

Raccomandazioni sul test HR-HPV come test di screening primario

2^ Edizione

Versione elaborata dal Gruppo di lavoro GISCI 1° livello “HPV test: formazione e valutazione degli indicatori di qualità”

Referenti:

Francesca Maria Carozzi, Annarosa Del Mistro

Partecipanti:

Simone Barocci
Simonetta Bisanzi
Simonetta Bulletti
Elena Burroni
Daniela Butera
Stefania Cannistrà
Elena Cesarini
Dino Della Giustina
Laura De Marco
Elisabetta Depetrini
Giulia Fantacci
Helena Frayle
Cristina Fodero
Anna Gillio Tos
Alessandra Mongia
Manuela Monica
Giampaolo Pompeo
Maria Teresa Sandri
Cristina Sani
Ezio Venturino
Maria Zucca

Versione definitiva discussa ed approvata dal Gruppo e successivamente ratificata dall'Assemblea GISCI il 15/06/2017

Raccomandazioni sul test HR-HPV come test di screening primario

Indice

1. Il programma di screening con test HPV e citologia di triage
2. Obiettivi del documento
3. Gestione dei campioni
 - 3.1 Il prelievo nello screening con HPV primario
 - 3.2 Identificazione dei campioni e tracciabilità
4. Il test molecolare HPV DNA nello screening
5. Centralizzazione delle analisi di primo livello (test HPV e citologia di triage)
 - 5.1 Carichi di lavoro
 - 5.2 L'organizzazione del laboratorio HPV
 - 5.3 Movimentazione dei campioni HPV-positivi per la citologia di triage
 - 5.4 Archiviazione e smaltimento dei campioni dopo l'esecuzione del test HPV
6. Formazione del personale
7. Procedure di controllo di qualità per i test molecolari
 - 7.1 Controllo di qualità interno (CQI)
 - 7.2 Caratteristiche dei programmi di valutazione esterna di qualità (VEQ) per test HPV di screening
8. Indicazioni per la refertazione del test HPV e della lettera di risposta alla donna
9. Indicatori prestazionali
 - 9.1 Indicatori del processo pre-analitico, analitico e post-analitico
 - 9.2 Verifica delle prestazioni del laboratorio mediante i cicli della VEQ e i controlli interni
 - 9.3 Controllo periodico degli indicatori epidemiologici
- 10 BIBLIOGRAFIA

1. Il programma di screening con test HPV e citologia di triage

La persistenza dell'infezione con tipi ad alto rischio di HPV (HR-HPV) è la condizione necessaria per lo sviluppo del carcinoma della cervice e dei suoi precursori. Il carcinoma della cervice uterina è attribuibile nella quasi totalità dei casi (99%) ad HPV. In questo contesto solo l'infezione da HPV ad alto rischio (tipi 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) (1) ha rilevanza clinica, per cui il termine "Test HPV" nello screening indica la ricerca di sequenze dei soli HR-HPV.

I risultati degli studi clinici randomizzati sull'applicazione di test molecolari per la ricerca di HPV nei programmi di screening hanno dimostrato che in donne di età superiore a 30 anni il test HPV è più efficace del pap test nel rilevare la presenza o il rischio di sviluppare carcinomi e lesioni di alto grado (2). Inoltre, i risultati dei progetti di fattibilità condotti dal 2007 in varie Regioni hanno dimostrato la fattibilità in termini organizzativi della strategia con test HPV e la buona accettazione da parte delle donne (3-7).

Il nuovo Piano Nazionale della Prevenzione (PNP 2014-2018) prevede che le Regioni riconvertano i loro programmi di screening dal pap test al test HPV per le donne al di sopra dei 30-35 anni di età entro il 2018, seguendo il protocollo definito nel rapporto di Health Technology Assessment (HTA) pubblicato nel 2012 (8). L'aggiornamento delle linee guida europee, pubblicate a settembre 2015 (9), prevedono l'introduzione del test HPV di screening con un protocollo assolutamente analogo a

quello riportato nel documento HTA italiano: test HPV da solo (non cotesting) e pap test di triage solo nelle donne HPV positive. Il protocollo applicato in Italia è più conservativo di quello delle linee guida europee.

Il protocollo raccomandato è riportato in Figura 1:

- se il test HPV è negativo, la donna verrà invitata a ripetere il test di screening dopo cinque anni
- se il test HPV è positivo, si esegue la citologia di triage
 - o se il pap di triage è negativo, il protocollo prevede ripetizione del test HPV a 1 anno e colposcopia in caso di persistenza dell'infezione HPV;
 - o se il pap di triage è positivo, il protocollo prevede colposcopia immediata.

Il protocollo italiano, basato sulle linee guida europee, non prevede l'uso della genotipizzazione, neanche parziale, o altri biomarcatori (10), che sono tuttora oggetto di valutazione in progetti di ricerca.

Il protocollo con test HPV primario nelle donne sopra i 30 anni prevede l'utilizzo di test clinicamente validati e la centralizzazione del test HPV e della citologia di triage in laboratori di grandi dimensioni.

2. Obiettivi del documento

Questo documento contiene elementi e raccomandazioni utili per i laboratori coinvolti nel percorso di screening per il carcinoma della cervice con test HPV come test primario. Vengono analizzati e dettagliati i diversi aspetti di competenza del laboratorio, dal prelievo alla fase analitica, alla modalità di refertazione e comunicazione dei risultati, nonché di gestione di campioni critici o risultati diversi dall'atteso. Con l'implementazione della nuova strategia di screening, è importante avviare un percorso di adeguamento delle modalità operative che coinvolga l'intero processo di laboratorio.

Il documento contiene indicazioni da inserire nelle specifiche procedure operative (o istruzioni di lavoro) per eventuali adeguamenti certificativi e di accreditamento delle strutture.

3. Gestione dei campioni

Le modalità di prelievo e di identificazione dei campioni rappresentano un aspetto importante e vincolante per la gestione delle fasi preanalitiche ed analitiche in laboratorio; è fondamentale che i laboratori siano coinvolti nella valutazione preliminare dei sistemi di prelievo.

In particolare, si suggerisce di inserire in fase di stesura dei capitolati di gara una attribuzione di punteggi qualitativi associati a:

- stabilità del campione prelevato sia per HPV che per citologia
- possibilità di eseguire ripetizioni del test HPV e della eventuale citologia in caso di problematiche tecniche, così da non dover richiamare la donna
- compatibilità del sistema di prelievo con almeno due o più test HPV validati per lo screening
- liquidi conservanti utilizzabili nei centri prelievo ed in laboratorio senza necessità di cappe aspiranti o altri dispositivi non di uso routinario
- modalità di smaltimento dei campioni residui
- eventuali limiti per lo stoccaggio ed il trasporto.

Le frasi di rischio associate al mezzo di prelievo hanno un interesse significativo sia in termini di materiale da smaltire che di sicurezza per pazienti ed operatori.

3.1 Il prelievo nello screening con HPV primario

Il programma con HPV primario prevede l'esecuzione del pap test di triage nei casi HPV positivi: le modalità di prelievo devono essere compatibili con questo processo.

Il prelievo può essere:

- unico, cioè essere adeguato sia per la ricerca dell'HPV sia per la lettura della citologia di triage, nel caso si utilizzi un contenitore (vial) con liquido preservante come quelli già in uso per la citologia in fase liquida,
- doppio, nel caso in cui il pap test sia allestito in modo convenzionale: in questo caso, viene fatto un primo prelievo per la citologia convenzionale (da colorare e leggere solo nel caso di test HPV positivo) ed un secondo prelievo per il test HPV.

Per ulteriori informazioni sulle modalità di prelievo si rimanda allo specifico documento GISCi "Indicazioni per il prelievo nello screening del carcinoma cervicale" (11).

3.2 Identificazione dei campioni e tracciabilità

Il campione deve essere identificato con un codice a barre associato in modo univoco all'anagrafica, alla provenienza e all'episodio di screening, assegnato al momento dell'invito. L'etichetta con il codice deve riportare anche nome e cognome e data di nascita.

Al fine di garantire la tracciabilità del campione, devono essere utilizzati strumenti informatici in grado di assicurare l'esatto abbinamento tra il campione e l'anagrafica dell'utente in tutte le fasi del percorso.

L'etichetta con il codice a barre dovrebbe essere stampata direttamente in ambulatorio dall'operatore che effettua il prelievo al momento dell'accettazione; in alternativa, per i programmi che non dispongono di stampanti per etichette in sede di prelievo, può essere utilizzata l'etichetta allegata alla lettera di invito.

La qualità della stampa delle etichette deve essere costante e garantita nel tempo da ciascun centro prelievo, in quanto sia la strumentazione per il test HPV che quella per la preparazione del vetrino dalla fase liquida hanno criteri molto stringenti di qualità del codice a barre al fine di effettuare la 'lettura' in modo automatico ed evitare errori. Ogni centro screening ha più ambulatori sul territorio e tutti i centri prelievo devono essere ben informati dal Responsabile screening anche su questi aspetti tecnici legati alle modalità di corretta identificazione del campione. La qualità delle etichette può essere inserita nei capitolati di gara per la fornitura di etichette e/o per gli inviti.

Il gestionale di screening deve trasmettere al gestionale (LIS) del laboratorio centralizzato i dati anagrafici della donna, la data di prelievo e, dove previsto, le notizie cliniche.

Devono inoltre essere definite le modalità di trasporto dei campioni dai punti prelievo al laboratorio, in modo da rispettare le disposizioni di legge per i campioni biologici e le caratteristiche del sistema di prelievo utilizzato, nonché le tempistiche di arrivo al laboratorio.

Si raccomanda il massimo coinvolgimento del laboratorio nella stesura e nella verifica dei protocolli e istruzioni di lavoro relativi alla fase del prelievo, di conservazione ed invio del materiale biologico.

4. Il test molecolare HPV DNA nello screening

Nello screening cervicale il test HPV può essere usato come test di screening primario, come test di triage per ASC-US (e LSIL nelle donne >35 anni), e nel follow-up delle pazienti trattate per lesioni \geq CIN2-3. In qualsiasi contesto avvenga, il test HPV utilizzato deve essere validato per lo screening (12, 8).

Nello screening la ricerca di HPV DNA rappresenta un test di rischio oncogeno ed i test molecolari applicabili in un contesto di screening devono avere una sensibilità e una specificità clinica per lesioni di alto grado conformi alle raccomandazioni fatte dal gruppo di esperti internazionali (12). Nello screening, la performance del test HPV non deve essere misurata su una maggior capacità di

individuare poche copie virali (elevata sensibilità analitica) ma sulla capacità di evidenziare le infezioni da HPV clinicamente rilevanti (elevata sensibilità clinica).

Per l'elenco aggiornato dei test validati si rinvia al documento GISCI-ONS "Test HPV validati per lo screening del carcinoma della cervice uterina" (aggiornato a cadenza annuale) (13).

Il sistema utilizzato deve essere in grado di individuare tutto il gruppo di HPV ad alto rischio (HR-HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) (1) come pool, mentre la genotipizzazione tipo specifica, anche parziale, non è inserita nell'attuale protocollo.

Oltre alle caratteristiche del test, è importante tenere anche conto del grado di automazione dei sistemi analitici e preanalitici nonché del numero di esami che possono essere eseguiti giornalmente dalla strumentazione (14).

5. Centralizzazione delle analisi di primo livello (test HPV e citologia di triage)

La ricerca di sequenze HR-HPV come test primario dello screening deve essere effettuata in laboratori di strutture del SSN, accreditate secondo le normative ministeriali e regionali per l'attività di laboratorio in generale e per l'attività nell'ambito degli screening oncologici, laddove già predisposte.

Per garantire un ottimale utilizzo delle risorse e un'elevata qualità, sia il test HPV che la citologia di triage devono essere centralizzati in laboratori di riferimento (8, 15) con esperienza consolidata in test molecolari e nella lettura di pap test di screening.

La riconversione del programma di screening della cervice dal pap primario ad HPV primario offre l'opportunità a livello regionale per ripensare alla riorganizzazione dei processi, e le modalità di centralizzazione dei laboratori devono essere definite e gestite fin da subito.

Poiché nello screening coesistono due percorsi, diversificati per età della donna (pap test per la fascia più giovane e test HPV più pap test di triage per le donne sopra i 30 anni) e che anche per il pap test è raccomandata la centralizzazione, diventa utile e auspicabile che entrambi i test vengano effettuati in un unico laboratorio. In tal caso, la modalità di centralizzazione del test HPV deve tenere conto anche dei volumi di attività previsti dalle linee-guida nazionali sui laboratori che effettuano citologia di screening (numero minimo PAP test per laboratorio è pari a 15.000 all'anno).

La centralizzazione facilita l'efficienza e la specializzazione, consente un'elevata qualità nell'offerta del percorso di screening, una gestione programmabile e modulabile della fase di transizione da screening citologico a screening HPV e determina una riduzione dei costi, sia per quanto concerne l'acquisto/affitto dei macchinari, sia per il personale.

Il numero di campioni gestito nell'arco di un anno da un laboratorio HPV centralizzato dovrà essere indicativamente non inferiore a 40.000 e fino a 100.000 o più.

Il numero massimo dei test effettuabili non ha di per sé un limite (l'utilizzo di piattaforme dedicate permette l'automazione di tutte le fasi, pre-analitiche e analitiche), ma è funzionale alle caratteristiche territoriali, alle necessità logistiche e agli spazi di cui il laboratorio dispone. Per gestire volumi molto elevati di campioni, il laboratorio deve disporre di spazi idonei alla corretta conservazione dei campioni e dei reagenti, nel rispetto dei parametri di sicurezza, soprattutto nel caso di utilizzo di mezzi di conservazione contenenti metanolo o altri alcoli.

Nelle regioni di piccole dimensioni, il laboratorio unico centralizzato potrà effettuare un numero di test inferiori a quanto sopra indicato.

5.1 Carichi di lavoro

A differenza di quanto avviene per la citologia di screening, per i test HPV non ci sono carichi stimati per il numero annuo massimo e minimo di test HPV di screening da eseguire e/o validare per ciascun professionista.

Sulla base del workload della strumentazione presente sul mercato e delle attività gestionali da esse derivate, si può ragionevolmente valutare che in un laboratorio che effettua circa 100.000 test HPV all'anno, la gestione routinaria dell'attività di screening (accettazione, esecuzione del test HPV,

refertazione) necessiti di 3-4 TSLB (a seconda del grado di automazione del sistema analitico usato) e 3 dirigenti sanitari completamente dedicati.

La possibilità di gestire all'interno della stessa struttura sia le attività relative al test HPV che alla citologia di triage permette una migliore gestione del percorso dei campioni; in questo caso, dovrà essere previsto anche il personale per l'allestimento, la lettura e la refertazione delle citologie di triage, secondo le indicazioni contenute nel documento GISCi "La citologia di triage nei programmi di screening con HPV come test primario" (16).

5.2 L'organizzazione del laboratorio HPV

In dettaglio, per quanto riguarda il test HPV, il laboratorio dovrà:

- Predisporre protocolli e specifiche istruzioni operative per ogni fase, in cui identificare e indicare i parametri di qualità del test (vedi paragrafo: controlli di qualità interni, CQI) e gli interventi previsti in caso di mancato rispetto dei parametri di qualità analitici e tecnico-organizzativi;
- Adottare un protocollo per la valutazione ed elaborazione continua dei dati di laboratorio;
- Garantire la completa tracciabilità del processo dal momento del ricevimento del campione e dei relativi dati identificativi al momento dell'emissione del referto (processo integrato con le attività pre- e post-analitiche), inclusa, ove prevista, la citologia di triage;
- Effettuare per ogni seduta analitica: registrazione e monitoraggio dei materiali di controllo utilizzati, risposte fornite, approvazione da parte degli operatori, tracciabilità e operazioni su ogni singolo campione (documentazione della corretta revisione dei risultati prima del rilascio, come previsto ad esempio da ISO-15189);
- Partecipare ad almeno uno dei programmi di Valutazione Esterna di Qualità, VEQ (vedi paragrafo valutazione esterna della qualità);
- Definire le modalità di costruzione, verifica e conservazione delle carte di controllo degli strumenti e dei risultati analitici;
- Conservare la documentazione dei controlli di qualità (CQI per 1 anno e VEQ per 3 anni), e delle azioni correttive;
- La strumentazione deve essere sottoposta a tutte le normali procedure e verifiche previste dalla buona pratica di laboratorio per gli esami molecolari;
- Eseguire e registrare gli interventi di manutenzione preventiva, ordinaria e straordinaria della strumentazione;
- Gestire il magazzino: tempistiche arrivo del materiale, non conformità interne o dei fornitori;
- Collaborare con le altre strutture coinvolte nel programma di screening all'analisi dei propri dati e di quelli complessivi del programma di screening;
- Garantire la formazione specifica e il continuo aggiornamento degli operatori coinvolti.

5.3 Movimentazione dei campioni HPV-positivi per la citologia di triage

I prelievi in fase liquida risultati HPV-positivi e i vetrini convenzionali delle donne con test HPV positivo devono essere identificati e gestiti per l'allestimento e la lettura della citologia di triage.

Il gestionale di laboratorio, integrato al gestionale di screening, deve essere in grado di produrre una lista dei campioni HPV-positivi per cui allestire/colorare e leggere il pap test di triage.

Nel caso in cui il laboratorio di citologia sia esterno alla struttura sede del laboratorio HPV, vanno definite le modalità di invio dei campioni, in modo da garantire la tracciabilità di tutti i passaggi e la corretta gestione dei dati analitici. Inoltre, devono essere previste modalità di collaborazione congiunta per la valutazione dei dati analitici e di processo.

5.4 Archiviazione e smaltimento dei campioni dopo l'esecuzione del test HPV

I campioni risultati negativi al test HPV e i vetrini strisciati di donne con test HPV negativo (che non devono essere colorati o conservati) vanno smaltiti secondo le normative di legge a partire dal giorno successivo alla refertazione.

I campioni risultati positivi al test HPV possono essere smaltiti secondo le normative di legge una volta effettuata la lettura del pap test di triage.

Dopo la lettura, i pap test di triage delle donne HPV positive devono essere conservati secondo la normativa vigente.

6. Formazione del personale

La ricerca di sequenze HPV è basata su metodiche di biologia molecolare che richiedono una specifica competenza professionale. Il personale che effettua e referta il test HPV in ambito di screening deve avere esperienza consolidata in metodiche di biologia molecolare e deve ricevere un adeguato percorso formativo specifico.

La formazione deve essere contestualizzata al settore di applicazione, cioè a come il test è inserito nel processo dello screening (algoritmo dello screening, indicatori di performance di laboratorio e di percorso, modalità di raccolta e analisi dei dati).

E' inoltre fondamentale che il personale sia coinvolto e partecipi alle valutazioni dei programmi di screening effettuati in ambito nazionale (GISCI, ONS) e in ambito regionale.

Le riunioni regionali sugli screening oncologici, previste con cadenza annuale in diverse regioni, sono un utile momento di confronto e di formazione, da incentivare e da implementare. All'interno del laboratorio occorre inoltre prevedere riunioni periodiche di confronto sulle problematiche incontrate e sui risultati dei test HPV e della citologia di triage, nonché dei relativi controlli di qualità interni ed esterni.

Il Biologo / Medico impegnato nell'organizzazione e gestione del laboratorio HPV e nella refertazione degli esami deve essere in grado di programmare la formazione e l'attività del personale e di analizzare, comprendere, risolvere eventuali problematiche tecniche, informatiche, di valutazione e validazione dei risultati.

Programmare la formazione significa in questo contesto tracciare un percorso che consenta ad ogni operatore di affrontare il carico di lavoro routinario di propria competenza (inclusa la gestione delle criticità e degli imprevisti nelle diverse fasi) in completa autonomia.

Sia il personale tecnico che i dirigenti devono ricevere una formazione specifica sulla strumentazione in uso, da registrare su un record individuale.

7. | Procedure di controllo di qualità per i test molecolari

Un programma di assicurazione di qualità è un processo complesso che deve ricomprendere le modalità di gestione dei campioni in tutte le fasi, l'esecuzione delle analisi, i controlli di qualità interni, il monitoraggio di indicatori di processo, la partecipazione a programmi di controllo di qualità esterno, la rivalutazione e analisi dei casi falsi-negativi o dei cancri di intervallo.

Ciascun laboratorio deve descrivere questi processi in appositi documenti (protocolli operativi o istruzioni operative) che dovranno esplicitare anche:

- Gli scostamenti significativi dei valori ottenuti per il CQI (ISO 15189)
- Gli scostamenti significativi nell'ambito dei programmi di VEQ (ISO 15189)
- Le Azioni Correttive intraprese in caso di dati anomali
- Le modalità di registrazione e gestione delle non conformità, incluse quelle della fase preanalitica
- Le modalità di gestione dei campioni HPV positivi per l'esecuzione della citologia di triage
- La gestione degli errori e dei ritardi nelle tempistiche di esecuzione dell'esame o dell'invio dei risultati.

7.1. Controllo di qualità interno (CQI)

In tutti i laboratori devono essere definiti e attivi controlli di qualità intra-laboratorio, archiviati giornalmente.

Il CQI consente di valutare e controllare le prestazioni analitiche di un sistema e di verificare la stabilità del metodo analitico nel breve, medio e lungo termine.

Il CQI consente di verificare l'imprecisione del metodo, evidenziare variazioni e fornire allarmi in tempo reale, così da attivare immediatamente azioni correttive prima dell'emissione dei referti relativi ai campioni analizzati nel corso della seduta (17).

I materiali di controllo utilizzati dovrebbero avere caratteristiche chimico-fisiche il più possibile simili ai campioni dei pazienti e devono seguire l'intera fase di processazione utilizzata per i campioni.

All'interno dei kit dei test HPV sono forniti controlli / calibratori (negativi e positivi), che definiscono la validità della seduta e in alcuni sistemi anche il cut-off del test. Oltre a questi, all'interno del kit possono essere presenti anche controlli di qualità 'interni' aggiuntivi, sempre forniti dal produttore.

Con questi controlli le metodiche risultano 'auto-consistenti' e non totalmente soddisfacenti sotto l'aspetto dei requisiti normativi e metodologici.

Da qui l'importanza di inserire l'utilizzo di materiali di controllo di terza parte, anche in assenza di valori certificati, per evidenziare eventuali spostamenti sistematici della serie analitica.

E' fortemente consigliato quindi inserire in ogni seduta controlli interni indipendenti (di terza parte), da usare sistematicamente (ogni giorno, in ogni piastra o set di piastre, ad ogni cambio di lotto del test in uso).

Questi materiali possono essere commerciali o preparati all'interno del laboratorio. In quest'ultimo caso il laboratorio può preparare i CQI utilizzando materiale residuo di campioni precedentemente analizzati, anche costruendo pool di più campioni in modo da usare lo stesso materiale di controllo per un arco di tempo il più lungo possibile.

Questa modalità è da preferirsi perché consente un monitoraggio a lungo termine della precisione del metodo, della sua stabilità e riproducibilità dei risultati anche quando più operatori sono coinvolti nello stesso processo.

Utilizzando materiale privo di un valore assegnato sarà indispensabile ottenere una stima del valore atteso, che dovrà essere conservata con la documentazione specifica.

Ogni fase della preparazione dei controlli interni deve essere pre-definita e registrata, ed effettuata in modo da garantire la corretta selezione dei campioni.

La preparazione della nuova serie dei controlli deve sempre essere pianificata prevedendo la sovrapposibilità all'ultimo panel utilizzato.

Sarebbe auspicabile che nelle regioni in cui i test HPV di screening sono effettuati da più laboratori dedicati, i laboratori condividessero lo stesso protocollo per l'utilizzo dei controlli interni o ancor più preferibile che usassero lo stesso controllo interno.

Si raccomanda:

- l'uso di materiali di controllo su almeno due livelli distinti (negativo/positivo; positivo debole/positivo forte) da inserire nella singola seduta analitica;
- di definire l'imprecisione massima accettabile tra le diverse sedute analitiche, espressa come coefficiente di variazione (CV) in base al test utilizzato.

E' fortemente consigliato l'ausilio di sistemi informatici dedicati alla gestione del controllo di qualità interno.

7.2 Caratteristiche dei programmi di valutazione esterna di qualità (VEQ) per test HPV di screening

I laboratori hanno l'obbligo di partecipare a programmi di VEQ per tutti gli esami eseguiti e questo rappresenta anche un pre-requisito per i procedimenti di accreditamento e certificazione (ISO

15189). Le VEQ permettono di produrre dati che consentono al singolo laboratorio di confrontarsi con gli altri (accuratezza).

Scopi fondamentali dei programmi di VEQ sono la valutazione dell'uniformità dei risultati ottenuti in laboratori differenti, e la valutazione comparativa di metodi differenti.

In riferimento al test HPV usato nello screening, i programmi di VEQ attualmente disponibili presentano delle criticità, soprattutto in relazione al tipo di materiale utilizzato per la preparazione del panel da testare (preparazione sintetica o campione biologico; tipo di mezzo di conservazione; tipi HPV inclusi; carica virale), e all'analisi dei risultati (pochissimi programmi di VEQ per HPV disponibili sul mercato forniscono un'analisi specifica per test HPV eseguito in contesto di screening) (18). In particolare:

- In alcuni metodi i materiali forniti tendono a comportarsi in maniera diversa rispetto al materiale biologico oggetto del test. Quindi, a volte, la performance verificata con questi materiali può non coincidere con la performance analitica nell'analisi dei campioni biologici, cioè, in definitiva, con quello che interessa conoscere.
- Alcuni programmi forniscono i controlli in forma liofilizzata e questo consente di rispendere il materiale con lo specifico mezzo di conservazione utilizzato nel laboratorio, introducendo però la variabilità legata alla ricostituzione del liofilo.
- Analogamente, raramente i programmi di VEQ disponibili forniscono una valutazione di performance clinica, ma anche in questo caso non sempre si tiene conto della sensibilità clinica a cui i test HPV di screening sono settati, e quindi un risultato può essere valutato in modo non coerente al contesto di screening.
- Recentemente la Regione Toscana ha avviato un programma di VEQ specifico per HPV primario a cui possono aderire i laboratori che effettuano test HPV di screening sul territorio nazionale.

In ogni caso, i programmi di VEQ rappresentano un indispensabile complemento dei programmi di CQI, perché forniscono una valutazione comparativa della qualità analitica del singolo laboratorio rispetto a quella del gruppo di laboratori partecipanti.

Pertanto uno degli obiettivi che il GISCi si propone è promuovere la partecipazione dei centri di screening a programmi di VEQ specifici per le caratteristiche che il test HR-HPV ha nel programma di screening.

Nella scelta di quale programma di VEQ utilizzare occorre tenere presente e valutare attentamente se:

- ¶ VEQ specifiche per il test HPV di screening
- ¶ Numerosità dei laboratori partecipanti con il sistema analitico del laboratorio: per ottenere un'informazione statisticamente utile è necessaria la partecipazione di almeno 8 strutture di screening
- ¶ Numero dei cicli offerti e modalità di invio del materiale da parte del gestore nel corso dell'esercizio
- ¶ Esperienza maturata dal gestore nello specifico programma di VEQ
- ¶ Tipologia di report presentato (tempestività, completezza, chiarezza, facilità di lettura, possibilità di interagire).

Le rielaborazioni periodiche dei dati forniti dai laboratori partecipanti ad un ciclo di VEQ rappresentano una evidenza significativa dello stato dell'arte dei metodi e costituiscono la strategia più semplice per evidenziare differenze tra i metodi validati.

8 | Indicazioni per la refertazione del test HPV e della lettera di risposta alla donna

È auspicabile uniformare i moduli di risposta del test HPV utilizzati nei vari programmi di screening. Il risultato analitico del test HPV (trasferito dal sistema di analisi al gestionale di

laboratorio con generazione di un referto che dovrebbe preferibilmente essere firmato digitalmente), deve poi essere trasferito nel gestionale di screening.

L'esito del test HPV di screening deve prevedere le opzioni descritte in Tabella 1.

Tabella 1: Descrittiva esito HPV da inserire nei referti di laboratorio e nella lettera di risposta che viene inviata alla donna

Codice informatico	Esito test HPV associato	Descrittiva referti laboratorio	Descrittiva lettera di screening
1	Negativo	Negativo, cioè non è stata evidenziata la presenza di tipi ad alto rischio di Papilloma Virus	Negativo, cioè non è stata evidenziata la presenza di tipi ad alto rischio di Papilloma Virus
2	Positivo	Positivo, cioè è stata evidenziata la presenza di uno o più tipi ad alto rischio di Papilloma Virus	Positivo, cioè è stata evidenziata la presenza di uno o più tipi ad alto rischio di Papilloma Virus
3	Non eseguibile	Non eseguibile	Non eseguibile [^] [^] Il campione può risultare non eseguibile per vari motivi: materiale insufficiente, provetta vuota, provetta non idonea, campione non conservato correttamente, prelievo non eseguito correttamente
4	Inadeguato tecnico	Non valutabile	Non valutabile [^] [^] Il campione può risultare non valutabile quando il materiale è insufficiente o non idoneo.
5	Non valutabile	Non valutabile	Non valutabile [^] [^] Il campione può risultare non valutabile quando il materiale è insufficiente o non idoneo.

La lettera di risposta da inviare alla donna deve riportare i risultati di tutti i test effettuati (test HPV o test HPV e pap test di triage) ed il consiglio clinico che ne deriva (come specificato più avanti).

In particolare, per lo screening con HPV primario la lettera di risposta deve essere semplice e facilmente comprensibile per le donne, ma al contempo deve essere esauriente per i ginecologi e gli altri operatori degli screening, e non dare adito a problematiche interpretative.

La lettera di risposta deve riportare:

- l'esito del test in modo semplice, con un linguaggio immediato “positivo/negativo/inadeguato/non valutabile” o con frasi del tipo “è stata/non è stata evidenziata la presenza di HPV ad alto rischio”;
- l'esito dell'eventuale citologia di triage (stesse modalità di refertazione del pap test primario);
- il laboratorio in cui è stato effettuato il test HPV e dove è stato letto il pap test di triage (con relativo nome del professionista che ha refertato gli esami ed eventualmente anche del responsabile del laboratorio);
- il metodo ‘validato per lo screening’ utilizzato per la ricerca di HPV; l'elenco dei tipi HPV che il metodo può rilevare.

Inoltre, la risposta del test di screening con HPV primario, così come è per il Pap test primario, deve comprendere:

- in caso di test HPV negativo, l'indicazione del successivo round di screening previsto dal programma;

- in caso di test HPV positivo, l'indicazione del percorso successivo (invio in colposcopia o richiamo ad un anno).

La risposta deve ricomprendere informazioni semplici e chiare sul perché, in presenza di un test HPV positivo e citologia negativa, il protocollo prevede un richiamo ad un anno.

Nel caso di metodi in grado di fornire un dato semi-quantitativo o di metodi in grado di dare una genotipizzazione parziale, questo dato non deve essere riportato nella risposta alla donna. Questo perché non c'è un protocollo differenziato per tipo di HPV e perché nel caso di test HPV ripetuti (sia per triage ASC-US, follow-up o test di screening primario), un valore 'semi-quantitativo' aumentato rispetto ad un esame precedente non indica necessariamente un aumento della carica virale perché il dato non è normalizzato rispetto alla cellularità del campione; questi concetti, assolutamente scontati per gli addetti ai lavori, potrebbero indurre ripetizioni del test dopo un periodo di tempo inferiore rispetto a quanto sia in realtà necessario o indurre a sovra-trattamento. Analogamente, la definizione del tipo di HPV presente non determina al momento una modifica dell'iter diagnostico-terapeutico.

I modelli di risposta sono disponibili sul sito del GISCi all'interno del 'TOOL BOX'.

9. Indicatori prestazionali

9.1. Indicatori del processo pre- analitico, analitico e post-analitico

Per valutare e monitorare le caratteristiche della procedura in esame, e per ottenere informazioni utili al miglioramento dell'attività, è opportuno l'uso di indicatori che permettano di analizzare in dettaglio i fattori organizzativi, strumentali e procedurali ritenuti più critici nelle diverse fasi dello screening con test HPV.

Il monitoraggio delle Non Conformità è uno strumento fondamentale per la costruzione di indicatori di monitoraggio del processo analitico.

Sulla base delle esperienze maturate dai programmi HPV che sono partiti sin dal 2013, si possono configurare varie tipologie di non conformità:

Non conformità della fase pre-analitica

Sono da considerare tutte quelle situazioni per cui il campione non è idoneo per eseguire l'esame:

Al momento del controllo dei campioni vi è la possibilità di evidenziare anomalie che sospendono o impediscono la presa in carico del campione:

1. Data prelievo non conforme alla processazione
2. Mancanza della firma sul modulo della privacy (ove previsto invio della scheda cartacea)
3. Il contenitore del campione non è identificato o è senza codice a barre
4. Il contenitore del campione è scaduto
5. Il contenitore del campione è non conforme (es. non idoneo, o chiuso male, o rotto, con conseguente perdita di materiale biologico, o vuoto).
6. Barcode non leggibile
7. Mancata corrispondenza tra dati su contenitore del campione e file informatico e/o lista cartacea
8. Mancata corrispondenza tra dati su contenitore del campione e scheda anamnestica
9. Altro (specificare)

Non conformità della fase-analitica

Uno o più campioni possono risultare non valutabili nel corso dell'analisi; a seconda della causa e del metodo in uso, il campione può essere ripetuto; questa modalità e le azioni conseguenti vanno previste nell'Istruzione Operativa, e vanno registrati tutti i casi di campioni o piastre non valutabili.

Non conformità della fase post-analitica

Sono da considerare tutte quelle situazioni per le quali la trasmissione del dato non avviene regolarmente:

- Mancato trasferimento dei risultati al sistema informatico del laboratorio.
- Mancato trasferimento del referto dal sistema informatico del laboratorio al gestionale screening.
- Referti non idonei per errori di stampa.

Le Non Conformità si possono ulteriormente classificare in:

- minori (che vengono risolte durante il processo operativo);
- maggiori (che **non** vengono risolte e quindi necessitano di un altro campione da parte dell'utente).

Il gruppo di lavoro propone come indicatore per il monitoraggio le sole Non Conformità MAGGIORI per tutte e tre le fasi (preanalitica, analitica e postanalitica).

Tipologia delle non conformità maggiori

- Contenitore non idoneo
- Provetta scaduta
- Barcode ripetutamente non leggibile
- Data del prelievo non consistente con indicazioni di stabilità indicate dal produttore
- Errata identificazione del campione
- Elevata frequenza di campioni non valutabili in laboratorio (per i test che danno questa indicazione)

Si consiglia la registrazione delle Non Conformità ad ogni seduta analitica ed una rielaborazione trimestrale.

Per i test che prevedono un controllo interno di adeguatezza del materiale, non esistono al momento indicazioni su valori accettabili e desiderabili e quindi dati standard di riferimento verranno definiti successivamente.

9.2 Verifica delle prestazioni del laboratorio mediante i cicli della VEQ e i controlli interni

I dati analitici dei controlli interni e di seduta devono essere registrati informaticamente e sottoposti ad analisti statistiche mensili o trimestrali, sulla base del carico di attività del laboratorio.

Per i programmi di VEQ il laboratorio dovrà definire le opportune azioni correttive in caso di scarti significativi dai risultati previsti (in termini di z- score, o di differenza %), analizzare e tenere la registrazione della valutazione dei singoli rapporti, indagando in dettaglio sulle eventuali cause di non accettabilità.

E' interesse del laboratorio valutare il metodo in uso in base alle risposte complessive fornite nei cicli di VEQ dai partecipanti con il proprio metodo/sistema, e utilizzare i rapporti periodici in fase di assegnazione dei punteggi qualitativi nei capitolati di gara, ai fini dell'acquisizione di nuova strumentazione.

Occorre prevedere dei report periodici interni al laboratorio sull'andamento delle VEQ da condividere con tutti gli operatori e Dirigenti coinvolti nell'attività.

9.3 Controllo periodico degli indicatori epidemiologici

Gli indicatori del percorso di screening con test HPV sono descritti in un apposito documento GISCI: “Il manuale degli indicatori per il monitoraggio dei programmi di screening con test HPV primario” (19), a cui si rimanda.

Di seguito si riportano i principali indicatori da monitorare in laboratorio:

- frequenza dei campioni HPV positivi (al test primario e al richiamo a 1 anno) per verificare variazioni di positività nel tempo. Il dato deve essere valutato almeno per classi di età decennali; si raccomanda l’attivazione di verifiche qualora l’indicatore assuma valori al di fuori dei seguenti range di accettabilità per il test primario al baseline:

- frequenza di test HPV inadeguati, smarriti o vuoti: accettabile <1%;
- frequenza dei pap test di triage positivi
- tempi di refertazione (test HPV e pap test di triage).

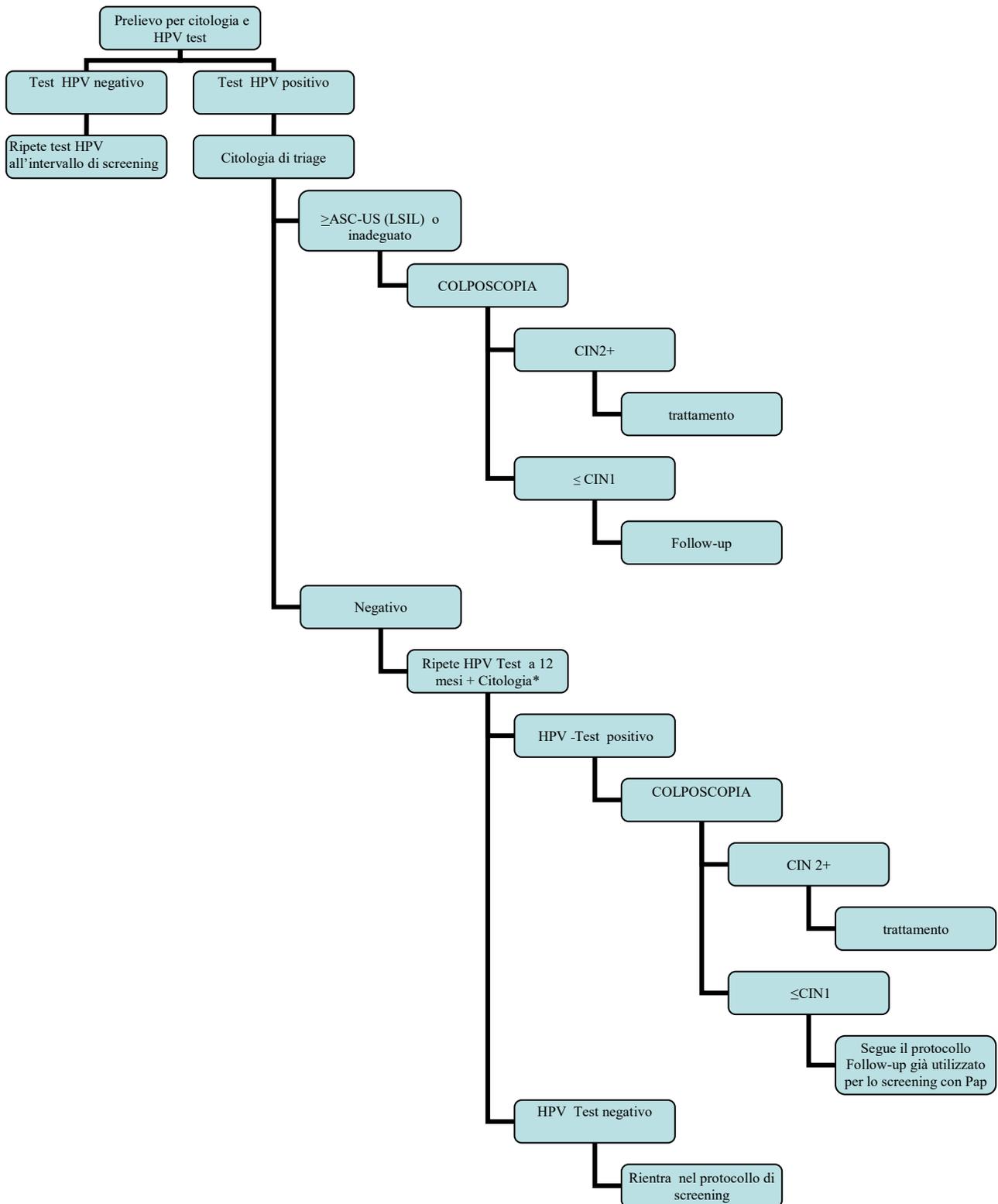
Nella **Tabella 2** sono riportati gli indicatori epidemiologici generali sulle prestazioni del test HPV raccomandati dal GISCI (19)

	Indicatore	Formula	Dati necessari	Note
Indicatori per il tempo zero				
3	Proporzione di test HPV positivi	HPV positivi / HPV totali *100	HPV positivi HPV totali	Calcolare per: - classe quinquennale d’età - primo esame vs successivi
4	Proporzione di test HPV inadeguati, smarriti o vuoti	HPV inadeguati, smarriti o vuoti / HPV totali *100	HPV inadeguati, smarriti o vuoti HPV totali	Registrare a parte eventuali piastre inadeguate
5	Proporzione di Pap test di triage positivi	Pap test di triage positivi / Pap test di triage totali *100	Pap test di triage positivi Pap test di triage totali	Sono letti i Pap test delle donne con test HPV+ Pap test positivo: ASC-US+ Calcolare per: - classe quinquennale d’età - primo esame vs successivi
6	Proporzione di Pap test di triage inadeguati	Pap test di triage inadeguati / Pap test di triage totali *100	Pap test di triage inadeguati Pap test di triage totali	Calcolare per: - primo esame vs successivi
7	Distribuzione dei Pap test di triage per categoria diagnostica	Singola categoria diagnostica / Pap test di triage totali * 100	Categorie diagnostiche dei Pap test di triage	Calcolare per: - classe quinquennale d’età - primo esame vs successivi
8	Tasso di invio a un anno	Donne inviate a un anno / donne screenate *100	Donne HPV+Pap- Donne screenate	Calcolare per: - classe quinquennale d’età - primo esame vs successivi
Indicatori per la ripetizione a un anno				
16	Proporzione di test HPV positivi alla ripetizione	HPV positivi alla ripetizione / HPV totali alla ripetizione *100	HPV positivi alla ripetizione HPV totali alla ripetizione	Calcolare per: - classe quinquennale d’età - primo esame vs successivi
18	VPP di HPV+ persistente per CIN2+	Donne sottoposte a colposcopia con diagnosi CIN2+ / donne sottoposte a colposcopia *100	Donne sottoposte a colposcopia alla ripetizione Donne sottoposte a colposcopia con diagnosi CIN2+ alla ripetizione	Calcolare per: - classe quinquennale d’età - primo esame vs successivi
Tempi di attesa				
27	Tempo fra esecuzione del prelievo e	Donne con test HPV refertato entro 21 giorni di	Data di esecuzione del prelievo Data di refertazione del test	Calcolare complessivamente per le donne con test HPV effettuato al tempo zero o alla ripetizione

	refertazione del test HPV	calendario / Donne con test HPV eseguito al tempo zero o alla ripetizione) *100	HPV Donne con test HPV eseguito al tempo zero Donne con test HPV eseguito alla ripetizione	
28	Tempo fra esecuzione del prelievo e invio della lettera con esito HPV+Pap-	Donne con invio della lettera con esito HPV+Pap- entro 30 giorni di calendario dalla data di prelievo / donne con esito HPV+Pap-	Data di esecuzione del prelievo Data di invio della lettera con esito HPV+Pap- Donne con esito HPV+Pap-	Calcolare per il tempo zero

Si raccomanda di condividere i valori relativi agli indicatori con il team responsabile coinvolto nell'assicurazione qualità del programma di screening nella sua globalità: personale medico, biologo, tecnico, infermieristico ed ausiliario coinvolto nell'intero percorso.

Figura 1. Protocollo screening cervicale con test HPV primario e citologia di triage.



*al richiamo a 12 mesi il risultato della citologia non modifica il protocollo

10. Bibliografia

1. Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens- Part B: Biological agents. *Lancet Oncol* 2009;10:331-332.
2. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, et al; International HPV screening working group. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomized controlled trials. *Lancet* 2014;383(9916):524-532.
3. Confortini M, Giorgi Rossi P, Barbarino P, et al. Screening for cervical cancer with the human papillomavirus test in an area of central Italy with no previous active cytological screening programme. *J Med Screen* 2010;17:79-86.
4. Zorzi M, Del Mistro A, Farruggio A, et al. Use of high-risk Human Papillomavirus DNA test as primary test in a cervical cancer screening programme: a population-based cohort study. *BJOG* 2013, 120:1260-1267.
5. Del Mistro A, Frayle H, Ferro A, et al, on behalf of the Veneto HPV-screening Working Group. Cervical cancer screening by high risk HPV testing in routine practice: results at one year recall of high risk HPV-positive and cytology-negative women. *J Med Screen* 2014;21:30-37.
6. Pasquale L, Giorgi Rossi P, Carozzi F, et al. Cervical cancer screening with HPV testing in the Valcamonica (Italy) screening programme. *J Med Screen* 2015;22:38-48.
7. Passamonti B, Gustinucci D, Giorgi Rossi P, et al. Cervical human papilloma virus (HPV) DNA primary screening test: Results of a population-based screening programme in central Italy. *J Med Screen* 2016 Sep 10. pii: 0969141316663580. [Epub ahead of print]
8. Ronco G, Biggeri A, Confortini M, et al. HTA report: Ricerca del DNA di papilloma virus umano (HPV) come test primario per lo screening dei precursori del cancro del collo uterino. *Epidemiol Prev* 2012;36 (3/4 suppl 1):e1-e72.
9. Von Karsa L, Arbyn M, De Vuyst H, et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination. *Papillomavirus Res* 2015;1:22-31.
10. Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Biomed Res Int* 2013;2013:519619.
11. Documento GISCI “Indicazioni per il prelievo nello screening del carcinoma cervicale”. 2016.
12. Meijer C, Berkhof J, Castle PE et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer* 2009;124:516-520.
13. Documento GISCI “Test HPV validati per lo screening del carcinoma della cervice uterina”. 2016.

14. Ratnam S, Jang D, Gilchrist J, et al. Workflow and maintenance characteristics of five automated laboratory instruments for the diagnosis of sexually transmitted infections. *J Clin Microbiol* 2014;52:2299-2304.
15. L'implementazione del DNA-HPV come test primario nei programmi italiani di screening del cervicocarcinoma. Indicazioni dai risultati del Progetto MIDDIR. Accessibile a: <https://www.cpo.it/workspace/files/report-mididir-aprile2016-571a18a7556a9.pdf>
16. Documento GISCI “La citologia di triage nei programmi di screening con HPV come test primario”. 2013.
17. Ottomano C, Ceriotti F, Galeazzi M, et al. Linee guida per gestione dei programmi di Controllo di Qualità Interno. *Biochimica Clinica* 2008;32:102-121.
18. Carozzi FM, Del Mistro A, Cuschieri K, Frayle H, Sani C, Burroni E. HPV testing for primary cervical screening: Laboratory issues and evolving requirements for robust quality assurance. *J Clin Virol* 2016;76:S22-S28.
19. Documento GISCI “Il manuale degli indicatori per il monitoraggio dei programmi di screening con test HPV primario”. 2016.

Appendice

Il documento ha avuto una prima edizione nel 2010, che viene sostituita dalla presente

La Versione della 1^ Edizione era stata elaborata:

- **dal Gruppo di lavoro GISCI: “Rivisitazione del ruolo del Pap test e dell’HPV-DNA test nell’era della vaccinazione anti-HPV”**
Coordinatori: Donatella Beccati, Massimo Confortini Basilio Passamonti
- **e dal Gruppo di lavoro GISCI: “Studio di concordanza inter-laboratorio e VEQ per test HPV-DNA”** **Coordinatore:**
Francesca Carozzi

Componenti:

1. Claudio Angeloni
2. Paolo Barbarino
3. Maria Benevolo
4. Stefania Benini
5. Simonetta Bulletti
6. Carla Cogo
7. Paolo Dalla Palma
8. Annarosa Del Mistro
9. Laura De Marco
10. Deborah French
11. Anna GillioTos
12. Paolo Giorgi Rossi
13. Lucia Giovannelli
14. Anna Iossa
15. Amedeo Lattanzi
16. Vincenzo Maccalini
17. Iva Maestri
18. Morena Malispina
19. Gioia Montanari
20. Federico Morigi
21. Irene Paganini
22. Antonella Pellegrini
23. Tatiana Raggi
24. Maria Teresa Sandri
25. Cristina Sani
26. Maria Luisa Schiboni
27. Vera Stornelli
28. M. Concetta Tufi
29. Manuel Zorzi

Versione definitiva discussa ed approvata nella riunione di consenso del 12 Aprile 2010 e successivamente ratificata dall’Assemblea GISCI il 28 maggio 2010