I controlli di qualità nella citologia e nel test HPV: così come sono organizzati sono ancora attuali?

Francesca Carozzi
Università degli Studi di Firenze - Docente a Contratto Citopatologia
Già Direttore SC Laboratorio Regionale Prevenzione Oncologica
ISPRO_Firenze

Conflitti di interesse: nessuno

Webinar GISCi, 15 giugno 2023

I Controlli di Qualità nello Screening: Citologia e HPV

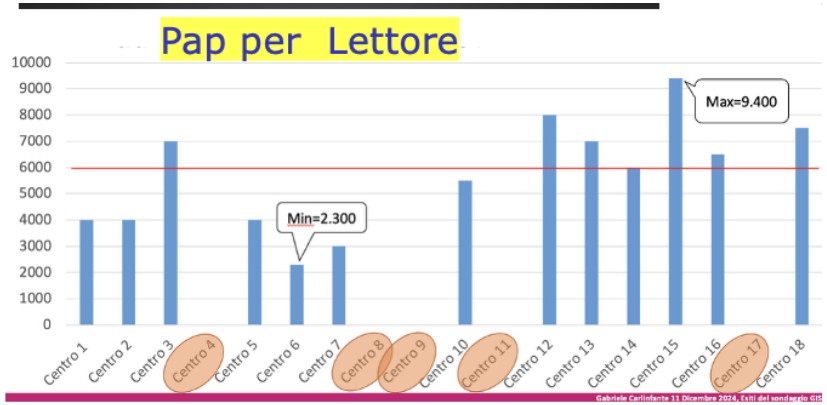
15 giugno 2023, 15:00 – 19:15

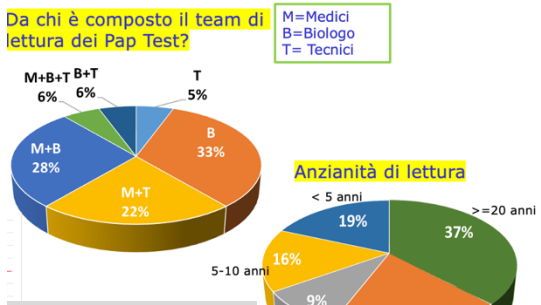
Sondaggio GISCI sulla Citologia di Screening: presentazione degli esiti

Gabriele Carlinfante
Azienda USL/IRCCS di Reggio Emilia

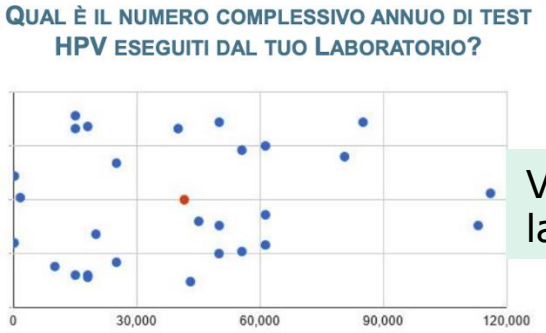
I CONTROLLI DI QUALITÀ A LIVELLO NAZIONALE: ESITO DEL SONDAGGIO

Laura De Marco
S.S. Screening Cervicocarcinoma - Centro Unificato Screening Cervico Vaginale
e
S. C. Epidemiologia dei Tumori – CRPT U





Personale coinvolto



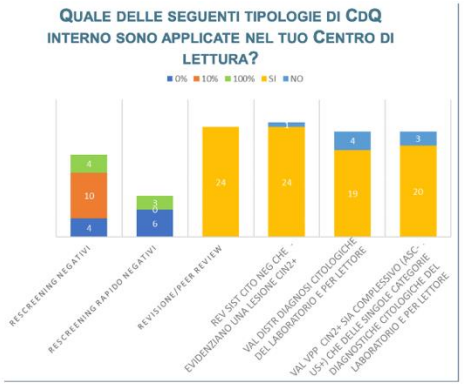
Volumi attività x lab HPV

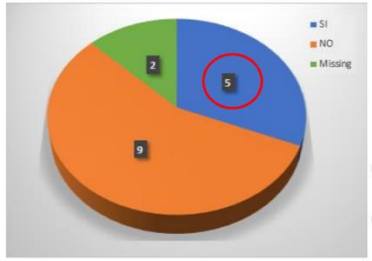
- Mediana: 41.500

Lowest values: 100, 170, 1600, 10000, 15000
Highest values: 61240, 80500, 85000, 113000, 116000

Missing: 2 (6,7%)
(laboratori che non eseguono test HPV)

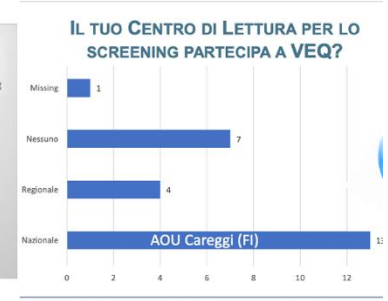
PAP: CQI e interlab



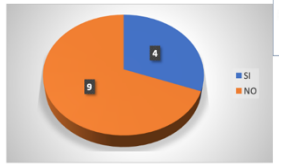


➢ Valutato come Regione

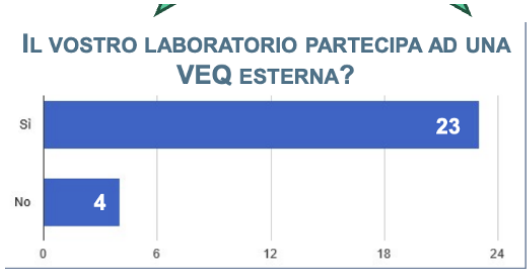
VEQ PAP



HPV: CQI e interlab



VEQ HPV



Le sfide attuali

Superare la Frammentazione regionale : alcune regioni hanno sistemi di QA robusti, altre meno strutturati.
I programmi nazionali più solidi favoriscono la **condivisione di dati e standard comuni**.

Citologia

- L'IA Avanza: i controlli di qualità si devono adeguare la struttura alle nuove tecnologie (Digital Pathology)
- Set di vetrini digitali interlabo
- Rivedere il ruolo delle Peer review
- Rivedere il ruolo del rescreening rapido
- Le Veq: un requisito 'obbligatorio' per l'accreditamento

Test HPV

- CQI e VEQ non solo "binari" (positivo/negativo) ma **multilivello** con maggiore complessità
- Proficiency Panel
- Audit di laboratorio sui casi negativi
- CQI e Veq specifiche per self sampling?
- Quale ruolo per il gene housekeeping?

5 Procedure di controllo di qualita`

5.1 Controllo di qualita` interno (CQI)

Si raccomanda l'introduzione dei seguenti controlli di qualità interni:

- Valutazione della distribuzione delle diagnosi citologiche per laboratorio e per lettore;
- Valutazione del VPP per CIN2+ sia complessivo (LSIL+) che delle singole categorie diagnostiche citologiche per laboratorio e per lettore;
- lettura collegiale (peer-review) dei quadri anormali e di difficile inquadramento (ASC-US vs negativi, ASC-US vs LSIL, inadeguati ecc..);
- revisione sistematica delle citologie negative che al successivo controllo ad un anno evidenziano una lesione CIN2 o più grave (CIN2+).

Possono essere introdotte altre forme di controllo di qualità interno, quali ad esempio la revisione rapida dei negativi di triage o la revisione del 10% dei negativi di triage, particolarmente indicato nelle situazioni in cui si rilevino scostamenti significativi nella distribuzione delle categorie diagnostiche.

5.2 Controllo di qualita` esterno (CQE)

Circolazione interlaboratorio di set di Pap test di tria

5.3 Valutazione esterna di qualita` (VEQ)

Qualora disponibili, si raccomanda la partecipazione a programmi esterni di qualità cosi come previsto dalla normativa vigente.

Cosi Forte carico di lavoro!! Solo casi complessi?

Ruolo fondamentale da monitorare ogni 3-6 mesi

Sistematico

Da ripristinirare -Impegnativi, ma importanti . Il Gisci almeno ogni 6-12 mesi? In sinergia con le regioni e con le società scientifiche del settore?

Obbligatoria

Importante per i neolettori

F. Carozzi 2025

British Journal of Cancer www.nature.com/bjc

CONSENSUS STATEMENT

Check for updates

Molecular Diagnostics

Italian guidelines for cervical cancer screening. Multisocietal recommendations on the use of biomarkers in HPV screening with risk-based approach and GRADE methodology

Silvia Gori[1,31], Francesco Venturelli[2,31], Francesca Carozzi[3], Paolo Giorgi Rossi[2,32], Annarosa Del Mistro[1,32] and on behalf of the Multisocietal Contributor Group*

Le nuove linee guida Italiane per il triage: I biomarcatori

HPV16	α-9	55.8	2.6	62.4
HPV18	α-7	14.3	1	15.3
HPV45	α-7	4.8	0.6	4.8
HPV33	α-9	4	0.6	3.9
HPV58	α-9	4	0.8	3.7
HPV31	α-9	3.5	1	2.9
HPV52	α-9	3.2	1	2.6
HPV35	α-9	1.6	0.4	1.4
HPV59	α-7	1.2	0.4	0.9
HPV39	α-7	1.3	0.6	0.8
HPV68	α-7	0.6	0.4	0.2
HPV51	α-5	1	0.9	0.2
HPV56	α-6	0.8	0.6	0.2

Genotipizzazione

P16 Dual staining

F. Carozzi 2025

Genotipizzazione e controlli di qualità interni per la Citologia

Devono concentrarsi sulla **sensibilità per lesioni di alto grado** e sulla **riproducibilità diagnostica**

Set di vetrini e cqi mirati sui casi HPV+ **non 16/18**, che diventano il vero target del triage.

Utilizzo di **archivi digitali di casi difficili** per mantenere l'allenamento dei citologi.

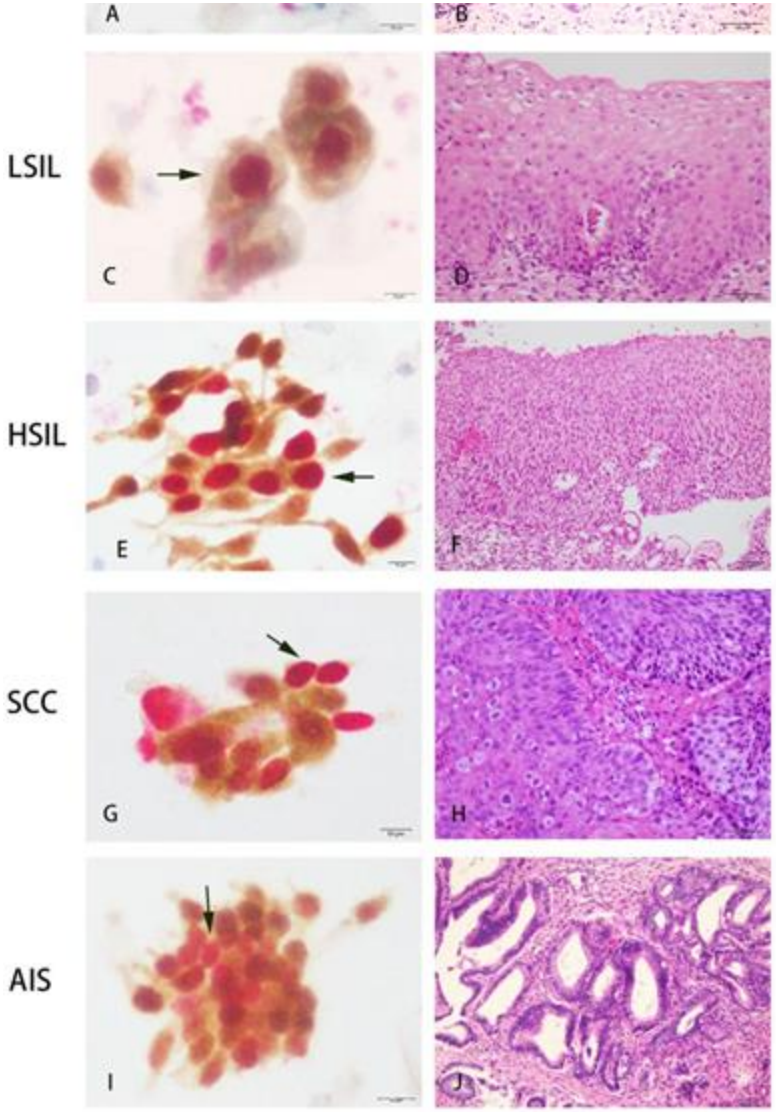
VEQ PAP TEST: nuove sfide

Casi più complessi	• Le VEQ devono includere casi di triage realistici: LSIL, AGC, HSIL in donne HPV+, ma anche falsi negativi e positivi difficili
Frequenza e dimensione	• Numero adeguato di vetrini digitali • Gruppo di esperti per revisione e utilizzo AI x criteri più uniformi (Vedi UK neqas)
Integrazione con l'informazione virologica	• i casi forniti in VEQ dovrebbero essere accompagnati da dato HPV/ genotipo, in chiaro per simulare il contesto reale di triage.
Confronto tra laboratori	• Con la centralizzazione, le VEQ dovrebbero servire anche a garantire che i laboratori siano **allineati tra loro**

F. Carozzi 2025

Dual Staining p16/Ki67

- Adozione crescente: Il dual staining p16/Ki67 si afferma come test di triage cruciale per HPV+.
- L'accuratezza è fondamentale per garantire risultati affidabili e decisioni cliniche corrette
- Difficoltà:
  - Variabilità pre-analitica: Fissazione e qualità del campione richiedono attenzione meticolosa.
  - Interpretazione morfologica: Necessaria formazione specifica per una valutazione accurata.



Controlli di qualità per Dual staining

Situazione In Italia

- ◆ Studio NTCC2:
  - Valutazione della qualità del dual staining tramite sperimentazioni e confronti interlaboratorio.

In attesa di VEQ nazionali consolidate su preparati citologici implementazioni controlli interni e confronti interlaboratorio per garantire l'affidabilità dei risultati

◆ Desiderabili schemi che includano anche vetrini da colorare cioè analisi che includono tutta la procedura (come per ER/PgR)

Programmi internazionali di controllo di qualità Per p16 ……. Ma …..

◆ UK NEQAS – Immunocitochimica

Offre schemi EQA per marcatori immunocitochimici, p16 non sembra incluso nella lista

- Alcuni schemi includono anche dual staining p16/Ki67, in forma di casi digitali o vetrini di controllo cioè analisi che includono tutta la procedura

- NordicQC (Danimarca, paesi nordici)
  - Programmi di controllo qualità per immunoistochimica, con esercizi anche su p16. Alcuni cicli pilota hanno incluso la valutazione del dual staining.
- CAP (Collegio dei Patologi Americani, USA)
  - Fornisce EQA per immunoistochimica; sono disponibili moduli specifici per p16, e in alcuni casi anche per test combinati p16/Ki67.

HPV: Cosa cambia nei Controlli di Qualità con l'introduzione della genotipizzazione?

I laboratori devono dimostrare **accuratezza, sensibilità e specificità** nei test.

- Passaggio da VEQ "binaria" (positivo/negativo) a **VEQ multilivello** con maggiore complessità.
- Partecipazione a Proficiency Panel

- La capacità dei laboratori di identificare correttamente I tipi di HPV ha implicazioni cliniche dirette per la gestione delle pazienti.
- La comparabilità tra laboratori richiede l'uso di standard comuni e di pannelli di controllo che includano campioni con diversi genotipi.
- Gli errori di genotipizzazione possono avere conseguenze importanti: sia un falso negativo (mancata identificazione di un HPV16 o 18) sia un falso positivo (attribuire erroneamente un genotipo ad alto rischio) influenzano le decisioni cliniche.

HPV: Cosa cambia nei Controlli di Qualità interni con l’introduzione della genotipizzazione?

L'introduzione della genotipizzazione richiede un'evoluzione dei controlli di qualità interni.

- Accuratezza della tipizzazione: Non è sufficiente un semplice controllo "positivo/negativo" per HPV HR. È necessario verificare l'identificazione precisa dei singoli genotipi critici (HPV16, 18 e altri HR).
- Controlli interni di processo: Devono confermare la capacità del test di distinguere tra genotipi specifici.
- Controllo dei falsi positivi/negativi: È fondamentale per ogni singolo genotipo.

Pannelli di proficiency per I test HPV di screening

- I pannelli di proficiency specifici per lo screening sono distribuiti da organizzazioni internazionali (come WHO/IARC e reti europee).
  Questi pannelli contengono campioni già tipizzati che permettono ai laboratori di testare la sensibilità e specificità dei propri sistemi diagnostici.

- Nel 2022 il primo proficiency per lo screening

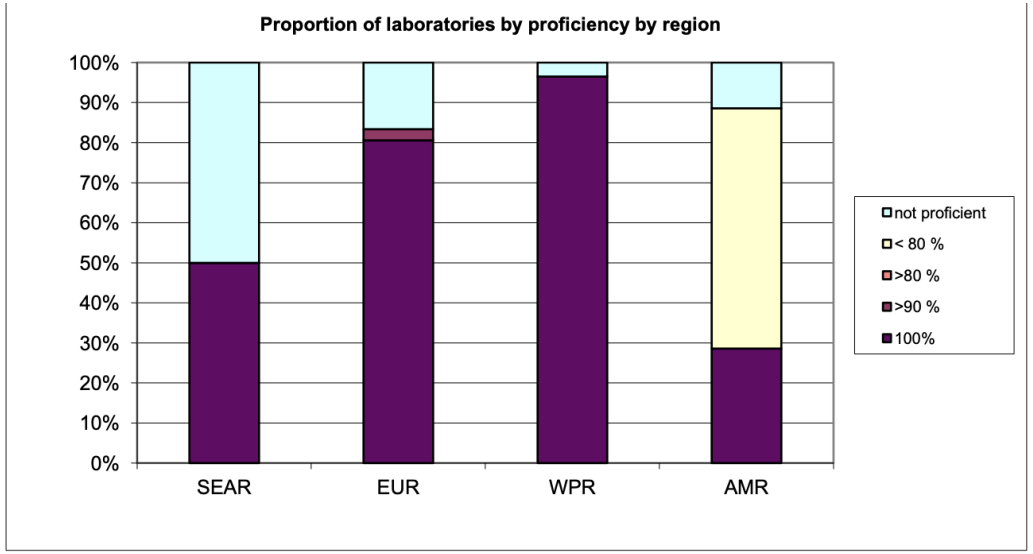


Figure 3: Proficiency for HPV DNA screening by WHO region. The figure includes 158 data set.

le quantità di virus nei campioni inviati sono confrontabili con la sensibilità e la specificità clinica dello screening cervicale basato su HPV

risultati soddisfacenti, è necessario proseguire la ricerca sulla sensibilità analitica richiesta per un'ottimale sensibilità clinica e sulla definizione di criteri adeguati di specificità clinica

Technical Report on the Global HPV LabNet DNA Screening Proficiency Panel 2022

Carina Eklund[1], Camilla Lagheden[1], Emel Yilmaz[1], Sara Arroyo Mühr[1], Marina Lilja[2], Ola Forslund[3] & Joakim Dillner[1]

criteri di proficiency provvisori.

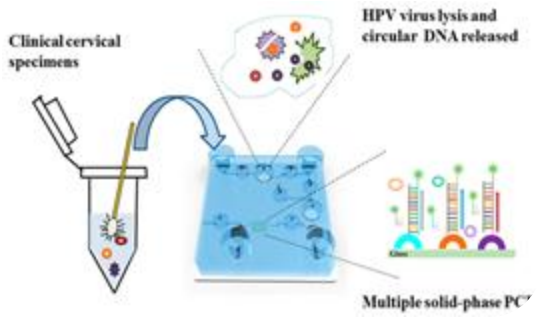
Two samples with HPV16 and 18 at 1 IU/µl and a pool with 100 GE/µl for HPV types 31, 33, 45, 52, 58 were also included but detection of these low virus amounts was not required for proficiency.

Criterio di proficiency	Descrizione / requisito	Note tecniche
Sensibilità analitica minima richiesta	Il test deve rilevare i tipi oncogeni HPV inclusi nel pannello alle concentrazioni definite	Per ottenere "100 % proficiency", è richiesta la piena rilevazione di HPV16 e HPV18 a 10 IU/µL, e di HPV31, 33, 45, 52, 58 a 1000 genoma equivalenti/µL, senza falsi positivi.
Specificità / assenza di falsi positivi	I campioni negativi non devono dare risultati positivi non giustificati	
Rilevazione completa dei tipi nel campione (quando richiesto)	In campioni misti, il test deve essere capace di identificare tutti i tipi HPV presenti	
Riproducibilità / coerente performance interna	I risultati devono essere consistenti per replicati o dataset multipli dallo stesso laboratorio	
Soglia di accettazione (cut-off per dichiarare "proficiency")	≥ 90 % dei dati (campioni positivi) rilevati correttamente e nessun falso positivo nei campioni negativi	

…'The false positivities appeared to be essentially randomly distributed among the samples, indicating that the problem with false positives is usually not related to a property of the assays itself (e.g. cross-reactivity), but rather with the laboratory conditions of use (e.g. contamination)'

Parametro	Valore / risultato nel 2022
Percentuale dei dataset che hanno raggiunto la "proficiency"	77 % dei dataset (cioè 0,77)
Percentuale di dataset con falsi positivi	~ 22 % dei dataset presentavano almeno un risultato falso positivo (
Panel screening: numero di campioni nel **panel**	12 campioni sfidanti
Tipi HPV inclusi nel pannello screening	HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68a e 68b (miscelati o singoli) su DNA umano

F. Carozzi 2025



Cosa cambia nelle VEQ HPV con l'introduzione della genotipizzazione?

- Panel più complessi
  - Le VEQ non inviano più solo campioni HPV+ o HPV–, ma pool con diversi genotipi HR-HPV.
  - Ogni laboratorio deve riportare quali genotipi ha rilevato, non solo la positività.
- Valutazione su genotipi critici
  - Le VEQ devono sempre includere campioni con HPV16 e 18 (maggiore rischio oncogeno).
  - Devono anche includere genotipi a rischio intermedio per testare la sensibilità globale.
- Uniformità di refertazione
  - È essenziale standardizzare il formato del referto (es. distinguere "HPV16 positivo" da "HR-HPV positivo non 16/18").
  - Le VEQ devono valutare anche la correttezza della refertazione clinica, non solo la tecnica di laboratorio.
- Benchmarking tra laboratori
  - I programmi VEQ devono pubblicare report comparativi che mostrino la performance di ogni laboratorio rispetto al gruppo, evidenziando eventua discrepanze nella genotipizzazione.

Test HPV Validati per lo screening (22 Test) da rapporto Gisci 2024

Gruppo carcinogeni	Classificazio	Nessuna solo HR Totale	Tipz Parziale		Tipiz completa	Tipizzazione Estesa		
IARC	IARC handbo	N.3 Test	n.9 Test	n.1 Test	N.6 Test	n.1 Test	n.1 Test	n. 1 Test
1	16	14 HR insieme	16	16	16	16	16	16
1	18		18	18	18	18	18	18
1	45		12 HR insieme	12 HR insieme	45	45	45	45
1	31				31	31	31	31
1	33				33	33	33	52
1	35				35	35	52	33
1	52				52	52	58	58
1	58				58	58	39	51
1	39				39	51	51	39
1	51				51	59	56	56
2a	68				68	39	59	59
1	56				56	68	68	68
1	59				59	56	66	66
2b		66'	66'	66'	66	66	35	35
				+67'				

F.Carozzi Gisci 2024

1 test tipiz completa include solo i 12 tipi HR

F. Carozzi 2025

Esempi

- **WHO HPV LabNet proficiency**: verità a livello **genotipo**, campioni singoli/mix a diverse concentrazioni; soglia stringente su 16/18. Nel panel per lo screening in realtà '*Assays with limited genotyping options that report the positivity or negativity of HPV types in combined categories were considered proficient if the targeted HPV* ntypes *were covered in the respective category'*
  - *I test che individuano HPV16/18 vs other : sono in qualche modo più facilmente proficiency se non danno FP.*

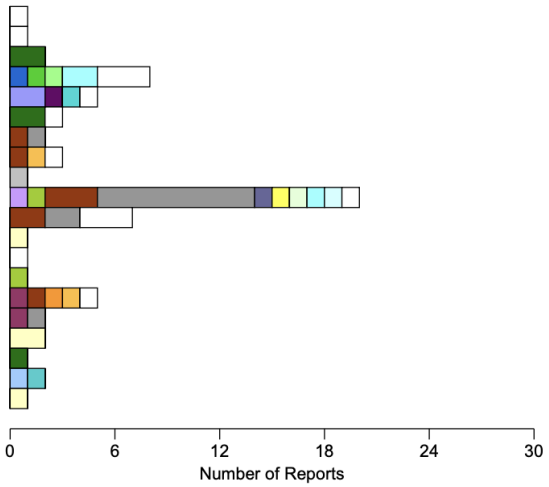
- **QCMD/UK NEQAS**: modelli di scoring con **equivalenze di reporting** e mix multi-tipo; report con benchmarking e azioni correttive.

Questi approcci dimostrano che il "layer di equivalenza" e il doppio endpoint analitico/clinico sono fattibili e già usati

Specimen : 8319 **HPV high risk genotypes 31, 33, 39, 56 and 58 detected**

HPV high risk genotype combinations reported

UK	(All)	
0	(1)	16,31,33,35,39,51,52,56,58,59,68
0	(1)	18,45
0	(2)	31
2	(8)	31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68
1	(5)	31,33,35,39,51,52,56,58,59,68
0	(3)	31,33,35,39,56,58,59,68
0	(2)	31,33,39,45,56,58
0	(3)	31,33,39,45,56,58,59
0	(1)	31,33,39,51,56,58
3	(20)	31,33,39,56,58
0	(7)	31,33,39,56,58,59
0	(1)	31,33,39,58
0	(1)	31,33,39,58,59
0	(1)	31,33,56
0	(5)	31,33,56,58
1	(2)	31,33,56,58,59
0	(2)	31,33,58
0	(1)	31,333,35,39,45,56,58,59,68
0	(2)	31,58
0	(1)	58

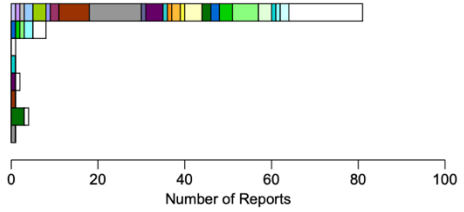


No method
Unspecified
Other
Abbott Real-Time
Abbott: Alinity m
Roche: Cobas 4800
Cobas 6800/8800
Roche: Cobas 5800
BD : Onclarity
Fujirebio : INNO-LiPA
In house
Real-Time Multiplex
mPCR/RLB
Genomica: CLART HPV 2
Cepheid: GeneXpert
Seegene: HPV4A ACE
Seegene: Anyplex II HPV28
Seegene: Allplex HPV28
Sacace Real-TM
Hologic: Aptima
InterLabService
HPV Vision Array
F-HPV typing
Sansure HPV13+2

Specimen : 8318 **HPV high risk genotype 16 detected**

HPV high risk genotype combinations reported

UK	(All)	
12	(81)	16
2	(8)	16,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68
0	(1)	16,31,33,35,39,51,52,56,58,59,68
0	(1)	16,35,39,51,56,59,68
1	(2)	16,39,56,68
0	(1)	16,45
0	(4)	16,56,59
0	(1)	18



No method
Unspecified
Other
Abbott Real-Time
Abbott: Alinity m
Roche: Cobas 4800
Cobas 6800/8800
Roche: Cobas 5800
BD : Onclarity
Fujirebio : INNO-LiPA
In house
Real-Time Multiplex
mPCR/RLB
Genomica: CLART HPV 2
Cepheid: GeneXpert
Seegene: HPV4A ACE
Seegene: Anyplex II HPV28
Seegene: Allplex HPV28
Sacace Real-TM
Greiner: PapilloCheck
Hologic: Aptima
InterLabService
Viasure HPV16+18
F-HPV typing
Sansure HPV13+2

Alcuni esempi!!!

Implicazioni pratiche per la raccolta dati Beta globina o equivalenti

Controllo di adeguatezza del campione

Evitare falsi negativi

Qualità del prelievo e della conservazione

Comparabilità tra test confronti tra laboratori e piattaforme.

Received 3 July 2025; Received in revised form 21 August 2025; Accepted 4 September 2025

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv

Assessing sample adequacy and clinical performance of self-collected and clinician-collected HPV specimens using internal control Ct values

Marianna Martinelli [a,1], Sadaf Sakina Hassan [b,1], Emel Yilmaz [b], Camilla Lagheden [b], Sara Nordqvist Kleppe [b], Clementina Cocuzza [a], Laila Sara Arroyo Mühr [b,*]

[a] School of Medicine and Surgery, University of Milano-Bicocca, Milan 20126, Italy
[b] International HPV Reference Center, Center for Cervical Cancer Elimination, F56, Karolinska Institutet, Stockholm 14186, Sweden

ARTICLE INFO

Keywords:
Sample adequacy
Ct
HPV testing
Cervical screening

ABSTRACT

Background: Human papillomavirus (HPV) testing is the primary method for cervical cancer screening, but reliable detection depends on adequate sample cellularity. Cycle threshold (Ct) values for the assay's internal control (IC), such as β-globin, are commonly used as proxies for adequacy, yet standardized Ct cut-offs are lacking. We aimed to contribute evidence-based thresholds for sample adequacy using real-world data.
Methods: We analyzed 237,853 clinician-collected and self-collected samples tested with the BD Onclarity™ HPV Assay between 2022 and 2024. β-globin Ct values were assessed by HPV status to evaluate adequacy. Histologically confirmed CIN2+ outcomes were linked via the National Cervical Screening Registry to assess clinical performance.
Results: Among 110,482 clinician-taken samples, 73.63 % (81,350) were HPV negative; 74.32 % (60,457) of these had β-globin Ct ≤28, and only 1.28 % exceeded Ct 32.1. In 127,390 self-collected samples, 83.47 % (106,329) were HPV negative; 99.66 % (105,967) had Ct ≤28 and only 0.06 % exceeded Ct 32.1. HPV positivity declined gradually beyond Ct 26 and more markedly above Ct 28. CIN2+ cases (n = 5546) were rarely HPV negative (n = 73), and these showed low β-globin Ct values, indicating adequate cellularity. Self-collected samples had significantly lower Ct values than clinician-taken ones (median 21.5 vs. 26.5; p < 2.2e-16), likely due to lower resuspension volume.
Conclusions: Both clinician- and self-collected samples showed adequate cellularity, with potentially false negative HPV results from low cellular content appearing rare. Observed patterns suggest Ct <26 as optimal and Ct <28 as a minimum for program-level quality assurance with the BD Onclarity™ HPV Assay.

- Registrazione nei gestionali di laboratorio del dato analitico gene housekeeping : non solo pos/neg ma dato CT o equivalenti
- Sia per campioni tradizionali che in self sampling

F. Carozzi 2025

I criteri di Valutazione della qualità del prelievo
Citologia vs HPV

- **Citologia**
  - Adeguatezza valutata dal citologo
  - Indicatori: % Pap insoddisfacenti, % senza cellule endocervicali
  - Variabilità soggettiva elevata
  - Feedback qualitativo ai prelevatori
  - Audit basato su discussione di casi

- **HPV: gene housekeeping**
  - Adeguatezza valutata molecolarmente
  - Indicatori: % campioni non validi
- % CT housekeeping sotto soglia
- • Parametro oggettivo e riproducibile
  - Feedback numerico e comparabile tra operatori/centri
  - Audit quantitativo e trend nel tempo

ISPRO
Istituto per lo studio, la prevenzione e la rete oncologica

SST Servizio Sanitario della Toscana

Seminario

"Lo screening del carcinoma della cervice con HPV test: un percorso condiviso"

14 novembre 2018

Accreditamento E.C.M. nazionale

Auditorium Santa Apollonia
Via San Gallo 25/A
Firenze

L'analisi dei prelevatori nell'era della citologia in fase liquida

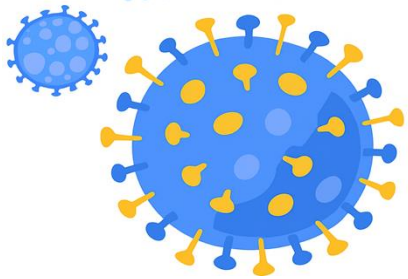
Filippo Cellai, Francesca Carozzi

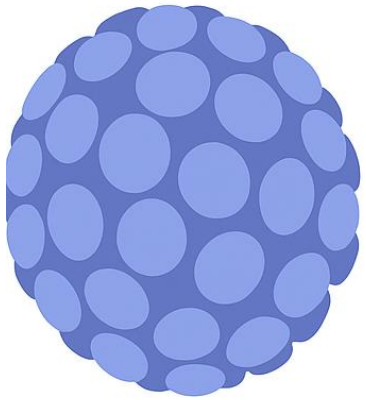
Laboratorio Regionale Prevenzione Oncologica
Istituto per lo studio, la prevenzione e la rete oncologica (ISPRO)

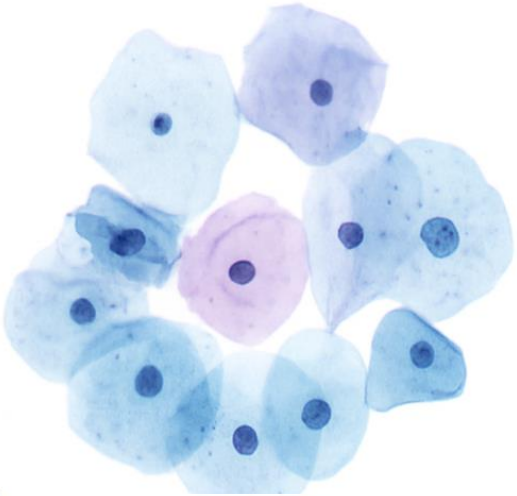
Insieme in Toscana per capire, vivere e curare il cancro

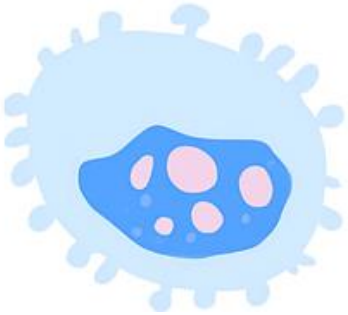
www.ispro.toscana.it

Individuare valori di cut-off del dato semiquantitativo (CT) al fine di poter individuare prelievi **"ottimali"** e **"sub-ottimali"** , dipende dal testo usato









Grazie per l'attenzione!

frakaro@gmail.com