

Xpert® HPV

REF GXHPV-CE-10

Trademark, Patents and Copyright Statements

Cepheid[®], the Cepheid logo, GeneXpert[®] and Xpert[®] are trademarks of Cepheid.

Windows[®] is a trademark of Microsoft Corporation.

ThinPrep[®] and PreservCyt[®] are trademarks of Hologic, Inc.

THE PURCHASE OF THIS PRODUCT CONVEYS TO THE BUYER THE NON-TRANSFERABLE RIGHT TO USE IT IN ACCORDANCE WITH THIS PACKAGE INSERT. NO OTHER RIGHTS ARE CONVEYED EXPRESSLY, BY IMPLICATION OR BY ESTOPPEL. FURTHERMORE, NO RIGHTS FOR RESALE ARE CONFERRED WITH THE PURCHASE OF THIS PRODUCT.

Copyright © 2020 Cepheid. All rights reserved.

Dichiarazioni relative a marchi di fabbrica, brevetti e copyright

Cepheid[®], il logo Cepheid, GeneXpert[®] e Xpert[®] sono marchi di fabbrica di Cepheid.

Windows[®] è un marchio di fabbrica di Microsoft Corporation.

ThinPrep[®] e PreservCyt[®] sono marchi di fabbrica di Hologic, Inc.

L'ACQUISTO DI QUESTO PRODOTTO CONCEDE ALL'ACQUIRENTE IL DIRITTO NON TRANSFERIBILE DI UTILIZZARLO D'ACCORDO CON QUESTO FOGLIETTO ILLUSTRATIVO. NESSUN ALTRO DIRITTO VIENE CONCESSO ESPRESSAMENTE, IMPLICITAMENTE O PER PRECLUSIONE. INOLTRE, CON L'ACQUISTO DI QUESTO PRODOTTO NON VIENE CONCESSO NESSUN DIRITTO ALLA RIVENDITA.

Copyright © 2020 Cepheid. Tutti i diritti riservati.



Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna
Sweden

Xpert® HPV

Solo per uso diagnostico *in vitro*.

1 Nome registrato

Xpert® HPV

2 Nome comune o usuale

Xpert HPV Assay

3 Uso previsto

Il saggio Xpert HPV Assay è un test qualitativo *in vitro* per il rilevamento della regione E6/E7 del genoma di DNA virale del papilloma virus umano (Human Papillomavirus, HPV) ad alto rischio in campioni di analisi prelevati dalle pazienti. Il test consiste nell'esecuzione di un'amplificazione multiplex del DNA bersaglio dei 14 tipi di HPV ad alto rischio in una singola analisi mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) in tempo reale. Il saggio Xpert HPV Assay consente di identificare in modo specifico i tipi HPV 16 e HPV 18/45 in due canali di rilevamento distinti e riportare gli altri 11 tipi ad alto rischio (31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) in un unico risultato combinato (pooling). I campioni di analisi sono limitati alle cellule cervicali prelevate in soluzione PreservCyt® (Hologic Corp.). Sono stati convalidati per l'uso con Xpert HPV Assay anche i campioni cervicali prelevati in soluzione PreservCyt per l'esame citologico e pretrattati con acido acetico glaciale (Glacial Acetic Acid, GAA) per lisare i globuli rossi in eccesso.

Indicazioni relative al saggio Xpert HPV Assay:

- Il saggio Xpert HPV Assay può essere utilizzato con un campione di analisi del Pap test per valutare la presenza o l'assenza dei tipi di HPV ad alto rischio. Le informazioni così ottenute, insieme alla valutazione medica dell'anamnesi della paziente, agli altri fattori di rischio e alle linee guida professionali, possono essere utilizzate come ausilio nella gestione della paziente.
- Il saggio Xpert HPV Assay può essere utilizzato con un campione di analisi del Pap test per valutare la presenza o l'assenza dei genotipi di HPV 16 e 18/45. Le informazioni così ottenute, insieme alla valutazione medica dell'anamnesi della paziente, agli altri fattori di rischio e alle linee guida professionali, possono essere utilizzate come ausilio nella gestione della paziente.

4 Riepilogo e spiegazione

L'infezione persistente da HPV ad alto rischio è la causa principale del carcinoma della cervice uterina ed è un precursore della neoplasia cervicale intraepiteliale (CIN). La presenza dell'HPV è implicata in più del 99% dei tumori cervicali in tutto il mondo.¹ L'HPV è un piccolo virus a DNA a doppia elica, privo di pericapside, con un genoma di circa 8.000 nucleotidi. Esistono più di 150 tipi diversi di HPV, e circa 40 tipi di HPV che sono in grado di infettare la mucosa ano-genitale nell'uomo.² Tuttavia, solo un sottoinsieme costituito da circa 14 di questi tipi è considerato ad alto rischio per lo sviluppo del tumore cervicale e delle relative lesioni precorritrici. I risultati dei recenti studi suggeriscono che i protocolli e i test di screening specifici per il DNA dei tipi di HPV ad alto rischio dovrebbero essere incentrati sui virus HPV di tipo 16, 18 e 45.³ Complessivamente, i virus HPV di tipo 16, 18 e 45 sono stati ritrovati nel 75% di tutti i carcinomi squamosi e si ritiene che siano associati a circa l'80% di tutti i tumori cervicali invasivi.^{4,5}

Nota Salvo diversamente specificato, nella presente pubblicazione "HPV" o "HR HPV" significa "HPV ad alto rischio".

5 Principio della procedura

Il saggio Xpert HPV Assay è un test automatizzato per il rilevamento e il differenziamento qualitativo del DNA dell'HPV. Il saggio viene eseguito sui sistemi dello strumento GeneXpert di Cepheid.

I sistemi dello strumento GeneXpert consentono di automatizzare e integrare il trattamento dei campioni, la lisi delle cellule, la purificazione, l'amplificazione degli acidi nucleici e il rilevamento delle sequenze bersaglio nei campioni clinici, utilizzando la PCR in tempo reale. I sistemi comprendono uno strumento, un computer e un software già installato per l'esecuzione dei test e la visualizzazione dei risultati. I sistemi richiedono l'utilizzo delle cartucce GeneXpert monouso contenenti i reagenti della PCR, all'interno delle quali viene collocato il campione e si svolge il trattamento basato sulla PCR. Essendo le cartucce chiuse, il rischio di contaminazione crociata tra i campioni è ridotto al minimo. Per una descrizione completa dei sistemi, vedere il *Manuale dell'operatore di GeneXpert Dx System* o il *Manuale dell'operatore di GeneXpert Infinity System*, come appropriato.

Il saggio Xpert HPV Assay include i reagenti per il rilevamento dell'HPV ad alto rischio. Il saggio Xpert HPV Assay è progettato per l'uso con campioni cervicali prelevati in PreservCyt tramite spazzolino o tramite spatola associata a spazzolino endocervicale. È possibile utilizzare anche i campioni cervicali pretrattati con determinati metodi che prevedono l'uso dell'acido acetico glaciale (GAA). I campioni cervicali prelevati in soluzione PreservCyt sono stati convalidati per l'uso con il test Xpert per l'HPV. Per il prelievo dei campioni cervicali seguire le istruzioni del fabbricante.

La cartuccia include anche un controllo per l'adeguatezza dei campioni (Sample Adequacy Control, SAC) e un controllo per la verifica della sonda (Probe Check Control, PCC). I reagenti del controllo SAC rilevano la presenza di un gene umano in singola copia e verificano che il campione di analisi contenga un numero adeguato di cellule umane tale da consentire l'esecuzione di una stima qualitativa dello stato dell'HPV. Il PCC verifica la reidratazione dei reagenti, il riempimento delle provette della PCR nelle cartucce, l'integrità della sonda e la stabilità dei coloranti.

I canali contengono i primer e le sonde per il rilevamento dei genotipi specifici o dei risultati combinati, come descritto di seguito: "SAC; Principale" per il controllo dell'adeguatezza dei campioni, "HPV 16; Principale" per l'HPV 16, "HPV 18_45; Principale" per il risultato combinato dell'HPV 18/45, "P3; Principale" per il risultato combinato di uno dei tipi di HPV 31, 33, 35, 52 o 58, "P4; Principale" per il risultato combinato dell'HPV di tipo 51 o 59 e "P5; Principale" per il risultato combinato di uno dei tipi di HPV 39, 56, 66 o 68. Per un esempio di legenda del saggio, vedere la Figura 5.

6 Reagenti e strumenti

6.1 Materiale fornito

 Il kit del saggio Xpert HPV Assay (GXHPV-CE-10) contiene reagenti sufficienti per il trattamento di 10 campioni di analisi e/o di controllo qualità.

Il contenuto del kit è il seguente:

Cartucce del saggio Xpert HPV Assay con provette di reazione integrate	10
• Microsfera 1 e 2 (liofilizzate)	1 di ciascuna per cartuccia
• Reagente tampone	2,0 ml per cartuccia
Pipette di trasferimento (1 ml)	10
CD	1
• File di definizione del saggio (Assay Definition File, ADF)	
• Istruzioni per l'importazione dell'ADF nel software GeneXpert	
• Istruzioni per l'uso (foglietto illustrativo)	

Nota Le schede di sicurezza (SDS) sono disponibili sul sito www.cepheid.com o sul sito www.cepheidinternational.com nella scheda **SUPPORT (ASSISTENZA)**.

Nota L'albumina di siero bovino (BSA) presente nelle microsfele di questo prodotto è stata prodotta esclusivamente da plasma bovino di origine statunitense. Gli animali non sono stati nutriti con proteine di ruminanti o altre proteine animali; gli animali hanno superato i test ante mortem e post mortem. Durante la lavorazione, il materiale non è stato miscelato con altro materiale animale.

6.2 Conservazione e manipolazione

-  • Conservare le cartucce e i reagenti del saggio Xpert HPV Assay a una temperatura compresa tra 2 °C e 28 °C.
- Non aprire le cartucce fino al momento di eseguire il test. Utilizzare le cartucce entro 30 minuti dall'apertura del coperchio.
-  • Non utilizzare i reagenti o le cartucce oltre la data di scadenza.
- Non utilizzare cartucce che presentano perdite.

6.3 Materiali necessari ma non forniti

- Campione cervicale prelevato in PreservCyt tramite spazzolino o tramite spatola associata a spazzolino endocervicale
- Sistemi di strumentazione GeneXpert Dx o GeneXpert Infinity (il numero di catalogo varia in base alla configurazione): strumento GeneXpert, computer, lettore di codici a barre e Manuale dell'operatore.
 - Per il sistema GeneXpert Dx: software GeneXpert Dx versione 4.3 o successiva
 - Per i sistemi GeneXpert Infinity-80 e Infinity-48s: software Xpertise versione 6.1 o successiva

- Manuale dell'operatore del sistema dello strumento GeneXpert appropriato
- Stampante (se fosse necessario l'uso di una stampante, contattare l'Assistenza Tecnica di Cepheid per predisporre l'acquisto di una stampante consigliata).

7 Avvertenze e precauzioni

7.1 Generale



- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Nei campioni clinici possono essere presenti microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e il virus dell'immunodeficienza umana (HIV). Tutti i campioni biologici, comprese le cartucce usate, devono essere trattati come potenziali veicoli di agenti infettivi. Poiché, nella maggior parte dei casi, è impossibile distinguere i potenziali veicoli di infezione, tutti i campioni biologici devono essere trattati attenendosi alle precauzioni standard. Le linee guida per il trattamento dei campioni sono disponibili presso l'ente statunitense per la prevenzione e il controllo delle malattie (U.S. Center for Disease Control and Prevention) e l'istituto per gli standard clinici e di laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute).^{6,7}
- Attenersi alle procedure di sicurezza del proprio istituto per l'utilizzo e la manipolazione di sostanze chimiche e campioni biologici.
- I campioni biologici di analisi, i dispositivi di trasferimento e le cartucce usate devono essere trattati come potenziali veicoli di agenti infettivi adottando le precauzioni standard. Attenersi alle procedure di smaltimento dei rifiuti ambientali della propria struttura sanitaria per il corretto smaltimento delle cartucce usate e dei reagenti non utilizzati. Questi materiali potrebbero essere considerati rifiuti chimici pericolosi per il cui smaltimento sarà necessario attenersi a specifiche procedure nazionali o regionali. Se i regolamenti nazionali o regionali non forniscono istruzioni chiare sul corretto smaltimento, i campioni biologici di analisi e le cartucce usate devono essere smaltiti in base alle linee guida dell'OMS (Organizzazione mondiale della sanità) sulla manipolazione e lo smaltimento dei rifiuti medici.
- Per evitare la contaminazione dei campioni di analisi delle pazienti durante la manipolazione si consiglia di osservare le buone pratiche di laboratorio e cambiarsi i guanti tra un campione e l'altro.

7.2 Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni di analisi

• Prelievo dei campioni di analisi

I campioni cervicali prelevati in soluzione PreservCyt sono stati convalidati per l'uso con il saggio Xpert HPV Assay. Per il prelievo dei campioni cervicali seguire le istruzioni del fabbricante.

• Trasporto dei campioni di analisi



I campioni cervicali prelevati in soluzione PreservCyt possono essere trasportati a una temperatura compresa tra 2 °C e 30 °C. Il trasporto dei campioni di analisi dell'HPV deve soddisfare i requisiti previsti dai regolamenti nazionali, regionali e locali per il trasporto degli agenti eziologici.⁸

• Conservazione dei campioni di analisi



I campioni cervicali prelevati in soluzione PreservCyt possono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 30 °C fino a sei mesi dalla data del prelievo.

7.3 Saggio/Reagente

- Non sostituire i reagenti del saggio Xpert HPV Assay con altri reagenti.
- Non aprire il coperchio della cartuccia del saggio Xpert HPV Assay fino a quando non si è pronti ad aggiungere il campione durante l'analisi.
- Non utilizzare una cartuccia che è caduta dopo essere stata estratta dalla confezione.
- Non agitare la cartuccia. Se la cartuccia cade o viene agitata dopo l'apertura, si potrebbero ottenere risultati non validi.
- Non applicare l'etichetta con l'ID del campione sul coperchio della cartuccia o sull'etichetta del codice a barre.
- Non utilizzare una cartuccia la cui provetta di reazione sia danneggiata.
- ② • Ogni cartuccia monouso del saggio Xpert HPV Assay serve a eseguire un solo test. Non riutilizzare le cartucce usate.
- Indossare i guanti e il camice da laboratorio. Cambiarsi i guanti quando si passa da un campione all'altro durante il trattamento dei campioni.
- Nel caso in cui l'area di lavoro o le apparecchiature vengano contaminate dai campioni o dai controlli, pulire a fondo le superfici interessate con una soluzione di candeggina per uso domestico a base di ipoclorito di sodio diluito 1:10 e poi con una soluzione di etanolo al 70% o isopropanolo al 70%. Asciugare completamente le superfici di lavoro prima di continuare.

8 Pericoli chimici^{9,10}

I componenti non sono considerati pericolosi ai sensi delle direttive UE per la classificazione e l'etichettatura delle sostanze chimiche o delle miscele o ai sensi del Sistema di armonizzazione globale della classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche e delle miscele.

9 Procedura

Prima di iniziare queste procedure, verificare che nello strumento GeneXpert sia in esecuzione il software GeneXpert Dx versione 4.3 o successiva o il software Xpertise versione 6.1 o successiva.

Importante Iniziare il test entro 30 minuti dall'apertura del coperchio della cartuccia.

9.1 Preparazione della cartuccia

Per aggiungere il campione alla cartuccia del saggio Xpert HPV Assay:

1. Elementi necessari:

- cartuccia del saggio Xpert HPV Assay;
- pipetta di trasferimento, in dotazione (la tacca sulla pipetta indica il volume di riempimento di 1 ml);
- campione del test adeguatamente prelevato ed etichettato.



2. Controllare che la cartuccia per il test non sia danneggiata. Se danneggiata, non utilizzarla.
3. Aprire il coperchio della cartuccia.
4. Miscelare il campione capovolgendo delicatamente il relativo flaconcino da 8 a 10 volte, oppure miscelandolo brevemente con un miscelatore vortex a velocità media per 5 secondi senza interruzione.
5. Aprire la confezione della pipetta di trasferimento.
6. Aprire il coperchio del flaconcino del campione, schiacciare la pompetta della pipetta di trasferimento, inserire la pipetta nel flaconcino e riempirla, rilasciando la pompetta, fino alla tacca che indica 1 ml. Vedere la Figura 1. Verificare che la pipetta si riempia senza che siano presenti bolle d'aria.

Importante Evitare di aggiungere muco in eccesso nella cartuccia.

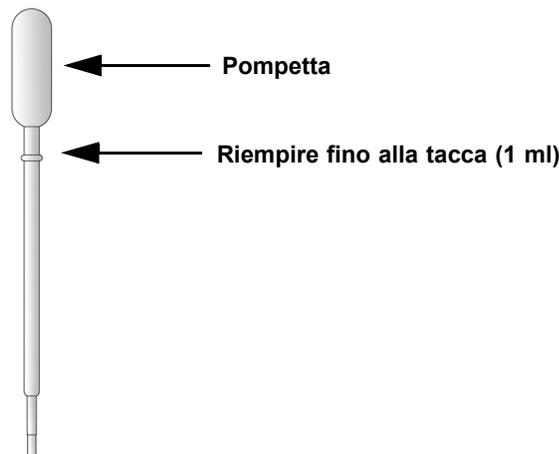


Figura 1. Pipetta di trasferimento e tacca di riempimento

7. Espellere il contenuto della pipetta nella camera della cartuccia riservata al campione. Vedere la Figura 2.

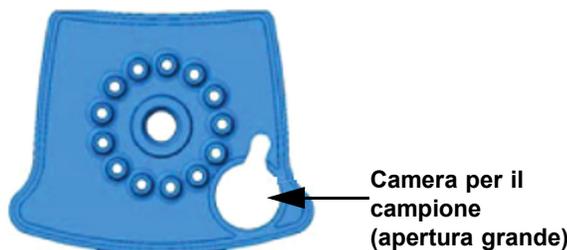


Figura 2. Cartuccia del saggio Xpert HPV (vista dall'alto)

8. Chiudere il coperchio della cartuccia.

9.2 Avvio del test

Importante

Prima di iniziare il test, verificare che i file di definizione (ADF) del saggio Xpert HPV Assay siano stati importati all'interno del software. Questa sezione elenca le fasi principali di esecuzione del test. Per istruzioni dettagliate, consultare il *Manuale dell'operatore del GeneXpert Dx System* o il *Manuale dell'operatore del GeneXpert Infinity System*.

Nota I passaggi da seguire possono variare se l'amministratore del sistema modifica il flusso di lavoro predefinito del sistema.

In questa sezione vengono riportati i passaggi predefiniti per il funzionamento del GeneXpert System. Per istruzioni dettagliate, consultare il *Manuale dell'operatore di GeneXpert Dx System* o il *Manuale dell'operatore di GeneXpert Infinity System* in base al modello utilizzato.

- Accendere il sistema dello strumento GeneXpert:
 - Se si utilizza lo strumento GeneXpert Dx, accendere prima lo strumento e poi il computer. Il software GeneXpert si avvierà automaticamente, oppure potrebbe essere necessario fare doppio clic sull'icona del collegamento del software GeneXpert Dx sul desktop di Windows®.
 - oppure
 - Se si utilizza lo strumento GeneXpert Infinity, accendere lo strumento. Il software GeneXpert si avvierà automaticamente, oppure potrebbe essere necessario fare doppio clic sull'icona del collegamento del software Xpertise sul desktop di Windows.
- Connettersi al software del sistema dello strumento GeneXpert con il proprio nome utente e la password.
- Nella finestra del sistema GeneXpert, fare clic su **Crea analisi** (GeneXpert Dx) oppure fare clic su **Orders (Ordini)** e **Order Test (Ordina analisi)** (Infinity). Verrà visualizzata la finestra Crea analisi. Vedere la Figura 3.

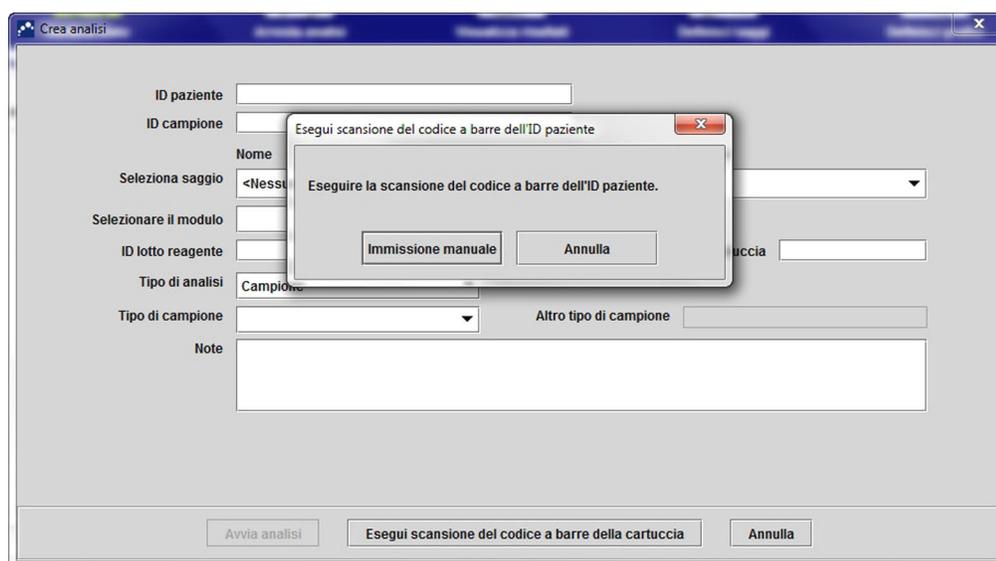


Figura 3. Finestra Crea analisi di GeneXpert Dx

4. Eseguire la scansione o digitare l'ID del paziente (opzionale). Se l'ID del paziente viene digitato, assicurarsi che sia digitato correttamente. L'ID del paziente è associato ai risultati del test e viene visualizzato nella finestra Visualizza risultati.
5. Eseguire la scansione o digitare l'ID del campione. Se l'ID del campione viene digitato, assicurarsi che sia digitato correttamente. L'ID del campione è associato ai risultati del test e viene visualizzato nella finestra Visualizza risultati così come su tutti i rapporti. Verrà visualizzata la finestra di dialogo Esegui scansione del codice a barre della cartuccia.
6. Eseguire la scansione del codice a barre della cartuccia Xpert HPV. Verrà visualizzata la finestra Crea analisi. Usando le informazioni contenute nel codice a barre, il software riempie automaticamente le caselle corrispondenti ai seguenti campi: Seleziona saggio, ID lotto reagente, N/S cartuccia e Data di scadenza.

Nota

Se non è possibile eseguire la scansione del codice a barre impresso sulla cartuccia del saggio Xpert HPV Assay, ripetere il test con una nuova cartuccia attenendosi alla procedura descritta nella sezione 14, Procedura di ripetizione del test.

Nome	Versione
Xpert HPV 16_18-45	1
Xpert HPV HR_16_18-45	1
Xpert HPV HR	1
Xpert HPV 16_18-45	1

Figura 4. Finestra Crea analisi di GeneXpert Dx con menu a discesa Seleziona saggio

7. Dal menu a discesa **Seleziona saggio** (vedere la Figura 4), selezionare il file di definizione del saggio (ADF) appropriato per il test dell'HPV che è stato richiesto.

Il saggio Xpert HPV Assay può essere configurato per impostare come file predefinito uno qualsiasi dei tre ADF a discrezione del laboratorio. Le richieste del medico per la genotipizzazione reflex dell'HPV 16 o dell'HPV 18/45 possono essere ordinate con il saggio specifico per il genotipo di HPV oppure, laddove indicato, eseguite come parte di un saggio completo per il genotipo e l'alto rischio.

- Test solo per HPV ad alto rischio: selezionando il saggio **Xpert HPV HR** si ottiene un risultato complessivo positivo o negativo per la presenza di uno dei 14 tipi di HPV ad alto rischio individuati. Un esempio è riportato nella Figura 5.
- Test di genotipizzazione dell'HPV 16, 18/45: selezionando il saggio **Xpert HPV 16_18-45** si ottiene un risultato positivo o negativo per:
 - il genotipo HPV 16 e per
 - il genotipo HPV 18 o HPV 45.

I risultati specifici relativi a tutti gli altri tipi di HPV non vengono né raccolti né visualizzati. Un esempio è riportato nella Figura 6.

- Test combinato per i genotipi di HPV e per i genotipi di HPV ad alto rischio: selezionando il saggio **Xpert HPV HR_16_18-45** si ottiene un risultato positivo o negativo per l'HPV 16, per l'HPV 18/45 e per la presenza di uno degli altri restanti 11 tipi ad alto rischio indicati come "Altri HR HPV". Un esempio è riportato nella Figura 7.

Nota

Una volta avviato il test, saranno raccolti solo i risultati relativi al saggio selezionato in questo passaggio. I dati che non sono stati raccolti non sono recuperabili.

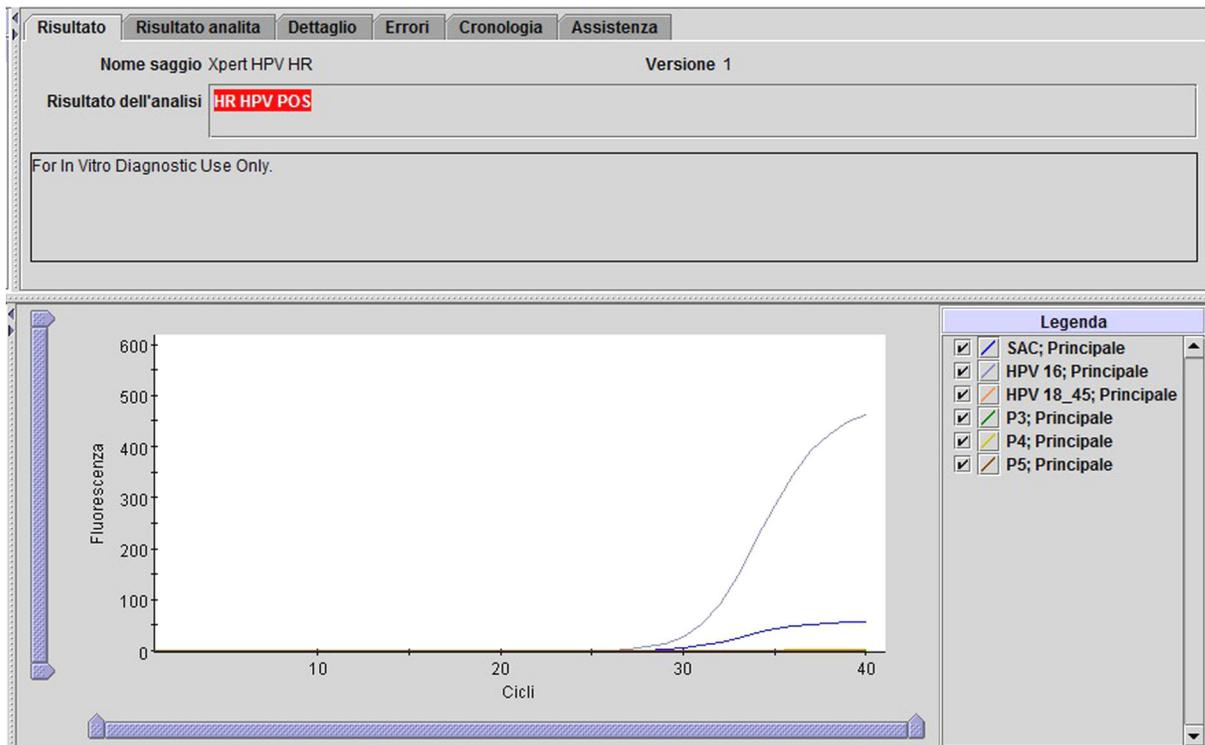


Figura 5. Positivo per HPV HR

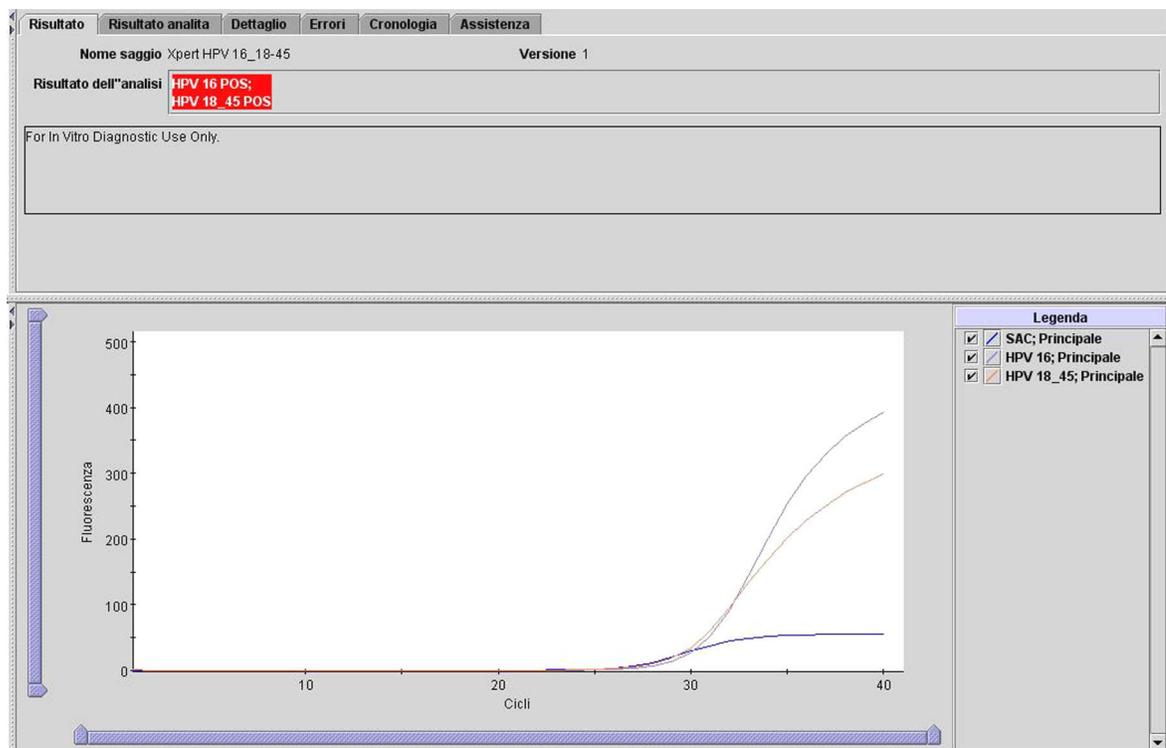


Figura 6. Positivo per HPV 16_18-45

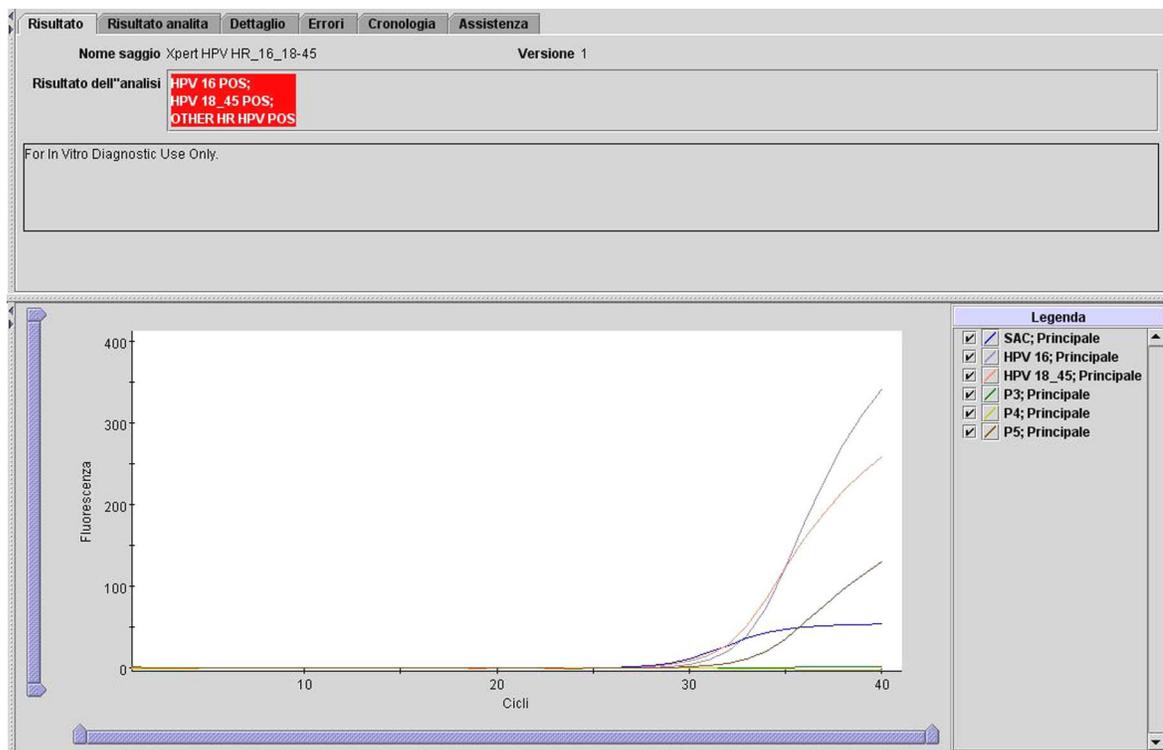


Figura 7. Positivo per HPV HR_16_18-45

8. Fare clic su **Avvia analisi** (GeneXpert Dx) o **Submit (Inoltra)** (Infinity). Immettere la password, se richiesto.
9. Per il sistema GeneXpert Infinity, posizionare la cartuccia sul nastro trasportatore. La cartuccia verrà caricata automaticamente, il test verrà eseguito e la cartuccia usata verrà collocata nel contenitore dei rifiuti.

oppure

Per lo strumento GeneXpert Dx:

- A. Aprire lo sportello del modulo dello strumento con la spia verde lampeggiante e caricare la cartuccia.
- B. Chiudere lo sportello. Il test viene avviato e la spia verde cessa di lampeggiare. Al termine del test, la spia si spegne.
- C. Attendere che il sistema abbia sbloccato lo sportello del modulo prima di aprirlo, quindi rimuovere la cartuccia.
- D. Smaltire le cartucce usate negli appositi contenitori per rifiuti biologici attenendosi alla prassi standard del proprio presidio.

Nota Il risultato si ottiene dopo circa 60 minuti.

10 Visualizzazione e stampa dei risultati

Per le istruzioni dettagliate sulla visualizzazione e la stampa dei risultati, fare riferimento al *Manuale dell'operatore del GeneXpert Dx System* o al *Manuale dell'operatore del GeneXpert Infinity System*.

11 Controllo qualità

CONTROL

Ciascun test include un controllo per la verifica della sonda (PCC) e un controllo per l'adeguatezza dei campioni (SAC).

- **Controllo per la verifica della sonda (PCC):** prima che inizi la reazione di PCR, lo strumento GeneXpert misura il segnale di fluorescenza emesso dalle sonde, allo scopo di monitorare la reidratazione delle microsferi, il riempimento delle provette di reazione, l'integrità delle sonde e la stabilità dei coloranti. Il PCC si considera superato se soddisfa i criteri di accettazione convalidati.
- **Controllo per l'adeguatezza dei campioni (SAC):** i reagenti del controllo SAC rilevano la presenza di un gene umano a singola copia per cellula e verificano la presenza di DNA umano nel campione.
- **Controlli esterni:** possono essere usati controlli esterni, in conformità con gli organismi di accreditamento locali, regionali e nazionali pertinenti.

12 Interpretazione dei risultati

I risultati ottenuti dalla misurazione dei segnali fluorescenti e dagli algoritmi di calcolo incorporati vengono interpretati dal sistema dello strumento GeneXpert e visualizzati nella scheda Risultati della finestra Visualizza risultati. Il saggio Xpert HPV Assay fornisce i risultati del test per le sequenze bersaglio degli HPV in base ai risultati e alle interpretazioni riportate nella Tabella 1.

Nota Una volta avviato il test, saranno raccolti solo i risultati relativi al saggio selezionato.

Tabella 1. Risultati e interpretazioni del saggio Xpert HPV Assay

Risultato	Interpretazione
HR HPV POS Vedere la Figura 9.	<p>Il DNA dell'HPV ad alto rischio è stato rilevato come positivo.</p> <ul style="list-style-type: none"> • La sequenza bersaglio del DNA dell'HPV ad alto rischio ha un Ct nell'intervallo di validità e un endpoint di fluorescenza al di sopra del valore soglia impostato. • SAC: non applicabile Il risultato relativo al controllo SAC viene ignorato perché l'amplificazione della sequenza bersaglio dell'HPV può competere con questo controllo. • PCC: RIUSCITO. Tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
HPV 16 POS Vedere Figura 11, Figura 13 e Figura 16.	<p>Il DNA dell'HPV 16 è stato rilevato come positivo.</p> <ul style="list-style-type: none"> • La sequenza bersaglio del DNA dell'HPV 16 ha un Ct nell'intervallo di validità e un endpoint di fluorescenza al di sopra del valore soglia impostato. • SAC: non applicabile Il risultato relativo al controllo SAC viene ignorato perché l'amplificazione della sequenza bersaglio dell'HPV può competere con questo controllo. • PCC: RIUSCITO. Tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
HPV 18_45 POS Vedere Figura 14 e Figura 16.	<p>Il DNA dell'HPV 18_45 è stato rilevato come positivo.</p> <ul style="list-style-type: none"> • La sequenza bersaglio del DNA dell'HPV 18/45 ha un Ct nell'intervallo di validità e un endpoint di fluorescenza al di sopra del valore soglia impostato. • SAC: non applicabile Il risultato relativo al controllo SAC viene ignorato perché l'amplificazione della sequenza bersaglio dell'HPV può competere con questo controllo. • PCC: RIUSCITO. Tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
OTHER HR HPV POS Vedere Figura 15 e Figura 16.	<p>Il DNA degli altri HPV ad alto rischio è stato rilevato come positivo.</p> <ul style="list-style-type: none"> • La sequenza bersaglio del DNA degli altri tipi di HPV ad alto rischio ha un Ct nell'intervallo di validità e un endpoint di fluorescenza al di sopra del valore soglia impostato. • SAC: non applicabile Il risultato relativo al controllo SAC viene ignorato perché l'amplificazione della sequenza bersaglio degli altri HPV ad alto rischio può competere con questo controllo. • PCC: RIUSCITO. Tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
HR HPV NEG Vedere la Figura 8.	<p>Il DNA dell'HPV ad alto rischio è al di sotto del livello di rilevamento.</p> <ul style="list-style-type: none"> • La sequenza bersaglio del DNA dell'HPV ad alto rischio ha un Ct che non rientra nell'intervallo di validità e/o un endpoint di fluorescenza sotto il valore soglia impostato. • SAC: RIUSCITO. L'amplificazione mediante PCR della sequenza bersaglio del controllo SAC fornisce un Ct nell'intervallo di validità e un endpoint di fluorescenza al di sopra del valore soglia impostato. • PCC: RIUSCITO. Tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.

Tabella 1. Risultati e interpretazioni del saggio Xpert HPV Assay (continua)

Risultato	Interpretazione
HPV 16 NEG Vedere Figura 10, Figura 12, Figura 14 e Figura 15.	<p>Il DNA dell'HPV 16 è al di sotto del livello di rilevamento.</p> <ul style="list-style-type: none"> La sequenza bersaglio del DNA dell'HPV 16 ha un Ct che non rientra nell'intervallo di validità e/o un endpoint di fluorescenza sotto il valore soglia impostato. SAC: RIUSCITO. L'amplificazione mediante PCR della sequenza bersaglio del controllo SAC fornisce un Ct nell'intervallo di validità e un endpoint di fluorescenza al di sopra del valore soglia impostato. PCC: RIUSCITO. Tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
HPV 18_45 NEG Vedere Figura 10, Figura 11, Figura 12, Figura 13 e Figura 15.	<p>Il DNA dell'HPV 18-45 è al di sotto del livello di rilevamento.</p> <ul style="list-style-type: none"> La sequenza bersaglio del DNA dell'HPV 18/45 ha un Ct che non rientra nell'intervallo di validità e/o un endpoint di fluorescenza sotto il valore soglia impostato. SAC: RIUSCITO. L'amplificazione mediante PCR della sequenza bersaglio del controllo SAC fornisce un Ct nell'intervallo di validità e un endpoint di fluorescenza al di sopra del valore soglia impostato. PCC: RIUSCITO. Tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
OTHER HR HPV NEG Vedere Figura 12, Figura 13 e Figura 14.	<p>Il DNA degli altri HPV ad alto rischio è al di sotto del livello di rilevamento.</p> <ul style="list-style-type: none"> La sequenza bersaglio del DNA degli altri HPV ad alto rischio ha un Ct che non rientra nell'intervallo di validità e/o un endpoint di fluorescenza sotto il valore soglia impostato. SAC: RIUSCITO. L'amplificazione mediante PCR della sequenza bersaglio del controllo SAC fornisce un Ct nell'intervallo di validità e un endpoint di fluorescenza al di sopra del valore soglia impostato. PCC: RIUSCITO. Tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
NON VALIDO Vedere la Figura 17.	<p>La presenza o l'assenza della sequenza bersaglio del DNA dell'HPV non può essere determinata. Ripetere il test secondo le istruzioni riportate nella sezione 14, Procedura di ripetizione del test.</p> <ul style="list-style-type: none"> SAC: NON RIUSCITO. Il controllo SAC ha un Ct che non rientra nell'intervallo di validità e/o un endpoint di fluorescenza al di sotto del valore soglia impostato. PCC: RIUSCITO. Tutti i risultati della verifica della sonda sono validi.
ERRORE	<p>La presenza o l'assenza della sequenza bersaglio del DNA dell'HPV non può essere determinata. Ripetere il test secondo le istruzioni riportate nella sezione 14, Procedura di ripetizione del test.</p> <ul style="list-style-type: none"> SAC: NESSUN RISULTATO PCC: NON RIUSCITO*. Uno o tutti i risultati di verifica della sonda non riusciti. <p>* Se la verifica della sonda è riuscita, l'errore deriva dal superamento del limite massimo di pressione rispetto all'intervallo accettabile o dal guasto di un componente del sistema.</p>
NESSUN RISULTATO	<p>La presenza o l'assenza della sequenza bersaglio del DNA dell'HPV non può essere determinata. Ripetere il test secondo le istruzioni riportate nella sezione 14, Procedura di ripetizione del test. NESSUN RISULTATO indica che i dati raccolti sono insufficienti. L'operatore, ad esempio, ha interrotto l'esecuzione di un test oppure si è verificata un'interruzione di corrente.</p> <ul style="list-style-type: none"> HPV: NESSUN RISULTATO SAC: NESSUN RISULTATO PCC: NA (non applicabile)

Nota

Le schermate mostrate in questa sezione riflettono gli esempi in cui vengono utilizzati i tre saggi. Nella Figura 8 e nella Figura 9 viene utilizzato il saggio Xpert HPV HR, nella Figura 10 e nella Figura 11 viene utilizzato il saggio di genotipizzazione Xpert HPV 16_18-45 e dalla Figura 12 alla Figura 14 viene utilizzato il saggio Xpert HPV HR_16_18-45, in base alle selezioni effettuate dal menu a discesa (vedere la sezione 9.2, Avvio del test e il menu a discesa illustrato nella Figura 4).

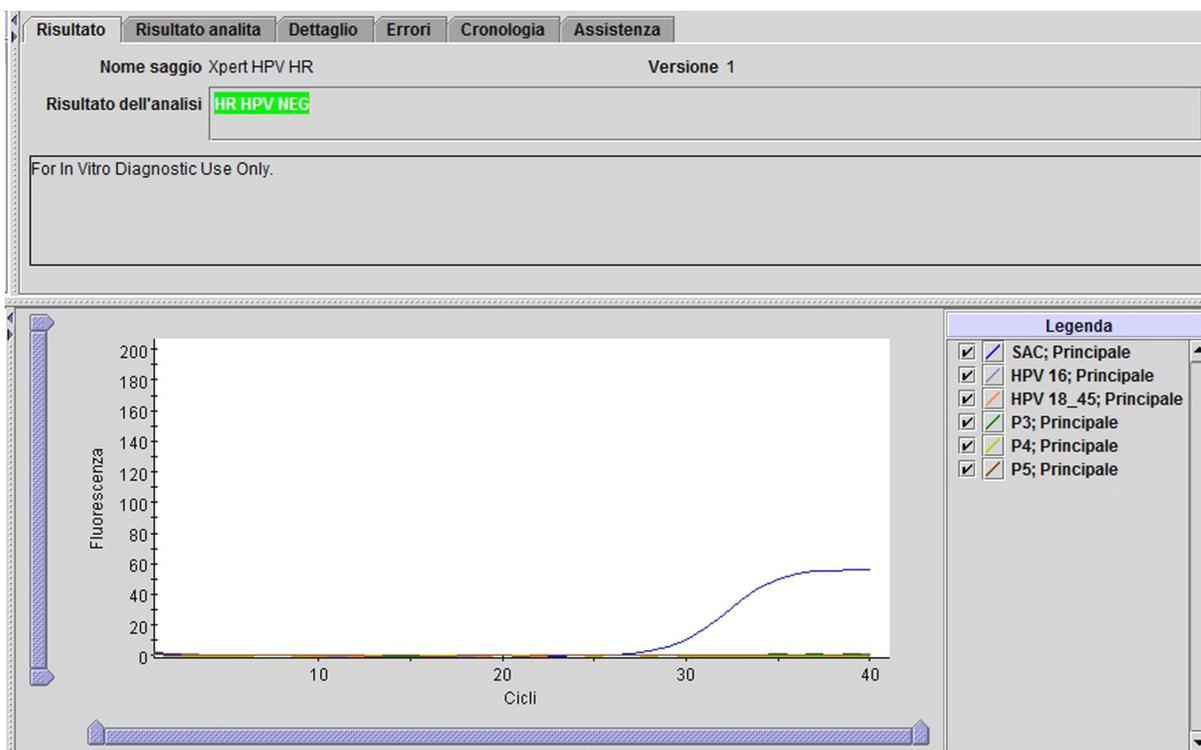


Figura 8. Negativo per HPV ad alto rischio (risultato ottenuto con il saggio Xpert HPV HR Assay)

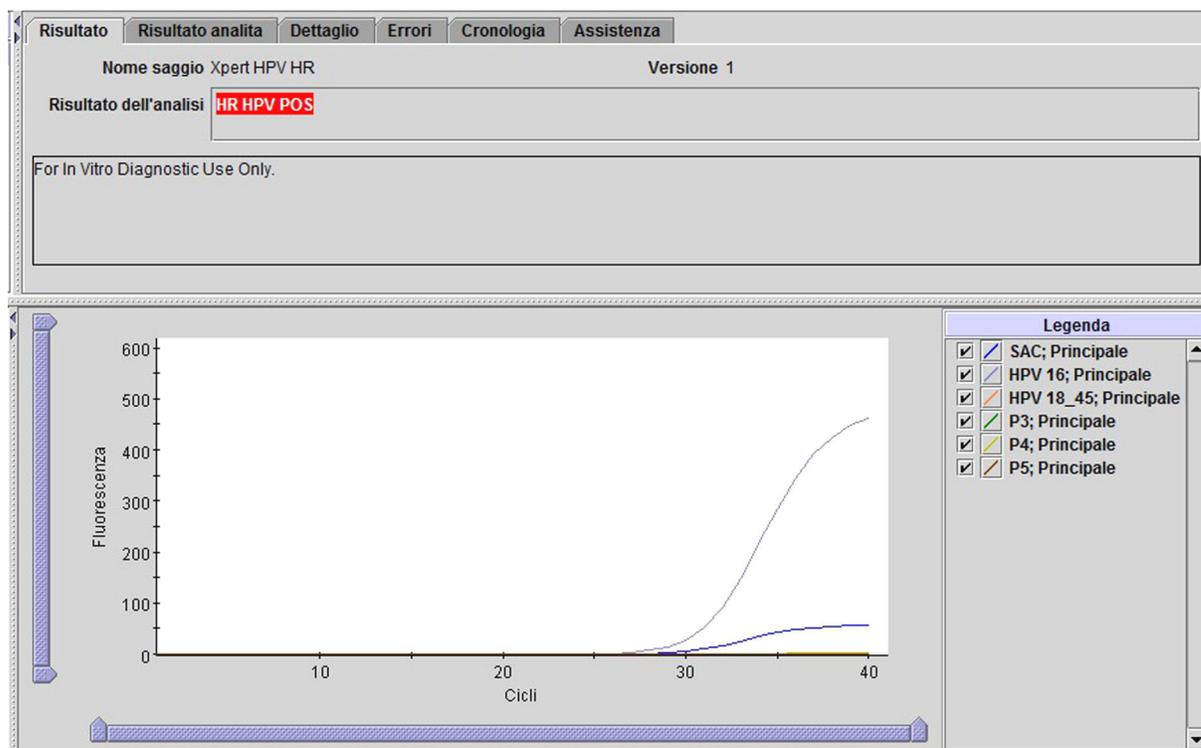


Figura 9. Positivo per HPV ad alto rischio (risultato ottenuto con il saggio Xpert HPV HR Assay)

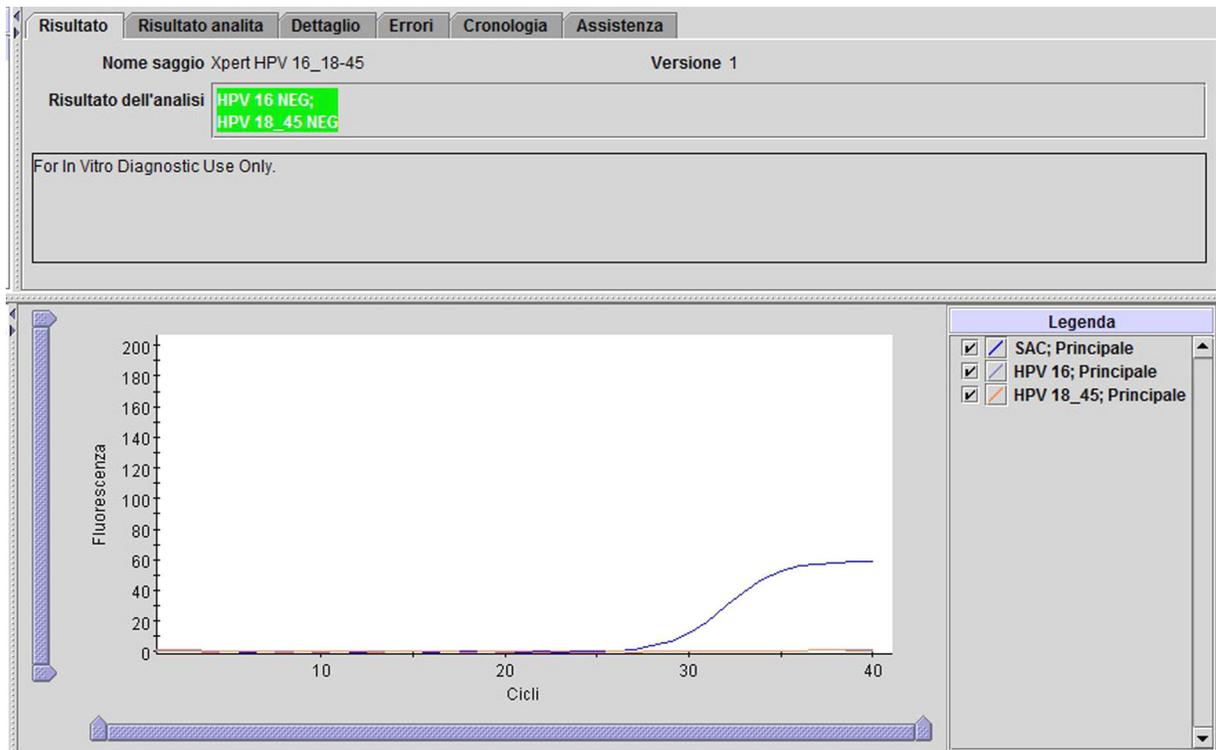


Figura 10. Negativo per HPV 16; negativo per HPV 18_45 (risultato ottenuto con il saggio Xpert HPV 16_18-45 Assay)

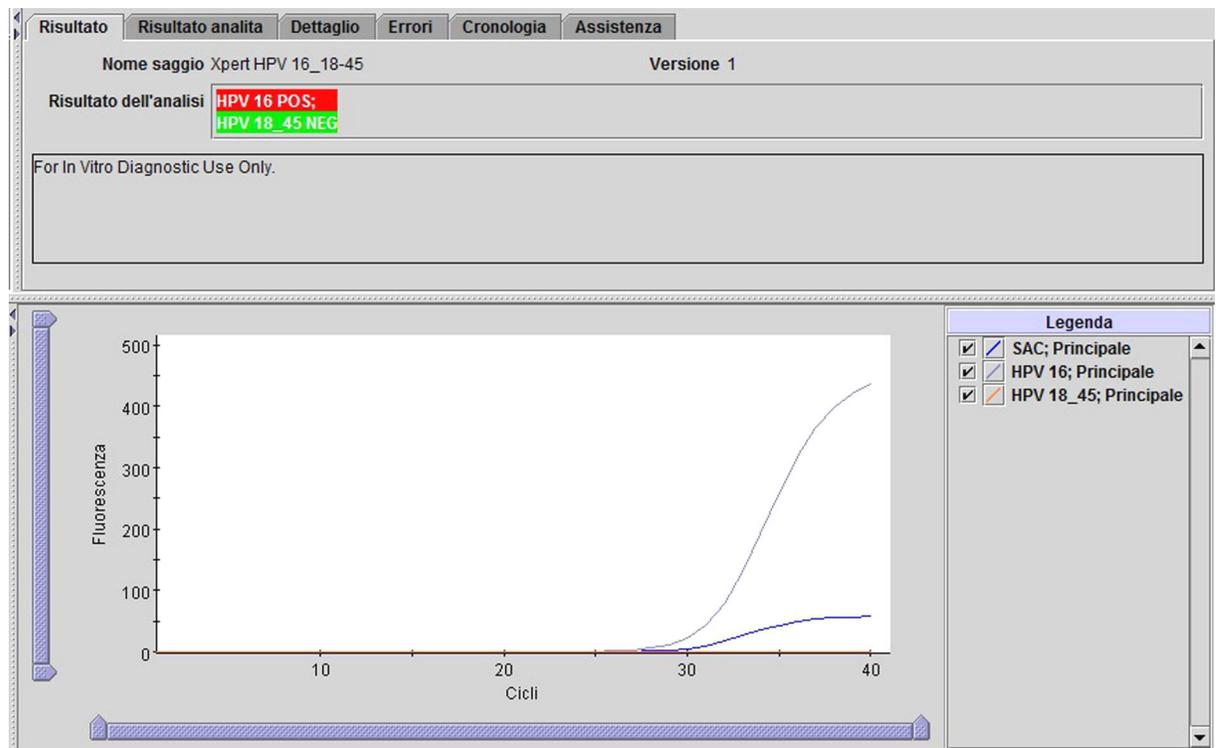


Figura 11. Positivo per HPV 16; negativo per HPV 18_45 (risultato ottenuto con il saggio Xpert HPV 16_18-45 Assay)

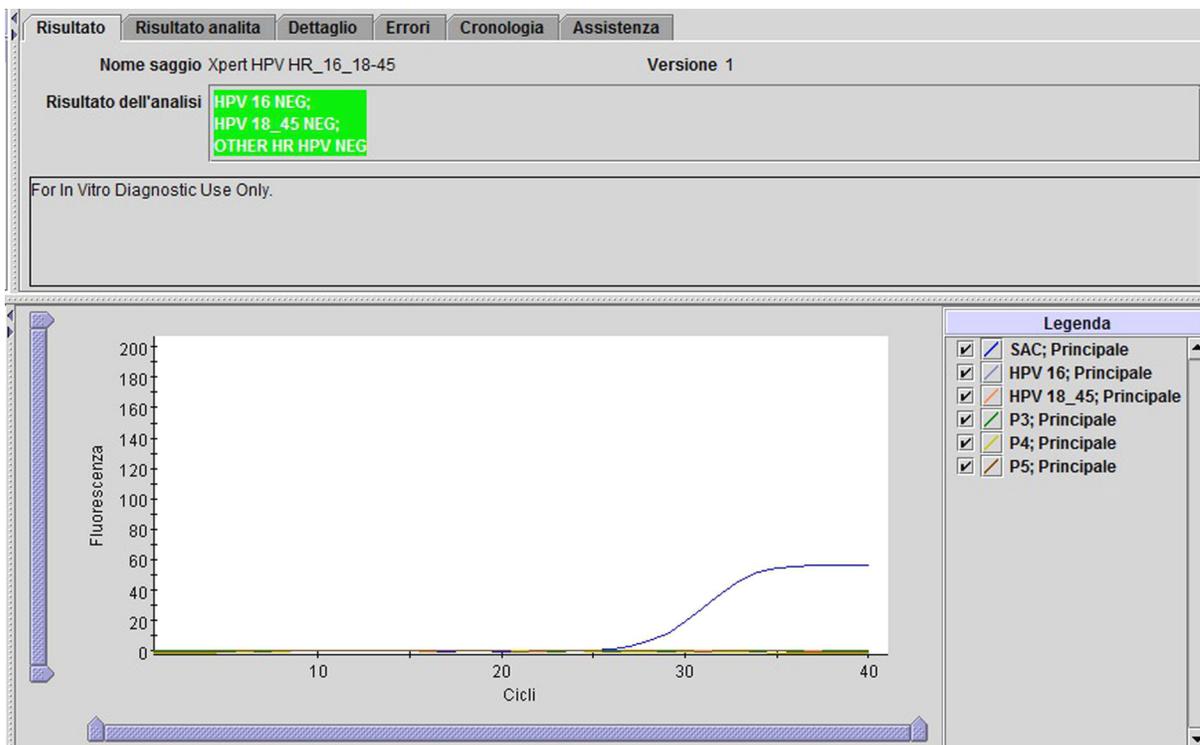


Figura 12. Negativo per HPV 16; negativo per HPV 18-45; negativo per gli altri HPV ad alto rischio (risultato ottenuto con il saggio Xpert HPV HR_16_18-45 Assay)

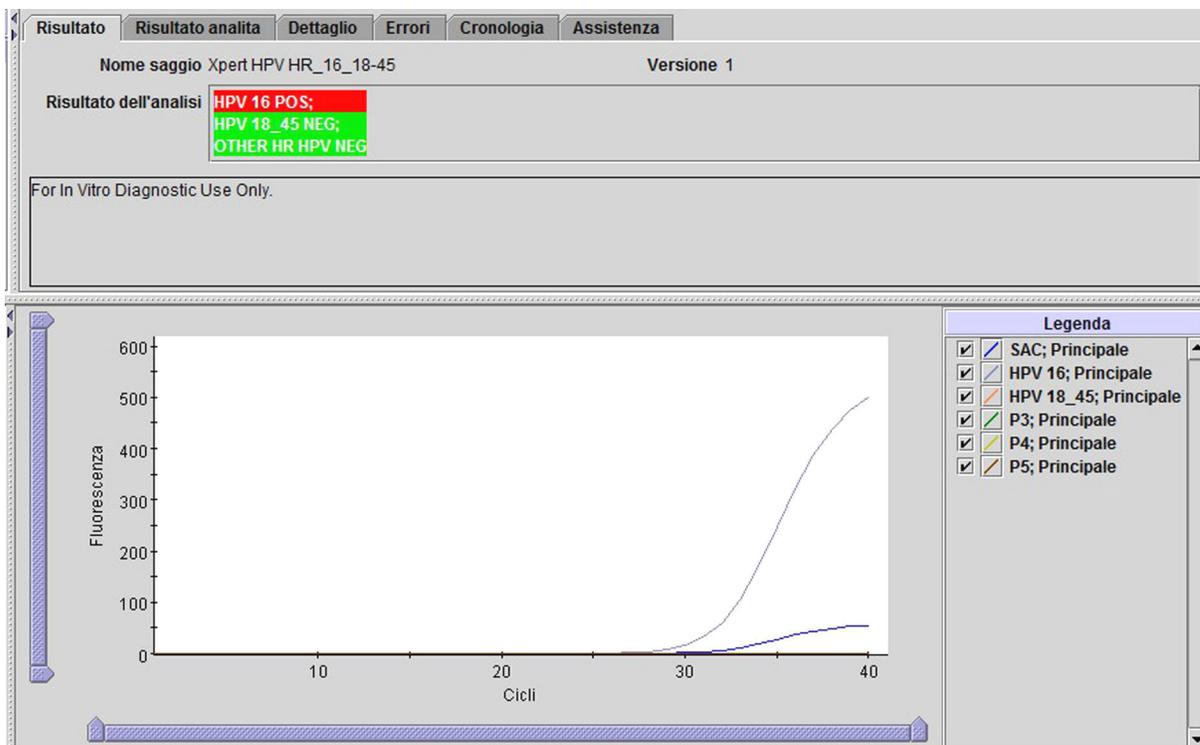


Figura 13. Positivo per HPV 16; negativo per HPV 18-45; negativo per gli altri HPV ad alto rischio (risultato ottenuto con il saggio Xpert HPV HR_16_18-45 Assay)

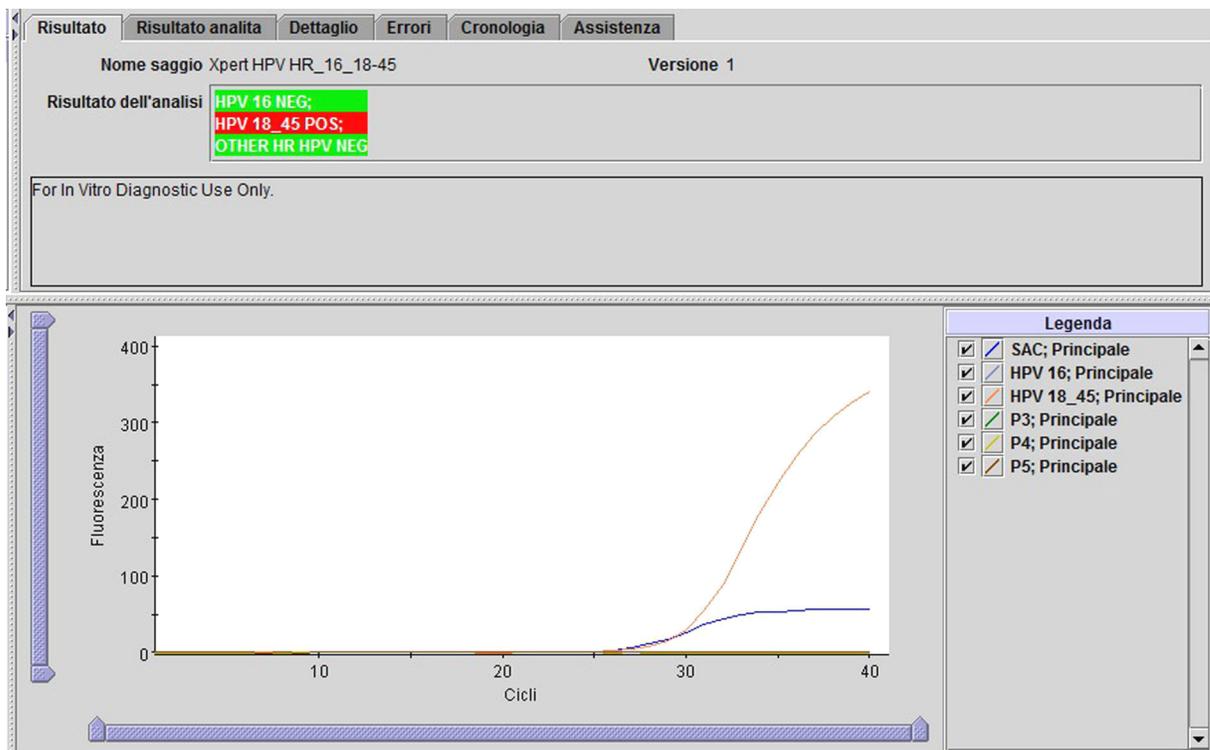


Figura 14. Negativo per HPV 16; positivo per HPV 18-45; negativo per gli altri HPV ad alto rischio (risultato ottenuto con il saggio Xpert HPV HR_16_18-45 Assay)

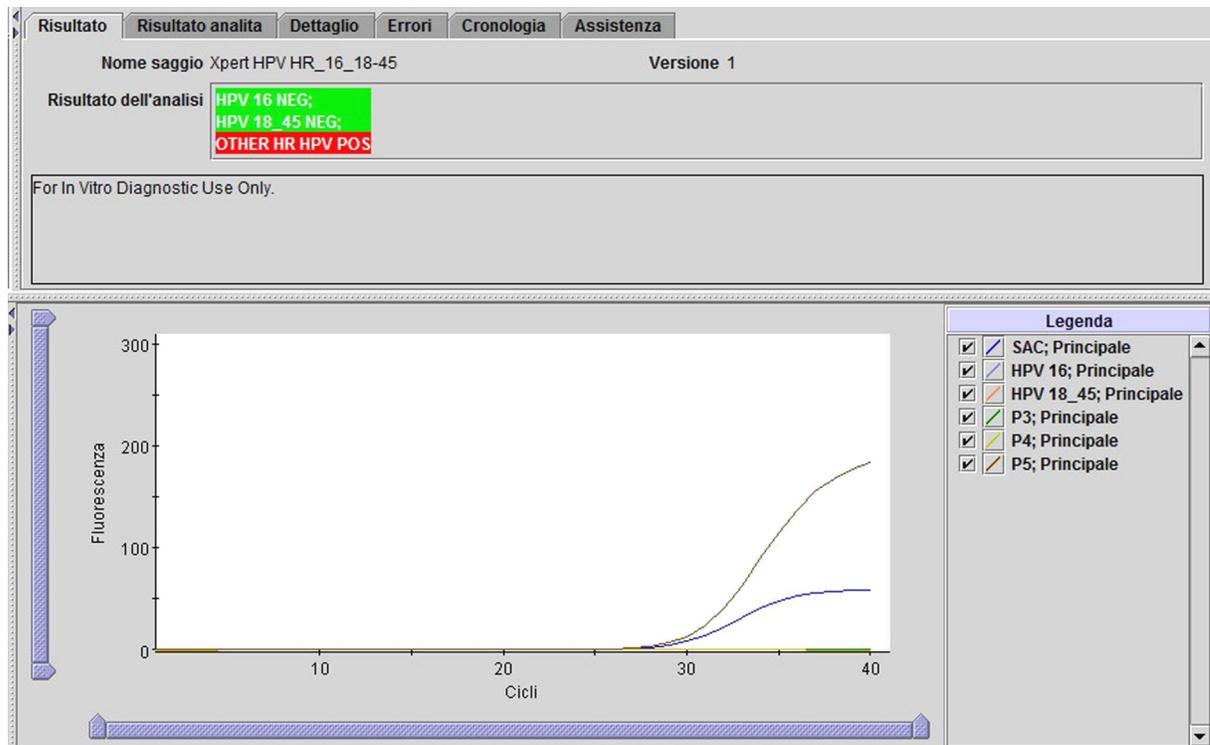


Figura 15. Negativo per HPV 16; negativo per HPV 18-45; positivo per gli altri HPV ad alto rischio (risultato ottenuto con il saggio Xpert HPV HR_16_18-45 Assay)

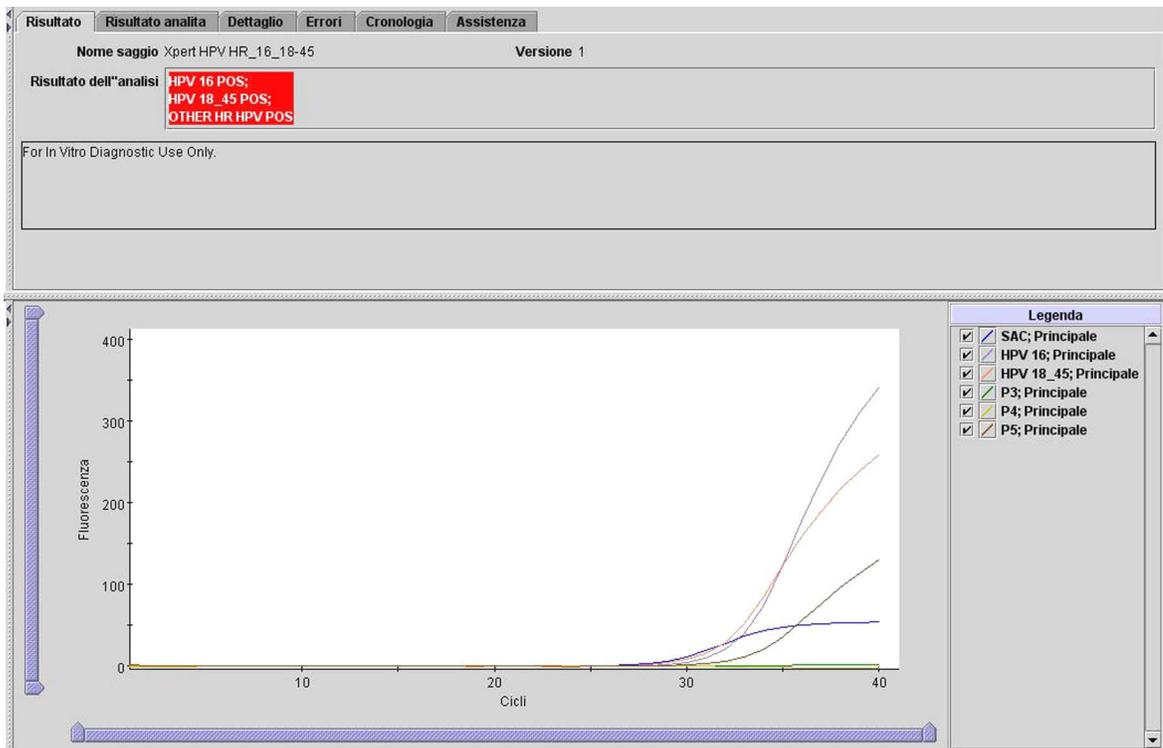


Figura 16. Positivo per HPV 16; positivo per HPV 18-45; positivo per gli altri HPV ad alto rischio (risultato ottenuto con il saggio Xpert HPV HR_16_18-45 Assay)

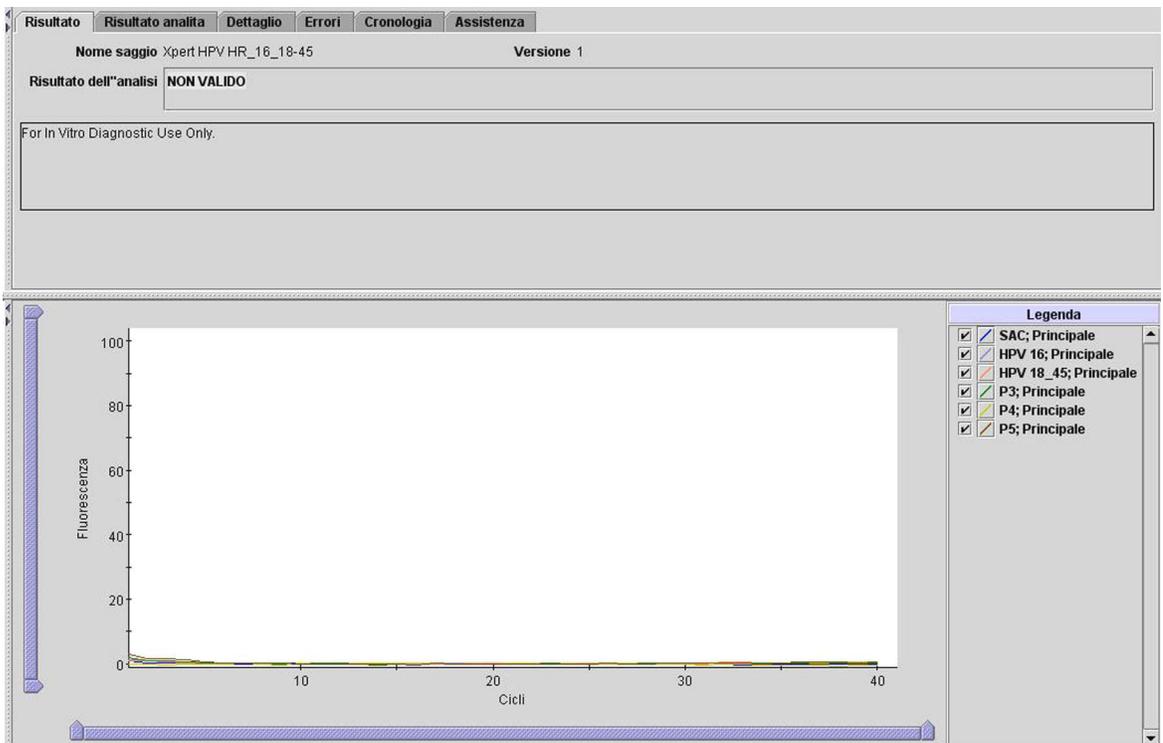


Figura 17. Non valido per HPV HR_16_18-45 (risultato ottenuto con il saggio Xpert HPV HR_16_18-45 Assay)

13 Motivi per ripetere il saggio

Se si ottiene uno dei risultati riportati di seguito, ripetere il test attenendosi alle istruzioni della sezione 14, Procedura di ripetizione del test.

- Un risultato **NON VALIDO** indica che il controllo SAC ha avuto esito negativo, il campione non è stato trattato adeguatamente, la PCR è stata inibita o il campione era inadeguato.
- Un risultato **ERRORE** indica che il test è stato interrotto probabilmente perché la provetta di reazione non era stata riempita bene, è stato rilevato un problema di integrità della sonda del reagente, sono stati superati i limiti di pressione, una verifica della sonda non è riuscita, oppure è stato rilevato un errore di posizionamento della valvola.
- **NESSUN RISULTATO** indica che i dati raccolti sono insufficienti. L'operatore, ad esempio, ha interrotto l'esecuzione di un test oppure si è verificata un'interruzione di corrente.

14 Procedura di ripetizione del test

- Ripetere il test con una nuova cartuccia (non riutilizzare la cartuccia). Vedere la sezione 9, Procedura.
- Ottenere il campione residuo.
- Se il volume del campione residuo è insufficiente o se ripetendo il test si continuano a ottenere risultati del tipo **NON VALIDO, ERRORE** o **NESSUN RISULTATO**, prelevare un nuovo campione e ripetere il test con una nuova cartuccia.

15 Limitazioni

- Il rilevamento dell'HPV dipende dal DNA presente nel campione, pertanto l'affidabilità dei risultati dipende dall'adeguatezza del prelievo, della manipolazione e della conservazione del campione.
- Il saggio Xpert HPV Assay è stato convalidato esclusivamente per l'uso con campioni cervicali prelevati in soluzione PreservCyt tramite spazzolino o tramite spatola associata a spazzolino endocervicale.
- Risultati del test errati possono dipendere dal prelievo inadeguato dei campioni di analisi, da un errore tecnico, dallo scambio di campioni o dal fatto che il numero di copie del DNA dell'HPV è al di sotto del limite di rilevamento del test.
- Il saggio Xpert HPV Assay è stato convalidato esclusivamente mediante le procedure riportate in questo foglietto illustrativo. Le modifiche apportate a queste procedure possono alterare le prestazioni del test.
- L'interferenza del saggio può essere osservata in presenza di: sangue intero ($\geq 0,25\%$ v/v), cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) ($\geq 1 \times 10^6$ cellule/ml), *Candida albicans* ($\geq 1 \times 10^8$ cellule/ml), crema contro il prurito Vagisil ($\geq 0,25\%$ p/v) o gel idratante Vagi Gard ($\geq 0,5\%$ p/v).
- La presenza di creme vaginali dense ($> 0,25\%$ p/v) nel campione può provocare interruzioni del saggio causate dalla pressione.
- Gli effetti di altre potenziali variabili quali perdite vaginali, uso di assorbenti interni, di lavande vaginali e variabili legate al prelievo dei campioni non sono stati determinati.
- Il saggio Xpert HPV Assay fornisce risultati qualitativi. Non è possibile desumere alcuna correlazione tra la grandezza del valore Ct e il numero di cellule presenti in un campione infetto.
- Le prestazioni del saggio Xpert HPV Assay non sono state valutate in pazienti di età inferiore a 18 anni.
- Le prestazioni del saggio Xpert HPV Assay non sono state valutate nelle donne con precedente isterectomia.
- Il saggio Xpert HPV Assay non è stato convalidato per l'uso con tamponi vaginali prelevati dal medico o dalla paziente.
- Il saggio Xpert HPV Assay non è stato valutato con pazienti in corso di trattamento con agenti antimicrobici per infezioni come la clamidia o la gonorrea.
- Come nel caso di molti test diagnostici, i risultati del saggio Xpert HPV Assay devono essere interpretati assieme ad altri dati clinici e di laboratorio a disposizione del medico.
- Le prestazioni del saggio Xpert HPV Assay non sono state valutate per i soggetti vaccinati contro l'HPV.
- Il saggio Xpert HPV Assay non è stato valutato in caso di sospetto abuso sessuale.
- La prevalenza dell'infezione da HPV in una popolazione può influire sulle prestazioni del test.
- I campioni contenenti meno di 1 ml di soluzione PreservCyt sono considerati inadeguati per il saggio Xpert HPV Assay.
- Le prestazioni del saggio Xpert HPV Assay non sono state valutate nei campioni cervicali pretrattati per l'esame citologico utilizzando dispositivi diversi dal dispositivo ThinPrep 2000.
- Un risultato negativo per il saggio Xpert HPV Assay non esclude la possibilità di anomalie citologiche o di neoplasia CIN 2, CIN 3 di base o futura, o cancro.

- Il saggio Xpert HPV Assay rileva il DNA virale E6/E7 degli HPV ad alto rischio di tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68. Questo test non rileva il DNA E6/E7 dei tipi di HPV a basso rischio (es. 6, 11, 42, 43, 44) in quanto non esiste alcuna utilità clinica nel valutare la presenza dei tipi di HPV a basso rischio nel contesto dello screening del tumore cervicale.
- Il rilevamento del DNA dell'HPV ad alto rischio dipende dal numero di copie presenti nel campione di analisi e può essere influenzato dai metodi di prelievo di quest'ultimo, da fattori correlati alla paziente, dallo stadio dell'infezione e dalla presenza di sostanze interferenti.
- L'uso di questo prodotto deve essere limitato al personale addestrato all'uso del saggio Xpert HPV Assay.
- Questo test può fornire risultati falsi positivi o falsi negativi.
- Mutazioni o polimorfismi nelle regioni che si legano ai primer o alle sonde possono compromettere il rilevamento dei tipi di HPV bersaglio e generare di conseguenza un risultato falso negativo.

16 Prestazioni cliniche

Le caratteristiche delle prestazioni cliniche del saggio Xpert HPV Assay sono state valutate in uno studio prospettico multicentrico (sette centri statunitensi) in due stadi, al quale hanno partecipato donne di tutte le età con richiesta di esame colposcopico sulla base di uno o più risultati anomali di precedenti Pap test, di un risultato anomalo di Pap test associato a un risultato positivo per l'HPV ad alto rischio, oppure di altri sospetti clinici di tumore cervicale. Durante l'esame colposcopico, da ciascun soggetto sono stati prelevati due campioni di analisi ThinPrep (campione A e campione B) da utilizzare per la valutazione citologica e per l'esame comparativo con il saggio Xpert HPV Assay e due test per l'HPV ad alto rischio approvati dall'FDA. Le analisi con questi metodi comparativi sono state eseguite in base alle istruzioni riportate nei foglietti illustrativi dei relativi test US-IVD. Il campione A è stato trattato per l'esame citologico seguito da analisi con il saggio Xpert HPV Assay. Il campione B è stato riservato per l'analisi dell'HPV eseguita con i test comparativi per l'HPV e con il saggio Xpert HPV Assay. Entrambi i campioni di analisi sono stati prelevati utilizzando una spatola associata a spazzolino in base alle indicazioni riportate nel foglietto illustrativo del ThinPrep. Da ciascun soggetto sono state prelevate un minimo di due biopsie cervicali con bisturi a lama cilindrica (punch biopsy) e per gli esami colposcopici non soddisfacenti in cui era scarsa la visualizzazione della giunzione squamo-colonnare è stato effettuato un raschiamento endocervicale (endocervical curettage, ECC). L'esame istologico dei campioni di analisi ottenuti con biopsia e raschiamento endocervicale (endocervical curettage, ECC) è stato inizialmente condotto a livello locale per gli standard della gestione e la cura delle pazienti e successivamente in modo retrospettivo, in cieco, da un gruppo di tre patologi esperti per determinare lo stato definitivo della patologia cervicale su base comune. La fase I di inclusione includeva 144 soggetti (fascia di età: 20–70 anni) con 31 casi \geq CIN 2. I dati ottenuti nella fase I sono stati utilizzati per stimare un set di cutoff clinici per il saggio relativi agli endpoint dello stato patologico \geq CIN 2 e \geq CIN 3 utilizzando un approccio basato sulle caratteristiche operative del ricevente (Receiver Operating Characteristic, ROC). La fase II di inclusione includeva 564 soggetti (fascia di età: 18–75 anni) con 111 casi \geq CIN 2. I dati ottenuti nella fase II sono stati utilizzati per perfezionare i cutoff clinici relativi agli endpoint dello stato patologico \geq CIN 2 e \geq CIN 3 utilizzando un approccio ROC. Con l'approccio retrospettivo è stata condotta un'analisi dell'omogeneità per confermare la possibilità di combinare i risultati (pooling) provenienti dalla fase I e dalla fase II; i risultati possono essere combinati in più parametri di popolazioni e campioni di analisi.

La sensibilità e la specificità clinica del saggio Xpert HPV Assay, il metodo comparativo 1 e il metodo comparativo 2 nel set di dati della fase II relativi allo stato patologico \geq CIN 2 sono riassunti nella Tabella 2.

Tabella 2. Prestazioni cliniche relative allo stato patologico \geq CIN 2^a

	Xpert HPV Assay (Campione A) ^b	Xpert HPV Assay (Campione B) ^c	Metodo comparativo 1 ^d	Metodo comparativo 2 ^e
Sensibilità	(99/109) 90,8% (83,8 – 95,5%)	(100/110) 90,9% (83,9 – 95,6%)	(103/111) 92,8% (86,3 – 96,8%)	(96/111) 86,5% (78,7 – 92,2%)
Specificità	(182/429) 42,4% (37,7 – 47,3%)	(194/446) 43,5% (38,8 – 48,2%)	(178/453) 39,3% (34,8 – 44,0%)	(212/451) 47,0% (42,3 – 51,7%)
Valore predittivo positivo	(99/346) 28,6% (23,8 – 33,7%)	(100/352) 28,4% (23,8 – 33,4%)	(103/378) 27,2% (22,8 – 32,0%)	(96/335) 28,7% (23,9 – 33,8%)
Valore predittivo negativo	(182/192) 94,8% (90,6 – 97,5%)	(194/204) 95,1% (91,2 – 97,6%)	(178/186) 95,7% (91,7 – 98,1%)	(212/227) 93,4% (89,3 – 96,3%)

- a. Stime dei punti come indicato. Intervalli di confidenza al 95% secondo il test esatto di Fisher.
b. n = 538. Nove campioni di analisi QNS per il test Xpert; 17 campioni di analisi indeterminati al test iniziale e alla ripetizione del test.
c. n = 556. Otto campioni di analisi indeterminati al test iniziale e alla ripetizione del test.
d. n = 564.
e. n = 562. Due campioni di analisi indeterminati al test iniziale e alla ripetizione del test.

La sensibilità e la specificità clinica del saggio Xpert HPV Assay, il metodo comparativo 1 e il metodo comparativo 2 nel set di dati della fase II relativi allo stato patologico \geq CIN 3 sono riassunti nella Tabella 3.

Tabella 3. Prestazioni cliniche relative allo stato patologico \geq CIN 3^a

	Xpert HPV Assay (Campione A) ^b	Xpert HPV Assay (Campione B) ^c	Metodo comparativo 1 ^d	Metodo comparativo 2 ^e
Sensibilità	(68/72) 94,4% (86,4 – 98,5%)	(69/73) 94,5% (86,6 – 98,5%)	(71/74) 95,9% (88,6 – 99,2%)	(64/74) 86,5% (76,5 – 93,3%)
Specificità	(187/465) 40,2% (35,7 – 44,8%)	(199/482) 41,3% (39,6 – 45,8%)	(182/489) 37,2% (32,9 – 41,7%)	(216/487) 44,4% (39,9 – 48,9%)
Valore predittivo positivo	(68/346) 19,7% (15,6 – 24,2%)	(69/352) 19,6% (15,6 – 24,1%)	(71/378) 18,8% (15,0 – 23,1%)	(64/335) 19,1% (15,0 – 23,7%)
Valore predittivo negativo	(187/191) 97,9% (94,7 – 99,4%)	(199/203) 98,0% (95,0 – 99,5%)	(182/185) 98,4% (95,3 – 99,7%)	(216/226) 95,6% (92,0 – 97,9%)

- a. Stime dei punti come indicato. Intervalli di confidenza al 95% secondo il test esatto di Fisher.
b. n = 537. Nove campioni di analisi QNS per l'analisi con Xpert; 17 campioni di analisi indeterminati al test iniziale e alla ripetizione del test; consenso sullo stato CIN 2 rispetto a CIN 3 non raggiunto per un campione di analisi.
c. n = 555. Otto campioni di analisi indeterminati al test iniziale e alla ripetizione del test; consenso sullo stato CIN 2 rispetto a CIN 3 non raggiunto per un campione di analisi.
d. n = 563. Consenso sullo stato CIN 2 rispetto a CIN 3 non raggiunto per un campione di analisi.
e. n = 561. Due campioni di analisi indeterminati al test iniziale e alla ripetizione del test; consenso sullo stato CIN 2 rispetto a CIN 3 non raggiunto per un campione di analisi.

Una valutazione della concordanza analitica nel set di dati della fase II ha dimostrato una concordanza complessiva tra il saggio Xpert HPV Assay e il set di dati (campione A rispetto a campione B; n = 533 confronti appaiati) del 94,6% (IC al 95% 92,3 – 96,3; coeff. statistico K 0,88). La concordanza complessiva tra il saggio Xpert HPV Assay (campione B) e il metodo comparativo 1 (n = 556 confronti appaiati) è stata del 92,4% (IC al 95% 89,9 – 94,5; coeff. statistico K 0,83). La concordanza complessiva tra il saggio Xpert HPV Assay (campione B) e il metodo comparativo 2 (n = 554 confronti appaiati) è stata del 87,4% (IC al 95% 84,3 – 90,0; coeff. statistico K 0,73).

Le prestazioni cliniche del saggio Xpert HPV Assay per i campioni A e B del Pap test, ordinati per fascia di età dei soggetti, sono state determinate sia per lo stato patologico \geq CIN 2 sia per lo stato patologico \geq CIN 3. Le prestazioni cliniche relative allo stato patologico \geq CIN 2 sono presentate nella Tabella 4 e le prestazioni cliniche relative allo stato patologico \geq CIN 3 sono presentate nella Tabella 5.

Tabella 4. Prestazioni del saggio Xpert HPV Assay rispetto allo stato patologico \geq CIN 2, per fascia di età

Fascia di età	Pap test A		Pap test B	
	Sensibilità (IC al 95%)	Specificità (IC al 95%)	Sensibilità (IC al 95%)	Specificità (IC al 95%)
20–29	95,7% (85,5 – 99,5)	25,8% (19,1 – 33,4)	95,7% (85,5 – 99,5)	32,1% (24,9 – 39,9)
30–39	91,7% (77,5 – 98,2)	46,4% (38,3 – 54,6)	94,6% (81,8 – 99,3)	44,3% (36,4 – 52,4)
40–49	88,9% (65,3 – 98,6)	44,8% (32,6 – 57,4)	88,9% (65,3 – 98,6)	45,8% (34,0 – 58,0)
50–59	71,4% (29,0 – 96,3)	62,8% (46,7 – 77,0)	71,4% (29,0 – 96,3)	64,4% (48,8 – 78,1)
≥ 60	100% (2,5 – 100)	33,3% (9,9 – 65,1)	100% (2,5 – 100)	30,8% (9,1 – 61,4)

Tabella 5. Prestazioni del saggio Xpert HPV Assay rispetto allo stato patologico \geq CIN 3, per fascia di età

Fascia di età	Pap test A		Pap test B	
	Sensibilità (IC al 95%)	Specificità (IC al 95%)	Sensibilità (IC al 95%)	Specificità (IC al 95%)
20–29	96,7% (82,8 – 99,9)	23,8% (17,7 – 30,9)	100% (88,4 – 100)	30,1% (23,4 – 37,5)
30–39	90,9% (70,8 – 98,9)	43,1% (35,5 – 51,0)	91,3% (72,0 – 98,9)	40,7% (33,3 – 48,4)
40–49	92,9% (66,1 – 99,8)	43,7% (31,9 – 56,0)	92,9% (66,1 – 99,8)	44,7% (33,3 – 56,6)
50–59	100% (39,8 – 100)	62,2% (46,5 – 76,2)	100% (39,8 – 100)	63,8% (48,5 – 77,3)
≥ 60	100% (2,5 – 100)	33,3% (9,9 – 65,1)	100% (2,5 – 100)	30,8% (9,1 – 61,4)

È stato condotto un secondo studio clinico per valutare le prestazioni del saggio Xpert HPV Assay nelle popolazioni che più somigliano a quelle a cui è destinato il saggio, per le quali sono a disposizione dei programmi organizzati di screening del tumore cervicale. Si tratta di uno studio multicentrico, con metodo comparativo, nel quale sono stati utilizzati campioni di analisi residui prelevati in PreservCyt e ottenuti da donne di età compresa tra 20 e 60 anni che hanno partecipato ai programmi organizzati di screening del tumore cervicale condotti nel Regno Unito. Con rare eccezioni, tutti i campioni di analisi raccolti in questo studio sono stati prelevati con uno spazzolino in base alle indicazioni riportate nel foglietto illustrativo del ThinPrep. Nello studio sono stati inclusi gli stessi due metodi comparativi, il metodo 1 come metodo comparativo principale e il metodo 2 come metodo comparativo secondario. Le dimensioni dei campioni per lo studio sono state calcolate per due fasce di età (donne tra 20 e 29 anni e donne tra 30 e 60 anni) per supportare la valutazione della concordanza (con IC al 95%) e il calcolo del coefficiente statistico K (con IC al 95%) relativi a ciascun metodo comparativo.

In questo studio, i campioni di analisi residui con i risultati degli esami citologici sono stati suddivisi in tre aliquote per la valutazione con il saggio Xpert HPV Assay e con i metodi comparativi 1 e 2. La sequenza delle aliquote rimosse per l'analisi con il saggio Xpert HPV Assay e con il metodo comparativo 1 è stata randomizzata in modo che ~50% delle prime aliquote è stato utilizzato per l'analisi con il test Xpert per l'HPV e il 50% delle prime aliquote è stato utilizzato per il metodo comparativo 1. La terza aliquota è stata sempre riservata per l'analisi con il metodo comparativo 2. Indipendentemente dalla sequenza delle aliquote, il flaconcino del campione di analisi originario è stato miscelato prima della rimozione di ciascuna aliquota per garantire l'omogeneità del campione. L'analisi con i metodi comparativi è stata condotta in base ai foglietti illustrativi dei relativi test CE-IVD, che a livello procedurale erano identici ai foglietti illustrativi dei test US-IVD; l'analisi dei risultati utilizza i parametri di cutoff riportati nei foglietti illustrativi dei test US-IVD.

Un'analisi dei dati dello studio ha dimostrato una sostanziale concordanza tra il saggio Xpert HPV Assay e il metodo comparativo 1. Tale concordanza è indipendente dalla fascia di età dei soggetti (20–29 anni e 30–60 anni) e dallo stato dell'esame citologico [normale (NILM, negativo per lesioni intraepiteliali o maligne) o peggio del normale (peggio di NILM)]. Un riepilogo della concordanza tra il saggio Xpert HPV Assay e il metodo comparativo 1 è riportato nella Tabella 6.

Tabella 6. Concordanza tra il saggio Xpert HPV Assay e il metodo comparativo 1

Confronto della concordanza	n	Concordanza percentuale positiva	Concordanza percentuale negativa	Concordanza percentuale complessiva	Coeff. statistico K
Totale^a	3438	90,4% (87,9 – 92,6%)	97,1% (96,4 – 97,7%)	95,8% (95,1 – 96,5%)	0,87 (0,85 – 0,89)
Età 20–29	829	92,9% (89,7 – 95,4%)	94,9% (92,5 – 96,7%)	94,1% (92,3 – 95,6%)	0,88 (0,84 – 0,91)
Età 30–60	2609	87,8% (83,8 – 91,2%)	97,6% (96,9 – 98,2%)	96,4% (95,6 – 97,0%)	0,84 (0,81 – 0,87)
Esame citologico normale	2798	85,3% (81,0 – 88,9%)	97,4% (96,6 – 98,0%)	95,9% (95,1 – 96,6%)	0,81 (0,78 – 0,84)
Esame citologico > normale	441	96,7% (93,9 – 98,4%)	90,8% (84,9 – 95,0%)	94,8% (92,3 – 96,7%)	0,88 (0,83 – 0,93)

a. Stime dei punti come indicato. Intervalli di confidenza al 95% secondo il test esatto di Fisher.

Un'analisi dei dati dello studio dimostra una buona concordanza tra il saggio Xpert HPV Assay e il metodo comparativo 2. Tale concordanza è indipendente dalla fascia di età dei soggetti (20–29 anni e 30–60 anni) e dallo stato dell'esame citologico [normale (NILM, negativo per lesioni intraepiteliali o maligne) o peggio del normale (peggio di NILM)]. Un riepilogo della concordanza tra il saggio Xpert HPV Assay e il metodo comparativo 2 è riportato nella Tabella 7.

Tabella 7. Concordanza tra il saggio Xpert HPV Assay e il metodo comparativo 2

Confronto della concordanza	n	Concordanza percentuale positiva	Concordanza percentuale negativa	Concordanza percentuale complessiva	Coeff. statistico K
Totale^a	3313	84,5% (81,5 – 87,1%)	96,3% (95,5 – 97,0%)	93,9% (93,0 – 94,7%)	0,81 (0,79 – 0,84)
Età 20–29	835	94,2% (91,1 – 96,5%)	93,1% (90,5 – 95,1%)	93,5% (91,6 – 95,1%)	0,87 (0,83 – 0,90)
Età 30–60	2478	75,5% (70,7 – 79,9%)	97,1% (96,3 – 97,8%)	94,0% (93,0 – 94,9%)	0,75 (0,71 – 0,79)
Esame citologico normale	2798	76,9% (72,3 – 82,2%)	96,5% (95,5 – 97,2%)	94,0% (93,0 – 95,0%)	0,73 (0,69 – 0,77)
Esame citologico > normale	441	92,5% (89,0 – 95,1%)	93,5% (87,6 – 97,2%)	92,7% (89,9 – 95,0%)	0,83 (0,77 – 0,88)

a. Stime dei punti come indicato. Intervalli di confidenza al 95% secondo il test esatto di Fisher.

Come ulteriore misura della concordanza analitica, in questo studio è stato valutato il tasso di positività all'HPV in base allo stato citologico. Nei campioni di analisi di dimensioni simili valutati da ciascun metodo, i tassi di positività all'HPV riportati dai tre metodi di analisi dell'HPV sono simili e generalmente concordanti con i tassi di positività all'HPV riportati nelle altre popolazioni di bassa prevalenza della malattia (es. lo studio ALTS). Un riepilogo dei tassi di positività all'HPV misurati da ciascun metodo in base allo stato citologico è riportato nella Tabella 8.

Tabella 8. Positività all'HPV in base al metodo e allo stato citologico

Categoria (Regno Unito/USA)	Xpert HPV Assay			Metodo comparativo 1			Metodo comparativo 2		
	Totale	Pos	% Pos	Totale	Pos	% Pos	Totale	Pos	% Pos
Normale / NILM	3003	383	12,8	2968	363	12,2	2882	366	12,7
Al limite / ASC-US	219	113	51,6	218	110	50,5	221	123	55,7
Discariosi di basso grado (lieve) / LSIL^a	151	118	78,1	151	121	80,1	152	129	84,9
Discariosi di alto grado (moderata) / HSIL^b	30	30	100,0	29	28	96,6	31	31	100,0
Discariosi di alto grado (grave) / HSIL	36	36	100,0	36	35	97,2	36	36	100,0
Altro	17	11	64,7	17	11	64,7	17	10	58,8
Totale	3456	691	20,0	3419	668	19,5	3339	695	20,8

a. Lesione intraepiteliale squamosa di basso grado.

b. Lesione intraepiteliale squamosa di alto grado.

Un sottoinsieme [249/3538 (7,8%)] dei campioni di analisi inclusi in questo studio è stato pretrattato con acido acetico glaciale (GAA) prima di eseguire la valutazione per l'HPV con il saggio Xpert HPV Assay e con i metodi comparativi. Un centro ha utilizzato una versione modificata di una metodologia commerciale [71/1169 (6,1%); CytoLyt, Hologic, Crawley, UK, EU), mentre gli altri due centri hanno utilizzato delle procedure sviluppate in laboratorio basate sul metodo Espostis [rispettivamente 153/1170 (13,1%) e 25/1198 (2,1%)].¹¹⁻¹³ Il saggio Xpert HPV Assay dimostra una buona concordanza con i metodi comparativi, indipendente dallo stato di pretrattamento con GAA. Vedere la Tabella 9 e la Tabella 10.

Tabella 9. Concordanza tra il saggio Xpert HPV Assay e il metodo comparativo 1 in campioni di analisi pretrattati con GAA^a

Confronto della concordanza	n	Concordanza percentuale positiva	Concordanza percentuale negativa	Concordanza percentuale complessiva	Coeff. statistico K
Pretrattati con GAA	243	94,2% (85,8 – 98,4%)	96,6% (92,6 – 98,7%)	95,9% (92,6 – 98,0%)	0,90 (0,84 – 0,96)
Non trattati	3180	89,7% (87,0 – 92,0%)	97,2% (96,5 – 97,8%)	95,8% (95,0 – 96,5%)	0,86 (0,84 – 0,89)

a. Stime dei punti come indicato. Intervalli di confidenza al 95% secondo il test esatto di Fisher.

Tabella 10. Concordanza tra il saggio Xpert HPV Assay e il metodo comparativo 2 in campioni di analisi pretrattati con GAA^a

Confronto della concordanza	n	Concordanza percentuale positiva	Concordanza percentuale negativa	Concordanza percentuale complessiva	Coeff. statistico K
Pretrattati con GAA	246	87,7% (97,9 – 94,2%)	94,2% (89,6 – 97,2%)	92,3% (88,2 – 95,3%)	0,82 (0,74 – 0,90)
Non trattati	3067	84,1% (81,0 – 86,9%)	96,5% (95,7 – 97,2%)	94,0% (93,1 – 94,8%)	0,81 (0,78 – 0,84)

a. Stime dei punti come indicato. Intervalli di confidenza al 95% secondo il test esatto di Fisher.

17 Limite di rilevamento

La sensibilità analitica o limite di rilevamento (LoD) del saggio Xpert HPV Assay è stata valutata utilizzando:

1. Linee cellulari positive all'HPV: HPV 16 (SiHa), HPV 18 (HeLa S3), HPV 45 (MS751) e HPV 68 (ME180) in soluzione PreservCyt contenente come base una linea cellulare negativa all'HPV (C33A).
2. Plasmidi di DNA dei 14 tipi bersaglio di HPV ad alto rischio in una base di DNA genomico umano femminile.

17.1 Linee cellulari positive all'HPV

Il limite di rilevamento (LoD) per HPV 16, HPV 18, HPV 45 e HPV 68 è stato stimato analizzando replicati di 20 a un minimo di sei concentrazioni per ciascuna delle linee cellulari utilizzando un lotto di reagenti del saggio Xpert HPV Assay. I LoD sono stati stimati con l'analisi probit. I LoD dichiarati sono stati confermati analizzando almeno 20 replicati diluiti alle concentrazioni stimate dei LoD utilizzando tre lotti di reagenti del saggio Xpert HPV Assay. Il LoD dichiarato è definito come la concentrazione alla quale il 95% di almeno 20 replicati per lotto di reagente risulta positivo (Tabella 11).

17.2 Plasmidi di DNA dell'HPV

Il limite di rilevamento (LoD) per 14 plasmidi di DNA dell'HPV ad alto rischio è stato confermato con un minimo di 60 replicati utilizzando due operatori e tre lotti di reagenti. I test sono stati condotti in giornate differenti. Per ciascuno dei plasmidi di DNA dell'HPV è stato determinato il livello (in copie per reazione di PCR) al quale il tasso complessivo di veri positivi è statisticamente maggiore del 95% combinato (pooling) da tre lotti di reagenti (Tabella 12).

Tabella 11. Limite di rilevamento: Linee cellulari positive all'HPV

Tipo di HPV	LoD stimato con probit (cellule/ml)	IC al 95%	IC al 99,9%	Livello di conf. (cellule/ml)	Lotto di reagenti	Pos di 20 rep.	Media Ct (bersaglio)	DS Ct (bersaglio)	Media complessiva Ct (bersaglio)	DS complessiva Ct (bersaglio)	% Pos	% Pos complessiva
16	71	55 – 87	52 – 127	122	Lotto 1	19	35,6	1,0	35,3	1,2	95	95,0
					Lotto 2	19	35,0	1,4			95	
					Lotto 3	19	35,4	1,2			95	
18	46	35 – 56	33 – 90	53	Lotto 1	20	36,0	1,2	35,6	1,1	100	96,7
					Lotto 2	19	35,3	0,9			95	
					Lotto 3	19	35,6	1,1			95	
45	180	150 – 211	142 – 266	173	Lotto 1	19	37,0	1,2	37,1	1,1	95	96,7
					Lotto 2	20	37,0	1,2			100	
					Lotto 3	19	37,4	0,9			95	
68	267	231 – 304	221 – 366	366	Lotto 1	20	35,9	0,6	36,0	0,6	100	96,7
					Lotto 2	19	35,9	0,7			95	
					Lotto 3	20	36,2	0,5			100	

Tabella 12. Limite di rilevamento: Plasmidi di DNA dell'HPV

Bersaglio	Livello di copie analizzato	Conteggio campioni	FN	% Pos	IC al 95% un lato inferiore	Media generale Ct	DS Ct
HPV 35	15	60	0	100	95,1%	33,9	0,426
HPV 39	20	60	0	100	95,1%	36,5	0,352
HPV 45	10	100	0	100	97,0%	35,6	0,533
HPV 51	10	100	0	100	97,0%	35,1	0,587
HPV 52	15	60	0	100	95,1%	34,7	0,543
HPV 56	15	101	0	100	97,1%	36,6	0,525
HPV 58	20	60	0	100	95,1%	33,7	0,412
HPV 59	10	100	0	100	97,0%	35,1	0,618
HPV 66	30	60	0	100	95,1%	36,6	0,33
HPV 68	15	100	0	100	97,0%	36,9	0,445
HPV 16	10	100	0	100	97,0%	35,1	0,559
HPV 18	10	141	1	99,3	96,7%	35,9	0,585
HPV 31	10	100	0	100	97,0%	34,2	0,529
HPV 33	10	100	0	100	97,0%	35,0	0,642

18 Precisione e riproducibilità del saggio

La precisione e la riproducibilità del saggio Xpert HPV Assay sono state valutate in uno studio multicentrico condotto in 12 giornate, in cui due operatori in ciascuno dei tre centri hanno analizzato in cieco due volte al giorno un pannello di precisione da 16 elementi. Il pannello era composto sia da campioni artificiali (cellule in coltura contenenti vari tipi di HPV in una base di cellule in coltura prive di HPV) sia da un pool di campioni clinici in PreservCyt. Ciascun centro ha utilizzato una diversa configurazione del sistema GeneXpert (un centro ha utilizzato solo GX IVs, un centro ha utilizzato un GX XVI e un centro ha utilizzato un Infinity 80). Per ciascun periodo di quattro giornate di analisi dello studio sono stati utilizzati tre lotti del saggio Xpert HPV Assay. Alla fine dello studio, ciascun elemento del pannello di precisione è stato valutato 144 volte. I dati sono riepilogati in base al canale del saggio, rappresentato come 16 per il canale dell'HPV 16, 18/45 per il canale dell'HPV 18 e dell'HPV 45, 31 per il canale dell'HPV 31 e degli altri tipi, 51 per il canale dell'HPV 51 e dell'HPV 59 e 39 per il canale dell'HPV 39 e degli altri tipi. Vedere la Tabella 13 e la Tabella 14.

**Tabella 13. Precisione e riproducibilità del saggio Xpert HPV Assay:
Descrizione del pannello e concordanza positiva ^{a, b}**

Campione di analisi (bersaglio e concentrazione relativa)	Canale del saggio	Sito 1		Sito 2		Sito 3		Concordanza totale
		Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	
Campione di analisi artificiale (HPV 16 negativo alto)	16	83,3% (20/24)	91,7% (22/24)	87,5% (21/24)	82,6% (19/23)	100% (23/23)	83,3% (20/24)	88,0% (125/142)
	18/45	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (142/142)
	31	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (142/142)
	51	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (142/142)
	39	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (142/142)
Campione di analisi artificiale (HPV 16 positivo basso)	16	87,5% (21/24)	95,7% (22/23)	95,8% (23/24)	100% (23/23)	95,8% (23/24)	95,8% (23/24)	95,1% (135/142)
	18/45	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
	31	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
	51	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
	39	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
Campione di analisi artificiale (HPV 16 positivo moderato)	16	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (21/21)	95,8% (23/24)	100% (24/24)	99,3% (140/141)
	18/45	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (21/21)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (141/141)
	31	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (21/21)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (141/141)
	51	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (21/21)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (141/141)
	39	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (21/21)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (141/141)

**Tabella 13. Precisione e riproducibilità del saggio Xpert HPV Assay:
Descrizione del pannello e concordanza positiva (continua)^{a, b}**

Campione di analisi (bersaglio e concentrazione relativa)	Canale del saggio	Sito 1		Sito 2		Sito 3		Concordanza totale
		Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	
Campione di analisi artificiale (HPV 18 negativo alto)	16	100% (24/24)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
	18/45	83,3% (20/24)	86,4% (19/22)	79,2% (19/24)	87,5% (21/24)	95,8% (23/24)	91,7% (22/24)	87,3% (124/142)
	31	100% (24/24)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
	51	100% (24/24)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
	39	100% (24/24)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
Campione di analisi artificiale (HPV 18 positivo basso)	16	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (144/144)
	18/45	100% (24/24)	100% (24/24)	91,7% (22/24)	95,8% (23/24)	91,7% (22/24)	100% (24/24)	96,5% (139/144)
	31	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (144/144)
	51	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (144/144)
	39	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (144/144)
Campione di analisi artificiale (HPV 18 positivo moderato)	16	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (141/141)
	18/45	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (141/141)
	31	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (141/141)
	51	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (141/141)
	39	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (141/141)
Campione di analisi artificiale (HPV 68 negativo alto)	16	100% (22/22)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (139/139)
	18/45	100% (22/22)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (139/139)
	31	100% (22/22)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (139/139)
	51	100% (22/22)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (139/139)
	39	90,9% (20/22)	95,5% (21/22)	100% (24/24)	91,3% (21/23)	91,7% (22/24)	91,7% (22/24)	93,5% (130/139)
Campione di analisi artificiale (HPV 68 positivo basso)	16	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (141/141)
	18/45	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (141/141)
	31	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (141/141)
	51	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (141/141)
	39	95,8% (23/24)	95,8% (23/24)	100% (23/23)	87,0% (20/23)	100% (23/23)	100% (24/24)	96,5% (136/141)

**Tabella 13. Precisione e riproducibilità del saggio Xpert HPV Assay:
Descrizione del pannello e concordanza positiva (continua)^{a, b}**

Campione di analisi (bersaglio e concentrazione relativa)	Canale del saggio	Sito 1		Sito 2		Sito 3		Concordanza totale
		Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	
Campione di analisi artificiale (HPV 68 positivo moderato)	16	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
	18/45	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
	31	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
	51	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (24/24)	95,8% (23/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
	39	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	95,8% (23/24)	99,3% (141/142)
Campione di analisi artificiale (HPV 16/45/68 positivo basso)	16	100% (24/24)	100% (23/23)	95,8% (23/24)	95,8% (23/24)	95,7% (22/23)	100% (24/24)	97,9% (139/142)
	18/45	87,5% (21/24)	95,7% (22/23)	79,2% (19/24)	87,5% (21/24)	95,7% (22/23)	95,8% (23/24)	90,1% (128/142)
	31	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (142/142)
	51	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	95,8% (23/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	99,3% (141/142)
	39	91,7% (22/24)	95,7% (22/23)	91,7% (22/24)	91,7% (22/24)	95,7% (22/23)	95,8% (23/24)	93,7% (133/142)
Campione di analisi artificiale (negativo)	16	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (140/140)
	18/45	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (140/140)
	31	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (140/140)
	51	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (140/140)
	39	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (140/140)
Pool di campioni clinici (HPV 16, HPV 31)	16	50,0% (12/24)	20,8% (5/24)	33,3% (8/24)	18,2% (4/22)	8,3% (2/24)	20,8% (5/24)	25,4% (36/142)
	18/45	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
	31	20,8% (5/24)	41,7% (10/24)	37,5% (9/24)	50,0% (11/22)	20,8% (5/24)	33,3% (8/24)	33,8% (48/142)
	51	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
	39	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
Pool di campioni clinici (HPV 18, HPV 39)	16	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (144/144)
	18/45	16,7% (4/24)	20,8% (5/24)	41,7% (10/24)	25,0% (6/24)	12,5% (3/24)	20,8% (5/24)	22,9% (33/144)
	31	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (144/144)
	51	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (144/144)
	39	4,2% (1/24)	4,2% (1/24)	0% (0/24)	8,3% (2/24)	0% (0/24)	0% (0/24)	2,8% (4/144)

**Tabella 13. Precisione e riproducibilità del saggio Xpert HPV Assay:
Descrizione del pannello e concordanza positiva (continua)^{a, b}**

Campione di analisi (bersaglio e concentrazione relativa)	Canale del saggio	Sito 1		Sito 2		Sito 3		Concordanza totale
		Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	
Pool di campioni clinici (HPV 42, HPV 51, HPV 59)	16	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	95,8% (23/24)	100% (24/24)	99,3% (142/143)
	18/45	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (143/143)
	31	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (143/143)
	51	25,0% (6/24)	33,3% (8/24)	29,2% (7/24)	34,8% (8/23)	12,5% (3/24)	16,7% (4/24)	25,2% (36/143)
	39	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (143/143)
Pool di campioni clinici (HPV 52)	16	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (142/142)
	18/45	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (142/142)
	31	20,8% (5/24)	41,7% (10/24)	33,3% (8/24)	41,7% (10/24)	8,7% (2/23)	30,4% (7/23)	29,6% (42/142)
	51	95,8% (23/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (142/142)
	39	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (23/23)	100% (23/23)	100% (142/142)
Pool di campioni clinici (negativo)	16	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
	18/45	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
	31	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
	51	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)
	39	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (22/22)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (142/142)

- a. La concordanza per i campioni di analisi negativi e negativi alti è mostrata come % negativa; la concordanza per i campioni di analisi positivi bassi e positivi moderati è mostrata come % positiva.
- b. Nello studio erano inclusi 34 indeterminati totali: HPV 16 neg alto(2); HPV 16 pos basso(2); HPV 18 pos mod(3); HPV 18 neg alto(3); HPV 18 pos mod(3); HPV 68 neg alto(5); HPV 68 pos basso(3); HPV 68 pos mod(2); HPV 16, 45, 68(2); negativo CP(4); HPV 16, 31(2); HPV 42, 51, 59(1); HPV 52(2); negativo PC(2).

**Tabella 14. Riproducibilità del saggio Xpert HPV Assay:
Variabilità del Ct per gli elementi del pannello^a**

Campione di analisi (bersaglio e concentrazione relativa)	Canale del saggio (analita specifico)	n ^b	Ct medio	Tra i centri		Tra gli operatori		Tra i lotti		Tra i giorni		All'interno del saggio		Totale	
				DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)
Campione di analisi artificiale (HPV 16 negativo alto)	16 (16)	12	38,4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Campione di analisi artificiale (HPV 16 positivo basso)	16 (16)	135	35,4	0	0	0,605	1,7	0,425	1,2	0	0	1,003	2,8	1,246	3,5
Campione di analisi artificiale (HPV 16 positivo moderato)	16 (16)	140	34,0	0	0	0,288	0,8	0,211	0,6	0	0	0,972	2,9	1,036	3,0
Campione di analisi artificiale (HPV 18 negativo alto)	18/45 (18)	22	39,2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Campione di analisi artificiale (HPV 18 positivo basso)	18/45 (18)	139	35,9	0	0	0,408	1,1	0,414	1,2	0	0	1,149	3,2	1,287	3,6
Campione di analisi artificiale (HPV 18 positivo moderato)	18/45 (18)	140	34,1	0	0	0	0	0,430	1,3	0,170	0,5	1,049	3,1	1,146	3,4
Campione di analisi artificiale (HPV 68 negativo alto)	39 (68)	116	39,5	0	0	0,811	2,1	0,296	0,7	0	0	1,025	2,6	1,340	3,4
Campione di analisi artificiale (HPV 68 positivo basso)	39 (68)	141	36,2	0,055	0,2	0,362	1,0	0,099	0,3	0,265	0,7	0,703	1,9	0,843	2,3
Campione di analisi artificiale (HPV 68 positivo moderato)	39 (68)	142	34,7	0	0	0,060	0,2	0,196	0,6	0	0	0,789	2,3	0,815	2,3
Campione di analisi artificiale (HPV 16/45/68 positivo basso)	16 (16)	140	35,4	0,042	0,1	0,497	1,4	0,124	0,4	0	0	1,171	3,3	1,278	3,6
	18/45 (45)	133	37,2	0	0	0	0	0,454	1,2	0	0	1,586	4,3	1,649	4,4
	39 (68)	141	36,4	0,056	0,2	0	0	0	0	0,280	0,8	0,876	2,4	0,922	2,5
Campione di analisi artificiale (Negativo)	Negativo (HMBS)	140	28,9	0,126	0,4	0,323	1,1	0,115	0,4	0	0	0,714	2,5	0,802	2,8
Pool di campioni clinici (HPV 16, HPV 31)	16 (16)	41	37,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	31 (31)	97	38,2	0	0	0	0	0,356	0,9	0,453	1,2	1,411	3,7	1,524	4,0
Pool di campioni clinici (HPV 18, HPV 39)	18 (16)	47	39,7	0,643	1,6	0	0	0	0	1,148	2,9	1,388	3,5	1,913	4,8
	39 (39)	61	39,8	0	0	0,741	1,9	0	0	0	0	1,197	3,0	1,408	3,5
Pool di campioni clinici (HPV 42, HPV 51, HPV 59)	ND (42)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	51 (51)	92	38,9	0,452	1,2	0	0	0	0	0,088	0,2	1,348	3,5	1,424	3,7
	59 (59)	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Pool di campioni clinici (HPV 52)	31 (52)	82	38,2	0,307	0,8	0	0	0	0	0	0	2,738	7,2	2,756	7,2
Pool di campioni clinici (negativo)	Negativo (HMBS)	142	33,3	0,132	0,4	0	0	0,559	1,7	0	0	0,876	2,6	1,047	3,1

a. NA indica dati continui insufficienti per eseguire un'analisi ANOVA.

b. Risultati con valori Ct su 144 diversi da zero.

19 Specificità analitica

Con il saggio Xpert HPV Assay sono stati analizzati un pannello di 47 organismi, tra cui batteri, funghi e virus comunemente riscontrati nel tratto urogenitale femminile e 12 tipi di papilloma virus umano strettamente correlati. Tutti gli organismi sono stati inoculati all'interno di cellule negative all'HPV (C33A) in soluzione PreservCyt e all'interno di cellule negative all'HPV inoculate con cellule positive all'HPV 16 (SiHa) a 3 volte il limite di rilevamento. Gli organismi e le concentrazioni analitiche sono elencati nella Tabella 15. La specificità analitica è stata del 100% e nessuno degli organismi ha interferito con il rilevamento dell'HPV 16.

Tabella 15. Pannello di specificità analitica

Organismo	Concentrazione analitica	Organismo	Concentrazione analitica
<i>Bacteriodes fragilis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Streptococcus pyogenes</i>	3 x 10 ⁶ UFC/ml
<i>Bifidobacterium breve</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1 x 10 ⁶ UFC/ml
<i>Candida albicans</i>	4 x 10 ⁶ cellule/ml	Adenovirus	1 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /ml
<i>Candida glabrata</i>	1 x 10 ⁸ cellule/ml	Citomegalovirus (CMV)	1 x 10 ⁷ copie/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1 x 10 ⁸ CE ^a /ml	Virus di Epstein-Barr (EBV)	1 x 10 ⁷ copie/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	3 x 10 ⁷ UFC/ml	Virus dell'epatite B (HBV)	3,6 x 10 ⁶ UI/ml
<i>Corynebacterium xerosis</i>	1 x 10 ⁷ cellule/ml	Virus dell'epatite C (HCV)	7,62 x 10 ² UI/ml
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	Virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1)	1 x 10 ⁶ copie/ml
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	Virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1)	1 x 10 ⁷ copie/ml
<i>Escherichia coli</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	Virus dell'herpes simplex di tipo 2 (HSV-2)	1 x 10 ⁷ copie/ml
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	8,7 x 10 ⁷ UFC/ml	Papilloma virus umano (HPV) 6	1,25 x 10 ⁷ copie/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	HPV 11	1,25 x 10 ⁷ copie/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1 x 10 ⁷ cellule/ml	HPV 26	1,25 x 10 ⁷ copie/ml
<i>Lactobacillus crispatus</i>	1 x 10 ⁷ cellule/ml	HPV 30	1,25 x 10 ⁷ copie/ml
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	1 x 10 ⁷ cellule/ml	HPV 34	1,25 x 10 ⁷ copie/ml
<i>Lactobacillus jensenii</i>	3 x 10 ⁷ UFC/ml	HPV 53	1,25 x 10 ⁷ copie/ml
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	HPV 67	1,25 x 10 ⁷ copie/ml
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	HPV 69	1,25 x 10 ⁷ copie/ml
<i>Proteus mirabilis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	HPV 70	1,25 x 10 ⁷ copie/ml
<i>Proteus vulgaris</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	HPV 73	1,25 x 10 ⁷ copie/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	HPV 82	1,25 x 10 ⁷ copie/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	HPV 85	1,25 x 10 ⁷ copie/ml
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3 x 10 ⁶ UFC/ml		

a. Corpi elementari.

20 Sostanze interferenti

Le sostanze endogene ed esogene potenzialmente interferenti che possono essere presenti nei campioni cervicali sono state valutate relativamente alle prestazioni del saggio Xpert HPV Assay. Le sostanze sono state diluite singolarmente in cellule negative all'HPV inoculate con cellule positive all'HPV 16 (SiHa) a tre volte il limite di rilevamento. Le sostanze e le concentrazioni analitiche sono elencate nella Tabella 16. L'interferenza è stata osservata con il sangue intero (0,25% v/v) nel campione analitico, ma non è stata osservata con nessuna delle altre sostanze endogene alle concentrazioni analitiche stabilite. Non è stata osservata interferenza con nessuna delle sostanze esogene alle concentrazioni analitiche stabilite, eccetto per la crema contro il prurito Vagisil (0,25% p/v) e con il gel idratante Vagi Gard (0,5% p/v). Le creme dense possono provocare interruzioni del saggio causate dalla pressione a concentrazioni superiori allo 0,25% p/v nel campione analitico.

Tabella 16. Sostanze potenzialmente interferenti

Sostanza	Concentrazione
Sangue intero	0,25% v/v
Muco	0,15% v/v
Leucociti (PBMC)	1 x 10 ⁵ cellule/ml
Vagisil crema contro il prurito	0,25% p/v
Clotrimazolo crema vaginale	0,25% p/v
Preparazione H crema per emorroidi	0,25% p/v
Miconazole 3	0,25% p/v
Monistat 1	0,25% p/v
Zovirax Cold Sore Cream	0,25% p/v
Vagisil idratante	10% p/v
Vagi Gard gel idratante	0,5% p/v
KY Jelly Personal Lubricant	10% p/v
Yeast Gard lavanda	10% v/v
Delfen schiuma contraccettiva vaginale	10% p/v
VH Essentials lavanda medicata povidone-iodio	10% v/v
Noroforms ovuli vaginali deodoranti	10% p/v

21 Contaminazione da carry-over

È stato condotto uno studio allo scopo di dimostrare che l'impiego delle cartucce chiuse monouso GeneXpert previene la contaminazione da carry-over (trascinamento) nelle sessioni analitiche di campioni negativi, successive a sessioni con campioni caratterizzati da valori positivi molto elevati all'interno dello stesso modulo GeneXpert. Lo studio prevedeva il trattamento di un campione negativo con lo stesso modulo GeneXpert subito dopo il trattamento di un campione positivo molto alto per l'HPV 16 (tale da superare il 95% dei risultati ottenuti dai campioni di analisi delle pazienti malate nella popolazione utilizzata per lo studio). Questo schema di analisi è stato ripetuto 20 volte in due moduli GeneXpert per un totale di 42 sessioni analitiche, che hanno prodotto 20 campioni positivi e 22 campioni negativi. Tutti i 20 campioni positivi sono risultati correttamente positivi all'HPV 16 e tutti i 22 campioni negativi sono risultati correttamente negativi all'HPV.

22 Riferimenti bibliografici

1. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.*1999; 189(1):12-19.
2. Division of STD Prevention (1999). Prevention of genital HPV infection and sequelae: report of an external consultants' meeting. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved January 4, 2012.
3. Kjaer SK, van den Brule AJC, Paull G, et al. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ.*2002; 325(7364): 572-579.
4. De Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. 2010. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The Lancet.* 2010; 11(11): doi:10.1016/S1470-2045(10)70230-8.
5. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJF, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer.* 2011;128: 927-935. doi:10.1002/ijc.25396.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. (Refer to latest edition.)
7. CLSI Publication M29. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. (Refer to latest edition.)
8. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 48th Edition. 2007.
9. REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on the classification labeling and packaging of substances and mixtures amending and repealing, List of Precautionary Statements, Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC (amending Regulation (EC)).
10. Occupational Safety and Health Standards, Hazard Communication, Toxic and Hazard Substances (March 26, 2012) (29 C.F.R., pt. 1910, subpt. Z).
11. Coleman DV, Chapman, PA. Preparatory techniques. In *Clinical Cytopathology*. London: Butterworths, 1989: 54.
12. Yam LT, Janckila AJ. A simple method of preparing smears from bloody effusions for cytodiagnosis. *Acta Cytol.* 1983; 27(2):114-118.
13. Bahr GF. Some considerations of basic cell chemistry. In *Compendium on Cytopreparative Techniques. Tutorials of Cytology.* 1974; 3rd Edition: 1.

23 Ubicazione delle sedi centrali Cepheid

Sede centrale	Sede centrale europea
Cepheid 904 Caribbean Drive Sunnyvale, CA 94089-1189 USA	Cepheid Europe SAS Vira Solelh 81470 Maurens-Scopont Francia
Telefono: +1 408.541.4191	Telefono: +33 563 825 300
Fax: +1 408.541.4192	Fax: +33 563 825 301
www.cepheid.com	www.cepheidinternational.com

24 Assistenza Tecnica

Prima di contattare l'Assistenza Tecnica di Cepheid, raccogliere le seguenti informazioni:

- Nome prodotto
- Numero di lotto
- Numero di serie dello strumento
- Messaggi di errore (se presenti)
- Versione del software e, se pertinente, codice riportato sul Service Tag (etichetta di servizio) del computer

Informazioni di contatto

Stati Uniti

Telefono: + 1 888 838 3222

E-mail: techsupport@cepheid.com

Francia

Telefono: + 33 563 825 319

E-mail: support@cepheideurope.com

Le informazioni di contatto di tutti gli uffici di Assistenza Tecnica di Cepheid sono disponibili nel sito:
www.cepheid.com/en/CustomerSupport.

25 Tabella dei simboli

Simbolo	Significato
	Numero di catalogo
	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>
	Non riutilizzare
	Codice lotto
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Attenzione
	Produttore
	Contenuto sufficiente per <n> test
	Controllo
	Data di scadenza
	Marchio CE – Conformità europea
	Limitazione della temperatura
	Rischi biologici
	Attenzione
	Paese di produzione



Cepheid AB
 Röntgenvägen 5
 SE-171 54 Solna
 Svezia



