

Istruzioni per l'uso del test *digene*[®] HC2 High-Risk HPV DNA

IVD

Σ 96

Test di ibridazione dell'acido nucleico in vitro in micro piastra con amplificazione del segnale, basato sulla chemiluminescenza, per la rilevazione qualitativa di 13 tipi di DNA del papillomavirus umano (HPV) ad alto rischio in campioni cervicali

Da utilizzare con:

- DNAPap Cervical Sampler
- *digene* Specimen Transport Medium
- Soluzione Hologic PreservCyt[®]
- Fluido conservante BD SurePath[®]



REF

5197-1330



QIAGEN Gaithersburg, Inc.
1201 Clpper Road
Gaithersburg, MD 20878
Stati Uniti

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strsse 1
40724 Hilden
GERMANIA

1058538IT Rev. 01



Modifiche chiave rispetto alla precedente revisione delle istruzioni per l'uso

- Aggiunta procedura di preparazione dei campioni in soluzione PreservCyt utilizzando il kit QIAasymphony® DSP HPV Media unitamente ai dati delle prestazioni associati.

Indice

Uso previsto	6
Sommario e spiegazioni	7
Principio della metodica	8
Preparazione dei campioni con il QIA Symphony SP	11
Test condotti con il Rapid Capture System	12
Materiali in dotazione	14
Contenuto del kit	15
Materiali necessari ma non in dotazione	17
Apparecchiature e materiali per diagnostica in vitro	17
Apparecchiature e materiali per uso generico di laboratorio	19
Ulteriori apparecchiature e materiali per la preparazione di campioni in soluzione PreservCyt	20
Ulteriori apparecchiature e materiali per la preparazione di campioni SurePath	20
Avvertenze e precauzioni	20
Avvertenze	20
Precauzioni	24
Conservazione e manipolazione dei reagenti	26
Componenti del kit	26
Reagenti preparati	26
Prelievo e preparazione dei campioni	26
Campioni cervicali in STM	27
Biopsie cervicali	27
Campioni cervicali in soluzione PreservCyt	28
Campioni cervicali nel fluido conservante SurePath	29
Procedura	30
Preparazione dei reagenti	30
Creazione del layout della piastra	38
Preparazione del campione	40

Denaturazione e ibridazione dei campioni preparati con il QIA Symphony SP	43
Denaturazione e ibridazione di campioni in STM e campioni in PreservCyt e SurePath preparati manualmente	47
Cattura degli ibridi	55
Rilevazione degli ibridi	57
Lavaggio	59
Amplificazione del segnale	62
Misurazione della micropiastra di cattura e generazione dei risultati	63
Interpretazione dei risultati	64
Risultati dei test su campioni in STM	64
Risultati dei test su campioni in SurePath	64
Risultati dei test su campioni in PreservCyt	64
Rapporto RLU/CO prossimo a 1,0	65
Altri tipi di HPV	65
Verifica della calibrazione del test	65
Calibratore negativo	66
Calibratore positivo	66
Media calibratore positivo / media calibratore negativo	66
Calcolo del valore soglia	67
Controlli di qualità	67
Limiti della metodica	68
Caratteristiche	70
Prestazioni cliniche durante lo screening di pazienti con risultati normali del Pap test come supporto nella valutazione del rischio per la gestione delle pazienti	70
Prestazioni cliniche durante lo screening di pazienti con risultati del Pap test ASC-US per definire la necessità di eseguire la colposcopia	75
Sensibilità clinica e specificità per la determinazione del rischio di neoplasia grave o in donne con risultati dei Pap test indicati di LSIL o HSIL	79

Sensibilità analitica	84
Equivalenza tra tipi di campioni	86
Concordanza tra i metodi d'analisi	90
Riproducibilità	94
Reattività crociata	118
Ibridazione crociata	121
Effetto del sangue e di altre sostanze sui campioni in STM	121
Effetto del sangue e di altre sostanze sui campioni in soluzione	
PreservCyt	122
Carryover	124
Stabilità on board dei reagenti	126
Riferimenti bibliografici	129
Simboli	133
Guida alla risoluzione dei problemi	133
Controllo della contaminazione del DR2	145
Controllo della contaminazione del sistema di lavaggio e/o della sorgente d'acqua	145
Controllo della contaminazione dell'Automated Plate Washer	146
Informazioni sui contatti	147

Uso previsto

Per uso diagnostico in vitro (IVD).

Il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA mediante tecnologia Hybrid Capture® 2 (HC2) è un test di ibridazione dell'acido nucleico in micro piastra con amplificazione del segnale, che si avvale della chemiluminescenza per la rilevazione qualitativa di tredici tipi di DNA del papillomavirus umano (HPV) ad alto rischio in campioni cervicali.

Fra i campioni cervicali analizzabili con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA figurano i seguenti:

- Campioni prelevati con il tampone cervicale DNAPap Cervical Sampler
- Biopsie prelevate in *digene* Specimen Transport Medium (STM) (mezzo di trasporto campione)
- Campioni prelevati utilizzando un dispositivo del tipo a spazzolino o a spazzolino/spatola e posti in soluzione PreservCyt o nel fluido conservante SurePath

L'uso di questo test è indicato nei seguenti casi:

- Per la rilevazione dei tipi di HPV ad alto rischio 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68, il cui ruolo di principale fattore causale nello sviluppo del cancro cervicale è stato dimostrato.
- Come test di screening iniziale sulla popolazione generale, da effettuarsi unitamente o indipendentemente dal Pap test, per identificare le donne a maggior rischio di sviluppo del cancro cervicale o la presenza di una neoplasia cervicale grave. La diagnosi dell'HPV è sempre più indice di neoplasie cervicali con l'avanzare dell'età.
- Come test di follow-up per le pazienti il cui Pap test è risultato anomalo o già affette da una neoplasia cervicale, per determinare la candidatura alla colposcopia o ad altre procedure di follow-up.
- Come test di follow-up per le pazienti il cui Pap abbia messo in luce una neoplasia intraepiteliale squamosa non grave (LSIL) o grave (HSIL), prima della colposcopia. Per queste pazienti, il risultato del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA fungerà da supporto per il medico nella gestione della

paziente, consentendogli di valutare i rischi per la donna e di determinare l'assenza di una neoplasia grave.

Sommario e spiegazioni

La presenza di alcuni tipi di HPV nell'apparato genitale femminile si associa a diverse forme tumorali, tra cui il condiloma, la papulosi di tipo Bowen, carcinomi e neoplasie cervicali, vaginali e vulvari intraepiteliali (1–3). Sono principi generalmente accettati che questi virus vengano prevalentemente trasmessi per via sessuale e che i tipi di HPV ad alto rischio costituiscano il principale fattore di rischio riconosciuto per lo sviluppo del cancro della cervice (4–8).

I papillomavirus umani sono composti da una particella virale icosaedrica (virione) contenente una molecola di DNA circolare a doppio filamento da 8.000 coppie di basi, circondata da un capsido proteico. In seguito all'infezione delle cellule epiteliali, il DNA virale si espande per tutto lo spessore dell'epitelio, mentre i virioni intatti si riscontrano soltanto negli strati più superficiali del tessuto. Per tale motivo, il DNA virale può essere presente sia sotto forma di virioni, sia di DNA episomiale o sequenze di DNA di HPV integrate, a seconda del tipo e della gravità della lesione.

A tutt'oggi non è possibile coltivare in vitro il virus dell'HPV e i test immunologici non sono adeguati per determinare la presenza di un'infezione cervicale da HPV. La prova indiretta dell'infezione anogenitale da HPV può essere ottenuta attraverso la visita medica e la presenza delle caratteristiche alterazioni cellulari associate a una replicazione virale nei campioni per il Pap Test o la biopsia. In alternativa, le biopsie possono essere analizzate mediante ibridazione dell'acido nucleico, per rilevare direttamente la presenza del DNA dell'HPV.

Storicamente, l'HPV 16 e l'HPV 18 sono sempre stati considerati tipi di HPV associati ad un elevato rischio di cancro (8–10). È stato dimostrato che i tipi di HPV 31, 33 e 35 si associano a un rischio di cancro intermedio (2, 11–14). L'associazione al livello intermedio è dovuta al fatto che questi tipi vengono rilevati con maggiore frequenza nelle neoplasie intraepiteliali squamose gravi piuttosto che nei casi di cancro. Lo sviluppo di forme cancerogene dovute alla presenza di questi tipi di HPV è pertanto meno probabile rispetto a quando è presente DNA dell'HPV dei tipi ad alto rischio (15). Questi 5 tipi di HPV sono

nel complesso responsabili di circa il 73% delle infezioni da HPV (16, 17). Altri tipi di DNA dell'HPV, tra cui i tipi 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68, sono stati identificati come i principali ceppi del papillomavirus rilevabili nel resto delle lesioni (17–27). Questi tipi di HPV possono anche essere classificati come gruppi a rischio intermedio ed alto, in base alla relativa distribuzione in diverse categorie di diagnosi istopatologica (16, 17, 24–28).

È stato dimostrato che il DNA dell'HPV è presente in circa il 10% delle donne con epitelio cervicale normale, ma sull'effettiva prevalenza in gruppi specifici di donne influiscono fortemente l'età e altre variabili demografiche (2, 10, 16, 29). Studi prospettici hanno evidenziato che il 15–28% delle donne risultate positive al DNA dell'HPV ha sviluppato lesioni intraepiteliali squamose (SIL) entro 2 anni rispetto al solo 1–3% delle donne trovate negative (30, 31). In particolare, il rischio di progressione della neoplasia con i tipi di HPV 16 e 18 si è rivelato maggiore (circa il 40%) rispetto agli altri tipi (30).

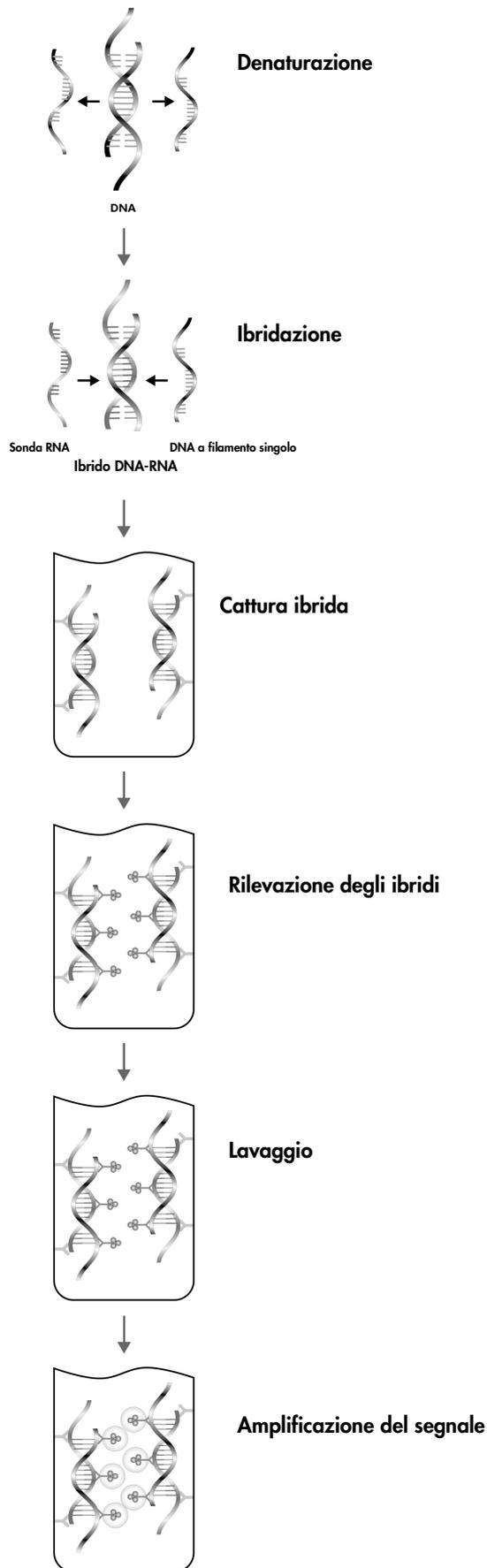
Principio della metodica

Il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, basato sulla tecnologia HC2, è un test di ibridazione dell'acido nucleico in vitro ad amplificazione del segnale in micro piastra che impiega la rilevazione chemiluminescente. I campioni contenenti il DNA bersaglio si ibridano con una miscela specifica di sonde di RNA dell'HPV. Gli ibridi RNA–DNA risultanti vengono catturati sulla superficie di una micropiastra rivestita di anticorpi specifici per tali ibridi. Gli ibridi immobilizzati vengono quindi fatti reagire con anticorpi coniugati con fosfatasi alcalina specifici per gli ibridi RNA–DNA, successivamente rilevati mediante un substrato chemiluminescente. Ad ogni anticorpo sono coniugate varie molecole di fosfatasi alcalina. Più anticorpi coniugati si legano a ogni ibrido catturato, dando luogo a una sostanziale amplificazione del segnale. Poiché il substrato viene scisso dalla fosfatasi alcalina legata, si verifica l'emissione di luce, misurata dallo strumento *digene* Microplate Luminometer (DML) e quantificata in unità di luce relative (RLU). L'intensità della luce emessa indica la presenza o l'assenza di DNA bersaglio nel campione.

Una misurazione di RLU uguale o superiore al valore soglia del dosaggio (CO) indica la presenza nel campione di sequenze di DNA dell'HPV ad alto rischio. Una misurazione di RLU inferiore al CO indica l'assenza delle sequenze di

DNA dell'HPV ad alto rischio specifiche o livelli di DNA dell'HPV inferiori al limite di rilevazione del test.

Diagramma di flusso Hybrid Capture



Preparazione dei campioni con il QIASymphony SP

La preparazione automatizzata dei campioni in soluzione PreservCyt può essere eseguita utilizzando il QIASymphony SP con il kit QIASymphony DSP HPV Media o QIASymphony DSP AXpH DNA.

Preparazione dei campioni con il kit QIASymphony DSP HPV Media

Il kit QIASymphony DSP HPV Media mette a disposizione estratti dei campioni sulla micropiastra di ibridazione, pronti per l'analisi automatizzata con il Rapid Capture® System (RCS) utilizzando il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Il QIASymphony SP esegue l'intera procedura per preparare fino a 88 campioni, in lotti comprendenti fino a 24 campioni, in una singola sessione. Dopo aver caricato i campioni sullo strumento, il QIASymphony SP processa 88 campioni in soluzione PreservCyt in 2 ore e 15 minuti senza alcun intervento dell'utente.

Importante: Gli estratti dei campioni ottenuti dalla preparazione dei campioni in soluzione PreservCyt con il kit QIASymphony DSP HPV Media possono essere analizzati esclusivamente utilizzando il sistema RCS. L'esecuzione manuale del test non è convalidata.

Quando si esegue la preparazione automatizzata dei campioni con il QIASymphony, per le necessarie informazioni procedurali e descrittive consultare i manuali utente del QIASymphony e le *Istruzioni per l'uso (Manuale) del kit QIASymphony DSP HPV Media*, oltre alle presenti istruzioni per l'uso.

Preparazione dei campioni con il kit QIASymphony DSP AXpH DNA

Il kit QIASymphony DSP AXpH DNA consente di ottenere eluati di DNA sulla micropiastra di ibridazione, pronti per i test manuali o RCS automatizzati con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Il QIASymphony SP esegue l'intera procedura per preparare fino a 88 campioni, in lotti comprendenti fino a 24 campioni, in una singola sessione. Dopo aver caricato i campioni sullo strumento, il QIASymphony SP processa 88 campioni in 4 ore e 30 minuti senza alcun intervento dell'utente.

Quando si esegue la preparazione automatizzata dei campioni con il QIASymphony, per le necessarie informazioni procedurali e descrittive consultare i relativi manuali utente del QIASymphony e il *Manuale del kit QIASymphony DSP AXpH DNA*, oltre alle presenti istruzioni per l'uso.

Test condotti con il Rapid Capture System

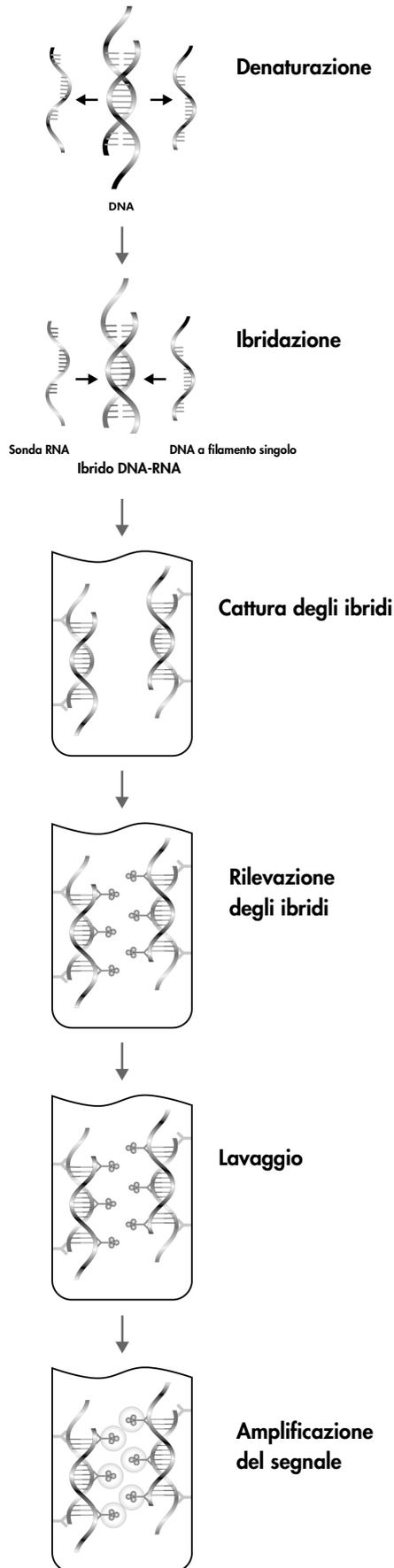
Il test ad alta produttività di volumi e campioni può essere eseguito con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA utilizzando il sistema RCS. Il sistema RCS è un sistema di aspirazione e diluizione automatica di uso generico che può essere utilizzato con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA per i test ad alta produttività di volumi e campioni. Questo sistema gestisce fino a 352 campioni in 8 ore, incluso un periodo di 3,5 ore durante il quale non è richiesto l'intervento dell'utente; in 13 ore è possibile generare i risultati per un massimo di 704 campioni.

La preparazione dei campioni viene eseguita indipendentemente dall'RCS prima della collocazione sulla piattaforma RCS. Inoltre, la rilevazione del segnale chemiluminescente e la refertazione dei risultati vengono eseguiti utilizzando uno strumento DML offline comune sia alle metodica manuale sia alla metodica automatizzata RCS.

Ogni fase procedurale del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA viene eseguita nell'esatta sequenza della procedura manuale del test. L'RCS consente l'elaborazione scaglionata di 4 micropiastre al massimo, ognuna contenente i campioni, i calibratori necessari per i test e i controlli di qualità.

Quando si eseguono i test RCS automatizzati, per le necessarie informazioni procedurali e descrittive consultare il Manuale utente del Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) e il Manuale utente del Rapid Capture System — Esecuzione dei test *digene* HC2 DNA con campioni processati mediante il QIASymphony SP (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*), oltre alle presenti istruzioni per l'uso.

Diagramma di flusso Hybrid Capture



Preparazione manuale
campioni

Preparazione automatizzata sul Rapid Capture System

Materiali in dotazione

In un kit del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA sono contenuti 96 test.

Quando si eseguono i test manuali, il numero minimo di test raccomandati per ogni utilizzo è pari a 24. Se si desidera utilizzare meno di 24 test, il numero totale dei test per ciascun kit potrebbe ridursi a causa di volumi limitati dei reagenti. Il numero di risultati pazienti varia a seconda del numero di utilizzi per kit, come specificato sopra.

Numero di utilizzi	Numero di risultati pazienti
1	88
2	80
3	72
4	64

Quando si eseguono i test RCS automatizzati, in caso di utilizzo del kit completo è necessario testare un'intera micropiastra (88 campioni) per ogni sessione RCS. Il test di micropiastre parziali è accettabile; si deve tuttavia utilizzare l'intero kit a causa del volume vuoto richiesto per il funzionamento dello strumento.

Contenuto del kit

<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test		(96)
N° catalogo		5197-1330
Indicator Dye (indicatore)	INDIC	0,35 ml
Contiene sodio azide allo 0,05% (p/v)		
Denaturation Reagent (Reagente di denaturazione)*	REAG DENAT	50 ml
Soluzione diluita di idrossido di sodio (NaOH)		
Probe Diluent (Diluente della sonda)*	DIL PROBE	5 ml
Soluzione tamponata con sodio azide allo 0,05% (p/v)		
High-Risk HPV Probe (Sonda per l'HPV ad alto rischio)	PROBE HPV HIGH-RISK	200 µl
Sonda dell'RNA dell'HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 in soluzione tamponata (tappo rosso)		
Low-Risk HPV Quality Control (Controllo di qualità per l'HPV a basso rischio)	QC HPV LOW-RISK	1 ml
DNA dell'HPV 6 clonato (500.000 copie/ml) 5 pg/ml e DNA vettore in STM con sodio azide allo 0,05% (p/v).		
High-Risk HPV Quality Control (Controllo di qualità per l'HPV ad alto rischio)	QC HPV HIGH-RISK	1 ml
DNA dell'HPV 16 clonato (500.000 copie/ml) 5 pg/ml e DNA vettore in STM con sodio azide allo 0,05% (p/v)		
Negative Calibrator (Calibratore negativo)	CAL -	2 ml
DNA vettore in STM con sodio azide allo 0,05% (p/v)		

*Per informazioni sulla salute e sulla sicurezza, vedere "Avvertenze e precauzioni," pagina 20.

La tabella continua alla pagina seguente

High-Risk HPV Calibrator (Calibratore per l'HPV ad alto rischio)	CAL HPV HIGH-RISK	1 ml
DNA dell'HPV 16 clonato 1 pg/ml e DNA vettore in STM con sodio azide allo 0,05% (p/v)		
Capture Microplate (Micropiastra di cattura)	PLATE CAPTURE	1
Rivestita di anticorpi policlonali di capra anti-ibridi RNA-DNA.		
Detection Reagent 1 (Reagente di rilevazione 1)	REAG DET 1	12 ml
Anticorpi coniugati con fosfatasi alcalina anti-ibridi RNA-DNA in soluzione tamponata con sodio azide allo 0,05% (p/v)		
Detection Reagent 2 (Reagente di rilevazione 2)	REAG DET 2	12 ml
CDP-Star® con Emerald II (substrato chemiluminescente)		
Wash Buffer Concentrate (Tampone di lavaggio concentrato)*	BUF WASH X 30	100 ml
Contiene sodio azide allo 1,5% (p/v)		

*Per informazioni sulla salute e sulla sicurezza, vedere "Avvertenze e precauzioni," pagina 20.

Materiali necessari ma non in dotazione

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le rispettive schede tecniche di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

Apparecchiature e materiali* per diagnostica in vitro

- *digene* Hybrid Capture 2 System ("sistema *digene* HC2"), composto da un luminometro approvato da QIAGEN ("strumento DML"), un personal computer e relative periferiche (monitor, tastiera, mouse, stampante e cavo per stampante) approvati da QIAGEN, un software del sistema *digene* HC2 ("software di analisi dei dosaggi *digene*"), i protocolli di dosaggio del sistema *digene* HC2 per l'HPV, il software per piastre LumiCheck e il manuale utente del *digene* HC2 System (*digene HC2 System User Manual*)
- Hybrid Capture System Rotary Shaker I
- Hybrid Capture System Microplate Heater I
- Hybrid Capture System Automated Plate Washer
- Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (facoltativo)[†]
- Portaprovette di conversione e coperchio (facoltativo)[†]
- Portaprovette per campioni *digene* e coperchio per portaprovette (facoltativo)[†]
- Pipettatore EXPAND-4 e supporto (facoltativo)[‡]
- Dispenser di pellicola per sigillare e taglierina (facoltativo, utilizzati con l'MST Vortexer 2)

* QIAGEN fornisce unicamente apparecchiature e materiali convalidati con il *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

[†] Necessario per eseguire test RCS automatizzati.

[‡] Elemento personalizzato utilizzato per trasferire campioni in STM alla micropiastra di ibridazione. È possibile utilizzare altre pipette personalizzate multicanale espandibili, purché sia possibile ottenere uno spazio di 3,2 cm tra i puntali dopo l'espansione.

- Rapid Capture System (facoltativo per grossi volumi di campioni)
- Sistema di lavaggio
- Micropiastre di ibridazione
- Coperchi per micropiastre
- Strisce per pozzetti micropiastre RCS*
- Recipienti dei reagenti RCS*
- Coperchi per recipienti reagenti RCS*
- Puntali monouso RCS*
- Coperchi a discesa RCS*
- Tampone N2†
- Tampone D2†
- Vaschetta del lavatore RCS blu‡
- Puntali extra lunghi per pipette
- Provette per prelievo campioni
- Portaprovette per provette di prelievo campioni
- Tappi a vite per provette di prelievo campioni
- Contenitori monouso per reagenti
- Pellicola per sigillare DuraSeal™
- Microprovette di ibridazione
- Portaprovette per microprovette
- Copripietra

* Necessario per eseguire test RCS automatizzati.

† Necessari per eseguire i test con campioni preparati con il kit QIAasymphony DSP AXpH DNA.

‡ Necessaria per i test RCS automatizzati dei campioni processati con il kit QIAasymphony DSP HPV Media.

Apparecchiature e materiali per uso generico di laboratorio

- Bagno d'acqua a $65 \pm 2^\circ\text{C}$ di dimensioni sufficienti a contenere un portaprovette per campioni (21 cm di larghezza x 32 cm di profondità x 18 cm altezza)
- Microcentrifuga
- Vortexer con coppetta
- Pipettatore a canale singolo; impostazioni variabili per volumi di 20–200 μl e 200–1.000 μl
- Pipettatore a ripetizione a spostamento positivo, ad esempio Eppendorf® Repeater®
- Pipettatore a 8 canali: configurazioni variabili per volumi di 25–200 μl
- Contaminuti
- Soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5% v/v
- Pellicola Parafilm® o equivalente
- Puntali monouso con barriera di contenimento dell'aerosol per pipettatore a canale singolo (20–200 μl e 200–1.000 μl)
- Puntali monouso per pipettatore a ripetizione a spostamento positivo (12,5, 5, 2,5 e 1,25 ml)
- Puntali monouso per pipettatore a 8 canali (25–200 μl)
- Salviettine Kimtowels® o salviettine equivalenti di carta prive di fibre
- Salviette imbevute di alcol
- Copertina monouso per il banco
- Guanti monouso privi di polveri
- Provette in polipropilene con il fondo tondo e tappi a pressione da 5 ml e/o 15 ml
- Portaprovette per provette da 10 ml o 15 ml
- Provette a fondo conico da 50 ml in polipropilene

Ulteriori apparecchiature e materiali per la preparazione di campioni in soluzione PreservCyt



Consultare le *Istruzioni per l'uso (Manuale)* del kit QIAasymphony DSP HPV Media per la preparazione automatizzata dei campioni con il kit QIAasymphony DSP HPV Media.



Consultare il *Manuale* del kit QIAasymphony DSP AXpH DNA per la preparazione automatizzata dei campioni con il kit QIAasymphony DSP AXpH DNA.



Consultare le istruzioni per l'uso del kit *digene* HC2 Sample Conversion per la preparazione manuale dei campioni.

Ulteriori apparecchiature e materiali per la preparazione di campioni SurePath

- Centrifuga ad agitazione in grado di raggiungere $800 \pm 15 \times g$ e di contenere provette da centrifuga a fondo conico in polipropilene da 15 ml
- Provette di conversione del campione *digene* HC2* o provette in polipropilene da 15 ml VWR® o Corning®
- Pipette di trasferimento da 7 ml con puntale standard o equivalente
- *digene* Specimen Transport Medium

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro.

Leggere attentamente tutte le istruzioni prima di utilizzare il test.

Avvertenze

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per ulteriori informazioni, consultare le appropriate schede di sicurezza (SDS). Le schede SDS, nel pratico

* Le provette di conversione del campione *digene* HC2 disponibili presso QIAGEN devono essere utilizzate con l'MST Vortexer 2 o l'RCS.

e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.

Campioni



I campioni possono contenere agenti infettivi e devono essere trattati di conseguenza. Tutti i campioni devono essere considerati potenzialmente infettivi.

Nessuna metodica di test nota è in grado di garantire con certezza che i campioni non possano trasmettere l'infezione. Si raccomanda di trattare i campioni umani secondo le prassi nazionali e locali corrette in materia di biosicurezza. Utilizzare tali prassi per la biosicurezza con materiali contenenti, o che si sospetta contengano, agenti infettivi.

A titolo esemplificativo, fra le precauzioni da adottare figurano le seguenti:

- Non pipettare con la bocca.
- Non fumare, mangiare o bere in aree in cui si utilizzano reagenti o campioni.
- Indossare guanti monouso privi di polveri quando si utilizzano reagenti o campioni. Lavarsi bene le mani dopo avere eseguito il test.
- Pulire e disinfettare le superfici venute a contatto diretto con i campioni utilizzando un disinfettante tubercolicida, ad esempio ipoclorito di sodio allo 0,5% v/v o altro disinfettante adatto (32, 33).
- Decontaminare e smaltire tutti i campioni, reagenti e altro materiale potenzialmente contaminato in conformità con le normative nazionali e locali.

Dopo la denaturazione e l'incubazione, i campioni non sono più considerati infettivi (34); tuttavia, il personale di laboratorio deve continuare a uniformarsi alle precauzioni nazionali e locali.

Sodio azide

Alcuni reagenti contengono sodio azide. È stato segnalato che la sodio azide si combina con il piombo o il rame nelle tubature dei laboratori. Queste azidi

potrebbero esplodere per effetto di percussione, ad esempio colpi di martello. Per evitare la formazione di azidi di rame o piombo, sciacquare gli scarichi abbondantemente con acqua dopo avervi versato soluzioni contenenti sodio azide. Per decontaminare vecchi scarichi in cui si sospetta l'accumulo di azidi, la U.S. Occupational Safety and Health Administration (l'autorità statunitense per la salute e la sicurezza sul lavoro) consiglia quanto segue:

1. Travasare i liquidi dal sifone, utilizzando un tubo di gomma o di plastica.
2. Riempirlo con una soluzione di idrossido di sodio al 10% v/v.
3. Lasciare riposare per 16 ore.
4. Risciacquare bene con acqua.

Tampone N2



Non aggiungere sbiancanti, né soluzioni acide direttamente alla soluzione o ai residui contenenti il tampone N2.

Il tampone N2 contiene idrocloruro di guanidina, che può formare composti altamente reattivi se combinati con agenti sbiancanti.

Se si rovescia il liquido di questi tamponi, pulire con acqua e detergente idoneo per l'uso in laboratorio. Se il liquido rovesciato contiene agenti potenzialmente infetti, pulire l'area interessata con acqua e detergente da laboratorio, successivamente con una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% (v/v).

Test RCS automatizzati

Consultare il Manuale utente del Rapid Capture System per ulteriori avvertenze e precauzioni specifiche all'utilizzo di tale sistema nei test ad alto rendimento per volumi e campioni.

Dichiarazioni di sicurezza e di rischio relative ai componenti

Le seguenti frasi di rischio e di sicurezza si applicano ai componenti del kit del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA:

Tampone di lavaggio concentrato



Contiene sodio azide: tossico. Frasi di rischio e di sicurezza: * R25-52/53, S36/37/39-45.

Reagente di denaturazione



Contiene idrossido di sodio: corrosivo. Frasi di rischio e di sicurezza: * R35, S26-36/37/39-45

Diluente della sonda



Contiene BES e acido acetico: irritante. Frasi di rischio e di sicurezza: * R36/38, S26-36/37/39

- * R25: Tossico in caso di ingestione; R35: Provoca gravi ustioni; R36/38: Irritante per gli occhi e la pelle; R52/53: Nocivo per gli organismi acquatici, può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico; S26: In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare uno specialista; S36/37/39: Usare indumenti protettivi, guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia; S45: In caso d'infortunio o di malore, consultare immediatamente un medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

Informazioni di emergenza 24 ore su 24

In caso di emergenza o di infortuni a causa di sostanze chimiche è possibile chiedere assistenza, 24 ore su 24, presso:

CHEMTREC

USA e Canada ■ Tel: 1-800-424-9300

Al di fuori degli USA e del Canada ■ Tel: +1-703-527-3887 (sono ammesse telefonate con addebito al destinatari)

Precauzioni

Durante l'esecuzione del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, l'utilizzatore deve sempre uniformarsi alle precauzioni riportate di seguito:

- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza indicata accanto al simbolo  sull'etichetta della confezione esterna, oppure oltre la data di scadenza dei reagenti preparati.
- L'esecuzione di test al di fuori degli intervalli di tempo e temperatura indicati può dare luogo a risultati non validi. I test che non rientrano negli intervalli di tempo e temperatura stabiliti non sono validi e devono essere ripetuti.
- Per ottenere risultati affidabili, attenersi scrupolosamente alla procedura del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, alla calibrazione del test, al controllo di qualità e all'interpretazione dei risultati.
- È importante pipettare esattamente il volume di reagente indicato e miscelare bene dopo l'aggiunta di ogni reagente. In caso contrario, il risultato del test potrebbe non essere corretto. Verificando se avvengono i cambiamenti di colore descritti, si avrà la conferma che le condizioni sopra indicate sono state soddisfatte.
- Ad esclusione del tampone di lavaggio concentrato, i componenti del kit sono stati sottoposti a test come insieme. Non sostituirli con componenti provenienti da altre fonti o lotti diversi. Per ottenere i volumi di reagenti necessari all'esecuzione dei test sulle micropiastre multiple in una singola sessione RCS, è comunque accettabile combinare componenti di kit con lo stesso numero di lotto.

- Gli acidi nucleici sono molto sensibili alla degradazione ambientale delle nucleasi. Le nucleasi sono presenti sulla pelle umana e su superfici o materiali utilizzati dall'uomo. Pulire e coprire le superfici di lavoro con una copertina monouso per il banco e indossare guanti privi di polveri durante tutte le fasi del test.
- Durante l'esecuzione del test, prestare attenzione per evitare la contaminazione della micropiastra di cattura e del reagente di rilevazione 2 (DR2) con fosfatasi alcalina esogena. Fra le sostanze potenzialmente contenenti fosfatasi alcalina figurano il reagente di rilevazione 1 (DR1), batteri, saliva, capelli e sostanze oleose della pelle. È particolarmente importante coprire la micropiastra di cattura dopo la fase di lavaggio e durante l'incubazione con il DR2, in quanto la fosfatasi alcalina esogena potrebbe reagire con tale reagente e dare luogo a falsi positivi.
- Proteggere il DR2 dall'esposizione prolungata alla luce diretta. Utilizzare il DR2 subito dopo averlo dosato ed evitare la luce solare diretta.
- Il pipettatore a ripetizione deve essere riempito prima di procedere all'erogazione del reagente; è inoltre opportuno eseguire periodicamente un controllo della presenza di grandi bolle d'aria. Quantità eccessive di grandi bolle d'aria, contenute nel puntale del pipettatore a ripetizione, possono causare un'erogazione imprecisa e devono essere evitate riempiendo il pipettatore, dispensando tutto il liquido e riempiendolo nuovamente. Per istruzioni d'uso specifiche, consultare il manuale utente del pipettatore.
- I pipettatori multicanale devono essere utilizzati con una tecnica di aspirazione inversa (vedere "Rilevazione degli ibridi," pagina 57) per l'erogazione dei reagenti DR1 e DR2. Controllare il puntale di ogni pipettatore multicanale per verificare che sia fissata saldamente e riempita correttamente.
- Verificare che ogni pozzetto della micropiastra di cattura sia stato lavato accuratamente (vedere "Lavaggio," pagina 59). Un lavaggio inadeguato causa un aumento del rumore di fondo e può dare luogo a risultati falsi positivi. La presenza di residui del tampone di lavaggio nei pozzetti può dare luogo a una riduzione del segnale o a scarsa riproducibilità.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Componenti del kit

Al ricevimento, conservare il kit a 2–8°C. Il tampone di lavaggio concentrato, il reagente di denaturazione e l'indicatore possono essere conservati a 2–30°C. Tutti i reagenti sono pronti all'uso, ad eccezione del reagente di denaturazione (DNR), della miscela della sonda e del tampone di lavaggio.

Reagenti preparati

Dopo la preparazione, il DNR è stabile per 3 mesi se conservato a 2–8°C.

Dopo la preparazione, il tampone di lavaggio è stabile per 3 mesi se conservato a 2–30°C.

Se si analizzano i campioni processati con il kit QIASymphony DSP HPV Media o QIASymphony DSP AXpH DNA:

- Dopo l'apertura, il kit, i calibratori e i controlli di qualità non denaturati sono stabili per 3 mesi a 2–8°C.
- Se si analizzano campioni processati con il kit QIASymphony DSP AXpH DNA, il reagente di denaturazione 2 (DNR2) preparato è stabile per 8 ore se conservato a 15–30°C.

Prelievo e preparazione dei campioni

Prelevare e trasportare i campioni cervicali da analizzare con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA utilizzando uno dei seguenti dispositivi per il prelievo di campioni:

- DNAPap Cervical Sampler (formato da uno spazzolino cervicale e dal STM)
- Biopsie prelevate nel *digene* STM
- Dispositivo di prelievo del tipo a spazzolino o una combinazione di spazzolino/spatola inseriti nella soluzione PreservCyt o nel fluido conservante SurePath

I campioni prelevati con dispositivi di campionamento o trasportati con mezzi diversi da quelli citati non sono adatti all'uso con questo test. Le caratteristiche di questo test sono state stabilite soltanto con i kit di prelievo indicati.

Il DNAPap Cervical Sampler deve essere utilizzato esclusivamente su donne non in gravidanza. I campioni cervicali devono essere prelevati prima dell'applicazione di acido acetico o iodio, se dovrà essere effettuato un esame colposcopico. Consultare le istruzioni per l'uso del DNAPap Cervical Sampler per ulteriori informazioni sulle procedure di prelievo e manipolazione di campioni.

I campioni cervicali prelevati in STM non richiedono alcuna conversione dei campioni prima dell'analisi con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. I campioni in PreservCyt e SurePath richiedono la conversione dei campioni prima dell'analisi con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Campioni cervicali in STM

Importante: Non prelevare un campione cervicale in STM in presenza di concentrazioni elevate di pomate antifungine, spermicidi o lavande vaginali.

I campioni in STM possono essere conservati per un massimo di 2 settimane a temperatura ambiente e inviati al laboratorio d'analisi senza refrigerazione. I campioni devono essere spediti in un contenitore isolato con un servizio di consegna entro 24 o 48 ore.

Una volta giunti presso il laboratorio di analisi, i campioni dovranno essere conservati a 2–8°C se il test verrà eseguito entro 1 settimana. In caso contrario, è possibile conservarli a una temperatura –20°C per un massimo di 3 mesi coprendo i tappi delle provette con pellicola Parafilm. Quando si estraggono i campioni dal freezer per analizzarli, sostituire immediatamente i tappi delle provette di prelievo dei campioni con appositi tappi a vite.

La soluzione STM contiene un conservante che ritarda la crescita batterica e contribuisce a preservare l'integrità del DNA. La sua funzione non è quella di preservare la vitalità di organismi o cellule.

Biopsie cervicali

Con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA possono essere analizzate biopsie cervicali appena prelevate, con sezione trasversale pari a 2–5 mm. Non

utilizzare biopsie di diametro inferiore a 2 mm. Il campione per biopsia deve essere immediatamente immerso in 1,0 ml di STM, coprendo il tappo della provetta con pellicola Parafilm per evitare che la provetta si stappi, e conservato congelato a -20°C . I campioni per biopsia devono essere spediti a $2-30^{\circ}\text{C}$ per la consegna al laboratorio d'analisi il giorno seguente.

Nel laboratorio d'analisi, conservare a -20°C finché non viene effettuato il test. Quando si estraggono i campioni dal freezer per eseguire l'analisi, sostituire immediatamente i tappi delle provette di prelievo dei campioni con appositi tappi a vite.

Campioni cervicali in soluzione PreservCyt

Importante:

- Non prelevare campioni cervicali in PreservCyt per la preparazione dei campioni con il kit QIASymphony DSP HPV Media se sono presenti elevate concentrazioni di pomata antifungina, gel vaginale lubrificante o sangue.
- Non prelevare campioni cervicali in PreservCyt per la preparazione dei campioni con il kit QIASymphony DSP AXpH DNA se è presente gel spermicida.

Prelevare i campioni secondo la routine e preparare i vetrini del Pap test ThinPrep[®] seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Devono rimanere almeno 4 ml di soluzione PreservCyt per il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. I campioni con meno di 4 ml di PreservCyt, dopo la preparazione del Pap Test contengono materiale insufficiente e potrebbero dare luogo a falsi negativi con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Dopo il prelievo, conservare i campioni in soluzione PreservCyt fino a 3 mesi a una temperatura compresa tra 2 e 30°C prima della preparazione per il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. I campioni in soluzione PreservCyt non possono essere congelati.

Per la preparazione dei campioni sono disponibili le seguenti metodiche:

- Preparazione automatizzata dei campioni con il QIASymphony SP e il kit QIASymphony DSP HPV Media. Si ottengono estratti dei campioni contenenti particelle magnetiche, STM e DNR, pronti per procedere alla fase di denaturazione del test.

- Preparazione automatizzata dei campioni con il QIA Symphony SP e il kit QIA Symphony DSP AXpH DNA. Si ottiene un eluato di DNA pronto per procedere alla fase di denaturazione del test.
- Preparazione manuale dei campioni con il kit *digene* HC2 Sample Conversion. Il risultato della preparazione manuale dei campioni è un campione denaturato pronto per procedere alla fase di ibridazione del test.

Campioni cervicali nel fluido conservante SurePath

I campioni prelevati nel fluido conservante SurePath secondo le relative istruzioni per l'uso possono essere utilizzati con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Per l'analisi con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, i campioni SurePath prelevati possono essere conservati fino a una settimana a una temperatura compresa tra 15 e 22°C prima della preparazione del precipitato cellulare post-gradiente. Preparare i vetrini del Pap Test SurePath secondo le relative istruzioni dell'analizzatore di vetrini BD PrepStain®.

Dopo la preparazione dei vetrini del Pap Test SurePath, pipettare immediatamente 2,0 ml di fluido conservante SurePath nella provetta per centrifuga contenente il precipitato cellulare residuo, per conservare l'integrità del precipitato per l'esecuzione del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Il precipitato cellulare post-gradiente con il fluido conservante SurePath può essere conservato fino a 2 settimane a una temperatura compresa tra 15 e 22°C, seguite da max. 4 settimane a 2–8°C prima della preparazione per il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

I campioni di precipitato cellulare post-gradiente SurePath vengono preparati come indicato nelle presenti istruzioni per l'uso. Il risultato della preparazione manuale dei campioni è un campione denaturato pronto per procedere alla fase di ibridazione del test.

Procedura

Prima di iniziare

- Per l'analisi manuale, attendere almeno 60 minuti che il Microplate Heater I si equilibri a $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se non si rispetta il periodo di riscaldamento, la micropiastre di ibridazione potrebbe fondersi. Per maggiori informazioni consultare il *Microplate Heater I Manuale dell'operatore*.
- Se si utilizza un bagno d'acqua durante le fasi di denaturazione e ibridazione, verificare che la temperatura del bagno d'acqua sia di 65°C e che vi sia acqua sufficiente per potere immergere l'intero volume del campione contenuto nella provetta.

Preparazione dei reagenti

Punti importanti prima di iniziare

- Togliere i campioni e tutti i reagenti necessari dal frigorifero prima di iniziare il test. Lasciarli riposare per 15–30 minuti in modo che raggiungano una temperatura di $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$. Preparare i campioni in soluzione PreservCyt e SurePath prima di equilibrare a temperatura ambiente tutti i campioni denaturati in precedenza e i reagenti.
- Se si combinano reagenti pronti all'uso per una sessione RCS su più piastre, miscelare accuratamente i singoli flaconi, poi unire il volume adeguato di reagente in una provetta a fondo conico pulita monouso in polipropilene.
- Per i test manuali, i reagenti del tampone di lavaggio e della miscela della sonda vengono preparati durante speciali fasi dell'analisi. Per i test RCS automatizzati, tutti i reagenti vengono preparati prima di iniziare la sessione RCS e posizionati sulla piattaforma RCS.
- Prima di preparare gli altri reagenti, preparare il DNR e il DNR2, se necessario.
- Al termine del test, scartare tutti i reagenti preparati (salvo diversamente specificato) e i dosaggi dei reagenti.
- Utilizzare le tabelle 1–5 seguenti per determinare il volume richiesto per ogni reagente in base al numero dei test/delle micropiastre e al metodo

d'analisi. I volumi dei test RCS automatizzati includono il volume vuoto del reagente richiesto dallo strumento.

Tabella 1. Volumi richiesti di reagenti preparati e pronti all'uso per i test manuali di campioni in STM e campioni in PreservCyt e SurePath preparati manualmente

Numero di test/strisce	Miscela della sonda	Tampone di lavaggio	DR1	DR2
24/3	1,04 ml	>1 litro	3 ml	3 ml
48/6	2,08 ml	>1 litro	5 ml	5 ml
72/9	3,12 ml	>1 litro	7 ml	7 ml
96/12	4,16 ml	>1 litro	12 ml	12 ml

Tabella 2. Volumi richiesti di reagenti preparati e pronti all'uso per i test RCS automatizzati di campioni in STM e campioni in PreservCyt e SurePath preparati manualmente

Numero di micropiastre	Miscela della sonda	Tampone di lavaggio	DR1	DR2
≤1	5,20 ml	3 litri	10 ml	10 ml
≤1,5	6,24 ml	3 litri	14 ml	14 ml
≤2	8,32 ml	3 litri	18 ml	18 ml
≤2,5	9,36 ml	6 litri	22 ml	22 ml
≤3	10,40 ml	6 litri	26 ml	26 ml
≤3,5	12,48 ml	6 litri	30 ml	30 ml
≤4	13,52 ml	6 litri	34 ml	34 ml

Tabella 3. Volumi richiesti di reagenti preparati e pronti all'uso per i test RCS automatizzati di campioni in PreservCyt preparati utilizzando il kit QIA Symphony DSP HPV Media

Numero di micropiastre	Miscela della sonda		Tampone di lavaggio	DR	
	DNR			DR1	DR2
≤1	2,2 ml	5,20 ml	3 litri	10 ml	10 ml
≤1,5	2,2 ml	6,24 ml	3 litri	14 ml	14 ml
≤2	2,4 ml	8,32 ml	3 litri	18 ml	18 ml
≤2,5	2,4 ml	9,36 ml	6 litri	22 ml	22 ml
≤3	2,6 ml	10,40 ml	6 litri	26 ml	26 ml
≤3,5	2,6 ml	12,48 ml	6 litri	30 ml	30 ml
≤4	2,8 ml	13,52 ml	6 litri	34 ml	34 ml

Tabella 4. Volumi richiesti di reagenti preparati e pronti all'uso per i test manuali di campioni in PreservCyt preparati utilizzando il kit QIA Symphony DSP AXpH DNA

Numero di test/strisce	Miscela della sonda		Tampone di lavaggio	DR		
	DNR	DNR2		DR1	DR2	
24/3	0,6 ml	1,0 ml	1,04 ml	>1 litro	3 ml	3 ml
48/6	0,6 ml	2,0 ml	2,08 ml	>1 litro	5 ml	5 ml
72/9	0,6 ml	2,5 ml	3,12 ml	>1 litro	7 ml	7 ml
96/12	0,6 ml	5,0 ml	4,16 ml	>1 litro	12 ml	12 ml

Tabella 5. Volumi richiesti di reagenti preparati e pronti all'uso per i test RCS automatizzati di campioni in PreservCyt preparati utilizzando il kit QIASymphony DSP AXpH DNA

Numero di micropiastre			Miscela della sonda	Tampone di lavaggio	DR1	DR2
	DNR	DNR2				
≤1	2,2 ml	5,0 ml	5,20 ml	3 litri	10 ml	10 ml
≤1,5	2,2 ml	5,5 ml	6,24 ml	3 litri	14 ml	14 ml
≤2	2,4 ml	6,5 ml	8,32 ml	3 litri	18 ml	18 ml
≤2,5	2,4 ml	7,7 ml	9,36 ml	6 litri	22 ml	22 ml
≤3	2,6 ml	8,8 ml	10,40 ml	6 litri	26 ml	26 ml
≤3,5	2,6 ml	10,0 ml	12,48 ml	6 litri	30 ml	30 ml
≤4	2,8 ml	11,0 ml	13,52 ml	6 litri	34 ml	34 ml

Reagente di denaturazione

- 1. Aggiungere 5 gocce di indicatore nel flacone del reagente di denaturazione.**
- 2. Miscelare accuratamente.**
Il DNR deve presentarsi di un colore viola scuro uniforme.
- 3. Apporre al DNR l'etichetta con la nuova data di scadenza.**

Note:

- Dopo la preparazione, il DNR è stabile per 3 mesi se conservato a 2–8°C.
- Se il colore si attenua, aggiungere altre 3 gocce di indicatore e miscelare bene prima dell'uso.

Reagente di denaturazione 2

1. Etichettare una provetta a fondo conico pulita monouso in polipropilene con "DNR2".
2. Aggiungere il volume necessario di tampone N2 (vedere la Tabella 6 seguente) nel contenitore etichettato.

Tabella 6. Preparazione del DNR2

Volume di DNR2 necessario	Volume del tampone N2	Volume del tampone D2	Indicatore
1,0 ml	0,4 ml	0,6 ml	1-2 gocce
2,0 ml	0,8 ml	1,2 ml	1-2 gocce
2,5 ml	1,0 ml	1,5 ml	1-2 gocce
5,0 ml	2,0 ml	3,0 ml	1-2 gocce
5,5 ml	2,2 ml	3,3 ml	1-2 gocce
6,5 ml	2,6 ml	3,9 ml	1-2 gocce
7,7 ml	3,1 ml	4,6 ml	1-2 gocce
8,8 ml	3,5 ml	5,3 ml	1-2 gocce
10,0 ml	4,0 ml	6,0 ml	1-2 gocce
11,0 ml	4,4 ml	6,6 ml	1-2 gocce

3. Aggiungere il volume necessario di tampone D2 (vedere la precedente Tabella 6) nel contenitore etichettato.
4. Aggiungere la quantità necessaria di indicatore (vedere la precedente Tabella 6) nel contenitore etichettato.

Nota: Utilizzare l'indicatore fornito con il kit del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

5. Agitare per almeno 10 secondi.

Nota: Dopo la preparazione, il DNR2 è stabile per 8 ore se conservato a 15-30°C.

Miscela della sonda

Punti importanti prima di iniziare

- Per i test manuali, preparare la miscela della sonda durante l'incubazione per la denaturazione dei campioni (se applicabile, vedere "Denaturazione di calibratori, controlli di qualità e campioni in STM", pagina 47 o "Denaturazione di calibratori, controlli di qualità ed eluati di DNA per l'analisi manuale", pagina 44).
- Prestare estrema attenzione per evitare la contaminazione da parte delle ribonucleasi. Per pipettare la sonda, servirsi di pipette con puntali dotati di barriera di contenimento dell'aerosol.
- Il diluente della sonda è denso. Verificare che si formi un vortice visibile durante la preparazione della miscela della sonda; una miscelazione incompleta può dare luogo a una riduzione del segnale.
- Se si combinano flaconi multipli della sonda per i test RCS automatizzati, unire la sonda in un unico flacone e miscelare aspirando e rilasciando con una pipetta.

1. Per evitare che residui di sonda rimangano nel tappo del flacone, centrifugare per breve tempo ogni flacone per portare il liquido sul fondo dello stesso.

2. Picchiettare delicatamente per miscelare.

3. Determinare la quantità necessaria di miscela della sonda:

Si raccomanda di preparare la miscela della sonda in quantità eccedente, in modo da tenere conto del volume che potrebbe andare perso nei puntali delle pipette o sui lati del flacone. I volumi specificati nelle Tabelle 1–5 precedenti includono il volume eccedente raccomandato.

Test manuali: Determinare i volumi necessari per una diluizione 1:25 della sonda nel relativo diluente per la preparazione della miscela (25 µl/test). I volumi sono riportati in Tabella 1, pagina 31, e Tabella 4, pagina 32, a seconda del caso.

Test automatizzati RCS: Utilizzare i volumi specificati in Tabella 2, pagina 31, Tabella 3, pagina 32 o Tabella 5, pagina 33, a seconda del caso.

4. Etichettare un nuovo contenitore monouso con la dicitura “miscela della sonda per l’HPV ad alto rischio”.

A seconda del numero di test, è consigliabile utilizzare una provetta in polipropilene a fondo tondo da 15 ml o 5 ml, con tappo a pressione.

5. Aggiungere la quantità necessaria di diluente della sonda (vedere la Tabella 7 seguente) nel contenitore etichettato.

6. Pipettare la quantità necessaria di sonda per l’HPV ad alto rischio nel diluente della sonda (vedere la Tabella 7 seguente), posizionando il puntale della pipetta contro la parete interna della provetta, esattamente al di sopra del menisco, ed espellendone il contenuto.

Importante: Non immergere il puntale nel diluente della sonda.

Tabella 7. Preparazione della miscela della sonda

Volume necessario miscela sonda	Volume diluente sonda	Volume sonda HPV ad alto rischio
1,04 ml	1,0 ml	40 µl
2,08 ml	2,0 ml	80 µl
3,12 ml	3,0 ml	120 µl
4,16 ml	4,0 ml	160 µl
5,20 ml	5,0 ml	200 µl
6,24 ml	6,0 ml	240 µl
8,32 ml	8,0 ml	320 µl
9,36 ml	9,0 ml	360 µl
10,40 ml	10,0 ml	400 µl
12,48 ml	12,0 ml	480 µl
13,52 ml	13,0 ml	520 µl

7. Agitare per almeno 5 secondi alla velocità massima per ottenere una miscelazione completa.

Deve formarsi un vortice visibile.

Tampone di lavaggio

Punti importanti prima di iniziare

- Per i test manuali, preparare il tampone di lavaggio durante la fase di cattura degli ibridi (vedere "Cattura degli ibridi", pagina 55).
- Per ridurre al minimo l'esposizione, durante la preparazione aggiungere acqua al tampone di lavaggio concentrato.
- Per la metodica di lavaggio manuale delle micropiastre, preparare 3 litri di tampone nel sistema di lavaggio.

Si raccomanda di pulire ogni 3 mesi il sistema di lavaggio e le tubature con soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5%, risciacquando bene con acqua distillata o deionizzata, per evitare la possibile contaminazione da parte della fosfatasi alcalina presente nei batteri e nelle muffe.

- Per l'Automated Plate Washer, preparare il tampone di lavaggio e conservarlo in un contenitore chiuso, oppure prepararne 1 litro per volta e riporlo nell'apposito contenitore di lavaggio dell'Automated Plate Washer.
- Per i test RCS automatizzati, preparare la quantità specificata (se applicabile, vedere Tabella 2, pagina 31, Tabella 3, pagina 32 o Tabella 5, pagina 33) nel flacone di lavaggio RCS.

- 1. Miscelare bene il tampone di lavaggio concentrato e aggiungere il volume necessario di tampone (vedere la Tabella 8 seguente) nel contenitore specificato.**
- 2. Aggiungere il volume necessario di acqua distillata o deionizzata (vedere la Tabella 8 seguente) nel contenitore specificato.**

Tabella 8. Preparazione del tampone di lavaggio

Volume di tampone di lavaggio necessario	Volume di tampone di lavaggio concentrato	Volume di acqua distillata o deionizzata
1 litro	33,3 ml	966,7 ml
2 litri	66,6 ml	1.933,4 ml
3 litri	100,0 ml	2.900,0 ml
6 litri	200,0 ml	5.800,0 ml

- 3. Posizionare una salvietta di carta pulita e priva di fibre su tutte le aperture del contenitore e miscelare bene.**
- 4. Sigillare il contenitore per evitare la contaminazione o l'evaporazione, oppure collocarlo sul rispettivo strumento, a seconda del caso.**
- 5. Apporre sul tampone di lavaggio l'etichetta con la nuova data di scadenza.**

Nota: Dopo la preparazione, il tampone di lavaggio è stabile per 3 mesi se conservato a 2–30°C.

Creazione del layout della piastra

- 1. Creare un layout della piastra usando il software di analisi dei dosaggi *digene* con i protocolli di dosaggio *digene* per l'HPV.**

Consultare il manuale utente del relativo software per le istruzioni riguardanti la creazione di un layout della piastra con le corrette posizioni di calibratori, controlli di qualità e campioni.

Note:

- I calibratori, i controlli di qualità e in campioni sono analizzati in una configurazione a colonna con 8 pozzetti della micropiastra.
- Eseguire l'analisi dei calibratori e dei controlli di qualità nelle seguenti posizioni sulla micropiastra (vedere la Figura 1, pagina 39):
 - Replicati del controllo negativo (NC) nei pozzetti della micropiastra A1, B1, C1
 - Replicati del calibratore per l'HPV ad alto rischio (HRC) nei pozzetti della micropiastra D1, E1, F1

- Controllo di qualità per l'HPV a basso rischio (QC1-LR) nel pozzetto della micropiastra G1
- Controllo di qualità per l'HPV ad alto rischio (QC2-HR) nel pozzetto della micropiastra H1

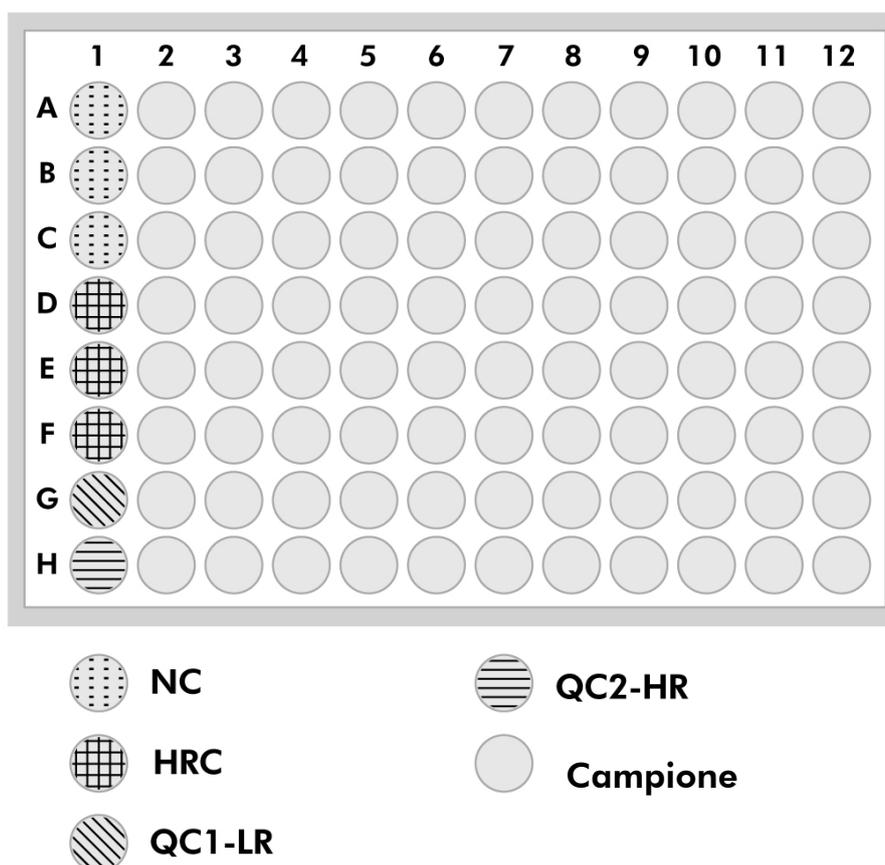


Figura 1. Posizione dei calibratori, dei controlli di qualità e dei campioni sulla micropiastra.

Importante: Quando si eseguono i test RCS automatizzati, utilizzare protocolli di dosaggio specifici di RCS per creare il layout della piastra e generare i risultati. I parametri definiti dei protocolli di dosaggio specifici per RCS sono diversi da quelli dei protocolli di dosaggio per i test manuali (vedere "Calcolo del valore soglia", pagina 67).

- 2. Posizionare i calibratori, i controlli di qualità e i campioni da analizzare in un portaprovette per le provette di prelievo dei campioni o in un portaprovette per campioni nell'ordine in cui saranno eseguiti i test.**

Importante: Quando si eseguono test RCS automatizzati, per evitare di ottenere risultati imprecisi è importante che il layout della piastra

corrisponda ai campioni corretti analizzati. Verificare che i numeri di serie coincidano per ogni portaprovette per campioni coperchio utilizzati e, se necessario, etichettare ogni portaprovette per campioni e coperchio secondo l'ordine di analisi sull'RCS. Utilizzare un pennarello e un'etichetta che non vengano asportati nel bagno d'acqua a 65°C.

Preparazione del campione

I campioni in PreservCyt e SurePath devono essere preparati prima dell'analisi con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. A seconda del tipo di preparazione eseguita, i campioni preparati sono pronti per diverse fasi del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

I metodi disponibili per la preparazione dei campioni sono i seguenti:

- Preparazione automatizzata dei campioni in soluzione PreservCyt con il kit QIAasymphony DSP HPV Media
- Preparazione automatizzata dei campioni in soluzione PreservCyt con il kit QIAasymphony DSP AXpH DNA
- Preparazione manuale dei campioni in soluzione PreservCyt
- Preparazione manuale dei campioni SurePath

Preparazione dei campioni in soluzione PreservCyt con il kit QIAasymphony DSP HPV Media



Per le istruzioni relative alla preparazione dei campioni in soluzione PreservCyt, consultare le *Istruzioni per l'uso (Manuale) del kit QIAasymphony DSP HPV Media*.

Importante: Gli estratti dei campioni ottenuti dalla preparazione dei campioni in soluzione PreservCyt con il kit QIAasymphony DSP HPV Media possono essere analizzati esclusivamente utilizzando il sistema RCS. L'esecuzione manuale del test non è convalidata.

Dalla preparazione dei campioni in soluzione PreservCyt utilizzando il kit QIAasymphony DSP HPV Media si ottengono estratti dei campioni in una micropiastra di ibridazione con la prima colonna vuota. Gli estratti dei campioni contengono particelle magnetiche, STM e DNR e sono pronti per i test RCS automatizzati nella fase di denaturazione. I calibratori, i controlli di qualità

e gli estratti dei campioni vengono denaturati contemporaneamente sulla micropiastra di ibridazione sul sistema RCS (vedere “Denaturazione e ibridazione dei campioni preparati con il QIASymphony SP”, pag. 43).

Preparazione dei campioni in soluzione PreservCyt con il kit QIASymphony DSP AXpH DNA



Per le istruzioni relative alla preparazione dei campioni in soluzione PreservCyt, consultare il *Manuale del kit QIASymphony DSP AXpH DNA*.

Dalla preparazione dei campioni in soluzione PreservCyt utilizzando il kit QIASymphony DSP AXpH DNA si ottengono eluati in una micropiastra di ibridazione con la prima colonna vuota. Gli eluati di DNA sono pronti per la fase di denaturazione del test. I calibratori, i controlli di qualità e gli eluati di DNA vengono denaturati contemporaneamente sulla micropiastra di ibridazione (vedere “Denaturazione e ibridazione dei campioni preparati con il QIASymphony SP”, pagina 43).

Preparazione manuale dei campioni in soluzione PreservCyt



Per la preparazione manuale di campioni in soluzione PreservCyt, consultare le istruzioni per l'uso del kit *digene HC2 Sample Conversion*.

Dalla preparazione manuale dei campioni in PreservCyt con il kit *digene HC2 Sample Conversion* si ottengono campioni pronti per la fase di ibridazione del test. Preparare i calibratori e i controlli di qualità separatamente (vedere “Denaturazione di calibratori, controlli di qualità e campioni in STM”, pagina 47).

Preparazione manuale dei campioni SurePath

Le istruzioni per la preparazione manuale dei campioni SurePath sono riportate di seguito. Dalla preparazione manuale dei campioni in SurePath si ottengono campioni pronti per la fase di ibridazione del test. Preparare i calibratori e i controlli di qualità separatamente (vedere “Denaturazione di calibratori, controlli di qualità e campioni in STM,” pagina 47).

Importante: Se pare che il campione SurePath di precipitato cellulare post-gradiente contenga meno di 1 ml di fluido, il campione non è adatto all'analisi

con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA poiché il fluido conservante SurePath non è stato aggiunto dopo l'esame citologico.

- 1. Equilibrare i campioni SurePath a temperatura ambiente e verificare che il volume del fluido osservato sia di circa 2,8 ml.**
- 2. Centrifugare i campioni SurePath in una centrifuga ad agitazione ad una velocità pari a $800 \pm 15 \times g$ per 10 ± 1 minuti.**
- 3. Rimuovere le provette dalla centrifuga.**
- 4. Subito dopo la centrifuga, decantare accuratamente il sovrantante e asciugare delicatamente ogni provetta per circa 3 volte su salviette Kimtowels o salviette equivalenti prive di fibre per rimuovere il liquido in eccesso. Osservare il precipitato in ogni provetta.**

Importante: Durante l'asciugatura non lasciare che il precipitato cellulare scivoli all'interno della provetta.

- 5. Posizionare le provette nel portaprovette.**
- 6. Aggiungere 200 μ l di STM a ogni precipitato utilizzando un pipettatore a ripetizione o a un canale.**
- 7. Riportare in sospensione ogni precipitato agitando ogni singola provetta per 15 secondi ad alta velocità.**

Se risulta difficile riportare a sospensione, agitare per altri 5–30 secondi o fino a quando il precipitato galleggia liberamente, staccandosi dal fondo della provetta, e sembra sciogliersi.

Nota: Le provette possono essere miscelate senza tappo.

- 8. Pipettare 100 μ l di DNR in ogni campione SurePath utilizzando un pipettatore a ripetizione o a un canale.**

Importante: Prestare attenzione a non toccare i lati della provetta, in caso contrario potrebbe verificarsi una contaminazione crociata dei campioni.

- 9. Miscelare accuratamente ogni singola provetta, agitandola singolarmente ad alta velocità e per almeno 5 secondi.**

Nota: Le provette possono essere miscelate senza tappo.

10. Etichettare le provette di conversione campioni *digene* HC2 o le provette a fondo conico da 15 ml con l'identificazione e il tipo adeguati del campione (ad esempio, "SP" per il tipo di campione SurePath) e posizzionarle in un portaprovette.

Nota: Per i test RCS automatizzati, occorre utilizzare provette di conversione campioni *digene* HC2.

11. Trasferire l'intero volume nella provetta a fondo conico da 15 ml utilizzando una pipetta monouso da trasferimento con puntale standard da 7 ml o equivalente.

12. Chiudere le provette a fondo conico con i tappi e collocarle in un portaprovette.

13. Incubare le provette in un bagno d'acqua a $65 \pm 2^\circ\text{C}$ per 90 ± 5 minuti.

Nota: Il tempo di incubazione è maggiore di quello necessario per altri tipi di campioni approvati.

Se il test sarà completato nello stesso giorno, denaturare i calibratori e i controlli di qualità (vedere "Denaturazione di calibratori, controlli di qualità e campioni in STM", pagina 47).

14. Dopo l'incubazione rimuovere il portaprovette dal bagno d'acqua.

Se si utilizza un portacampioni, non lasciare raffreddare prima di rimuovere il coperchio, ma proseguire subito con l'analisi oppure rimuovere il coperchio e la pellicola per sigillare DuraSeal.

Nota: Se il portacampioni si raffredda, le provette possono incollarsi al coperchio e rovesciarsi.

I campioni SurePath preparati possono essere:

- Analizzati subito (procedere al "Ibridazione di campioni in STM e campioni in PreservCyt e SurePath preparati manualmente," pagina 50)
- Conservati (vedere "Interruzione facoltativa per campioni in STM e campioni in PreservCyt e SurePath preparati manualmente", pagina 50)

Denaturazione e ibridazione dei campioni preparati con il QIASymphony SP

Dalla preparazione dei campioni con il QIASymphony SP si ottiene una micropiastra con la prima colonna vuota. Il contenuto della micropiastra è

pronto per la fase di denaturazione del test. I calibratori e i controlli di qualità vengono aggiunti alla micropiastra di ibridazione. Successivamente si esegue la fase di denaturazione.



Quando si eseguono test RCS automatizzati dei campioni preparati con il QIA Symphony SP, consultare il Manuale utente del Rapid Capture System — Esecuzione dei test *digene* HC2 DNA con campioni processati mediante il QIA Symphony SP per le istruzioni relative alla conduzione dei test.

Importante: Gli estratti dei campioni ottenuti dalla preparazione dei campioni in soluzione PreservCyt con il kit QIA Symphony DSP HPV Media possono essere analizzati esclusivamente utilizzando il sistema RCS. L'esecuzione manuale del test non è convalidata.

Denaturazione di calibratori, controlli di qualità ed eluati di DNA per l'analisi manuale

Punti importanti prima di iniziare

- Questa procedura riguarda l'analisi manuale dei campioni in soluzione PreservCyt preparati con il kit QIA Symphony DSP AXpH DNA. Quando si eseguono test RCS automatizzati, consultare il Manuale utente del Rapid Capture System — Esecuzione dei test *digene* HC2 DNA con campioni processati mediante il QIA Symphony SP per le istruzioni relative alla conduzione dei test.
- La denaturazione dei calibratori e dei controlli di qualità viene eseguita utilizzando il DNR, mentre la denaturazione degli eluati di DNA viene condotta utilizzando il DNR2.

1. Agitare su vortex ogni calibratore e controllo di qualità per 10 secondi alla velocità massima.

Capovolgere ogni provetta per recuperare il materiale contenuto nel tappo.

2. Rimuovere il tappo dalle provette dei calibratori e dei controlli di qualità ed eliminarlo.

- 3. Utilizzando un pipettatore a singolo canale, aggiungere 50 µl del calibratore o del controllo di qualità corretto al fondo del pozzetto vuoto della micropiastra di ibridazione, secondo il layout della piastra creato.**

Se i calibratori e i controlli di qualità devono essere usati per altri test, chiudere le provette con tappi a vite nuovi per provette di prelievo campioni, etichettare con la nuova data di scadenza e conservare a 2–8°C.

Nota: Dopo l'apertura, i calibratori e i controlli di qualità non denaturati sono stabili per 3 mesi a 2–8°C.

- 4. Agitare accuratamente su vortex i reagenti DNR e DNR2 preparati e dosare ciascuno in un contenitore monouso per reagenti adeguatamente etichettato.**

Importante: Accertarsi che a ogni colonna della micropiastra di eluato sia aggiunto il reagente corretto.

- 5. Utilizzando un pipettatore a 8 canali, aggiungere 25 µl di DNR alla prima colonna della micropiastra di ibridazione contenente i calibratori e i controlli di qualità.**
- 6. Utilizzando un pipettatore a 8 canali, aggiungere 25 µl di DNR2 a ogni pozzetto della micropiastra di ibridazione contenente un eluato di DNA.**
- 7. Coprire la micropiastra di ibridazione con un apposito coperchio e agitare sul Rotary Shaker I impostato a 1.100 ± 100 giri/min per 30 secondi.**
- 8. Collocare la micropiastra nel Microplate Heater I alla temperatura di $65 \pm 2^\circ\text{C}$, prestando attenzione a non creare spruzzi. Incubare la micropiastra di ibridazione per 45 ± 5 minuti.**

Preparare la miscela della sonda durante questa incubazione (vedere "Miscela della sonda" pagina 35).

- 9. Rimuovere la micropiastra di ibridazione dal Microplate Heater I.**

I calibratori, i controlli di qualità e gli eluati di DNA denaturati possono essere:

- Conservati (vedere "Interruzione facoltativa degli eluati di DNA", pagina 46)
- Analizzati immediatamente (passare a "Ibridazione degli eluati di DNA", pagina 46)

Interruzione facoltativa degli eluati di DNA

Gli eluati di DNA denaturati, tra cui i calibratori e i controlli di qualità, coperti con un coperchio per micropiastra, possono essere conservati a 2–8°C per 2 settimane.

Ibridazione degli eluati di DNA

Prima di iniziare

Se la micropiastra di ibridazione contenente i calibratori, i controlli di qualità e gli eluati di DNA denaturati è stata conservata, rimuovere il relativo coperchio e portare la micropiastra alla temperatura di 20–25°C.

- 1. Agitare accuratamente su vortex la miscela della sonda e dosare in un contenitore monouso per reagenti.**
- 2. Pipettare con cautela 25 µl della miscela della sonda in ogni pozzetto della micropiastra di ibridazione, utilizzando un pipettatore a 8 canali e un puntale nuovo per ogni aggiunta di miscela.**

Evitare spruzzi e non toccare i lati dei pozzetti della micropiastra di ibridazione.

- 3. Coprire la micropiastra di ibridazione con un coperchio e agitare sul Rotary Shaker I impostato a 1.100 ± 100 giri/min per 3 ± 2 minuti.**

Dopo l'agitazione, i calibratori, i controlli di qualità e gli eluati di DNA dovrebbero assumere una colorazione gialla.

I campioni che rimangono viola potrebbero non avere ricevuto la quantità corretta di miscela della sonda. Aggiungere altri 25 µl di miscela ai campioni rimasti viola e agitare di nuovo. Se dopo questa procedura vi sono ancora campioni viola, è necessario analizzarli di nuovo.

- 4. Collocare la micropiastra nel Microplate Heater I alla temperatura di 65 ± 2 °C, prestando attenzione a non creare spruzzi. Incubare la micropiastra di ibridazione per 60 ± 5 minuti.**
- 5. Per proseguire l'analisi, passare a "Cattura degli ibridi" pagina 55.**

Denaturazione e ibridazione di campioni in STM e campioni in PreservCyt e SurePath preparati manualmente

Punti importanti prima di iniziare

- Quando si analizzano campioni in PreservCyt e SurePath preparati manualmente, la fase di denaturazione non è necessaria. Tuttavia, i calibratori e i controlli di qualità richiesti con il test vengono denaturati secondo le istruzioni riportate di seguito.
- Alcuni campioni in STM possono contenere sangue o altro materiale biologico, che può nascondere i cambiamenti di colore conseguenti all'aggiunta del reagente DNR. Con campioni che presentano un colore scuro, prima di aggiungere il DNR in questa fase si potrebbe non ottenere il cambiamento di colore corretto. In questi casi, il cambiamento di colore non corretto non influisce sui risultati del test. È possibile verificare la corretta miscelazione osservando il cambiamento di colore dei calibratori e dei controlli di qualità.

Denaturazione di calibratori, controlli di qualità e campioni in STM

Punti importanti prima di iniziare

- Non rimuovere il dispositivo di prelievo del campione dalla provetta.
- Per evitare falsi positivi, è di vitale importanza che tutto il materiale dei campioni venga a contatto con il DNR. La miscelazione conseguente all'aggiunta del DNR è una fase cruciale.
- I campioni in STM denaturati con la metodica MST Vortexer 2 devono utilizzare la procedura "Ibridazione mediante una micropiastre e il Microplate Heater I". La procedura "Ibridazione mediante microprovette e bagno d'acqua" non è stata convalidata con campioni in STM denaturati utilizzando la metodica MST Vortexer 2.

1. Rimuovere e gettare i tappi dalle provette.

Importante: i tappi rimossi dalle provette dei campioni in STM sono potenzialmente infettivi (per ulteriori informazioni vedere “Avvertenze e precauzioni,” pagina 20).

2. Pipettare il volume specificato (vedere la Tabella 9 seguente) di DNR nelle provette utilizzando un pipettatore a ripetizione o regolabile.

Prestare attenzione a non toccare i lati delle provette, in caso contrario potrebbe verificarsi una contaminazione crociata dei campioni.

Nota: Il volume di DNR aggiunto equivale alla metà del volume del liquido contenuto nella provetta.

Tabella 9. Aggiunta di DNR

Calibratore, controllo di qualità o campione in STM	Volume di DNR necessario
Calibratore negativo, 2 ml	1.000 µl
Calibratore HPV ad alto rischio, 1 ml	500 µl
Controllo di qualità HPV basso o alto rischio, 1 ml	500 µl
Campione in STM, 1 ml	500 µl

3. Miscelare le provette utilizzando una delle metodiche descritte di seguito:

Procedura con MST Vortexer 2

- a. Coprire le provette con la pellicola per sigillare DuraSeal stendendola sopra le provette contenute nel portaprovette per campioni.
- b. Posizionare il coperchio del portaprovette sopra le provette ricoperte di pellicola e bloccarlo in posizione con le 2 clip laterali. Tagliare la pellicola con l'apposita taglierina.
- c. Spostare la leva rossa verso l'alto (UP) in modo che si trovi in posizione orizzontale.
- d. Collocare il portaprovette sull'MST Vortexer 2 in modo che sia saldamente inserito all'interno delle guide e che l'angolo più largo, che presenta la tacca del portaprovette, si trovi nell'angolo anteriore destro.

- Fissare il portaprovette spostando la leva rossa verso il basso in posizione verticale.
- e. Verificare che la velocità sia impostata a 100 (velocità massima) e ruotare l'interruttore di alimentazione dell'MST Vortexer 2 su ON.
 - f. Agitare le provette per 10 secondi.
 - g. Ruotare l'interruttore di alimentazione dell'MST Vortexer 2 su OFF.
 - h. Rimuovere il portaprovette per campioni dall'MST Vortexer 2 sollevando la leva rossa verso l'alto.

Procedura di agitazione manuale delle singole provette

- a. Richiudere le provette di prelievo campioni con tappi a vite nuovi.
- b. Miscelare accuratamente ogni singola provetta, agitandola singolarmente ad alta velocità per almeno 5 secondi.
Importante: Durante la miscelazione si deve formare un vortice visibile di liquido che bagni l'intera superficie interna della provetta.
- c. Capovolgere ogni provetta una volta per far sì che il liquido bagni i lati interni, il tappo e il bordo.
- d. Riporre la provetta nel portaprovette.

Il liquido all'interno della provetta deve assumere una colorazione viola.

4. Incubare le provette contenute nel portaprovette in un bagno d'acqua a $65 \pm 2^\circ\text{C}$ per 45 ± 5 minuti.

Per i test manuali, preparare la miscela di sonde durante questo periodo di incubazione (vedere “

Miscela della sonda,” pagina 35).

5. Dopo l'incubazione rimuovere le provette dal bagno d'acqua.

Se si utilizza un portaprovette per campioni, non lasciare raffreddare prima di rimuovere il coperchio, ma proseguire subito con l'analisi oppure rimuovere il coperchio e la pellicola per sigillare DuraSeal.

Nota: Se il portaprovette per campioni si raffredda, le provette possono incollarsi al coperchio e rovesciarsi.

I calibratori, o controlli di qualità e i campioni in STM denaturati possono essere:

- Conservati (vedere “Interruzione facoltativa per campioni in STM e campioni in PreservCyt e SurePath preparati manualmente”, pagina 50)
- Analizzati subito (procedere a “Ibridazione di campioni in STM e campioni in PreservCyt e SurePath preparati manualmente”, pagina 50)

Interruzione facoltativa per campioni in STM e campioni in PreservCyt e SurePath preparati manualmente

Importante: Non conservare o spedire campioni denaturati su ghiaccio secco.

Tutti i campioni preparati, inclusi i calibratori e i controlli di qualità, possono essere conservati a 2–8°C fino al giorno dopo o a –20°C per un massimo di 3 mesi. È possibile effettuare un massimo di 3 cicli di congelamento/scongelo con un massimo di 2 ore a temperatura ambiente durante ogni ciclo di scongelamento.

Per la conservazione fino al giorno dopo a 2–8°C nel portaprovette per campioni, coprire i campioni con la pellicola per sigillare DuraSeal e riposizionare il coperchio.

Per la conservazione a –20°C nel portaprovette per campioni, rimuovere il coperchio e la pellicola per sigillare DuraSeal, quindi chiudere le provette con un tappo adeguato.

Ibridazione di campioni in STM e campioni in PreservCyt e SurePath preparati manualmente



Quando si eseguono i test RCS automatizzati di campioni in STM o di campioni in PreservCyt e SurePath preparati manualmente, consultare il Manuale utente del Rapid Capture System per le istruzioni necessarie al completamento dei test.

Punti importanti prima di iniziare

- Per i campioni in STM e i campioni in PreservCyt e SurePath preparati manualmente sono disponibili due procedure: “Ibridazione mediante micropiastra e Microplate Heater I” e “Ibridazione mediante microprovette e bagno d’acqua.”
- I campioni in STM denaturati con l’MST Vortexer 2 devono utilizzare il metodo “Ibridazione mediante una micropiastra e il Microplate Heater I”. Il metodo “Ibridazione mediante microprovette e bagno d’acqua” non è stato convalidato con campioni in STM denaturati utilizzando l’MST Vortexer 2.
- La miscela della sonda è densa. Verificare che la miscela sia accuratamente miscelata e che la necessaria quantità sia completamente dispensata in ogni pozzetto della micropiastra o della microprovetta di ibridazione.
- Quando si trasferisce il campione nella micropiastra o nella microprovetta di ibridazione, evitare di toccare i lati dei pozzetti della micropiastra o delle microprovette poiché possono verificarsi falsi positivi se i campioni non sono trasferiti correttamente. Limitare la formazione di bolle d’aria. Utilizzare un puntale extra lungo pulito per ogni trasferimento al fine di evitare la contaminazione crociata.

Prima di iniziare

Se i calibratori, i controlli di qualità o i campioni denaturati sono stati conservati, portarli alla temperatura di 20–25°C e, se conservati in un portaprovette per campioni, rimuovere ed eliminare i tappi dalle provette.

Ibridazione mediante una micropiastra e il Microplate Heater I

1. Procurarsi ed etichettare una micropiastra di ibridazione.
2. Agitare utilizzando uno dei seguenti metodi:

Calibratori, controlli di qualità o campioni in STM con MST Vortexer 2

- a. Se applicabile, coprire le provette con pellicola per sigillare DuraSeal e fissare il coperchio sul portaprovette per campioni.
- b. Agitare il portaprovette per campioni per almeno 5 secondi alla velocità massima.
- c. Posizionare immediatamente il portaprovette per campioni sul piano di lavoro e sbloccare le clip. Sollevare il coperchio del portaprovette di

circa 1 cm e muoverlo delicatamente a sinistra e a destra per sbloccare tutte le provette che potrebbero essersi attaccate alla pellicola per sigillare DuraSeal. Togliere il coperchio del portaprovette sollevandolo verticalmente fino a quando il portaprovette risulta visibile.

- d. Togliere con cautela la pellicola per sigillare DuraSeal dal coperchio del portaprovette ed eliminarla.

Campioni in PreservCyt o SurePath con MST Vortexer 2

- a. Se applicabile, coprire le provette con pellicola per sigillare DuraSeal e fissare il coperchio sul portaprovette per campioni.
- b. Agitare il portaprovette di conversione per almeno 10 secondi alla velocità massima.
- c. Posizionare immediatamente il portaprovette per campioni sul piano di lavoro e sbloccare le clip. Sollevare il coperchio del portaprovette di circa 1 cm e muoverlo delicatamente a sinistra e a destra per sbloccare tutte le provette che potrebbero essersi attaccate alla pellicola per sigillare DuraSeal. Togliere il coperchio del portaprovette sollevandolo verticalmente fino a quando il portaprovette per campioni risulta visibile.
- d. Togliere con cautela la pellicola per sigillare DuraSeal dal coperchio del portaprovette ed eliminarla.

Tutti i tipi di campioni con Vortexer

- a. Agitare ogni provetta separatamente per almeno 5 secondi.

3. Utilizzando un pipettatore EXPAND-4 o un pipettatore a canale singolo con puntali extra lunghi, trasferire 75 µl di ogni calibratore, controllo di qualità o campione sul fondo del pozzetto vuoto della micropiastra di ibridazione, secondo il layout della piastra creato.

Se i campioni saranno conservati, chiudere i calibratori, i controlli di qualità e i campioni in STM denaturati con nuovi tappi a vite per provette di prelievo campioni e posizionare il tappo originale di ogni campione sui campioni in PreservCyt e SurePath.

Nota: Conservare i campioni secondo i limiti riportati in modo dettagliato in "Interruzione facoltativa per campioni in STM e campioni in PreservCyt e SurePath preparati manualmente".

4. Dopo avere trasferito l'ultimo campione, coprire la micropiastra di ibridazione con l'apposito coperchio e incubare per 10 minuti a 20–25°C.
5. Agitare accuratamente la miscela della sonda e dosare in un contenitore monouso per reagenti.
6. Pipettare con precisione 25 µl della miscela in ogni pozzetto della micropiastra di ibridazione, utilizzando un pipettatore a 8 canali e un puntale nuovo per ogni aggiunta di miscela.

Evitare gli spruzzi e non toccare i lati dei pozzetti della micropiastra di ibridazione.

7. Coprire la micropiastra di ibridazione con un apposito coperchio e agitare sul Rotary Shaker I impostato a 1100 ± 100 giri/min per 3 ± 2 minuti.

Dopo l'agitazione, i calibratori, i controlli di qualità, i campioni in STM e in campioni in SurePath dovrebbero assumere una colorazione gialla, mentre i campioni in soluzione PreservCyt dovrebbero diventare rosa.

I campioni che rimangono viola potrebbero non avere ricevuto la quantità corretta di miscela della sonda. Aggiungere altri 25 µl di miscela ai campioni rimasti viola e agitare di nuovo. Se dopo questa procedura vi sono ancora campioni viola, è necessario analizzarli di nuovo.

8. Collocare la micropiastra nel Microplate Heater I alla temperatura di $65 \pm 2^\circ\text{C}$, prestando attenzione a non creare spruzzi. Incubare la micropiastra per 60 ± 5 minuti.
9. Per proseguire l'analisi, passare a "Cattura degli ibridi", pagina 55.

Ibridazione mediante microprovette e bagno d'acqua

1. Etichettare e collocare il numero richiesto di microprovette pulite di ibridazione nel portaprovette per microprovette.
2. Agitare ogni calibratore, controllo di qualità e provetta separatamente per almeno 5 secondi prima di rimuovere il campione.
3. Utilizzando un pipettatore a canale singolo con un puntale extra lungo, trasferire 75 µl di ogni calibratore, controllo di qualità o campione sul fondo della relativa microprovetta di ibridazione, secondo il layout della piastra creato.

Se i campioni saranno conservati, chiudere i calibratori, i controlli di qualità e i campioni in STM denaturati con nuovi tappi a vite per provette di

prelievo campioni e posizionare il tappo originale di ogni campione sui campioni in PreservCyt e SurePath.

Nota: Conservare i campioni secondo i limiti riportati in modo dettagliato in "Interruzione facoltativa per campioni in STM e campioni in PreservCyt e SurePath preparati manualmente", pagina 50.

- 4. Dopo avere trasferito l'ultimo campione, coprire le microprovette di ibridazione con l'apposito coperchio e incubare per 10 minuti a 20–25°C.**
- 5. Agitare accuratamente la miscela della sonda e dosare in un contenitore monouso per reagenti.**
- 6. Pipettare con precisione 25 µl della miscela in ogni microprovetta di ibridazione, utilizzando un pipettatore a 8 canali e un puntale nuovo per ogni fila.**

Evitare gli spruzzi e non toccare i lati delle microprovette di ibridazione.

Ispezionare la parte inferiore del portaprovette per verificare che tutte le microprovette di ibridazione abbiano ricevuto la corretta quantità di miscela della sonda.

- 7. Coprire le microprovette di ibridazione con un copripiastra. Collocare il coperchio sulla parte superiore del portaprovette. Agitare il portaprovette per microprovette sul Rotary Shaker I impostato a 1.100 ± 100 giri/min per 3 ± 2 minuti.**

Dopo l'agitazione, i calibratori, i controlli di qualità, i campioni in STM e in campioni in SurePath dovrebbero assumere una colorazione gialla, mentre i campioni in soluzione PreservCyt dovrebbero diventare rosa.

I campioni che rimangono viola potrebbero non avere ricevuto la quantità corretta di miscela della sonda. Aggiungere altri 25 µl di miscela ai campioni rimasti viola e agitare di nuovo. Se dopo questa procedura vi sono ancora campioni viola, è necessario analizzarli di nuovo.

- 8. Incubare il portaprovette per microprovette in un bagno d'acqua a $65 \pm 2^\circ\text{C}$ per 60 ± 5 minuti.**

Verificare che il livello del bagno d'acqua sia sufficiente per poter immergere l'intero volume delle microprovette di ibridazione.

Nota: Il portaprovette galleggia nel bagno d'acqua.

- 9. Passare a "Cattura degli ibridi," pagina 55.**

Cattura degli ibridi

1. **Rimuovere dalla struttura della micropiastra di cattura tutti i pozzetti non utilizzati per il ciclo di analisi.**

Riporre i pozzetti della micropiastra inutilizzati nella busta originale e risigillarla.

2. **Con un pennarello, numerare in sequenza ogni colonna ed etichettare la micropiastra appropriato utilizzando un identificatore adatto.**

I campioni saranno aggiunti ai pozzetti della micropiastra di cattura secondo il layout della piastra creato.

3. **Se necessario, rimuovere accuratamente la micropiastra di ibridazione dal Microplate Heater I o il portaprovette per microprovette dal bagno d'acqua.**

Togliere immediatamente il coperchio della micropiastra e collocarlo su una superficie pulita, oppure rimuovere il coperchio del portaprovette e tendere lentamente il copripiastra sul portaprovette per microprovette.

4. **Utilizzando un pipettatore a 8 canali, trasferire l'intero contenuto (circa 100 μ l) dei pozzetti della micropiastra di ibridazione o le microprovette di ibridazione, sul fondo dei corrispondenti pozzetti della micropiastra di cattura.**

Utilizzare puntali nuovi per ogni trasferimento e svuotare bene tutti i puntali per garantire il trasferimento completo del campione. Se lo si desidera, il pipettatore può essere stabilizzato appoggiando la parte mediana dei puntali sul bordo superiore dei pozzetti della micropiastra di cattura (vedere la Figura 2 seguente).

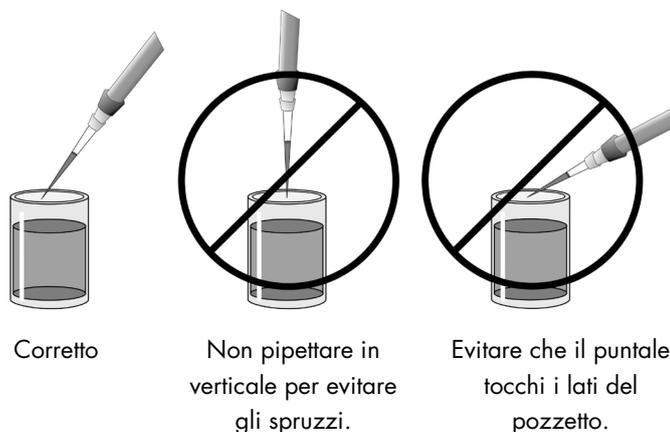


Figura 2. Corretto pipettamento.

- 5. Coprire la micropiastra di cattura con il coperchio o con un nuovo copripiastra, e agitare sul Rotary Shaker I impostato a 1.100 ± 100 giri/min per 60 ± 5 minuti a $20-25^{\circ}\text{C}$.**

Preparare il tampone di lavaggio durante questa incubazione (vedere "Tampone di lavaggio" pagina 37).

- 6. Una volta completata la fase di incubazione, estrarre la micropiastra di cattura dal Rotary Shaker I e rimuovere con cautela il coperchio o il copripiastra.**
- 7. Eliminare il liquido dai pozzetti versandolo nel lavandino; capovolgere completamente la micropiastra sul lavandino e scuotere con forza con un movimento verso il basso.**

Importante: Non capovolgere nuovamente la micropiastra.

Fare attenzione a non causare spruzzi effettuando il travaso troppo vicino al fondo del lavandino.

- 8. Asciugare picchettando con decisione per due o tre volte su salviette Kimtowels pulite o equivalenti salviette di carta prive di fibre.**
Verificare che tutto il liquido sia stato rimosso dai pozzetti e che la parte superiore della micropiastra di cattura sia asciutta.
- 9. Per proseguire l'analisi, passare a "Rilevazione degli ibridi," pagina 57.**

Rilevazione degli ibridi

Punti importanti prima di iniziare

- Effettuare le aggiunte di reagente sulla micropiastra di cattura, procedendo da sinistra verso destra e utilizzando un pipettatore a 8 canali. Pulire i puntali sul contenitore monouso per reagenti per rimuovere il reagente in eccesso prima di procedere all'erogazione sulla micropiastra.
- Se non si utilizza un pipettatore a 8 canali, è possibile sostituirlo con un pipettatore a ripetizione. Effettuare i dosaggi del DR1 in una provetta di polipropilene di dimensioni sufficienti a contenere il volume necessario.
- Si consiglia di impiegare la tecnica di aspirazione inversa per erogare il reagente in modo più uniforme. La procedura è descritta qui di seguito.
- Se lo si desidera, il pipettatore può essere stabilizzato appoggiando la parte mediana dei puntali sul bordo superiore dei pozzetti della micropiastra di cattura. Prestare attenzione a non toccare i lati dei pozzetti della micropiastra, in caso contrario potrebbe verificarsi una contaminazione crociata dei campioni (vedere la Figura 2, pagina 55).

- 1. Miscelare accuratamente il DR1 e trasferire con precisione il volume appropriato (se necessario, vedere la Tabella 1, pagina 31, o la Tabella 4, pagina 32) in un contenitore pulito monouso per reagenti.**
- 2. Pipettare con precisione 75 µl di DR1 in ogni pozzetto della micropiastra di cattura secondo la tecnica di aspirazione inversa, procedendo come segue:**
 - a. Inserire i puntali su un pipettatore a 8 canali, facendo attenzione che siano alloggiati correttamente.
 - b. Spingere lo stantuffo pipetta del pipettatore oltre il primo arresto fino al secondo arresto.
 - c. Immergere i puntali nel reagente.
 - d. Rilasciare lentamente lo stantuffo e attendere che il reagente riempi i puntali.

- e. Dispensare il reagente nei pozzetti della micropiastra premendo lo stantuffo fino al primo arresto. Non rilasciare lo stantuffo finché i puntali non sono stati immersi nel reagente.
- f. Riempire i puntali e ripetere la procedura fino al riempimento completo di tutti i pozzetti.

Verificare che tutti i pozzetti siano stati riempiti osservando l'intensità della colorazione rosa. Tutti i pozzetti dovrebbero presentare più o meno la stessa intensità.

- 3. Coprire la micropiastra di cattura con il coperchio o la pellicola Parafilm pulita (o materiale equivalente) e incubare a 20–25°C per 30–45 minuti.**
- 4. Per proseguire l'analisi, passare a "Lavaggio," pagina 59.**

Lavaggio

Lavare la micropiastra di cattura seguendo una delle metodiche descritte di seguito.

Metodo con Automated Plate Washer

Tenere sempre accesso l'Automated Plate Washer. Verificare che il contenitore di risciacquo sia pieno e che il contenitore di scarico sia vuoto. L'Automated Plate Washer effettua il lavaggio di pulizia di routine. Per ulteriori istruzioni, consultare il *Automated Plate Washer Manuale dell'operatore*.

Prima di iniziare

- Verificare che il contenitore per il liquido di lavaggio sia riempito con almeno 1 litro di tampone di lavaggio. In caso contrario, preparare il tampone di lavaggio (vedere "Tampone di lavaggio", pagina 37).
- Verificare che il contenitore di risciacquo sia riempito con acqua deionizzata o distillata.
- Verificare che il contenitore di scarico sia vuoto e che il tappo sia ben chiuso.
- L'Automated Plate Washer si riempirà automaticamente prima di ogni lavaggio e dopo ogni lavaggio effettuerà un ciclo di risciacquo.
- Se si utilizza solo una fila parziale di pozzetti della micropiastra di cattura, prima del lavaggio posizionare dei pozzetti vuoti nella micropiastra in modo da completare la colonna.

1. **Rimuovere il coperchio della micropiastra e posizionare la micropiastra sulla piattaforma dell'Automated Plate Washer.**
2. **Verificare che l'Automated Plate Washer sia acceso e che sul display compaia "Digene Wash Ready" (Lavaggio pronto digene) o "P1".**
3. **Selezionare il numero di file di cui eseguire il lavaggio premendo il tasto "Rows" (File) e "+" o "-" per effettuare la regolazione.**
4. **Premere il tasto "Rows" per tornare a "Digene Wash Ready" o "P1".**

5. Premere “Start/Stop” (Avvia/Arresta) per avviare il sistema.

L’Automated Plate Washer esegue 6 cicli di riempimento e aspirazione, per i quali occorrono circa 10 minuti. Durante il programma vi sarà una breve pausa, quindi non rimuovere la micropiastra in anticipo.

Quando il lavaggio è terminato, sul display compare “Digene Wash Ready” o “P1”.

6. Estrarre la micropiastra di cattura dalla piattaforma dell’Automated Plate Washer al termine dl programma.

La micropiastra deve presentarsi bianca e nei pozzetti non devono essere rimaste tracce di liquido rosa residuo.

7. Per proseguire l’analisi, passare a “Amplificazione del segnale,” pagina 62.

Metodo di lavaggio manuale

1. Rimuovere il DR1 dai pozzetti della micropiastra di cattura ponendo delle salviettine Kimtowels pulite, o equivalenti salviettine di carta prive di fibre, sopra la micropiastra.

2. Accertarsi che le salviettine di carta siano a contatto con tutta la superficie della micropiastra di cattura, poi capovolgerla con cautela.

3. Lasciare asciugare la micropiastra per 1–2 minuti.

4. Asciugare bene ponendo la micropiastra su salviettine Kimtowels pulite, o equivalenti salviettine di carta prive di fibre.

Gettare con cura tutte le salviettine usate per evitare la contaminazione da fosfatasi alcalina.

5. Lavare a mano la micropiastra per 6 volte utilizzando il sistema di lavaggio.

Per eseguire un lavaggio corretto, riempire ogni pozzetto con tampone di lavaggio finché non trabocca. Ciò consente di rimuovere il DR1 dalla parte superiore dei pozzetti della micropiastra di cattura. Il lavaggio inizia dal pozzetto A1 e continua a serpentina, procedendo verso destra e verso il basso. Una volta riempiti tutti i pozzetti, versare il liquido nel lavandino con un movimento deciso verso il basso. Il secondo lavaggio parte dal pozzetto H12 e procede a serpentina verso sinistra e verso l’alto. Questa sequenza di 2 lavaggi viene ripetuta altre 2 volte per un totale di 6 lavaggi per pozzetto.

- 6. Dopo il lavaggio, asciugare la micropiastra capovolgendola su salviette Kintowels pulite, o equivalenti salviette di carta prive di fibre, picchettando con decisione 3–4 volte. Cambiare le salviette di carta e asciugare di nuovo.**
- 7. Lasciare la micropiastra capovolta e farla asciugare per 5 minuti. Asciugare la micropiastra di cattura ancora una volta.**
La micropiastra deve presentarsi bianca e nei pozzetti non devono essere rimaste tracce di liquido rosa residuo.
- 8. Per proseguire l'analisi, passare a "Amplificazione del segnale", pagina 62.**

Amplificazione del segnale

Punti importanti prima di iniziare

- Utilizzare un nuovo paio di guanti per il trattamento del DR2.
- Effettuare le aggiunte di reagente sulla micropiastra di cattura, procedendo da sinistra verso destra e utilizzando un pipettatore a 8 canali.
- Se non si utilizza un pipettatore a 8 canali, è possibile sostituirlo con un pipettatore a ripetizione. Effettuare i dosaggi del DR2 in una provetta di polipropilene di dimensioni sufficienti a contenere il volume necessario.
- Aggiungere il DR2 senza interruzioni. I tempi di incubazione di tutti i pozzetti della micropiastra di cattura devono essere il più possibile identici.
- Prestare attenzione a non toccare i lati dei pozzetti e ad evitare di spruzzare il reagente sui puntali del pipettatore, perché potrebbe verificarsi una contaminazione crociata dei campioni (vedere la Figura 2, pagina 55).

1. **Miscelare accuratamente il DR2 e trasferire il volume appropriato (se necessario, vedere la Tabella 1, pagina 31, o la Tabella 4, pagina 32) in un contenitore pulito monouso per reagenti.**
2. **Pipettare con precisione 75 µl di DR2 in ogni pozzetto della micropiastra di cattura secondo la tecnica di aspirazione inversa precedentemente descritta (vedere "Rilevazione degli ibridi", pagina 57).**

Verificare che tutti i pozzetti siano stati accuratamente riempiti osservando l'intensità della colorazione gialla; tutti i pozzetti dovrebbero presentare più o meno la stessa intensità.

3. **Coprire la micropiastra con il coperchio e incubare a 20–25°C per 15 minuti (non superare i 30 minuti di incubazione).**

Importante: Evitare la luce del sole diretta.

4. **Per proseguire l'analisi, passare a "Misurazione della micropiastra di cattura e generazione dei risultati", pagina 63.**

Misurazione della micropiastra di cattura e generazione dei risultati

1. Misurare la micropiastra di cattura utilizzando uno strumento DML.

Consultare il manuale utente del rispettivo software per dettagli sulla misurazione di una micropiastra di cattura e la generazione dei report dei risultati. Il software di analisi dei dosaggi *digene* consente di inserire le informazioni pertinenti del test.

2. Se non è stata utilizzata una micropiastra di cattura completa, rimuovere i pozzetti utilizzati dal supporto della micropiastra, sciacquare bene il supporto con acqua distillata o deionizzata, asciugare e tenerlo da parte per il test successivo.

3. Eliminare tutti i dosaggi dei reagenti e i reagenti preparati, salvo diversamente specificato.

Diluire il restante DNR nel flacone prima di smaltirlo nel rispetto delle procedure di laboratorio nazionali e locali.

Interpretazione dei risultati

Il valore soglia (CO) del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA di 1 pg/ml è equivalente a 100.000 copie dell'HPV/ml o a 5.000 copie dell'HPV per test.

Risultati dei test su campioni in STM

I campioni in STM con rapporto RLU/CO $\geq 1,0$ sono considerati "positivi" per 1 o più tipi di HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68.

I campioni STM con rapporto RLU/CO $< 1,0$ sono considerati "negativi" o "nessun DNA dell'HPV rilevato" per i 13 tipi di HPV coperti dal test. Le sequenze di DNA dell'HPV ad alto rischio sono assenti o i livelli del DNA dell'HPV sono al di sotto del limite di rilevazione del test.

Risultati dei test su campioni in SurePath

I campioni in SurePath con rapporto RLU/CO $\geq 1,0$ sono considerati "positivi" per 1 o più tipi di HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68.

I campioni in SurePath con rapporto RLU/CO $< 1,0$ sono considerati "negativi" o "nessun DNA dell'HPV rilevato" per i 13 tipi di HPV coperti dal test. Le sequenze di DNA dell'HPV sono assenti o i livelli del DNA dell'HPV sono al di sotto del limite di rilevazione del test.

Risultati dei test su campioni in PreservCyt

I campioni in PreservCyt con rapporto RLU/CO $\geq 1,0$ sono considerati "positivi" per 1 o più tipi di HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68.

I campioni in PreservCyt con rapporto RLU/CO $< 1,0$ sono considerati "negativi" o "nessun DNA dell'HPV rilevato" per i 13 tipi di HPV coperti dal test. Le sequenze di DNA dell'HPV sono assenti o i livelli del DNA dell'HPV sono al di sotto del limite di rilevazione del test.

Per i campioni in PreservCyt con un rapporto RLU/CO $\geq 1,0$ e $< 2,5$, QIAGEN raccomanda di ripetere il test sul campione, secondo la seguente procedura:

- Se alla prima ripetizione del test, il rapporto RLU/CO è $\geq 1,0$, indicare il campione come "positivo". Non è richiesto nessun ulteriore test.
- Se alla prima ripetizione del test il rapporto RLU/CO è $< 1,0$, è necessaria una seconda ripetizione (terzo risultato). Il secondo risultato è il risultato finale ($< 1,0$ è negativo, $\geq 1,0$ è positivo) ed è indicato.

Rapporto RLU/CO prossimo a 1,0

Se il rapporto RLU/CO di un campione è prossimo ma non inferiore a 1,0 e si sospetta un'infezione da HPV ad alto rischio, si deve prendere in considerazione la possibilità di alternare i metodi e/o ripetere la procedura per il campione.

Altri tipi di HPV

Dal momento che questo dosaggio rileva soltanto i tipi di HPV ad alto rischio 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68, nel campione possono essere presenti altri tipi di HPV a basso rischio. Se si esegue il test specificamente per rilevare la presenza di HPV a basso rischio trasmesso per via sessuale, utilizzare il test *digene* HC2 HPV DNA, che rileva i tipi di DNA dell'HPV a basso e ad alto rischio.

Verifica della calibrazione del test

La verifica della calibrazione del test viene eseguita per garantire che i reagenti, i calibratori e i controlli di qualità funzionino correttamente, permettendo una determinazione precisa del valore soglia del test. Poiché per il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA è necessaria una calibrazione ad ogni dosaggio, occorre procedere alla verifica di ciascun dosaggio. Questa procedura di verifica non sostituisce i test di controllo di qualità interni. Sono stati stabiliti intervalli accettabili per la calibrazione del test e i controlli di qualità soltanto per gli strumenti DML approvati da QIAGEN.

La calibrazione del test viene eseguita automaticamente dal software di analisi dei dosaggi *digene* e stampata sul rapporto di analisi dei dati. Gli utenti in possesso del Software Qualitativo *digene*, versione 1.03 o precedente, devono

tuttavia eseguire manualmente la verifica della calibrazione del test prima di potere mettere a referto i risultati. Per maggiori informazioni contattare il centro di assistenza tecnica QIAGEN.

Il test deve soddisfare i criteri specificati di calibrazione. Qualora uno dei seguenti criteri risulti non valido, il software non interpreterà i risultati relativi ai campioni.

Calibratore negativo

Il calibratore negativo (NC) deve essere analizzato in tre replicati ad ogni dosaggio. Il calibratore negativo deve essere ≥ 10 e ≤ 250 RLU, mentre il coefficiente di variazione (CV) deve essere $\leq 25\%$. Se il CV è $> 25\%$, il software elimina il valore RLU che più si allontana dalla media e ricalcola la media e il CV utilizzando i valori rimanenti.

Se il CV rimane $> 25\%$, la calibrazione del test non è valida ed è necessario ripetere i dosaggi di tutti i campioni delle pazienti. Pertanto i risultati ottenuti non devono essere messi a referto.

Calibratore positivo

L'HRC deve essere analizzato in tre replicati ad ogni dosaggio. Il CV dell'HRC deve essere $\leq 15\%$. Se il CV è $> 15\%$, il software elimina il valore RLU che più si allontana dalla media e ricalcola la media e il CV utilizzando i valori rimanenti.

Se il CV rimane $> 15\%$, la calibrazione del test non è valida ed è necessario ripetere i dosaggi di tutti i campioni delle pazienti. Pertanto i risultati ottenuti non devono essere messi a referto.

Media calibratore positivo / media calibratore negativo

Il software utilizza l' $HRC\bar{x}$ e l' $NC\bar{x}$ per calcolare l' $HRC\bar{x}/NC\bar{x}$. Un $HRC\bar{x}/NC\bar{x}$ valido è definito come $2,0 \leq HRC\bar{x}/NC\bar{x} \leq 15$.

Se l' $HRC\bar{x}/NC\bar{x}$ è $< 2,0$ o > 15 , la calibrazione del test non è valida ed è necessario ripetere i dosaggi di tutti i campioni delle pazienti. Pertanto i risultati ottenuti non devono essere messi a referto.

Calcolo del valore soglia

Il software di analisi dei dosaggi *digene* calcola e riporta i valori RLU/valore soglia e i risultati positivi/negativi riferiti a tutti i campioni. Il valore soglia per determinare i campioni positivi è $HRC\bar{X}$. Il software di analisi dei dosaggi *digene* utilizza i valori RLU dei campioni per esprimere i risultati come RLU del campione/valore soglia.

Per i test RCS automatizzati, il protocollo di dosaggio RCS HPV applica un fattore di regolazione della calibrazione (CAF) di 0,8 all' $HRC\bar{X}$ valido. Il CAF è necessario affinché le caratteristiche dei test RCS automatizzati rimangano equivalenti a quelle dei test manuali. Poiché il fattore CAF si applica unicamente ai risultati dei test RCS automatizzati, per generare risultati precisi dei test è indispensabile selezionare il corretto protocollo di dosaggio.

Controlli di qualità

Con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA sono forniti campioni per il controllo di qualità, da utilizzare per il controllo di qualità interno. I controlli di qualità forniti sono DNA bersaglio clonati dell'HPV e non derivano dall'HPV naturale. È lo stesso tipo di materiale utilizzato per i calibratori forniti. È possibile analizzare altri controlli di qualità nel rispetto delle linee guida o dei requisiti normativi locali o nazionali o di enti di certificazione. I controlli di qualità forniti non funzionano correttamente per l'elaborazione della soluzione PreservCyt o del fluido conservante SurePath.

Per istruzioni sull'inserimento dei numeri di lotto e sulle date di scadenza dei controlli di qualità, consultare il software di analisi dei dosaggi *digene* applicabile. Perché un dosaggio possa essere considerato valido, il rapporto RLU/CO di ogni controllo di qualità deve rientrare nei criteri definiti, secondo quanto specificato nella Tabella 10 seguente.

Se i controlli di qualità non rientrano in questi intervalli, il dosaggio non è valido e il test deve essere ripetuto. Pertanto, i risultati ottenuti non devono essere messi a referto.

Tabella 10. Criteri di validità del dosaggio dei controlli di qualità

Controllo di qualità	Minimo (RLU/CO)	Massimo (RLU/CO)	CV (%)
QC1-LR	0,001	0,999	≤25
QC2-HR	2	8	≤25

Limiti della metodica

- Il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA per i tipi di HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 non è consigliato per la valutazione di sospette violenze sessuali.
- La prevalenza di infezione da HPV in una popolazione può influire sulle prestazioni. I valori predittivi positivi diminuiscono quando si sottopongono al test popolazioni con una bassa prevalenza o individui non a rischio di infezione.
- Un risultato negativo non esclude la possibilità di infezione da HPV, in quanto livelli molto bassi di infezione o errori di campionamento possono dare luogo a falsi negativi. Il test inoltre non rileva il DNA dell'HPV dei tipi a basso rischio (6, 11, 42, 43 e 44).
- L'infezione da HPV non è un indice certo della presenza di neoplasia cervicale grave, né implica in tutti i casi lo sviluppo di una neoplasia cervicale grave o cancro.
- Esiste un minimo di ibridazione crociata tra la sonda per l'HPV ad alto rischio e l'HPV dei tipi 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 e MM9. Le pazienti con campioni contenenti livelli elevati di questi tipi di HPV possono erroneamente essere candidate alla colposcopia (15, 35).
- Il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA è concepito per rilevare tipi di HPV ad alto rischio, tra cui 39, 58, 59 e 68. Studi analitici condotti da QIAGEN, utilizzando DNA plasmidico dell'HPV clonato, dimostrano che il test rileva questi tipi di HPV a concentrazioni comprese tra 0,62 pg/ml e 1,39 pg/ml. Ciò è equivalente alle caratteristiche di rilevazione degli altri tipi di HPV bersaglio del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. QIAGEN è

stata in grado di convalidare la rilevazione di questi tipi di HPV soltanto in un numero limitato di campioni clinici. A causa della bassa prevalenza di questi tipi nella popolazione generale (28), le caratteristiche del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA per la rilevazione dei tipi di HPV 39, 58, 59 e 68 non sono state statisticamente confermate.

- Se al momento del prelievo del campione in STM per il test dell'HPV sono presenti concentrazioni elevate di pomate antifungine, spermicidi o lavande vaginali, esiste la probabilità di ottenere falsi negativi nel caso i campioni prelevati contengano livelli di DNA dell'HPV che danno luogo a rapporti RLU/CO vicini al valore soglia del test.
- Se al momento del prelievo del campione cervicale in PreservCyt per la preparazione dei campioni con il kit QIA Symphony DSP AXpH DNA sono presenti concentrazioni elevate di pomate antifungine, gel vaginali lubrificanti o sangue, esiste la probabilità di ottenere falsi negativi nel caso i campioni prelevati contengano livelli di DNA dell'HPV che danno luogo a rapporti RLU/CO vicini al valore soglia del test.
- Se al momento del prelievo del campione cervicale in PreservCyt per la preparazione dei campioni con il kit QIA Symphony DSP AXpH DNA è presente spermicida, esiste la probabilità di ottenere falsi negativi.
- È possibile una reattività crociata tra la sonda HPV ad alto rischio e il plasmide pBR322. È stata osservata la presenza di sequenze omologhe di pBR322 in campioni genitali umani e potrebbero verificarsi falsi positivi in presenza di livelli elevati di plasmide batterico.
- Quando si eseguono test RCS automatizzati, la mancata osservazione visiva della piastra di ibridazione per verificare il corretto trasferimento del campione e la mancata correzione in caso di trasferimento errato possono determinare risultati falsi negativi.

Caratteristiche

Prestazioni cliniche durante lo screening di pazienti con risultati normali del Pap test come supporto nella valutazione del rischio per la gestione delle pazienti

Segue una descrizione dei risultati di 8 studi clinici indipendenti condotti da istituzioni mediche, accademiche e governative di primo piano presso centri ubicati negli Stati Uniti e in altri paesi. Per gli studi sono state utilizzate le metodiche consolidate di Pap test in vigore presso i paesi in cui è stato condotto lo studio. In tutti i casi tranne 2, per l'interpretazione dei risultati del Pap test è stato utilizzato il sistema di valutazione Bethesda. Per la terminologia equivalente nello screening del cancro cervicale nella Comunità Europea, consultare le European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening (36). Inoltre, in tutti gli studi la neoplasia cervicale grave è stata diagnosticata attraverso l'utilizzo della biopsia a guida colposcopica. Questi studi hanno valutato l'utilità clinica del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA rispetto al Pap test nelle donne di età più avanzata (in genere oltre i 30 anni). In tutti gli studi tranne uno sono stati eseguiti anche test prospettici dell'HPV utilizzando il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Salvo se diversamente indicato di seguito, gli studi sono consistiti in uno screening longitudinale della popolazione generale condotto utilizzando il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Due studi sono stati condotti negli Stati Uniti, 2 in Europa, 2 in America Latina, uno in Africa e uno in Asia.

Le prestazioni del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA osservate in 6 studi longitudinali sono riepilogate nelle Tabelle 11 e 12 seguenti, per donne di età pari a 30 anni o superiore con diagnosi confermata dall'esame istologico di neoplasia cervicale grave, definita come neoplasia intraepiteliale cervicale (CIN) 3 o più grave.

Tabella 11. Stime delle prestazioni – sensibilità e specificità

Popolazione	n	Sensibilità (%) (n/N) Intervallo di confidenza al 95% (IC)			Specificità (%) (n/N) IC 95%		
		Solo Pap Test	Solo test HPV	HPV + Pap	Solo Pap Test	Solo test HPV	HPV + Pap
Europa Occidentale 1	7592	51,6	96,3	100,0	98,5	96,2	95,1
		(14/27)	(26/27)	(27/27)	(7.453/7.565)	(7.275/7.565)	(7.193/7.565)
		32,0–71,3	81,0–99,9	87,2–100,0	98,2–98,8	95,7–96,6	94,6–95,6
America Latina 1	6115	58,4	94,8	97,4	98,7	93,9	93,4
		(45/77)	(73/77)	(75/77)	(5.962/6.038)	(5.669/6.038)	(5.637/6.038)
		46,68–69,6	87,2–98,6	90,9–99,7	98,4–99,0	93,3–94,5	92,7–94,0
America Latina 2*	6176	77,9	89,7	94,1	94,1	94,0	89,9
		(53/68)	(61/68)	(64/68)	(5.745/6.108)	(5.742/6.108)	(5.490/6.108)
		66,2–87,1	79,9–95,8	85,6–98,4	93,4–94,6	93,4–94,6	89,1–90,6
Africa	2925	84,1	89,7	92,5	86,4	80,0	76,4
		(90/107)	(96/107)	(99/107)	(2.436/2.818)	(2.253/2.818)	(2.152/2.818)
		75,8–90,5	82,4–94,8	85,8–96,7	85,1–87,7	78,4–81,4	74,8–77,9
Asia	1936	97,6	100,0	100,0	76,3	83,0	68,0
		(41/42)	(42/42)	(42/42)	(1.445/1.894)	(1.572/1.894)	(1.287/1.894)
		87,4–99,9	91,6–100,0	91,6–100,0	74,3–78,2	81,2–85,0	65,8–70,1
Stati Uniti 1	1040	50,0	100,0	100,0	97,6	96,2	95,5
		(1/2)	(2/2)	(2/2)	(1.013/1.038)	(999/1.038)	(991/1.038)
		1,26–98,7	15,8–100,0	15,8–100,0	96,5–98,4	94,9–97,3	94,0–96,7

* Dati test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA se disponibili, altrimenti sono stati utilizzati i dati HCS; dati combinati.

Tabella 12. Stime delle prestazioni – valore predittivo positivo e negativo

Popolazione	n	Prevalenza (%) CIN 3	Valore predittivo positivo (%) (n/N) IC 95%			Valore predittivo negativo (%) (n/N) IC 95%		
			Solo Pap Test	Solo test HPV	HPV + Pap	Solo Pap Test	Solo test HPV	HPV + Pap
Europa Occidentale 1	7592	0,36 (27/7.592)	11,1 (14/126)	8,23 (26/316)	6,77 (27/399)	99,83 (7.453/7.466)	99,99 (7.275/7.276)	100,0 (7.193/7.193)
		0,23–0,52	6,2–17,9	5,5–11,8	4,5–9,7	99,7–99,9	99,9–100,0	99,9–100,0
America Latina 1	6115	1,26 (77/6.115)	37,2 (45/121)	16,5 (73/442)	15,8 (75/476)	99,47 (5.962/5.994)	99,93 (5.669/5.673)	99,96 (5.637/5.639)
		0,99–1,57	28,6–46,4	13,2–20,3	12,6–19,4	99,3–99,6	99,8–100,0	99,9–100,0
America Latina 2*	6176	1,10 (68/6.176)	12,7 (53/416)	14,3 (61/427)	9,4 (64/682)	99,74 (5.745/5.760)	99,88 (5.742/5.749)	99,93 (5.490/5.494)
		0,86–1,39	9,7–16,3	11,1–18,0	7,3–11,8	99,6–99,9	99,8–100,0	99,8–100,0
Africa	2925	3,66 (107/2.925)	19,1 (90/472)	14,5 (96/661)	12,9 (99/765)	99,31 (2.436/2.453)	99,51 (2.253/2.264)	99,63 (2.152/2.160)
		3,01–4,40	15,6–22,9	11,9–17,4	10,6–15,5	98,9–99,6	99,1–99,8	99,3–99,8
Asia	1936	2,17 (42/1.936)	8,37 (41/490)	11,5 (42/364)	6,47 (42/649)	99,93 (1.445/1.446)	100,0 (1.572/1.572)	100,0 (1.287/1.287)
		1,57–2,92	6,1–11,2	8,4–15,3	4,7–8,7	99,6–100,0	99,8–100,0	99,7–100,0
Stati Uniti 1	1040	0,19 (2/1.040)	3,85 (1/26)	4,88 (2/41)	4,08 (2/49)	99,90 (1.013/1.014)	100,0 (999/999)	100,0 (991/991)
		0,02–0,69	0,1–19,6	0,6–16,5	0,5–14,0	99,5–100,0	99,6–100,0	99,6–100,0

* Dati test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA se disponibili, altrimenti sono stati utilizzati i dati HCS; dati combinati.

In tutti gli studi si riscontra un miglioramento uniforme, e spesso molto significativo, della sensibilità del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA rispetto al solo Pap test. Come per la sensibilità, il valore predittivo negativo dell'HPV supera quello del solo Pap test in tutti i casi, avvicinandosi al 100%. Questo valore predittivo negativo dimostra l'alta probabilità di assenza di una neoplasia cervicale grave o di cancro nelle donne citologicamente normali non infettate da HPV.

Sebbene la specificità del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA sia inferiore a quella del solo Pap test, l'analisi del quoziente di probabilità ha dimostrato che la diminuzione della specificità osservata non è sufficientemente significativa da pregiudicare l'utilità clinica dell'utilizzo del test per identificare le donne con rischio scarso o nullo di avere o sviluppare una neoplasia cervicale. Nonostante ciò, è importante che la decisione di candidare la paziente alla colposcopia sia

basata su tutte le informazioni cliniche e relative al rischio disponibili al medico, nonché sull'anamnesi della paziente. Tra le variabili importanti figurano un'infezione da HPV nell'anamnesi e/o Pap test anomali, età del primo rapporto, numero di partner sessuali e conseguenti malattie a trasmissione sessuale (37, 38).

Sebbene la prevalenza di patologie gravi non vari in misura significativa tra gli studi da cui sono state determinate le prestazioni, la prevalenza dell'infezione da HPV in una popolazione può influire sulle prestazioni e di norma varia in base alla popolazione di pazienti. È stato inoltre posto in evidenza che la prevalenza dell'infezione da HPV diminuisce drasticamente con l'aumentare dell'età (17, 24–29, 38–40). I valori predittivi positivi diminuiscono quando si eseguono i test su popolazioni con bassa prevalenza o su individui a basso rischio di infezione.

Sono state eseguite analisi longitudinali utilizzando i risultati di 2 studi: uno condotto negli Stati Uniti dal National Cancer Institute (NCI, Istituto Nazionale Tumori) di Portland, Oregon e l'altro condotto in Francia presso il Laboratoire Pol Bouin C.H.U. (Laboratorio Pol Bouin, Centro Ospedaliero Universitario) a Reims. Queste analisi longitudinali sono state effettuate per dimostrare che le pazienti negative al Pap test/negative all'HPV corrono minori rischi di avere neoplasie cervicali rispetto alle donne tradizionalmente definite a basso rischio, la cui infezione da HPV non è nota, e rispetto alle pazienti negative al Pap test/positive all'HPV (vedere le Tabelle 13 e 14 seguenti).

Tabella 13. Analisi longitudinale – rischio relativo di neoplasia grave

Gruppo dello studio	Età	Classificazione a basso rischio	n	Casi di CIN 3+	Tasso (per 100 anni-paziente)	Rischio relativo IC 95%
NCI	30 e oltre	Pap test normale, HPV negativo	12.054	28	0,043	0,897 0,596–1,348
		Pap test consecutivi normali*	9.429	19	0,048	1,000
	Tutte	Pap test normale, HPV negativo	17.594	48	0,056	0,678 0,514–0,894
		Pap test consecutivi normali*	13.392	44	0,082	1,000
Francia	30 e oltre	Pap test normale, HPV negativo	1.690	3	0,084	0,849 0,307–2,35
		Pap test consecutivi normali†	2.026	4	0,099	1,000
	Tutte	Pap test normale, HPV negativo	2.180	3	0,066	0,491 0,221–1,09
		Pap test consecutivi normali†	2.650	7	0,136	1,000

* Tre Pap test normali nell'arco di circa 2 anni.

† Due Pap test normali nell'arco di circa 2 anni.

Tabella 14. Analisi longitudinale — tassi di morbilità stratificati in base all’infezione da HPV al basale

Gruppo dello studio	Età	Stato al baseline	n	Casi di CIN 3+	Tasso (per 100 anni-paziente)	Rischio relativo IC 95%
NCI	30 e oltre	Pap test normale, HPV positivo	1078	24	0,451	10,50 6,13–18,0
		Pap test normale, HPV negativo	12.054	28	0,043	1,00
	Tutte	Pap test normale, HPV positivo	2.561	63	0,096	10,64 7,33–15,5
		Pap test normale, HPV negativo	17.594	48	0,056	1,00
Francia	30 e oltre	Pap test normale, HPV positivo	419	14	2,346	27,3 8,41–88,3
		Pap test normale, HPV negativo	1.696	3	0,084	1,00
	Tutte	Pap test normale, HPV positivo	619	22	2,520	37,0 11,8–116
		Pap test normale, HPV negativo	2.180	3	0,066	1,00

L'utilità clinica del risultato del test HPV è ulteriormente dimostrata dall'aumento del rischio di neoplasia cervicale nelle donne positive all'HPV- rispetto a quelle negative all'HPV.

Prestazioni cliniche durante lo screening di pazienti con risultati del Pap test ASC-US per definire la necessità di eseguire la colposcopia

Nel 1996, negli Stati Uniti è stato condotto uno studio dal titolo "Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears" (Utilità dei test del DNA dell'HPV per la suddivisione delle donne con risultati del Pap test borderline) sotto la direzione del Kaiser Foundation Research Institute (Istituto di Ricerca Fondazione Kaiser) e del Kaiser Permanente Medical Group (Gruppo Medico Kaiser Permanente). Sono stati prelevati campioni cervicali per Pap test di routine e per il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA da donne che frequentavano strutture cliniche del centro Kaiser. I campioni iniziali per il Pap test sono stati valutati in base alla classificazione Bethesda. Per la terminologia equivalente nello screening del cancro cervicale nella Comunità Europea,

consultare le European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening (42). Sono state prese in considerazione donne (a partire da 15 anni) con risultati del Pap test ASC-US (cellule atipiche di significato non determinato) candidate alla colposcopia e alla biopsia. Campioni istologici a guida colposcopica sono stati esaminati da patologi ed è stata formulata una prima diagnosi. Ogni campione istologico è stato valutato anche da un patologo indipendente, mentre le differenze tra la prima e la seconda diagnosi indipendente sono state giudicate da un terzo patologo.

Il campione iniziale è stato analizzato con un prototipo del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA contenente sonde di 11 dei 13 tipi di HPV (sono stati esclusi i tipi di HPV 59 e 68). Era previsto che questa differenza non avrebbe dato luogo a discrepanze sostanziali nel profilo delle prestazioni del test.

Erano disponibili i risultati del test del DNA dell'HPV ad alto rischio e le diagnosi istologiche di 885 donne sottoposte al Pap test ASC-US. Per la maggior parte delle pazienti, i test erano stati eseguiti su campioni prelevati sia in STM sia in soluzione PreservCyt. Data la similitudine tra le caratteristiche del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA condotto su campioni in STM e in soluzione PreservCyt, i risultati dei test vengono presentati solo per i campioni in soluzione PreservCyt.

Tra le pazienti il cui esito del Pap test ASC-US dava adito alla candidatura per altri esame, il valore predittivo negativo del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA per l'HSIL, oppure per una patologia più grave, alla colposcopia è stato del 99% (vedere la Tabella 15 seguente).

Tabella 15. Confronto tra il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA e i dati istologici consensuali; popolazione con risultati del Pap test ASC-US che danno adito alla candidatura ad altri esami; studio Kaiser, campioni in soluzione PreservCyt

		HSIL o patologia più grave al momento della colposcopia		Totale
		+	-	
<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test	+	66	317	383
	-	5	497	502
Totale		71	814	885

Sensibilità $[TP/(TP+FN)] = 93,0\%$ (66/71)
 IC 95% = 84,3-97,7
 Specificità $[TN/(TN+FP)] = 61,1\%$ (497/814)
 IC 95% = 57,7-64,4
 Prevalenza della malattia = 8,0% (71/885)
 Valore predittivo positivo del test = 17,2% (66/383)
 Valore predittivo negativo del test = 99,0% (497/502)

Vengono determinati i valori teorici predittivi positivo e negativo basati su varie prevalenze per un test ASC-US iniziale, sfociato in HSIL o patologie più gravi in base ai risultati del test HPV ad alto rischio (vedere la Tabella 16 seguente).

Tabella 16. Valore predittivo teorico positivo e negativo di test dell'HPV ad alto rischio. Risultati del Pap test ASC-US

Prevalenza teorica per HSIL	Risultato iniziale del Pap test ASC-US	
	Valore predittivo positivo del test	Valore predittivo negativo del test
5	11,2	99,4
10	21,0	98,7
15	29,7	98,0
20	37,4	97,2
25	44,3	96,3
30	50,6	95,3

Si è determinata la variazione tra le diverse fasce di età contemplate in questo studio (vedere la Tabella 17 seguente).

Tabella 17. Dati dello studio Kaiser: Confronto tra le prestazioni del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA e i risultati istologici consensuali (HSIL) — caratteristiche in base alle fasce d'età

	Età <30	Età 30–39	Età >39
n	287	233	365
Prevalenza della malattia (%)	12,2	11,2	2,7
Sensibilità (%)	100,00	88,46	80,00
(n/N)	(35/35)	(23/26)	(8/10)
IC 95%	90,0–100,0	69,9–97,6	44,4–97,5
Specificità (%)	31,4	66,2	79,15
(n/N)	(79/252)	(137/207)	(281/355)
IC 95%	25,7–37,5	59,3–72,6	74,6–83,3
Valore predittivo negativo (%)	100,00	97,86	99,29
(n/N)	(79/79)	(137/140)	(281/283)
Valore predittivo positivo (%)	16,83	24,73	9,76
(n/N)	(35/208)	(23/93)	(8/82)

Sensibilità clinica e specificità per la determinazione del rischio di neoplasia grave o in donne con risultati dei Pap test indici di LSIL o HSIL

Uno studio multicentrico, che ha previsto l'uso del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, è stato condotto sui campioni prelevati presso vari grandi centri, ospedali e ambulatori di colposcopia ad alta prevalenza di neoplasie cervicali e dell'HPV (3 centri) nella zona occidentale e meridionale degli Stati Uniti. Il test dell'HPV è stato eseguito presso 3 centri investigativi non affiliati agli ambulatori di colposcopia presso i quali erano stati prelevati i campioni. La popolazione di

questo studio clinico comprendeva donne a cui era stata diagnosticata una neoplasia intraepiteliale squamosa non grave (LSIL) o grave (HSIL), in base ai risultati di un recente Pap test, e candidate a una colposcopia di follow up. Delle 702 pazienti partecipanti allo studio, 327 presentavano risultati del Pap test superiori all'ASC-US e disponevano di informazioni adeguate; 96 di queste presentavano uno stato patologico finale di HSIL o patologia più grave.

Campioni di cellule cervicali esfoliate sono stati prelevati con il DNAPap Cervical Sampler e posti in STM, oppure prelevati con un dispositivo del tipo a spazzola e lavati nella soluzione PreservCyt. I campioni erano stati prelevati durante la colposcopia. Si è quindi proceduto ad analizzarli con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA e i risultati sono stati confrontati con lo stato patologico determinato per ogni paziente. Lo stato patologico si basava sui risultati dell'esame istologico. Quando l'istologia era negativa o in assenza di risultati istologici, lo stato patologico era stato determinato a livello citologico durante l'esame colposcopico (vedere la Tabella 18 seguente).

Il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA era stato eseguito presso 3 grandi centri metropolitani non affiliati ai centri incaricati del prelievo dei campioni durante la colposcopia. L'esame citologico era stato eseguito presso un laboratorio di patologia di riferimento, mentre l'esame istologico era stato condotto presso gli istituti che si occupavano della colposcopia. I risultati dei test sono stati confrontati con lo stato patologico, per valutare la sensibilità, la specificità e il valore predittivo negativo e positivo del test nella rilevazione delle neoplasie cervicali gravi. Data la similitudine tra le caratteristiche del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA condotto su campioni in STM e in soluzione PreservCyt, i risultati dei test vengono presentati solo per i campioni in soluzione PreservCyt. Non è stata osservata alcuna differenza tra i risultati del test HPV ad alto rischio su campioni in STM e campioni in PreservCyt.

Tabella 18. Algoritmo dello stato patologico della paziente

Risultato citologico	Risultato istologico	Stato patologico
Negativo	Negativo o non effettuato*	Negativo
LSIL	Negativo	LSIL
HSIL	Negativo	HSIL
Cancro	Negativo	HSIL+
Negativo	LSIL	LSIL
LSIL	Non effettuato*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Cancro	LSIL	LSIL
Negativo	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Non effettuato*	HSIL
Cancro	HSIL	HSIL
Negativo	Cancro	HSIL+
LSIL	Cancro	HSIL+
HSIL	Cancro	HSIL+
Cancro	Non effettuato*	HSIL+
Cancro	Cancro	HSIL+

*La biopsia e/o il raschiamento endocervicale mediante curette (ECC) non sono stati eseguiti in quanto non erano state osservate anomalie durante la colposcopia oppure il risultato istologico non era disponibile.

Le prestazioni del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA sono state determinate utilizzando 327 campioni in PreservCyt, 96 dei quali prelevati da donne con diagnosi di neoplasia cervicale grave (vedere le Tabelle 19 e 20 seguenti). I confronti sono stati effettuati su tutte le pazienti dello studio con risultati del Pap test anomali che davano adito alla candidatura per altri esami.

Tabella 19. Risultati dei test dell'HPV ad alto rischio

		Stato patologico finale HSIL		Stato patologico finale LSIL		Stato patologico finale negativo		Totale
		+	-	+	-	+	-	
Risultati per l'HPV ad alto rischio		+	-	+	-	+	-	Totale
Risultati del LSIL		44	4	78	33	28	37	224
Pap test con candidatura ad altri esami	HSIL	45	3	29	14	5	7	103
	Totale	89	7	107	47	33	44	327
	Totale	96		154		77		

Il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA ha evidenziato una sensibilità globale pari a circa il 93% nell'identificazione delle donne con neoplasie gravi, fra la popolazione candidata alla colposcopia sulla base di una diagnosi di LSIL, HSIL o patologia equivalente, formulata in base al Pap test (vedere la Tabella 20 seguente). In questa popolazione, il test ha inoltre dimostrato un valore predittivo negativo di circa il 95%.

Tabella 20. Caratteristiche dei test per il DNA dell'HPV ad alto rischio tra le pazienti con risultato del Pap test indice di LSIL o patologia più grave e stato patologico finale di HSIL

		Stato patologico finale		Totale
		HSIL	LSIL o negativo	
Risultato del test DNA HPV ad alto rischio	+	89	140	229
	-	7	91	98
Totale		96	231	327

Sensibilità $[TP/(TP+FN)] = 92,7\% (89/96)$
 IC 95% = 85,6–97,0
 Specificità $[TN/(TN+FP)] = 39,4\% (91/231)$
 IC 95% = 33,1-46,0
 Prevalenza della malattia con Pap test indice di LSIL ad HSIL finale = 21,4%
 Prevalenza della malattia con Pap test indice di HSIL ad HSIL finale = 46,6%
 Valore predittivo positivo globale = 38,9% (89/229)
 Valore predittivo negativo globale = 92,8% (91/98)

Nonostante la specificità del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA sia sembrata piuttosto bassa, non è prevista una stretta correlazione tra l'assenza di neoplasia e un risultato negativo del test dell'HPV. Il DNA dell'HPV può essere presente in donne in cui non si è manifestata l'evoluzione a una patologia più grave. Infatti, effettuando i test dell'HPV con reazione a catena della polimerasi (PCR) (un test utilizzato solo in ambito di ricerca) su campioni con risultati

positivi del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA e con corrispondente stato patologico inferiore alla neoplasia non grave, circa il 75% è risultato positivo.

Sono stati determinati i valori predittivi teorici positivo e negativo del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA di LSIL o HSIL, come risultato iniziale del Pap test, confermata come HSIL o patologia più grave in sede di colposcopia (vedere la Tabella 21 seguente).

Tabella 21. Valore predittivo teorico positivo e negativo del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA di LSIL o HSIL come risultato iniziale del Pap test

Prevalenza teorica della HSIL	LSIL o HSIL come risultato iniziale del Pap test	
	Valore predittivo positivo del test	Valore predittivo negativo del test
5	7,4	99,0
10	14,5	97,9
15	21,2	96,8
20	27,6	95,5
25	33,7	94,1
30	39,6	92,6
35	45,1	90,9
40	50,4	89,0
45	55,5	86,8
50	60,4	84,3

Sensibilità analitica

È stato sottoposto a test un pannello non clinico di DNA plasmidico dell'HPV clonato per determinare se i 13 tipi di HPV siano tutti rilevabili dal test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA e per determinare la sensibilità analitica del test per ciascun tipo di HPV. Ogni concentrazione dell'HPV bersaglio (100 pg/ml, 10

pg/ml, 2,5 pg/ml, 1,0 pg/ml, 0,5 pg/ml e 0,2 pg/ml) di ciascuno dei 13 tipi di DNA dell'HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) è stata analizzata in tre replicati. È stata calcolata l'RLU media per ogni concentrazione di ciascun tipo di HPV, poi confrontata con il calibratore positivo.

È stato determinato il limite rilevabile di ogni tipo di HPV in STM (vedere la Tabella 22 seguente). I limiti rilevabili variavano da 0,62 pg/ml a 1,39 pg/ml, a seconda del tipo di HPV oggetto del test. Il limite medio rilevabile di tutti i 13 tipi di DNA dell'HPV è stato di 1,08 pg/ml, con una deviazione standard di 0,05 pg/ml.

Tabella 22. Riepilogo dei limiti di sensibilità rilevabili del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA per ogni tipo di DNA dell'HPV in STM

Tipo di DNA dell'HPV	Concentrazione di DNA dell'HPV rilevabile (pg/ml)	Deviazione standard	IC 95%
16	1,09	0,06	0,94–1,29
18	1,05	0,05	0,88–1,29
31	1,01	0,05	0,91–1,15
33	1,35	0,02	1,26–1,45
35	1,11	0,05	0,95–1,31
39	1,39	0,09	1,16–1,71
45	1,14	0,04	0,99–1,35
51	0,78	0,10	0,70–0,88
52	1,37	0,06	1,21–1,58
56	0,62	0,04	0,58–0,67
58	0,82	0,04	0,73–0,94
59	1,10	0,06	1,00–1,21
68	1,19	0,04	1,03–1,39
Media (tutti i tipi)	1,08	0,05	0,95–1,25

Equivalenza tra tipi di campioni

Equivalenza tra campioni in STM e campioni in PreservCyt

È stata esaminata l'equivalenza tra campioni in STM e in PreservCyt per un uguale recupero del DNA dell'HPV 18 da circa 10^6 cellule HeLa positive contenenti genomi dell'HPV 18 integrati, con concentrazione di picco in STM e in un pool di cellule negative in soluzione PreservCyt. Ogni tipo di campione è stato trattato seguendo le rispettive procedure di preparazione e denaturazione,

descritte nelle istruzioni per l'uso applicabili, e analizzato con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. I risultati hanno dimostrato che il recupero del DNA dell'HPV 18 da cellule carcinomatose umane è equivalente per i due mezzi e che la preparazione dei campioni in PreservCyt non influisce sulla sensibilità analitica del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Equivalenza fra la preparazione manuale e la preparazione con il kit QIASymphony DSP HPV Media dei campioni in soluzione PreservCyt

Sono stati condotti studi con campioni in soluzione PreservCyt prelevati da una sottopopolazione di donne con risultato citologico normale (n=1.276) e da una sottopopolazione di donne con risultato citologico ASC-US o superiore a ASC-US (n=402). Per ogni campione è stata eseguita la preparazione manuale e la preparazione con il kit QIASymphony DSP HPV Media, seguita da un test RCS automatizzato utilizzando il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (vedere la Tabella 23 seguente).

Tabella 23. Concordanza tra i risultati per i campioni in soluzione PreservCyt ottenuti mediante preparazione manuale e preparazione con il kit QIASymphony DSP HPV Media (n=1.678)

Concordanza positiva (%)		Concordanza negativa (%)	
(n/N)		(n/N)	
IC 95%		IC 95%	
Tutti positivi	Sottoinsieme positivo alto (RLU/CO \geq2,5)	Tutti negativi	Sottoinsieme negativo alto (RLU/CO $<$0,8)
96,0	97,6	96,2	99,1
(409/426)	(372/381)	(1.204/1.252)	(1.173/1.184)
93,7-97,5	95,6-98,8	95,0-97,1	98,3-99,5

La specificità e la sensibilità relative del test condotto sui campioni in soluzione PreservCyt preparati con il kit QIASymphony DSP HPV Media sono altamente correlate ai risultati ottenuti utilizzando il metodo di preparazione manuale,

come evidenziato dal limite inferiore dell'IC del 95% per la concordanza sia positiva che negativa.

Equivalenza fra la preparazione manuale e la preparazione con il kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA dei campioni in soluzione PreservCyt

Sono stati condotti studi utilizzando campioni in soluzione PreservCyt prelevati da una sottopopolazione di donne a partire da 30 anni d'età con risultato citologico normale (n=1.901) e una sottopopolazione di donne con risultato citologico ASC-US (n=398). Per ogni campione è stata eseguita la preparazione manuale e la preparazione con il kit QIAAsymphony DSP AXpH, seguita da un test RCS automatizzato utilizzando il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (vedere la Tabella 24 seguente).

Tabella 24. Concordanza tra i risultati relativi ai campioni in PreservCyt ottenuti mediante preparazione manuale e preparazione con il kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA (n=2.299)

Concordanza positiva (%) (n/N) IC 95%		Concordanza negativa (%) (n/N) IC 95%	
Tutti positivi	Sottoinsieme positivo alto (RLU/CO $\geq 2,5$)	Tutti negativi	Sottoinsieme negativo alto (RLU/CO $< 0,8$)
92,7 (281/303)	96,5 (245/254)	99,1 (1.978/1.996)	99,9 (1.967/1.969)
89,3–95,2	93,4–98,1	98,6–99,4	99,6–100,0

La specificità e la sensibilità relative del test condotto sui campioni in PreservCyt preparati utilizzando il kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA sono altamente correlate ai risultati ottenuti utilizzando il metodo di preparazione manuale, come evidenziato dal limite inferiore dell'IC del 95% per la concordanza sia positiva che negativa.

Equivalenza tra campioni in STM e campioni SurePath

È stata condotta una valutazione clinica a due fasi utilizzando 6 centri di prelievo e 3 siti di test negli Stati Uniti. Le pazienti che frequentavano un centro clinico per malattie a trasmissione sessuale, un centro clinico ostetrico/ginecologico, un centro clinico di colposcopia, un ospedale o un centro di pianificazione familiare erano idonee alla partecipazione secondo i criteri di inclusione ed esclusione predeterminati. La fase di fattibilità, intesa a determinare un valore soglia adeguato del *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test per l'utilizzo con i campioni SurePath, ha coinvolto circa 400 pazienti. La fase di convalida clinica, che ha coinvolto circa 1.500 pazienti per convalidare il valore soglia prescelto, è iniziata dopo che un'analisi temporanea della fase di fattibilità ha dimostrato che un valore soglia pari a 1,0 RLU/CO utilizzando campioni SurePath ha prodotto una concordanza accettabile con i risultati del campione in STM.

In entrambe le fasi di valutazione, sono stati prelevati campioni cervicali SurePath e in STM accoppiati da ogni partecipante che aveva fornito il proprio consenso. Il campione SurePath è stato quindi inviato a un laboratorio di citologia per la preparazione dei vetrini. Dopo la preparazione citologica, il campione SurePath rimanente e il corrispondente campione in STM sono stati analizzati con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA utilizzando un valore soglia pari a 1,0 RLU/CO (vedere la Tabella 25 seguente).

Tabella 25. Concordanza tra i risultati dei campioni SurePath e i risultati dei campioni in STM (tutte le età e classificazione citologica) (n=1.490)

Concordanza positiva (%)		Concordanza negativa (%)	
(n/N)		(n/N)	
IC 95%		IC 95%	
Tutti positivi	Sottoinsieme positivo alto (RLU/CO $\geq 2,5$)	Tutti negativi	Sottoinsieme negativo alto (RLU/CO $< 0,80$)
93,5	96,4	95,3	96,0
(401/429)	(378/392)	(1.011/1.061)	(1.002/1.044)
90,7–95,6	94,1–98,0	93,8–96,5	94,6–97,1

La specificità e la sensibilità relative dei test eseguiti su campioni SurePath sono altamente correlate ai risultati ottenuti analizzando campioni in STM, come evidenziato dal limite inferiore dell'IC del 95% per la concordanza sia positiva che negativa.

Concordanza tra i metodi d'analisi

È stato condotto uno studio multicentrico (n=2.270) per valutare i risultati dei test clinici eseguiti con l'RCS rispetto ai risultati dei test ottenuti utilizzando il metodo manuale. L'analisi è stata condotta presso 3 centri, esterni a QIAGEN, con campioni di pazienti prelevati presso 5 centri di prelievo. Il set di dati era formato da 1.269 campioni cervicali prelevati in soluzione PreservCyt e 1.001 campioni prelevati in STM.

Per questa popolazione di pazienti sono state calcolate le concordanze statistiche tra campioni corrispondenti analizzati con il sistema RCS e con il test manuale (vedere le Tabelle 26 e 27 seguenti).

Tabella 26. Riepilogo della concordanza tra test RCS automatizzati e test manuali – campioni in STM (n=1.001)

Classificazione citologica	Prevalenza HPV (%)	Concordanza positiva (%)		Concordanza negativa (%)	
		Tutti positivi	Sottoinsieme positivo alto (RLU/CO >2,5)	Tutti negativi	Sottoinsieme negativo alto (RLU/CO <0,8)
WNL* <30 anni	21	99,3	99,1	99,3	100,0
		(139/140)	(112/113)	(538/542)	(531/531)
		96,1–100,0	95,2–100,0	98,1–99,8	99,3–100,0
WNL ≥30 anni	15	92,0	93,8	100,0	100,0
		(23/25)	(15/16)	(143/143)	(142/142)
		74,0–99,0	69,8–99,8	97,5–100,0	97,4–100,0
ASC-US	65	98,1	100,0	96,4	100,0
		(51/52)	(47/47)	(27/28)	(26/26)
		89,7–100,0	92,4–100,0	81,7–99,9	86,8–100,0
LSIL+	96	100,0	100,0	66,7	66,7
		(65/65)	(62/62)	(2/3)	(2/3)
		94,5–100,0	94,2–100,0	9,4–99,2	9,4–99,2
Altro	33	100,0	100,0	100,0	100,0
		(1/1)	(1/1)	(2/2)	(2/2)
		2,5–100,0	2,5–100,0	15,8–100,0	15,8–100,0
Tutti i campioni in STM	28	98,6	99,2	99,2	99,9
		(279/283)	(237/239)	(712/718)	(703/704)
		96,4–99,6	97,0–99,9	98,2–99,7	99,2–100,0

* WNL = nella norma.

Tabella 27. Riepilogo delle concordanze tra test RCS automatizzati e test manuali – campioni in PreservCyt (n=1.269)

Classificazione citologica	HPV Prevalenza (%)	Concordanza positiva (%)		Concordanza negativa (%)	
		(n/N) IC 95%		(n/N) IC 95%	
		Tutti positivi	Sottoinsieme positivo alto (RLU/CO >2,5)	Tutti negativi	Sottoinsieme negativo alto (RLU/CO <0,8)
WNL <30 anni	20	96,2 (75/78) 89,2–99,2	100,0 (64/64) 94,4–100,0	98,4 (301/306) 96,2–99,5	99,0 (293/296) 97,1–99,8
WNL ≥30 anni	8	88,7 (47/53) 77,0–95,7	92,1 (35/38) 78,6–98,3	99,1 (578/583) 98,0–99,7	99,5 (571/574) 98,5–99,9
ASC-US	36	100,0 (48/48) 92,6–100,0	100,0 (46/46) 92,3–100,0	96,6 (84/87) 90,3–99,3	96,5 (83/86) 90,1–99,3
LSIL+	77	100,0 (64/64) 94,4–100,0	100,0 (62/62) 94,2–100,0	89,5 (17/19) 66,9–98,7	88,9 (16/18) 65,3–98,6
Altra citologia	11	100,0 (3/3) 29,2–100,0	100,0 (3/3) 29,2–100,0	100,0 (24/24) 85,6–100,0	100,0 (24/24) 85,8–100,0
Tutti i campioni in PreservCyt*	20	96,4 (238/247) 93,2–98,3	98,6 (211/214) 96,0–99,7	98,5 (1.007/1.022) 97,6–99,2	98,9 (990/1.001) 98,0–99,4

*Dati di citologia di 4 pazienti non disponibili.

È stato condotto uno studio clinico supplementare utilizzando campioni archiviati residui in soluzione PreservCyt prelevati da una sottopolazione di donne a partire da 30 anni d'età con risultato citologico normale (vedere la Tabella 28 seguente) con una prevalenza dell'HPV del 4,8%.

Tabella 28. Riepilogo della concordanza tra test RCS automatizzati e test manuali – donne nella norma a partire da 30 anni d'età (n=2.077)

Concordanza positiva (%)		Concordanza negativa (%)	
(n/N)		(n/N)	
IC 95%		IC 95%	
Tutti positivi	Sottoinsieme positivo alto (RLU/CO >2,5)	Tutti negativi	Sottoinsieme negativo alto (RLU/CO <0,8)
92,0	91,8	99,3	99,7
(92/100)	(78/85)	(1.964/1.977)	(1.944/1.949)
84,84, 96,48	83,77, 96,62	98,88, 99,65	99,40, 99,92

Nel sottoinsieme positivo alto, sono stati registrati 7 risultati discordanti tra i risultati dei test manuali e dei test RCS automatizzati. I risultati iniziali dei test manuali relativi a questi 7 campioni non rientravano nell'algoritmo raccomandato di ripetizione del test dei campioni in PreservCyt; tuttavia, dal momento che il disegno dello studio prevedeva l'analisi di tutti i campioni in tre replicati, per la risoluzione discrepante erano disponibili risultati ripetuti.

I dati dei test ripetuti per ognuno dei 7 campioni discordanti suggeriscono che tali campioni sono tutti negativi al DNA dell'HPV (vedere la Tabella 29 seguente). In base ai risultati negativi ripetuti ottenuti per entrambi i replicati, ogni risultato inizialmente positivo del test manuale era probabilmente un falso positivo.

Tabella 29. Campioni discordanti in PreservCyt per donne nella norma a partire da 30 anni d'età (n=7)

Campione	Sito	Test manuali (RLU/CO)			Test RCS automatizzati (RLU/CO)		
		Iniziale	Ripetuto 1	Ripetuto 2	Iniziale	Ripetuto 1	Ripetuto 2
1	A	2,51	0,08	0,08	0,12	0,17	0,14
2	A	20,18	0,08	0,09	0,19	0,24	0,20
3	A	3,88	0,12	0,11	0,17	0,22	0,22
4	A	9,37	0,09	0,09	0,15	0,21	0,20
5	A	6,01	0,17	0,13	0,25	0,30	0,30
6	B	2,97	0,71	0,99	1,59	0,89	0,90
7	C	11,01	0,16	0,14	0,19	0,15	0,21

I risultati ottenuti da questo studio clinico indicano una concordanza complessiva tra test RCS automatizzati e test manuali utilizzando campioni in STM o in PreservCyt.

Riproducibilità

Riproducibilità globale dei test manuali

È stato eseguito uno studio multicentrico per determinare la riproducibilità globale da un giorno all'altro e da un centro all'altro del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, utilizzando un pannello di DNA bersaglio dell'HPV e campioni clinici in STM positivi e negativi all'HPV.

Tre laboratori esterni hanno eseguito i test utilizzando kit del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA appartenenti allo stesso lotto, in 3 giorni diversi, con un pannello di riproducibilità identico. Il pannello di riproducibilità includeva i seguenti campioni:

- 12 pool di campioni clinici denaturati in STM
- 3 pool di campioni clinici non denaturati in PreservCyt
- Calibratore negativo
- Calibratore positivo per l'HPV ad alto rischio a concentrazioni di 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml e 10 pg/ml.

Tutti i membri del pannello sono stati analizzati in tre replicati in ciascun giorno, utilizzando il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. I risultati indicano che la riproducibilità del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA con campioni clinici è ottima (vedere la Tabella 30 seguente).

Tabella 30. Riproducibilità globale – riproducibilità multicentrica (tutte le sessioni di tutti i centri)

Misura statistica	Risultato
Positivi previsti con risultato positivo osservato (IC 95%)	100,0% (99,0–100,0)
Negativi previsti con risultato negativo osservato (IC 95%)	99,0% (97,49–99,73)
Concordanza (IC 95%)	99,5% (98,70–99,86)
Kappa	0,990

Riproducibilità con campioni clinici in STM

Test manuali. È stato condotto uno studio per determinare la riproducibilità dei test manuali di campioni clinici in STM utilizzando il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. È stato preparato un pannello di 20 membri costituito da pool clinici

(10 positivi e 10 negativi) unendo campioni in STM precedentemente analizzati. I campioni sono stati analizzati in 4 replicati nell'arco di 5 giorni, per un totale di 20 replicati per campione. I test sono stati eseguiti utilizzando una miscela di sonde combinata, costituita dalla sonda HPV ad alto rischio e da una sonda HPV a basso rischio. Non si prevede che la riproducibilità del test possa differire se si utilizza soltanto la miscela della sonda nel test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Sono stati calcolati la media RLU/CO e l'IC al 95% intorno alla media (vedere la Tabella 31 seguente).

Tabella 31. Riproducibilità dei campioni in STM – test manuali (in ordine decrescente in base alla media RLU/CO)

ID campione	Media RLU/CO	IC 95%	Risultato test positivo (%) (n/N)
10	3,18	3,02–3,35	100 (20/20)
20	1,43	1,36–1,50	100 (20/20)
11	1,25	1,20–1,28	100 (20/20)
12	1,21	1,15–1,27	100 (20/20)
15	1,20	1,14–1,25	100 (20/20)
13	1,07	1,01–1,11	80 (16/20)
16	1,06	1,01–1,09	75 (15/20)
17	1,04	1,00–1,06	80 (16/20)
14	0,98	0,92–1,02	45 (9/20)
18	0,92	0,87–0,96	20 (4/20)
19	0,72	0,68–0,75	0 (0/20)
7	0,40	0,33–0,46	0 (0/20)
4	0,38	0,35–0,39	0 (0/20)
9	0,37	0,32–0,41	0 (0/20)
1	0,35	0,32–0,36	0 (0/20)
2	0,35	0,31–0,37	0 (0/20)
8	0,32	0,29–0,34	0 (0/20)
3	0,30	0,27–0,31	0 (0/20)
6	0,27	0,24–0,30	0 (0/20)
5	0,26	0,23–0,28	0 (0/20)

Per i 5 campioni con una media RLU/CO pari al 20% o più al di sopra del valore soglia, 100 replicati su 100 (100,0%) sono risultati positivi. Per i 5 campioni con una media RLU/CO entro il 20% al di sopra o al di sotto del valore soglia, 60 replicati su 100 (60%; IC 95% = 49,7–69,6) sono risultati positivi e 40 su 100 (40%) negativi. Per i 10 campioni con una media RLU/CO di oltre il 20% al di sotto del valore soglia, 200 replicati su 200 (100%) sono risultati negativi.

I risultati indicano che è prevedibile che i campioni che si discostano del 20% o più dal valore soglia diano risultati coerenti. I campioni vicini al valore soglia hanno dato luogo a un numero pressoché uguale di risultati positivi e negativi. Questi dati dimostrano che l'analisi manuale di campioni in STM eseguita con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA fornisce risultati riproducibili.

Test RCS automatizzati. È stato condotto uno studio per determinare la riproducibilità all'interno della stessa sessione, tra un giorno e l'altro e tra i laboratori di test RCS automatizzati su campioni in STM utilizzando il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. È stato testato un pannello di 16 membri di campioni clinici in pool (vedere la Tabella 32 seguente) utilizzando un singolo lotto di reagenti, due volte al giorno in 3 giorni diversi. Ogni membro del pannello è stato analizzato in 4 replicati.

Tabella 32. Riproducibilità dei campioni in STM – composizione del pannello dei test RCS automatizzati

Membro pannello	RLU/CO approssimativo	Risultato previsto
1N	<0,4	Negativo
2N	0,4–0,8	Negativo
3P	0,8–1,2	Altamente negativo/debolmente positivo
4P	0,8–1,2	Altamente negativo/debolmente positivo
5P	0,8–1,2	Altamente negativo/debolmente positivo
6P	1,2–2,0	Debolmente positivo
7P	1,2–2,0	Debolmente positivo
8P	1,2–2,0	Debolmente positivo
9P	2,0–5,0	Debolmente positivo
10P	5,0–10,0	Mediamente positivo
11N	<0,4	Negativo
12N	<0,4	Negativo
13N	<0,4	Negativo
14XR	Materiale clinico positivo al DNA dell'HPV a basso rischio in pool clinici negativi in STM	Altamente negativo/debolmente positivo
15XR	DNA plasmidico dell'HPV a basso rischio in pool clinici negativi in STM	Altamente negativo/debolmente positivo
16XR	Controllo DNA vettore del plasmide in pool clinici negativi in STM	Altamente negativo/debolmente positivo

Sono stati inclusi due membri del pannello (14XR e 15XR) per valutare il potenziale di ibridazione crociata della miscela della sonda del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA con i campioni contenenti soltanto DNA dell'HPV a basso rischio di tipo 6, 11, 42, 43 e 44. Il membro del pannello 16XR era composto da DNA pGEM[®] alla concentrazione di 1,49 ng/ml e fungeva da controllo vettoriale per il membro 15XR. I risultati di questi test non indicano nessun falso positivo per effetto della presenza di tipi di DNA dell'HPV a basso rischio nei campioni clinici. Tali risultati sono coerenti con quelli dei test manuali.

La riproducibilità è stata calcolata secondo la metodica descritta da NCCLS E5-A* (vedere la Tabella 33 seguente). Questa metodica richiede il calcolo dei componenti di varianza per ognuna delle fonti di variabilità: laboratorio, giorno, sessione ed errore (definito come variazione inter-test e intra-test).

* NCCLS. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices (Valutazione della precisione delle prestazioni dei dispositivi per analisi chimiche di laboratorio); Linee guida approvate. Documento NCCLS E5-A (1999).

Tabella 33. Riproducibilità dei campioni in STM — test RCS automatizzati; riproducibilità quantitativa

Membro pannello	n	Media RLU/CO	Deviazione standard				Totale	CV totale (%)
			Intra-sessione	Inter-sessione	Intergiornaliera	Inter-laboratorio		
1N	72	0,13	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	15,10
2N	72	0,36	0,03	0,01	0,03	0 [†]	0,04	11,69
3P	72	0,96	0,06	0,06	0,04	0 [†]	0,09	9,55
4P	72	1,03	0,06	0,18	0,06	0 [†]	0,19	18,81
5P	72	1,41	0,11	0,14	0,15	0,06	0,24	17,00
6P	72	1,73	0,10	0,27	0 [†]	0,11	0,31	18,10
7P	72	1,74	0,12	0,21	0 [†]	0 [†]	0,24	13,78
8P [‡]	70	1,95	N/A [§]	N/A [§]	N/A [§]	N/A [§]	0,47	23,80
9P	72	5,21	0,34	0,44	0,21	0 [†]	0,59	11,36
10P	72	7,67	0,46	0,63	0,71	0 [†]	1,05	13,70
11N	72	0,13	0,01	0,01	0,01	0 [†]	0,02	16,89
12N	72	0,17	0,03	0,06	0,03	0 [†]	0,07	39,14
13N	72	0,15	0,02	0,02	0 [†]	0,01	0,03	17,01

[†] I componenti di varianza negativa sono impostati a zero.

[‡] Due replicati non validi per il membro del pannello 8P hanno precluso l'analisi dei componenti della varianza a causa di gruppi di dimensioni differenti a confronto.

[§] N/A: analisi della varianza non possibile a causa di un numero di replicati minore di quello di altri membri del pannello.

Riproducibilità di campioni clinici in PreservCyt

Test manuali. La riproducibilità dei test manuali su campioni in PreservCyt eseguiti utilizzando il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA è stata determinata in uno studio condotto con 24 campioni fittizi a varie concentrazioni del DNA dell'HPV. I campioni erano costituiti da soluzione PreservCyt e globuli bianchi, con e senza batteri contenenti plasmidi dell'HPV 16.

I campioni sono stati analizzati in 4 replicati nell'arco di 5 giorni, per un totale di 20 replicati per campione. Durante ogni giorno sui 5 dello studio, è stato preparato e analizzato un dosaggio di 8 ml di ciascun campione seguendo le istruzioni per l'uso del kit *digene* HC2 Sample Conversion. Sono stati calcolati la media e l'IC al 95% (vedere la Tabella 34 seguente).

Tabella 34. Riproducibilità dei campioni in PreservCyt – test manuali con preparazione manuale dei campioni; riproducibilità qualitativa (in ordine decrescente in base alla media RLU/CO)

ID campione	Media RLU/CO	IC 95%	Risultato test positivo (%) (n/N)
21	3,51	3,19–3,83	100 (20/20)
12	1,58	1,48–1,69	100 (20/20)
13	1,42	1,32–1,52	100 (20/20)
17	1,38	1,23–1,53	90 (18/20)
18	1,36	1,23–1,48	95 (19/20)
15	1,32	1,16–1,49	85 (17/20)
23	1,17	1,06–1,27	75 (15/20)
16	1,14	1,07–1,20	75 (15/20)
20	1,10	0,96–1,21	85 (17/20)
19	1,06	0,95–1,17	45 (9/19)
22	1,05	0,99–1,10	70 (14/20)
11	1,04	0,96–1,11	65 (13/20)
14	0,94	0,86–1,01	25 (5/20)
24	0,77	0,73–0,81	0 (0/20)
3	0,28	0,25–0,30	0 (0/20)
1	0,27	0,24–0,30	0 (0/20)
7	0,27	0,25–0,30	0 (0/20)
2	0,27	0,25–0,28	0 (0/20)
5	0,26	0,24–0,28	0 (0/20)

La tabella continua alla pagina seguente

Tabella 34. Continua

ID campione	Media RLU/CO	IC 95%	Risultato test positivo (%) (n/N)
4	0,24	0,22–0,25	0 (0/20)
9	0,23	0,21–0,25	0 (0/20)
8	0,22	0,18–0,27	0 (0/20)
10	0,22	0,20–0,25	0 (0/20)
6	0,19	0,17–0,21	0 (0/20)

Per i 6 campioni con una media RLU/CO pari al 20% o più al di sopra del valore soglia, 114 replicati su 120 (95,0%) sono risultati positivi. Per i 7 campioni con una media RLU/CO entro il 20% al di sopra o al di sotto del valore soglia, 88 replicati su 139 (63,3%; IC 95% = 54,3–70,9) sono risultati positivi e 51 su 139 (36,7%) negativi. Per i 4 campioni entro il 10% al di sopra o al di sotto del valore soglia, 41 replicati su 79 (51,9%) sono risultati positivi e 38 su 79 (48,1%) negativi. Per gli 11 campioni con una media RLU/CO di oltre il 20% al di sotto del valore soglia, 220 replicati su 220 (100%) sono risultati negativi.

I risultati indicano che è prevedibile che i campioni che si discostano del 20% o più dal valore soglia diano risultati coerenti. I campioni vicini al valore soglia hanno dato luogo a un numero pressoché uguale di risultati positivi e negativi. Questi dati dimostrano che l'analisi manuale di campioni in PreservCyt eseguita con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA fornisce risultati riproducibili.

Test RCS automatizzati con preparazione manuale dei campioni. È stato condotto uno studio interno su test RCS automatizzati utilizzando campioni clinici in PreservCyt ottenuti prevalentemente da donne con risultato citologico di ASC-US o superiore a ASC-US (prevalenza dell'HPV 57%). I campioni sono stati divisi in 2 aliquote, ciascuna delle quali è stata poi trattata singolarmente utilizzando il kit *digene* HC2 Sample Conversion e analizzata in modo duplice con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Come per altri test qualitativi di diagnostica in vitro, la variabilità dei risultati del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA ottenuti da campioni clinici è associata

principalmente a una delle seguenti procedure o a una loro combinazione: prelievo dei campioni, preparazione dei campioni e procedura d'analisi. Dal momento che i risultati dei test confrontati erano stati ottenuti dallo stesso campione clinico, si è controllata la variabilità del disegno sperimentale dovuta al prelievo dei campioni. La ripetibilità dei risultati ottenuti da 2 aliquote preparate singolarmente dallo stesso campione clinico (indicata di seguito come "tra aliquote preparate") riflette la variazione dovuta alla combinazione di preparazione dei campioni e procedura di analisi. La ripetibilità dei risultati ottenuti dalla stessa aliquota di campione (indicata di seguito come "all'interno dell'aliquota preparata") riflette la variazione ottenuta dalla sola procedura d'analisi (vedere la Tabella 35 seguente).

Tabella 35. Riproducibilità dei campioni in PreservCyt — test RCS automatizzati con preparazione manuale dei campioni; riproducibilità qualitativa

Analisi	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)	
	(n/N) IC 95%	(n/N) IC 95%	(n/N) IC 95%	
All'interno dell'aliquota preparata	Tutti i dati	99,62 (261/262)	94,7 (160/169)	97,7 (421/431)
		97,9–100,0	90,1–97,5	95,8–98,9
	Sottoinsiemi positivo alto e negativo alto	100,0 (249/249)	98,2 (160/163)	99,3 (409/412)
		98,5–100,0	94,7–99,6	97,9–99,9
Tra le aliquote preparate	Tutti i dati	99,6 (264/265)	98,2 (163/166)	99,1 (427/431)
		97,9–100,0	94,8–99,6	97,6–99,8
	Sottoinsiemi positivo alto e negativo alto	100,0 (249/249)	99,4 (161/162)	99,8 (410/411)
		98,5–100,0	96,6–100,0	98,7–100,0

È stato condotto un ulteriore studio per valutare la riproducibilità quantitativa dei risultati ottenuti con test RCS automatizzati su campioni in PreservCyt simulati. Tre centri di test, tra cui QIAGEN, hanno partecipato allo studio.

Ogni laboratorio d'analisi ha eseguito sia test RCS automatizzati sia test manuali, utilizzando il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, due volte al giorno per 5 giorni diversi, con un pannello di riproducibilità a 6 membri messo a disposizione. Ogni membro del pannello era costituito da cellule in coltura aggiunte alla soluzione PreservCyt, al fine di produrre un valore RLU/CO approssimato (vedere la Tabella 36 seguente).

I membri del pannello positivi al DNA dell'HPV sono stati preparati aggiungendo varie quantità di cellule SiHa positive al DNA dell'HPV (ottenute da una linea cellulare di laboratorio). Il membro del pannello negativo era costituito da cellule Jurkat negative all'HPV (ottenute da una diversa linea cellulare di laboratorio). La concentrazione cellulare finale di tutti i 6 membri del pannello era pari a circa 5×10^4 cellule/ml.

Tabella 36. Riproducibilità dei campioni in PreservCyt – test RCS automatizzati con preparazione manuale dei campioni; membri del pannello di riproducibilità quantitativa

Membro pannello	Tipo di cellula	RLU/CO	
		approssimativo	Risultato previsto
1N	Jurkat	<1,0	Negativo
2N	Jurkat	<1,0	Negativo
3P	SiHa e Jurkat	5,0–8,0	Debolmente positivo
4P	SiHa e Jurkat	5,0–8,0	Debolmente positivo
5P	SiHa	30,0–50,0	Mediamente positivo
6P	SiHa	200,0	Altamente positivo

La riproducibilità è stata calcolata secondo la metodica descritta da NCCLS E5-A* (vedere la Tabella 37 seguente). Questa metodica richiede il calcolo dei componenti di varianza per ognuna delle fonti di variabilità: laboratorio, giorno, sessione ed errore (definito come variazione inter-test e intra-test). Ognuno dei 6 membri del pannello è stato analizzato in 4 replicati in ciascuna delle 10 sessioni (2 sessioni al giorno per 5 giorni d'analisi) presso ognuno dei 3 laboratori d'analisi.

Tabella 37. Riproducibilità dei campioni in PreservCyt – test RCS automatizzati con preparazione manuale dei campioni; riproducibilità quantitativa

Membro pannello	n	Media RLU/CO	Deviazione standard				Totale	CV totale (%)
			Intra-sessione	Inter-sessione	Intergiornaliera	Inter-laboratorio		
1N	120	0,20	0,04	0,01	0,01	0,08	0,089	44,4
2N	120	0,20	0,06	0,01	0 [†]	0,08	0,10	52,2
3P	120	4,05	0,76	1,17	0 [†]	0,26	1,42	35,1
4P	120	4,23	0,74	0,86	0 [†]	0,31	1,18	27,8
5P	120	28,6	5,00	5,61	4,41	0 [†]	8,71	30,5
6P	120	214,6	33,95	27,25	18,09	25,53	53,61	25,0

[†] I componenti di varianza negativa sono impostati a zero.

Per integrare questo studio di riproducibilità iniziale con dati ottenuti da campioni molto vicini al valore soglia del dosaggio, è stato condotto un ulteriore studio di precisione presso un centro esterno a QIAGEN utilizzando il sistema RCS.

Il pannello era costituito da 1 campione negativo, 2 campioni negativi o debolmente positivi e 2 campioni debolmente positivi. Ogni membro del pannello è stato preparato aggiungendo colture di cellule Jurkat e SiHa alla soluzione PreservCyt, allo scopo di ottenere i valori RLU/CO bersaglio (vedere la Tabella 38 seguente).

Il centro esterno ha eseguito i test RCS automatizzati utilizzando un singolo lotto di reagenti del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA per ogni sessione,

* NCCLS. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices (Valutazione della precisione delle prestazioni dei dispositivi per analisi chimiche di laboratorio); Linee guida approvate. Documento NCCLS E5-A (1999).

effettuando il test 2 volte al giorno in 3 diversi giorni e utilizzando un pannello a 5 membri di campioni in PreservCyt simulati messo a disposizione. Ogni membro del pannello è stato diviso in 4 campioni, tutti analizzati sulla stessa micropiastra (vedere la Tabella 39 seguente).

Tabella 38. Riproducibilità dei campioni in PreservCyt — test RCS automatizzati con preparazione manuale dei campioni; membri del pannello di riproducibilità quantitativa vicina al valore soglia del dosaggio

Membro pannello	Valore RLU/CO approssimativo	Risultato previsto
1N	0,2	Negativo
2P	0,8–1,2	Altamente negativo/debolmente positivo
3P	0,8–1,2	Altamente negativo/debolmente positivo
4P	1,2–2,0	Debolmente positivo
5P	1,2–2,0	Debolmente positivo

Tabella 39. Riproducibilità dei campioni in PreservCyt — test RCS automatizzati con preparazione manuale dei campioni; riproducibilità quantitativa vicina al valore soglia del dosaggio

Membro pannello	n	Media RLU/CO	Deviazione standard				CV (%)
			Intra-sessione	Inter-sessione	Inter-giornaliera	Totale	
1N	24	0,14	0,01	0*	0,02	0,02	15,12
2P	24	1,39	0,14	0,15	0*	0,21	14,84
3P	24	1,31	0,16	0*	0,11	0,19	14,70
4P	24	1,74	0,13	0,21	0,18	0,31	17,73
5P	24	1,63	0,24	0,20	0,26	0,40	24,63

* I componenti di varianza negativa sono impostati a zero.

Preparazione dei campioni con il kit QIASymphony DSP HPV Media. È stato condotto uno studio interno sulla preparazione dei campioni con il kit QIASymphony DSP HPV Media utilizzando campioni clinici in PreservCyt ottenuti da donne con uno dei seguenti risultati citologici:

- ASC-US o superiore a ASC-US
- Negativo a lesione intraepiteliale o patologia maligna (NILM)

Sono stati eseguiti due prelievi su ogni campione. Ogni campione è stato preparato singolarmente con il kit QIASymphony DSP HPV Media e i risultati sono stati determinati mediante test RCS automatizzati con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Come per altri test qualitativi di diagnostica in vitro, la variabilità dei risultati del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA ottenuti da campioni clinici è associata principalmente a una delle seguenti procedure o a una loro combinazione: prelievo dei campioni, preparazione dei campioni e procedura d'analisi. Dal momento che i risultati dei test confrontati erano stati ottenuti dallo stesso campione clinico (indicati come "tra campioni"), si è controllata la variabilità del disegno sperimentale dovuta al prelievo dei campioni. La riproducibilità dei

risultati (vedere la Tabella 40 seguente) ottenuti da 2 campioni preparati singolarmente dallo stesso campione clinico riflette la variazione dovuta alla preparazione dei campioni e alla procedura di analisi.

Tabella 40. Riproducibilità dei campioni in PreservCyt — preparazione dei campioni con il kit QIA Symphony DSP HPV Media; riproducibilità qualitativa tra campioni

Concordanza positiva (%) (n/N) IC 95%	Concordanza negativa (%) (n/N) IC 95%	Concordanza complessiva (%) (n/N) IC 95%
99,0 (95/96) 94,3-99,8	96,4 (161/167) 92,4-98,3	97,3 (256/263) 94,6-98,7

È stato condotto un ulteriore studio per valutare la riproducibilità dei risultati utilizzando campioni in soluzione PreservCyt simulati. Dopo la preparazione dei campioni con il kit QIA Symphony DSP HPV Media è stato eseguito il test RCS automatizzato utilizzando il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Gli 8 membri positivi del pannello sono stati preparati aggiungendo cellule SiHa o HeLa positive al DNA di HPV- a cellule C-33 A negative al DNA di HPV- in soluzione PreservCyt, mentre i 2 membri del pannello negativi al DNA di HPV- contenevano solo cellule C-33 A negative al DNA di HPV-.

Tre diversi operatori hanno eseguito i test lo stesso giorno utilizzando tre diversi strumenti QIA Symphony SP e tre diversi kit QIA Symphony DSP HPV Media con membri del pannello 2N, 3E, 5P, 7P e 9P. I membri del pannello 2N, 3E, 5P e 7P sono stati analizzati con 18 replicati in 3 diverse sessioni, che hanno prodotto 54 punti dati per ogni membro del campione. Il membro del pannello 9P è stato analizzato con 16 replicati in 3 diverse sessioni, che hanno prodotto 48 punti dati.

Un operatore ha eseguito il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA in tre diversi giorni utilizzando tre diversi strumenti QIA Symphony SP e un lotto del kit QIA Symphony DSP HPV Media con i membri del pannello 1N, 4E, 6P, 8P e

10P. I membri del pannello 1N, 4E, 6P e 8P sono stati analizzati con 18 replicati in 8 diverse sessioni, che hanno prodotto 144 punti dati per ogni membro del campione. Il membro del pannello 10P è stato analizzato con 16 replicati in 8 diverse sessioni, che hanno prodotto 128 punti dati.

Per i membri del pannello con una media RLU/CO del 20% o più al di sopra del valore soglia, 572 su 572 (100,0%) sono risultati positivi. Per i membri del pannello con una media RLU/CO entro il 20% al di sopra o al di sotto del valore soglia, 98 su 198 (49,5%) sono risultati positivi e 100 su 198 (50,5%) negativi. Per i membri del pannello con una media RLU/CO del 20% o più al di sotto del valore soglia, 198 su 198 (100,0%) sono risultati negativi (vedere la Tabella 41 seguente).

Tabella 41. Riproducibilità dei campioni in soluzione PreservCyt – preparazione dei campioni con il kit QIA Symphony DSP HPV Media; riproducibilità qualitativa

Membro del pannello	Tipo di cellula	Media RLU/CO	Deviazione standard	Risultato test positivo (%) (n/N)
1N	C-33 A	0,37	0,05	0 (0/144)
2N	C-33 A	0,41	0,06	0 (0/54)
3E	HeLa e C-33 A	0,81	0,11	6 (3/54)
4E	SiHa e C-33 A	1,09	0,18	66 (95/144)
5P	HeLa e C-33 A	3,17	0,46	100 (54/54)
6P	SiHa e C-33 A	4,81	0,74	100 (144/144)
7P	HeLa e C-33 A	6,77	0,97	100 (54/54)
8P	SiHa e C-33 A	9,41	1,39	100 (144/144)
9P	HeLa e C-33 A	13,72	2,81	100 (48/48)
10P	SiHa e C-33 A	28,13	5,08	100 (128/128)

I risultati indicano che è prevedibile che i campioni che si discostano del 20% o più dal valore soglia diano risultati coerenti. I campioni vicini al valore soglia

hanno prodotto un numero pressoché uguale di risultati positivi e negativi. Questi dati dimostrano che la preparazione di campioni in soluzione PreservCyt con il kit QIAasymphony DSP HPV Media seguita da analisi con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA fornisce risultati riproducibili.

I risultati dello studio interno sono stati inoltre utilizzati per valutare la riproducibilità quantitativa dei risultati ottenuti con la preparazione dei campioni in soluzione PreservCyt utilizzando il kit QIAasymphony DSP HPV Media (vedere la Tabella 42 e la Tabella 43 seguenti).

Tabella 42. Riproducibilità dei campioni in soluzione PreservCyt – preparazione dei campioni con il kit QIAasymphony DSP HPV Media; riproducibilità quantitativa con lo stesso operatore

Membro del pannello	n	Media RLU/CO	Deviazione standard			Deviazione standard totale stimata	CV totale stimato (%)
			Intra-sessione	Inter-sessione	Tra combinazioni*		
1N	144	0,37	0,04	0,03	0,03	0,06	14,92
4E	144	1,09	0,12	0,11	0,09	0,19	17,24
6P	144	4,81	0,49	0,40	0,42	0,77	15,92
8P	144	9,41	0,96	0,97	0,46	1,44	15,32
10P	128	28,13	4,00	2,04	2,54	5,16	18,35

*Tra combinazioni di strumenti QIAasymphony SP e diversi giorni.

Tabella 43. Riproducibilità dei campioni in soluzione PreservCyt – preparazione dei campioni con il kit QIASymphony DSP HPV Media; riproducibilità quantitativa nello stesso giorno

Membro del pannello	n	Media RLU/CO	Deviazione standard		Deviazione standard totale stimata	CV totale stimato (%)
			Intra-sessione	Inter-sessione*		
2N	54	0,41	0,04	0,05	0,06	15,86
3E	54	0,81	0,08	0,08	0,12	14,48
5P	54	3,17	0,38	0,33	0,50	15,72
7P	54	6,77	0,92	0,38	1,00	14,73
9P	48	13,72	2,64	1,15	2,88	21,01

*Una sessione è costituita da una combinazione di un kit QIASymphony DSP HPV Media, uno strumento QIASymphony SP e un operatore.

La riproducibilità quantitativa è molto elevata, come indicato da tutti i valori CV che rimangono al di sotto del 25%. Le deviazioni standard inter-sessione sono confrontabili al corrispondente valore intra-sessione, il che indica risultati coerenti a prescindere allo strumento o dal lotto del kit utilizzato.

Preparazione dei campioni con il kit QIASymphony DSP AXpH DNA. È stato condotto uno studio interno sulla preparazione dei campioni con il kit QIASymphony DSP AXpH DNA utilizzando campioni clinici in soluzione PreservCyt ottenuti da donne con risultato citologico ASC-US o NILM. Sono stati eseguiti due prelievi su ogni campione. Ogni campione è stato preparato singolarmente utilizzando il kit QIASymphony DSP AXpH DNA e i risultati sono stati determinati mediante metodica RCS automatizzata con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Come per altri test qualitativi di diagnostica in vitro, la variabilità dei risultati del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA ottenuti da campioni clinici è associata principalmente a una delle seguenti procedure o a una loro combinazione: prelievo dei campioni, preparazione dei campioni e procedura d'analisi. Dal momento che i risultati dei test confrontati erano stati ottenuti dallo stesso campione clinico (indicati come "tra campioni"), è stata controllata la variabilità del disegno sperimentale dovuta al prelievo dei campioni. La riproducibilità dei risultati (vedere la Tabella 44 seguente) ottenuti da 2 campioni preparati

singolarmente dallo stesso campione clinico riflette la variazione dovuta alla preparazione dei campioni e alla procedura di analisi.

Tabella 44. Riproducibilità dei campioni in soluzione PreservCyt – preparazione dei campioni con il kit QIAasymphony DSP AXpH DNA; riproducibilità qualitativa tra campioni

Concordanza positiva (%) (n/N) IC 95%	Concordanza negativa (%) (n/N) IC 95%	Concordanza complessiva (%) (n/N) IC 95%
95,3	96,7	96,2
(101/106)	(176/182)	(277/288)
89,4–98,0	92,3–98,5	93,3–97,9

È stato condotto un ulteriore studio per valutare la riproducibilità dei risultati utilizzando campioni in PreservCyt simulati. La preparazione dei campioni con il kit QIAasymphony DSP AXpH DNA è stata seguita da test RCS automatizzati con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Tre diversi operatori hanno eseguito il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA in giorni diversi utilizzando strumenti e lotti di reagenti diversi con un pannello di 9 membri. Ciascun membro è stato analizzato in modo duplice in 24 sessioni diverse, che hanno prodotto 48 punti dati per ognuno di essi. Gli 8 membri positivi del pannello sono stati preparati aggiungendo cellule HeLa o SiHa positive al DNA dell'HPV a cellule H9 negative al DNA dell'HPV in soluzione PreservCyt, mentre il membro negativo al DNA dell'HPV conteneva soltanto cellule H9 negative al DNA dell'HPV.

Per i membri del pannello con una media RLU/CO del 20% o più al di sopra del CO, 237 su 240 (98,8%) sono risultati positivi. Per i membri del pannello con una media RLU/CO entro il 20% al di sopra o al di sotto del CO, 95 su 144 (66,0%) sono risultati positivi e 49 su 144 (34,0%) negativi. Per i membri del pannello con una media RLU/CO del 20% o più al di sotto del CO, 48 su 48 (100,0%) sono risultati negativi (vedere la Tabella 45 seguente).

Tabella 45. Riproducibilità dei campioni in PreservCyt – preparazione dei campioni con il kit QIASymphony DSP AXpH DNA; riproducibilità qualitativa

Membro pannello	Tipo di cellula	Media RLU/CO	Deviazione standard	Risultato test positivo (%) (n/N)
1N	H9	0,17	0,03	0 (0/48)
2E	H9 e HeLa	1,00	0,16	56 (27/48)
3E	H9 e HeLa	1,16	0,57	54 (26/48)
4E	H9 e SiHa	1,18	0,23	88 (42/48)
5P	H9 e SiHa	1,89	0,20	100 (48/48)
6P	H9 e HeLa	2,05	0,43	96 (46/48)
7P	H9 e SiHa	2,97	0,45	100 (48/48)
8P	H9 e HeLa	5,67	0,61	100 (48/48)
9P	H9 e SiHa	9,91	1,63	98 (47/48)

I risultati indicano che è prevedibile che i campioni che si discostano del 20% o più dal CO diano risultati coerenti. I campioni vicini al CO hanno dato luogo a un numero pressoché uguale di risultati positivi e negativi. Questi dati dimostrano che la preparazione di campioni in PreservCyt con il kit QIASymphony DSP AXpH DNA seguita da analisi con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA fornisce risultati riproducibili.

I risultati dello studio interno sono stati inoltre utilizzati per valutare la riproducibilità quantitativa dei risultati ottenuti con la preparazione di campioni in PreservCyt con il kit QIA Symphony DSP AXpH DNA (vedere la Tabella 46 seguente).

Tabella 46. Riproducibilità dei campioni in PreservCyt — preparazione dei campioni con il kit QIA Symphony DSP AXpH DNA; riproducibilità quantitativa

Membro pannello	n	Media RLU/CO	Deviazione standard			Deviazione standard totale stimata	CV totale stimato (%)
			Intra-sessione	Inter-sessione	Tra combinazioni*		
1N	48	0,17	0,02	0,02	0,01	0,03	18,13
2E	48	1,00	0,14	0,05	0,06	0,16	16,20
3E	48	1,16	0,48	0,22	0,23	0,57	49,27
4E	48	1,18	0,16	0,14	0,10	0,23	19,63
5P	48	1,89	0,09	0,09	0,16	0,20	10,63
6P	48	2,05	0,18	0,34	0,19	0,43	20,83
7P	48	2,97	0,27	0,23	0,28	0,45	15,14
8P	48	5,67	0,35	0,44	0,24	0,61	10,85
9P	48	9,91	1,36	0,55	0,71	1,63	16,42

*Tra combinazioni di kit del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, kit QIA Symphony DSP AXpH DNA, RCS utilizzato, QIA Symphony SP utilizzato e operatore.

Riproducibilità di campioni clinici SurePath

Test manuali. La riproducibilità dei test manuali su campioni SurePath eseguiti con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA è stata determinata in uno studio condotto utilizzando 3 diversi laboratori. I campioni sono stati analizzati utilizzando un valore soglia pari a 1,0 RLU/CO in giorni diversi e con diverse sessioni, impiegando un insieme di campioni identico di stato HPV positivo o negativo noto. Il pannello del campione di riproducibilità era formato da 5 campioni positivi, 2 campioni altamente negativi/debolmente positivi e 5 campioni negativi.

Ogni membro del pannello è stato preparato combinando campioni clinici univoci prelevati nel fluido conservante SurePath con uno stato HPV negativo e positivo noto, allo scopo di ottenere i valori RLU/CO bersaglio desiderati. Ogni membro del pannello è stato testato in modo duplice, due volte al giorno per un

periodo di 5 giorni presso ognuno dei 3 laboratori partecipanti (vedere la Tabella 47 seguente).

Tabella 47. Riproducibilità dei campioni SurePath – test manuali; riproducibilità qualitativa

Membro pannello	Media RLU/CO	Risultato test positivo (%) (n/N)
1	0,20	0,0 (0/60)
2	0,21	0,0 (0/60)
3	0,22	0,0 (0/60)
4	0,28	3,3 (2/60)
5	0,36	3,3 (2/60)
6	0,83	21,7 (13/60)
7	1,17	43,3 (26/60)
8	19,47	100,0 (60/60)
9	25,65	100,0 (60/60)
10	81,52	100,0 (60/60)
11	154,18	100,0 (60/60)
12	765,29	100,0 (60/60)

Test RCS automatizzati. La riproducibilità dei risultati dei campioni SurePath ottenuti utilizzando i test RCS automatizzati è stata confrontata con i risultati ottenuti con i test manuali. Sono state analizzate due aliquote separate ottenute dallo stesso campione trattato (vedere la Tabella 48 seguente).

Tabella 48. Riproducibilità dei campioni in SurePath — test RCS automatizzati; concordanza tra i risultati dei test RCS automatizzati e dei test manuali

Concordanza positiva (%) (n/N) IC 95%		Concordanza negativa (%) (n/N) IC 95%	
Tutti positivi	Sottoinsieme positivo alto (RLU/CO $\geq 2,5$)	Tutti negativi	Sottoinsieme negativo alto (RLU/CO $< 0,80$)
99,0	100,0	97,7	98,7
417/421	375/375	1.057/1.079	1.050/1.064
97,6–99,7	99,0–100,0	96,9–98,7	97,8–99,28

Reattività crociata

È stato analizzato un pannello di batteri, virus e plasmidi normalmente presenti nel tratto anogenitale femminile, oltre a una serie di tipi di HPV a tropismo cutaneo per cui erano disponibili cloni, al fine di determinare se si sarebbe verificata una reattività crociata con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Tutti i microrganismi sono stati analizzati a concentrazioni comprese tra 1×10^5 e 1×10^7 organismi per ml. I DNA purificati di virus e plasmidi sono stati analizzati a una concentrazione di 4 ng/ml.

Segue un elenco dei batteri analizzati. Il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA è risultato negativo per tutti i batteri:

- *Acinetobacter anitratus*
- *Acinetobacter lwoffii* (ATCC 17908)
- *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285)

- *Bacteroides melaninogenicus*
- *Candida albicans* (ATCC 14053 o 10231)
- *Chlamydia trachomatis*
- *Enterobacter cloacae*
- *Escherichia coli* (HB101)*
- *Escherichia coli*
- *Fusobacterium nucleatum*
- *Gardnerella vaginalis*
- *Haemophilus ducreyi*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Lactobacillus acidophilus*
- *Mobiluncus curtisii*
- *Mobiluncus mulieris*
- *Mycoplasma hominis*
- *Mycoplasma hyorhinis*
- *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC 19424)
- *Neisseria lactamica* (NRL 2118)
- *Neisseria meningitidis* (ATCC 13077)
- *Neisseria sicca* (ATCC 29256)
- *Peptostreptococcus anaerobius*
- *Proteus vulgaris* (ATCC 21117, 8427, 33420)
- *Serratia marcescens*
- *Staphylococcus aureus* (catena di Cowan)
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus faecalis* (ATCC 14508)

* Sono stati analizzati sia la catena dell'*E. coli* utilizzata per la coltura di plasmidi (HB101), sia un isolato clinico dell'*E. coli*.

- *Streptococcus pyogenes* (ATCC 27762)
- *Treponema pallidum*
- *Trichomonas vaginalis*
- *Ureaplasma urealyticum*

Segue un elenco del DNA virale o plasmidico o del siero umano analizzato. Il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA è risultato negativo per tutti:

- Adenovirus 2
- Citomegalovirus
- Virus di Epstein-Barr
- Antigene di superficie del virus dell'epatite B
- Herpes simplex I
- Herpes simplex II
- Virus dell'immunodeficienza umana (HIV, DNA RT)
- Tipi di HPV 1, 2, 3, 4, 5, 8, 13 e 30
- Simian virus 40 (SV40)

Il solo plasmide che ha mostrato una reattività crociata nel test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA è stato il pBR322. La reattività crociata tra il pBR322 e la miscela della sonda non è inattesa in quanto è difficile rimuovere tutti i vettori del DNA del pBR322 quando si isola l'inserto HPV. È stata osservata la presenza di sequenze omologhe di pBR322 in campioni genitali umani e potrebbero verificarsi falsi positivi in presenza di livelli elevati di plasmide batterico. Tuttavia, su 298 campioni clinici risultati positivi con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, è stato dimostrato che nessun risultato positivo era dovuto al pBR322 dopo l'analisi con una sonda per il pBR322. Pertanto, la probabilità che si verifichi un falso positivo dovuto a sequenze omologhe di pBR322 con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, effettuato su campioni clinici, sembra essere bassa.

Ibridazione crociata

Diciotto tipi diversi di HPV (ad alto e basso rischio) sono stati analizzati con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA a concentrazioni di 4 ng/ml di DNA dell'HPV. Tutti i bersagli dell'HPV ad alto rischio sono risultati positivi. Questo studio ha inoltre dimostrato che l'ibridazione crociata tra i tipi di HPV 6 e 42 e il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA è molto contenuta. I campioni delle pazienti contenenti elevati livelli (4 ng/ml o più) dei tipi dell'HPV 6 o 42 possono dare luogo a falsi positivi con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Il significato clinico di questo è che le pazienti con 4 ng/ml o più dei tipi dell'HPV 6 o 42 possono essere candidate alla colposcopia, nonostante ciò non sia necessario.

Inoltre, è stato osservato che il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA manifesta una reattività crociata con i tipi di HPV 40, 53 e 66. Questi tipi sono rari e non vi sono prove a sufficienza per stabilire l'esatta correlazione tra l'infezione da HPV di questi tipi e lo sviluppo di una neoplasia grave (15). È stato inoltre documentato nella letteratura che miscele di sonde complesse, simili a quella utilizzata in questo test, possono dare luogo a falsi positivi a causa dell'ibridazione crociata con i tipi di HPV 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 o MM9 (35). Sebbene alcuni di questi tipi di HPV siano rari o nuovi, non riscontrati spesso in presenza di neoplasie gravi, le pazienti i cui campioni contengono elevati livelli di questi tipi di DNA dell'HPV possono essere erroneamente candidate alla colposcopia.

Effetto del sangue e di altre sostanze sui campioni in STM

È stato valutato l'effetto del sangue e di altre sostanze potenzialmente interferenti, definite o non definite, sul test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Sangue intero, lavande vaginali, pomate antifungine e spermicidi (agenti che sovente vengono riscontrati nei campioni cervicali) sono stati aggiunti a campioni in STM negativi e positivi (pool di campioni clinici e campioni non clinici) a concentrazioni che si possono riscontrare nei campioni cervicali.

Non sono stati osservati falsi positivi con nessuno dei quattro agenti a qualunque concentrazione. È tuttavia possibile ottenere un falso negativo su campioni clinici con livelli di DNA dell'HPV vicini a quelli del valore soglia per il test (1 pg/ml), se sono presenti concentrazioni elevate di pomate antifungine

o spermicidi. È in ogni caso estremamente improbabile che un campione clinico sia costituito per la quasi totalità da una di queste sostanze, dato che di routine la cervice viene pulita prima di prelevare i campioni per il Pap test e per il test dell'HPV.

Effetto del sangue e di altre sostanze sui campioni in soluzione PreservCyt

Preparazione manuale dei campioni

È stato valutato l'effetto del sangue e di altre sostanze potenzialmente interferenti, definite o non definite, che possono essere presenti nei campioni in soluzione PreservCyt, sul test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Sangue intero, lavande vaginali, pomate antifungine e spermicidi (agenti che sovente vengono riscontrati nei campioni cervicali) sono stati aggiunti a pool di campioni in soluzione PreservCyt negativi e positivi a concentrazioni che si possono riscontrare nei campioni cervicali. Non sono stati osservati falsi positivi o falsi negativi con nessuno dei quattro agenti a qualunque concentrazione. Inoltre, le sostanze intrinseche in alcuni campioni clinici non impediscono la rilevazione del DNA dell'HPV da parte del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Preparazione dei campioni con il kit QIAasymphony DSP HPV Media

Sono stati valutati gli effetti del sangue e di altre sostanze potenzialmente interferenti nei campioni in soluzione PreservCyt utilizzando il kit QIAasymphony DSP HPV Media per la preparazione dei campioni e la metodica RCS automatizzata con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Sono stati analizzati gli effetti delle seguenti sostanze potenzialmente interferenti:

- Pomata antifungina
- Crema antinfiammatoria
- Sangue
- Gel spermicida
- Lavanda vaginale
- Supposte deodoranti femminili
- Gel lubrificante

Ciascuna sostanza è stata aggiunta a pool di cellule negative e positive. Non sono stati osservati falsi positivi o falsi negativi con nessuna delle sostanze a concentrazioni normalmente presenti nei campioni cervicali. È tuttavia possibile ottenere un falso negativo su campioni clinici con livelli di DNA di HPV vicini a quelli del valore soglia per il test, se sono presenti concentrazioni elevate di pomate antifungine, gel vaginali lubrificanti o sangue. È in ogni caso estremamente improbabile che un campione clinico sia costituito per la quasi totalità da una di queste sostanze, dato che di routine la cervice viene pulita prima di prelevare i campioni per il Pap test e per il test dell'HPV.

Preparazione dei campioni con il kit QIAasymphony DSP AXpH DNA

È stato valutato l'effetto del sangue intero su campioni in PreservCyt utilizzando il kit QIAasymphony DSP AXpH DNA per la preparazione dei campioni e il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA per l'analisi. Sono stati selezionati e analizzati campioni clinici contenenti sangue visibile, utilizzando sia la metodica di preparazione dei campioni manuale sia la metodica automatizzata con il kit QIAasymphony DSP AXpH DNA. I risultati, confrontati su 238 campioni, hanno dato luogo a una concordanza totale del 94,12% e un valore p del test di McNemar pari a 0,2850, a indicare che non esiste nessuna differenza statisticamente significativa tra le prestazioni cliniche della metodica di preparazione manuale e la metodica di preparazione automatizzata dei campioni con il kit QIAasymphony DSP AXpH DNA.

Sono stati analizzati gli effetti delle seguenti sostanze potenzialmente interferenti:

- Lavanda vaginale
- Pomata antifungina
- Gel spermicida
- Cellule mononucleari di sangue periferico (PBMC)
- Gel lubrificante
- Spray vaginale
- Spermicida

- Particelle magnetiche
- Liquido TopElute

Ogni sostanza è stata aggiunta a pool di cellule negative e positive a concentrazioni che si possono riscontrare in campioni cervicali o possono essere aggiunte durante la preparazione dei campioni. Non sono stati osservati falsi positivi con nessuna delle sostanze a qualunque concentrazione. Non sono stati osservati falsi negativi, ad esclusione dello spermicida. Non si devono pertanto prelevare campioni cervicali in PreservCyt per la preparazione automatizzata dei campioni con il kit QIA Symphony DSP AXpH DNA in presenza di gel spermicidi.

Carryover

Il sistema RCS è stato progettato per ridurre al minimo la contaminazione o il carryover dei campioni da parte della fosfatasi alcalina residua attraverso l'uso di puntali per pipetta monouso per l'aspirazione di reagenti e campioni. Per verificare queste caratteristiche di progettazione, QIAGEN ha condotto alcuni studi per valutare se l'utilizzo del sistema RCS ha aumentato il potenziale di carryover o di contaminazione crociata dei campioni rispetto al metodo manuale. Sono stati utilizzati strumenti RCS multipli per valutare il potenziale carryover da un sistema all'altro.

In uno studio, 2 ng e 20 ng di DNA plasmidico dell'HPV sono stati aggiunti al controllo negativo per preparare campioni in STM altamente positivi. La concentrazione di 20 ng/ml ha dato luogo a valori RLU circa 3–5 volte più elevati di quelli del campione clinico con positività più alta, che si prevede saranno riscontrati durante i test clinici di routine. Questi campioni simulati altamente positivi sono stati collocati sull'intera micropiastra in un modello a scacchiera, in posizioni alternate con pozzetti contenenti soltanto il controllo negativo (pozzetti di analisi). Questa configurazione tiene conto dei potenziali effetti aggiuntivi dei campioni sequenziali altamente positivi. Le micropiastre sono state poi analizzate utilizzando sia la metodica dei test manuali sia quella dei test RCS automatizzati. Dopo l'elaborazione, si è confrontato il numero di pozzetti d'analisi falsi positivi. Con questi campioni in STM simulati, i test RCS automatizzati non hanno dato luogo a un numero di pozzetti falsi positivi superiore a quello dei test manuali, anche quando la micropiastra conteneva una sequenza estremamente alta di campioni positivi.

Nel corso di una seconda valutazione del carryover, i campioni in PreservCyt delle pazienti positive all'HPV sono stati uniti, creando un pannello di campioni con livelli diversi di chemiluminescenza, al fine di ottenere valori RLU/CO rappresentativi della gamma prevista durante i test clinici RCS automatizzati eseguiti di routine. I campioni positivi variavano all'incirca da 200 a 1800 RLU/CO. Per valutare il potenziale di carryover, tra cui i possibili effetti aggiuntivi di campioni sequenziali altamente positivi, questi membri positivi del pannello sono stati collocati su micropiastre in un modello a scacchiera, accanto ai pozzetti di controllo negativi. Queste piastre sono state poi analizzate utilizzando la metodica dei test RCS automatizzati.

I risultati di questa valutazione del carryover, utilizzando campioni di pazienti in pool, suggerisce un potenziale tasso di falsi positivi dello 0,3% dovuto agli effetti di carryover quando si eseguono test RCS automatizzati con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

L'esperienza di QIAGEN nella conduzione di test con campioni in soluzione PreservCyt in pool suggerisce che l'unione dei campioni in PreservCyt delle pazienti crea campioni che non presentano caratteristiche simili ai singoli campioni delle pazienti stesse. Sebbene gli effetti di questa unione sul possibile carryover dei test RCS automatizzati siano sconosciuti, ulteriori analisi precliniche dei test RCS automatizzati non hanno indicato nessun aumento del potenziale di falsi positivi dovuti al carryover. Tali valutazioni sono state condotte utilizzando campioni di plasmidi artificiali con concentrazioni di DNA quasi 5 volte superiori a quelle osservate in ambito clinico.

In una terza valutazione del carryover sono stati creati campioni di prova aggiungendo un fluorocromo, in concentrazioni rappresentative dell'intervallo dinamico dei valori RLU del dosaggio, a matrici di fondo prossime alla viscosità dei campioni clinici e dei reagenti del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Questi campioni di prova sono poi stati trattati utilizzando 3 strumenti RCS separati ed è stato valutato il potenziale di carryover di ciascuna delle seguenti fondamentali fasi procedurali del sistema RCS:

- Trasferimento dei campioni
- Trasferimento da una piastra all'altra
- Aggiunta della sonda

- Agitazione delle micropiastre
- Lavaggio delle micropiastre

La fluorescenza risultante, misurata ad una lunghezza d'onda d'eccitazione di 485 nm e una lunghezza d'onda d'emissione di 535 nm, è risultata sufficientemente sensibile per rilevare un evento di carryover nell'ordine di 1:20.000, corrispondente a un falso positivo con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (vale a dire, 1 pg in 20 ng). I risultati di questa valutazione non hanno evidenziato nessun evento di carryover durante una qualsiasi delle fasi procedurali fondamentali del sistema RCS che risulterebbe in un falso positivo del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Stabilità on board dei reagenti

QIAGEN ha valutato le caratteristiche dei test RCS automatizzati quando si utilizzano reagenti che rimangono sulla piattaforma del sistema per periodi di tempo prolungati. Tra i reagenti destinati con maggiori probabilità a rimanere sullo strumento per periodi di tempo prolungati figurano la miscela della sonda, il DR1, il DR2, e la micropiastre di cattura.

Sono state valutate le prestazioni del test utilizzando sia reagenti appena preparati, sia reagenti lasciati invecchiare sullo strumento RCS a temperatura ambiente per un periodo di 16 ore (per simulare 2 turni di lavoro nel laboratorio). Sono stati analizzati campioni clinici simulati utilizzando 2 strumenti RCS in ognuno dei 2 giorni d'analisi con una matrice di reagenti definita (vedere la Tabella 49 seguente).

Tabella 49. Disegno dello studio relativo alla stabilità on board dei reagenti

Strumento RCS	Giorno 1	Giorno 2
1	Reagenti invecchiati	Reagenti appena preparati
2	Reagenti appena preparati	Reagenti invecchiati

Nella Figura 3 seguente è riportato un grafico di tutti i punti dati RLU/CO. Il grafico e l'analisi di regressione dei reagenti invecchiati rispetto ai reagenti appena preparati indicano la concordanza tra tali reagenti.

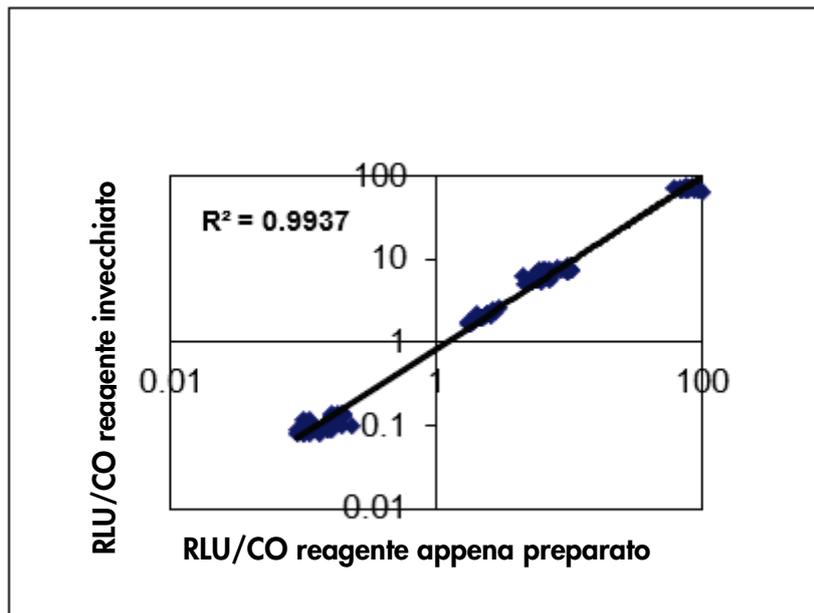


Figura 3. Grafico di dispersione per il confronto tra il calibratore di dosaggio e i valori di controllo utilizzando reagenti invecchiati e appena preparati.

Da un ulteriore esame dei risultati della concordanza emerge che nessun risultato qualitativo è cambiato utilizzando reagenti invecchiati (vedere la Tabella 50 seguente).

Tabella 50. Concordanza tra reagenti appena preparati e reagenti invecchiati

Misura statistica	Risultato
Concordanza complessiva (%)	100,0
(n/N)	(96/96)
IC 95%	97,97–100,0
Concordanza positiva (%)	100,0
(n/N)	(64/64)
IC 95%	97,97–100,0
Concordanza negativa (%)	100,0
(n/N)	(32/32)
IC 95%	97,97–100
R ²	0,9937
Pendenza	0,97
Intercept	0,47
Kappa	1,0

L'analisi dei dati mostra risultati statisticamente identici per entrambi i reagenti (appena preparati e invecchiati), a indicare che i reagenti sono sufficientemente stabili se collocati sullo strumento per un periodo di tempo fino a 16 ore.

Riferimenti bibliografici

QIAGEN possiede un'ampia banca dati online continuamente aggiornata con le pubblicazioni scientifiche riguardanti i prodotti QIAGEN. Le opzioni di ricerca specifiche consentono di trovare gli articoli necessari sia tramite parole chiave sia specificando l'applicazione, l'area di ricerca, il titolo ecc.

Per un elenco bibliografico completo, visitare il sito QIAGEN Reference Database all'indirizzo www.qiagen.com/RefDB/search.asp oppure contattare il centro di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale.

Riferimenti citati

1. Broker, T. R. and Botchan, M. (1986) Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. In: Botchan, M., Grodzicker, T., and Sharp, P., eds. *DNA Tumor Viruses: Control of Gene Expression and Replication*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 17-36. From the 1985 Cancer Cells Conference at Cold Spring Harbor.
2. Lorincz, A.T. and Reid, R. (1989) Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **1**, 123.
3. Jenson, A.B., Kurman, R.J., and Lancaster, W.D. (1984) Human papillomaviruses. In: Belshe, R.B. *Textbook of Human Virology*. Littleton, MA: PSG-Wright, p 951.
4. Becker, T.M., Stone, K.M., and Alexander, E.R. (1987) Genital human papillomavirus infection: a growing concern. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **14(2)**, 389.
5. McCance, D.J., Walker, P.G., Dyson, J.L., Coleman, D.V., and Singer, A. (1983) Presence of human papillomavirus DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia. *Br. Med. J.* **287**, 784.
6. Naghashfar, Z. et. al. (1985) Identification of genital tract papillomaviruses HPV-6 and HPV-16 in warts of the oral cavity. *J. Med. Virol.* **17**, 313.
7. Gissmann, L., Wolnik, L., Ikenberg, H., Koldovsky, U., Schnurch, H.G., and zur Hausen, H. (1983) Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 560.
8. Munoz, N., Bosch, F.X., Shah, K.V., and Meheus, A., eds. (1992) *IARC Scientific Publications no. 119: The Epidemiology of Cervical Cancer and*

Human Papillomavirus. Lyon, France:International Agency for Research on Cancer.

9. Reid, R. et al. (1987) Sexually transmitted papillomaviral infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **156(1)**, 212.
10. Fuchs, P.G., Girardi, F., and Pfister, H. (1988) Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int. J. Cancer* **41**, 41.
11. Lorincz, A.T., Temple, G.F., Kurman, R.J., Jenson, A.B., and Lancaster, W.D. (1987) Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* **79(4)**, 671.
12. Lorincz, A.T., Lancaster, W.D., and Temple, G.F. (1986) Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J. Virol.* **58(1)**, 225.
13. Beaudenon, S., Kremsdorf, D., Croissant, O., Jablonska, S., Wain-Hobson, S., and Orth, G. (1986) A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* **321**, 246.
14. Lorincz, A.T., Quinn, A.P., Lancaster, W.D., and Temple, G.F. (1987) A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* **159**, 187.
15. Meyer, T. et al., (1998) Association of rare human papillomavirus types with genital premalignant and malignant lesions. *J. Infect. Dis.* **178(1)**, 252.
16. Lorincz, A.T., Reid, R., Jenson, A.B., Greenberg, M.D., Lancaster, W., and Kurman, R.J. (1992) Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* **79**, 328.
17. Longuet, M., Beaudenon, S., and Orth, G. (1996) Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39. *J. Clin. Microbiol.* **34(3)**, 738.
18. Naghashfar, Z.S., Rosenshein, N.B., Lorincz, A.T., Buscema, J., and Shah, K.V. (1987) Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18 related virus of the genital tract. *J. Gen. Virol.* **68**, 3073.
19. Nuovo, G.J., Crum, C.P., de Villiers, E.M., Levine, R.U., and Silverstein, S.J. (1988) Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J. Virol.* **62(4)**, 1452.

20. Shimoda, K., Lorincz, A.T., Temple, G.F., and Lancaster, W.D. (1988) Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J. Gen. Virol.* **69**, 2925.
21. Lorincz, A.T., Quinn, A.P., Goldsborough, M.D., McAllister, P., and Temple, G.F. (1989) Human papillomavirus type 56: a new virus detected in cervical cancers. *J. Gen. Virol.* **70**, 3099.
22. Lorincz, A.T., Quinn, A.P., Goldsborough, M.D., Schmidt, B.J., and Temple, G.F. (1989) Cloning and partial DNA sequencing of two new human papillomavirus types associated with condylomas and low-grade cervical neoplasia. *J. Virol.* **63(6)**, 2829.
23. Beaudenon, S. et al. (1987) Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology* **161**, 374.
24. Schiffman, M. (1993) Latest HPV findings: some clinical implications. *Contemp. Ob. Gyn.* **38(10)**, 27.
25. Volpers, C.; and Streeck, R.E. (1991) Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 39. *Virology* **181**, 419.
26. Matsukura, T., and Sugase, M. (1990) Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virology* **177**, 833.
27. Rho, J., Roy-Burman, A., Kim, H., de Villiers, E.M., Matsukura, T., and Choe, J. (1994) Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. *Virology* **203**, 158.
28. Bosch, F.X. et al. (1995) International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* **87(11)**, 796.
29. Kahn, T., Schwarz, E., and zur Hausen, H. (1986) Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* **51**, 61.
30. Koutsky, L.A. et al. (1992) A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N. Engl. J. Med.* **327**, 1272.
31. Nieminen, P., Aho, M., Vesterinen, E., Stellato, G., Vaheri, A., Soares, V.R.X., Paavonen, J. (1991) Natural history of HPV infection: preliminary results of a cohort study [abstract]. In: 1991 Papillomavirus Workshop. Seattle, WA p 77.

32. Centers for Disease Control (1987) Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **36(Suppl 2)**, 3S.
33. Sehulster, L.M., Hollinger, F.B., Dreesman, G.R., and Melnick, J.L. (1981) Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **42(5)**, 762.
34. Martin, L.S., McDougal, J.S., and Loskoski, S.L. (1985) Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J. Infect. Dis.* **152(2)**, 400.
35. Vernon, S.D., Unger, E.R., and Williams, D. (2000) Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture. *J. Clin. Microbiol.* **38(2)**, 651.
36. Coleman, D. et al. (1993) European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Europe against cancer programme. *Eur. J. Cancer* **29A(Suppl. 4)**, S1.
37. Lorincz, A.T., Schiffman, M.H., Jaffurs, W.J., Marlow, J., Quinn, A.P., and Temple, G.F. (1990) Temporal associations of human papillomavirus infection with cervical cytologic abnormalities. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **162(3)**, 645.
38. Morrison, E.A.B. et al. (1991) Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int. J. Cancer* **49**, 6.
39. Wheeler, C.M., Stewart, A.M., Gravitt, P.E., and Cheng, S. (1995) Generation of entire human papillomavirus genomes by long PCR: frequency of errors produced during amplification. *Genome Res.* **5(1)**, 79.
40. Burk R.D. et al. (1996) Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex. Transm. Dis.* **23(4)**, 333.

Simboli

Nelle presenti istruzioni per l'uso sono utilizzati i seguenti simboli:

Simbolo	Definizione
 96	Contenuto sufficiente per 96 test
	Dispositivo medico per diagnostica in vitro
	Numero di catalogo
	Produttore
	Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
	Data di scadenza
	Fare riferimento alle informazioni riportate nel manuale

Guida alla risoluzione dei problemi

Commenti e suggerimenti

Cambiamento di colore non corretto o non osservato durante la denaturazione.

- | | |
|------------------------------------|--|
| a) DNR non preparato correttamente | Verificare che il DNR contenga l'indicatore e sia di colore viola scuro. |
|------------------------------------|--|

Commenti e suggerimenti

- | | |
|--|--|
| b) DNR non aggiunto | Verificare che al campione sia stato aggiunto il DNR misurando il volume del campione (deve essere 1,5 ml). Se dal volume si evince che non è stato aggiunto il DNR, aggiungerlo correttamente, miscelare e procedere con il test se si osserva il cambiamento di colore corretto. |
| c) Il campione contiene sangue o altri materiali che mascherano il cambiamento di colore | Con questi tipi di campioni non è previsto l'esatto cambiamento di colore descritto; ciò non influisce negativamente sui risultati del test. |
| d) Il pH del campione potrebbe essere insolitamente acido | Se nessuna delle altre cause è pertinente, il campione potrebbe essere insolitamente acido e il cambiamento di colore previsto non avviene. Prelevare un nuovo campione prima di applicare acido acetico sulla cervice, poiché un pH non corretto del campione influisce negativamente sui risultati del test. |

Il controllo di qualità dà risultati non corretti.

- | | |
|--|--|
| a) È stato scelto un protocollo di dosaggio non corretto per il test | Se il protocollo di dosaggio non è corretto per il test da eseguire, occorre rileggere la micropiastra entro 30 minuti dall'aggiunta del DR2 con il protocollo corretto. |
| b) È stata invertita la posizione dei controlli QC1-LR e QC2-HR | Testare nuovamente i campioni. |
| c) È stata invertita la posizione di HRC e QC2-HR | Testare nuovamente. |

Commenti e suggerimenti

Cambiamento di colore non corretto o non osservato durante l'ibridazione.

- | | |
|--|--|
| a) Miscelazione inadeguata della miscela della sonda con i calibratori denaturati, i controlli di qualità e/o i campioni, oppure miscela della sonda non aggiunta o volume di reagente aggiunto non corretto | Agitare la micropiastra di ibridazione o il portaprovette contenente le microprovette per altri 2 minuti. Se vi sono microprovette o pozzetti della micropiastra che rimangono viola, aggiungere altri 25 µl della miscela della sonda corretta e miscelare bene. Se dopo l'aggiunta della miscela e la miscelazione non si ottiene il cambiamento di colore corretto e il campione non conteneva sangue o altri materiali, riesaminare il campione. |
| b) Il campione contiene sangue o altri materiali che mascherano il cambiamento di colore | Con questi tipi di campioni non è previsto l'esatto cambiamento di colore descritto; ciò non influisce negativamente sui risultati del test. |
| c) Campione in <1.000 µl di STM | Controllare il volume del campione originale. Il volume deve essere 1.425 µl ± 20 µl (dopo la rimozione del dosaggio di 75 µl per l'analisi). Se il volume è <1.425 µl, il campione originale conteneva <1.000 µl di STM. Procurarsi un nuovo campione. |

Il test non è conforme ai criteri di convalida del dosaggio. Nessun segnale osservato nei calibratori positivi, nei controlli di qualità o nei campioni.

- | | |
|--|--|
| a) Sonda non aggiunta al relativo diluente | Preparare la miscela della sonda come descritto nelle presenti istruzioni per l'uso. Etichettare le provette con cura. |
|--|--|

Commenti e suggerimenti

- b) Sonda contaminata da ribonucleasi durante la preparazione
- Per pipettare la sonda, utilizzare pipette con puntali dotati di barriera di contenimento dell'aerosol e indossare i guanti. Preparare la miscela della sonda in un contenitore sterile. Usare solo contenitori per reagente puliti, nuovi e monouso.
- c) Miscelazione inadeguata della miscela della sonda
- Dopo avere aggiunto la sonda all'apposito diluente, miscelare bene, agitando ad alta velocità per almeno 5 secondi. Deve formarsi un vortice visibile.
- d) Miscelazione inadeguata della miscela della sonda e del campione denaturato
- Dopo avere versato la miscela della sonda e il campione in ogni pozzetto microprovetta di ibridazione, agitare nel Rotary Shaker I impostato a 1.100 ± 100 giri/min per 3 ± 2 minuti. Controllare che la colorazione di ogni pozzetto della micropiastra o microprovetta sia passata da viola a giallo.
- e) Tempo o temperatura non corretti durante la fase di ibridazione
- Ibridare per 60 ± 5 minuti a $65 \pm 2^\circ\text{C}$. Controllare la temperatura del Microplate Heater I o del bagno d'acqua. Verificare che il Microplate Heater I o il bagno d'acqua siano atti a riscaldare i campioni alla temperatura corretta e che sia stato effettuato un preriscaldamento di 60 minuti prima dell'uso. Verificare che il livello dell'acqua sia adeguato per riscaldare i campioni alla temperatura corretta. I bagni d'acqua devono essere calibrati periodicamente.
- f) Miscelazione inadeguata durante la fase di cattura
- Agitare sul Rotary Shaker I per 60 ± 5 minuti a $20-25^\circ\text{C}$ come descritto nelle presenti istruzioni per l'uso. Verificare la velocità del Rotary Shaker I mediante calibrazione. (Consultare il *Rotary Shaker I Manuale dell'operatore*).

Commenti e suggerimenti

- | | |
|---|--|
| g) Quantità di DR1 non corretta o periodo di incubazione non rispettato | Pipettare 75 µl di DR1 in ogni pozzetto della micropiastra utilizzando un pipettatore a 8 canali. Incubare a 20–25°C per 30–45 minuti. |
| h) Quantità di DR2 non corretta o periodo di incubazione non rispettato | Pipettare 75 µl di DR2 in ogni pozzetto della micropiastra utilizzando un pipettatore a 8 canali. Incubare a 20–25°C per 15–30 minuti. |
| i) Guasto dello strumento DML o programmazione non corretta | Per ulteriori istruzioni consultare il manuale utente dello strumento DML applicabile e del relativo software, oppure contattare il centro di assistenza tecnica QIAGEN. |

Valori RLU elevati nei calibratori, nei controlli di qualità e/o nei campioni (≥200 RLU in molti o tutti i pozzetti della micropiastra). Il test potrebbe non essere conforme ai criteri di convalida del dosaggio.

- | | |
|---|--|
| a) DNR non aggiunto o volume di reagente aggiunto non corretto; oppure miscelazione inadeguata del DNR con i campioni, i calibratori o i controlli di qualità | Verificare che il pipettatore a ripetizione eroghi le quantità corrette prima di aggiungere il DNR. È essenziale utilizzare pipettatori calibrati. Aggiungere metà volume di DNR a ogni provetta e miscelare bene. Per evitare falsi positivi, accertarsi che il liquido bagni l'intera superficie interna della provetta. Calibratori, controlli di qualità e campioni dovrebbero assumere una colorazione viola dopo l'aggiunta del DNR. |
|---|--|

Commenti e suggerimenti

- | | |
|--|--|
| b) Leggera perdita nello strumento DML; sportello non sigillato; guarnizione dello sportello rotta | Controllare la lettura del rumore di fondo (misurazione dei dati non elaborati) dello strumento DML provando a leggere una micropiastra vuota. Una lettura superiore a 50 RLU indica l'esistenza di una lieve perdita. Per ulteriori istruzioni consultare il manuale utente dello strumento DML appropriato oppure contattare il centro di assistenza tecnica QIAGEN. |
| c) Contaminazione del DR2 o dei pozzetti della micropiastra di cattura da parte del DR1 o fosfatasi alcalina esogena | Vedere "Controllo della contaminazione del DR2", pagina 145. |
| d) Tampone di lavaggio contaminato | Vedere "Controllo della contaminazione del sistema di lavaggio e/o della sorgente d'acqua", pagina 145. |
| e) Automated Plate Washer contaminato | Vedere "Controllo della contaminazione del sistema di lavaggio e/o della sorgente d'acqua", pagina 145. |
| f) Lavaggio inadeguato dei pozzetti della micropiastra di cattura dopo l'incubazione del DR1 | Lavare bene i pozzetti della micropiastra di cattura con il tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare oppure utilizzare l'Automated Plate Washer. Dopo il lavaggio, nei pozzetti non devono essere presenti tracce visibili di liquido rosa residuo. Per istruzioni relative alla verifica della contaminazione o ai guasti, consultare il <i>Automated Plate Washer Manuale dell'operatore</i> . |

Commenti e suggerimenti

- g) Contaminazione dei pozzetti della micropiastra da parte del DR1 Verificare che tutte le superfici siano pulite e asciutte. Prestare attenzione quando si utilizza il DR1. Evitare gli aerosol.
- h) Asciugatura della soluzione di ibridazione nello stesso punto delle salviettine Kimtowels o equivalenti salviettine di carta prive di fibre Non asciugare su salviettine Kimtowels o equivalenti salviettine di carta prive di fibre già usate in precedenza.
- i) Utilizzo di salviettine non corrette per l'asciugatura Per l'asciugatura, utilizzare salviettine Kimtowels o equivalenti salviette di carta prive di fibre.

Rapporti PC/NC bassi o numero elevato (>20%) di campioni debolmente positivi con rapporti <2,0. Il test potrebbe non essere conforme ai criteri di convalida del dosaggio.

- a) Preparazione inadeguata del campione Aggiungere il volume corretto di DNR e miscelare bene, agitando. Per evitare falsi positivi, accertarsi che il liquido bagni l'intera superficie interna della provetta.
- Per i campioni in soluzione PreservCyt, verificare che la miscelazione sia stata corretta e che il precipitato cellulare sia tornato completamente in sospensione prima dell'incubazione per la denaturazione.
- Si dovrebbe osservare un netto cambiamento di colore da trasparente a viola scuro. Incubare a $65 \pm 2^\circ\text{C}$ per 45 ± 5 minuti.

Commenti e suggerimenti

- | | |
|--|---|
| b) Sonda non miscelata adeguatamente o quantità di sonda insufficiente aggiunta | Preparare la miscela della sonda come descritto. Miscelare bene, agitando e verificando che venga prodotto un vortice visibile. Per garantire la corretta dispensazione, la miscela della sonda deve essere aggiunta alle provette con un pipettatore a spostamento positivo o un pipettatore multicanale. |
| c) Aggiunta di un volume inadeguato di miscela della sonda in ogni pozzetto o microprovetta di ibridazione | Verificare che il pipettatore a 8 canali eroghi le quantità corrette prima di aggiungere la miscela della sonda. Aggiungere 25 µl di miscela in ogni microprovetta o pozzetto della micropiastra contenente calibratori, controlli di qualità e campioni denaturati. Dopo l'aggiunta e la completa miscelazione, dovrebbe avvenire il cambiamento di colore da viola scuro a giallo. I campioni in soluzione PreservCyt assumono una colorazione rosa anziché gialla. |
| d) Perdita di attività da parte del DR1 | Conservare il DR1 a 2–8°C. Utilizzarlo prima della data di scadenza. |
| e) Cattura insufficiente | La fase di cattura va eseguita utilizzando un Rotary Shaker I impostato a 1.100 ±100 giri/min. Convalidare la velocità dello strumento mediante calibrazione. |
| f) Lavaggio inadeguato | Lavare bene i pozzetti della micropiastra con il tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare oppure utilizzare l'Automated Plate Washer. |
| g) Tampone di lavaggio contaminato | Vedere "Controllo della contaminazione del sistema di lavaggio e/o della sorgente d'acqua", pagina 145. |

Commenti e suggerimenti

Serie di campioni positivi con valori RLU pressoché identici.

- | | |
|--|---|
| a) Contaminazione dei pozzetti della micropiastra di cattura durante il test | Coprire la micropiastra di cattura durante tutte le incubazioni. Evitare di esporre le provette alla contaminazione di aerosol mentre si esegue l'analisi. Indossare guanti privi di polveri durante la manipolazione. |
| b) Contaminazione del DR2 | Prestare attenzione a non contaminare lo stock quando si pipetta il DR2 nei pozzetti della micropiastra di cattura. Evitare la contaminazione del DR2 da parte di aerosol provenienti dal DR1 o da polvere presente in laboratorio, ecc. |
| c) Guasto dell'Automated Plate Washer | Per istruzioni relative alla verifica della contaminazione o ai guasti, vedere "Controllo della contaminazione del sistema di lavaggio e/o della sorgente d'acqua", pagina 145, oppure consultare il <i>Automated Plate Washer Manuale dell'operatore</i> . |

CV ampi tra i replicati.

- | | |
|----------------------------------|--|
| a) Uso scorretto dei pipettatori | Controllare il pipettatore per verificare che continui a erogare volumi riproducibili. Calibrare i pipettatori come di routine. |
| b) Miscelazione insufficiente | Miscelare bene tutte le fasi. Agitare prima e dopo l'incubazione per la denaturazione e dopo avere aggiunto la miscela della sonda. Verificare che venga prodotto un vortice visibile. |

Commenti e suggerimenti

- | | |
|---|--|
| c) Trasferimento incompleto del liquido dalle microprovette di ibridazione o dai pozzetti della micropiastra di ibridazione ai pozzetti della micropiastra di cattura | Prestare attenzione durante la fase di trasferimento dalla micropiastra o dalle microprovette di ibridazione ai pozzetti della micropiastra di cattura, in modo da assicurare che vengano trasferiti volumi riproducibili. |
| d) Condizioni di lavaggio improprie | Lavare bene i pozzetti della micropiastra con il tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare oppure utilizzare l'Automated Plate Washer. |
| e) Contaminazione dei pozzetti della micropiastra da parte del DR1 | Verificare che tutte le superfici siano pulite e asciutte. Prestare attenzione quando si utilizza il DR1. Evitare gli aerosol. |

Falsi positivi ottenuti da campioni la cui negatività è nota.

- | | |
|--|--|
| a) DR2 contaminato | Prestare attenzione a non causare la contaminazione crociata dei campioni quando si dosa il DR2 da un campione all'altro. Se si utilizza un kit solo in parte, dosare il volume necessario per il test in un contenitore per reagenti monouso pulito prima di riempire il pipettatore. |
| b) Contaminazione dei pozzetti della micropiastra da parte del DR1 | Lavare bene i pozzetti della micropiastra con il tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare o utilizzando l'Automated Plate Washer. Dopo il lavaggio, nei pozzetti non devono essere presenti tracce visibili di liquido rosa residuo. |

Commenti e suggerimenti

- c) Asciugatura di diverse file nello stesso punto delle salviettine Kimtowels o equivalenti salviettine di carta prive di fibre
- Non asciugare utilizzando nello stesso punto salviettine già usate in precedenza.
- d) Preparazione inadeguata del campione
- Aggiungere il volume corretto di DNR e miscelare bene, agitando. Per evitare falsi positivi, accertarsi che il liquido bagni l'intera superficie interna della provetta.
- Per i campioni in soluzione PreservCyt, verificare che la miscelazione sia stata eseguita correttamente e che il precipitato cellulare sia tornato completamente in sospensione prima dell'incubazione per la denaturazione. Consultare le istruzioni per l'uso del kit *digene* HC2 Sample Conversion.
- Si dovrebbe osservare un netto cambiamento di colore da trasparente a viola scuro. Incubare a $65 \pm 2^\circ\text{C}$ per 45 ± 5 minuti. Per i campioni SurePath, accertarsi che siano incubati per 90 ± 5 minuti a $65 \pm 2^\circ\text{C}$.
- e) Condizioni di lavaggio improprie
- Lavare bene i pozzetti della micropiastra con il tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare o utilizzando l'Automated Plate Washer.

Commenti e suggerimenti

- f) Contaminazione del puntale della pipetta con materiale non denaturato durante il trasferimento di campione denaturato nella microprovetta o nel pozzetto della micropiastra di ibridazione
- La fase di denaturazione della procedura di elaborazione del campione deve essere eseguita come indicato nelle presenti istruzioni per l'uso. Una miscelazione del campione, un'inversione della provetta o un'agitazione non corrette possono risultare in una denaturazione incompleta degli ibridi RNA-DNA non specifici endogeni ai campioni cervicali. Quando si utilizzano campioni in soluzione PreservCyt o nel fluido conservante SurePath in particolare, è probabile che questi ibridi siano presenti sulle pareti interne della provetta di denaturazione del campione. Per impedire possibili residui di questo materiale cellulare non denaturato, il puntale della pipetta non deve toccare i lati della provetta di denaturazione del campione durante il trasferimento del campione denaturato nella microprovetta o nel pozzetto della micropiastra di ibridazione.

Elevati valori RLU del calibratore negativo (>200 RLU). Il resto del test viene eseguito come previsto.

- a) Il DR2 è stato incubato a una temperatura maggiore di 20–25°C.
- Rieseguire il test e fare in modo che durante le fasi di cattura e rilevazione l'incubazione avvenga a 20–25°C.
- b) Il DR2 è stato incubato per un periodo superiore a 30 minuti.
- Leggere la micropiastra dopo 15 minuti (e non oltre 30 minuti) di incubazione a 20–25°C.
- c) Il DR2 o il tampone di lavaggio sono stati contaminati da fosfatasi alcaline o dal DR1.
- Vedere "Controllo della contaminazione del DR2" pagina 145, o "Controllo della contaminazione del sistema di lavaggio e/o della sorgente d'acqua", pagina 145.

Commenti e suggerimenti

Il test non è conforme ai criteri di convalida del dosaggio. Rapporto $PC\bar{x}/NC\bar{x}$ elevato.

- | | |
|---|---|
| a) È stata invertita la posizione di HRC e QC2-HR | Riesaminare i campioni. Leggere attentamente le etichette poste sulle fiale del calibratore e del controllo di qualità per evitare l'inversione della posizione di questi reagenti. |
|---|---|

Controllo della contaminazione del DR2

- 1. Pipettare 75 µl della fiala dosata, residua o originale del DR2 in un pozzetto vuoto della micropiastra di cattura.**

Nota: il test del DR2 in replicati di 3 fornisce un'ottima valutazione delle prestazioni.

- 2. Incubare a 20–25°C per 15 minuti. Evitare la luce del sole diretta.**
- 3. Misurare la micropiastra utilizzando uno strumento DML.**

Il controllo del DR2 deve essere <50 RLU.

Se i valori del DR2 sono <50 RLU, il reagente può essere utilizzato per ripetere il test.

Se il DR2 è contaminato (>50 RLU), richiedere un nuovo kit e ripetere il test.

Controllo della contaminazione del sistema di lavaggio e/o della sorgente d'acqua

- 1. Etichettare i pozzetti 1–4. Pipettare 75 µl di DR2 in 4 pozzetti per micropiastra di cattura separati.**

Il pozzetto 1 serve per il controllo del DR2.

- 2. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dal flacone di lavaggio nel pozzetto 2 della micropiastra.**
- 3. Lasciare scorrere il tampone di lavaggio attraverso la tubazione del lavatore. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dalla tubazione nel pozzetto 3.**
- 4. Ottenere un dosaggio di acqua utilizzato per preparare il tampone di lavaggio. Pipettare 10 µl di acqua nel pozzetto 4.**

5. Incubare a 20–25°C per 15 minuti. Evitare la luce del sole diretta.

6. Misurare la micropiastra utilizzando uno strumento DML.

Il controllo del DR2 (pozzetto 1) deve essere <50 RLU.

Confrontare il valore RLU derivato dai pozzetti 2, 3 e 4 con il valore RLU del controllo del DR2. I singoli valori RLU dei pozzetti 2, 3 e 4 non devono superare di 50 RLU il valore RLU del controllo del DR2.

I valori che superano di 50 RLU il controllo del DR2 indicano contaminazione. Vedere “Metodo di lavaggio manuale”, pagina 60, per le istruzioni relative alla pulizia e alla manutenzione del sistema di lavaggio.

Controllo della contaminazione dell'Automated Plate Washer

1. Etichettare i pozzetti 1–5. Pipettare 75 µl di DR2 in 5 pozzetti per micropiastra di cattura separati.

Il pozzetto 1 serve per il controllo del DR2.

2. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dal flacone di lavaggio del Plate Washer nel pozzetto 2 della micropiastra.

3. Pipettare 10 µl di liquido di risciacquo dal flacone di risciacquo del Plate Washer nel pozzetto 3.

4. Premere il tasto “Prime” (Riempi) sulla tastiera del Plate Washer, lasciando scorrere il tampone di lavaggio attraverso i tubi. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dal canale nel pozzetto 4.

5. Premere il tasto “Rinse” (Risciacqua) sulla tastiera del Plate Washer, lasciando scorrere il liquido di risciacquo attraverso i tubi. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dal canale nel pozzetto 5.

6. Coprire e incubare a 20–25°C per 15 minuti. Evitare la luce solare diretta.

7. Misurare la micropiastra utilizzando uno strumento DML.

Il controllo del DR2 (pozzetto 1) deve essere <50 RLU.

Confrontare il valore RLU derivato dai pozzetti 2, 3, 4 e 5 con il valore RLU del controllo del DR2. I singoli valori RLU dei pozzetti 2, 3, 4 e 5 non devono superare di 50 RLU il valore RLU del controllo del DR2.

I valori che superano di 50 RLU il controllo del DR2 indicano la contaminazione del Plate Washer.

Per la procedura di decontaminazione, consultare il *Automated Plate Washer Manuale dell'operatore*.

Informazioni sui contatti

Per contattare il rappresentante locale QIAGEN utilizzare il foglio di informazioni sui contatti allegato a questo kit.

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Marchi commerciali: QIAGEN®, *digene*®, Hybrid Capture®, QIASymphony®, Rapid Capture® (Gruppo QIAGEN); PrepStain®, SurePath® (Becton, Dickinson and Company); CDP-Star® (Tropix, Inc.); Corning® (Corning Incorporated); DuraSeal™ (Diversified Biotech); Eppendorf®, Repeater® (Eppendorf AG); Kimtowels® (Kimberly-Clark Corporation); Parafilm® (BEMIS Company, Inc.); pGEM® (Promega Corp); PreservCyt®, ThinPrep® (Hologic, Inc.); VWR® (VWR International, Inc.).

I marchi, nomi registrati ecc. utilizzati nel presente documento, anche se non contrassegnati specificamente come tali, vanno considerati protetti dalla legge.

Questo prodotto e la relativa metodica di utilizzo sono coperti da uno o più dei seguenti brevetti:

La tecnologia Hybrid Capture è coperta dal brevetto europeo n° 0 667 918 registrato in Austria, Belgio, Svizzera, Liechtenstein, Germania, Danimarca, Spagna, Francia, Regno Unito, Grecia, Irlanda, Italia, Lussemburgo, Paesi Bassi e Svezia.

Brevetto USA per Hybrid Capture

6.228.578B1

Brevetti USA per HPV

5,643,715 • 5,712,092 • 5,876,922 • 5,952,487 • 5,958,674 • 5,981,173

© 2012-2013 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com



Sample & Assay Technologies