

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

IVD

 96

Test di ibridazione dell'acido nucleico in vitro con amplificazione del segnale, basato su chemiluminescenza su micropiastra, per la rilevazione qualitativa di 18 tipi di DNA del papillomavirus umano (HPV) a basso rischio e ad alto rischio in campioni cervicali

Da utilizzare con:

Dispositivo di prelievo *digene* HC2 DNA

digene Specimen Transport Medium (STM, mezzo di trasporto campione)

Soluzione PreservCyt[®] Hologic

Fluido conservante BD SurePath[®]



REF

5196-1330



QIAGEN

19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
USA

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
GERMANIA

L2126it Rev. 4



Sample & Assay Technologies

INDICE

NOME E USO PREVISTO	1
SOMMARIO E SPIEGAZIONI	2
PRINCIPIO DELLA METODICA	3
REAGENTI E MATERIALI FORNITI	4
MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI	5
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	6
PRECAUZIONI DI SICUREZZA.....	6
FRASI DI SICUREZZA E DI RISCHIO RELATIVE AI COMPONENTI	6
PRECAUZIONI D'USO	8
PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI	9
PRELIEVO E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI	12
CAMPIONI CERVICALI IN STM	12
BIOPSIE CERVICALI.....	12
CAMPIONI CERVICALI IN SOLUZIONE PRESERVCYT	12
CAMPIONI CERVICALI NEL FLUIDO CONSERVANTE SUREPATH.....	13
PROCEDURA DEL TEST	14
ANALISI AD ALTA PRODUTTIVITÀ DI VOLUMI E CAMPIONI CON L'UTILIZZO DEL SISTEMA RAPID CAPTURE SYSTEM	14
METODICA MANUALE	14
DENATURAZIONE	15
AGITAZIONE E DENATURAZIONE	19
IBRIDAZIONE: METODICA DELLA MISCELA DI SONDE ETEROGENEE (CPC) E METODICA DELLE DUE SONDE	22
CATTURA DEGLI IBRIDI.....	25
RILEVAZIONE DEGLI IBRIDI	25
LAVAGGIO	26
AMPLIFICAZIONE DEL SEGNALE	27
CRITERI DI VERIFICA DELLA CALIBRAZIONE DEL DOSAGGIO	29
CALCOLO DEL VALORE CUTOFF	32
CONTROLLO DI QUALITÀ	33
INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEI CAMPIONI	34
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	35
DATI A SUPPORTO DELL'INDICAZIONE DI HPV A BASSO E AD ALTO RISCHIO	35
DATI A SUPPORTO DELL'INDICAZIONE PRIMARIA PER LO SCREENING DELL'HPV AD ALTO RISCHIO	39
SENSIBILITÀ ANALITICA.....	42
PRESTAZIONI DELLA MISCELA DI SONDE ETEROGENEE (CPC).....	43
EQUIVALENZA TRA CAMPIONI IN STM E CAMPIONI IN SOLUZIONE PRESERVCYT	43
CORRELAZIONE DEI RISULTATI DEI CAMPIONI IN SUREPATH CON QUELLI DEI CAMPIONI IN STM IN UNA POPOLAZIONE CLINICA	43
RIPRODUCIBILITÀ.....	44
SONDA PER L'HPV AD ALTO RISCHIO.....	45
REATTIVITÀ CROCIATA	46
PANNELLO DI REATTIVITÀ CROCIATA	46
IBRIDAZIONE CROCIATA.....	47
EFFETTO DEL SANGUE E DI ALTRE SOSTANZE SUI CAMPIONI IN STM	47
EFFETTO DEL SANGUE E DI ALTRE SOSTANZE SUI CAMPIONI IN SOLUZIONE PRESERVCYT	47
RIPRODUCIBILITÀ DEL TEST <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA CON CAMPIONI CLINICI PRELEVATI IN STM	47
RLU/CO	48
RIPRODUCIBILITÀ DEL TEST <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA CON CAMPIONI CLINICI PRELEVATI IN SOLUZIONE PRESERVCYT	48
RLU/CO	49
RIPRODUCIBILITÀ DEL TEST <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA CON CAMPIONI PRELEVATI NEL FLUIDO CONSERVANTE SUREPATH	49

RIPRODUCIBILITÀ DEI RISULTATI PER I CAMPIONI IN SUREPATH OTTENUTI UTILIZZANDO IL SISTEMA RAPID CAPTURE SYSTEM PER LA PROCESSAZIONE DEI DOSAGGI	50
LIMITI DELLA METODICA.....	51
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	52
GUIDA ALLA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI.....	55
CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE	60
INFORMAZIONI DI CONTATTO QIAGEN	61

NOME E USO PREVISTO

Per uso diagnostico in vitro.

Il test *digene* HC2 HPV DNA basato sulla tecnologia Hybrid Capture[®] 2 (HC2) è un test di ibridazione dell'acido nucleico con amplificazione del segnale, che si avvale della chemiluminescenza su micropiastra per la rilevazione qualitativa di 18 tipi di DNA del papillomavirus umano (HPV) a basso rischio e ad alto rischio in campioni cervicali.

I campioni cervicali analizzabili con il test *digene* HC2 HPV DNA includono i seguenti:

- Campioni prelevati con il dispositivo di prelievo *digene* HC2 DNA
- Campioni prelevati con un dispositivo del tipo a spazzolino o a spazzolino/spatola combinati e posti in soluzione PreservCyt (per maggiori informazioni consultare le istruzioni per l'uso del kit di conversione campioni *digene* HC2)
- Campioni prelevati nel fluido conservante SurePath (SOLO per test del DNA dell'HPA ad alto rischio)
- Biopsie prelevate nel *digene* Specimen Transport Medium (STM, mezzo di trasporto campione)

L'uso di questo test è indicato se si utilizzano le sonde per l'HPV a basso rischio e ad alto rischio:

- per favorire la diagnosi di infezioni da HPV a trasmissione sessuale (tipo di HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68).
- per differenziale fra due gruppi di DNA dell'HPV: tipi di HPV a basso rischio (6, 11, 42, 43 e 44) e tipi di HPV ad alto rischio (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68); tuttavia, non è possibile determinare il tipo di HPV specifico presente.

L'uso di questo test è indicato se si utilizza la sonda per l'HPV ad alto rischio:

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

Il test *digene* HC2 HPV DNA deve essere utilizzato in associazione ai riscontri clinici di altri test diagnostici e di screening, delle visite mediche e dell'anamnesi completa, in conformità alle adeguate procedure di gestione delle pazienti. I risultati del test *digene* HC2 HPV DNA **non devono** essere utilizzati come unica base di valutazione clinica delle pazienti.

SOMMARIO E SPIEGAZIONI

La presenza di alcuni tipi di HPV nell'apparato genitale femminile è associata a diverse neoplasie, fra cui il condiloma, la papulosi di tipo Bowen, i carcinomi e le neoplasie cervicali, vaginali e vulvari intraepiteliali.¹⁻³ Sono principi generalmente accettati il fatto che questi virus vengano trasmessi principalmente per via sessuale e che i tipi di HPV ad alto rischio costituiscano il principale fattore di rischio riconosciuto per lo sviluppo del cancro cervicale.⁴⁻⁸

I papillomavirus umani sono composti da una particella virale icosaedrica (virione) contenente una molecola di DNA circolare a doppio filamento costituita da 8000 coppie di basi, circondata da un capsido proteico. Dopo aver infettato le cellule epiteliali, il DNA virale si espande per tutto lo spessore dell'epitelio, ma i virioni intatti si riscontrano soltanto negli strati più superficiali del tessuto. Pertanto, il DNA virale può essere presente sia sotto forma di virioni, sia di DNA episomiale o sequenze di DNA dell'HPV integrate, a seconda del tipo e della gravità della lesione.

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

Storicamente, l'HPV 16 e l'HPV 18 sono sempre stati considerati tipi di HPV associati ad un alto rischio di cancro, mentre l'HPV 6 e l'HPV 11 tipi di HPV a basso rischio di cancro.⁸⁻¹⁰ Di conseguenza, è stato dimostrato che i tipi di HPV 31, 33 e 35 sono associati ad un rischio di cancro intermedio.^{2,11-14} Nonostante questo utile panorama concettuale, questi 7 tipi di HPV sono responsabili solamente per il 70% delle neoplasie cervicali.⁹⁻¹¹ Gli alti tipi di HPV (fra cui 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) sono stati identificati come i principali HPV rilevabili nelle restanti lesioni^{15-20,32-36}. Questi tipi di HPV possono anche essere classificati come gruppi a rischio basso, intermedio ed alto, in base alla relativa distribuzione nelle diverse categorie di diagnosi istopatologica^{21, 32-37}

È stato dimostrato che il DNA dell'HPV è presente in circa il 10% delle donne con epitelio cervicale normale, ma l'effettiva prevalenza in gruppi specifici di donne è influenzata fortemente dall'età e da altre variabili demografiche.^{2,10,21,31} Studi prospettici hanno evidenziato che il 15-28% delle donne risultate positive al DNA dell'HPV ha sviluppato una neoplasia intraepiteliale squamosa (SIL) entro 2 anni rispetto al solo 1.3% di donne negative al DNA dell'HPV.^{22,23} In particolare, il rischio di progressione per i tipi di HPV 16 e 18 è risultato superiore (circa 40%) che per altri tipi di HPV.²²

PRINCIPIO DELLA METODICA

Il test *digene* HC2 HPV DNA, basato sulla tecnologia HC2, è un test di ibridazione dell'acido nucleico in vitro con amplificazione del segnale che utilizza la rilevazione mediante chemiluminescenza su micropiastra. I campioni contenenti il DNA bersaglio si ibridano con una specifica sonda RNA dell'HPV. Gli ibridi RNA/DNA risultanti vengono catturati sulla superficie di una micropiastra rivestita con anticorpi specifici per tali ibridi. Gli ibridi immobilizzati vengono quindi fatti reagire con anticorpi coniugati con fosfatasi alcalina specifici per gli ibridi RNA/DNA e poi sottoposti a rilevazione 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 da un luminometro 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 cutoff indica la presenza di sequenze di DNA dell'HPV nel campione. Una misurazione di RLU inferiore al valore cutoff indica l'assenza delle sequenze di DNA dell'HPV specifiche o livelli di DNA dell'HPV inferiori al limite di rilevazione del test.

Utilizzando il sistema Rapid Capture[®] System (RCS) è possibile effettuare un'analisi ad alta produttività di volumi e campioni con il test *digene* HC2 HPV DNA. Questo strumento elabora fino a 352 campioni in otto ore. Per attivare l'analisi ad alta produttività di volumi e campioni, tutte le fasi procedurali del test vengono eseguite dal sistema RCS, ad eccezione della denaturazione del campione, della rilevazione del segnale chemiluminescente e della refertazione dei risultati.

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

Il kit del test digene HC2 HPV DNA contiene 96 test (cat. n. 5196-1330). Il numero di risultati pazienti varia a seconda del numero di utilizzi per kit:

1 utilizzo = 40 risultati pazienti (a basso rischio e ad alto rischio)

2 utilizzi = 32 risultati pazienti (a basso rischio e ad alto rischio)

- 1 x 0,35 ml **Colorante indicatore**
Contiene sodio azide allo 0,05% p/v.
- 1 x 50 ml **Reagente di denaturazione**
Soluzione diluita di idrossido di sodio (NaOH).
- 1 x 5 ml **Diluente della sonda**
Soluzione tamponata con sodio azide allo 0,05% p/v.
- 1 x 150 µl **Sonda per l'HPV a basso rischio**
Sonda per l'RNA dell'HPV 6/11/42/43/44 in soluzione tamponata (tappo verde).
- 1 x 100 µl **Sonda per l'HPV ad alto rischio**
Sonda per l'RNA dell'HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68 in soluzione tamponata (tappo rosso).
- 1 x 1 ml **Controllo di qualità per l'HPV a basso rischio**
5 pg/ml (500.000 copie/ml) di DNA dell'HPV 6 clonato e DNA vettore in STM con sodio azide allo 0,05% p/v.
- 1 x 1 ml **Controllo di qualità per l'HPV ad alto rischio**
5 pg/ml (500.000 copie/ml) di DNA dell'HPV 16 clonato e DNA vettore in STM con sodio azide allo 0,05% p/v.
- 1 x 2,0 ml **Calibratore negativo**
DNA vettore in STM con sodio azide allo 0,05% p/v.
- 1 x 1,0 ml **Calibratore per l'HPV a basso rischio**
1 pg/ml di DNA dell'HPV 11 clonato e DNA vettore in STM con sodio azide allo 0,05% p/v.
- 1 x 1,0 ml **Calibratore per l'HPV ad alto rischio**
1 pg/ml di DNA dell'HPV 16 clonato e DNA vettore in STM con sodio azide allo 0,05% p/v.
- 1 x 1 **Micropiastra di cattura**
Rivestita con anticorpi anti-ibridi RNA/DNA.
- 1 x 12 ml **Reagente di rilevazione 1**
Anticorpi coniugati con fosfatasi alcalina anti-ibridi RNA/DNA in soluzione tamponata con sodio azide allo 0,05% p/v.
- 1 x 12 ml **Reagente di rilevazione 2**
CDP-Star® con Emerald II (substrato chemiluminescente).
- 1 x 100 ml **Tampone di lavaggio concentrato**
Contiene sodio azide all'1,5% p/v.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Attrezzatura diagnostica e accessori del sistema Hybrid Capture System *in vitro*^A

digene Hybrid Capture 2 System (chiamato "sistema *digene* HC2"), composto da un luminometro approvato da QIAGEN (chiamato "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 (chiamato "software di analisi del dosaggio *digene*"), i protocolli di dosaggio per HPV del sistema *digene* HC2, il software per piastre LumiCheck e il manuale utente del sistema *digene* HC2 (*HC2 System Software User Manual*)
Agitatore rotante Hybrid Capture System Rotary Shaker I
Riscaldatore per micropiastre Hybrid Capture System Microplate Heater I
Lavatore automatico per micropiastre Hybrid Capture System Automated Plate Washer
Agitatore Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (opzionale)^B
Rack di conversione e relativo coperchio (facoltativo)
Rack campioni *digene* e relativo coperchio (facoltativo)
Pipettatore EXPAND-4 e relativo supporto (facoltativo)^C
Dispositivo di prelievo *digene* HC2 DNA^D
Dispenser di pellicola per sigillare e taglierina (facoltativi, utilizzati con l'MST Vortexer 2)

Attrezzature e accessori per uso generico di laboratorio

Bagno d'acqua a 65 ± 2 °C di dimensioni sufficienti per contenere 1 rack di conversione (36 x 21 x 9 cm) o rack campioni
Microcentrifuga (facoltativa, per la centrifugazione dei flaconi della sonda in modo da ottenere il volume massimo)
Miscelatore vortex con coppetta
Micropipettatore a canale singolo; impostazioni variabili per volumi di 20-200 µl e 200-1.000 µl
Pipettatore a ripetizione a spostamento positivo, ad esempio pipettatore Eppendorf® Repeater® o equivalente
Pipettatore a 8 canali: impostazioni variabili per volumi di 25-200 µl
Timer
Soluzione di ipoclorito di sodio al 5% v/v (o normale candeggina)
Pellicola Parafilm® o equivalente
Puntali per pipette monouso con barriera di contenimento dell'aerosol per pipettatore a canale singolo (da 20-200 µl e 200-1.000 µl)
Puntali monouso per pipettatore Eppendorf Repeater (25 e 500 µl)
Puntali monouso per pipettatore a 8 canali (25-200 µl)
Salviettine Kimtowels® o equivalenti salviettine di carta prive di fibre
Copertura monouso da banco
Guanti non talcati
Provette in polipropilene con fondo tondo e tappo a pressione da 5 ml e/o 15 ml (per la diluizione delle sonde)
Provette per microcentrifuga in polipropilene da 2,0 ml con tappo

Ulteriori attrezzature e accessori per la processazione dei campioni nel fluido conservante SurePath

Centrifuga a cestello oscillante in grado di raggiungere 800 ± 15 x g e di contenere provette da centrifuga a fondo conico in polipropilene da 15 ml
Provette di conversione campioni *digene* HC2 (a fondo conico, da 15 ml)^F
Pipette di trasferimento con puntale standard da 7 ml o pipette equivalenti
QIAGEN Specimen Transport Media (STM, mezzi di trasporto campioni)
Puntali monouso per pipettatore Eppendorf Repeater (100 µl)

Sistema Rapid Capture System (facoltativo per analisi ad alta produttività di volumi e campioni)^E
Sistema di lavaggio
Micropiastre di ibridazione
Coperchi per micropiastre
Strisce di micropiastre vuote (di marca Costar, modello #2581); da utilizzare facoltativamente con l'Automated Plate Washer
Puntali per pipette extra lunghi per la rimozione del campione
Provette di prelievo campioni
Rack per le provette di prelievo campioni
Tappi a vite per le provette di prelievo campioni
Contenitori per reagenti monouso
Pellicola per sigillare DuraSeal™
Microprovette di ibridazione
Rack per microprovette
Copripiastre

Ulteriori attrezzature e accessori per la processazione dei campioni in soluzione PreservCyt

Centrifuga a cestello oscillante in grado di raggiungere 2.900 ± 150 x g e di contenere provette da centrifuga in polipropilene a fondo conico da 10 ml o 15 ml
Pipette per sierologia da 5 ml o pipette da trasferimento
Kit di conversione campioni *digene* HC2^A
Puntali monouso per pipettatore Eppendorf Repeater (50 e 100 µl)

Per la procedura di agitazione manuale

Provette di conversione campioni *digene* (a fondo conico, da 15 ml)^F, provette a fondo conico Sarstedt da 10 ml oppure provette in polipropilene a fondo conico VWR® o Corning® da 15 ml con tappi
Rack per provette a fondo conico da 10 ml o 15 ml

Per la procedura con Multi-Specimen Tube Vortexer 2

Provette di conversione campioni *digene* HC2 (a fondo conico, da 15 ml)^F
Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2
Rack di conversione e coperchio (specifico per provette a fondo conico da 15 ml)
Dispenser di pellicola per sigillare e taglierina
Pellicola per sigillare DuraSeal (utilizzata con l'MST Vortexer 2)

^A QIAGEN fornisce unicamente apparecchiature e materiali convalidati con i test *digene* HC2 HPV DNA.

^B Necessaria anche quando si esegue l'applicazione semi-automatica del sistema RCS.

^C Elemento personalizzato. È possibile utilizzare altre pipette multicanale espandibili, purché sia possibile ottenere uno spazio di 3,2 cm fra i puntali dopo l'espansione. In alternativa, si può utilizzare una pipetta a canale singolo in grado di dispensare 75 µl.

^D Le caratteristiche delle prestazioni del test *digene* HC2 HPV DNA sono state stabilite soltanto con i kit di prelievo indicati.

^E Consultare il manuale utente del sistema Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) per istruzioni specifiche relative all'utilizzo di tale sistema per analisi ad alta produttività di volumi e campioni con questo test.

^F Devono essere utilizzate le provette di conversione campioni *digene* HC2 (marca VWR o Corning®) fornite da QIAGEN per ottenere prestazioni corrette del test quando si utilizza la procedura con Multi-Specimen Tube Vortexer 2.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

LEGGERE TUTTE LE ISTRUZIONI CON ATTENZIONE PRIMA DI UTILIZZARE IL TEST.

PRECAUZIONI DI SICUREZZA

TUTTI I CAMPIONI devono essere considerati come potenzialmente infettivi. Nessuna metodica di analisi nota è in grado di garantire con certezza che i campioni non possano trasmettere infezioni. Si raccomanda di trattare i campioni umani secondo le adeguate prassi nazionali/locali 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:

1. Non pipettare con la bocca.
2. Non fumare, mangiare o bere in aree in cui si utilizzano reagenti o campioni.
3. Indossare guanti monouso non talcati quando si utilizzano reagenti o campioni. Lavarsi bene le mani dopo avere eseguito il test.
4. Pulire e disinfettare le superfici venute a contatto diretto con i campioni, utilizzando un disinfettante tuberculocida, per esempio ipoclorito di sodio allo 0,5% v/v del volume o altro disinfettante adatto.^{42,43}
5. Decontaminare e smaltire tutti i campioni, reagenti e altro materiale potenzialmente contaminato in conformità alle normative nazionali e locali.

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 US Occupational Safety and Health Administration (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, quindi (4) risciacquare bene con acqua.

Test RCS automatizzati

Consultare il manuale del sistema Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) per ulteriori avvertenze e precauzioni specifiche relative all'utilizzo di tale sistema per analisi ad alta produttività di volumi e campioni.

FRASI 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 HPV DNA:

Tampone di lavaggio concentrato



Contiene: Sodio azide. Avvertenza! Nocivo se ingerito. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. Non disperdere nell'ambiente. Smaltire il contenuto/contenitore in un impianto d'eliminazione di rifiuti autorizzato.

Reagente di denaturazione



Contiene: idrossido di sodio. Pericolo! Provoca gravi ustioni alla pelle e lesioni oculari. Può essere corrosivo sui metalli. Smaltire il contenuto/contenitore in un impianto d'eliminazione di rifiuti autorizzato. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare con precauzione con acqua per vari minuti. Togliere le lenti a

contatto, se presenti e facili da togliere. Continuare a sciacquare. IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (O CON I CAPELLI): Togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle con acqua. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Conservare sotto chiave. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso.

Diluyente sonda



Contiene: acido acetico; acido poliacrilico. Pericolo! Provoca gravi ustioni alla pelle e lesioni oculari. Smaltire il contenuto/contenitore in un impianto d'eliminazione di rifiuti autorizzato. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare con precauzione con acqua per vari minuti. Togliere le lenti a contatto, se presenti e facili da togliere. Continuare a sciacquare. IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (O CON I CAPELLI): Togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle con acqua. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Conservare sotto chiave. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso.

Calibratore per l'HPV ad alto rischio

Avvertenza! Causa lieve irritazione cutanea. In caso di irritazione cutanea consultare il medico.

Calibratore per l'HPV a basso rischio

Avvertenza! Causa lieve irritazione cutanea. In caso di irritazione cutanea consultare il medico.

Controllo di qualità per l'HPV ad alto rischio

Avvertenza! Causa lieve irritazione cutanea. In caso di irritazione cutanea consultare il medico.

Controllo di qualità per l'HPV a basso rischio

Avvertenza! Causa lieve irritazione cutanea. In caso di irritazione cutanea consultare il medico.

Calibratore negativo

Avvertenza! Causa lieve irritazione cutanea. In caso di irritazione cutanea consultare il medico.

Ulteriori informazioni

Schede di sicurezza: www.qiagen.com/safety

PRECAUZIONI D'USO

1. Per uso diagnostico in vitro.
2. Lo spazzolino cervicale deve essere utilizzato esclusivamente su donne non in gravidanza.
3. Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza, indicata accanto al simbolo  sull'etichetta della confezione esterna.
4. L'esecuzione del 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 devono essere ripetuti.
5. Per ottenere risultati affidabili, attenersi scrupolosamente alla procedura del test *digene* HC2 HPV DNA, ai criteri di verifica della calibrazione del test, al controllo qualità e all'interpretazione dei risultati dei campioni.
6. 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.
7. I componenti del kit sono stati sottoposti a test come insieme. **Non** sostituirli con componenti provenienti da altre fonti o lotti diversi.
8. Gli acidi nucleici sono molto sensibili alla degradazione ambientale ad opera 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 copertura monouso da banco e **indossare guanti non talcati durante tutte le fasi del dosaggio**.
9. Durante l'esecuzione del dosaggio, evitare che la micropiastra di cattura e il reagente di rilevazione 2 vengano contaminati con fosfatasi alcalina esogena. Sostanze potenzialmente contenenti fosfatasi alcalina sono il reagente di rilevazione 1, i batteri, la saliva, i capelli e le sostanze oleose della pelle. **È particolarmente importante coprire la micropiastra di cattura dopo la fase di lavaggio e durante l'incubazione con il reagente di rilevazione 2, in quanto la fosfatasi alcalina esogena potrebbe reagire con il reagente di rilevazione 2 e dare luogo a falsi positivi**.
10. Proteggere il reagente di rilevazione 2 da lunghe esposizioni alla luce diretta. Utilizzare il reagente di rilevazione 2 subito dopo averlo diviso in aliquote ed evitare la luce solare diretta.
11. Il pipettatore a ripetizione deve essere riempito prima di procedere alla dispensazione del reagente; è inoltre opportuno eseguire periodicamente un controllo della presenza di grosse bolle d'aria. Quantità eccessive di grosse bolle d'aria nel puntale del pipettatore a ripetizione possono causare una dispensazione imprecisa e possono essere evitate riempiendo il pipettatore, dispensando tutto il liquido e riempiendolo nuovamente. Consultare il manuale di istruzioni del fornitore del pipettatore per istruzioni d'uso specifiche.
12. Le pipette multicanale devono essere utilizzate con la tecnica del pipettamento inverso (vedere *Rilevazione degli ibridi*) per la dispensazione dei reagenti di rilevazione 1 e 2. Controllare ogni puntale sulla pipetta multicanale per verificare che sia fissato saldamente e riempito correttamente.
13. Verificare che ogni pozzetto della micropiastra venga accuratamente lavato come indicato nelle istruzioni di lavaggio manuale. Un lavaggio inadeguato causa un aumento del rumore di fondo e può dare luogo a falsi positivi. La presenza di residui del tampone di lavaggio nei pozzetti può dare luogo a una riduzione del segnale o a scarsa riproducibilità.
14. Dopo l'avvio a freddo attendere almeno 60 minuti che l'Hybrid Capture System Microplate Heater I venga termostato a $65\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Se non si rispetta il periodo di riscaldamento, la micropiastra di ibridazione potrebbe fondersi. Per maggiori dettagli, consultare il manuale del Microplate Heater I (*Microplate Heater I User Manual*).

PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

1. Al ricevimento, conservare il kit a 2-8 °C. Il tampone di lavaggio concentrato, il reagente di denaturazione e il colorante indicatore possono essere conservati a 2-30 °C.
2. Non utilizzare dopo la data di scadenza, indicata accanto al simbolo  sull'etichetta della confezione, o dopo la data di scadenza dei reagenti preparati (vedere di seguito).
3. Tutti i reagenti sono pronti all'uso, ad eccezione del reagente di denaturazione, delle sonde per l'HPV a basso rischio e ad alto rischio e del tampone di lavaggio concentrato.

Per individuare la presenza di uno qualunque dei 18 tipi di HPV nei campioni analizzati si impiega una metodica che prevede una miscela di sonde eterogenee (CPC). Per utilizzare questa opzione occorre preparare una miscela di sonde eterogenee unendo la miscela della sonda per l'HPV a basso rischio diluita e la miscela della sonda per l'HPV ad alto rischio diluita prima di eseguire il test *digene* HC2 HPV DNA. Con la metodica delle due sonde vengono impiegate miscele della sonde per l'HPV a basso e della sonda per l'HPV ad alto rischio separate. Vedere le istruzioni riportate di seguito.

Consultare il manuale del sistema Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) per la preparazione della/e miscela/e di sonde per l'HPV, del tampone di lavaggio, del reagente di rilevazione 1 e del reagente di rilevazione 2, poiché tale manuale riguarda specificamente l'utilizzo di questo sistema per analisi ad alta produttività di volumi e campioni.

REAGENTE	METODICA DI PREPARAZIONE
Reagente di denaturazione	<p>Prepararlo prima:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aggiungere 5 gocce di colorante indicatore nel flacone del reagente di denaturazione e miscelare accuratamente. Il reagente di denaturazione deve presentarsi di un colore viola scuro uniforme. • Dopo la preparazione, il reagente di denaturazione è stabile per tre mesi, se conservato a 2-8 °C. Etichettarlo con la nuova data di scadenza. Se il colore si attenua, aggiungere 3 gocce di colorante indicatore e miscelare accuratamente prima dell'uso. <p>Avvertenza: Il reagente di denaturazione è corrosivo. Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/il viso. Prestare attenzione durante l'uso.</p>
Miscela della sonda per l'HPV a basso rischio (preparata con la sonda per l'HPV a basso rischio e il diluente della sonda)	<p>Prepararla durante l'incubazione per la denaturazione del campione:</p> <p>Importante: A volte, residui della sonda rimangono intrappolati nel tappo del flacone.</p> <p>Nota: Prestare attenzione ad evitare la contaminazione della sonda e della miscela della sonda con RNasi. Per pipettare la sonda servirsi di pipette con puntali dotati di barriera di contenimento dell'aerosol. Il diluente della sonda è viscoso.</p> <p>Durante la preparazione delle sonde per l'HPV verificare l'accurata miscelazione. Durante la fase di miscelazione deve formarsi un vortice visibile nel liquido. Una miscelazione incompleta può dare luogo a una riduzione del segnale.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrifugare brevemente il flacone della sonda per l'HPV a basso rischio per portare il liquido sul fondo del flacone. Picchiettare delicatamente per miscelare. • Determinare la quantità di miscela della sonda necessaria (25 µl/test). Si raccomanda di preparare le miscele delle sonde in quantità eccedente, in modo da tenere conto del volume che potrebbe andare perso nei puntali delle pipette o sui lati del flacone. Vedere i volumi consigliati, elencati di seguito. Il numero minimo di pozzetti raccomandato per ogni utilizzo è 24. Se si desidera utilizzare meno di 24 pozzetti per ogni dosaggio, il numero totale dei test per ogni kit potrebbe ridursi a causa di volumi limitati della sonda e del diluente della sonda. • Trasferire la quantità necessaria di diluente della sonda in un nuovo contenitore monouso. A seconda del numero di test, è consigliabile utilizzare una provetta in polipropilene a fondo tondo da 5 ml o 15 ml, con tappo a pressione. Per preparare la miscela, diluire la sonda per l'HPV a basso rischio utilizzando l'apposito diluente nel rapporto 1:25.

		N. di test/strisce	Volume diluente della sonda*	Volume sonda*
		48/6	2,0 ml	80,0 µl
		24/3	1,0 ml	40,0 µl
		Per pozzetto	0,045 ml	1,8 µl

*Questi valori comprendono il volume eccedente consigliato.

- Pipettare la sonda per l'HPV a basso rischio nel diluente della sonda, posizionando il puntale della pipetta contro la parete interna della provetta, esattamente al di sopra del menisco, ed espellendone il contenuto. **Non immergere il puntale nel diluente della sonda.**
- Agitare per almeno 5 secondi alla velocità massima per ottenere un'accurata miscelazione. **Deve formarsi un vortice visibile.** Etichettare come "miscela della sonda per l'HPV a basso rischio" e conservare in un contenitore chiuso e pulito fino all'utilizzo. **La miscela della sonda non utilizzata deve essere gettata.**

Miscela della sonda per l'HPV ad alto rischio	Preparare la miscela come descritto per la miscela della sonda per l'HPV a basso rischio. Etichettare come "miscela della sonda per l'HPV ad alto rischio". La miscela della sonda non utilizzata deve essere gettata.
Miscela di sonde eterogenee	Preparare la miscela della sonda per l'HPV a basso rischio e quella per l'HPV ad alto rischio come descritto in precedenza. Aggiungere tutto il contenuto della miscela della sonda per l'HPV a basso rischio diluita nella provetta della miscela della sonda per l'HPV ad alto rischio diluita. Miscelare accuratamente, agitando per almeno 5 secondi alla velocità massima. Deve formarsi un vortice visibile. Etichettare come "miscela di sonde eterogenee". La miscela della sonda non utilizzata deve essere gettata.

Tampone di lavaggio	<p>Prepararlo durante la fase di cattura:</p> <p>Per l'Automated Plate Washer del sistema Hybrid Capture System è possibile preparare il tampone di lavaggio come di seguito descritto e conservarlo in un contenitore chiuso oppure prepararne 1 litro per volta e conservarlo nell'apposito contenitore del liquido di lavaggio dell'Automated Plate Washer. Per i volumi di miscelazione, consultare la tabella seguente.</p> <p>Per le istruzioni di cura e manutenzione consultare il manuale dell'operatore dell'Automated Plate Washer.</p> <p>Avvertenza: Il tampone di lavaggio concentrato è tossico per ingestione. Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/il viso. Per ridurre al minimo l'esposizione, durante la preparazione aggiungere acqua al tampone di lavaggio concentrato.</p> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Quantità di tampone di lavaggio concentrato</th> <th style="text-align: center;">Quantità di acqua distillata o deionizzata</th> <th style="text-align: center;">Volume finale del tampone di lavaggio</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">33,3 ml</td> <td style="text-align: center;">966,7 ml</td> <td style="text-align: center;">1 l</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">66,6 ml</td> <td style="text-align: center;">1.933,4 ml</td> <td style="text-align: center;">2 l</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">100,0 ml</td> <td style="text-align: center;">2.900,0 ml</td> <td style="text-align: center;">3 l</td> </tr> </tbody> </table> <p>Nota: È molto importante lasciare sempre in funzione l'Automated Plate Washer. Ciò consente di effettuare il lavaggio di manutenzione dopo otto ore di mancato utilizzo.</p> <p>Prima di eseguire ogni dosaggio verificare che il contenitore di scarico dell'Automated Plate Washer sia vuoto e che il contenitore del liquido di risciacquo sia stato riempito con acqua distillata o deionizzata.</p> <p>Per la metodica di lavaggio manuale delle piastre:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Miscelare accuratamente il tampone di lavaggio concentrato. • Diluire 100 ml di tampone di lavaggio concentrato con 2,9 l di acqua distillata o deionizzata nel sistema di lavaggio e miscelare accuratamente (il volume finale deve essere di 3 l). • Sigillare il contenitore per evitare la contaminazione o l'evaporazione. <p>Dopo la preparazione, il tampone di lavaggio è stabile per tre mesi a 2-30 °C. Apporvi un'etichetta con la nuova data di scadenza. Se il tampone di lavaggio è stato refrigerato, termostatarlo a 20-25 °C prima di utilizzarlo.</p> <p>Si consiglia di pulire ogni tre mesi il sistema di lavaggio e le tubature con soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5% e di risciacquare accuratamente con acqua distillata o deionizzata ogni tre mesi per evitare la possibile contaminazione da parte della fosfatasi alcalina presente nei batteri e nelle muffe.</p>	Quantità di tampone di lavaggio concentrato	Quantità di acqua distillata o deionizzata	Volume finale del tampone di lavaggio	33,3 ml	966,7 ml	1 l	66,6 ml	1.933,4 ml	2 l	100,0 ml	2.900,0 ml	3 l
Quantità di tampone di lavaggio concentrato	Quantità di acqua distillata o deionizzata	Volume finale del tampone di lavaggio											
33,3 ml	966,7 ml	1 l											
66,6 ml	1.933,4 ml	2 l											
100,0 ml	2.900,0 ml	3 l											

VOLUMI DEI REAGENTI PRONTI ALL'USO													
Reagenti di rilevazione 1 e 2	<p>Immediatamente prima dell'uso:</p> <p>Miscelare bene i reagenti, quindi <u>misurare</u> con precisione il volume corretto di reagente di rilevazione 1 o 2 in un contenitore pulito, seguendo le linee guida riportate di seguito. Per evitare contaminazione, questi reagenti NON DEVONO essere versati di nuovo nei flaconi originali: gettare il materiale non utilizzato dopo l'uso. Se non si utilizza un pipettatore a 8 canali, sostituirlo con un pipettatore a ripetizione adatto. In questo caso, è opportuno suddividere il reagente in aliquote in provette di polipropilene di dimensioni sufficienti a contenere il volume necessario, secondo quanto indicato di seguito.</p> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">N. di test/strisce</th> <th style="text-align: center;">Volume del reagente di rilevazione 1 o 2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">96/12</td> <td style="text-align: center;">contenuto del flacone</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">72/9</td> <td style="text-align: center;">7,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">48/6</td> <td style="text-align: center;">5,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">24/3</td> <td style="text-align: center;">3,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1 test</td> <td style="text-align: center;">0,125 ml</td> </tr> </tbody> </table>	N. di test/strisce	Volume del reagente di rilevazione 1 o 2	96/12	contenuto del flacone	72/9	7,0 ml	48/6	5,0 ml	24/3	3,0 ml	1 test	0,125 ml
N. di test/strisce	Volume del reagente di rilevazione 1 o 2												
96/12	contenuto del flacone												
72/9	7,0 ml												
48/6	5,0 ml												
24/3	3,0 ml												
1 test	0,125 ml												

PRELIEVO E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

Si raccomanda di analizzare con il test *digene* HC2 HPV DNA esclusivamente i campioni cervicali prelevati e trasportati con il dispositivo di prelievo *digene* HC2 DNA (costituito da uno spazzolino cervicale e dal *digene* Specimen Transport Medium, STM) o i campioni prelevati con un dispositivo di prelievo del tipo a spazzolino o a spazzolino/spatola combinati e posti in soluzione PreservCyt oppure i campioni cervicali prelevati nel fluido conservante SurePath. Campioni prelevati con dispositivi di campionamento diversi o trasportati con mezzi diversi da quelli citati non sono adatti all'uso con questo test. Le caratteristiche di questo kit sono state stabilite esclusivamente con i kit di prelievo indicati. 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 dispositivo di prelievo *digene* HC2 DNA per procedure supplementari di prelievo e manipolazione dei campioni.

CAMPIONI CERVICALI IN STM

I campioni in STM possono essere conservati per un massimo di due settimane a temperatura ambiente e spediti al laboratorio di 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 una settimana. In caso contrario, è possibile conservarli a una temperatura di -20 °C per un massimo di 3 mesi (vedere le *Note* in *Biopsie cervicali* prima del congelamento). Il mezzo 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. Il dispositivo di prelievo *digene* HC2 DNA non deve essere utilizzato per il prelievo di campioni da donne in gravidanza.

BIOPSIE CERVICALI

Con il test *digene* HC2 HPV DNA possono essere analizzati anche campioni biotici cervicali appena prelevati, con sezione trasversale di 2-5 mm. I campioni biotici devono essere collocati immediatamente in 1,0 ml di STM e congelati a -20 °C. Possono essere spediti a 2-30 °C al laboratorio di analisi con consegna il giorno seguente e devono essere conservati a -20 °C fino al momento della processazione. Non utilizzare biopsie con diametro inferiore ai 2 mm.

Note: per evitare che le provette contenenti i campioni si stappino, se spedite o conservate congelate:

- Coprire i tappi con Parafilm prima di spedire i campioni precedentemente congelati. I campioni possono essere spediti congelati o a 20-25 °C.
- Quando si estraggono i campioni dal congelatore per analizzarli, sostituire immediatamente i tappi con i tappi a vite per le provette di prelievo campioni.

CAMPIONI CERVICALI IN SOLUZIONE PRESERVCYT

Con il test *digene* HC2 HPV DNA possono essere analizzati campioni prelevati con un dispositivo del tipo a spazzolino o a spazzolino/spatola combinati e posti in soluzione PreservCyt per la preparazione dei vetrini del Pap test ThinPrep®. I campioni devono essere prelevati con metodiche routine e i vetrini del Pap test ThinPrep® preparati seguendo le istruzioni di Hologic.

Nota: Devono rimanere almeno 4 ml di soluzione PreservCyt per il test *digene* HC2 HPV DNA. I campioni con meno di 4 ml di PreservCyt dopo la preparazione del Pap Test possono contenere materiale insufficiente e potrebbero dare luogo a falsi negativi con il test *digene* HC2 HPV DNA.

Dopo il prelievo, conservare i campioni in soluzione PreservCyt al massimo fino a 3 mesi a una temperatura compresa tra 2 e 30 °C prima della preparazione con il test *digene* HC2 HPV DNA. I campioni in soluzione PreservCyt non possono essere congelati. Per la processazione di questi campioni, consultare la *Procedura di preparazione dei campioni in soluzione PreservCyt*.

CAMPIONI CERVICALI NEL FLUIDO CONSERVANTE SUREPATH

(solo per test del DNA dell'HPV ad alto rischio)

La preparazione manuale dei campioni in SurePath viene effettuata utilizzando il precipitato cellulare post-gradiente derivante dalla preparazione dei vetrini del Pap Test SurePath. Preparare i vetrini del Pap Test SurePath secondo le istruzioni valide per l'analizzatore di vetrini BD PrepStain®.

Importante: Subito dopo la preparazione dei vetrini del Pap Test SurePath occorre pipettare 2,0 ml del fluido conservante SurePath nella provetta da centrifuga contenente il precipitato cellulare residuo. Ciò consente di preservare l'integrità del precipitato cellulare post-gradiente per l'esecuzione del test *digene* HC2 HPV DNA.

Il precipitato cellulare post-gradiente con il fluido conservante SurePath può essere conservato al massimo fino a 4 settimane a 2-30 °C prima della preparazione del campione per il test *digene* HC2 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 DEL TEST

I campioni possono contenere agenti infettivi e devono essere trattati di conseguenza. Il test *digene* HC2 HPV DNA può essere eseguito manualmente come indicato nelle presenti istruzioni per l'uso oppure utilizzando il sistema Rapid Capture System per analisi ad alta produttività di volumi e campioni.

ANALISI AD ALTA PRODUTTIVITÀ DI VOLUMI E CAMPIONI CON L'UTILIZZO DEL SISTEMA RAPID CAPTURE SYSTEM

Il sistema Rapid Capture System è un sistema automatico di pipettamento e diluizione che può essere utilizzato con il test *digene* HC2 HPV DNA per analisi ad alta produttività di volumi e campioni. Questo sistema gestisce fino a 352 campioni in otto ore, incluso un periodo di 3,5 ore durante il quale non viene richiesto l'intervento dell'utente; in 13 ore è possibile generare i risultati per un massimo di 704 campioni. La denaturazione dei campioni che vengono preparati per il test viene eseguita indipendentemente dal sistema RCS, prima di inserire i campioni nella 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 che alla metodica con sistema RCS. Le fasi procedurali del test *digene* HC2 HPV DNA vengono eseguite nell'esatta sequenza della procedura manuale del test. L'applicazione RCS consente l'elaborazione scaglionata di 4 micropiastre al massimo; ogni piastra contiene i campioni, i calibratori e i controlli di qualità necessari per il test.

Per le necessarie informazioni procedurali e descrittive relative all'utilizzo del sistema Rapid Capture System, consultare il Manuale utente del Sistema Rapid Capture *Rapid Capture System User Manual* in dotazione con lo strumento e le presenti istruzioni per l'uso.

METODICA MANUALE

Setup

1. Se si utilizza il Microplate Heater I, **attendere almeno 60 minuti affinché si sia termostato a 65 °C ± 2 °C dopo un avvio a freddo.** Per maggiori dettagli, consultare il manuale del Microplate Heater I (*Microplate Heater I User Manual*).
2. Confermare che la temperatura del bagno d'acqua sia 65°C e che vi sia acqua sufficiente per coprire l'intero volume nelle provette dei campioni.
3. 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 20-25°C.
Nota: preparare i campioni in soluzione PreservCyt e SurePath prima di termostatare a temperatura ambiente i campioni precedentemente denaturati e il reagente.
4. Utilizzare il software di analisi del dosaggio *digene* per creare il layout delle piastre. Consultare il rispettivo manuale utente per la creazione di un layout delle micropiastre.
5. Porre i calibratori, i controlli di qualità e i campioni da analizzare in un rack portaprovette nell'ordine in cui verranno analizzati. **Analizzare per PRIMI il calibratore negativo, il calibratore per l'HPV a basso rischio e il calibratore per l'HPV ad alto rischio.** Il calibratore negativo (NC), il calibratore per l'HPV a basso rischio (LRC), il calibratore per l'HPV ad alto rischio (HRC), il controllo di qualità a basso rischio (QC1-LR), il controllo di qualità ad alto rischio (QC2-HR) e i campioni devono essere analizzati in una configurazione a colonna con 8 pozzetti per micropiastra. Vedere l'esempio di layout riportato di seguito.

Esempio di layout per un ciclo di dosaggio di 24 pozzetti di micropiastra:			
Fila	Colonna		
	1	2	3
A	NC	Camp. 1	Camp. 9
B	NC	Camp. 2	Camp. 10
C	NC	Camp. 3	Camp. 11
D	LRC o HRC	Camp. 4	Camp. 12
E	LRC o HRC	Camp. 5	Camp. 13
F	LRC o HRC	Camp. 6	Camp. 14
G	QC1-LR	Camp. 7	Camp. 15
H	QC2-HR	Camp. 8	Camp. 16

- Se si utilizza la metodica della miscela di sonde eterogenee (CPC, Combined-Probe Cocktail Method), NC, LRC e HRC vengono analizzati in tre replicati con la miscela di sonde eterogenee sulla stessa micropiastra. Utilizzare rispettivamente i pozzetti A1, B1 e C1 per NC e i pozzetti D1, E1, F1, G1, H1 e A2 per LRC e HRC. Utilizzare rispettivamente i pozzetti B2 e C2 per i controlli di qualità QC1-LR e QC2-HR e i campioni a partire da D2. **La procedura CPC non è stata convalidata per l'utilizzo con il sistema Rapid Capture.**
- Con la metodica delle due sonde, eseguire i test con la miscela della sonda per l'HPV a basso rischio sul lato sinistro della micropiastra e quelli con la miscela della sonda per l'HPV ad alto rischio sul lato destro della micropiastra.

Dispensare IN PRIMO LUOGO il calibratore negativo (NC) e il calibratore basso rischio (LRC) in tre replicati con la miscela della sonda per l'HPV a basso rischio. Quindi dispensare i controlli di qualità (QC1-LR e QC2-HR) e i campioni singolarmente, anche con la miscela della sonda per l'HPV a basso rischio. Porre i replicati NC in A1, B1, C1; i replicati LCR in D1, E1, F1; QC1-LR in G1; QC2-HR in H1; e i campioni a partire da A2.

POI dispensare NC e il calibratore alto rischio (HRC) in tre replicati con la miscela della sonda per l'HPV ad alto rischio. Quindi dispensare i campioni QC1-LR e QC2-HR singolarmente anche con la miscela della sonda per l'HPV ad alto rischio. Porre i replicati NC in A7, B7, C7; i replicati HRC in D7, E7, F7; QC1-LR in G7; QC2-HR in H7; e i campioni a partire da A8. Vedere il layout di esempio sopra riportato.

Consultare il corrispondente manuale utente per il setup dei calibratori/controlli di qualità/campioni nel software.

- In alternativa, è possibile utilizzare due micropiastre separate per i calibratori, i controlli di qualità e i campioni analizzati con la sonda a basso rischio e ad alto rischio. NC ed LRC vengono dispensati in tre replicati, QC1-LR e QC2-HR vengono dispensati singolarmente con la miscela della sonda per l'HPV a basso rischio su una micropiastra; NC ed HRC vengono dispensati in tre replicati, QC1-LR e QC2-HR vengono dispensati singolarmente con la miscela della sonda per l'HPV ad alto rischio sulla seconda micropiastra. Utilizzare rispettivamente i pozzetti A1, B1 e C1 per NC e i pozzetti D1, E1 ed F1 per LRC o HRC. Utilizzare rispettivamente i pozzetti G1 e H1 per i controlli di qualità QC1-LR e QC2-HR.
- I campioni possono essere analizzati in singolo con la miscela di sonde eterogenee, se si utilizza la metodica CPC, o in singolo con la miscela della sonda per l'HPV a basso rischio e in singolo con la miscela della sonda per l'HPV ad alto rischio, se si utilizza la metodica delle due sonde.

DENATURAZIONE

Note:

- Avvertenza:** Il reagente di denaturazione è corrosivo. Prestare attenzione e indossare guanti non talcati durante la manipolazione.

- **Importante:** Alcuni campioni cervicali possono contenere sangue o altro materiale biologico, che può nascondere i cambiamenti di colore conseguenti all'aggiunta del reagente di denaturazione. Con campioni che presentano un colore scuro prima dell'aggiunta del reagente di denaturazione, 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.
- Durante le fasi di denaturazione e ibridazione, verificare che il livello del bagno d'acqua sia sufficiente, per poter immergere l'intero volume del campione contenuto nella provetta.
- La preparazione di calibratori, controlli di qualità e campioni può essere eseguita fino alla fase di denaturazione; questi materiali possono essere poi 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. Miscelare bene prima dell'uso.
- Dopo la denaturazione e l'incubazione i campioni non sono più considerati infettivi.²⁶ Tuttavia, il personale di laboratorio deve continuare a rispettare le precauzioni nazionali/locali.
- Non rimuovere il dispositivo di prelievo campione prima della denaturazione.
- Per evitare falsi positivi, è di vitale importanza che tutti i calibratori, i controlli di qualità e i campioni in STM vengano a contatto con il reagente di denaturazione. La miscelazione dopo l'aggiunta del reagente di denaturazione è una fase fondamentale: **verificare che il Multi-Specimen Tube Vortexer 2 sia impostato a 100 (velocità massima) e che si formi un vortice visibile nel liquido durante la miscelazione in modo che il liquido bagni l'intera superficie interna della provetta. Se si esegue l'agitazione manuale, accertarsi che tutti i calibratori, i controlli di qualità e i campioni vengano miscelati singolarmente, agitandoli per almeno 5 secondi alla velocità massima, in modo che il vortice che si forma nel liquido bagni tutta la superficie interna della provetta, quindi capovolgere una volta le provette.**

Procedura di preparazione di calibratori, controlli di qualità e campioni in STM

1. Rimuovere e gettare i tappi delle provette di calibratori, controlli di qualità e campioni STM.
Nota: i tappi rimossi dalle provette dei campioni vengono considerati potenzialmente infettivi. Smaltirli in base alla normativa nazionale/locale.
2. Pipettare il reagente di denaturazione con il colorante indicatore in ogni calibratore, controllo di qualità o campione in STM, utilizzando un pipettatore a ripetizione o regolabile. Prestare attenzione a non toccare i lati della provetta, in caso contrario potrebbe verificarsi una contaminazione crociata dei campioni. Il volume di reagente di denaturazione necessario equivale alla metà del volume del campione. Il volume esatto di ciascun tipo di calibratore, controllo di qualità e campione è indicato nella tabella seguente.

Diluire il reagente di denaturazione restante nel flacone prima di smaltirlo nel rispetto delle procedure di laboratorio nazionali/locali.

Calibratore, controllo di qualità o campione	Volumi del reagente di denaturazione necessari
Calibratore negativo	1.000 µl
Calibratore per l'HPV a basso o ad alto rischio	500 µl
Controlli di qualità a basso o ad alto rischio	500 µl
Campione cervicale	500 µl

3. Miscelare i campioni seguendo una delle due metodiche descritte di seguito.

Metodica con Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

Nota: i campioni prelevati con il dispositivo di prelievo *digene* HC2 DNA e miscelati con l'MST Vortexer 2 **devono** essere ibridati utilizzando la metodica con Hybridization Microplate and Microplate Heater I.

- a) Coprire le provette dei calibratori, dei controlli di qualità e dei campioni in STM con la pellicola per sigillare DuraSeal stendendola sopra le provette contenute nel rack.
- b) Posizionare il coperchio del rack sopra le provette coperte con la pellicola e bloccarlo in posizione con le due clip laterali. Tagliare la pellicola con l'apposita taglierina.
- c) Collocare il rack sul Multi-Specimen Tube Vortexer 2 e bloccarlo con il morsetto. Accertarsi che la velocità sia impostata a 100 (valore massimo), quindi ruotare su ON l'interruttore di alimentazione dello strumento. Agitare le provette per 10 secondi.

Metodica di agitazione manuale delle singole provette

- a) Richiudere le provette dei calibratori, dei controlli di qualità e dei campioni in STM con tappi a vite puliti per le provette di prelievo campioni.
- b) Miscelare accuratamente ogni singola provetta, agitandola ad alta velocità per almeno 5 secondi.
- c) Capovolgere ogni provetta una volta per far sì che il liquido bagni la superficie interna, il tappo e il bordo.
- d) Riporre la provetta nel rack.

Indipendentemente dalla metodica di agitazione utilizzata, **durante la miscelazione dovrebbe formarsi un vortice visibile nel liquido contenuto in ogni provetta, in modo che il liquido bagni tutta la superficie interna della provetta.** I calibratori, controlli di qualità e i campioni dovrebbero assumere una colorazione viola.

4. Incubare le provette sul rack in un bagno d'acqua a 65 ± 2 °C per 45 ± 5 minuti (i calibratori denaturati, i controlli di qualità e i campioni possono essere analizzati immediatamente oppure conservati come descritto nelle note sopra riportate). Preparare la miscela o le miscele di sonde per l'HPV durante questa fase di incubazione. Vedere la sezione *Preparazione e conservazione dei reagenti*.

Procedura di preparazione dei campioni in soluzione PreservCyt

Note:

- Per informazioni complete, consultare le istruzioni per l'uso del kit di conversione campioni *digeneHC2*.
- La preparazione di un'aliquota di 4 ml di soluzione PreservCyt produce materiale sufficiente per 2 test, se l'analisi viene eseguita manualmente. Il volume minimo che può essere analizzato è di 4 ml.
- Preparare i campioni in soluzione PreservCyt in lotti di 36 o meno; in caso contrario, i precipitati possono staccarsi durante la decantazione del supernatante. Ciò è importante per conservare l'integrità del precipitato di cellule durante la fase di decantazione. Se si preparano altre fiale di soluzione PreservCyt, non iniziare a prepararle finché non è stata completata la preparazione del primo lotto.

Preparazione del reagente

Utilizzare il reagente di denaturazione (DNR) in dotazione con il test *digene* HC2 HPV DNA (vedere *Preparazione e conservazione dei reagenti*) oppure il DNR in dotazione con il kit di conversione campioni *digene* HC2. Per preparare il DNR in dotazione con il kit di conversione campioni *digene* HC2 aggiungere 3 gocce del colorante indicatore nel flacone di DNR e miscelare accuratamente. La soluzione deve presentarsi di un colore viola scuro uniforme. Per stabilire i volumi necessari, vedere la Tabella 1.

Tabella 1
Volumi necessari: Preparazione del reagente

Numero di test	Volume di soluzione PreservCyt	Volume di tampone di conversione
1-2	4 ml	0,4 ml
3	6 ml	0,6 ml
4	8 ml	0,8 ml
5	10 ml	1,0 ml
6	12 ml	1,2 ml

1. Etichettare una provetta di conversione campioni *digene* HC2, una provetta a fondo conico Sarstedt da 10 ml o una provetta a fondo conico VWR o Corning da 15 ml con il corrispondente numero di identificazione del campione.
2. Maneggiare un campione alla volta:
 - a. Agitare vigorosamente il flacone di PreservCyt finché le cellule non appaiono distribuite in maniera omogenea.
 - b. Pipettare immediatamente il volume adeguato di campione in PreservCyt nella provetta etichettata, in quanto le cellule sedimentano molto rapidamente. Dispensare la soluzione PreservCyt sul fondo conico della provetta per ridurre al minimo il materiale cellulare che aderisce all'interno della provetta.
3. Aggiungere il volume adeguato di tampone di conversione campioni in ogni provetta (vedere la Tabella 1).
4. Richiudere con il tappo e miscelare accuratamente il contenuto di ogni provetta utilizzando un miscelatore vortex con coppetta.

Nota: la procedura con MST Vortexer 2 non è stata convalidata per la miscelazione dei campioni in soluzione PreservCyt con tampone di conversione campioni prima della centrifugazione, quindi non deve essere utilizzata per questa fase.
5. Centrifugare le provette in una centrifuga a cestello oscillante ad velocità pari a $2.900 \pm 150 \times g$ per 15 ± 2 minuti.

6. Durante la centrifugazione, preparare la miscela del mezzo di trasporto campioni/reagente di denaturazione (STM/DNR) in un rapporto 2:1, seguendo la Tabella 2.

Nota: la miscela STM/DNR deve essere preparata fresca ogni giorno in cui viene eseguito il test.

- a. Per determinare il volume totale di miscela STM/DNR necessaria, utilizzare il volume iniziale di campione in soluzione PreservCyt come guida, quindi moltiplicare i volumi di STM e di DNR “per provetta” per il numero di campioni da processare (vedere la Tabella 2).

Tabella 2
Volumi necessari: STM/DNR

N. di test	Volume di soluzione PreservCyt	Volume STM per provetta per miscela STM/DNR finale*	Volume DNR per provetta per miscela STM/DNR finale*	Miscela STM/DNR aggiunta per provetta
1-2	4 ml	120 µl	60 µl	150 µl
3	6 ml	170 µl	85 µl	225 µl
4	8 ml	220 µl	110 µl	300 µl
5	10 ml	270 µl	135 µl	375 µl
6	12 ml	320 µl	160 µl	450 µl

* I volumi elencati in queste colonne non devono essere aggiunti direttamente alla provetta del campione.

- b. Miscelare accuratamente la soluzione agitandola.
7. Rimuovere le provette dalla centrifuga una alla volta e inserirle in un rack o in un rack di conversione. Dovrebbe essere presente un precipitato di colore rosa/arancione sul fondo di ogni provetta.

Nota: i campioni che non presentano un precipitato visibile dopo la centrifugazione non sono accettabili per il test e devono essere scartati.

8. Maneggiare ogni provetta singolarmente:
- Rimuovere il tappo e metterlo da parte su una salvietta di carta pulita priva di fibre.
 - Decantare con cura il supernatante.
 - Mantenere la posizione invertita della provetta e asciugare delicatamente (per circa 6 volte) su una salvietta di carta priva di fibre, fino a quando non cola più alcun liquido dalla provetta. Utilizzare ogni volta una parte pulita della salvietta. Durante l'asciugatura **evitare** che il precipitato cellulare fuoriesca dalla provetta.

Note:

 - Non asciugare più volte con la stessa parte della salvietta di carta priva di fibre.
 - È importante rimuovere la maggior parte di soluzione PreservCyt durante l'asciugatura. Tuttavia, è normale vedere dei residui di soluzione PreservCyt dopo l'asciugatura.
 - Mettere la provetta in un rack o in un rack di conversione.

AGITAZIONE E DENATURAZIONE

Procedura di agitazione manuale

- Aggiungere il volume adeguato di STM/DNR in ogni precipitato (vedere la Tabella 2). Richiudere con il tappo ogni provetta e risospingere i precipitati singolarmente, agitando ogni provetta per almeno 30 secondi alla massima velocità. In caso difficoltà a risospingere il precipitato, agitare per altri 10-30 secondi o fino a quando il precipitato galleggia liberamente, staccandosi dal fondo della provetta. Qualora il precipitato non si sia sciolto dopo un'ulteriore agitazione (2 minuti al massimo), prendere nota dell'identificazione del campione e procedere con la fase successiva.

2. Porre le provette in un rack.
3. Porre il rack in un bagno d'acqua a 65 ± 2 °C per 15 ± 2 minuti. Verificare che il livello d'acqua sia sufficiente per coprire tutto il liquido contenuto nelle provette.
4. Rimuovere il rack con i campioni dal bagno d'acqua e agitare singolarmente i campioni per circa 15-30 secondi.
Nota: verificare che a questo punto tutti i precipitati siano tornati completamente in sospensione. I campioni che ancora presentano un precipitato visibile non sono accettabili per il test e devono essere scartati.
5. Porre nuovamente il rack nel bagno d'acqua a 65 ± 2 °C e continuare la denaturazione per altri 30 ± 3 minuti.
6. Passare alla fase di *ibridazione* o vedere il punto *Interruzione facoltativa* per la conservazione e il trattamento dei campioni denaturati.

Procedura con Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

Note:

- la procedura con Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 è convalidata per la processazione dei campioni in soluzione PreservCyt dopo la centrifugazione e la decantazione del supernatante.
 - Solo l'MST Vortexer 2 è progettato per la processazione di campioni in soluzione PreservCyt.
 - Il rack di conversione e coperchio è progettato appositamente per ospitare le provette di conversione campioni *digene* HC2 (provette a fondo conico VWR o Corning da 15 ml). L'utente deve utilizzare solo un tipo di provetta per volta sul rack di conversione. Altre marche non sono state convalidate per l'utilizzo.
 - È necessario attenersi rigorosamente ai tempi di agitazione specificati per il rack di conversione e coperchio.
 - Il rack di conversione e coperchio non può essere utilizzato per l'agitazione dei calibratori o dei controlli di qualità del kit del test *digene* HC2 DNA. L'altezza delle provette STM impedisce un'adeguata agitazione se si utilizza il rack di conversione e coperchio.
1. Dopo aver asciugato ogni provetta a fondo conico da 15 ml etichettata, collocarla nella posizione corretta nel rack di conversione.
 2. Aggiungere il volume adeguato di miscela STM/DNR ad ogni precipitato (Tabella 2).
 3. Coprire le provette a fondo conico da 15 ml con pellicola per sigillare DuraSeal, stendendola sopra le provette nel rack.
 4. Posizionare il coperchio del rack sopra le provette coperte con la pellicola e bloccarlo in posizione con le due clip laterali. Tagliare la pellicola con l'apposita taglierina, dopo aver bloccato saldamente il coperchio.
 5. Spostare la leva rossa verso l'alto in modo che si trovi in posizione orizzontale.
 6. Porre il rack di conversione e coperchio nell'MST Vortexer 2 in modo che l'angolo intagliato più grande del rack di conversione si trovi nell'angolo anteriore destro. Posizionare il rack e coperchio sulla piattaforma dell'MST Vortexer 2 in modo che sia saldamente inserito all'interno delle guide. Fissare il rack in posizione, spostando la leva rossa verso il basso in posizione verticale. In tal modo il rack si blocca in posizione.
 7. Accertarsi che la velocità sia impostata a 100 (valore massimo) e che l'interruttore a levetta Pulser sia in posizione OFF.
 8. Ruotare l'interruttore di alimentazione dello strumento su ON. **Agitare le provette per 30 secondi.**
 9. Ruotare l'interruttore di alimentazione dello strumento su OFF.
 10. Rimuovere il rack di conversione e coperchio dall'MST 2 Vortexer, sollevando la leva rossa verso l'alto.

11. Porre il rack in un bagno d'acqua a 65 ± 2 °C per 15 ± 2 minuti. Verificare che il livello dell'acqua copra completamente tutto il liquido in tutte le provette.
12. Dopo un'incubazione di 15 minuti, rimuovere il rack con i campioni dal bagno d'acqua.
13. Per impedire spruzzi, asciugare l'acqua in eccesso nel rack prima di rimetterlo sull'MST Vortexer 2.
14. Fissare il rack di conversione e coperchio nell'MST Vortexer 2 come descritto al *punto 6*.
15. Accertarsi che la velocità sia impostata a 100, quindi ruotare su ON l'interruttore di alimentazione dello strumento. **Agitare le provette per 1 minuto.**
16. Ruotare l'interruttore di alimentazione dello strumento su OFF.
Nota: la procedura con MST Vortexer 2 standardizza la velocità, i tempi e il processo di miscelazione, eliminando la necessità di verificare visivamente la presenza di precipitati cellulari, come nella procedura di agitazione manuale.
17. Porre nuovamente il rack nel bagno d'acqua a 65 ± 2 °C e continuare la denaturazione per 30 ± 3 minuti.
18. Rimuovere il rack dal bagno d'acqua, asciugarlo e fissarlo nello strumento.
19. Ruotare l'interruttore di alimentazione dello strumento su ON. **Agitare per 10 secondi all'impostazione massima.**
20. Ruotare l'interruttore di alimentazione dello strumento su OFF. Rimuovere il rack.
21. Rimuovere immediatamente il coperchio del rack e la pellicola per sigillare DuraSeal dai campioni.
22. Passare alla fase di *ibridazione* o vedere il punto *Interruzione facoltativa* per la conservazione e il trattamento dei campioni denaturati.

Procedura di preparazione dei campioni in SurePath (SOLO per test del DNA dell'HPV ad alto rischio)

Dopo il trattamento citologico, procedere come segue:

1. Verificare che il volume del liquido osservato sia pari a 2,8 ml.
ATTENZIONE: Se il precipitato cellulare residuo sembra contenere una quantità di liquido inferiore a 1 ml, è possibile che il fluido conservante SurePath non sia stato aggiunto dopo l'esame citologico, pertanto il campione NON è idoneo per il test del DNA dell'HPV ad alto rischio.
2. Accertarsi che i campioni vengano temostatati a temperatura ambiente.
3. Centrifugare il campione in una centrifuga a cestello oscillante ad una velocità pari a $800 \pm 15 \times g$ per 10 ± 1 minuti.
4. Rimuovere le provette dalla centrifuga.
5. Decantare attentamente il supernatante subito dopo la centrifugazione e asciugare delicatamente ogni provetta (circa 3 volte) su salviette di carta assorbente per rimuovere il liquido in eccesso. Osservare il precipitato in ogni provetta. **Durante l'asciugatura evitare che il precipitato cellulare fuoriesca dalla provetta.**
6. Posizionare le provette nel rack.
7. Aggiungere 200 µl di STM a ogni precipitato utilizzando un pipettatore a ripetizione o regolabile.
Nota: le provette possono essere miscelate senza tappo.
8. Risospendere ogni precipitato, agitando ogni provetta singolarmente per 15 secondi ad una velocità elevata. In caso difficoltà a risospendere il precipitato, agitare per altri 5 - 30 secondi o fino a quando il precipitato galleggia liberamente, staccandosi dal fondo della provetta, e sembra sciogliersi.
9. Pipettare 100 µl di reagente di denaturazione preparato (con colorante indicatore) per ogni campione, usando un pipettatore a ripetizione o regolabile.

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

In caso di smaltimento del reagente di denaturazione rimanente, attenersi alle normative applicabili locali, statali e federali per lo smaltimento di sostanze corrosive.

10. Miscelare accuratamente ogni provetta, agitandola singolarmente ad una velocità elevata per 5 secondi.

Nota: le provette possono essere miscelate senza tappo.

Etichettare la provetta a fondo conico da 15 ml con il tipo e l'identificazione adeguati del campione (ad esempio "SP" per il campione in SurePath) e posizionarla in un rack.

Nota: se si utilizza il sistema Rapid Capture System per una processazione semi-automatica, occorre utilizzare provette a fondo conico VWR o Corning da 15 ml per garantire il corretto posizionamento nel rack di conversione *digene* (rack color argento).

11. Trasferire tutto il volume della provetta in una provetta a fondo conico da 15 ml con tappo a vite, utilizzando una pipetta monouso di trasferimento con puntale standard da 7-ml o una pipetta equivalente¹.
12. Chiudere con il tappo le provette a fondo conico da 15 ml.
13. Incubare in un bagno d'acqua a 65 ± 2 °C per 90 ± 5 minuti.

ATTENZIONE: il tempo di incubazione è maggiore di quello necessario per altri tipi di campione approvati.

14. Se il test dell'HPV sarà completato nello stesso giorno, denaturare i calibratori del test *digene* HC2 DNA secondo le presenti istruzioni per l'uso.
15. Rimuovere il rack campioni dal bagno d'acqua.

Interruzione facoltativa

Dopo la denaturazione, i campioni in STM e i campioni in PreservCyt e SurePath convertiti possono essere conservati a 2-8 °C fino al giorno dopo o a -20 °C per un massimo di 3 mesi. Per il congelamento di una notte, i campioni possono essere lasciati nel rack di conversione con la pellicola DuraSeal e il coperchio del rack riposizionato. Prima del congelamento a -20 °C, occorre rimuovere il coperchio del rack e la pellicola DuraSeal e applicare i tappi sulle provette. In ogni caso, i campioni devono essere termostatati a temperatura ambiente (20- 25 °C) e agitati accuratamente, prima di procedere alla fase di ibridazione.

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

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.

IBRIDAZIONE: METODICA DELLA MISCELA DI SONDE ETEROGENEE (CPC) E METODICA DELLE DUE SONDE

Note:

- Le miscele di sonde dell'HPV sono viscosi. Verificare che la miscela di sonde sia accuratamente miscelata e che la necessaria quantità sia completamente dispensata in ogni pozzetto della micropiastra. Vedere la sezione *Preparazione e conservazione dei reagenti*.
- Se il campione denaturato è stato conservato a -20 °C, lasciarlo scongelare a 20-25 °C, quindi agitarlo accuratamente prima di procedere all'ibridazione.

¹ I test di verifica QIAGEN hanno utilizzato provette a fondo conico da 15 ml di marca VWR.

- Pre-riscaldare il Microplate Heater I a 65 ± 2 °C per almeno 60 minuti prima dell'uso. Per maggiori dettagli, consultare il manuale del Microplate Heater I (*Microplate Heater I User Manual*).

Metodica di ibridazione mediante piastra di ibridazione e Microplate Heater I

Nota: I campioni prelevati con il dispositivo di prelievo *digene* HC2 DNA in STM e processati utilizzando la metodica con MST Vortexer 2 possono essere ibridati **solo** utilizzando la metodica con Microplate Heater I.

1. Procurarsi ed etichettare una micropiastra di ibridazione.
2. Rimuovere i calibratori, i controlli di qualità e i campioni dal bagno d'acqua dopo l'incubazione. Se si utilizza il Multi-Specimen Tube Vortexer 2, agitare l'intero rack di campioni in STM per almeno 5 secondi alla velocità massima. Per i campioni in soluzione PreservCyt o in SurePath, agitare l'intero rack di conversione per almeno 10 secondi alla velocità massima. In alternativa, agitare ogni provetta singolarmente per almeno 5 secondi.
3. Pipettare 75 µl di ogni calibratore, controllo di qualità o campione sul **fondo** del pozzetto vuoto della micropiastra di ibridazione dopo aver creato il layout delle piastre come indicato al punto *Setup*. Evitare di toccare i lati dei pozzetti e limitare la formazione di bolle d'aria. Utilizzare un puntale per pipetta extra lungo pulito per ogni trasferimento al fine di evitare la contaminazione crociata di calibratori, controlli di qualità o campioni. Non rimuovere il dispositivo di prelievo campione dalla provetta di trasporto. Le provette dei campioni denaturati possono essere chiuse con gli appositi tappi a vite e conservate con i dispositivi di prelievo inseriti. I campioni in PreservCyt denaturati possono essere richiusi con i tappi originali.

Nota: Possono verificarsi falsi positivi se le aliquote dei campioni non vengono trasferite correttamente. Durante il trasferimento del campione, fare in modo che il puntale della pipetta non venga a contatto con l'interno della provetta durante la dispensazione dell'aliquota di 75 µl.

4. Dopo avere trasferito l'ultimo campione, coprire la piastra con un coperchio e **incubare la micropiastra di ibridazione per 10 minuti a 20-25 °C**.
5. Aliquotare la miscela della sonda preparata e accuratamente agitata in un contenitore per reagenti monouso. Pipettare con precisione 25 µl della miscela della sonda in ogni pozzetto contenente calibratori, controlli di qualità e campioni, utilizzando un pipettatore a 8 canali e puntali nuovi per ogni fila. Dispensare il volume della sonda in ogni pozzetto di ibridazione, evitando la formazione di spruzzi. Evitare di toccare i lati del pozzetto. Posizionare il coperchio sulla micropiastra e lasciarvelo per tutta la durata dell'incubazione di denaturazione.
6. Coprire la micropiastra di ibridazione con un apposito coperchio e agitare sul Rotary Shaker I del sistema Hybrid Capture System impostato a 1.100 ± 100 giri/min per 3 ± 2 minuti. *I calibratori, i controlli di qualità e i campioni dovrebbero assumere una colorazione gialla dopo l'agitazione.* I pozzetti che rimangono viola potrebbero non avere ricevuto la quantità corretta di miscela della sonda. Aggiungere altri 25 µl di miscela della sonda ai campioni rimasti viola e agitare di nuovo. Se dopo questa procedura vi sono ancora pozzetti viola, è necessario analizzare nuovamente i campioni.

Note:

- Dopo l'agitazione, i campioni in soluzione PreservCyt assumono una colorazione rosa anziché gialla.
 - Collocare la micropiastra di ibridazione nel Microplate Heater I, prestando attenzione ad evitare la formazione di spruzzi.
7. Incubare nel Microplate Heater I preriscaldato e termostato a 65 ± 2 °C per 60 ± 5 minuti.

Metodica di ibridazione con microprovette e bagno d'acqua

Note:

- La processazione dei campioni prelevati con il dispositivo di prelievo *digene* HC2 DNA in STM utilizzando la metodica con MST Vortexer 2 per la miscelazione e la metodica con bagno d'acqua per l'ibridazione **non è stata convalidata**. I campioni prelevati con il dispositivo di prelievo *digene* in STM e processati utilizzando la metodica con MST Vortexer 2 possono essere ibridati **solo** utilizzando la metodica con Microplate Heater I.
- Se il campione denaturato è stato conservato a -20 °C, lasciarlo scongelare a 20-25 °C, quindi agitarlo bene prima di procedere all'ibridazione.

1. Etichettare e collocare il numero richiesto di microprovette di ibridazione pulite nel rack per microprovette.
2. Rimuovere i calibratori, i controlli di qualità e i campioni dal bagno d'acqua dopo l'incubazione. Agitare ogni provetta singolarmente per almeno 5 secondi, prima di rimuovere le aliquote.
3. Pipettare 75 µl di ogni calibratore, controllo di qualità o campione sul **fondo** della microprovetta di ibridazione vuota dopo aver creato il layout delle piastre come indicato al punto Setup. Evitare di toccare i lati delle microprovette e limitare la formazione di bolle d'aria. Utilizzare un puntale per pipetta extra lungo pulito per ogni trasferimento al fine di evitare la contaminazione crociata di calibratori, controlli di qualità o campioni. Non è necessario rimuovere il dispositivo di prelievo campione dalla provetta di trasporto. Le provette dei campioni denaturati possono essere chiuse con gli appositi tappi a vite e conservate con i dispositivi di prelievo inseriti.

Nota: Possono verificarsi falsi positivi se le aliquote dei campioni non vengono trasferite correttamente. Durante il trasferimento del campione, fare in modo che il puntale della pipetta non venga a contatto con l'interno della provetta durante la dispensazione dell'aliquota di 75 µl.

4. Dopo avere trasferito l'ultimo campione, **incubare le microprovette di ibridazione per 10 minuti a 20-25 °C**.
5. Aliquotare la miscela della sonda preparata e accuratamente agitata in un contenitore per reagenti monouso. Pipettare con precisione 25 µl della miscela della sonda in ogni microprovetta contenente calibratori, controlli di qualità e campioni, utilizzando un pipettatore a 8 canali e puntali nuovi per ogni fila. Dispensare il volume della sonda in ogni microprovetta di ibridazione, evitando la formazione di spruzzi. Evitare di toccare i lati delle provette. Ispezionare il rack dal fondo per verificare che tutte le provette abbiano ricevuto la corretta quantità di miscela della sonda.
6. Coprire le microprovette con un copripietra. Posizionare il coperchio sul rack. Agitare il rack per microprovette sul Rotary Shaker I impostato a 1.100 ± 100 giri/min per 3 ± 2 minuti. *I calibratori, controlli di qualità e i campioni dovrebbero assumere una colorazione gialla*. Le provette che rimangono viola potrebbero non avere ricevuto la quantità corretta di miscela della sonda. Aggiungere altri 25 µl di miscela della sonda ai campioni rimasti viola e agitare di nuovo. Se dopo questa procedura vi sono ancora provette viola, è necessario analizzare nuovamente i campioni.

Nota: Dopo l'agitazione, i campioni in soluzione PreservCyt assumono una colorazione rosa anziché gialla.

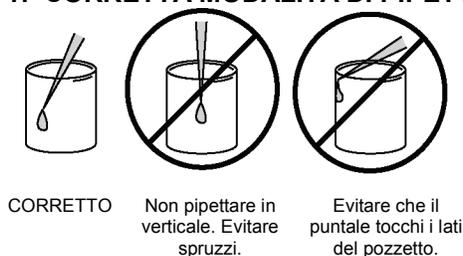
7. Incubare in un bagno d'acqua a 65 ± 2 °C per 60 ± 5 minuti. Verificare che il livello del bagno d'acqua sia sufficiente per coprire l'intero volume della miscela di ibridazione. Il rack per microprovette deve galleggiare nel bagno d'acqua.

Nota: Creare un layout delle piastre usando il software di analisi del dosaggio *digene* qualora non sia stato già fatto precedentemente.

CATTURA DEGLI IBRIDI

1. Rimuovere dal supporto della micropiastra tutti i pozzetti della micropiastra di cattura non necessari. Riporre i pozzetti della micropiastra non utilizzati nella busta originale e risigillarla. Numerare con un pennarello le colonne 1, 2, 3. . . . Etichettare la micropiastra con un identificativo appropriato. I campioni verranno aggiunti ai pozzetti in base al layout di esempio preparato al punto Setup.
2. Estrarre con cautela dal Microplate Heater I la micropiastra di ibridazione contenente i calibratori, i controlli di qualità e i campioni. Rimuovere immediatamente il coperchio della micropiastra e posizionarlo su una superficie pulita. In alternativa, rimuovere il rack per microprovette dal bagno d'acqua. Rimuovere immediatamente il coperchio del rack e sollevare lentamente il copripiastra fino a toglierlo.
3. Trasferire tutto il contenuto (circa 100 μ l) di calibratori, controlli di qualità e campioni dai pozzetti della micropiastra di ibridazione o dalle microprovette sul fondo dei corrispondenti pozzetti della micropiastra di cattura, utilizzando un pipettatore a 8 canali. Utilizzare puntali per pipetta nuovi sul pipettatore a 8 canali per il trasferimento di ogni colonna 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** del puntale della pipetta sul bordo superiore dei pozzetti della micropiastra di cattura (vedere lo *schema 1*).

SCHEMA 1: CORRETTA MODALITÀ DI PIPETTAMENTO



4. Coprire la micropiastra di cattura con il coperchio della piastra o un copripiastra e agitare sul Rotary Shaker I impostato a 1.100 ± 100 giri/min per 60 ± 5 minuti a $20-25$ °C.
5. Preparare il tampone di lavaggio e controllare i contenitori del liquido lavaggio e di scarico dell'Automated Plate Washer durante l'incubazione. Vedere la sezione Preparazione e conservazione dei reagenti.
6. Una volta completata la fase di cattura, estrarre la micropiastra di cattura dal Rotary Shaker I e rimuovere con cautela il coperchio o il copripiastra. Eliminare il liquido dai pozzetti, versandolo nel lavandino; capovolgere completamente la piastra sul lavandino e scuotere con forza con un movimento verso il basso, prestando attenzione a non formare spruzzi effettuando il travaso troppo vicino al fondo del lavandino. **Non capovolgere nuovamente la piastra**; asciugare picchettando con decisione per 2-3 volte su salviettine Kimtowels pulite o equivalenti salviettine di carta prive di fibre. Verificare che tutto il liquido sia stato rimosso dai pozzetti e che la parte superiore della micropiastra sia asciutta.

RILEVAZIONE DEGLI IBRIDI

Note:

- Effettuare le aggiunte sulla piastra, procedendo da sinistra a destra e utilizzando un pipettatore a 8 canali.
- Si consiglia di impiegare la tecnica di pipettamento inverso per dispensare il reagente in modo più uniforme. Con questa tecnica i puntali per pipetta vengono inizialmente riempiti in eccesso, utilizzando il secondo arresto del controllo di aspirazione/erogazione del pipettatore (stantuffo). Vedere la procedura descritta di seguito. Pulire i puntali nel contenitore per

reagenti monouso per rimuovere il reagente in eccesso prima di procedere alla dispensazione sulla piastra.

- Se lo si desidera, il pipettatore può essere stabilizzato appoggiando la parte mediana del puntali della pipetta sul bordo superiore dei pozzetti della micropiastra. Prestare attenzione a non toccare i lati dei pozzetti della micropiastra, in caso contrario potrebbe verificarsi una contaminazione crociata dei campioni. Vedere lo schema 1 illustrato in precedenza.
1. Aliquotare il volume corretto di reagente di rilevazione 1 in un contenitore per reagenti monouso (per le istruzioni vedere la sezione *Preparazione e conservazione dei reagenti*). Pipettare con precisione 75 µl del reagente di rilevazione 1 in ogni pozzetto della micropiastra di cattura, utilizzando un pipettatore a 8 canali, secondo la tecnica di pipettamento inverso.

Procedura di pipettamento inverso:

- a) Inserire i puntali su un pipettatore a 8 canali, facendo attenzione che tutti i puntali siano alloggiati correttamente.
 - b) Spingere lo stantuffo del pipettatore oltre il primo arresto fino al secondo arresto.
 - c) Immergere i puntali nella soluzione del reagente di rilevazione 1.
 - d) Rilasciare lentamente lo stantuffo e lasciare che la soluzione riempi i puntali.
 - e) Dispensare la soluzione nei pozzetti della micropiastra (75 µl), premendo lo stantuffo fino al primo arresto. Non rilasciare lo stantuffo finché i puntali delle pipette non sono stati reimmersi nella soluzione del reagente di rilevazione 1.
 - f) Riempire i puntali e ripetere la procedura fino al riempimento completo di tutti i pozzetti. Riempire i pozzetti della micropiastra procedendo da sinistra a destra. 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.
2. Coprire le piastre con il coperchio o la pellicola Parafilm pulita (o materiale equivalente) e incubare a 20-25 °C per 30-45 minuti.

LAVAGGIO

Lavare la piastra di cattura seguendo una delle due procedure descritte di seguito.

Metodica con Automated Plate Washer

Nota: Tenere sempre l'Automated Plate Washer su **ON** (acceso). Verificare che il contenitore del liquido di risciacquo sia pieno e che il contenitore di scarico sia vuoto. L'Automated Plate Washer effettua di routine il lavaggio di pulizia del sistema. Per maggiori dettagli, consultare il manuale dell'Automated Plate Washer.

PRIMA DI OGNI USO:

- Verificare che il contenitore del liquido di lavaggio sia riempito con almeno 1 litro di soluzione del tampone di lavaggio. In caso contrario, preparare la soluzione del tampone di lavaggio. Vedere la sezione Preparazione e conservazione dei reagenti.
 - Verificare che il contenitore del liquido 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.
1. Rimuovere il coperchio della piastra e posizionare la piastra sulla piattaforma dell'Automated Plate Washer.
 2. Verificare che l'Automated Plate Washer sia acceso e che sul display compaia "Digene Wash Ready" (Lavaggio digene pronto) o "P1".

Nota: Se si utilizza solo una striscia parziale di pozzetti, prima del lavaggio posizionare i pozzetti vuoti della micropiastra nella piastra di cattura in modo da completare la colonna.

3. Selezionare il numero di strisce di cui eseguire il lavaggio premendo il tasto "Rows" (File) e "+" o "-" per effettuare la regolazione. Premere il tasto "Rows" per tornare a "Digene Wash Ready" o "P1".
4. Premere "Start/Stop" per avviare il sistema.
5. L'Automated Plate Washer esegue sei cicli di riempimento e aspirazione impiegando circa 10 minuti. Durante il programma vi sarà una breve pausa, quindi non rimuovere la piastra in anticipo. Quando il lavaggio è terminato, sul display compare "Digene Wash Ready" o "P1".
6. Estrarre la micropiastra dall'Automated Plate Washer una volta terminato il programma. La piastra dovrà presentarsi bianca e nei pozzetti della micropiastra non devono rimanere tracce di liquido rosa residuo.

Metodica di lavaggio manuale

1. Rimuovere il reagente di rilevazione 1 dai pozzetti, posizionando delle salviettine Kimtowels pulite, o altre salviettine equivalenti prive di fibre, sopra la piastra e capovolgerla con cautela. Accertarsi che le salviettine di carta siano a contatto con tutta la superficie della piastra, poi capovolgere la piastra. Lasciare la piastra in scarico per 1-2 minuti. Asciugare accuratamente su salviettine Kimtowels pulite o equivalenti salviettine di carta prive di fibre. Gettare le salviettine di carta usate per evitare la contaminazione da fosfatasi alcalina durante le fasi successive.
2. Lavare a mano la piastra per 6 volte utilizzando il sistema di lavaggio. Ogni pozzetto viene lavato riempiendolo fino a farlo traboccare in modo da rimuovere il reagente di rilevazione 1 dalle parti superiori del pozzetto. Il lavaggio inizia dal pozzetto A1 e continua a serpentina, procedendo verso destra e verso il basso. Dopo che tutti i pozzetti sono stati riempiti, 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.
3. Dopo il lavaggio, asciugare la piastra, capovolgendola su salviettine Kimtowels o equivalenti salviettine di carta prive di fibre e picchiettando con decisione per 3-4 volte. Sostituire le salviettine di carta e asciugare di nuovo. Lasciare la piastra capovolta e farla asciugare per 5 minuti. Asciugarla ancora una volta.
4. La piastra dovrà presentarsi bianca e nei pozzetti della micropiastra non devono rimanere tracce di liquido rosa residuo.

AMPLIFICAZIONE DEL SEGNALE

NOTE:

- Utilizzare un nuovo paio di guanti per manipolare il reagente di rilevazione 2.
 - Aliquotare **solo** la quantità di reagente necessaria per l'esecuzione del test in un apposito contenitore per reagenti monouso, al fine di evitare la contaminazione del reagente di rilevazione 2. Vedere la sezione Preparazione dei reagenti. **Non versare di nuovo il reagente di rilevazione 2 nel flacone originale. Gettare il materiale non utilizzato dopo l'uso.**
 - L'aggiunta di reagente di rilevazione 2 deve essere effettuata senza interruzione. I tempi di incubazione di tutti i pozzetti devono essere il più possibile identici.
 - Prestare attenzione a non toccare i lati del pozzetto della micropiastra e ad evitare la formazione di spruzzi di reagente sui puntali, poiché in caso contrario potrebbe verificarsi una contaminazione crociata dei campioni (vedere lo *schema 1*).
1. Pipettare con precisione 75 µl di reagente di rilevazione 2 in ogni pozzetto della micropiastra di cattura, utilizzando un pipettatore a 8 canali come descritto in precedenza. *Tutti i pozzetti della micropiastra dovrebbero assumere una colorazione gialla.* Verificare che tutti i pozzetti siano stati riempiti osservando l'intensità della colorazione. Tutti i pozzetti dovrebbero presentare più o meno la stessa intensità.

2. Coprire le micropiastre con il coperchio o la pellicola Parafilm pulita (o materiale equivalente) e incubare a 20-25 °C per 15 minuti. Evitare la luce solare diretta.
3. Leggere la micropiastro sullo strumento DML dopo 15 minuti (e non oltre 30 minuti) di incubazione.
4. Il protocollo del software specifico del dosaggio consente di inserire le informazioni pertinenti del test direttamente nel software.
5. Se non è stata utilizzata una micropiastro completa, rimuovere i pozzetti utilizzati dal supporto della micropiastro, lavare accuratamente il supporto con acqua distillata o deionizzata, asciugarlo e tenerlo da parte per il dosaggio successivo.

CRITERI DI VERIFICA DELLA CALIBRAZIONE DEL DOSAGGIO

La verifica della calibrazione del dosaggio viene eseguita per garantire che i reagenti, i calibratori e i controlli di qualità funzionino correttamente, permettendo una determinazione precisa del valore cutoff del dosaggio. Il test *digene* HC2 HPV DNA richiede una calibrazione per ogni dosaggio, pertanto è necessario verificare ogni dosaggio sulla base dei seguenti criteri. Questa procedura di verifica non sostituisce i test con i controlli di qualità interni. I protocolli di dosaggio del software di analisi del dosaggio *digene* verificano automaticamente i criteri seguenti.

1. Calibratore negativo

Il calibratore negativo deve essere analizzato in tre replicati ad ogni dosaggio del test. Il calibratore negativo deve avere un valore ≥ 10 e ≤ 250 RLU per poter procedere. I risultati del calibratore negativo devono mostrare un coefficiente di variazione (%CV) $\leq 25\%$. Se il %CV è > 25 , scartare il valore RLU del calibratore che più si allontana dalla media e ricalcolare la media utilizzando i due valori rimanenti. Se la differenza fra la media e ciascuno dei due valori è $\leq 25\%$, passare alla fase 2. In caso contrario, la calibrazione del dosaggio non è valida ed è necessario ripetere il dosaggio per tutti i campioni delle pazienti. Pertanto, i risultati ottenuti non devono essere messi a referto.

2. Calibratori

Il calibratore o calibratori devono essere analizzati in tre replicati ad ogni dosaggio. Con la metodica CPC, entrambi i calibratori devono essere analizzati in tre replicati. I risultati dei calibratori devono mostrare un coefficiente di variazione (%CV) $\leq 15\%$. Per la metodica CPC, il %CV di LRC, HRC e LRC-HRC combinati deve essere $\leq 15\%$. Se il %CV è > 15 , scartare il valore RLU del calibratore che più si allontana dalla media e ricalcolare la media utilizzando i valori rimanenti. È possibile cancellare solo 1 replicato LRC e 1 replicato HRC. Se il %CV dei calibratori è $\leq 15\%$, passare alla fase 3. In caso contrario, la calibrazione del dosaggio non è valida ed è necessario ripetere il dosaggio per tutti i campioni delle pazienti. Pertanto, i risultati ottenuti non devono essere messi a referto.

La calibrazione del dosaggio sopra descritta per i calibratori viene eseguita automaticamente dal software di analisi del dosaggio *digene* e stampata sul rapporto di analisi dei dati. **I protocolli di analisi del dosaggio *digene* per l'HPV verificano automaticamente che il %CV dei calibratori per l'HPV a basso rischio e ad alto rischio sia $\leq 15\%$.** Tuttavia, le versioni v1.0.2 e v1.0.3 del software di analisi del dosaggio *digene* NON invalidano il dosaggio a meno che il %CV non sia $> 25\%$ per i calibratori. Pertanto, l'utente deve verificare manualmente che il %CV calcolato dal software di analisi del dosaggio *digene* sia $\leq 15\%$ e procedere come indicato per la situazione 1 nella tabella di seguito riportata. Se il %CV dei replicati dei calibratori rientra nell'intervallo 15-25, vedere le istruzioni riportate nella tabella seguente per la situazione 2 o 3 e procedere come indicato nella colonna "Intervento dell'utente".

Situazione	Risultato del %CV per i replicati LRC e/o HRC	Azione eseguita dal software di analisi del dosaggio <i>digene</i>	Intervento dell'utente
1	≤ 15%	Dosaggio indicato come "Valid" (valido)	I risultati possono essere messi a referto; non sono richiesti altri interventi.
2	Fra 15% e 25%	Nessun valore estremo cancellato e dosaggio indicato come "Valid"	Eliminare il valore RLU del calibratore che più si allontana dalla media. Ricalcolare il %CV del calibratore con i due valori restanti. Se il %CV dei valori RLU restanti è > 15%, il dosaggio non è valido. I risultati non possono essere messi a referto. Se il %CV dei valori RLU restanti è ≤ 15%, ricalcolare il valore cutoff del dosaggio, quindi ricalcolare il rapporto RLU/valore cutoff di ciascun campione alla luce questo valore cutoff. I valori ricalcolati possono essere messi a referto.
3	Fra 15% e 25%	Un valore estremo del calibratore cancellato e dosaggio indicato come "Valid"	Il test non è valido. I risultati non possono essere messi a referto. Si deve ripetere il test.
4	> 25%	Un valore estremo cancellato e dosaggio indicato come "Invalid" (non valido)	Il test non è valido. I risultati non possono essere messi a referto. Si deve ripetere il test.

Per calcolare manualmente il %CV, come richiesto nel caso della situazione 2 sopra descritta, l'utente deve dividere la deviazione standard (STDEV) (n-1) dei restanti valori RLU dei replicati per la media dei restanti valori RLU dei replicati (LRC o HRC o entrambi) e moltiplicare questo risultato per 100.

Per calcolare il %CV utilizzando Microsoft® Excel® (in dotazione con la precedente versione del software di analisi del dosaggio *digene*), l'utente può calcolare la deviazione standard dei replicati del calibratore utilizzando la formula *STDEV* (Dev. stand.) e calcolare il valore RLU medio del calibratore utilizzando la formula *AVERAGE* (Media). Una volta ottenuti questi valori, per ottenere il %CV dividere STDEV per AVERAGE e moltiplicare il risultato per 100.

$$(STDEV/AVERAGE) * 100 = \%CV$$

Per domande sul calcolo dei %CV e su come ricalcolare il valore cutoff del dosaggio o il rapporto RLU/cutoff dei campioni, rivolgersi al rappresentante QIAGEN locale.

Per stabilire la riproducibilità dei calibratori e stimare la frequenza con cui è necessario eseguire i calcoli manuali, sono stati raccolti i risultati di tre valutazioni cliniche riguardanti 152 cicli di dosaggio eseguiti con il test *digene* HC2 HPV DNA. I risultati hanno messo in luce che il %CV medio di questi 152 cicli di dosaggio è 8,1. Considerando tutti e tre i replicati del calibratore per ogni ciclo di dosaggio, è stata osservata una riproducibilità del calibratore (%CV) >15% solo in 17 cicli su 152 (11,2%), dove 10 su 17 di questi cicli di dosaggio hanno dato un risultato del %CV compreso fra 15 e 25 (situazione 2). Per i 17 cicli di dosaggio che hanno dato come risultato un %CV > 15, è stato rimosso un solo valore estremo ed è stato ricalcolato il %CV. In seguito all'intervento dell'utente per la situazione 2, solo il %CV di un ciclo di dosaggio è rimasto >15, invalidando il ciclo. È stato calcolato il %CV dei restanti 151 cicli di dosaggio, ottenendo un %CV medio pari a 6,0.

- I risultati della media dei calibratori (LRC o HRC) e della media del calibratore negativo (NC) vengono utilizzati per calcolare il rapporto LRC/NC o HRC/NC per ogni sonda. Le versioni precedenti (V1.0.2 e V1.0.3) dei protocolli del software di analisi del dosaggio *digene* non calcolano correttamente gli intervalli accettabili. Questi rapporti devono soddisfare i criteri seguenti per la verifica della calibrazione del dosaggio prima di poter procedere all'interpretazione dei risultati dei campioni:

METODICA CPC	METODICA DELLE DUE SONDE
Verifica della calibrazione del dosaggio Intervalli accettabili	Verifica della calibrazione del dosaggio Intervalli accettabili
$2,0 \leq \overline{LRC} / \overline{NC} \leq 15$	$2,0 \leq \overline{LRC} / \overline{NCLR} \leq 15$ (lato LR)
$2,0 \leq \overline{HRC} / \overline{NC} \leq 15$	$2,0 \leq \overline{HRC} / \overline{NCHR} \leq 15$ (lato HR)
$2,0 \leq (\overline{LRC} \text{ e } \overline{HRC}) / \overline{NC} \leq 15$	

4. Calcolare i rapporti corretti $\overline{LRC} / \overline{NC}$ o $\overline{HRC} / \overline{NC}$ per ciascun gruppo di sonde. Se i rapporti sono $\geq 2,0$ e ≤ 15 , passare al punto successivo. Se qualcuno dei rapporti risulta $< 2,0$ o > 15 , **il test non è valido per la sonda specifica e deve essere ripetuto**. Ripetere l'analisi di tutti i campioni delle pazienti che fanno parte dello stesso ciclo.

Nota: Sono stati stabiliti intervalli accettabili per il calibratore negativo e i calibratori positivi solo per lo strumento DML.

CALCOLO DEL VALORE CUTOFF

Una volta che il dosaggio è stato convalidato in base ai criteri sopra esposti, i valori cutoff per determinare i campioni positivi sono i seguenti:

1) Metodica della miscela di sonde eterogenee: $\frac{(\text{replicati LRC} + \text{replicati HRC})}{\# \text{ di replicati}}$

2) Metodica delle due sonde: Valore cutoff della sonda per l'HPV a basso rischio = $LRC\bar{x}$
Valore cutoff della sonda per l'HPV ad alto rischio = $HRC\bar{x}$

Esempio di calcoli del valore cutoff					
per:		Sonda per l'HPV a basso o ad alto rischio Metodica delle due sonde	Sonda per l'HPV a basso rischio Metodica CPC	Sonda per l'HPV ad alto rischio Metodica CPC	Sonde per l'HPV eterogenee Metodica CPC
	Valori RLU di NC	Valori RLU di LRC o HRC	Valori RLU di LRC	Valori RLU di HRC	Valori RLU di LRC e HRC
	97	312	330	235*	330
	101	335	305	295	305
	91	307	385	279	385
					295
					235*
					279
Valore RLU medio	96	318	340	287*	318,8*
%CV	4,9	4,7	12,0	3,9*	13,0
$LRC\bar{x}/NC\bar{x}$	N/V	3,31	3,54	3,00	3,32

Il valore RLU medio del calibratore positivo determina il valore cutoff del dosaggio. Pertanto, il valore cutoff di positività è $(LRC\bar{x}) = 318$.

* Il %CV medio dei 6 replicati è stato di 16,8. Il replicato con un valore di 235 è stato cancellato. Il %CV dei replicati restanti è stato di 13,0 con una media di 318,8. Il %CV iniziale dell'HRC è stato di 11,5.

I valori RLU di tutti i campioni devono essere convertiti in un rapporto rispetto al valore cutoff corretto. Ad esempio, tutti i dosaggi effettuati con la sonda per l'HPV a basso rischio devono essere espressi come RLU/valore cutoff a basso rischio del campione. Lo stesso dicasi per i campioni analizzati con la sonda per l'HPV ad alto rischio o le sonde CPC.

Note: I valori RLU/CO e i valori di positività/negatività per tutti i campioni sono riportati nel *rapporto di analisi dei dati* dello strumento DML.

Per l'applicazione dello strumento del sistema Rapid Capture System, il protocollo del software RCS HPV è stato programmato in modo da applicare un fattore di regolazione della calibrazione (CAF) di 0,8 alla media del valore RLU dei replicati del calibratore positivo valido. Questo fattore CAF è necessario affinché le caratteristiche delle prestazioni del dosaggio restino equivalenti alla procedura manuale del test. Questa modifica si applica solo ai dosaggi eseguiti usando l'applicazione dello strumento del sistema Rapid Capture System. È importante quindi selezionare il protocollo del software corretto da utilizzare con ogni specifica metodica del test in modo da generare risultati accurati. I valori RLU di tutti i campioni devono essere convertiti in un rapporto rispetto al valore cutoff (CO) corretto. Ad esempio, tutti i dosaggi devono essere espressi sotto forma di valore RLU/CO del campione.

CONTROLLO DI QUALITÀ

La fornitura del test *digene* HC2 HPV DNA include campioni per il controllo di qualità. Consultare il corrispondente manuale utente per il corretto inserimento dei numeri di lotto e delle date di scadenza dei controlli di qualità. I controlli di qualità devono essere inclusi in ogni dosaggio e il valore RLU/CO di ogni controllo di qualità deve rientrare nei seguenti intervalli accettabili relativi al dosaggio per essere considerato valido. **Se i controlli di qualità non rientrano in questi intervalli, il dosaggio non è valido e deve essere ripetuto.** I risultati delle pazienti non possono essere messi a referto se il dosaggio non è valido.

Controllo di qualità	Tipo HPV	Risultato atteso (Valore RLU/cutoff) Sonda per l'HPV a basso rischio			
		Minimo	Massimo	Media	%CV
QC1-LR	Basso rischio (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	Alto rischio (HPV 16)	0,001	0,999	0,5	25

Controllo di qualità	Tipo HPV	Risultato atteso (Valore RLU/cutoff) Sonda per l'HPV ad alto rischio			
		Minimo	Massimo	Media	%CV
QC1-LR	Basso rischio (HPV 6)	0,001	0,999	0,5	25
QC2-HR	Alto rischio (HPV 16)	2	8	5,0	25

Controllo di qualità	Tipo HPV	Risultato atteso (Valore RLU/cutoff) Sonda per l'HPV CPC			
		Minimo	Massimo	Media	%CV
QC1-LR	Basso rischio (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	Alto rischio (HPV 16)	2	8	5,0	25

1. Il materiale di controllo di qualità fornito nel kit è costituito da DNA bersaglio clonati dell'HPV e non deriva dall'HPV wild-type. È lo stesso tipo di materiale utilizzato per i calibratori forniti nel test *digene* HC2 HPV DNA.
2. I controlli di qualità forniti non svolgono una corretta azione di controllo per la processazione della soluzione PreservCyt o del fluido conservante SurePath.
3. I controlli di qualità inclusi in questo kit del test devono essere utilizzati per il controllo di qualità interno. È possibile utilizzare ulteriori controlli di qualità in base alle linee guida o ai requisiti normativi locali e/o nazionali o di enti di certificazione.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEI CAMPIONI

Nota: Il valore cutoff del test *digene* HC2 HPV DNA di 1 pg/ml è equivalente a 100.000 copie dell'HPV/ml o a 5.000 copie dell'HPV per ogni dosaggio.

1. I campioni in STM con rapporto RLU/cutoff $\geq 1,0$ ottenuto **con la sola sonda per l'HPV a basso rischio** sono considerati "Positive" (positivi) per 1 o più fra i tipi di HPV 6, 11, 42, 43 o 44.
2. I campioni in STM con rapporto RLU/cutoff $\geq 1,0$ ottenuto **con la sola sonda per l'HPV ad alto rischio** sono considerati "Positive" per 1 o più fra i tipi di HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68.
3. Per i campioni in PreservCyt, se il rapporto RLU/CO di un campione è $\geq 1,0$ e $< 2,5$, QIAGEN raccomanda di ripetere il test sul campione. Se il risultato iniziale del nuovo test è positivo ($\geq 1,0$ RLU/CO), il campione può essere riportato come positivo e non è necessario eseguire altri test. Tuttavia, se alla prima ripetizione del test il risultato è negativo ($< 1,0$), è necessaria una seconda ripetizione (terzo risultato) per ottenere un risultato finale. Il risultato della seconda ripetizione viene considerato il risultato finale e deve essere riportato.
4. Se il rapporto RLU/cutoff di un campione è vicino, ma inferiore a 1,0, e si sospetta un'infezione da HPV ad alto rischio, prendere in considerazione metodiche di analisi alternative e/o ripetere l'analisi del campione.
5. I campioni in STM con rapporto RLU/cutoff $\geq 1,0$ ottenuto sia con la sonda per l'HPV a basso rischio sia con la sonda per l'HPV ad alto rischio sono considerati "Positive" per 1 o più fra i tipi di HPV individuati da entrambi i gruppi di sonde.
6. I campioni in STM con rapporto RLU/cutoff $\geq 1,0$ ottenuto con una miscela di sonde eterogenee (CPC) sono considerati "Positive" per 1 o più fra i tipi di HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68.
7. I campioni con rapporto RLU/cutoff $< 1,0$ ottenuto con una miscela di sonde eterogenee (CPC) oppure sia con la sonda per l'HPV a basso rischio sia con la sonda per l'HPV ad alto rischio sono considerati "Negative" o "No HPV DNA detected" (Non è stato rilevato DNA dell'HPV) per i 18 tipi di HPV oggetto di analisi. Le sequenze di DNA dell'HPV sono assenti o i livelli di DNA dell'HPV sono al di sotto del limite di rilevazione del dosaggio.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

DATI A SUPPORTO DELL'INDICAZIONE DI HPV A BASSO E AD ALTO RISCHIO

Screening clinico di pazienti con esito del Pap test ASC-US per determinare la necessità della candidatura ad una colposcopia

Nel 1996, negli Stati Uniti è stato condotto uno studio intitolato "Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears" (Utilità dei test del DNA dell'HPV per il triage delle donne con risultati borderline del Pap test), sotto la direzione del Kaiser Foundation Research Institute e del Kaiser Permanente Medical Group. Sono stati prelevati campioni cervicali per Pap test di routine e per il test *digene* HC2 HPV DNA da donne che frequentavano varie 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 della cervice nella Comunità europea, consultare le Linee guida europee per il controllo di qualità nello screening del cancro della cervice⁴⁰. Sono state prese in considerazione donne (dai 15 anni in su) con esito del Pap test ASC-US (cellule atipiche di significato non determinato) candidate alla colposcopia e alla biopsia. Campioni istologici prelevati sotto 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 e le differenze fra la prima diagnosi e la seconda diagnosi indipendente sono state giudicate da un terzo patologo.

Il test del DNA dell'HPV è stato eseguito sul campione iniziale ed è stata impiegata solo la sonda per l'HPV ad alto rischio. Il test del DNA dell'HPV è stato eseguito con un prototipo del test *digene* HC2 HPV DNA contenente sonde di 11 dei 13 tipi di HPV inclusi nella sonda per l'HPV ad alto rischio (sono rimasti esclusi i tipi di HPV 59 e 68). Si ipotizzava che questa differenza non avrebbe dato luogo a discrepanze sostanziali nei profili di prestazione dei due dosaggi.

Erano disponibili i risultati del test dell'HPV e le diagnosi istologiche di 885 donne con esito del Pap test ASC-US. Per la maggior parte delle pazienti, i test erano stati eseguiti su campioni prelevati sia in STM che in soluzione PreservCyt. Data la similitudine tra le caratteristiche di prestazione del test *digene* HC2 HPV DNA condotto su campioni in STM e in soluzione PreservCyt, le prestazioni del dosaggio vengono presentate esclusivamente per i campioni in soluzione PreservCyt.

La Tabella 3 mostra che tra le pazienti con esito del Pap test ASC-US che dava adito alla candidatura per altri esami, il valore predittivo negativo del test *digene* HC2 HPV DNA per HSIL o per una neoplasia più grave alla colposcopia è stato del 99%.

Tabella 3
Confronto tra il test *digene* HC2 HPV DNA versus istologia consensuale
Popolazione con esito del Pap test ASC-US indicativo di candidatura ad altri esami
Studio Kaiser, campioni in soluzione PreservCyt

	HSIL o neoplasia più grave al momento della colposcopia			Totale
		+	-	
HPV ad alto rischio	+	66	317	383
	-	5	497	502
	Totale	71	814	885

Sensibilità [TP/(TP+FN)] = 93,0% (66/71)

IC al 95% = da 84,3 a 97,7

Specificità [TN/(TN+FP)] = 61,1% (497/814)

IC al 95% = da 57,7 a 64,4

Prevalenza della malattia = 8,0% (71/885)

Valore predittivo positivo del dosaggio = 17,2% (66/383)

Valore predittivo negativo del dosaggio = 99,0% (497/502)

La Tabella 4 mostra i valori predittivi teorici positivo e negativo basati su varie prevalenze per un test ASC-US iniziale, sfociato in HSIL o neoplasia più grave in base ai risultati della sonda per l'HPV ad alto rischio.

Tabella 4
Valore predittivo teorico positivo e negativo
Sonda per l'HPV ad alto rischio
Esiti del Pap test ASC-US

Prevalenza teorica per HSIL	Esito iniziale del Pap test ASC-US	
	Valore predittivo positivo del dosaggio	Valore predittivo negativo del dosaggio
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

La Tabella 5 illustra la variazione in base alle diverse fasce di età contemplate nello studio:

Tabella 5
Dati dello studio Kaiser
Prestazioni del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA versus istologia consensuale
Risultati (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 (35/35)	88,46 (23/26)	80,00 (8/10)
Intervallo di confidenza al 95%	90,0-100	69,9-97,6	44,4-97,5
Specificità (%)	31,4 (79/252)	66,2 (137/207)	79,15 (281/355)
Intervallo di confidenza al 95%	25,7-37,5	59,3-72,6	74,6-83,3
Valore predittivo negativo (%)	100 (79/79)	97,86 (137/140)	99,29 (281/283)
Valore predittivo positivo (%)	16,83 (35/208)	24,73 (23/93)	9,76 (8/82)

Sensibilità clinica e specificità per la determinazione del rischio di neoplasia di alto grado in donne con esiti del Pap test indicativi di LSIL o HSIL

Uno studio clinico multicentrico basato sull'uso del test *digene* HC2 HPV DNA è stato condotto su campioni prelevati presso vari grandi ospedali e cliniche di colposcopia ad alta prevalenza di neoplasie cervicali e HPV (3 centri) nella zona occidentale e meridionale degli Stati Uniti. Il test dell'HPV è stato eseguito presso 3 centri di sperimentazione non affiliati con le cliniche di colposcopia presso le quali erano stati prelevati i campioni. La popolazione di questo studio clinico comprendeva donne a cui era stata diagnosticata una neoplasia intraepiteliale squamosa di basso grado (LSIL) o di alto grado (HSIL) in base ai risultati di un recente Pap test e che erano candidate ad una colposcopia di follow-up. Su 702 pazienti partecipanti allo studio, 327 presentavano esiti del Pap test più gravi di ASC-US e disponevano di informazioni adeguate; 96 di queste presentavano uno stato patologico finale di HSIL o neoplasia più grave. Campioni di cellule cervicali esfoliate sono stati prelevati con il dispositivo di prelievo campione *digene* HC2 DNA e posti in STM, oppure prelevati con un dispositivo del tipo a spazzolino e posti in soluzione PreservCyt. I campioni erano stati prelevati durante la colposcopia. Si è quindi proceduto ad

analizzarli con il test *digene* HC2 HPV DNA e i risultati sono stati confrontati con lo stato patologico stabilito 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 6*). Il test *digene* HC2 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 eseguito presso l'istituto che si era occupato 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 di alto grado. Data la similitudine tra le caratteristiche di prestazione del test *digene* HC2 HPV DNA condotto su campioni in STM e in soluzione PreservCyt, le prestazioni del dosaggio vengono presentate esclusivamente per i campioni in soluzione PreservCyt.

Non è stata osservata alcuna differenza tra i risultati del test con sonda per l'HPV ad alto rischio su campioni in STM e campioni in PreservCyt. La tabella seguente illustra i risultati ottenuti con la sonda per l'HPV ad alto rischio in questa popolazione:

Tabella 6
Algoritmo dello stato patologico della paziente

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

* Biopsia e/o curettage endocervicale (ECC) non effettuati, perché non erano state osservate anomalie durante la colposcopia oppure il risultato istologico non era disponibile.

Le Tabelle 7 e 8 mostrano le prestazioni del test *digene* HC2 HPV DNA, determinate utilizzando 327 campioni in PreservCyt, 96 dei quali prelevati da donne con diagnosi di neoplasia cervicale di alto grado. I confronti sono stati effettuati su tutte le pazienti dello studio con esito del Pap test anormale che davano adito alla candidatura per altri esami. I confronti sono riportati per i campioni in PreservCyt analizzati con la sonda per l'HPV ad alto rischio.

Tabella 7
Risultati della sonda per l'HPV ad alto rischio

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

La Tabella 8 mostra che il test *digene* HC2 HPV DNA eseguito con la sonda per l'HPV ad alto rischio ha evidenziato una sensibilità globale pari a circa il 93% nell'identificazione delle donne con neoplasie di alto grado nella popolazione candidata alla colposcopia sulla base di una diagnosi di LSIL, HSIL o neoplasia equivalente, formulata in seguito a Pap test. In questa popolazione, il test ha inoltre dimostrato un valore predittivo negativo di circa il 93%.

Tabella 8
Caratteristiche delle prestazioni
Test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA fra le pazienti candidate ad altri esami
in base al Pap test indicativo di LSIL o neoplasia più grave e con stato patologico finale di HSIL

Risultato della sonda per l'HPV ad alto rischio	Pap test indicativo di LSIL o HSIL → Neoplasia HSIL			Totale
	+	-		
+	89	140		229
-	7	91		98
Totale	96	231		327

Sensibilità $[TP/(TP+FN)] = 92,7\%$ (89/96)

IC al 95% = da 85,6 a 97,0

Specificità $[TN/(TN+FP)] = 39,4\%$ (91/231)

IC al 95% = da 33,1 a 46,0

Prevalenza della malattia con Pap test indicativo di LSIL - HSIL finale = 21,4%

Prevalenza della malattia con Pap test indicativo di 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 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 neoplasia 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 per l'HPV e con corrispondente stato patologico inferiore alla neoplasia di basso grado, circa il 75% dei campioni è risultato positivo.

La Tabella 9 mostra i valori predittivi teorici positivo e negativo ottenuti con la sonda per l'HPV ad alto rischio per una LSIL o HSIL iniziale, confermata come HSIL o neoplasia più grave in sede di colposcopia.

Tabella 9
Valore predittivo teorico positivo e negativo
Sonda per l'HPV ad alto rischio
LSIL o HSIL iniziale evidenziata dal Pap test

Prevalenza teorica per la HSIL	LSIL o HSIL iniziale evidenziata dal Pap test	
	Dosaggio positivo	Dosaggio positivo
	Valore predittivo	Valore predittivo
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

DATI A SUPPORTO DELL'INDICAZIONE PRIMARIA PER LO SCREENING DELL'HPV AD ALTO RISCHIO

Validità clinica dello screening di pazienti con risultati normali del Pap test come supporto nella valutazione del rischio per la gestione delle pazienti

Viene presentata di seguito una descrizione dei risultati di otto 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 del Pap test in uso presso i paesi in cui è stato condotto lo studio. In tutti i casi, eccetto due, è stato utilizzato il sistema di classificazione Bethesda per l'interpretazione dei risultati del Pap test. Inoltre, in tutti gli studi la neoplasia cervicale di alto grado è stata diagnosticata mediante biopsia sotto 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 30-35 anni). In tutti gli studi, tranne uno, sono stati eseguiti anche analisi prospettiche dell'HPV utilizzando il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Salvo se diversamente indicato di seguito, gli studi sono stati studi di screening trasversale della popolazione generale condotti utilizzando il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Come citato, 2 degli 8 studi di screening sono stati condotti negli Stati Uniti, 2 in Europa, 2 in America Latina, 1 in Africa e 1 in Asia.

Le prestazioni del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA osservate in sei studi trasversali sono riepilogate nelle Tabelle 10 e 11 seguenti, per donne di età pari o superiore a 30 anni con diagnosi confermata da esame istologico di neoplasia cervicale di alto grado (definita come CIN3 o più grave).

Tabella 10
Stime di prestazione del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA
Sensibilità e specificità

Popolazione	n		Sensibilità (%)			Specificità (%)		
			Solo PAP test	Solo test HPV	HPV + PAP	Solo PAP test	Solo test HPV	HPV + PAP
Europa Occidentale 1	7592		51,6 (14/27)	96,3 (26/27)	100 (27/27)	98,5 (7453/7565)	96,2 (275/7565)	95,1 (7193/7565)
		IC al 95%	32,0-71,3	81,0-99,9	87,2-100	98,2- 98,8	95,7-96,6	94,6-95,6
America Latina 1	6115		58,4 (45/77)	94,8 (73/77)	97,4 (75/77)	98,7 (5962/6038)	93,9 (5669/6038)	93,4 (5637/6038)
		IC al 95%	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 (53/68)	89,7 (61/68)	94,1 (64/68)	94,1 (5745/6108)	94,0 (5742/6108)	89,9 (5490/6108)
		IC al 95%	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 (90/107)	89,7 (96/107)	92,5 (99/107)	86,4 (2436/2818)	80,0 (2253/2818)	76,4 (2152/2818)
		IC al 95%	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 (41/42)	100 (42/42)	100 (42/42)	76,3 (1445/1894)	83,0 (1572/1894)	68,0 (1287/1894)
		IC al 95%	87,4-99,9	91,6-100,0	91,6-100,0	74,3-78,2	81,2-85,0	65,8-70,1
USA 1	1040		50,0 (1/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	97,6 (1013/1038)	96,2 (999/1038)	95,5 (991/1038)
		IC al 95%	1,26-98,7	15,8-100,0	15,8-100,0	96,5-98,4	94,9-97,3	94,0-96,7

[†] Sono stati utilizzati i dati HC2 se disponibili, altrimenti i dati HCS; dati combinati.

Tabella 11
Stime di prestazione del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA
Valore predittivo positivo e negativo

Popolazione	n		Prevalenza (%)	Valore predittivo positivo (%)			Valore predittivo negativo (%)		
				Solo PAP test	Solo test HPV	HPV + PAP	Solo PAP test	Solo test HPV	HPV + PAP
Europa Occidentale 1	7592		CIN 3 0,36 (27/7592)	11,1 (14/126)	8,23 (26/316)	6,77 (27/399)	99,83 (7453/7466)	99,99 (7275/7276)	100,0 (7193/7193)
		IC al 95%	0,23-0,52	6,21-17,9	5,45-11,8	4,51-9,69	99,70-99,91	99,92-100,0	99,95-100,0
America Latina 1	6115		1,26 (77/6115)	37,2 (45/121)	16,5 (73/442)	15,8 (75/476)	99,47 (5962/5994)	99,93 (5669/5673)	99,96 (5637/5639)
		IC al 95%	0,99-1,57	28,6-46,4	13,2-20,3	12,6-19,4	99,25-99,63	99,82-99,98	99,87-100,0
America Latina 2 [†]	6176		1,10 (68/6176)	12,7 (53/416)	14,3 (61/427)	9,4 (64/682)	99,74 (5745/5760)	99,88 (5742/5749)	99,93 (5490/5494)
		IC al 95%	0,86-1,39	9,69-16,3	11,1-18,0	7,30-11,8	99,57-99,85	99,75-99,95	99,81-99,98
Africa	2925		3,66 (107/2925)	19,1 (90/472)	14,5 (96/661)	12,9 (99/765)	99,31 (2436/2453)	99,51 (2253/2264)	99,63 (2152/2160)
		IC al 95%	3,01-4,40	15,6-22,9	11,9-17,4	10,6-15,5	98,89-99,60	99,13-99,76	99,27-99,84
Asia	1936		2,17 (42/1936)	8,37 (41/490)	11,5 (42/364)	6,47 (42/649)	99,93 (1445/1446)	100,0 (1572/1572)	100,0 (1287/1287)
		IC al 95%	1,57-2,92	6,07-11,2	8,44-15,3	4,70-8,65	99,62-100,0	99,77-100,0	99,71-100,0
USA 1	1040		0,19 (2/1040)	3,85 (1/26)	4,88 (2/41)	4,08 (2/49)	99,90 (1013/1014)	100,0 (999/999)	100,0 (991/991)
		IC al 95%	0,02-0,69	0,10-19,6	0,60-16,5	0,50-14,0	99,45-100,0	99,63-100,0	99,63-100,0

[†] Sono stati utilizzati i dati HC2 se disponibili, altrimenti 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 (NPV) dell'HPV supera quello del solo Pap test in tutti i casi, avvicinandosi al 100%. Questo

NPV dimostra l'alta probabilità di assenza di una neoplasia cervicale di alto grado o di cancro nelle donne citologicamente normali senza infezioni 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 ai rischi a disposizione del medico, nonché sull'anamnesi della paziente. Fra le variabili importanti figurano un'infezione da HPV nell'anamnesi e/o Pap test anomali, età del primo rapporto sessuale, numero di partner sessuali ed eventuali malattie a trasmissione sessuale concomitanti.^{27,28}

Sebbene la prevalenza di neoplasie di alto grado non vari significativamente fra 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 evidenziato che la prevalenza dell'infezione da HPV diminuisce drasticamente con l'aumentare dell'età.^{28, 30-37, 41} I valori predittivi positivi diminuiscono quando le popolazioni esaminate presentano una bassa prevalenza o individui a basso rischio di infezione.

Sono state eseguite analisi longitudinali utilizzando i risultati di due 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) di Reims. Queste analisi longitudinali sono state effettuate per dimostrare che le pazienti negative al Pap test/negative all'HPV corrono minori rischi di ammalarsi di neoplasie cervicali rispetto a donne tradizionalmente definite a basso rischio il cui stato HPV non è noto e rispetto a pazienti negative al Pap test/positive all'HPV.

I risultati di queste analisi longitudinali sono presentati nelle tabelle 12 e 13 riportate di seguito.

Tabella 12
Riepilogo dei risultati: Studio dell'NCI e studio francese
Rischio relativo di neoplasia di alto grado

Gruppo di studio	Età	Classificazione a basso rischio	n	Casi di CIN 3+	Tasso (per 100 anni-paziente)	Rischio relativo (IC al 95%)
NCI	30 e oltre	Pap test normale, negativo all'HPV	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, negativo all'HPV	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, negativo all'HPV	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, negativo all'HPV	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 annuali normali su un arco di tempo di circa 2 anni

Tabella 13
Riepilogo dei risultati: Studio dell'NCI e studio francese
Tassi di morbilità stratificati in base allo stato HPV al basale

Gruppo di studio	Età	Stato al basale	n	Casi di CIN 3+	Tasso (per 100 anni-paziente)	Rischio relativo (IC al 95%)
NCI	30 e oltre	Pap test normale, positivo all'HPV	1.078	24	0,451	10,50 (6,13, 18,0)
		Pap test normale, negativo all'HPV	12.054	28	0,043	1,00
	Tutte	Pap test normale, positivo all'HPV	2.561	63	0,096	10,64 (7,33 – 15,5)
		Pap test normale, negativo all'HPV	17.594	48	0,056	1,00
Francia	30 e oltre	Pap test normale, positivo all'HPV	419	14	2,346	27,3 (8,41, 88,3)
		Pap test normale, negativo all'HPV	1696	3	0,084	1,00
	Tutte	Pap test normale, positivo all'HPV	619	22	2,520	37,0 (11,8, 116)
		Pap test normale, negativo all'HPV	2180	3	0,066	1,00

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

SENSIBILITÀ ANALITICA

È stato analizzato un pannello non clinico di DNA plasmidico dell'HPV clonato per determinare se i 18 tipi di HPV siano tutti rilevabili dal test *digene* HC2 HPV DNA e per determinare la sensibilità analitica del dosaggio per ciascun tipo di HPV. Ogni concentrazione di HPV bersaglio (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1 pg/ml, 0,5 pg/ml e 0,2 pg/ml) di ciascuno dei 18 tipi di DNA dell'HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) è stata analizzata in tre replicati con la sonda per l'HPV a basso rischio o la sonda per l'HPV ad alto rischio, come opportuno. È stato calcolato il valore medio in RLU per ogni concentrazione di ciascun tipo di HPV ed è stato poi confrontato con il calibratore positivo per il corrispondente lato del dosaggio.

Il limite rilevabile di ogni tipo di HPV in STM è riportato nella Tabella 14. I limiti rilevabili variavano da 0,62 pg/ml a 1,39 pg/ml a seconda del tipo di HPV oggetto di analisi. Tutti i tipi di HPV sono risultati rilevabili ad un livello stimato di 1,09 di DNA bersaglio dell'HPV per 1 ml di campione in STM. Il limite medio rilevabile per tutti e 18 i tipi di DNA dell'HPV è stato di 1,09 pg/ml con una deviazione standard dello 0,05.

Tabella 14
Riepilogo dei limiti rilevabili di sensibilità del test *digene* HC2 HPV DNA
per ogni tipo di DNA dell'HPV in STM

Tipo di DNA dell'HPV	Concentrazione di DNA dell'HPV (pg/ml)	Deviazione standard	Intervallo di confidenza al 95%
6	1,33	0,03	1,22-1,46
11	1,13	0,05	1,00-1,29
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
42	1,20	0,05	1,02-1,44
43	0,85	0,03	0,86-1,07
44	1,17	0,04	1,02-1,36
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)	1,09	0,05	0,97-1,27

PRESTAZIONI DELLA MISCELA DI SONDE ETEROGENEE (CPC)

Lo stesso pannello non clinico di DNA plasmidico dell'HPV sopra descritto è stato analizzato per stabilire la sensibilità analitica di ciascuno dei 18 tipi di HPV nel test *digene* HC2 HPV DNA secondo il protocollo per la miscela di sonde eterogenee (CPC), come descritto nelle presenti istruzioni. La sensibilità analitica del protocollo CPC variava da 0,58 pg/ml a 1,39 pg/ml e tutti i tipi di HPV sono risultati rilevabili a un livello stimato di 0,95 pg/ml di DNA bersaglio dell'HPV per 1 ml di campione. Il limite medio rilevabile di tutti e 18 i tipi di DNA dell'HPV è stato di 0,95 pg/ml con una deviazione standard di 0,07. Questa sensibilità equivale alla sensibilità analitica riscontrata per la metodica delle due sonde del test *digene* HC2 HPV DNA.

EQUIVALENZA TRA CAMPIONI IN STM E CAMPIONI IN SOLUZIONE PRESERVCYT

È stata esaminata l'equivalenza tra campioni in STM e in soluzione PreservCyt per un uguale recupero del DNA dell'HPV 18 da circa 10^6 cellule HeLa positive contenenti genomi dell'HPV 18 integrati, messi in STM e in un pool di cellule negative in soluzione PreservCyt. Ogni tipo di campione è stato trattato seguendo le rispettive procedure di processazione/denaturazione, descritte nelle presenti istruzioni per l'uso, e analizzato con il test *digene* HC2 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 soluzione PreservCyt non influenza la sensibilità analitica del test *digene* HC2 HPV DNA.

CORRELAZIONE DEI RISULTATI DEI CAMPIONI IN SUREPATH CON QUELLI DEI CAMPIONI IN STM IN UNA POPOLAZIONE CLINICA

È stato condotto uno studio clinico di fase II che ha coinvolto 6 centri di prelievo e 3 centri di analisi 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 per l'arruolamento nello studio secondo i criteri di inclusione ed

esclusione predefiniti. La fase di fattibilità, intesa a determinare un valore cutoff adeguato del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA per l'utilizzo con i campioni in SurePath, ha coinvolto circa 400 pazienti. La fase di convalida clinica, che ha coinvolto circa 1.500 pazienti per convalidare il valore cutoff prescelto, è iniziata dopo che un'analisi temporanea della fattibilità ha dimostrato che un valore cutoff pari a 1,0 RLU/CO utilizzando campioni in SurePath produceva una concordanza accettabile con i risultati dei campioni in STM.

In entrambe le fasi di valutazione, i campioni cervicali in STM e in SurePath accoppiati erano stati ottenuti da ogni partecipante donna consenziente. Il campione in SurePath è stato poi inviato a un laboratorio di citologia per la preparazione dei vetrini. Dopo la preparazione citologica, il campione in SurePath rimanente e il corrispondente campione in STM sono stati analizzati con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA utilizzando un valore cutoff del dosaggio pari a 1,0 RLU/CO.

La Tabella 15 fornisce la correlazione dei risultati per i campioni in SurePath accoppiati con i campioni STM osservata nei risultati finali, idonea per l'analisi dei dati ottenuti dall'intera popolazione arruolata.

Tabella 15
Concordanza dei risultati dei campioni in SurePath con quelli dei campioni in STM
(tutte le fasce di età e classificazioni citologiche)
(n = 1490)

% di concordanza positiva IC al 95% (n/N)		% di concordanza negativa IC al 95% (n/N)	
Tutti positivi	Sottoinsieme altamente positivo (RLU/CO ≥ 2,5)	Tutti negativi	Sottoinsieme debolmente negativo RLU/CO (<0,80)
93,5 90,7, 95,6 (401/429)	96,4 94,1, 98,0 (378/392)	95,3 93,8, 96,5 (1011/1061)	96,0 94,6, 97,1 (1002/1044)

Questi risultati pronosticano che la specificità e la sensibilità relative del dosaggio utilizzando i campioni in SurePath saranno altamente correlate con quelle ottenute con i campioni in STM, come dimostrato dal limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% sia per la concordanza positiva che negativa.

RIPRODUCIBILITÀ

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

Tre laboratori esterni hanno eseguito i test utilizzando kit del test *digene* HC2 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 soluzione PreservCyt; calibratore negativo e calibratori positivi per l'HPV a basso rischio e 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 componenti del pannello sono stati analizzati in tre replicati utilizzando sia la metodica della sonda per l'HPV ad alto rischio sia la metodica CPC. I risultati sono riportati nella Tabella 16.

Tabella 16
Riepilogo della statistica generale per la riproducibilità inter-centro del test *digene* HC2 HPV DNA

Misura statistica	SONDA PER L'HPV AD ALTO RISCHIO	Miscela di sonde eterogenee (CPC)	Risultati combinati della sonda per l'HPV ad alto rischio e la metodica CPC^a
Percentuale di risultati positivi attesi con risultato positivo osservato	100% (99,0-100,0)	99,8% (98,92-100,0)	99,9% (99,38-100,0)
Percentuale di risultati negativi attesi con risultato negativo osservato	99,0% (97,49-99,73)	98,9% (96,79-99,77)	99,0% (97,88-99,58)
Concordanza	99,5% (98,70-99,86)	99,5% (98,70-99,86)	99,5% (99,0-99,78)
Kappa	0,990	0,989	0,990

^a I numeri fra parentesi indicano gli intervalli di confidenza al 95%. I dati globali sono ottenuti da una combinazione di tutti i dosaggi eseguiti presso tutti i centri.

I risultati indicano che la riproducibilità del test *digene* HC2 HPV DNA con campioni clinici prelevati in STM è ottima.

PANNELLO DI 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 le sonde per l'HPV utilizzate nel test *digene* HC2 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 ad una concentrazione di 4 ng/ml.

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

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
<i>Acinetobacter lwoffii</i> (ATCC 17908)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (ATCC 19424)
<i>Bacteroides fragilis</i> (ATCC 25285)	<i>Neisseria lactamica</i> (NRL 2118)
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> (ATCC 13077)
<i>Candida albicans</i> (ATCC 14053 o 10231)	<i>Neisseria sicca</i> (ATCC 29256)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 21117, 8427, 33420)
<i>Escherichia coli</i> (HB101)*	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (catena di Cowan)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i> (ATCC 14508)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 27762)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Mobiluncus curtisii</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Mobiluncus mulieris</i>	
<i>Mycoplasma hominis</i>	

* Sono stati analizzati sia il ceppo dell'*E. coli* utilizzato per la coltura di plasmidi (HB101) sia un isolato clinico dell'*E. coli*.

Segue un elenco del DNA virale o plasmidico o del siero umano analizzato:

Adenovirus 2	Papillomavirus umano del tipo 1
Citomegalovirus	Papillomavirus umano del tipo 2
Virus di Epstein-Barr	Papillomavirus umano del tipo 3
Antigene di superficie del virus dell'epatite B	Papillomavirus umano del tipo 4
Herpes Simplex I	Papillomavirus umano del tipo 5
Herpes Simplex II	Papillomavirus umano del tipo 8
Virus dell'immunodeficienza umana (HIV, RT DNA)	Papillomavirus umano del tipo 13
Simian virus 40 (SV40)	Papillomavirus umano del tipo 30
	pBR322

Gli unici virus o plasmidi che hanno mostrato una reattività crociata nel test *digene* HC2 HPV DNA sono il tipo 13 e il plasmide pBR322. Il DNA dell'HPV 13 ha reagito solo con la sonda per l'HPV a basso rischio. L'HPV 13 viene normalmente rilevato nelle lesioni labiali di alcuni gruppi etnici, ma non è stato rilevato nel tratto anogenitale.²⁹ Si prevede, pertanto che la reattività crociata osservata fra l'HPV 13 e la sonda per l'HPV a basso rischio del test *digene* HC2 HPV DNA non produca un risultato clinicamente ambiguo per i campioni anogenitali. La reattività crociata tra il pBR322 e le sonde per l'HPV a basso rischio e ad alto rischio del test *digene* HC2 HPV DNA non è imprevedibile in quanto è difficile rimuovere tutto il DNA vettore del pBR322 quando si isola l'inserito di 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 le sonde per l'HPV ad alto rischio e a basso rischio del test *digene* HC2 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 HPV DNA eseguito su campioni clinici, sembra essere bassa.

IBRIDAZIONE CROCIATA

Ognuno dei 18 tipi di HPV è stato analizzato sia con la sonda per l'HPV a basso rischio che con quella per l'HPV ad alto rischio a concentrazioni di 4 ng/ml di DNA dell'HPV. Si prevedeva che tutti i bersagli dell'HPV risultassero positivi con il gruppo di sonde corretto e, al contrario, che nessuno dei campioni risultasse positivo con il gruppo di sonde opposto. Questo studio ha dimostrato che l'ibridazione crociata fra i tipi di HPV 6 e 42 (tipi di HPV a basso rischio) e il gruppo di sonde per l'HPV ad alto rischio è molto contenuta. I campioni con alti livelli (4 ng/ml o più) di DNA dell'HPV 6 o dell'HPV 42 possono risultare positivi con entrambi i gruppi di sonde. Dal punto di vista clinico ciò significa che le pazienti con livelli di DNA dell'HPV 6 o dell'HPV 42 pari o superiori a 4 ng/ml possono essere candidate alla colposcopia.

Inoltre, è stata osservata una reattività crociata della sonda per l'HPV ad alto rischio 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 di alto grado³⁸. Le pazienti con campioni contenenti elevati livelli di questi tipi di DNA dell'HPV possono essere candidate erroneamente alla colposcopia. È stato inoltre documentato nella letteratura che 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 MM9.³⁹ Sebbene alcuni di questi tipi di HPV siano rari o nuovi, non riscontrati spesso in presenza di neoplasie di alto grado, le pazienti i cui campioni contengono elevati livelli di questi tipi di DNA dell'HPV possono essere candidate erroneamente 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 HPV DNA. Sangue intero, lavande vaginali, pomate antifungine e spermicidi (agenti che vengono normalmente riscontrati nei campioni cervicali) sono stati aggiunti a campioni in STM negativi e positivi (pool di campioni clinici e di campioni non clinici) a concentrazioni riscontrabili nei campioni cervicali. Non sono stati osservati falsi positivi con nessuno dei quattro agenti a qualunque concentrazione. È tuttavia possibile ottenere un falso negativo per campioni clinici con livelli di DNA dell'HPV vicini a quelli del valore cutoff di positività del test (1 pg/ml) in presenza di livelli 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 norma 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 PRESERVACYT

È stato valutato l'effetto del sangue e di altre sostanze potenzialmente interferenti, definite o non definite, potenzialmente presenti nei campioni in soluzione PreservCyt, sul test *digene* HC2 HPV DNA. Sangue intero, lavande vaginali, pomate antifungine e spermicidi (agenti che vengono normalmente riscontrati nei campioni cervicali) sono stati aggiunti a pool di campioni in soluzione PreservCyt negativi e positivi a concentrazioni riscontrabili nei campioni cervicali. Non sono stati osservati falsi positivi o falsi negativi con nessuno dei 4 agenti a qualunque concentrazione. Inoltre, le sostanze intrinseche in alcuni campioni clinici non impediscono la rilevazione del DNA dell'HPV con il test *digene* HC2 HPV DNA.

RIPRODUCIBILITÀ DEL TEST *digene* HC2 HPV DNA CON CAMPIONI CLINICI PRELEVATI IN STM

La riproducibilità del test *digene* HC2 HPV DNA con campioni clinici prelevati in STM è stata stabilita nell'ambito di uno studio con 20 pool clinici (10 positivi e 10 negativi) preparati associando campioni prelevati mediante spazzolino cervicale in STM precedentemente denaturati e 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 effettuati utilizzando la metodica della miscela di sonde eterogenee. Sono stati calcolati medie, deviazione standard e intervalli di confidenza al 95% intorno alla media (IC) per ogni campione in una giornata e nel corso dei 5 giorni; i risultati sono riportati nella Tabella 17.

Tabella 17
Valore medio RLU/CO con intervalli di confidenza e percentuale di positivi
(in ordine decrescente in base al valore medio RLU/CO)

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

Per i 5 campioni con un valore medio RLU/CO superiore del 20% o più al valore cutoff (numeri 1-5), 100 replicati su 100 (100,0%) sono risultati positivi. Per i 5 campioni con un valore medio RLU/CO superiore di non oltre il 20% al valore cutoff (numeri 6-10), 60 replicati su 100 (60%) sono risultati positivi e 40 su 100 (40%) negativi. Per i 10 campioni con un valore medio RLU/CO di oltre il 20% al di sotto del valore cutoff, 200 replicati su 200 (100%) sono risultati negativi.

Quindi i campioni con un valore medio RLU/CO superiore del 20% o più al valore cutoff sono risultati positivi il 100% delle volte, mentre i campioni con un valore medio RLU/CO del 20% o più al di sotto del valore cutoff sono risultati negativi il 100% delle volte, ad indicare che è prevedibile che i campioni che si scostano del 20% o più dal valore cutoff diano risultati coerenti. I campioni vicini al valore cutoff hanno dato luogo a un numero pressoché uguale di risultati positivi e negativi. Questi dati dimostrano che l'analisi dei campioni in STM eseguita con il test *digene* HC2 HPV DNA fornisce risultati riproducibili.

RIPRODUCIBILITÀ DEL TEST *digene* HC2 HPV DNA CON CAMPIONI CLINICI PRELEVATI IN SOLUZIONE PRESERV CYT

La riproducibilità del test *digene* HC2 HPV DNA con campioni clinici prelevati in soluzione PreservCyt è stata stabilita nell'ambito di uno studio con 24 campioni fittizi in un dato intervallo di 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. Ogni giorno dei 5 dello studio è stato preparato e analizzato un dosaggio di 8 ml di ciascun campione seguendo le istruzioni per l'uso del kit di conversione campioni *digene* HC2 e utilizzando esclusivamente la sonda per l'HPV ad alto rischio. Sono stati calcolati medie, deviazioni standard e intervalli di confidenza al 95% (IC) per ogni campione in una giornata e nel corso dei 5 giorni e per i replicati. Il valore medio RLU/CO, l'intervallo di confidenza intorno alla media e la percentuale di replicati positivi sono riportati nella Tabella 18 per ogni campione, in ordine decrescente in base al valore medio RLU/CO.

Tabella 18
Valore medio RLU/CO con intervalli di confidenza e percentuale di positivi
(in ordine decrescente in base al valore medio RLU/CO)

N.	ID camp.	Valore medio RLU/CO	IC	% di positivi
1	21	3,51	3,19-3,83	100 (20/20)
2	12	1,58	1,48-1,69	100 (20/20)
3	13	1,42	1,32-1,52	100 (20/20)
4	17	1,38	1,23-1,53	100 (20/20)
5	18	1,36	1,23-1,48	90 (18/20)
6	15	1,32	1,16-1,49	95 (19/20)
7	23	1,17	1,06-1,27	85 (17/20)
8	16	1,14	1,07-1,20	75 (15/20)
9	20	1,10	0,96-1,21	75 (15/20)
10	19	1,06	0,95-1,17	85 (17/20)
11	22	1,05	0,99-1,10	45 (9/19)
12	11	1,04	0,96-1,11	70 (14/20)
13	14	0,94	0,86-1,01	65 (13/20)
14	24	0,77	0,73-0,81	25 (5/20)
15	3	0,28	0,25-0,30	0 (0/20)
16	1	0,27	0,24-0,30	0 (0/20)
17	7	0,27	0,25-0,30	0 (0/20)
18	2	0,27	0,25-0,28	0 (0/20)
19	5	0,26	0,24-0,28	0 (0/20)
20	4	0,24	0,22-0,25	0 (0/20)
21	9	0,23	0,21-0,25	0 (0/20)
22	8	0,22	0,18-0,27	0 (0/20)
23	10	0,22	0,20-0,25	0 (0/20)
24	6	0,19	0,17-0,21	0 (0/20)

Per i 6 campioni con un valore medio RLU/CO superiore del 20% o più al valore cutoff (numeri 1-6), 114 replicati su 120 (95,0%) sono risultati positivi. Per i 7 campioni con un valore medio RLU/CO superiore di non oltre il 20% al valore cutoff (numeri 7-13), 88 replicati su 139 (63,3%) 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 cutoff (numeri 10-13), 41 su 79 (51,9%) dei replicati sono risultati positivi e 38 (48,1%) negativi. Per gli 11 campioni con un valore medio RLU/CO di oltre il 20% al di sotto del valore cutoff, 220 replicati su 220 (100%) sono risultati negativi.

Pertanto, i campioni con un valore medio RLU/CO del 20% o più al di sopra del valore cutoff sono risultati positivi per più del 95% delle volte, mentre i campioni con un valore medio RLU/CO del 20% o più al di sotto del valore cutoff sono risultati negativi per il 100% delle volte; si prevede quindi che i campioni che si scostano del 20% o più dal valore cutoff diano risultati coerenti. I campioni vicini al valore cutoff hanno dato luogo a un numero pressoché uguale di risultati positivi e negativi. Questi dati dimostrano che l'analisi dei campioni in soluzione PreservCyt eseguita con il test *digene* HC2 HPV DNA fornisce risultati riproducibili.

RIPRODUCIBILITÀ DEL TEST *digene* HC2 HPV DNA CON CAMPIONI PRELEVATI NEL FLUIDO CONSERVANTE SUREPATH

Le valutazioni di riproducibilità sono state condotte allo scopo di caratterizzare la capacità di 3 laboratori diversi di ottenere un risultato diagnostico simile in giorni diversi e con diversi cicli di dosaggio di un insieme identico di campioni di stato HPV positivo/negativo noto, utilizzando un valore cutoff del dosaggio pari a 1,0 RLU/CO. Il pool di campioni per la valutazione della riproducibilità era formato da 5 campioni

HPV positivi, 2 campioni con concentrazioni di DNA dell'HPV vicine al valore cutoff del dosaggio e 5 campioni HPV negativi.

I componenti del pool erano stati preparati combinando campioni univoci in SurePath con stato HPV negativo e positivo noto, allo scopo di ottenere i valori RLU/CO bersaglio desiderati. Ogni componente del pool è stato testato in due replicati, due volte al giorno per un periodo di cinque giorni presso ciascuno dei tre laboratori partecipanti.

Tabella 19
Studio di riproducibilità, campioni in SurePath
Risultati qualitativi per componente del pool

Componente del pool	Valore medio RLU/CO	Risultato atteso	HPV-positivo n (%)	HPV-negativo n (%)
1	0,20	negativo	0 (0)	60 (100)
2	0,21	negativo	0 (0)	60 (100)
3	0,22	negativo	0 (0)	60 (100)
4	0,28	negativo	2 (3,3)	58 (96,7)
5	0,36	negativo	2 (3,3)	58 (96,7)
6	0,83	negativo	13 (21,7)	47 (78,3)
7	1,17	positivo	26 (43,3)	34 (56,7)
8	19,47	positivo	60 (100)	0 (0)
9	25,65	positivo	60 (100)	0 (0)
10	81,52	positivo	60 (100)	0 (0)
11	154,18	positivo	60 (100)	0 (0)
12	765,29	positivo	60 (100)	0 (0)

RIPRODUCIBILITÀ DEI RISULTATI PER I CAMPIONI IN SUREPATH OTTENUTI UTILIZZANDO IL SISTEMA RAPID CAPTURE SYSTEM PER LA PROCESSAZIONE DEI DOSAGGI

La riproducibilità dei risultati per i campioni in SurePath ottenuti utilizzando il sistema Rapid Capture System per la processazione dei dosaggi è stata confrontata con i risultati ottenuti con la processazione manuale dei dosaggi. Sono stati eseguiti due test comparativi su aliquote separate dello stesso campione processato.

Tabella 20
Concordanza dei risultati SurePath intra-campione con RCS
(RCS versus dosaggio manuale)

% di concordanza positiva IC al 95% (n/N)		% di concordanza negativa IC al 95% (n/N)	
Tutti positivi	Sottoinsieme altamente positivo (RLU/CO ≥ 2,5)	Tutti negativi	Sottoinsieme debolmente negativo RLU/CO (<0,80)
99,0 417/421 97,6, 99,7	100 375/375 99,0, 100	97,7 1057/1079 96,9, 98,7	98,7 1050/1064 97,8, 99,28

LIMITI DELLA METODICA

Per uso diagnostico in vitro

Consultare il manuale del sistema Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) per ulteriori limiti della metodica relativi all'utilizzo di tale sistema per analisi ad alta produttività di volumi e campioni.

- Il test *digene* HC2 HPV DNA per i tipi di papillomavirus umano 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 non è consigliato per la valutazione di sospette violenze sessuali.
- La prevalenza dell'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 *digene* HC2 HPV DNA distingue fra 2 gruppi di tipi di HPV: 6/11/42/43/44 e 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. Non viene fatta distinzione fra i tipi virali che fanno parte di tali gruppi.
- Il test *digene* HC2 HPV DNA può essere impiegato unicamente con campioni cervicali prelevati utilizzando il dispositivo di prelievo *digene* HC2 DNA o biopsie prelevate in STM o con campioni cervicali prelevati con un dispositivo di prelievo del tipo a spazzolino o a spazzolino/spatola combinati e posti in soluzione PreservCyt o campioni cervicali prelevati nel fluido conservante SurePath. Le biopsie possono essere analizzate unicamente se poste immediatamente in STM e conservate a -20°C fino al momento del dosaggio.
- Il dispositivo di prelievo *digene* HC2 DNA non deve essere utilizzato per il prelievo di campioni da donne in gravidanza.
- L'infezione da HPV non è un indicatore certo della presenza di una neoplasia cervicale di alto grado né implica in tutti i casi lo sviluppo di una neoplasia di alto grado o di cancro.
- Esiste un minimo di ibridazione crociata fra l'HPV dei tipi 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 e MM9, e la sonda per l'HPV ad alto rischio. Le pazienti con campioni contenenti elevati livelli di questi tipi di HPV possono essere erroneamente candidate alla colposcopia³⁸.
- Il test *digene* HC2 HPV DNA è concepito per rilevare tipi di HPV a basso rischio e ad alto rischio, tra cui 39, 58, 59 e 68. Studi analitici condotti da QIAGEN utilizzando DNA plasmidico dell'HPV clonato dimostrano che questo dosaggio rileva questi tipi di HPV a livelli compresi nell'intervallo tra 0,62 pg/ml e 1,39 pg/ml. Ciò equivale alle caratteristiche di rilevazione degli altri tipi di HPV bersaglio del test *digene* HC2 HPV DNA. QIAGEN è stata in grado di convalidare la rilevazione di questi tipi di HPV solo in un numero limitato di campioni clinici. Data la bassa prevalenza di questi tipi nella popolazione generale (come dimostrato da Bosch et. Al³⁶), le caratteristiche di prestazione del test *digene* HC2 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 per il test dell'HPV sono presenti elevate concentrazioni di pomate antifungine, spermicidi o lavande vaginali, esiste la probabilità di ottenere falsi negativi, nel caso in cui i campioni prelevati contengano livelli di DNA dell'HPV che danno luogo a valori RLU/CO vicini al valore cutoff del test.
- È possibile una reattività crociata tra la sonda del test *digene* HC2 HPV DNA e il plasmide pBR322. È stata riportata la presenza di sequenze omologhe di pBR322 in campioni genitali umani e potrebbero verificarsi falsi positivi in presenza di livelli elevati di plasmide batterico.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Broker, T. R.; Botchan, M. Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. In: *DNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1986: 17-36. From the 1985 Cancer Cells Conference at Cold Spring Harbor.
2. Lorincz, A. T.; Reid, R. Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. *Current Opinion in Oncology* 1:123-132; 1989.
3. Jenson, A. B.; Kurman, R. J.; Lancaster, W. D. Human papillomaviruses. In: Belshe, R. B. *Textbook of Human Virology*. Littleton, MA: PSG-Wright; 1984: 951-968.
4. Becker, T. M.; Stone, K. M.; Alexander, E. R. Genital human papillomavirus infection: a growing concern. *Obstet Gynecol Clin North Am* 14(2):389-396; 1987.
5. McCance, D. J.; Walker, P. G.; Dyson, J. L.; Coleman, D. V.; Singer, A. Presence of human papillomavirus DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia. *Br Med J* 287:784-788; 1983.
6. Naghashfar, Z.; Sawada, E.; Kutcher, M. J.; Swancar, J.; Gupta, J.; Daniel, R.; Kashima, H.; Woodruff, J. D.; Shah, K. Identification of genital tract papillomaviruses HPV-6 and HPV-16 in warts of the oral cavity. *J Med Virol* 17:313-324; 1985.
7. Gissmann, L.; Wolnik, L.; Ikenberg, H.; Koldovsky, U.; Schnurch, H. G.; zur Hausen, H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *PNAS USA* 80:560-563; 1983.
8. Munoz, N.; Bosch, F. X.; Shah, K. V.; Meheus, A., Eds. *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1992. IARC Scientific Publication No. 119.
9. Reid, R.; Greenberg, M.; Jenson, A. B.; Husain, M.; Willett, J.; Daoud, Y.; Temple, G.; Stanhope, C. R.; Sherman, A. I.; Phibbs, G. D.; Lorincz, A. T. 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):212-222; 1987.
10. Fuchs, P. G.; Girardi, F.; Pfister, H. Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int J Cancer* 41:41-45; 1988.
11. Lorincz, A. T.; Temple, G. F.; Kurman, R. J.; Jenson, A. B.; Lancaster, W. D. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *JNCI* 79(4):671-677; 1987.
12. Lorincz, A. T.; Lancaster, W. D.; Temple, G. F. Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J Virol* 58(1):225-229; 1986.
13. Beaudenon, S.; Kremsdorf, D.; Croissant, O.; Jablonska, S.; Wain-Hobson, S.; Orth, G. A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* 321:246-249; 1986.
14. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Lancaster, W. D.; Temple, G. F. A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* 159:187-190; 1987.
15. Naghashfar, Z. S.; Rosenshein, N. B.; Lorincz, A. T.; Buscema, J.; Shah, K. V. Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18-related virus of the genital tract. *J gen Virol* 68:3073-3079; 1987.
16. Nuovo, G. J.; Crum, C. P.; de Villiers, E. M.; Levine, R. U.; Silverstein, S. J. Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J Virol* 62(4):1452-1455; 1988.
17. Shimoda, K.; Lorincz, A. T.; Temple, G. F.; Lancaster, W. D. Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J gen Virol* 69:2925-2928; 1988.
18. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Goldsborough, M. D.; McAllister, P.; Temple, G. F. Human papillomavirus type 56: a new virus detected in cervical cancers. *J gen Virol* 70:3099-3104; 1989.

19. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Goldsborough, M. D.; Schmidt, B. J.; Temple, G. F. Cloning and partial DNA sequencing of two new human papillomavirus types associated with condylomas and low-grade cervical neoplasia. *J Virol* 63(6):2829-2834; 1989.
20. Beaudenon, S.; Kremsdorf, D.; Obalek, S.; Jablonska, S.; Pehau-Arnaudet, G.; Croissant, O.; Orth, G. Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology* 161:374-384; 1987.
21. Lorincz, A. T.; Reid, R.; Jenson, A. B.; Greenberg, M. D.; Lancaster, W.; Kurman, R. J. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 79:328-337; 1992.
22. Koutsky, L. A.; Holmes, K. K.; Critchlow, C. W.; Stevens, C. E.; Paavonen, J.; Beckmann, A. M.; DeRouen, T. A.; Galloway, D. A.; Vernon, D.; Kiviat, N. B. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 327:1272-1278; 1992.
23. Nieminen, P.; Aho, M.; Vesterinen, E.; Stellato, G.; Vaheri, A.; Soares, V. R. X.; Paavonen, J. Natural history of HPV infection: preliminary results of a cohort study [abstract]. In: 1991 Papillomavirus Workshop. Seattle, WA: 1991: 77.
24. Schulster, L. M.; Hollinger, F. B.; Dreesman, G. R.; Melnick, J. L. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Envir Microbiol* 42(5):762-767; 1981.
25. Spire, B.; Barré-Sinoussi, F.; Montagnier, L.; Chermann, J. C. Inactivation of lymphadenopathy associated virus by chemical disinfectants. *Lancet*; 1984 October 20: pp. 899-901.
26. Martin, L. S.; McDougal, J. S.; Loskoski, S. L. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 152(2):400-403; 1985.
27. Lorincz, A. T.; Schiffman, M. H.; Jaffurs, W. J.; Marlow, J.; Quinn, A. P.; Temple, G. F. Temporal associations of human papillomavirus infection with cervical cytologic abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 162(3):645-651; 1990.
28. Morrison, E. A. B.; Ho, G. Y. F.; Vermund, S. H.; Goldberg, G. L.; Kadish, A. S.; Kelley, K. F.; Burk, R. D. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int J Cancer* 49:6-13; 1991.
29. Pfister, H.; Hettich, I.; Runne, U.; Gissmann, L.; Chilf, G. N. Characterization of human papillomavirus type 13 from focal epithelial hyperplasia Heck lesions. *J Virol* 47:363-366; 1983.
30. Kahn, T.; Schwarz, E.; zur Hausen, H. Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int J Cancer* 51:61-65; 1986.
31. Schiffman, M. Latest HPV findings: some clinical implications. *Cont. OB/GYN* 38(10):27-40; 1993.
32. Volpers, C.; Streeck, R. E. Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 39. *Virology* 181:419-423; 1991.
33. Matsukura, T.; Sugase, M. Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virology* 177:833-836; 1990.
34. Rho, J.; Roy-Burman, A.; Kim, H.; de Villiers, E.M.; Matsukura, T.; Choe, J. Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. *Virology* 203:158-161; 1994.
35. Longuet, M.; Beaudenon, S.; Orth, G. Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39. *J Clin Microbiol* 34(3):738-744; 1996.
36. Bosch, F.X.; Manos, M.M.; Munoz, N.; Sherman, M.; Jansen, A.M.; Peto, J.; Schiffman, M.H.; Moreno, V.; Kurman, R.; Shah, K.V.; International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *JNCI* 87(11):796-802; 1995.

37. Wheeler, C.M.; Stewart, A.M.; Gravitt, P.E.; Cheng, S. Generation of entire human papillomavirus genomes by long PCR: frequency of errors produced during amplification. *Genome Research* 5(1):79-88; 1995.
38. Meyer, T., et. al., Association of Rare Human Papillomavirus Types with Genital Premalignant and Malignant Lesions, *J. Infectious Diseases*, 178:252-255 (1998).
39. Vernon, S. D.; Unger, E. R.;and Williams, D.; Comparison of Human Papillomavirus Detection and Typing by Cycle Sequencing, Line Blotting, and Hybrid Capture, *JCM*, Feb. 2000, p. 651-655.
40. European Guidelines for the Quality Assurance in Cervical Screening. *The European Journal of Cancer*, ISSN 0944-1947, 29.A supp. 4; 1993.
41. RD Burke, P Kelly, J Feldman, et. al., Declining Prevalence of Cervicovaginal Human Papillomavirus Infection With Age Is Independent of Other Risk Factors, *Sexually Transmitted Diseases*, July-August, 1996:333-341).
42. CDC. Recommendations for Prevention of HIV Transmission in Health-Care Settings. *MMWR* 1987;36(2S):3S-18S.
43. Schulster L.M., Hollinger F.B., Dreesman G.R., et al. Immunological and Biophysical Alteration of Hepatitis B Virus Antigens by Sodium Hypochlorite Disinfection. *Appl Envir Microbiol* 1981;42(5):762-7.

GUIDA ALLA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Osservazione	Cause probabili	Soluzioni
<p>Cambiamento di colore non corretto o non osservato durante la denaturazione.</p>	<p>Reagente di denaturazione non preparato in modo corretto o</p> <p>Reagente di denaturazione non aggiunto.</p> <p>Il campione contiene sangue o altri materiali che mascherano il cambiamento di colore.</p> <p>Il pH del campione potrebbe essere insolitamente acido.</p>	<p>Verificare che il reagente di denaturazione contenga il colorante indicatore e sia di colore viola scuro.</p> <p>Verificare che al campione sia stato aggiunto il reagente di denaturazione misurando il volume del campione (deve essere 1,5 ml). Se dal volume si evince che non è stato aggiunto il reagente di denaturazione, aggiungerlo correttamente, miscelare e procedere con il dosaggio, se si osserva il cambiamento di colore corretto.</p> <p>Con questi tipi di campioni non si prevede l'esatto cambiamento di colore descritto; ciò non dovrebbe influire negativamente sui risultati del test <i>digene</i> HC2 HPV DNA.</p> <p>Se nessuna delle altre cause è pertinente, il campione potrebbe essere insolitamente acido e il cambiamento di colore previsto non si verifica. Prelevare un nuovo campione prima di applicare acido acetico sulla cervice, poiché un pH non corretto del campione influisce negativamente sui risultati del test.</p>
<p>Il controllo di qualità dà risultati non corretti</p>	<p>È stato scelto un protocollo software non corretto per il test (ad esempio è stato usato il protocollo CPC per la metodica delle due sonde).</p> <p>È stata invertita la posizione dei controlli QC1-LR e QC2-HR.</p> <p>È stata invertita la posizione di LRC e QC1-LR e/o di HRC e QC1-HR.</p>	<p>Se il protocollo software non è corretto per il test da eseguire, occorre rileggere la piastra, entro 30 minuti dall'aggiunta del reagente di rilevazione 2, con il protocollo corretto.</p> <p>Analizzare nuovamente i campioni.</p> <p>Analizzare nuovamente i campioni.</p>
<p>Cambiamento di colore non corretto osservato durante l'ibridazione.</p>	<p>Miscelazione inadeguata della miscela della sonda con i calibratori denaturati, i controlli e/o i campioni, oppure miscela della sonda non aggiunta o volume di reagente aggiunto non corretto.</p> <p>Il campione contiene sangue o altri materiali che mascherano il cambiamento di colore.</p> <p>Campione in <1000 µl di STM.</p>	<p>Agitare la micropiastra di ibridazione o il rack per microprovette per altri 2 minuti. Se vi sono dei pozzetti che rimangono viola, aggiungere altri 25 µl della miscela della sonda corretta e miscelare accuratamente. Se dopo l'aggiunta della sonda e la miscelazione non si ottiene il cambiamento di colore corretto e se il campione non conteneva sangue o altri materiali, analizzare nuovamente il campione.</p> <p>Con questi tipi di campioni non si prevede l'esatto cambiamento di colore descritto; ciò non dovrebbe influire negativamente sui risultati del test <i>digene</i> HC2 HPV DNA.</p> <p>Controllare il volume del campione originale. Il volume deve essere 1.350 µl ± 20 µl (dopo la rimozione di 75 µl per le sonde per l'HPV a basso e ad alto rischio). Se il volume è <1.350 µl, il campione originale conteneva <1.000 µl di STM. Procurarsi un nuovo campione.</p>

Osservazione	Cause probabili	Soluzioni
<p>Il dosaggio non soddisfa i criteri di convalida. Nessun segnale osservato nel calibratore, nei controlli di qualità o nei campioni.</p>	Sonda non aggiunta al relativo diluente.	Preparare le miscele delle sonde come descritto nelle presenti istruzioni per l'uso. Etichettare le provette con cura.
	Sonda contaminata da RNasi durante la preparazione.	Per pipettare la sonda utilizzare pipette con puntali dotati di barriera di contenimento dell'aerosol e indossare i guanti. Usare solo contenitori per reagente puliti, nuovi e monouso.
	Miscelazione inadeguata della sonda e del relativo diluente.	Dopo avere aggiunto la sonda al rispettivo diluente, miscelare accuratamente agitando ad alta velocità per almeno 5 secondi. Deve formarsi un vortice visibile.
	Miscelazione inadeguata della sonda diluita e del campione denaturato.	Dopo avere aggiunto la miscela della sonda e il campione in ogni pozzetto della micropiastra o della microprovetta di ibridazione, agitare sul Rotary Shaker I impostato a 1.100 ± 100 giri per 3 ± 2 minuti. Controllare che la colorazione di ogni provetta/pozzetto della micropiastra sia passata da viola a giallo.
	Tempo o temperatura non corretti durante la fase di ibridazione.	Ibridare per 60 ± 5 minuti a 65 ± 2 °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 impostati in modo da 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.
	Miscelazione inadeguata durante la fase di cattura.	Agitare sul Rotary Shaker I per 60 ± 5 minuti a $20-25$ °C come descritto nelle presenti istruzioni per l'uso. Verificare la velocità del Rotary Shaker I mediante calibrazione come descritto nella sezione di calibrazione della velocità del manuale utente del Rotary Shaker I (<i>Rotary Shaker I User Manual</i>).
	Sonde/miscele delle sonde/provette di ibridazione scambiate.	Preparare con cura le miscele delle sonde ed etichettare di conseguenza le provette che le contengono. Prestare attenzione ad aggiungere la sonda corretta alle provette di ibridazione corrette. Etichettare le provette contenenti le miscele delle sonde, le provette di ibridazione e/o i rack per ridurre al minimo le possibilità di scambi.
Mancata aggiunta della corretta quantità di reagente di rilevazione 1 o mancata incubazione per il periodo di tempo indicato.	Pipettare 75 µl di reagente di rilevazione 1 in ogni pozzetto utilizzando un pipettatore a 8 canali. Incubare a $20-25$ °C per 30-45 minuti.	
Mancata aggiunta della corretta quantità di reagente di rilevazione 2 o mancata incubazione per il periodo di tempo indicato.	Pipettare 75 µl di reagente di rilevazione 2 in ogni pozzetto utilizzando un pipettatore a 8 canali. Incubare a $20-25$ °C per un periodo di tempo da 15 a 30 minuti.	
Malfunzionamento del luminometro o programmazione non corretta.	Consultare il rispettivo manuale utente per maggiori istruzioni oppure rivolgersi al rappresentante QIAGEN locale.	

Osservazione	Cause probabili	Soluzioni
<p>Valori RLU elevati nel calibratore, nei controlli di qualità e/o nei campioni (≥200 in molti o tutti i pozzetti). Il dosaggio potrebbe non essere conforme ai criteri di convalida.</p>	<p>Reagente di denaturazione non aggiunto o volume di reagente aggiunto non corretto; oppure miscelazione inadeguata del reagente di denaturazione con i campioni o i calibratori.</p> <p>Leggera perdita nel luminometro. Sportello non sigillato. Guarnizione dello sportello rotta.</p> <p>Contaminazione del reagente di rilevazione 2 o dei pozzetti della micropiastra di cattura da parte del reagente di rilevazione 1 o di fosfatasi alcalina esogena.</p> <p>Tampone di lavaggio contaminato.</p> <p>Automated Plate Washer contaminato.</p> <p>Lavaggio inadeguato dei pozzetti della micropiastra di cattura dopo l'incubazione del reagente di rilevazione 1.</p> <p>Contaminazione dei pozzetti della micropiastra da parte del reagente di rilevazione 1.</p> <p>Asciugatura della soluzione di ibridazione nello stesso punto delle salviettine Kimtowels o equivalenti salviettine di carta prive di fibre.</p> <p>Utilizzo di salviettine non corrette per l'asciugatura.</p>	<p>Verificare che il pipettatore a ripetizione dispensi le quantità corrette prima di aggiungere il reagente di denaturazione. È essenziale utilizzare pipettatori calibrati. Aggiungere metà volume di reagente di denaturazione a ciascuna provetta e miscelare accuratamente. 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 reagente di denaturazione.</p> <p>Controllare la lettura del rumore di fondo del luminometro provando a leggere una micropiastra vuota. Una lettura superiore a 50 RLU indica l'esistenza di una lieve perdita. Consultare il rispettivo manuale utente per maggiori istruzioni oppure rivolgersi al rappresentante QIAGEN locale.</p> <p>Fare riferimento alla sezione Controllo della contaminazione riportata in questa Guida alla risoluzione dei problemi.</p> <p>Fare riferimento alla sezione Controllo della contaminazione riportata in questa Guida alla risoluzione dei problemi.</p> <p>Fare riferimento alla sezione Controllo della contaminazione riportata in questa Guida alla risoluzione dei problemi.</p> <p>Lavare accuratamente i pozzetti della micropiastra con il tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare oppure utilizzando l'Automated Plate Washer. Dopo il lavaggio, nei pozzetti della micropiastra non devono rimanere tracce di liquido rosa residuo. Per istruzioni relative alla verifica di casi di contaminazione o guasti, consultare il manuale dell'operatore dell'Automated Plate Washer (<i>Automated Plate Washer User Manual</i>).</p> <p>Verificare che tutte le superfici di lavoro siano pulite e asciutte. Utilizzare il reagente di rilevazione 1 con precauzione. Evitare la formazione di aerosol.</p> <p>Non asciugare su salviettine Kimtowels o equivalenti salviettine di carta prive di fibre già usate in precedenza.</p> <p>Utilizzare per l'asciugatura salviettine Kimtowels o equivalenti salviettine di carta prive di fibre.</p>

Osservazione	Cause probabili	Soluzioni
Rapporti PC/NC bassi o numero elevato di campioni debolmente positivi con rapporti <2,0 (>20%). Il dosaggio potrebbe non essere conforme ai criteri di convalida.	Preparazione inadeguata del campione.	Aggiungere il volume corretto di reagente di denaturazione e miscelare accuratamente 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. Per informazioni sul protocollo, consultare le istruzioni per l'uso del kit di conversione campioni <i>digene</i> H2. Si dovrebbe osservare un netto cambiamento di colore da trasparente a viola scuro. Incubare per 45 ± 5 minuti a 65 ± 2 °C.
	Sonda non miscelata adeguatamente o quantità di sonda insufficiente aggiunta ai dosaggi.	Preparare le miscele delle sonde come descritto. Miscelare accuratamente, agitando e verificando che si formi un vortice visibile. Per garantire la corretta dispensazione, le miscele delle sonde devono essere aggiunte alle provette con un pipettatore a spostamento positivo o un pipettatore multicanale.
	Aggiunta di un volume inadeguato di sonda diluita in ogni microprovetta di ibridazione.	Verificare che il pipettatore a 8 canali dispensi le quantità corrette prima di aggiungere la miscela della sonda alla micropiastra o alle microprovette di ibridazione. Aggiungere 25 µl di miscela della sonda in ogni pozzetto della micropiastra o microprovetta contenente calibratori, controlli di qualità e campioni clinici denaturati. Verificare che il pipettatore a 8 canali dispensi le quantità corrette prima di aggiungere la miscela della sonda ai pozzetti della micropiastra di ibridazione. Dopo l'aggiunta e la completa miscelazione della miscela della sonda dovrebbe avvenire il cambiamento di colore da viola scuro a giallo. I campioni in soluzione PreservCyt assumono una colorazione rosa anziché gialla.
	Perdita di attività da parte del reagente di rilevazione 1.	Conservare il reagente di rilevazione 1 a 2-8 °C. Utilizzarlo prima della data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione esterna del kit.
	Cattura insufficiente.	La fase di cattura dovrebbe essere eseguita utilizzando il Rotary Shaker I impostato a 1.100 ± 100 giri. Convalidare la velocità dello strumento mediante calibrazione.
Lavaggio inadeguato.	Lavare accuratamente i pozzetti della micropiastra con il tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare oppure utilizzando l'Automated Plate Washer.	
Tampone di lavaggio contaminato.	Fare riferimento alla sezione Controllo della contaminazione riportata in questa Guida alla risoluzione dei problemi.	
Serie di campioni positivi con valori RLU pressoché identici.	Contaminazione dei pozzetti della micropiastra di cattura durante la manipolazione del test.	Coprire la micropiastra di cattura durante tutte le incubazioni. Evitare di esporre le provette alla contaminazione di aerosol mentre si esegue il dosaggio. Indossare guanti non talcati durante la manipolazione.
	Contaminazione del reagente di rilevazione 2.	Prestare attenzione a non contaminare lo stock quando si pipetta il reagente di rilevazione 2 nei pozzetti della micropiastra di cattura. Evitare la contaminazione del reagente di rilevazione 2 da parte di aerosol provenienti dal reagente di rilevazione 1 o da polvere presente in laboratorio, ecc.
	Malfunzionamento dell'Automated Plate Washer.	Per istruzioni relative alla verifica di casi di contaminazione o guasti, fare riferimento alla sezione Controllo della contaminazione riportata in questa Guida alla risoluzione dei problemi o consultare il manuale dell'operatore dell'Automated Plate Washer (<i>Automated Plate Washer User Manual</i>).
%CV ampi fra i replicati.	Uso scorretto dei pipettatori.	Controllare il pipettatore per verificare che continui a dispensare volumi riproducibili. Calibrare i pipettatori di routine.
	Miscelazione insufficiente.	Miscelare accuratamente tutte le fasi. Agitare prima dell'incubazione per la denaturazione e dopo avere aggiunto la miscela della sonda. Verificare che si formi un vortice visibile.
	Trasferimento incompleto del liquido dalle microprovette di ibridazione ai pozzetti della micropiastra di cattura.	Prestare attenzione durante la fase di trasferimento dai pozzetti della micropiastra o dalle microprovette di ibridazione alla micropiastra di cattura per avere la certezza di trasferire volumi riproducibili.
	Condizioni di lavaggio inadeguate.	Lavare accuratamente i pozzetti della micropiastra con il tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare oppure utilizzando l'Automated Plate Washer e i corrispondenti protocolli.
	Contaminazione dei pozzetti della micropiastra da parte del reagente di rilevazione 1.	Verificare che tutte le superfici di lavoro siano pulite e asciutte. Prestare attenzione quando si utilizza il reagente di denaturazione 1. Evitare la formazione di aerosol.

Osservazione	Cause probabili	Soluzioni
Falsi positivi ottenuti da campioni con negatività nota.	<p>Reagente di rilevazione 2 contaminato.</p> <p>Contaminazione dei pozzetti della micropiastra da parte del reagente di rilevazione 1.</p> <p>Asciugatura di diverse file nello stesso punto delle salviettine Kimtowels o equivalenti salviettine di carta prive di fibre.</p> <p>Preparazione inadeguata del campione.</p> <p>Condizioni di lavaggio inadeguate.</p> <p>Contaminazione del puntale della pipetta con materiale non denaturato durante il trasferimento del campione denaturato nella microprovetta o nel pozzetto della micropiastra utilizzata/o per l'ibridazione della sonda per l'HPV.</p>	<p>Prestare attenzione a non causare la contaminazione crociata dei campioni quando si dispensa il reagente di rilevazione 2 da un campione all'altro. Se si utilizza il kit solo in parte, aliquotare il volume necessario per il dosaggio in un contenitore per reagenti monouso pulito, prima di riempire il pipettatore.</p> <p>Lavare accuratamente i pozzetti della micropiastra con il tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare oppure utilizzando l'Automated Plate Washer. Dopo il lavaggio, nei pozzetti della micropiastra non devono rimanere tracce di liquido rosa residuo.</p> <p>Non asciugare utilizzando nello stesso punto salviettine già usate in precedenza, in quanto potrebbe verificarsi contaminazione.</p> <p>Aggiungere il volume corretto di reagente di denaturazione e miscelare accuratamente agitando. Per evitare falsi positivi, verificare che il liquido bagni l'intera superficie della provetta utilizzando la metodica manuale oppure la metodica con MST Vortexer 2 (per la metodica manuale capovolgere la provetta una volta). 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. Per informazioni sul protocollo, consultare le istruzioni per l'uso del kit di conversione campioni <i>digene</i>HC2. Si dovrebbe osservare un netto cambiamento del colore in viola scuro per tutti i campioni. Incubare a 65 ± 2 °C per 45 ± 5 minuti. Per i campioni in SurePath, accertarsi che siano incubati per 90 ± 5 minuti a 65 ± 2 °C.</p> <p>Lavare accuratamente i pozzetti della micropiastra con il tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare oppure utilizzando l'Automated Plate Washer e i corrispondenti protocolli.</p> <p>La fase di denaturazione della procedura di processazione dei campioni deve essere eseguita come indicato nelle presenti istruzioni per l'uso. Una miscelazione del campione, un'inversione della provetta e un'agitazione non correttamente eseguite possono causare una denaturazione incompleta degli ibridi RNA:DNA aspecifici endogeni rispetto ai campioni cervicali. In particolare, quando si utilizzano campioni in soluzione PreservCyt o nel fluido conservante SurePath, è probabile che questi ibridi siano presenti sulle pareti interne della provetta di denaturazione del campione. Per impedire un possibile carry-over di questo materiale cellulare non denaturato, il puntale della micropipetta non deve toccare i lati della provetta per la denaturazione del campione durante il trasferimento del campione denaturato nella microprovetta o nel pozzetto della micropiastra utilizzato per l'ibridazione della sonda per l'HPV.</p>
Elevati valori RLU del calibratore negativo (>200 RLU). La restante parte del dosaggio viene eseguita come previsto.	<p>Il reagente di rilevazione 2 è stato incubato a una temperatura maggiore di 20-25 °C.</p> <p>Il reagente di rilevazione 2 è stato incubato per un periodo superiore ai 30 minuti.</p> <p>Il reagente di rilevazione 2 o il tampone di lavaggio sono stati contaminati da fosfatasi alcalina o reagente di rilevazione 1.</p>	<p>Eseguire nuovamente il test e verificare che durante le fasi di cattura e rilevazione l'incubazione avvenga a 20-25 °C.</p> <p>Leggere la piastra dopo 15 minuti di incubazione (e non oltre 30 minuti) a 20-25 °C.</p> <p>Fare riferimento alla sezione Controllo della contaminazione riportata in questa Guida alla risoluzione dei problemi.</p>
Il dosaggio non soddisfa i criteri di convalida. Rapporto PC/NC elevato	È stata invertita la posizione di HRC e QC2-HR e/o di LRC e QC1-LR	Analizzare nuovamente i campioni. Leggere attentamente le etichette sulle fiale del calibratore e dei controlli di qualità per evitare di invertire la posizione di questi reagenti.

CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE

Reagente valutato	Procedura di controllo della contaminazione	Interpretazione dei risultati
<p>Nota: Dispensare il reagente di rilevazione 2 con precauzione per evitare contaminazione. Indossare guanti ed evitare di toccare qualsiasi superficie di lavoro con i puntali delle pipette.</p>		
Reagente di rilevazione 2	<ul style="list-style-type: none"> Pipettare 75 µl della fiala aliquotata, residua e/o originale del reagente di rilevazione 2 in un pozzetto vuoto della micropiastra di cattura. Incubare a 20-25 °C per 15 minuti. Evitare la luce solare diretta. Leggere i pozzetti della micropiastra nel luminometro. <p>Nota: Analizzando il reagenti di rilevazione 2 in replicati di 3 è possibile ottenere una valutazione ottimale delle prestazioni.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Il controllo del reagente di rilevazione 2 deve essere < 50 RLU. Se i valori del reagente di rilevazione 2 sono < 50 RLU, il reagente di rilevazione 2 può essere utilizzato per ripetere il dosaggio. Se contaminato (>50 RLU), procurarsi un nuovo kit e ripetere il dosaggio.
Sistema del tampone di lavaggio e/o sorgente d'acqua	<ul style="list-style-type: none"> Pipettare 75 µl del reagente di rilevazione 2 in 4 pozzetti della micropiastra di cattura separati. Etichettare i pozzetti 1-4. Il pozzetto 1 serve per il controllo del reagente di rilevazione 2. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dal flacone Wash nel pozzetto 2. Lasciare scorrere il tampone di lavaggio attraverso la tubazione dello strumento. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dalla tubazione nel pozzetto 3. Procurarsi un'aliquota dell'acqua utilizzata per preparare il tampone di lavaggio. Pipettare 10 µl di acqua nel pozzetto 4. Incubare a 20-25 °C per 15 minuti. Evitare la luce solare diretta. Leggere i pozzetti della micropiastra nel luminometro. 	<ul style="list-style-type: none"> Il controllo del reagente di rilevazione 2 (pozzetto 1) deve essere < 50 RLU. Confrontare il valore RLU dei pozzetti 2, 3 e 4 con il valore RLU del controllo del reagente di rilevazione 2 (pozzetto 1). I singoli valori RLU per i pozzetti 2, 3 e 4 non devono superare di 50 RLU il valore RLU del controllo del reagente di rilevazione 2 (pozzetto 1). I valori che superano di 50 RLU il controllo del reagente di rilevazione 2 indicano contaminazione. Vedere la sezione Preparazione e conservazione dei reagenti per le istruzioni sulla pulizia e la manutenzione del sistema di lavaggio.
Automated Plate Washer	<ul style="list-style-type: none"> Pipettare 75 µl del reagente di rilevazione 2 in 5 pozzetti della micropiastra di cattura separati. Etichettare i pozzetti 1-5. Il pozzetto 1 serve per il controllo del reagente di rilevazione 2. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dal flacone del Plate Washer con l'etichetta <i>Wash</i> (Lavaggio) nel pozzetto 2. Pipettare 10 µl del liquido di risciacquo dal flacone del Plate Washer con l'etichetta <i>Rinse</i> (Risciacquo) nel pozzetto 3. Premere il tasto Prime sulla tastiera del Plate Washer, lasciando scorrere il tampone di lavaggio attraverso i tubi. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dal recipiente nel pozzetto 4. Premere il tasto Rinse sulla tastiera del Plate Washer, lasciando scorrere il liquido di risciacquo attraverso i tubi. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dal recipiente nel pozzetto 5. Coprire e incubare a 20-25 °C per 15 minuti. Evitare la luce solare diretta. Leggere i pozzetti della micropiastra nel luminometro. 	<ul style="list-style-type: none"> Il controllo del reagente di rilevazione 2 (pozzetto 1) deve essere < 50 RLU. Confrontare il valore RLU dei pozzetti 2, 3, 4 e 5 con il valore RLU del controllo del reagente di rilevazione 2 (pozzetto 1). I singoli valori RLU dei pozzetti 2, 3, 4 e 5 non devono superare di 50 RLU il valore RLU del controllo del reagente di rilevazione 2 (pozzetto 1). I valori che superano di 50 RLU il controllo del DR2 indicano la contaminazione del Plate Washer. Per la procedura di decontaminazione, consultare il manuale dell'operatore dell'Automated Plate Washer (<i>Automated Plate Washer User Manual</i>).

INFORMAZIONI DI CONTATTO QIAGEN

Per contattare il rappresentante QIAGEN locale utilizzare il foglio dei contatti allegato a questo prodotto.

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

I marchi, i 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:

Brevetti USA per HPV

5,643,715 • 5,712,092 • 5,876,922 • 5,952,487 • 5,958,674 • 5,981,173 • 6,107,086

Brevetto USA per Hybrid Capture

6,228,578B1

Riepilogo del test digene HC2 HPV DNA

IMPORTANTE: prima di utilizzare questo riepilogo è necessario avere acquisito piena familiarità con tutti i dettagli della procedura.

	Procedura	
	Metodica di agitazione manuale	Metodica con Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2
DENATURAZIONE (Per i campioni in soluzione PreservCyt consultare le istruzioni per l'uso del kit di conversione campioni digene HC2)	Etichettare le microprovette di ibridazione. Preparare il reagente di denaturazione. ↓ Pipettare il reagente di denaturazione (volume equivalente a metà del volume del campione) nei calibratori, controlli di qualità e nei campioni. Agitare ogni campione, calibratore e controllo di qualità singolarmente per 5 secondi alla velocità massima (per maggiori informazioni consultare le presenti istruzioni per l'uso). Controllare che tutte le provette siano di colore viola. ↓ Incubare a 65 ± 2 °C per 45 ± 5 minuti. ↓ Preparare la miscela della sonda per l'HPV. ↓ ↓ ↓	Etichettare la piastra di ibridazione. Preparare il reagente di denaturazione. ↓ Pipettare il reagente di denaturazione (volume equivalente a metà del volume del campione) nei calibratori, controlli di qualità e nei campioni. Controllare che tutte le provette siano di colore viola. ↓ Coprire il rack con la pellicola e il coperchio. ↓ Agitare per 10 secondi. ↓ Incubare a 65 ± 2 °C per 45 ± 5 minuti. ↓ Preparare la miscela della sonda per l'HPV. ↓ ↓
IBRIDAZIONE Metodica della miscela di sonde eterogenee Metodica delle due sonde	Metodica del bagno d'acqua Miscelare accuratamente i campioni denaturati e pipettarne 75 µl nelle provette. ↓ Incubare per 10 minuti a 20-25 °C. ↓ Pipettare 25 µl di miscela di sonde eterogenee nelle microprovette di ibridazione. OPPURE Miscelare accuratamente i campioni denaturati e pipettarne 75 µl nelle provette "LR". Miscelare accuratamente i campioni denaturati e pipettarne 75 µl nelle provette "HR". ↓ Incubare per 10 minuti a 20-25 °C. ↓ Pipettare 25 µl di miscela della sonda per l'HPV a basso rischio nelle provette "LR". Pipettare 25 µl di miscela della sonda per l'HPV ad alto rischio nelle provette "HR". ↓ Coprire le microprovette con un copripiastra e agitare sul Rotary Shaker I a 1.100 ± 100 giri/min per 3 ± 2 minuti. Controllare che tutte le provette siano di colore giallo. ↓ Incubare a 65 ± 2 °C per 60 ± 5 minuti. Preparare la micropiastra di cattura. ↓ ↓ ↓	Metodica con il Microplate Heater I Miscelare accuratamente i campioni denaturati e pipettarne 75 µl nei pozzetti della micropiastra. ↓ Incubare per 10 minuti a 20-25 °C. ↓ Pipettare 25 µl di miscela di sonde eterogenee nei pozzetti della micropiastra di ibridazione. OPPURE Miscelare accuratamente i campioni denaturati, quindi pipettarne 75 µl nei pozzetti della micropiastra "LR" e 75 µl in quelli della micropiastra "HR". ↓ Incubare per 10 minuti a 20-25 °C. ↓ Pipettare 25 µl di miscela della sonda per l'HPV a basso rischio nei pozzetti della micropiastra "LR". Pipettare 25 µl di miscela della sonda per l'HPV ad alto rischio nei pozzetti della micropiastra "HR". ↓ Coprire la micropiastra con il coperchio e agitare sul Rotary Shaker I a 1.100 ± 100 giri/min per 3 ± 2 minuti. Controllare che tutte le provette siano di colore giallo. ↓ Incubare a 65 ± 2 °C per 60 ± 5 minuti. Preparare la micropiastra di cattura. ↓ ↓
CATTURA DEGLI IBRIDI	Trasferire il contenuto di ogni pozzetto della micropiastra di ibridazione o microprovetta nel corrispondente pozzetto della micropiastra di cattura utilizzando un pipettatore a 8 canali. Coprire con il coperchio o il copripiastra. Agitare a 1.100 ± 100 giri a 20-25 °C per 60 ± 5 minuti. Preparare il tampone di lavaggio. ↓ Decantare e asciugare la micropiastra di cattura (per maggiori informazioni consultare le presenti istruzioni per l'uso). ↓	
RILEVAZIONE DEGLI IBRIDI	Pipettare 75 µl del reagente di rilevazione 1 in ogni pozzetto della micropiastra di cattura. Coprire la micropiastra di cattura con il coperchio, la pellicola Parafilm o materiale equivalente. Incubare a 20-25 °C per 30-45 minuti. Lavare la piastra con la metodica desiderata. ↓	
LAVAGGIO	Metodica di lavaggio manuale Decantare e asciugare la micropiastra di cattura (per maggiori informazioni consultare le presenti istruzioni per l'uso). ↓ Lavare 6 volte. ↓ Asciugare su salviettine di carta prive di fibre. ↓	Metodica con Automated Plate Washer Porre la piastra sullo strumento e premere "START/STOP" per avviarlo. ↓ Passare alla fase successiva. ↓ ↓ ↓
AMPLIFICAZIONE DEL SEGNALE	Pipettare 75 µl del reagente di rilevazione 2 in ogni pozzetto della micropiastra di cattura. Incubare a 20-25 °C per 15 - 30 minuti. ↓	
LETTURA	Leggere la micropiastra di cattura sullo strumento DML. ↓ Convalidare il test e interpretare i risultati dei campioni.	