

**Aptima HPV Assay**

Per uso diagnostico *in vitro*.  
Solo per esportazione dagli USA.

<b>Informazioni generali</b> .....	<b>2</b>
Uso previsto .....	2
Sommario e spiegazione del test .....	2
Principi della procedura .....	3
Avvertenze e precauzioni .....	4
Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti .....	6
Raccolta e conservazione dei campioni .....	7
<b>Procedure di controllo qualità</b> .....	<b>21</b>
<b>Interpretazione del test</b> .....	<b>22</b>
<b>Limiti</b> .....	<b>23</b>
<b>Risultati attesi sul Tigris DTS System: prevalenza di mRNA dell'HPV ad alto rischio</b> . . .	<b>25</b>
<b>Studio clinico Aptima HPV Assay con campioni per citologia in fase liquida ThinPrep</b> .....	<b>26</b>
<b>Prestazioni di Tigris DTS System assay</b> .....	<b>28</b>
<b>Risultati attesi sul Panther System: prevalenza di mRNA dell'HPV ad alto rischio</b> . . . .	<b>57</b>
<b>Progetto di studio clinico dell'Aptima HPV Assay con campioni per citologia in fase liquida ThinPrep</b> .....	<b>58</b>
<b>Prestazioni del Panther System assay</b> .....	<b>60</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>85</b>

<b>Tigris™ DTS System</b>	
<b>Tigris DTS System</b> .....	<b>9</b>
Reagenti e materiali forniti .....	9
Materiali richiesti ma disponibili separatamente .....	10
Materiali opzionali .....	11
<b>Procedura di analisi con il Tigris DTS System</b> .....	<b>11</b>
Note procedurali .....	14

<b>Panther™ System</b>	
<b>Panther System</b> .....	<b>15</b>
Reagenti e materiali forniti .....	15
Materiali richiesti ma disponibili separatamente .....	16
Materiali opzionali .....	16
<b>Procedura di analisi con il Panther System</b> .....	<b>17</b>
Note procedurali .....	19

## Informazioni generali

### Uso previsto

L'Aptima HPV assay (Dosaggio HPV Aptima) è un test di amplificazione del target mediante sonde di acidi nucleici per l'individuazione qualitativa *in vitro* dell'RNA messaggero (mRNA) virale E6/E7 da 14 tipi di Papillomavirus umano (Human papillomavirus, HPV) ad alto rischio (16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68). L'Aptima HPV assay non differenzia i 14 tipi ad alto rischio.

- L'uso dell'Aptima HPV assay è indicato per lo screening di donne sottoposte a Pap test con risultati di cellule squamose atipiche di significato indeterminato (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, ASC-US) per stabilire la necessità di procedere con la colposcopia. I risultati di questo test non hanno lo scopo di impedire alle donne di procedere con una colposcopia.
- L'Aptima HPV assay può essere utilizzato con citologia cervicale per lo screening aggiuntivo (co-testing) volto a valutare la presenza o l'assenza di tipi HPV ad alto rischio. Queste informazioni, insieme alla valutazione della storia citologica eseguita dal medico, ad altri fattori di rischio e alle linee guida professionali, possono essere utilizzate per suggerire la gestione della paziente.
- L'Aptima HPV assay può essere utilizzato come test primario per lo screening, con o senza citologia cervicale, per identificare le donne soggette a un aumento del rischio di sviluppare un tumore della cervice o patologie di alto grado. Queste informazioni, insieme alla valutazione della storia di screening della paziente eseguita dal medico, ad altri fattori di rischio e alle linee guida professionali, possono essere utilizzate per suggerire la gestione della paziente.

I campioni cervicali raccolti in fiale Pap test ThinPrep™ contenenti soluzione PreservCyt™ e i campioni raccolti con i kit di prelievo e trasporto di campioni cervicali Aptima possono essere analizzati con l'Aptima HPV assay sia prima che dopo il trattamento per Pap test. Il test può essere utilizzato per analizzare questi tipi di campioni con i sistemi di campionamento diretto Direct Tube Sampling (DTS), con il Tigris DTS System o con il Panther System. I campioni cervicali raccolti nel liquido conservante SurePath possono essere analizzati con l'Aptima HPV assay sul Tigris DTS System e sul Panther System.

### Sommario e spiegazione del test

Il cancro cervicale è uno dei cancro più diffusi tra le donne nel mondo. L'HPV è l'agente eziologico responsabile per più del 99% di tutti i casi di cancro cervicale.<sup>1,2,3</sup> L'HPV è un virus a DNA comunemente trasmesso per via sessuale che include più di 100 genotipi.<sup>4</sup>

Il genoma virale HPV è un DNA circolare a doppio filamento, di lunghezza pari a circa 7900 coppie di basi. Il genoma presenta otto cornici sovrapposte di lettura aperta. Sono presenti sei geni precoci (E), due geni tardivi (L) e una lunga regione di controllo non tradotta. I geni tardivi L1 e L2 codificano per le proteine strutturali del capsido maggiore e minore. I geni precoci regolano la replicazione virale dell'HPV. I geni E6 e E7 dei genotipi di HPV ad alto rischio sono notoriamente oncogeni. Le proteine espresse da mRNA policistronico E6-E7 alterano le funzioni cellulari della proteina p53 e della proteina del retinoblastoma, con conseguente deterioramento dei punti di controllo del ciclo cellulare e instabilità genomica.<sup>5,6</sup>

Quattordici genotipi di HPV sono considerati patogeni o ad alto rischio per la patologia cervicale.<sup>7</sup> Svareti studi hanno collegato i genotipi 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 alla progressione della malattia.<sup>2,5,8</sup> Le pazienti con infezione persistente causata da uno di questi genotipi sono a maggior rischio di sviluppare grave displasia o carcinoma cervicale.<sup>7,9</sup>

Le infezioni da HPV sono molto frequenti e la maggior parte delle donne guarisce entro 6-12 mesi.<sup>8, 10</sup> La presenza dell'acido nucleico dell'HPV non implica la presenza di una displasia cervicale o di un cancro cervicale. Tuttavia, un approccio efficace per l'individuazione della cervicopatia consiste nell'identificare gli elementi oncogenici dell'HPV che favoriscono l'infezione virale persistente e la trasformazione cellulare.<sup>3</sup>

### **Prestazioni cliniche dell'Aptima HPV assay nello screening primario per il tumore della cervice**

Le prestazioni cliniche dell'Aptima HPV assay, utilizzato in modalità di screening primario, sono state valutate in più studi eseguiti da sperimentatori indipendenti. Tredici pubblicazioni referenziate<sup>11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23</sup> di dieci diversi studi clinici mostrano le prestazioni di Aptima HPV nello screening primario in donne di nove Paesi (Cina, Canada, Francia, Messico, Inghilterra, Danimarca, Paesi Bassi, Stati Uniti e Germania). I dati di questi studi dimostrano che Aptima HPV assicura prestazioni cliniche simili a quelle di altri test HPV clinicamente validati se utilizzato per lo screening primario del pre-tumore e tumore della cervice.

### **Principi della procedura**

L'Aptima HPV assay prevede tre fasi principali, che si svolgono in una singola provetta: cattura del target; amplificazione del target con amplificazione mediata da trascrizione (Transcription-Mediated Amplification, TMA)<sup>24</sup> e rilevamento dei prodotti dell'amplificazione (ampliconi) mediante analisi con protezione dell'ibridizzazione (Hybridization Protection Assay, HPA).<sup>25</sup> Il test incorpora un controllo interno (Internal Control, IC) per il monitoraggio della cattura, dell'amplificazione e del rilevamento dell'acido nucleico, nonché per l'individuazione di eventuali errori dell'operatore o dello strumento.

I campioni vengono raccolti o trasferiti in una provetta contenente un terreno di trasporto dei campioni (Specimen Transport Medium, STM) che provoca la lisi delle cellule, libera l'mRNA e lo protegge dalla degradazione durante la conservazione. Quando viene eseguito l'Aptima HPV assay, l'mRNA target viene isolato dal campione mediante oligomeri di cattura legati a microparticelle magnetiche. Gli oligomeri di cattura contengono sequenze complementari a regioni specifiche delle molecole target dell'mRNA dell'HPV, oltre ad un filamento di residui di deossadenosina. Durante la fase di ibridizzazione, le regioni specifiche delle sequenze degli oligomeri di cattura si legano a regioni specifiche della molecola target di mRNA dell'HPV. Il complesso oligomero di cattura:target viene quindi catturato fuori dalla soluzione mediante riduzione della temperatura di reazione fino a temperatura ambiente. Questa riduzione della temperatura permette che si verifichi l'ibridizzazione fra la regione della deossadenosina sull'oligomero di cattura e le molecole di poli-deossitimidina unite con legame covalente alle particelle magnetiche. Le microparticelle, incluse le molecole target catturate di mRNA dell'HPV ad esse legate, vengono attratte sul lato della provetta di reazione usando dei magneti, e il supernatante viene aspirato. Le particelle vengono lavate per rimuovere la matrice residua di campione che potrebbe contenere inibitori dell'amplificazione.

Una volta completata la cattura del target, l'mRNA dell'HPV viene amplificato mediante TMA: un metodo di amplificazione degli acidi nucleici basato su trascrizione che utilizza due enzimi, la trascrittasi inversa del virus della leucemia murina di Moloney (MMLV) e la polimerasi dell'RNA T7. La trascrittasi inversa viene usata per generare una copia del DNA della sequenza dell'mRNA target contenente una sequenza promotrice per la polimerasi dell'RNA T7. La polimerasi dell'RNA T7 produce copie multiple di amplicon di RNA dal modello della copia di DNA.

L'amplicon viene individuato mediante HPA mediante sonde di acido nucleico a singolo filamento con marcatori chemiluminescenti che sono complementari all'amplicon. Le sonde di acido nucleico marcate si ibridizzano specificamente con l'amplicon. Il reagente di selezione distingue le sonde ibridizzate da quelle non ibridizzate inattivando il marcatore sulle sonde non ibridizzate. Durante la fase di rilevamento, la luce emessa dagli ibridi marcati RNA-DNA viene misurata in un luminometro come segnali fotonici denominati unità di luce relativa (Relative Light Units, RLU). I risultati finali del test vengono interpretati in base al rapporto segnale/cutoff dell'analisi (signal-to-cutoff, S/CO).

Ad ogni reazione viene aggiunto un IC mediante il reagente di cattura del target L'IC esegue il monitoraggio delle fasi del test per la cattura, l'amplificazione e l'individuazione del target. In ciascuna reazione, il segnale dell'IC viene distinto dal segnale dell'HPV per via della diversa cinetica di emissione luminosa delle sonde con differenti marcatori.<sup>26</sup> L'amplicone specifico dell'IC viene individuato mediante una sonda con rapida emissione di luce (segnale "flash") L'amplicone specifico dell'HPV viene rilevato usando sonde con cinetica di emissione di luce relativamente più lenta (segnale "glow"). Il test cinetico doppio (Dual Kinetic Assay, DKA) è un metodo usato per differenziare i segnali provenienti da marcatori con segnale "flash" e "glow".<sup>26</sup>

## Avvertenze e precauzioni

- A. Per uso diagnostico *in vitro*.
- B. Per ulteriori precauzioni e avvertenze specifiche, consultare il *manuali d'uso del Tigris DTS System* e del *Panther System* (Tigris DTS System Operator's Manual e il Panther System Operator's Manual).

## Pertinenti al laboratorio

- C. Usare solo contenitori da laboratorio monouso forniti o indicati in modo specifico come monouso.
- D. Adottare le consuete precauzioni di laboratorio. Non mangiare, bere o fumare nelle aree di lavoro. Quando si maneggiano campioni e reagenti del kit, indossare guanti monouso senza talco, occhiali protettivi e camici da laboratorio. Lavarsi accuratamente le mani dopo aver maneggiato campioni e reagenti del kit.
- E. **Avvertenza - Sostanza irritante e corrosiva:** evitare il contatto dell'Auto Detect 2 con la pelle, gli occhi e le mucose. Se questo liquido viene a contatto con la pelle o con gli occhi, risciacquare con acqua le zone colpite. Se questo liquido si rovescia, diluire il liquido rovesciato con acqua prima di asciugarlo con un panno.
- F. Le superfici di lavoro, le pipette e le altre apparecchiature devono essere decontaminate regolarmente con una soluzione di ipoclorito di sodio al 2,5 – 3,5% (da 0,35 M a 0,5 M). Per maggiori informazioni fare riferimento a *Procedura di analisi con il Tigris DTS System* o a *Procedura di analisi con il Panther DTS System*.

## Pertinenti ai campioni


- G. Mantenere le corrette condizioni di temperatura durante la spedizione e la conservazione del campione, per assicurarne l'integrità. La stabilità del campione non è stata valutata in condizioni di spedizione e conservazione diverse da quelle raccomandate.
- H. Le date di scadenza indicate sui kit e nelle provette di raccolta/trasferimento si riferiscono al centro di raccolta/trasferimento e non alla struttura di analisi. I campioni raccolti/trasferiti in qualsiasi momento precedente a queste date di scadenza sono validi per l'analisi purché siano stati trasportati e conservati secondo le istruzioni incluse nel rispettivo foglio illustrativo, anche se queste date di scadenza sono state superate.

- I. I campioni potrebbero essere infettivi. Nell'eseguire questo test, adottare le precauzioni universali. Metodi adeguati di manipolazione e smaltimento vanno stabiliti dal direttore del laboratorio. L'esecuzione di questa procedura è consentita solo a personale adeguatamente addestrato nella manipolazione di materiali infettivi.
- J. Evitare la contaminazione crociata durante i procedimenti di manipolazione dei campioni. Assicurarsi che i contenitori dei campioni non vengano in contatto tra di loro ed eliminare i materiali usati senza farli passare sopra i contenitori aperti. Cambiare i guanti se vengono a contatto con i campioni.
- K. In certe condizioni, il liquido può fuoriuscire dai tappi delle provette quando vengono forati. Per maggiori informazioni fare riferimento a *Procedura di analisi con il Tigris DTS System* o a *Procedura di analisi con il Panther DTS System*.
- L. I campioni per citologia in fase liquida ThinPrep e i campioni prelevati con il kit di raccolta e trasporto dei campioni cervicali (Cervical Specimen Collection and Transport, CSCT) devono essere scartati se nella provetta del campione è rimasto un dispositivo di prelievo.
- M. I campioni per citologia in fase liquida SurePath devono essere scartati se nella fiala non è presente un dispositivo di prelievo.

#### Pertinenti al test

- N. Conservare i reagenti alle temperature specificate. L'uso di reagenti conservati in modo erraneo può influire sulle prestazioni del test.
- O. Evitare la contaminazione microbica e da ribonucleasi dei reagenti.
- P. Non usare il kit dopo la data di scadenza.
- Q. Non scambiare, mescolare o combinare reagenti o calibratori provenienti da kit con numeri di lotto diversi.
- R. I liquidi degli Aptima assay, i reagenti Auto Detect Aptima, il conservante liquido degli Aptima System (solo per Tigris DTS System) e i controlli dell'Aptima HPV assay (solo per Tigris DTS System) non fanno parte del lotto master; è possibile utilizzare qualsiasi lotto.
- S. Per ottenere risultati accurati del test, è necessaria una miscelazione accurata dei reagenti del test.
- T. Usare puntali con tappi idrofobi.
- U. Alcuni reagenti di questo kit riportano, sulle rispettive etichette, delle indicazioni di pericolo e dei simboli di sicurezza.

**Nota** - La comunicazione dei pericoli riflette le classificazioni usate nelle schede di sicurezza (SDS) europee. Per ottenere informazioni sulle indicazioni di pericolo specifiche per la regione di appartenenza, consultare la SDS specifica per tale regione nella libreria delle schede di sicurezza (Safety Data Sheet Library) all'indirizzo [www.hologicds.com](http://www.hologicds.com).

Indicazioni di pericolo UE	
	<p><b>Reagente di selezione</b> <b>ACIDO BORACICO 1 – 5%</b> <i>Idrossido di sodio &lt; 1%</i></p> <p><b>AVVERTENZA</b> H315 – Provoca irritazione cutanea H319 – Provoca grave irritazione oculare</p>

**Reagente di cattura del target****EDTA 1 – 5%**

H411 – Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata

P273 – Non disperdere nell'ambiente

P280 – Proteggere gli occhi/il viso

**Requisiti di conservazione e manipolazione dei reagenti**

Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza indicata sulle fiale. Di seguito sono riportate ulteriori istruzioni sulla conservazione.

A. Alla consegna, conservare i seguenti reagenti a 2 °C - 8 °C (in frigorifero):

Reagente di amplificazione HPV.

Reagente enzimatico HPV.

Reagente sonda HPV.

Reagente di controllo interno HPV.

Calibratori positivi e calibratori negativi HPV.

Controlli positivi e controlli negativi HPV (solo Tigris DTS System).

B. Conservare i seguenti reagenti a temperatura compresa tra 15 °C e 30 °C (temperatura ambiente):

Soluzione di ricostituzione per amplificazione HPV.

Soluzione di ricostituzione dell'enzima HPV.

Soluzione di ricostituzione della sonda HPV.

Reagente di cattura del target HPV.

Reagente di selezione HPV.

Soluzione di lavaggio.

Reagente oleoso.

Tampone per fluido di disattivazione.

Reagente Auto Detect 1.

Reagente Auto Detect 2.

Conservante del liquido dell'Aptima System (solo Tigris DTS System).

C. Dopo la ricostituzione, i seguenti reagenti sono stabili per 30 giorni se conservati a temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C:

Reagente di amplificazione HPV.

Reagente enzimatico HPV.

Reagente sonda HPV.

D. Il reagente di cattura del target di lavoro (Working Target Capture Reagent, wTCR) è stabile per 30 giorni se conservato a 15 °C – 30 °C. Non refrigerare.

E. Eliminare dopo 30 giorni o dopo la data di scadenza del lotto master (la prima delle due evenienze) tutti i reagenti ricostituiti e wTCR non utilizzati.

F. I reagenti dell'Aptima HPV assay sono stabili per un totale di 48 ore se conservati a bordo del Tigris DTS System.

- G. I reagenti dell'Aptima HPV assay sono stabili per un totale di 72 ore se conservati a bordo del Panther System.
- H. Il reagente sonda e il reagente sonda ricostituito sono fotosensibili. Conservare i reagenti al riparo dalla luce.
- I. Non congelare i reagenti.

## Raccolta e conservazione dei campioni

### A. Raccolta e trattamento dei campioni.

#### *Campioni per citologia in fase liquida ThinPrep:*

1. Raccogliere i campioni cervicali nelle fiale per Pap test ThinPrep contenenti la soluzione PreservCyt utilizzando uno spazzolino per prelievo endocervicale o un campionamento combinato con spatola e cytobrush in base alle istruzioni del produttore.
2. Prima o dopo il trattamento con il ThinPrep 2000 System, il ThinPrep 3000 System, ThinPrep 5000 Processor o ThinPrep 5000 Processor con Autoloader, trasferire 1 ml di campione per citologia in fase liquida ThinPrep in una provetta di trasferimento del campione Aptima in base alle istruzioni riportate nel foglietto illustrativo del kit di trasferimento dei campioni Aptima.

#### *Campioni per citologia in fase liquida SurePath:*

1. Raccogliere un campione per citologia in fase liquida SurePath seguendo le istruzioni per l'uso del Pap test SurePath e/o del PrepStain System.
2. Trasferire il campione per citologia in fase liquida SurePath all'interno di una provetta di trasferimento del campione Aptima secondo le istruzioni riportate nel foglietto illustrativo del kit di trasporto del campione Aptima.

#### *Campioni del kit di raccolta e trasporto di campioni cervicali Aptima.*

Raccogliere il campione seguendo le istruzioni per l'uso del kit CSCT Aptima.

### B. Trasporto e conservazione prima dell'analisi.

#### *Campioni per citologia in fase liquida ThinPrep:*

1. Trasportare i campioni per citologia in fase liquida ThinPrep a una temperatura compresa tra 2 °C e 30 °C.
2. I campioni devono essere trasferiti nelle provette di trasferimento dei campioni Aptima entro 105 giorni dalla data di raccolta.
3. Prima del trasferimento, i campioni per citologia in fase liquida ThinPrep devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 30 °C e non devono essere esposti per oltre 30 giorni a temperature superiori a 8 °C.
4. I campioni per citologia in fase liquida ThinPrep trasferiti in provette di trasferimento dei campioni Aptima possono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 30 °C per un massimo di 60 giorni.
5. Se si richiede un periodo di conservazione più lungo, il campione per citologia in fase liquida ThinPrep o il campione per citologia in fase liquida ThinPrep diluito nella provetta di trasferimento del campione può essere conservato a - 20 °C o a temperature inferiori per un massimo di 24 mesi.

#### *Campioni per citologia in fase liquida SurePath:*

1. Trasportare i campioni per citologia in fase liquida SurePath a una temperatura compresa tra 2 °C e 25 °C.

2. I campioni devono essere trasferiti nelle provette di trasferimento dei campioni Aptima entro 7 giorni dalla data di raccolta.
3. Prima del trasferimento, i campioni per citologia in fase liquida SurePath devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 25 °C.
4. I campioni per citologia in fase liquida SurePath trasferiti in provette di trasferimento dei campioni Aptima possono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 25 °C per un massimo di 7 giorni.

*Campioni del kit di raccolta e trasporto di campioni cervicali Aptima:*

1. Trasportare e conservare i campioni a 2 °C – 30 °C per un massimo di 60 giorni.
2. Se occorre conservarli più a lungo, i campioni del kit di trasporto possono essere conservati a - 20 °C o a temperature inferiori per un massimo di 24 mesi.

C. Trattamento dei campioni per citologia in fase liquida SurePath:

**Nota** - prima di essere analizzati con l'Aptima HPV assay, i campioni per citologia in fase liquida SurePath devono essere trattati con la soluzione di trasporto Aptima.

1. Soluzione di trasporto Aptima

I campioni trattati possono essere conservati tra 2 °C e 8 °C fino a 17 giorni prima di essere analizzati con l'Aptima HPV assay. Per ulteriori dettagli, consultare il foglietto illustrativo del kit di trasferimento dei campioni Aptima.

D. Conservazione dei campioni dopo l'analisi:

1. I campioni analizzati devono essere conservati su una rastrelliera, in posizione verticale.
2. Le provette dei campioni vanno coperte con una barriera di plastica o di alluminio nuova e pulita.
3. Se i campioni analizzati devono essere congelati o spediti, rimuovere i tappi perforabili dalle provette dei campioni e sostituirli con nuovi tappi non perforabili. Se i campioni devono essere spediti per essere sottoposti ad analisi in un'altra struttura, occorre mantenere le temperature specificate. Prima di togliere i tappi dalle provette dei campioni precedentemente analizzati, occorre centrifugare le provette per 5 minuti ad una forza centrifuga relativa (Relative Centrifugal Force, RCF) di 420 per far scendere tutto il liquido sul fondo della provetta.

**Nota** - La spedizione dei campioni deve essere effettuata in conformità ai regolamenti applicabili relativi al trasporto nazionale e internazionale.



## Tigris DTS System

Sono elencati di seguito i reagenti dell'Aptima HPV assay per il Tigris DTS System. Accanto al nome di ciascun reagente è indicato anche il rispettivo simbolo identificativo.

### Reagenti e materiali forniti

Kit per l'Aptima HPV assay, 250 test, n. di cat, 302611 (4 scatole).

I calibratori e i controlli possono essere acquistati separatamente. Vedere sotto i numeri di parte delle scatole individuali.

#### Scatola refrigerata Aptima HPV (alla consegna, conservare a 2 °C – 8 °C)

Simbolo	Componente	Quantità
<b>A</b>	<b>Reagente di amplificazione HPV</b> <i>Acidi nucleici non infettivi liofilizzati in soluzione tamponata contenente &lt; 5% di agente di riempimento.</i>	1 fiala
<b>E</b>	<b>Reagente enzimatico HPV</b> <i>Trascrittasi inversa e RNA polimerasi liofilizzate in soluzione tamponata HEPES contenente &lt; 10% di reagente di riempimento.</i>	1 fiala
<b>P</b>	<b>Reagente sonda HPV</b> <i>Sonde di DNA non infettive chemiluminescenti (&lt; 500 ng/fiala) liofilizzate in soluzione tampone succinato contenente &lt; 5% di detergente.</i>	1 fiala
<b>IC</b>	<b>Reagente di controllo interno HPV</b> <i>Trascritto di RNA non infettivo in soluzione tamponata contenente &lt; 5% di detergente.</i>	1 fiala

#### Scatola a temperatura ambiente Aptima HPV (alla consegna, conservare a 15 °C – 30 °C)

Simbolo	Componente	Quantità
<b>AR</b>	<b>Soluzione di ricostituzione per amplificazione HPV</b> <i>Soluzione acquosa contenente conservanti.</i>	1 fiala
<b>ER</b>	<b>Soluzione di ricostituzione dell'enzima HPV</b> <i>Soluzione tamponata con HEPES contenente un tensioattivo e glicerolo.</i>	1 fiala
<b>PR</b>	<b>Soluzione di ricostituzione della sonda HPV</b> <i>Soluzione tamponata con succinato contenente &lt; 5% di detergente.</i>	1 fiala
<b>S</b>	<b>Reagente di selezione HPV</b> <i>600 mM di soluzione tamponata con borato contenente tensioattivo.</i>	1 fiala
<b>TCR</b>	<b>Reagente di cattura del target HPV</b> <i>Acido nucleico non infettivo in soluzione tamponata contenente una fase solida (&lt; 0,5 mg/ml).</i>	1 fiala
	<b>Collari per ricostituzione</b>	3
	<b>Foglio dei codici a barre dei lotti master</b>	1 foglio

**Scatola di calibratori HPV Aptima (N. cat. 302554)**  
(alla consegna, conservare a 2 °C – 8 °C)

Simbolo	Componente	Quantità
<b>PCAL</b>	<b>Calibratore positivo HPV</b> <i>Trascritto in vitro di HPV 16 non infettivo, in concentrazione di 1.000 copie per ml, in soluzione tamponata contenente &lt; 5% di detergente.</i>	5 fiale
<b>NCAL</b>	<b>Calibratore negativo HPV</b> <i>Soluzione tamponata contenente &lt; 5% di detergente.</i>	5 fiale

**Scatola di controlli HPV Aptima (N. cat. 302556)**  
(alla consegna, conservare a 2 °C – 8 °C)

Simbolo	Componente	Quantità
<b>PC</b>	<b>Controllo positivo HPV</b> <i>Cellule in coltura HPV-positive e HPV-negative, lisate, disattivate, in concentrazione di 25 cellule per ml, in soluzione tamponata contenente &lt; 5% di detergente.</i>	5 fiale
<b>NC</b>	<b>Controllo negativo HPV</b> <i>Cellule in coltura HPV-negative, lisate, disattivate, in una soluzione tamponata contenente &lt; 5% di detergente.</i>	5 fiale

**Materiali richiesti ma disponibili separatamente**

**Nota** - Salvo altrimenti specificato, per i materiali disponibili presso Hologic sono indicati i rispettivi numeri di catalogo.

	<u>N. di cat.</u>
Tigris DTS System	105118
Kit di liquidi per l'Aptima assay <i>(soluzione di lavaggio Aptima, tampone per liquido di disattivazione Aptima e reagente oleoso Aptima)</i>	302382
Kit Auto Detect Aptima	301048
Kit del conservante per il liquido dell'Aptima System)	302380
Puntali, 1.000 µl conduttivi, rilevatori di liquido	10612513 (Tecan)
Kit di analisi del Tigris DTS System	301191
<i>Unità multiprovette (Multi-Tube Unit, MTU)</i>	104772-02
<i>Sacca dei puntali delle MTU da smaltire</i>	900907
<i>Deflettori di rifiuti delle MTU</i>	900931
<i>Coperchi dei rifiuti delle MTU</i>	105523
Kit di trasferimento dei campioni Aptima	301154C
Kit di raccolta e trasporto di campioni cervicali Aptima	302657
Tappi perforabili Aptima	105668
Tappi non perforabili di ricambio	103036A
Tappi di ricambio per le soluzioni di ricostituzione dei reagenti sonda e di amplificazione	CL0041
Tappi di ricambio per la soluzione di ricostituzione del reagente enzimatico	501616
Tappi di ricambio per il reagente di selezione e il TCR	CL0040
Candeggina (soluzione di ipoclorito di sodio, al 5% o 0,7 M minimo)	—

Acqua per il Tigris DTS System <i>consultare il Tigris DTS System Operator's Manual (Manuale d'uso del Tigris DTS System) per i dati tecnici</i>	—
Guanti monouso	—
Kit soluzione di trasporto Aptima (solo per i campioni SurePath)	303658

## Materiali opzionali

	<u>N. di cat.</u>
Potenziatore di candeggina per pulizia	302101

## Procedura di analisi con il Tigris DTS System

**Nota** - Consultare il *Tigris DTS System Operator's Manual (Manuale d'uso del Tigris DTS System)* per ulteriori informazioni procedurali su questo sistema.

### A. Preparazione dell'area di lavoro.

Pulire le superfici di lavoro dove verranno preparati i reagenti. Passare sulle superfici di lavoro e sui pipettatori una soluzione di ipoclorito di sodio al 2,5% - 3,5% (da 0,35 M a 0,5 M). Lasciare la candeggina a contatto con le superfici per almeno 1 minuto, quindi risciacquare con acqua. Non lasciare asciugare la soluzione di ipoclorito di sodio. Coprire la superficie del banco sul quale verranno preparati i reagenti con teli da banco di laboratorio puliti, assorbenti e plastificati.

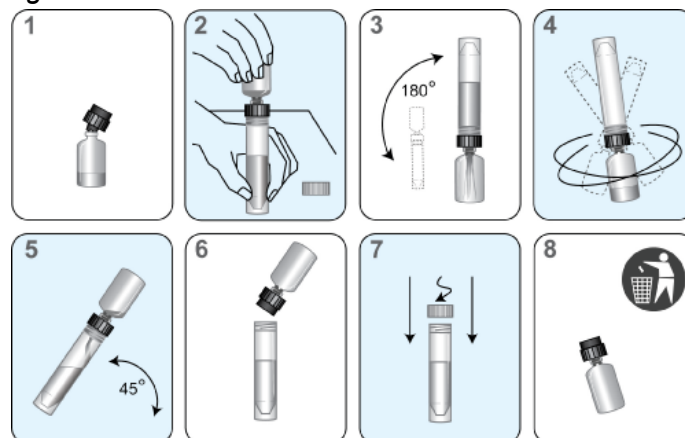
### B. Preparazione del reagente di un nuovo kit.

**Nota** - La ricostituzione dei reagenti deve essere eseguita prima di iniziare qualsiasi lavoro sul Tigris DTS System.

1. Per ricostituire i reagenti di amplificazione, enzimatico e sonda, unire il contenuto dei flaconi di reagente liofilizzato alla soluzione di ricostituzione. Se le soluzioni di ricostituzione sono state refrigerate, prima dell'uso lasciare che raggiungano la temperatura ambiente.
  - a. Abbinare ciascuna soluzione di ricostituzione al rispettivo reagente liofilizzato. Prima di fissare il collare di ricostituzione, assicurarsi che la soluzione di ricostituzione e il reagente presentino etichette di colore uguale.
  - b. Controllare i numeri di lotto sul foglio dei codici a barre dei lotti master per assicurarsi di abbinare i reagenti appropriati.
  - c. Aprire la fiala di reagente liofilizzato e inserire l'estremità indentata del collare di ricostituzione nell'apertura della fiala (Figura 1, Passaggio 1).
  - d. Aprire il flacone di soluzione di ricostituzione corrispondente e disporre il tappo su una superficie di lavoro pulita e coperta.
  - e. Tenendo sul banco il flacone della soluzione, inserire l'altra estremità del collare di ricostituzione nell'apertura del flacone (Figura 1, Passaggio 2).
  - f. Capovolgere lentamente i flaconi collegati. Far scendere la soluzione dal flacone di ricostituzione nella fiala di vetro del reagente (Figura 1, Passaggio 3).
  - g. Agitare roteando delicatamente la soluzione nel flacone per miscelarla con cura. Evitare di creare schiuma durante questa fase (Figura 1, Passaggio 4).
  - h. Attendere che il reagente liofilizzato si dissolva nella soluzione, quindi capovolgere di nuovo i flaconi collegati tra loro, mantenendo un'inclinazione di 45° per ridurre al minimo la formazione di schiuma (Figura 1, Passaggio 5). Lasciare che tutto il liquido ritorni nel flacone di plastica.

- i. Rimuovere il collare di ricostituzione e la fiala di vetro (Figura 1, Passaggio 6).
- j. Rimettere il tappo sul flacone di plastica. Annotare le iniziali dell'operatore e la data di ricostituzione sulle fiale di reagente ricostituito (Figura 1, Passaggio 7).
- k. Gettare il collare di ricostituzione e la fiala di vetro (Figura 1, Passaggio 8).

**Avvertenza - Evitare la formazione di schiuma durante la ricostituzione dei reagenti. La schiuma pregiudica la sensibilità di rilevamento dei livelli nel Tigris DTS System.**



**Figura 1. Processo di ricostituzione con il Tigris DTS System**

2. Preparare il reagente di cattura del target di lavoro (working Target Capture Reagent, wTCR).
  - a. Abbinare i flaconi di TCR e di IC.
  - b. Controllare i numeri di lotto dei reagenti sul foglio dei codici a barre dei lotti master per assicurarsi di abbinare i reagenti appropriati.
  - c. Aprire il flacone di TCR e disporre il tappo su una superficie di lavoro pulita e coperta.
  - d. Togliere il tappo dal flacone di IC e versare l'intero contenuto nel flacone di TCR. E' normale che nel flacone di controllo interno resti una piccola quantità di liquido.
  - e. Chiudere con il tappo il flacone di TCR e roteare con attenzione la soluzione per miscelare il contenuto. Evitare la formazione di schiuma durante questo passaggio.
  - f. Registrare sull'etichetta le iniziali dell'operatore e la data corrente.
  - g. Eliminare il flacone e il tappo dell'IC.
  - h. Nel wTCR può formarsi del precipitato che potrebbe produrre risultati non validi a causa di errori di verifica del volume. Il precipitato può essere dissolto riscaldando il wTCR a 42 °C - 60 °C per un massimo di 90 minuti. Prima di usare il wTCR, lasciare che raggiunga la temperatura ambiente. Non utilizzare se il precipitato persiste.
3. Preparare il reagente di selezione:
  - a. Verificare il numero di lotto del reagente sul foglio dei codici a barre dei lotti master per assicurarsi che appartenga al kit.
  - b. Se il reagente di selezione contiene del precipitato, riscaldarlo a 60 °C ± 1 °C per un massimo di 45 minuti per facilitare la dissoluzione del precipitato. Miscelare con attenzione il flacone ogni 5 - 10 minuti. Prima di usare il reagente di selezione, lasciare che raggiunga la temperatura ambiente. Non usarlo se persistono precipitato o torbidità.

**Nota - Miscelare accuratamente tutti i reagenti capovolgendoli con attenzione prima di caricarli sul sistema. Evitare la formazione di schiuma quando si capovolgono i reagenti.**

## C. Preparazione di reagenti precedentemente ricostituiti:

1. I reagenti sonda, di amplificazione ed enzimatico precedentemente ricostituiti devono essere portati a temperatura ambiente (temperatura compresa tra 15 °C e 30 °C) prima di iniziare il test.
2. Se il reagente sonda contiene precipitato che non ritorna in soluzione a temperatura ambiente, riscaldare a non oltre 60 °C per 1 – 2 minuti. Non usare il reagente se sono presenti precipitato o torbidità.
3. Se il wTCR contiene precipitato, riscaldarlo a 42 °C – 60 °C fino a 90 minuti. Prima di usare il wTCR, lasciare che raggiunga la temperatura ambiente. Non utilizzare se il precipitato persiste.
4. Se il reagente di selezione contiene del precipitato, riscaldarlo a 60 °C ± 1 °C per un massimo di 45 minuti per facilitare la dissoluzione del precipitato. Miscelare con attenzione il flacone ogni 5 - 10 minuti. Prima di usare il reagente di selezione, lasciare che raggiunga la temperatura ambiente. Non usarlo se persistono precipitato o torbidità.
5. Miscelare accuratamente ciascun reagente capovolgendolo con attenzione prima di caricarlo sul sistema. Evitare la formazione di schiuma quando si capovolgono i reagenti.
6. Non riempire al massimo i flaconi dei reagenti. Il Tigris DTS System riconosce e rifiuta i flaconi riempiti al massimo.

## D. Manipolazione dei campioni:

1. Prima dell'analisi, lasciare che i calibratori, i controlli e i campioni raggiungano la temperatura ambiente.
2. **Non mettere i campioni sul vortex.**
3. I campioni per citologia in fase liquida SurePath devono essere trattati con proteinasi K prima di essere analizzati con l'Aptima HPV assay in base alle istruzioni riportate nel paragrafo *Raccolta e conservazione dei campioni* Sezione C.
4. Ispezionare le provette dei campioni prima di caricarle sulla rastrelliera. Se una provetta del campione contiene delle bolle o presenta un volume inferiore a quello tipicamente osservato, centrifugarla per 5 minuti a 420 RCF per assicurarsi che non ci sia del liquido nel tappo.

**Nota** - La mancata osservanza del passaggio 4 potrebbe determinare un traboccamento di liquido dal tappo della provetta del campione.

## E. Preparazione del sistema.

Impostare lo strumento e la lista di lavoro seguendo le istruzioni contenute nel *Tigris DTS System Operator's Manual* (Manuale d'uso del Tigris DTS System) e nella sezione *Note procedurali* qui sotto.

## Note procedurali

### A. Calibratori:

1. Ciascuna lista di lavoro deve contenere 3 replicati del calibratore negativo e del calibratore positivo. Perché possa funzionare correttamente con il software dell'Aptima HPV assay, il calibratore negativo deve trovarsi nella prima posizione di provette della prima rastrelliera della lista di lavoro, e il calibratore positivo deve trovarsi nella seconda posizione di provette della prima rastrelliera della lista di lavoro.
2. Se si tenta di pipettare più di tre replicati da una provetta di calibratore, è possibile che si verifichino errori di volume insufficiente.

### B. Controlli:

1. Il software dell'Aptima HPV assay richiede che i controlli della sessione analitica vengano eseguiti dall'inizio alla fine. Il controllo negativo deve trovarsi nella terza posizione di provette della prima rastrelliera e nella penultima posizione di provette dell'ultima rastrelliera della lista di lavoro. Il controllo positivo deve trovarsi nella quarta posizione di provette della prima rastrelliera e nell'ultima posizione di provette dell'ultima rastrelliera della lista di lavoro.
2. Se si tenta di pipettare più di una volta da una provetta di controllo, è possibile che si verifichino errori di volume insufficiente.

### C. Temperatura.

Per temperatura ambiente si intende un range di temperatura da 15 a 30 °C.

### D. Talco dei guanti.

Come in qualsiasi sistema di reazione, il talco eccessivo in alcuni guanti può causare la contaminazione di provette aperte. Si consigliano guanti privi di talco.

## Panther System

Sono elencati di seguito i reagenti dell'Aptima HPV assay per il Panther System. Accanto al nome di ciascun reagente è indicato anche il rispettivo simbolo identificativo.

### Reagenti e materiali forniti

**Aptima HPV assay**, 250 test, n. di cat. 303093 (3 scatole).

**Aptima HPV assay**, 100 test, n. di cat. 302929 (3 scatole).

I calibratori possono essere acquistati separatamente. Vedere qui di seguito i singoli numeri di catalogo.

#### Scatola refrigerata Aptima HPV (alla consegna, conservare a 2 °C – 8 °C)

Simbolo	Componente	Quantità
<b>A</b>	<b>Reagente di amplificazione HPV</b> <i>Acidi nucleici non infettivi liofilizzati in soluzione tamponata contenente &lt; 5% di agente di riempimento.</i>	1 fiala
<b>E</b>	<b>Reagente enzimatico HPV</b> <i>Trascrittasi inversa e RNA polimerasi liofilizzate in soluzione tamponata HEPES contenente &lt; 10% di reagente di riempimento.</i>	1 fiala
<b>P</b>	<b>Reagente sonda HPV</b> <i>Sonde di DNA non infettive chemiluminescenti (&lt; 500 ng/fiala) liofilizzate in soluzione tampone succinato contenente &lt; 5% di detergente.</i>	1 fiala
<b>IC</b>	<b>Reagente di controllo interno HPV</b> <i>Trascritto di RNA non infettivo in soluzione tamponata contenente &lt; 5% di detergente.</i>	1 fiala

#### Scatola a temperatura ambiente Aptima HPV (alla consegna, conservare a temperatura ambiente compresa fra 15 °C e 30 °C)

Simbolo	Componente	Quantità
<b>AR</b>	<b>Soluzione di ricostituzione per amplificazione HPV</b> <i>Soluzione acquosa contenente conservanti.</i>	1
<b>ER</b>	<b>Soluzione di ricostituzione dell'enzima HPV</b> <i>Soluzione tamponata con HEPES contenente un tensioattivo e glicerolo.</i>	1
<b>PR</b>	<b>Soluzione di ricostituzione della sonda HPV</b> <i>Soluzione tamponata con succinato contenente &lt; 5% di detergente.</i>	1
<b>S</b>	<b>Reagente di selezione HPV</b> <i>600 mM di soluzione tamponata con borato contenente tensioattivo.</i>	1
<b>TCR</b>	<b>Reagente di cattura del target HPV</b> <i>Acido nucleico non infettivo in soluzione tamponata contenente una fase solida (&lt; 0,5 mg/ml).</i>	1
	<b>Collari per ricostituzione</b>	3
	<b>Foglio dei codici a barre dei lotti master</b>	1 foglio

**Scatola di calibratori HPV Aptima (N. cat. 302554)**  
(alla consegna, conservare a 2 °C – 8 °C)

Simbolo	Componente	Quantità
PCAL	<b>Calibratore positivo HPV</b> <i>Trascritto in vitro di HPV 16 non infettivo, in concentrazione di 1.000 copie per ml, in soluzione tamponata contenente &lt; 5% di detergente.</i>	5 fiale
NCAL	<b>Calibratore negativo HPV</b> <i>Soluzione tamponata contenente &lt; 5% di detergente.</i>	5 fiale

### Materiali richiesti ma disponibili separatamente

**Nota** - Salvo altrimenti specificato, per i materiali disponibili presso Hologic sono indicati i rispettivi numeri di catalogo.

	<u>N. di cat.</u>
Panther System	303095
Kit procedurale Panther	303096
<i>Kit di liquidi per l'Aptima assay</i>	303014
<i>(soluzione di lavaggio Aptima, tampone per liquido di disattivazione Aptima e reagente oleoso Aptima)</i>	
<i>Kit Auto Detect Aptima</i>	303013
<i>Unità multiprovetta (Multi-tube Unit, MTU)</i>	104772-02
<i>Kit dei sacchi di rifiuti Panther</i>	902731
<i>Coperchio del contenitore dei rifiuti Panther</i>	504405
Puntali, 1.000 µl conduttivi, rilevatori di liquido	10612513 (Tecan)
Kit di trasferimento dei campioni Aptima	301154C
Kit di raccolta e trasporto di campioni cervicali Aptima	302657
Tappi perforabili Aptima	105668
Tappi non perforabili di ricambio	103036A
Tappi di ricambio per kit da 250 test:	
<i>Soluzioni di ricostituzione per reagente di amplificazione e reagente sonda</i>	CL0041
<i>Soluzione di ricostituzione per reagente enzimatico</i>	501616
<i>TCR e reagente di selezione</i>	CL0040
Tappi di ricambio per kit da 100 test:	
<i>Soluzioni di ricostituzione per reagente di amplificazione e reagente sonda</i>	CL0041
<i>Soluzione di ricostituzione per reagente enzimatico</i>	CL0041
<i>TCR e reagente di selezione</i>	501604
Candeggina (soluzione di ipoclorito di sodio, al 5% o 0,7 M minimo)	—
Guanti monouso	—
Kit soluzione di trasporto Aptima (solo per i campioni SurePath)	303658

### Materiali opzionali

	<u>N. di cat.</u>
Potenziatore di candeggina per pulizia	302101



## Procedura di analisi con il Panther System

**Nota** - Per ulteriori informazioni sulla procedura con il Panther System, vedere il Panther System Operator's Manual (Manuale d'uso del Panther System).

### A. Preparazione dell'area di lavoro.

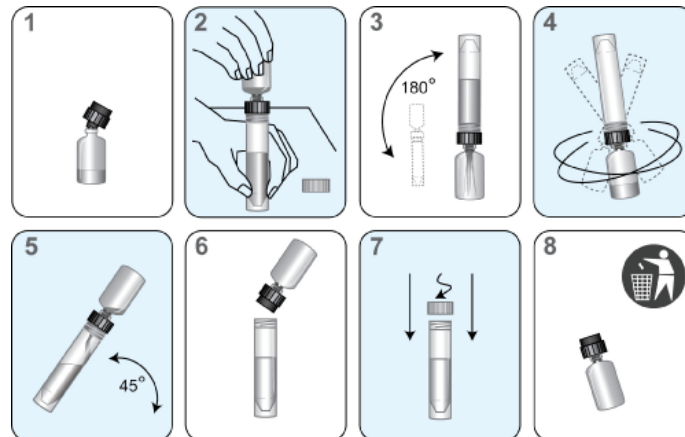
Pulire le superfici di lavoro dove verranno preparati i reagenti. Passare sulle superfici di lavoro e sui pipettatori una soluzione di ipoclorito di sodio al 2,5% - 3,5% (da 0,35 M a 0,5 M). Lasciare la candeggina a contatto con le superfici per almeno 1 minuto, quindi risciacquare con acqua. Non lasciare asciugare la soluzione di ipoclorito di sodio. Coprire la superficie del banco sul quale verranno preparati i reagenti con teli da banco di laboratorio puliti, assorbenti e plastificati.

### B. Preparazione del reagente di un nuovo kit.

**Nota** - Eseguire la ricostituzione dei reagenti prima di iniziare qualsiasi lavoro sul Panther System.

1. Per ricostituire i reagenti di amplificazione, enzimatico e sonda, unire il contenuto dei flaconi di reagente liofilizzato alla soluzione di ricostituzione. Se le soluzioni di ricostituzione sono state refrigerate, prima dell'uso lasciare che raggiungano la temperatura ambiente.
  - a. Abbinare ciascuna soluzione di ricostituzione al rispettivo reagente liofilizzato. Prima di collegare il collare di ricostituzione, assicurarsi che le etichette della soluzione di ricostituzione e del reagente siano dello stesso colore.
  - b. Controllare i numeri di lotto sul foglio dei codici a barre dei lotti master per assicurarsi di abbinare i reagenti appropriati.
  - c. Aprire la fiala di reagente liofilizzato e inserire l'estremità indentata del collare di ricostituzione nell'apertura della fiala (Figura 2, Passaggio 1).
  - d. Aprire il flacone di soluzione di ricostituzione corrispondente e disporre il tappo su una superficie di lavoro pulita e coperta.
  - e. Tenendo il flacone della soluzione di ricostituzione sul banco, inserire con fermezza l'altra estremità del collare di ricostituzione nell'apertura del flacone (Figura 2, Passaggio 2).
  - f. Capovolgere lentamente i flaconi collegati. Far scendere la soluzione dal flacone di ricostituzione nella fiala di vetro del reagente (Figura 2, Passaggio 3).
  - g. Agitare roteando delicatamente la soluzione nel flacone per miscelarla con cura. Evitare di creare schiuma durante questa fase (Figura 2, Passaggio 4).
  - h. Attendere che il reagente liofilizzato si dissolva nella soluzione, quindi capovolgere di nuovo i flaconi collegati tra loro, mantenendo un'inclinazione di 45° per ridurre al minimo la formazione di schiuma (Figura 2, Passaggio 5). Lasciare che tutto il liquido ritorni nel flacone di plastica.
  - i. Rimuovere il collare di ricostituzione e la fiala di vetro (Figura 2, Passaggio 6).
  - j. Rimettere il tappo sul flacone di plastica. Annotare le iniziali dell'operatore e la data di ricostituzione sulle fiale di reagente ricostituito (Figura 2, Passaggio 7).
  - k. Gettare sia il collare di ricostituzione che la fiala (Figura 2, Passaggio 8).

**Avvertenza** - Evitare la formazione di schiuma durante la ricostituzione dei reagenti. La schiuma pregiudica il meccanismo di rilevamento del livello di liquido nel Panther System.



**Figura 2. Procedimento di ricostituzione del Panther System**

2. Preparare il reagente di cattura del target di lavoro (working Target Capture Reagent, wTCR).
  - a. Abbinare i flaconi di TCR e di IC.
  - b. Controllare i numeri di lotto dei reagenti sul foglio dei codici a barre dei lotti master per assicurarsi di abbinare i reagenti appropriati.
  - c. Aprire il flacone di TCR e disporre il tappo su una superficie di lavoro pulita e coperta.
  - d. Togliere il tappo dal flacone di IC e versare l'intero contenuto nel flacone di TCR. E' normale che nel flacone di controllo interno resti una piccola quantità di liquido.
  - e. Chiudere con il tappo il flacone di TCR e roteare con attenzione la soluzione per miscelare il contenuto. Evitare la formazione di schiuma durante questo passaggio.
  - f. Registrare sull'etichetta le iniziali dell'operatore e la data corrente.
  - g. Eliminare il flacone e il tappo dell'IC.
  - h. Nel wTCR può formarsi del precipitato che potrebbe produrre risultati non validi a causa di errori di verifica del volume. Il precipitato può essere dissolto riscaldando il wTCR a 42 °C - 60 °C per un massimo di 90 minuti. Prima di usare il wTCR, lasciare che raggiunga la temperatura ambiente. Non utilizzare se il precipitato persiste.
3. Preparare il reagente di selezione:
  - a. Verificare il numero di lotto del reagente sul foglio dei codici a barre dei lotti master per assicurarsi che appartenga al kit.
  - b. Se il reagente di selezione contiene del precipitato, riscaldarlo a 60 °C ± 1 °C per un massimo di 45 minuti per facilitare la dissoluzione del precipitato. Miscelare con attenzione il flacone ogni 5 - 10 minuti. Prima di usare il reagente di selezione, lasciare che raggiunga la temperatura ambiente. Non usarlo se persistono precipitato o torbidità.

**Nota** - Miscelare accuratamente tutti i reagenti capovolgendoli con attenzione prima di caricarli sul sistema. Evitare la formazione di schiuma quando si capovolgono i reagenti.

## C. Preparazione di reagenti precedentemente ricostituiti:

1. I reagenti sonda, di amplificazione ed enzimatico precedentemente ricostituiti devono essere portati a temperatura ambiente (temperatura compresa tra 15°C e 30 °C) prima di iniziare il test.
2. Se il reagente sonda contiene precipitato che non ritorna in soluzione a temperatura ambiente, riscaldare a non oltre 60 °C per 1 – 2 minuti. Non usare il reagente se sono presenti precipitato o torbidità.
3. Se il wTCR contiene precipitato, riscaldarlo a 42 °C – 60 °C fino a 90 minuti. Prima di usare il wTCR, lasciare che raggiunga la temperatura ambiente. Non utilizzare se il precipitato persiste.
4. Se il reagente di selezione contiene del precipitato, riscaldarlo a 60 °C ± 1 °C per un massimo di 45 minuti per facilitare la dissoluzione del precipitato. Miscelare con attenzione il flacone ogni 5 - 10 minuti. Prima di usare il reagente di selezione, lasciare che raggiunga la temperatura ambiente. Non usarlo se persistono precipitato o torbidità.
5. Miscelare accuratamente ciascun reagente capovolgendolo con attenzione prima di caricarlo sul sistema. Evitare la formazione di schiuma quando si capovolgono i reagenti.
6. Non riempire al massimo i flaconi dei reagenti. Il Panther System riconosce e rifiuta i flaconi riempiti al massimo.

## D. Manipolazione dei campioni:

1. Prima dell'analisi, lasciare che i calibratori e i campioni raggiungano la temperatura ambiente.
2. **Non mettere i campioni nel vortex.**
3. Ispezionare le provette dei campioni prima di caricarle sulla rastrelliera. Se una provetta del campione contiene delle bolle o presenta un volume inferiore a quello tipicamente osservato, centrifugarla per 5 minuti a 420 RCF per assicurarsi che non ci sia del liquido nel tappo.

**Nota** - La mancata osservanza del passaggio 3 potrebbe determinare un traboccamento di liquido dal tappo della provetta del campione.

## E. Preparazione del sistema:

1. Impostare il sistema secondo le istruzioni contenute nel *Panther System Operator's Manual* (Manuale d'uso del Panther System) e nella sezione *Note procedurali* qui di seguito. Assicurarsi di utilizzare rastrelliere reagenti e adattatori TCR di dimensioni appropriate.
2. Caricare i campioni.

**Note procedurali**

## A. Calibratori:

1. Per funzionare correttamente il software dell'Aptima HPV assay sul Panther System, sono necessari tre replicati di calibratore positivo e tre replicati di calibratore negativo. È possibile caricare una fiala di ciascun calibratore in qualsiasi posizione della rastrelliera situata in qualunque corsia dello scomparto dei campioni sul Panther System. Il pipettaggio dei campioni inizierà una volta soddisfatte le due seguenti condizioni:
  - a. Il sistema sta eseguendo l'elaborazione di un calibratore positivo e di un calibratore negativo.
  - b. Il sistema ha registrato risultati validi per i calibratori.

2. Una volta che le provette di calibratore sono state pipettate e sono in corso di elaborazione per un particolare kit di reagenti, è possibile analizzare i campioni con il kit di reagenti del test associato per un periodo di 24 ore, eccetto nei seguenti casi.
    - a. I calibratori non sono validi.
    - b. Il kit di reagenti del test associato viene rimosso dal sistema.
    - c. Il kit di reagenti del test associato ha superato i limiti di stabilità.
  3. Se si tenta di pipettare più di tre replicati da una provetta di calibratore, è possibile che si verifichino errori di elaborazione.
- B. Temperatura.  
Per temperatura ambiente si intende un range di temperatura da 15 a 30 °C.
- C. Talco dei guanti.  
Come in qualsiasi sistema di reazione, il talco eccessivo in alcuni guanti può causare la contaminazione di provette aperte. Si consigliano guanti privi di talco.

## Procedure di controllo qualità

### A. Criteri di validità della sessione analitica.

Il software stabilisce automaticamente la validità della sessione analitica. Il software considera non valida una sessione analitica se si verifica una qualsiasi delle seguenti condizioni.

- Più di un replicato di calibratore negativo non valido.
- Più di un replicato di calibratore positivo non valido.
- Un controllo negativo non valido (solo per Tigris DTS System).
- Un controllo positivo non valido (solo per Tigris DTS System).

Una sessione analitica può essere considerata non valida da un operatore se si osservano e si documentano durante il test difficoltà tecniche, dell'operatore o dello strumento.

Una sessione analitica non valida deve essere ripetuta. Le sessioni analitiche interrotte devono essere ripetute.

### B. Criteri di accettazione dei calibratori.

La tabella qui sotto definisce i criteri RLU per i replicati dei calibratori negativo e positivo.

<b>Calibratore negativo</b>	Analita	$Fra \geq 0 \text{ e } \leq 45.000 \text{ RLU}$
	IC	$Fra \geq 75.000 \text{ e } \leq 400.000 \text{ RLU}$
<b>Calibratore positivo</b>	Analita	$\geq 480.000 \text{ e } \leq 1.850.000 \text{ RLU}$
	IC	$\leq 450.000 \text{ RLU}$

### C. Calcolo del cutoff dell'IC.

Il cutoff dell'IC viene determinato in base al segnale dell'IC ("flash") proveniente dai replicati validi del calibratore negativo.

$$\text{Cutoff IC} = 0,5 \times [\text{RLU media dell'IC dei replicati validi del calibratore negativo}]$$

### D. Calcolo del cutoff dell'analita.

Il cutoff dell'analita viene determinato in base al segnale dell'analita ("glow") proveniente dai replicati validi del calibratore negativo, nonché in base al segnale dell'analita proveniente dai replicati validi del calibratore positivo

$$\text{Cutoff analita} = \frac{[\text{RLU media dell'analita dei replicati validi del calibratore negativo}] + [0,09 \times \text{RLU media dell'analita dei replicati validi del calibratore positivo}]}{2}$$

### E. Calcolo del rapporto segnale/cutoff analita (S/CO).

Il rapporto S/CO analita è determinato dall'RLU dell'analita del campione di analisi e dal cutoff dell'analita per la sessione analitica.

$$\text{S/CO analita} = \frac{\text{RLU dell'analita del campione di analisi}}{\text{Cutoff analita}}$$

### F. Criteri di accettazione dei controlli (solo per Tigris DTS System).

Il controllo negativo deve avere un risultato negativo valido (RLU IC  $\geq$  cutoff IC e S/CO analita  $<$  0,50). Il controllo positivo deve avere un risultato positivo valido (S/CO analita  $\geq$  0,50).

## Interpretazione del test

I risultati del test vengono determinati automaticamente dal software del test. Un risultato del test deve essere negativo, positivo o non valido in base a quanto determinato dall'RLU dell'IC e dal rapporto S/CO per l'analita. Un risultato del test può anche essere non valido a causa di altri parametri (forma della curva cinetica anomala) che si trovano al di fuori dei range normali previsti. I risultati iniziali non validi vanno ripetuti.

I campioni prelevati con il kit CSCT Aptima possono essere diluiti per eliminare gli effetti di eventuali sostanze inibitrici. Diluire 1 parte del campione non valido in 8 parti di mezzi di trasporto dei campioni (la soluzione nelle provette dei kit di CSCT); es. 560 µl di campione in una nuova provetta del kit di CSCT contenente 4,5 ml di mezzi di trasporto dei campioni. Capovolgere con attenzione il campione per miscelarlo, evitando di creare schiuma. Analizzare il campione diluito secondo la procedura standard del test.

**Nota** - Per analizzare un'aliquota di campione è necessario un volume minimo di 1,7 ml. Non diluire un campione diluito non valido. Se un campione diluito produce un risultato non valido, occorre ottenere un nuovo campione dal paziente.

<b>Risultato dell'Aptima HPV Assay</b>	<b>Criteri</b>
<b>Negativo</b>	<i>S/CO analita &lt; 0,50 IC ≥ Cutoff IC IC ≤ 2.000.000 RLU</i>
<b>Positivo</b>	<i>S/CO analita ≥ 0,50 IC ≤ 2.000.000 RLU Analita ≤ 13.000.000 RLU</i>
<b>Non valido</b>	<i>IC &gt; 2.000.000 RLU oppure S/CO analita &lt; 0,50 e IC &lt; cutoff IC oppure Analita &gt; 13.000.000 RLU</i>

## Limiti

- A. I tipi di campioni diversi da quelli identificati nell'uso previsto non sono stati valutati.
- B. Le prestazioni dell'Aptima HPV assay non sono state valutate per i soggetti vaccinati contro l'HPV.
- C. L'Aptima HPV assay non è stato valutato nei casi di sospetto abuso sessuale.
- D. La prevalenza dell'infezione da HPV in una popolazione può influire sulle prestazioni del test. I valori predittivi positivi diminuiscono quanto vengono testate popolazioni con bassa prevalenza o individui non a rischio di infezione.
- E. I campioni per citologia in fase liquida ThinPrep che contengono meno di 1 ml dopo la preparazione del vetrino per Pap test ThinPrep vengono considerati inadeguati per l'Aptima HPV assay.
- F. La rimozione di 1 ml di campione per citologia in fase liquida SurePath prima dell'analisi citologica non è stata valutata relativamente all'impatto sul risultato citologico.
- G. La raccolta, la conservazione o il trattamento dei campioni effettuati in modo inadeguato possono influire sui risultati del test.
- H. Il controllo interno serve a monitorare le fasi del test di cattura del target, amplificazione e rilevamento, non a controllare l'adeguatezza del prelievo cervicale.
- I. Un risultato negativo dell'Aptima HPV assay non esclude la possibilità di anomalie citologiche o di CIN2, CIN3 futura o latente, o di cancro.
- J. Lubrificanti intimi contenenti poliquaternio 15 possono interferire con le prestazioni del test quando sono presenti in concentrazioni superiori allo 0,025% (v/v o p/v) di un campione di analisi.
- K. Farmaci antifungini contenenti tioconazolo possono interferire con le prestazioni del test quando sono presenti in concentrazioni superiori allo 0,075% (p/v) di un campione di analisi.
- L. L'Aptima HPV assay fornisce risultati qualitativi. Non può quindi essere tracciata una correlazione fra l'intensità di un segnale positivo del test e il livello di espressione di mRNA in un campione.
- M. l'individuazione dell'mRNA dell'HPV ad alto rischio dipende dal numero di copie presenti nel campione e può essere influenzato dai metodi di prelievo del campione, da fattori legati al paziente, dallo stadio dell'infezione e dalla presenza di sostanze interferenti.
- N. L'infezione da HPV non è indicativa della presenza di HSIL (lesione intraepiteliale squamosa di alto grado) citologica o di CIN di alto grado latente, né implica lo sviluppo di CIN2, CIN3 o cancro. La maggior parte delle donne infette da uno o più tipi di HPV ad alto rischio non sviluppa CIN2, CIN3 o cancro.
- O. Gli effetti delle altre potenziali variabili quali perdite vaginali, uso di tamponi, lavande ecc. e delle variabili legate al prelievo dei campioni non sono stati valutati.
- P. Questo prodotto deve essere utilizzato esclusivamente da personale addestrato all'uso dell'Aptima HPV assay.

- Q. La contaminazione crociata dei campioni può causare risultati falsi positivi. Il tasso di contaminazione crociata dell'Aptima HPV assay sul Tigris DTS System è pari allo 0,3% in base ai risultati di uno studio non clinico.
- R. I risultati dell'Aptima HPV assay devono essere interpretati contestualmente ad altri dati di laboratorio e ai dati clinici a disposizione del medico.
- S. Con questo test si possono ottenere risultati falsi positivi. I trascritti *in vitro* dei genotipi a basso rischio 26, 67, 70 e 82 hanno mostrato una reattività crociata con l'Aptima HPV assay.
- T. Il materiale di controllo positivo non è destinato al monitoraggio delle prestazioni relativamente al cutoff dell'analisi.



## Risultati attesi sul Tigris DTS System: prevalenza di mRNA dell'HPV ad alto rischio

La prevalenza dell'infezione da HPV ad alto rischio varia notevolmente ed è influenzata da diversi fattori fra i quali l'età, che contribuisce in misura maggiore.<sup>32, 33</sup> Molti studi hanno esaminato la prevalenza dell'HPV in base ai dati ottenuti dall'individuazione del DNA dell'HPV, tuttavia sono pochi gli studi che riportano la prevalenza in base all'individuazione dell'mRNA dell'HPV oncogeno. Donne provenienti da numerosi centri clinici (n = 18) rappresentative di un'ampia distribuzione geografica e di una popolazione variegata (10 stati all'interno degli Stati Uniti) sono state inserite in uno studio clinico prospettico noto come sperimentazione CLEAR.<sup>34</sup> La prevalenza dei campioni positivi all'mRNA dell'HPV osservata nella sperimentazione clinica è stata suddivisa in categorie, complessivamente, per gruppo di età e per centro di analisi. I risultati sono riportati nella Tabella 1 suddivisi per popolazione cellule squamose atipiche di significato indeterminato (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, ASC-US) e negativo per lesione intraepiteliale o malignità (Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy, NILM).

**Tabella 1:** Prevalenza di mRNA dell'HPV ad alto rischio per gruppo di età, centro di analisi e totale delle due categorie.

	Percentuale di positività % (x/n)	
	Popolazione ASC-US (≥ 21 anni)	Popolazione NILM (≥ 30 anni)
<b>Tutti</b>	41,8 (400/958)	5,0 (540/10.871)
<b>Gruppo di età (anni)</b>		
<b>Da 21 a 29</b>	60,3 (252/418)	N/P
<b>Da 30 a 39</b>	36,8 (98/266)	6,9 (289/4.199)
<b>≥ 40</b>	18,2 (50/274)	3,8 (251/6.672)
<b>Centro di analisi</b>		
<b>1</b>	41,6 (134/322)	4,7 (172/3.682)
<b>2</b>	41,4 (150/362)	5,2 (194/3.702)
<b>3</b>	42,3 (116/274)	5,0 (174/3.487)

N/P = non pertinente

## Studio clinico Aptima HPV Assay con campioni per citologia in fase liquida ThinPrep

Uno studio clinico statunitense prospettico, multicentrico, noto come studio CLEAR, è stato condotto allo scopo di determinare le prestazioni cliniche dell'Aptima HPV assay per l'individuazione della neoplasia intraepiteliale cervicale di grado 2 o della cervicopatia di grado più alto ( $\geq$  CIN2). Lo studio CLEAR comprendeva una valutazione al basale e una valutazione di follow-up a 3 anni.<sup>34</sup>

### Studio CLEAR - Valutazione al basale

Al basale, le donne sono state inserite nello studio ASC-US o nello studio NILM in base ai risultati citologici ottenuti durante uno screening di routine del tumore della cervice. La popolazione dello studio ASC-US includeva donne di età pari o superiore a 21 anni con risultati citologici ASC-US e la popolazione dello studio NILM includeva donne di età pari o superiore a 30 anni con risultati citologici NILM. Lo studio NILM è stato disegnato per supportare l'indicazione aggiuntiva per lo screening delle donne di età pari o superiore a 30 anni, in quanto le donne in questa fascia di età con risultati citologici ASC-US o più severo devono procedere alla colposcopia indipendentemente dal loro stato di infezione da HPV.<sup>35</sup>

Sono state arruolate donne provenienti da 18 centri clinici, principalmente cliniche di ostetricia e ginecologia, con un'ampia distribuzione geografica e una popolazione variegata. Le donne risultate idonee sono state inserite nello studio ASC-US o nello studio NILM in base al loro campione di riferimento per citologia in fase liquida ThinPrep. Come valutazione al basale, sono stati analizzati campioni di riferimento residui di donne dello studio ASC-US e dello studio NILM sia nell'Aptima HPV assay sia in un test sul DNA per l'HPV disponibile in commercio.

Al basale, tutte le donne inserite nello studio ASC-US sono state sottoposte a colposcopia, indipendentemente dai risultati del test per l'HPV. Sono stati effettuati due tipi di prelievo: una biopsia con raschiamento endocervicale (Endocervical Cutterage, ECC) e una biopsia con puntura cervicale (1 biopsia da ciascuno dei 4 quadranti). Se la lesione era visibile, la biopsia è stata eseguita con puntura (metodo diretto, 1 biopsia per lesione), mentre per i quadranti che non mostravano una lesione visibile la biopsia è stata eseguita alla giunzione squamocolumnare (metodo random).

Nello studio NILM, le donne positive all'Aptima HPV assay e/o al test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio, come pure donne scelte a caso negative a entrambi i test sono state sottoposte a colposcopia per una valutazione al basale. Le donne scelte a caso negative a entrambi i test sono state incluse nello studio per correggere il bias di verifica con stime prestazionali adattate generate utilizzando un metodo di imputazione multipla. A ciascuna donna sottoposta a colposcopia è stata effettuata una biopsia ECC. Le biopsie sono state effettuate con puntura solo in presenza di lesioni visibili (metodo diretto, 1 biopsia per lesione). Per le donne dello studio NILM che non presentano CIN2 o di grado superiore ( $\geq$  CIN2) sono state programmate visite di follow-up per 3 anni con esami citologici annuali.

Lo stato della malattia è stato determinato da un pannello di valutazione consensuale degli esami istologici, basato sulle valutazioni concordanti di almeno 2 patologi esperti. I patologi esperti sono stati tenuti all'oscuro dello stato di infezione da HPV delle donne. Essi sono anche stati tenuti all'oscuro dello stato citologico, nonché delle diagnosi istologiche di ciascuna donna. In caso di disaccordo, i 3 patologi hanno dovuto esaminare i vetrini mediante un microscopio a testa multipla fino a raggiungere il consenso. Per evitare il bias, gli sperimentatori, i medici e le donne sono stati tenuti all'oscuro dei risultati del test dell'HPV fino al completamento dell'esame colposcopico. Al basale sono state determinate le

prestazioni cliniche dell'Aptima HPV assay per l'individuazione di CIN2 o di grado superiore ( $\geq$  CIN2) e di neoplasia intraepiteliale cervicale di grado 3 o superiore ( $\geq$  CIN3) in relazione allo stato della patologia cervicale stabilito al basale. Sono state determinate anche le prestazioni cliniche del test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio per il confronto diretto con i risultati dell'Aptima HPV assay.

### Studio CLEAR - Valutazione al follow-up

Le donne dello studio NILM di 14 centri clinici sono risultate idonee a partecipare alla fase di follow-up della durata di 3 anni dello studio se: i) si erano sottoposte a una visita al basale con colposcopia e non presentavano  $\geq$ CIN2, oppure ii) non si erano sottoposte a una visita al basale con colposcopia. La fase di follow-up dello studio consisteva in visite a cadenza annuale. Durante queste visite, a ogni donna è stato prelevato un campione cervicale per citologia, e alcune donne sono state sottoposte a un test per HPV di tipo commerciale. Le donne con ASC-US o più severo durante il periodo di follow-up sono state sottoposte a una nuova colposcopia eseguita con le stesse procedure di biopsia ed esame istologico impiegate per la valutazione al basale dello studio NILM. Lo stato della patologia cervicale in occasione di una visita di follow-up è stato considerato "negativo" in base alla citologia NILM oppure, per le donne con risultati anormali nel test citologico, in base a risultati normali o a un pannello di valutazione consensuale degli esami istologici CIN1. Il periodo di follow-up è stato considerato completato per le donne con risultati  $\geq$ CIN2 rilevati durante tale periodo e queste non si sono dovute sottoporre a visite in seguito a diagnosi di  $\geq$ CIN2. Il follow-up è stato considerato completato per le donne per cui non è stato rilevato un valore  $\geq$ CIN2 durante il periodo di follow-up ma che si sono sottoposte a una visita nel 1° e/o nel 2° anno di follow-up e ad una visita nel 3° anno di follow-up.

L'obiettivo dello studio di follow-up era confrontare il rischio cumulativo di patologia cervicale a 3 anni nelle donne con risultati Aptima HPV assay positivi al basale rispetto a quelle con risultati Aptima HPV assay negativi. Lo stato della patologia cervicale a 3 anni è stato determinato come segue:

- Stato di patologia cervicale positivo ( $\geq$ CIN2 e/o  $\geq$ CIN3): donne con  $\geq$ CIN2 al basale o al follow-up.
- Stato di patologia cervicale negativo ( $<$ CIN2): donne che hanno completato il follow-up senza  $\geq$ CIN2 e che non sono state considerate soggette a uno stato di patologia cervicale "indeterminato".
- Stato di patologia cervicale indeterminato: donne che hanno ottenuto risultati del test citologico anormali durante il follow-up e che non disponevano di un successivo risultato del pannello di valutazione consensuale degli esami istologici, oppure donne con risultati citologici inadeguati alla loro ultima visita.
- Perse durante il follow-up: donne che non hanno completato il follow-up e non sono state considerate soggette a uno stato di patologia cervicale "indeterminato".

Sono state valutate le prestazioni cliniche dell'Aptima HPV assay nell'individuazione di  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 in relazione a un stato di patologia cervicale a 3 anni.

## Prestazioni di Tigris DTS System assay

### Popolazione ASC-US di età pari o superiore a 21 anni: prestazioni cliniche dell'Aptima HPV Assay con campioni per citologia in fase liquida ThinPrep

Complessivamente, nello studio ASC-US sono state inserite 1.252 donne di età pari o superiore a 21 anni. Di queste, 294 sono state ritirate dallo studio e 19 hanno avuto una diagnosi di malattia indeterminata; tutte queste donne sono state escluse dall'analisi. Le restanti 939 donne valutabili erano di età pari o superiore a 21 anni, con risultati citologici ASC-US, risultati dell'Aptima HPV assay e stato conclamato della malattia. Novantuno (91) donne hanno avuto una diagnosi di CIN2 o di grado superiore ( $\geq$  CIN2) e quarantuno (41) hanno avuto una diagnosi di CIN3 o di grado superiore ( $\geq$  CIN3). La prevalenza di diagnosi  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 nelle donne valutabili con risultati citologici ASC-US è stata rispettivamente del 9,7% e del 4,4%. I risultati dell'Aptima HPV assay basati sulla diagnosi effettuata con il pannello di valutazione consensuale degli esami istologici sono illustrati nella Tabella 2.

**Tabella 2:** Popolazione ASC-US di età pari o superiore a 21 anni: risultati dell'Aptima HPV assay ottenuti dalla diagnosi con pannello di valutazione consensuale degli esami istologici

Risultato dell'Aptima HPV Assay*	Test per il DNA dell'HPV	Diagnosi con pannello di valutazione consensuale degli esami istologici						
		Indeterminato**	Normale	CIN1	CIN2	CIN3	Cancro	Totale
Positivo	Positivo	6	170	113	41	32	1	363
Positivo	Negativo	0	7	0	1	2	0	10
Positivo	Nessun risultato***	0	14	11	0	2	0	27
Negativo	Positivo	0	47	13	2	3	0	65
Negativo	Negativo	10	371	55	6	1	0	443
Negativo	Nessun risultato***	3	40	7	0	0	0	50
<b>Totale</b>		19	649	199	50	40	1****	958

\*Tutti i campioni hanno mostrato risultati finali validi (dall'analisi iniziale o dopo la risoluzione dei risultati iniziali non validi per cause procedurali).

\*\*19 soggetti sono stati sottoposti a visita colposcopica ma non è stato possibile effettuare una diagnosi per i seguenti motivi: < 5 campioni di biopsia tutti con risultati istologici Normale/CIN1 (n = 15), nessuna biopsia prelevata (n = 3) e vetrini di biopsia smarriti (n = 1).

\*\*\*Per 77 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test per il DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.

\*\*\*\*Un soggetto ha avuto una diagnosi di adenocarcinoma in situ (AIS).

Nella Tabella 3 sono riportate le stime delle prestazioni cliniche dell'Aptima HPV assay, che comprendono la sensibilità, la specificità, il valore predittivo positivo (VPP) e il valore predittivo negativo (VPN) per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 basato sulla valutazione di tutte le biopsie e comprendente solo le biopsie dirette, nonché le stime relative al test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio.

**Tabella 3:** Popolazione ASC-US di età pari o superiore a 21 anni: prestazioni dell'Aptima HPV assay e del test per il DNA dell'HPV per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3

	Prestazioni	Aptima HPV Assay N = 939		Test per il DNA dell'HPV N = 865*	
		Stima	(CI al 95%)	Stima	(CI al 95%)
$\geq$ CIN2	<b>Tutte le biopsie</b>				
	Sensibilità (%)	86,8 (79/91)	(78,4, 92,3)	88,8 (79/89)	(80,5, 93,8)
	Specificità (%)	62,9 (533/848)	(59,6, 66,0)	55,8 (433/776)	(52,3, 59,3)
	VPP (%)	20,1 (79/394)	(18,1, 22,0)	18,7 (79/422)	(17,0, 20,4)
	VPN (%)	97,8 (533/545)	(96,5, 98,8)	97,7 (433/443)	(96,2, 98,8)
	Prevalenza (%)	9,7 (91/939)		10,3 (89/865)	
	<b>Biopsie dirette**</b>				
	Sensibilità (%)	93,3 (56/60)	(84,1, 97,4)	93,2 (55/59)	(83,8, 97,3)
	Specificità (%)	61,5 (539/876)	(58,3, 64,7)	54,5 (438/804)	(51,0, 57,9)
	VPP (%)	14,2 (56/393)	(12,7, 15,6)	13,1 (55/421)	(11,7, 14,2)
	VPN (%)	99,3 (539/543)	(98,3, 99,8)	99,1 (438/442)	(97,9, 99,7)
	Prevalenza (%)	6,4 (60/936)		6,8 (59/863)	
	$\geq$ CIN3	<b>Tutte le biopsie</b>			
Sensibilità (%)		90,2 (37/41)	(77,5, 96,1)	92,3 (36/39)	(79,7, 97,3)
Specificità (%)		60,2 (541/898)	(57,0, 63,4)	53,3 (440/826)	(49,9, 56,6)
VPP (%)		9,4 (37/394)	(8,1, 10,4)	8,5 (36/422)	(7,4, 9,4)
VPN (%)		99,3 (541/545)	(98,3, 99,8)	99,3 (440/443)	(98,3, 99,8)
Prevalenza (%)		4,4 (41/939)		4,5 (39/865)	
<b>Biopsie dirette**</b>					
Sensibilità (%)		93,1 (27/29)	(78,0, 98,1)	96,4 (27/28)	(82,3, 99,4)
Specificità (%)		59,6 (541/908)	(56,4, 62,7)	52,8 (441/836)	(49,4, 56,1)
VPP (%)		6,9 (27/394)	(5,8, 7,6)	6,4 (27/422)	(5,5, 7,0)
VPN (%)		99,6 (541/543)	(98,8, 100)	99,8 (441/442)	(98,9, 100)
Prevalenza (%)		3,1 (29/937)		3,2 (28/864)	

\*Per 74 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test per il DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.

\*\*Il risultato istologico consensuale è stato ottenuto utilizzando solo i risultati delle biopsie dirette. Le donne con biopsia indiretta denotano una colposcopia normale e sono incluse in queste analisi come non affette dalla malattia (< CIN2 o < CIN3, a seconda dei casi). Quando sono state incluse solo biopsie dirette non sempre è stato raggiunto un consenso.

Quando sono state valutate tutte le biopsie, le stime della sensibilità clinica dell'Aptima HPV assay e del test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio, laddove sono disponibili entrambi i risultati del test per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3, sono risultate simili (le differenze nelle stime della sensibilità non sono state significative dal punto di vista statistico): differenza di sensibilità = -2,3% [CI al 95%: -9,5%, 4,8%]. Le stime della specificità clinica dell'Aptima HPV assay per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 sono state maggiori rispetto a quelle del test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio (le differenze nelle stime della specificità sono state significative dal punto di vista statistico). Per  $\geq$  CIN2, la differenza di specificità è stata del 6,8% (CI al 95%: 4,9%, 9,0%). I VPN sono stati simili, ma per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 il VPP per l'Aptima HPV assay è stato leggermente più alto rispetto al VPP per il test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio (20,1% contro 18,7%).

Dei 91 casi di  $\geq$  CIN2, 60 (65,9%) sono stati identificati con biopsie dirette e 31 (34,1%) sono stati identificati con biopsie random e/o biopsie ECC (ossia, biopsie indirette). Questi risultati possono essere confrontati con i risultati degli studi presenti in letteratura, dai quali si evince che dal 25% al 40% circa dei casi di  $\geq$  CIN2 sono stati identificati solo con campioni biotici prelevati con metodi random e ECC.<sup>36,37</sup> Utilizzando solo biopsie dirette per determinare lo stato della malattia (supponendo che le donne sottoposte a biopsia indiretta abbiano mostrato risultati istologici normali in quanto non erano presenti lesioni visibili), la prevalenza di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 nello studio è stata rispettivamente del 6,4% e del 3,1%. Le stime della sensibilità clinica per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 sono state maggiori per entrambi i test utilizzando solo biopsie dirette rispetto alle stime calcolate utilizzando tutti i tipi di biopsie. Per entrambi i test, la specificità clinica ottenuta utilizzando solo biopsie dirette è stata simile alla specificità ottenuta con tutti i tipi di biopsie. Di conseguenza, quando sono state utilizzate solo biopsie dirette, la specificità dell'Aptima HPV assay è stata significativamente più alta rispetto a quella del test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio.

Le stime delle prestazioni cliniche dell'Aptima HPV assay e del test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio sono riportate per gruppo di età nelle Tabella 4 e nella Tabella 5 (rispettivamente  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3, in base alla valutazione di tutte le biopsie).

**Tabella 4:** Popolazione ASC-US di età pari o superiore a 21 anni: prestazioni dell'Aptima HPV assay e del test per il DNA dell'HPV per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 per gruppo di età

	Prestazioni	Aptima HPV Assay N = 939		Test per il DNA dell'HPV N = 865*	
		Stima	(CI al 95%)	Stima	(CI al 95%)
Da 21 a 29 anni		N = 415		N = 389	
	Sensibilità (%)	90,2 (55/61)	(80,2, 95,4)	94,9 (56/59)	(86,1, 98,3)
	Specificità (%)	44,9 (159/354)	(39,8, 50,1)	35,5 (117/330)	(30,5, 40,8)
	VPP (%)	22,0 (55/250)	(19,6, 24,2)	20,8 (56/269)	(19,0, 22,5)
	VPN (%)	96,4 (159/165)	(93,0, 98,5)	97,5 (117/120)	(93,6, 99,4)
	Prevalenza (%)	14,7 (61/415)		15,2 (59/389)	
Da 30 a 39 anni		N = 262		N = 239	
	Sensibilità (%)	90,0 (18/20)	(69,9, 97,2)	80,0 (16/20)	(58,4, 91,9)
	Specificità (%)	68,2 (165/242)	(62,1, 73,7)	61,6 (135/219)	(55,1, 67,8)
	VPP (%)	18,9 (18/95)	(14,7, 22,7)	16,0 (16/100)	(11,8, 19,6)
	VPN (%)	98,8 (165/167)	(96,5, 99,8)	97,1 (135/139)	(94,1, 99,1)
	Prevalenza (%)	7,6 (20/262)		8,4 (20/239)	
$\geq$ 40 anni		N = 262		N = 237	
	Sensibilità (%)	60,0 (6/10)	(31,3, 83,2)	70,0 (7/10)	(39,7, 89,2)
	Specificità (%)	82,9 (209/252)	(77,8, 87,1)	79,7 (181/227)	(74,0, 84,4)
	VPP (%)	12,2 (6/49)	(5,8, 18,4)	13,2 (7/53)	(6,9, 18,7)
	VPN (%)	98,1 (209/213)	(96,6, 99,4)	98,4 (181/184)	(96,6, 99,6)
	Prevalenza (%)	3,8 (10/262)		4,2 (10/237)	

\*Per 74 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test per il DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.

**Tabella 5:** Popolazione ASC-US di età pari o superiore a 21 anni: prestazioni dell'Aptima HPV assay e del test per il DNA dell'HPV per l'individuazione di  $\geq$  CIN3 per gruppo di età

	Prestazioni	Aptima HPV Assay N = 939		Test per il DNA dell'HPV N = 865*	
		Stima	(CI al 95%)	Stima	(CI al 95%)
<b>Da 21 a 29 anni</b>		N = 415		N = 389	
	Sensibilità (%)	96,3 (26/27)	(81,7, 99,3)	100 (25/25)	(86,7, 100)
	Specificità (%)	42,3 (164/388)	(37,5, 47,2)	33,0 (120/364)	(28,3, 38,0)
	VPP (%)	10,4 (26/250)	(8,9, 11,4)	9,3 (25/269)	(8,2, 10,0)
	VPN (%)	99,4 (164/165)	(97,2, 100)	100 (120/120)	(97,5, 100)
	Prevalenza (%)	6,5 (27/415)		6,4 (25/389)	
<b>Da 30 a 39 anni</b>		N = 262		N = 239	
	Sensibilità (%)	88,9 (8/9)	(56,5, 98,0)	77,8 (7/9)	(45,3, 93,7)
	Specificità (%)	65,6 (166/253)	(59,6, 71,2)	59,6 (137/230)	(53,1, 65,7)
	VPP (%)	8,4 (8/95)	(5,2, 10,4)	7,0 (7/100)	(3,9, 9,1)
	VPN (%)	99,4 (166/167)	(97,6, 100)	98,6 (137/139)	(96,4, 99,8)
	Prevalenza (%)	3,4 (9/262)		3,8 (9/239)	
<b><math>\geq</math> 40 anni</b>		N = 262		N = 237	
	Sensibilità (%)	60,0 (3/5)	(23,1, 88,2)	80,0 (4/5)	(37,6, 96,4)
	Specificità (%)	82,1 (211/257)	(77,0, 86,3)	78,9 (183/232)	(73,2, 83,6)
	VPP (%)	6,1 (3/49)	(1,6, 10,2)	7,5 (4/53)	(2,9, 10,7)
	VPN (%)	99,1 (211/213)	(98,0, 99,9)	99,5 (183/184)	(98,2, 100)
	Prevalenza (%)	1,9 (5/262)		2,1 (5/237)	

\*Per 74 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test per il DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.



Nella Tabella 6 sono riportati il rischio assoluto di malattia ( $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3, in base alla valutazione di tutte le biopsie) deducibile dai risultati dell'Aptima HPV assay e il rischio relativo di malattia deducibile dai risultati positivi rispetto a quelli negativi dell'Aptima HPV assay, nonché le stime relative al test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio. Il rischio relativo di  $\geq$  CIN2 è stato del 9,1% (CI al 95%: 5,0, 16,5), a indicare che una donna positiva all'Aptima HPV assay aveva una probabilità di 9,1 volte di ottenere una diagnosi di  $\geq$  CIN2 rispetto a una donna negativa all'Aptima HPV assay. Il rischio relativo di  $\geq$  CIN3 è stato del 12,8% (CI al 95%: 4,6, 35,6).

**Tabella 6:** Popolazione ASC-US di età pari o superiore a 21 anni: rischio assoluto e relativo di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 per i risultati dell'Aptima HPV assay e del test per il DNA dell'HPV

	Risultato del test	Aptima HPV Assay N = 939		Test per il DNA dell'HPV N = 865*	
		Rischio assoluto (CI al 95%)	Rischio relativo (CI al 95%)	Rischio assoluto (CI al 95%)	Rischio relativo (CI al 95%)
$\geq$ CIN2	Positivo	20,1 (79/394) (18,1, 22,0)	9,1 (5,0, 16,5)	18,7 (79/422) (17,0, 20,4)	8,3 (4,4, 15,8)
	Negativo	2,2 (12/545) (1,2, 3,5)		2,3 (10/443) (1,2, 3,8)	
	Prevalenza (%)	9,7 (91/939)		10,3 (89/865)	
$\geq$ CIN3	Positivo	9,4 (37/394) (8,1, 10,4)	12,8 (4,6, 35,6)	8,5 (36/422) (7,4, 9,4)	12,6 (3,9, 40,6)
	Negativo	0,7 (4/545) (0,2, 1,7)		0,7 (3/443) (0,2, 1,7)	
	Prevalenza (%)	4,4 (41/939)		4,5 (39/865)	

\*Per 74 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test per il DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.

Le stime del rischio assoluto e relativo della malattia ( $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3, in base alla valutazione di tutte le biopsie) per l'Aptima HPV assay e per il test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio sono riportate per gruppo di età nella Tabella 7.

**Tabella 7:** Popolazione ASC-US di età pari o superiore a 21 anni: rischio assoluto e relativo di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 per i risultati dell'Aptima HPV assay e del test per il DNA dell'HPV per gruppo di età

	Età	Risultato del test	Aptima HPV Assay N = 939		Test per il DNA dell'HPV N = 865*	
			Rischio assoluto (CI al 95%)	Rischio relativo (CI al 95%)	Rischio assoluto (CI al 95%)	Rischio relativo (CI al 95%)
$\geq$ CIN2	Da 21 a 29 anni		N = 415		N = 389	
		Positivo	22,0 (55/250) (19,6, 24,2)	6,1 (2,7, 13,7)	20,8 (56/269) (19,0, 22,5)	8,3 (2,7, 26,1)
		Negativo	3,6 (6/165) (1,5, 7,0)		2,5 (3/120) (0,6, 6,4)	
		Prevalenza (%)	14,7 (61/415)		15,2 (59/389)	
	Da 30 a 39 anni		N = 262		N = 239	
		Positivo	18,9 (18/95) (14,7, 22,7)	15,8 (3,8, 66,7)	16,0 (16/100) (11,8, 19,6)	5,6 (1,9, 16,1)
		Negativo	1,2 (2/167) (0,2, 3,5)		2,9 (4/139) (0,9, 5,9)	
		Prevalenza (%)	7,6 (20/262)		8,4 (20/239)	
	$\geq$ 40 anni		N = 262		N = 237	
		Positivo	12,2 (6/49) (5,8, 18,4)	6,5 (1,9, 22,2)	13,2 (7/53) (6,9, 18,7)	8,1 (2,2, 30,2)
		Negativo	1,9 (4/213) (0,6, 3,4)		1,6 (3/184) (0,4, 3,4)	
		Prevalenza (%)	3,8 (10/262)		4,2 (10/237)	
$\geq$ CIN3	Da 21 a 29 anni		N = 415		N = 389	
		Positivo	10,4 (26/250) (8,9, 11,4)	17,2 (2,4, 125)	9,3 (25/269) (8,2, 10,0)	Non calcolabile
		Negativo	0,6 (1/165) (0,0, 2,8)		0,0 (0/120) (0,0, 2,5)	
		Prevalenza (%)	6,5 (27/415)		6,4 (25/389)	
	Da 30 a 39 anni		N = 262		N = 239	
		Positivo	8,4 (8/95) (5,2, 10,4)	14,1 (1,8, 111)	7,0 (7/100) (3,9, 9,1)	4,9 (1,0, 22,9)
		Negativo	0,6 (1/167) (0,0, 2,4)		1,4 (2/139) (0,2, 3,6)	
		Prevalenza (%)	3,4 (9/262)		3,8 (9/239)	
	$\geq$ 40 anni		N = 262		N = 237	
		Positivo	6,1 (3/49) (1,6, 10,2)	6,5 (1,1, 38,0)	7,5 (4/53) (2,9, 10,7)	13,9 (1,6, 122)
		Negativo	0,9 (2/213) (0,1, 2,0)		0,5 (1/184) (0,0, 1,8)	
		Prevalenza (%)	1,9 (5/262)		2,1 (5/237)	

\*Per 74 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test per il DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.

### Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: prestazioni cliniche dell'Aptima HPV Assay al basale su campioni per citologia in fase liquida ThinPrep

Complessivamente, nello studio NILM sono state inserite 11.644 donne con risultati citologici NILM. Di queste, 773 donne sono state ritirate ed escluse dalla valutazione al basale. Le restanti 10.871 donne valutabili erano di età pari o superiore a 30 anni, con risultati citologici NILM e risultati dell'Aptima HPV assay. Delle 540 donne con risultati positivi all'Aptima HPV assay, 335 sono state sottoposte a colposcopia al basale. Delle 10.331 donne con risultati negativi all'Aptima HPV assay, 530 sono state sottoposte a colposcopia al basale. Venti (20) donne hanno avuto una diagnosi di  $\geq$  CIN2 e undici (11) una diagnosi di  $\geq$  CIN3; 799 donne hanno avuto una diagnosi istologica Normale/CIN1; 46 donne hanno avuto una diagnosi di stato indeterminato della malattia. I risultati dell'Aptima HPV assay basati sul pannello di valutazione consensuale al basale degli esami istologici sono illustrati nella Tabella 8.

**Tabella 8:** Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: risultati al basale di Aptima HPV assay, del test HPV DNA e del pannello di valutazione consensuale degli esami istologici

Risultato dell'Aptima HPV Assay*	Test per il DNA dell'HPV	Diagnosi con pannello di valutazione consensuale degli esami istologici						
		Indeterminato	Normale	CIN1	CIN2	CIN3	Cancro	Totale
Positivo	Positivo	11	212	11	4	7	2	247
Positivo	Negativo	7	59	0	1	0	1	68
Positivo	Nessun risultato**	3	16	1	0	0	0	20
Negativo	Positivo	10	170	8	2	1	0	191
Negativo	Negativo	15	313	9	1	0	0	338
Negativo	Nessun risultato**	0	0	0	1	0	0	1
<b>Totale</b>		46	770	29	9	8	3***	865

\*Tutti i campioni hanno mostrato risultati finali validi (dall'analisi iniziale o dopo la risoluzione dei risultati iniziali non validi per cause procedurali).

\*\*Per 21 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test per il DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.

\*\*\*Tre donne hanno avuto una diagnosi di adenocarcinoma in situ (AIS).

In totale, 10.052 donne hanno avuto una diagnosi al basale di stato della malattia non verificato (incluso lo stato indeterminato) (Tabella 9). Poiché sono state sottoposte a colposcopia solo le donne scelte a caso con risultati negativi sia per l'Aptima HPV assay che per il test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio, in questo gruppo la percentuale di donne con stato non verificato della malattia è stata alta (99,6%). Per correggere questo bias di verifica, è stato utilizzato un metodo di imputazione multipla per stimare il numero di donne con malattia che sarebbe stato identificato se tutte fossero state sottoposte a colposcopia. Sono riportate sia le stime delle prestazioni adattate per il bias di verifica sia le stime delle prestazioni non adattate, basate sulle 819 donne con stato al basale verificato della malattia.

**Tabella 9:** Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: classificazione delle donne NILM valutabili in base ai risultati dell'Aptima HPV assay e del test per il DNA dell'HPV, stato della malattia ( $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3) e stato della malattia al basale

Risultato dell'Aptima HPV Assay*	Test per il DNA dell'HPV	Donne totali	Stato della malattia verificato: $\geq$ CIN2		Stato della malattia verificato: $\geq$ CIN3		Stato della malattia non verificato
			Donne malate ( $\geq$ CIN2)	Donne non malate ( $<$ CIN2)	Donne malate ( $\geq$ CIN3)	Donne non malate ( $<$ CIN3)	Donne con stato della malattia sconosciuto (% sconosciuto)
Positivo	Positivo	360	13	223	9	227	124 (34,4%)
Positivo	Negativo	150	2	59	1	60	89 (59,3%)
Positivo	Nessun risultato**	30	0	17	0	17	13 (43,3%)
Negativo	Positivo	306	3	178	1	180	125 (40,8%)
Negativo	Negativo	9.420	1	322	0	323	9.097 (96,6%)
Negativo	Nessun risultato**	605	1	0	0	1	604 (99,8%)
<b>Totale</b>		10.871	20	799	11	808	10.052 (92,5%)

\*Tutti i campioni hanno mostrato risultati finali (dall'analisi iniziale o dopo la risoluzione dei risultati iniziali non validi per cause procedurali).

\*\*Per 635 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test per il DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.

La prevalenza adattata di diagnosi  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 nelle donne con risultati citologici NILM è stata rispettivamente dello 0,9% e dello 0,4%. Le stime adattate del rischio assoluto e relativo per l'individuazione al basale di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 sono riportate nella Tabella 10. Il rischio relativo adattato di  $\geq$  CIN2 è stato dell'8,1% (CI al 95%: 2,3, 28,1), a indicare che una donna positiva all'Aptima HPV assay ha una probabilità di 8,1 volte di ottenere una diagnosi di  $\geq$  CIN2 rispetto a una donna negativa all'Aptima HPV assay. Il rischio relativo adattato di  $\geq$  CIN3 è stato del 34,5% (CI al 95%: 2,7, 443,3). Le stime non adattate del rischio assoluto e relativo per l'individuazione al basale di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 sono mostrate complessivamente nella Tabella 11 e per gruppo di età nella Tabella 12.

**Tabella 10:** Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: rischio assoluto e relativo di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 per i risultati al basale dell'Aptima HPV assay e del test per il DNA dell'HPV (stime adattate per il bias di verifica)

Risultato del test		Aptima HPV Assay		Test per il DNA dell'HPV	
		Rischio assoluto (CI al 95%)	Rischio relativo (CI al 95%)	Rischio assoluto (CI al 95%)	Rischio relativo (CI al 95%)
$\geq$ CIN2	Positivo	4,7 (2,9, 7,6)	8,1 (2,3, 28,1)	3,7 (2,3, 6,0)	7,3 (1,6, 33,4)
	Negativo	0,6 (0,2, 1,9)		0,5 (0,1, 2,1)	
	Prevalenza (%)	0,9		0,9	
$\geq$ CIN3	Positivo	3,3 (1,4, 7,6)	34,5 (2,7, 443,3)	2,3 (1,3, 4,1)	21,0 (1,0, 423,4)
	Negativo	0,1 (0,0, 1,6)		0,1 (0,0, 2,4)	
	Prevalenza (%)	0,4		0,4	

**Tabella 11:** Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: rischio assoluto e relativo di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 per i risultati al basale dell'Aptima HPV assay e del test per il DNA dell'HPV (stime non adattate)

Risultato del test		Aptima HPV Assay N = 819		Test per il DNA dell'HPV N = 801*	
		Rischio assoluto (CI al 95%)	Rischio relativo (CI al 95%)	Rischio assoluto (CI al 95%)	Rischio relativo (CI al 95%)
$\geq$ CIN2	Positivo	4,8 (15/314) (3,4, 5,8)	4,8 (1,8, 13,1)	3,8 (16/417) (2,9, 4,4)	4,9 (1,4, 16,7)
	Negativo	1,0 (5/505) (0,4, 1,9)		0,8 (3/384) (0,2, 1,9)	
	Prevalenza (%)	2,4 (20/819)		2,4 (19/801)	
$\geq$ CIN3	Positivo	3,2 (10/314) (2,2, 3,7)	16,1 (2,1, 125)	2,4 (10/417) (1,6, 2,7)	9,2 (1,2, 71,6)
	Negativo	0,2 (1/505) (0,0, 0,9)		0,3 (1/384) (0,0, 1,1)	
	Prevalenza (%)	1,3 (11/819)		1,4 (11/801)	

\*Per 18 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test per il DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.

**Tabella 12:** Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: rischio assoluto e relativo di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 per i risultati al basale dell'Aptima HPV assay e del test per il DNA dell'HPV per gruppo di età (stime non adattate)

	Età	Risultato del test	Aptima HPV Assay N = 819		Test per il DNA dell'HPV N = 801*	
			Rischio assoluto (CI al 95%)	Rischio relativo (CI al 95%)	Rischio assoluto (CI al 95%)	Rischio relativo (CI al 95%)
$\geq$ CIN2	Da 30 a 39 anni		N = 384		N = 377	
		Positivo	4,8 (8/167) (2,1, 9,2)	10,4 (1,3, 82,3)	3,2 (7/216) (1,3, 6,6)	2,6 (0,5, 12,4)
		Negativo	0,5 (1/217) (0,0, 2,5)		1,2 (2/161) (0,2, 4,4)	
		Prevalenza (%)	2,3 (9/384)		2,4 (9/377)	
	$\geq$ 40 anni		N = 435		N = 424	
		Positivo	4,8 (7/147) (1,9, 9,6)	3,4 (1,0, 11,5)	4,5 (9/201) (2,1, 8,3)	10,0 (1,3, 78,1)
		Negativo	1,4 (4/288) (0,4, 3,5)		0,4 (1/223) (0,0, 2,5)	
		Prevalenza (%)	2,5 (11/435)		2,4 (10/424)	
$\geq$ CIN3	Da 30 a 39 anni		N = 384		N = 377	
		Positivo	3,0 (5/167) (1,0, 6,8)	6,5 (0,8, 55,1)	2,3 (5/216) (0,8, 5,3)	3,7 (0,4, 31,6)
		Negativo	0,5 (1/217) (0,0, 2,5)		0,6 (1/161) (0,0, 3,4)	
		Prevalenza (%)	1,6 (6/384)		1,6 (6/377)	
	$\geq$ 40 anni		N = 435		N = 424	
		Positivo	3,4 (5/147) (1,1, 7,8)	Non calcolabile	2,5 (5/201) (0,8, 5,7)	Non calcolabile
		Negativo	0,0 (0/288) (0,0, 1,3)		0,0 (0/223) (0,0, 1,6)	
		Prevalenza (%)	1,1 (5/435)		1,2 (5/424)	

\*Per 18 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test per il DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.

Nella Tabella 13 sono riportate le stime adattate delle prestazioni cliniche dell'Aptima HPV assay, che comprendono la sensibilità, la specificità, il VPP e il VPN per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3, nonché le stime relative al test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio. Le stime non adattate delle prestazioni cliniche sono riportate nella Tabella 14. L'Aptima HPV assay e il test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio hanno mostrato una sensibilità simile, mentre la specificità è stata significativamente più alta per l'Aptima HPV assay (CI al 95% non sovrapposti). Le stime dei valori predittivi dell'Aptima HPV assay sono state clinicamente rilevanti e simili alle stime per il test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio. I VPN sono stati simili, ma per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 il VPP per l'Aptima HPV assay è stato leggermente più alto rispetto al VPP per il test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio (4,7% contro 3,7%).

**Tabella 13:** Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: prestazioni dell'Aptima HPV assay e del test per il DNA dell'HPV per l'individuazione al basale di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 (stime adattate per il bias di verifica)

	Prestazioni	Aptima HPV Assay		Test per il DNA dell'HPV	
		Stima	(CI al 95%)	Stima	(CI al 95%)
$\geq$ CIN2	Sensibilità (%)	31,0	(5,9, 56,1)	35,4	(3,8, 66,9)
	Specificità (%)	95,2	(94,8, 95,6)	93,7	(93,2, 94,2)
	VPP (%)	4,7	(2,9, 7,6)	3,7	(2,3, 6,0)
	VPN (%)	99,4	(98,1, 99,8)	99,5	(97,9, 99,9)
	Prevalenza (%)	0,9		0,9	
$\geq$ CIN3	Sensibilità (%)	61,5	(14,0, 100)	56,4	(0,4, 100)
	Specificità (%)	95,2	(94,8, 95,6)	93,6	(93,1, 94,1)
	VPP (%)	3,3	(1,4, 7,6)	2,3	(1,3, 4,1)
	VPN (%)	99,9	(98,4, 100)	99,9	(97,6, 100)
	Prevalenza (%)	0,4		0,4	

**Tabella 14:** Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: prestazioni dell'Aptima HPV assay e del test per il DNA dell'HPV per l'individuazione al basale di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 (stime non adattate)

	Prestazioni	Aptima HPV Assay N = 819		Test per il DNA dell'HPV N = 801*	
		Stima	(CI al 95%)	Stima	(CI al 95%)
$\geq$ CIN2	Sensibilità (%)	75,0 (15/20)	(53,1, 88,8)	84,2 (16/19)	(62,4, 94,5)
	Specificità (%)	62,6 (500/799)	(59,2, 65,9)	48,7 (381/782)	(45,2, 52,2)
	VPP (%)	4,8 (15/314)	(3,4, 5,8)	3,8 (16/417)	(2,9, 4,4)
	VPN (%)	99,0 (500/505)	(98,1, 99,6)	99,2 (381/384)	(98,1, 99,8)
	Prevalenza (%)	2,4 (20/819)		2,4 (19/801)	
$\geq$ CIN3	Sensibilità (%)	90,9 (10/11)	(62,3, 98,4)	90,9 (10/11)	(62,3, 98,4)
	Specificità (%)	62,4 (504/808)	(59,0, 65,7)	48,5 (383/790)	(45,0, 52,0)
	VPP (%)	3,2 (10/314)	(2,2, 3,7)	2,4 (10/417)	(1,6, 2,7)
	VPN (%)	99,8 (504/505)	(99,1, 100)	99,7 (383/384)	(98,9, 100)
	Prevalenza (%)	1,3 (11/819)		1,4 (11/801)	

\*Per 18 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test per il DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.



Il confronto diretto tra l'Aptima HPV assay e il test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio dimostra una sensibilità simile e una specificità migliorata significativa dal punto di vista statistico dell'Aptima HPV assay rispetto al test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio per l'individuazione di  $\geq$  CIN2, come mostrato dai rapporti delle percentuali dei veri positivi e dei falsi positivi (rispettivamente Tabella 15 e Tabella 16).

**Tabella 15:** Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: rapporto delle percentuali al basale dei veri positivi (Aptima HPV assay/test per il DNA dell'HPV) per le donne con  $\geq$  CIN2 (stime non adattate)

		Test per il DNA dell'HPV		Totale
		Positivo	Negativo	
Aptima HPV Assay	Positivo	13	2	15 (78,9%)
	Negativo	3	1	4
	Totale	16 (84,2%)	3	19
Rapporto delle percentuali dei falsi positivi = 0,94 (15 su 16) (CI al 95%: 0,67, 1,20).				

**Tabella 16:** Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: rapporto delle percentuali preliminari di falsi positivi (Aptima HPV assay/test per il DNA dell'HPV) per le donne con  $<$  CIN2 (stime non adattate)

		Test per il DNA dell'HPV		Totale
		Positivo	Negativo	
Aptima HPV Assay	Positivo	223	59	282 (36,1%)
	Negativo	178	322	500
	Totale	401 (51,3%)	381	782
Rapporto delle percentuali dei falsi positivi = 0,70 (282 su 401) (CI al 95%: 0,64, 0,77).				

## Popolazione NILM di età inferiore a 30 anni: prestazioni cliniche dell'Aptima HPV Assay dopo 3 anni di follow-up

In totale, sono risultate idonee alla fase di follow-up 10.854 donne di età uguale o inferiore a 30 anni con risultati al basale validi di citologia NILM e Aptima HPV assay. Delle donne senza un valore  $\geq$ CIN2, il 66,9% (7.251/10.834) si è sottoposta a una visita di follow-up con Pap test del 1° anno, il 60,2% (6.522/10.825) a quella del 2° anno e il 58,6% (6.344/10.818) a quella del 3° anno. Complessivamente, il 58,8% (6.380/10.854) delle donne ha completato lo studio (con valori al basale o durante il follow-up  $\geq$ CIN2, e/o visite richieste completate).

Su 10.854 donne, 540 (il 5,0%) ha ottenuto risultati al basale positivi all'Aptima HPV assay. Tra queste 540 donne, a 263 (il 48,7%) è stato diagnosticato uno stato della patologia a 3 anni positivo o negativo in base ai risultati citologici o della colposcopia/biopsia. Le rimanenti 10.314 donne hanno avuto risultati al basale negativi all'Aptima HPV assay. Tra queste 10.314 donne, a 5.943 (il 57,6%) è stato diagnosticato uno stato della patologia a 3 anni positivo o negativo. Tra le 6.206 donne con stato della patologia a 3 anni, a 47 è stata diagnosticata una  $\geq$ CIN2, comprese 23 con  $\geq$ CIN3; 6.159 donne hanno avuto un valore normale/CIN1 dal pannello di valutazione consensuale degli esami istologici. I risultati al basale dell'Aptima HPV assay e di un test HPV DNA commerciale e lo stato della patologia a 3 anni (compresa la valutazione al basale e al follow-up) del pannello di valutazione consensuale degli esami istologici sono illustrati nella Tabella 17.

**Tabella 17:** Popolazione NILM di età inferiore a 30 anni: classificazione delle donne idonee alla fase di follow-up in base ai risultati al basale dell'Aptima HPV assay, e del test HPV DNA e allo stato della patologia ( $\geq$ CIN2,  $\geq$ CIN3, Non verificato) stabilito al basale e durante il follow-up

Risultato dell'Aptima HPV assay	Test per il DNA dell'HPV	Totale donne	Stato di patologia verificato: $\geq$ CIN2		Stato di patologia verificato: $\geq$ CIN3		Stato di patologia non verificato	
			Donne malate ( $\geq$ CIN2)	Donne non malate (<CIN2)	Donne malate ( $\geq$ CIN3)	Donne non malate ( $\geq$ CIN3)	Perse durante il follow-up	Indeterminato*
Positivo	Positivo	360	22	154	15	161	165	19
Positivo	Negativo	150	2	72	1	73	68	8
Positivo	Nessun risultato**	30	2	11	1	12	14	3
Negativo	Positivo	304	6	146	3	149	133	19
Negativo	Negativo	9,405	14	5,455	3	5,466	3,735	201
Negativo	Nessun risultato**	605	1	321	0	322	269	14
<b>To tale</b>		10,854	47	6,159	23	6,183	4,384	264

\*Donne che presentavano risultati del test citologico anormali durante il follow-up e che non disponevano di un successivo risultato del pannello di valutazione consensuale degli esami istologici, oltre a donne con risultati citologici inadeguati alla loro ultima visita. 174 donne con stato della patologia indeterminato hanno completato il follow-up secondo il protocollo.

\*\*635 donne con risultati all'Aptima HPV assay non hanno avuto risultati al test per il DNA dell'HPV principalmente a causa di un insufficiente volume di campione per la citologia.

Il rischio cumulativo di malattia a 3 anni ( $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3) si basa sulla valutazione di Kaplan-Meier (analisi della tabella di sopravvivenza) e comprende le patologie rilevate al basale e durante le fasi di follow-up. Le donne che hanno avuto qualche indicazione di patologia (ASC-US o risultati citologici più gravi) ma senza un risultato del pannello di valutazione consensuale degli esami istologici sono state incluse nell'analisi utilizzando un metodo di inserimento multiplo per prevedere il numero di donne affette da una patologia che sarebbero state identificate qualora si fossero sottoposte a una colposcopia.

Le stime del rischio assoluto e cumulativo a 3 anni per  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 sono mostrate nella Tabella 18.

**Tabella 18:** Popolazione NILM di età uguale o superiore a 30 anni: rischi cumulativi e assoluti\* a 3 anni per  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 in funzione del risultato al basale di Aptima HPV assay e del test HPV DNA

	Risultato del test	Aptima HPV assay		Test HPV DNA	
		Rischio assoluto (95% CI)	Rischio relativo (95% CI)	Rischio assoluto (95% CI)	Rischio relativo (95% CI)
$\geq$ CIN2	Positivo	7.39 (5.12, 10.59)	22.55 (12.68, 40.10)	6.42 (4.50, 9.13)	22.71 (12.19, 42.29)
	Negativo	0.33 (0.21, 0.51)		0.28 (0.17, 0.47)	
	Prelavenza (%)	0.68		0.68	
$\geq$ CIN3	Positivo	4.66 (2.94, 7.36)	44.12 (16.91, 115.10)	4.14 (2.62, 6.52)	51.33 (17.74, 148.55)
	Negativo	0.11 (0.04, 0.25)		0.08 (0.03, 0.22)	
	Prelavenza (%)	0.34		0.35	

\*I rischi cumulativi a 3 anni adattati per altri possibili bias sono risultati simili ai rischi riportati in questa tabella. A causa delle differenze previste nei rischi al 1° e 2° anno per i due gruppi di donne dello studio di follow-up (quelle sottoposte a colposcopia al basale e quelle non sottoposte a colposcopia al basale), è stato riportato solo il rischio cumulativo a 3 anni per i gruppi combinati.

La prevalenza cumulativa a 3 anni per  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 nelle donne con risultati citologici NILM al basale stata rispettivamente dello 0,68% e dell'0,34%. Il rischio relativo per  $\geq$  CIN2 è stato pari a 22,55 (95% CI: 12,68, 40,10), a indicare che un donna con Aptima HPV assay positivo ha 22,55 volte più probabilità di avere un valore  $\geq$ CIN2 rispetto a una donna con Aptima HPV assay negativo. Il rischio relativo per  $\geq$  CIN3 è stato pari a 44,12 (95% CI: 16,91, 115,10).

## Prestazioni cliniche dell'Aptima HPV Assay con i campioni per citologia in fase liquida SurePath

### Campioni SurePath trattati con la soluzione di trasporto Aptima

I campioni per citologia in fase liquida SurePath sono stati raccolti da donne canadesi (n = 558) a cui era stato richiesto un follow-up a causa di uno o più Pap test anormali, un'infezione da HPV o altri motivi. Un'aliquota (0,5 ml) di ciascun campione è stata trasferita all'interno di una provetta di trasporto del campione Aptima per poi essere trattata con la soluzione di trasporto Aptima. Un singolo replicato di ciascun campione è stato analizzato con l'Aptima HPV assay. Da ciascun campione è stata tolta un'aliquota a parte (1 ml) da valutare con un test per l'HPV basato sulla PCR disponibile in commercio. La sensibilità clinica per l'individuazione dello stato patologico, definito come risultato istologico  $\geq$  CIN3,

è stata calcolata per l'Aptima HPV assay e per il test per l'HPV basato sulla PCR, come mostrato nella Tabella 19, con valori predittivi positivi e negativi.

**Tabella 19:** Prestazioni per l'individuazione di  $\geq$  CIN3 dell'Aptima HPV assay e del test per l'HPV basato sulla PCR

Prestazioni	Aptima HPV Assay N = 558		Test per l'HPV basato sulla PCR N = 558	
	Stima	(95% CI)	Stima	(95% CI)
<b>Sensibilità (%)</b>	89,3 (25/28)	(72,8 - 96,3)	89,3 (25/28)	(72,8 - 96,3)
<b>Specificità (%)</b>	56,8 (301/530)	(52,5 - 60,9)	49,1 (260/530)	(44,8 - 53,3)
<b>VPP (%)</b>	9,8 (25/254)	(8,1 - 11,2)	8,5 (25/295)	(7,0 - 9,5)
<b>VPN (%)</b>	99,0 (301/304)	(97,6 - 99,8)	98,9 (260/263)	(97,2 - 99,7)
<b>Prevalenza (%)</b>	5,0 (28/558)		5,0 (28/558)	

**Tabella 20:** Sensibilità dell'Aptima HPV assay con campioni per citologia in fase liquida SurePath e ThinPrep

Genotipo di HPV	Copie/ reazione	ThinPrep	SurePath
		% positivi (CI al 95%)	% positivi (CI al 95%)
16	60	98,3 (91,1-99,7)	100 (94,0-100)
18	100	100 (94,0-100)	100 (94,0-100)
31	25	100 (94,0-100)	95,0 (86,3-98,3)
33	60	96,7 (88,6-99,1)	98,3 (91,1-99,7)
35	25	100 (94,0-100)	100 (94,0-100)
39	25	100 (94,0-100)	91,7 (81,9-96,4)
45	40	100 (94,0-100)	95,0 (86,3-98,3)
51	250	100 (94,0-100)	100 (94,0-100)
52	600	100 (94,0-100)	98,3 (91,1-99,7)
56	100	98,3 (91,1-99,7)	93,3 (84,1-97,4)
58	50	95,0 (86,3-98,3)	93,3 (84,1-97,4)
59	75	96,7 (88,6-99,1)	91,7 (81,9-96,4)
66	150	98,3 (91,1-99,7)	95,0 (86,3-98,3)
68	30	96,7 (88,6-99,1)	93,3 (84,1-97,4)

### Prestazioni cliniche dell'Aptima HPV Assay con campioni prelevati con il kit di raccolta e trasporto dei campioni cervicali

Campioni appaiati per citologia in fase liquida ThinPrep e prelevati con il kit CSCT Aptima sono stati raccolti da 735 soggetti. Un millilitro (1,0 ml) di ciascun campione per citologia in fase liquida ThinPrep è stato diluito in 2,9 ml di terreno di trasporto del campione Aptima e un singolo replicato è stato analizzato con l'Aptima HPV assay sul Tigris DTS System. Un singolo replicato di ciascun campione CSCT è stato analizzato anche con l'Aptima HPV assay. È stata determinata la concordanza percentuale dell'Aptima HPV assay tra il campione per citologia in fase liquida ThinPrep e il campione CSCT e i risultati sono illustrati nella Tabella 21.

La concordanza percentuale positiva è risultata pari al 95,9% (intervallo di confidenza al 95%: 92,6-97,8), la concordanza percentuale negativa è risultata pari al 95,5% (intervallo di confidenza al 95%: 93,3-97,0) e la concordanza complessiva è risultata pari al 95,6% (intervallo di confidenza al 95%: 93,9-96,9). È stata osservata una forte correlazione fra i campioni per citologia in fase liquida e i campioni prelevati con il kit di trasporto ( $\kappa = 0,90$ ).

**Tabella 21:** Concordanza complessiva dei risultati dell'Aptima HPV assay ottenuti da campioni per citologia in fase liquida ThinPrep e da campioni prelevati con il kit di raccolta e trasporto di campioni cervicali Aptima analizzati sul Tigris DTS System

		Campione per citologia in fase liquida ThinPrep		Totale
		Positivo	Negativo	
Campione prelevato con kit CSCT Aptima	Positivo	234	22	256
	Negativo	10	469	479
	Totale	244	491	735

Concordanza positiva = 95,9% (92,6-97,8)

Concordanza negativa = 95,5% (93,3-97,0)

Concordanza complessiva = 95,6% (93,9-96,9)

Coefficiente kappa = 0,90

## Sensibilità analitica

Il limite l'individuazione (Limit of Detection, LOD) al cutoff clinico è la concentrazione di RNA dell'HPV che fornisce un risultato positivo (al di sopra del cutoff clinico) nel 95% dei casi. Il LOD dell'Aptima HPV assay è stato determinato analizzando i pannelli di diluizione dei trascritti *in vitro* (In Vitro Transcripts, IVT) per tutti i 14 genotipi ad alto rischio e per tutte e 4 le linee cellulari infette da HPV: SiHa, HeLa, MS751 e ME180 (ATCC, Manassas, Virginia). Per i pannelli IVT, prima di procedere all'analisi il terreno di trasporto del campione è stato addizionato con IVT a varie concentrazioni e successivamente diluito con i singoli campioni negativi per citologia in fase liquida ThinPrep. Per i pannelli di cellule infette da HPV, prima di procedere all'analisi i pool di campioni per citologia in fase liquida ThinPrep negativi all'HPV sono stati addizionati con cellule infette da HPV a varie concentrazioni e successivamente diluiti con il terreno di trasporto del campione. Trenta replicati di ciascun livello di copie sono stati analizzati con ciascuno di due lotti di reagenti, per un totale di 60 replicati. L'analisi è stata eseguita nell'arco di 14 giorni, con 1-12 sessioni analitiche al giorno e 5 replicati di un dato genotipo e di una data concentrazione analizzati in ogni sessione analitica. Il limite l'individuazione del 95% è stato calcolato dall'analisi della regressione probit dei risultati di positività per ciascun pannello di diluizione.

I risultati dell'analisi probit, come riportato nella Tabella 22, mostrano che i limiti di individuazione al 95% per l'HPV di tipo 16, 18, 31, 33, 35, 38, 45, 58, 59 e 68 sono stati inferiori a 100 copie/reazione e i limiti di individuazione al 95% per i tipi 51, 52, 56 e 66 sono stati compresi tra 100 e 300 copie/reazione. I limiti di individuazione al 95% per le quattro linee cellulari analizzate sono stati inferiori a 1 cellula/reazione.

**Tabella 22:** Limite di rilevamento al cutoff clinico dell'Aptima HPV assay

Target	Limite di individuazione* (CI al 95%)
HPV 16	48,7 (36,6 - 72,2)
HPV 18	80,9 (60,4 - 118,4)
HPV 31	18,6 (14,2 - 27,3)
HPV 33	49,1 (37,0 - 71,3)
HPV 35	19,1 (14,2 - 29,1)
HPV 39	24,6 (19,1 - 34,4)
HPV 45	33,8 (25,7 - 49,4)
HPV 51	206,6 (157,5 - 297,7)
HPV 52	266,2 (205,5 - 373,8)
HPV 56	100,1 (81,9 - 129,9)
HPV 58	48,0 (37,3 - 68,7)
HPV 59	49,0 (36,4 - 75,9)
HPV 66	168,7 (129,6 - 241,1)
HPV 68	27,0 (20,3 - 40,1)
SiHa	0,30 (0,24 - 0,43)
HeLa	0,18 (0,14 - 0,29)
ME180	0,11 (0,09 - 0,16)
MS751	0,19 (0,14 - 0,33)

\*Copie per reazione per trascritti *in vitro* e cellule per reazione per linee cellulari

## Precisione del test

La precisione dell'Aptima HPV assay è stata valutata in due studi utilizzando lo stesso pannello da 20 elementi. Lo studio 1 è stato condotto in 3 centri di analisi esterni per determinare la riproducibilità del test. Lo studio 2 è stato condotto internamente per misurare la ripetibilità del test. Il pannello comprendeva 10 elementi positivi all'HPV con concentrazioni pari o superiori al limite di individuazione del test (positività attesa:  $\geq 95\%$ ), 4 elementi positivi all'HPV con concentrazioni inferiori al limite di individuazione del test (positività attesa: da  $> 0\%$  a  $< 25\%$ ) e 6 elementi negativi all'HPV. Gli elementi del pannello positivi all'HPV sono stati preparati aggiungendo trascritti di RNA *in vitro* (IVT) al terreno di trasporto del campione (Specimen Transport Medium, STM) o cellule in coltura infette da HPV (SiHa, HeLa, ME180 e MS751; ATCC, Manassas, Virginia) alla soluzione PreservCyt. Gli elementi del pannello negativi all'HPV sono stati preparati con STM o con pool di campioni residui per citologia in fase liquida ThinPrep.

Nello studio 1, 2 operatori in ciascuno dei 3 centri di analisi (1 strumento per centro) hanno eseguito 1 lista di lavoro dell'Aptima HPV assay al giorno nell'arco di 3 giorni per ciascuno dei 3 lotti di reagenti. Ogni lista di lavoro conteneva 3 replicati per ciascuno degli elementi del pannello di riproducibilità. Per ciascun elemento del pannello sono state analizzate centosessantadue (162) singole provette di campione (3 centri x 1 strumento x 2 operatori x 3 lotti x 3 liste di lavoro x 3 replicati). Nello studio 2, l'analisi è stata condotta internamente nell'arco di 20 giorni per un totale di 162 reazioni analizzate per ciascun elemento del pannello (1 centro x 3 strumenti x 3 operatori x 3 lotti x 2 liste di lavoro x 3 replicati).

Gli elementi del pannello sono descritti nella Tabella 23a (elementi del pannello con risultati positivi attesi) e nella Tabella 23b (elementi del pannello con risultati negativi attesi), insieme a un riepilogo della concordanza con i risultati attesi e con i valori dell'S/CO dell'analita in base ai percentili della distribuzione dell'S/CO di ordine 2,5, 50 e 97,5. La variabilità dell'S/CO dell'analita per gli elementi del pannello con i risultati positivi attesi è riportata nella Tabella 24 per lo studio 1 e nella Tabella 25 per lo studio 2.

La concordanza positiva per gli elementi del pannello positivi all'HPV con concentrazioni pari o superiori al limite di individuazione del test ha mostrato valori compresi tra il 95,1% e il 100% nello studio 1 e tra il 93,2% e il 100% nello studio 2 per 9 dei 10 elementi del pannello. I restanti elementi del pannello positivi all'HPV hanno prodotto una concordanza del 77,2% nello studio 1 e del 79,0% nello studio 2, che è risultata inferiore a quella attesa, ma coerente tra i due studi. La concordanza negativa per i membri del pannello negativi all'HPV con concentrazioni inferiori al limite di individuazione del test ha mostrato valori compresi tra il 78,8% e il 93,8% nello studio 1 e tra l'82,1% e il 95,7% nello studio 2. La concordanza con i risultati attesi per gli elementi del pannello negativi all'HPV ha mostrato valori compresi tra il 96,9% e il 100% nello studio 1 e tra il 96,3% e il 100% nello studio 2.



**Tabella 23a:** Studio di riproducibilità 1 e 2 dell'Aptima HPV assay: descrizione del pannello, concordanza positiva e distribuzione percentile dei valori dell'S/CO dell'analita per gli elementi del pannello con risultati positivi attesi

Descrizione del pannello (copie o cellule/reazione)	Studio 1 (3 centri di analisi)	Studio 2 (1 centro di analisi)
	Concordanza positiva % (CI al 95%)	Concordanza positiva % (CI al 95%)
<b>IVT HPV 16 e HPV 18 (100 copie)</b>	100 (161/161) (97,7, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>Cellule SiHa (3 cellule) e cellule HeLa (7,5 cellule)</b>	100 (162/162) (97,7, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>IVT HPV 18 (100 copie)</b>	100 (162/162) (97,7, 100)	100 (160/160) (97,7, 100)
<b>IVT HPV 16 (100 copie)</b>	100 (162/162) (97,7, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>Cellule MS751 (1 cellula)</b>	99,4 (161/162) (96,6, 99,9)	96,9 (157/162) (93,0, 98,7)
<b>Cellule ME180 (0,3 cellule)</b>	95,1 (154/162) (90,6, 97,5)	93,2 (151/162) (88,3, 96,2)
<b>IVT HPV 18 (30 copie)</b>	99,4 (161/162) (96,6, 99,9)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>IVT HPV 16 (30 copie)</b>	100 (162/162) (97,7, 100)	97,5 (158/162) (93,8, 99,0)
<b>Cellule HeLa (2,5 cellule)</b>	100 (162/162) (97,7, 100)	95,6 (152/159) (91,2, 97,9)
<b>Cellule SiHa (1 cellula)*</b>	77,2 (125/162) (70,1, 83,0)	79,0 (128/162) (72,1, 84,6)

IVT = trascritto *in vitro* L'IVT è stato addizionato all'STM e le cellule sono state addizionate alla soluzione PreservCyt.

\*Concordanza positiva % attesa ~ 95%; concordanza osservata inferiore probabilmente a causa della variabilità legata al modo in cui è stato prodotto l'elemento del pannello.

**Tabella 23b:** Studio di riproducibilità 1 e 2 dell'Aptima HPV assay: descrizione del pannello, concordanza negativa e distribuzione percentile dei valori dell'S/CO dell'analita per gli elementi del pannello con risultati negativi attesi

Descrizione del pannello (copie o cellule/reazione)	Studio 1 (3 centri di analisi)	Studio 2 (1 centro di analisi)
	Concordanza negativa % (CI al 95%)	Concordanza negativa % (CI al 95%)
<b>IVT HPV 18 (1 copia)*</b>	78,8 (126/160) (71,8, 84,4)	83,3 (135/162) (76,8, 88,3)
<b>IVT HPV 16 (1 copia)*</b>	80,9 (131/162) (74,1, 86,2)	88,3 (143/162) (82,4, 92,4)
<b>Cellule HeLa (0,05 cellule)*</b>	79,0 (128/162) (72,1, 84,6)	82,1 (133/162) (75,5, 87,2)
<b>Cellule SiHa (0,03 cellule)*</b>	93,8 (152/162) (89,0, 96,6)	95,7 (155/162) (91,4, 97,9)
<b>STM lotto 1</b>	100 (162/162) (97,7, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>STM lotto 2</b>	99,4 (160/161) (96,6, 99,9)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>STM lotto 3</b>	99,4 (161/162) (96,6, 99,9)	99,4 (161/162) (96,6, 99,9)
<b>Pool 1 ThinPrep</b>	97,5 (158/162) (93,8, 99,0)	97,5 (158/162) (93,8, 99,0)
<b>Pool 2 ThinPrep</b>	96,9 (157/162) (93,0, 98,7)	96,3 (156/162) (92,2, 98,3)
<b>Pool 3 ThinPrep</b>	100 (162/162) (97,7, 100)	99,4 (161/162) (96,6, 99,9)

STM = terreno di trasporto del campione; IVT = trascritto *in vitro*. L'IVT è stato addizionato all'STM e le cellule sono state addizionate alla soluzione PreservCyt.

\*Concordanza negativa % attesa > 75% e < 100%.

**Tabella 24:** Studio di riproducibilità 1 dell'Aptima HPV assay: variabilità del segnale per gli elementi del pannello con risultati positivi attesi

Descrizione del pannello (copie o cellule/reazione)	n.	S/CO medio	Tra i siti		Tra gli operatori		Tra i lotti		Tra le liste di lavoro		All'interno delle liste di lavoro		Totale	
			DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)
IVT HPV 16 e HPV 18 (100 copie)	161 <sup>^</sup>	23,4	0,1	0,4	0,1	0,4	0,9	4,0	0	0	1,6	7,0	1,9	8,1
Cellule SiHa (3 cellule) e cellule HeLa (7,5 cellule)	162	17,9	0	0	1,4	8,1	0	0	0,6	3,1	5,1	28,6	5,3	29,9
IVT HPV 18 (100 copie)	162	11,8	0	0	0	0	0,8	6,4	0,1	0,9	1,2	10,1	1,4	12,0
IVT HPV 16 (100 copie)	162	10,8	0,2	1,5	0	0	0,1	1,1	0,3	2,6	0,3	3,1	0,5	4,5
Cellule MS751 (1 cellula)	162	13,3	0,3	2,1	0	0	1,0	7,8	0,9	7,1	2,2	16,2	2,6	19,4
Cellule ME180 (0,3 cellule)	162	6,5	0,2	3,2	0	0	0,6	8,6	0,4	5,5	2,4	36,2	2,5	37,7
IVT HPV 18 (30 copie)	162	9,0	0,7	7,3	0	0	0,7	7,2	0,8	8,3	2,3	25,3	2,6	28,5
IVT HPV 16 (30 copie)	162	10,8	0,1	0,8	0	0	0,1	1,3	0,4	3,8	0,9	8,4	1,0	9,3
Cellule HeLa (2,5 cellule)	162	12,4	0	0	0,4	3,3	0,4	3,1	0	0	2,3	18,4	2,4	19,0
Cellule SiHa (1 cellula)	162	7,5	0,3	3,7	1,0	13,0	0	0	0	0	4,8	63,6	4,9	65,0

DS = deviazione standard; CV = coefficiente di variazione; IVT = trascritto *in vitro*; S/CO = rapporto segnale/cutoff

<sup>^</sup>Un campione ha prodotto un risultato non valido con l'Aptima HPV assay e non è stato incluso nell'analisi.

**Nota** - La variabilità da alcuni fattori può risultare numericamente negativa. Tale circostanza si verifica se la variabilità dovuta a questi fattori è molto piccola. In questi casi, il valore di DS e CV è indicato come pari a 0.

**Tabella 25:** Studio di riproducibilità 2 dell'Aptima HPV assay: variabilità del segnale per gli elementi del pannello con risultati positivi attesi

Descrizione del pannello (copie o cellule/reazione)	n.	S/CO medio	Tra gli strumenti		Tra gli operatori		Tra i lotti		Tra le liste di lavoro		All'interno delle liste di lavoro		Totale	
			DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)
IVT HPV 16 e HPV 18 (100 copie)	162	23,2	0,4	1,5	0,6	2,3	0,8	3,4	0,8	3,4	1,5	6,3	2,0	8,4
Cellule SiHa (3 cellule) e cellule HeLa (7,5 cellule)	162	18,6	0	0	1,7	9,3	0	0	3,5	18,6	3,7	20,0	5,4	28,9
IVT HPV 18 (100 copie)	160 <sup>^</sup>	11,9	0,1	0,6	0,2	1,6	0,8	7,0	0,4	3,6	1,3	11,3	1,7	13,8
IVT HPV 16 (100 copie)	162	10,8	0	0	0,1	1,3	0	0	0,2	2,2	0,7	6,1	0,7	6,6
Cellule MS751 (1 cellula)	162	13,6	0	0	0,6	4,3	0	0	2,5	18,4	2,1	15,2	3,3	24,2
Cellule ME180 (0,3 cellule)	162	5,8	0	0	0,6	10,8	0,5	9,4	2,2	36,9	1,7	29,7	2,9	49,5
IVT HPV 18 (30 copie)	162	8,8	0,4	4,4	0,5	6,0	0,7	7,9	1,0	11,5	1,9	21,4	2,4	26,6
IVT HPV 16 (30 copie)	162	10,5	0	0	0,1	1,3	0,2	2,0	1,6	14,9	1,2	11,2	2,0	18,8
Cellule HeLa (2,5 cellule)	159 <sup>^</sup>	12,0	0,6	5,1	1,0	8,5	0	0	2,8	23,8	2,0	16,6	3,7	30,6
Cellule SiHa (1 cellula)	162	7,4	0,9	12,5	0	0	0,7	9,3	1,8	24	4,2	56,8	4,7	63,8

DS = deviazione standard; CV = coefficiente di variazione; IVT = trascritto *in vitro*; S/CO = rapporto segnale/cutoff

<sup>^</sup>Cinque campioni hanno prodotto risultati non validi con l'Aptima HPV assay, di cui 2 per l'IVT dell'HPV 18 (100 copie) e 3 per le cellule HeLa (2,5 cellule) e non sono stati inclusi nell'analisi.

**Nota** - La variabilità da alcuni fattori può risultare numericamente negativa. Tale circostanza si verifica se la variabilità dovuta a questi fattori è molto piccola. In questi casi, il valore di DS e CV è indicato come pari a 0.

È stato condotto anche un terzo studio per determinare la riproducibilità del test analizzando un pannello da 6 elementi di campioni per citologia in fase liquida ThinPrep raggruppati in pool. Sei pool unici di campioni per citologia in fase liquida ThinPrep negativi all'HPV sono stati preparati come matrice, due dei quali sono stati analizzati come elementi del pannello negativi all'HPV. Quattro pool unici di campioni per citologia in fase liquida ThinPrep positivi all'HPV sono stati utilizzati per preparare gli elementi del pannello con alta positività (n = 2) e bassa positività (n = 2) all'HPV. Gli elementi del pannello con bassa positività avevano concentrazioni al limite di individuazione del test (positività attesa:  $\geq 95\%$  determinata per ciascun singolo pool positivo all'HPV dalle diluizioni seriali dei pool per l'analisi). Gli elementi del pannello con alta positività avevano concentrazioni superiori al limite di individuazione di un fattore di 1-2 log per ciascun pool positivo all'HPV (positività attesa: 100%). Nel giorno stabilito per l'analisi, ciascun elemento del pannello è stato trasferito (1 ml) in una provetta di trasferimento del campione Aptima contenente STM. L'analisi è stata condotta internamente da 2 operatori utilizzando 1 lotto di reagenti, 3 strumenti, nell'arco di 6 giorni (3 giorni per ciascun operatore), eseguendo 2 sessioni analitiche al giorno nelle quali il pannello è stato analizzato in duplicato.

Gli elementi del pannello sono descritti nella Tabella 26, insieme a un riepilogo della concordanza con i risultati attesi e con i valori dell'S/CO dell'analita in base ai percentili della distribuzione del segnale di ordine 2,5, 50 e 97,5. La variabilità dell'S/CO dell'analita per gli elementi del pannello con risultati positivi attesi è mostrata nella Tabella 27.

La concordanza è stata del 100% per gli elementi del pannello positivi all'HPV,  $\geq 98,6\%$  per gli elementi del pannello con bassa positività all'HPV e  $\geq 94,4\%$  per gli elementi del pannello negativi all'HPV.

**Tabella 26:** Studio di riproducibilità 3 dell'Aptima HPV assay: descrizione del pannello, concordanza percentuale

Descrizione del pannello	Concordanza % (CI al 95%)
Basso positivo 1	98,6 (71/72) (92,5, 99,8)
Basso positivo 2	100 (72/72) (94,9, 100)
Alto positivo 1	100 (72/72) (94,9, 100)
Alto positivo 2	100 (72/72) (94,9, 100)
Negativo 1	98,6 (71/72) (92,5, 99,8)
Negativo 2	94,4 (68/72) (86,6, 97,8)

**Tabella 27:** Studio di riproducibilità 3 dell'Aptima HPV assay: analisi del segnale per gli elementi del pannello con risultati positivi attesi

Descrizione del pannello	n.	S/CO medio	Tra gli strumenti		Tra gli operatori		Tra i lotti		Tra le liste di lavoro		All'interno delle liste di lavoro		Totale	
			DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)
Basso positivo 1	72	9,8	0	0	0	0	0	0	2,2	22,8	3,0	30,4	3,7	38,0
Basso positivo 2	72	10,5	0	0	2,2	21,0	0,9	9,0	3,7	35,3	2,7	26,1	5,2	49,5
Alto positivo 1	72	22,7	1,3	5,6	0	0	0,1	0,5	3,0	13,3	3,7	16,4	5,0	21,9
Alto positivo 2	72	23,9	0	0	0	0	0	0	2,9	12,3	3,0	12,4	4,2	17,4

DS = deviazione standard; CV = coefficiente di variazione; S/CO = rapporto segnale/cutoff

**Nota** - La variabilità da alcuni fattori può risultare numericamente negativa. Tale circostanza si verifica se la variabilità dovuta a questi fattori è molto piccola. In questi casi, il valore di DS e CV è indicato come pari a 0.

## Reattività crociata

La specificità analitica dell'Aptima HPV assay è stata valutata con soluzioni PreservCyt diluite 1:2,9 in STM e arricchite con batteri, lieviti o funghi in coltura, virus in coltura oppure trascritti *in vitro* di HPV a basso rischio. Gli organismi e le concentrazioni di analisi sono identificati nella Tabella 28. I criteri di studio per la valutazione dell'effetto della presenza dei microrganismi sulla specificità del test si sono basati sulla positività. La reattività crociata è stata osservata con i genotipi 26, 67, 70 e 82 dell'HPV a basso rischio, ma non è stata osservata con nessuno degli altri organismi analizzati.

**Tabella 28:** Pannello di specificità analitica – Organismi e concentrazione senza reattività crociata

Organismo	Concentrazione di analisi senza reattività crociata	Organismo	Concentrazione di analisi senza reattività crociata
<b>Batteri</b>			
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Listeria monocytogenes</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Actinomyces israelii</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Micrococcus luteus</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Mobiluncus curtisii</i>	2x10 <sup>7</sup> UFC/ml
<i>Atopobium vaginae</i>	5x10 <sup>7</sup> UFC/ml	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Bacillus cereus</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Mycoplasma fermentans</i>	5x10 <sup>7</sup> UFC/ml
<i>Bacteroides fragilis</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Mycoplasma genitalium</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Mycoplasma hominis</i>	5x10 <sup>7</sup> UFC/ml
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Bifidobacterium breve</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Chlamydia trachomatis</i>	2,5x10 <sup>7</sup> UFC/ml 2,3x10 <sup>5</sup> DICT <sub>50</sub> /ml
<i>Campylobacter fetus-fetus</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Neisseria meningitidis</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	3,2x10 <sup>5</sup> DICT <sub>50</sub> /ml	<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Clostridium difficile</i>	6x10 <sup>7</sup> UFC/ml	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Propionibacterium acnes</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Corynebacterium genitalium</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Proteus mirabilis</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Corynebacterium xerosis</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Proteus vulgaris</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Enterobacter cloacae</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Providencia stuartii</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Enterococcus faecalis</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Escherichia coli</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Ruminococcus productus</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Fingoldia magna</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Serratia marcescens</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Staphylococcus aureus</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Gardnerella vaginalis</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Haemophilus ducreyi</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Lactobacillus crispatus</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml
<i>Lactobacillus jensenii</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml		
<b>Lieviti/protozoi</b>			
<i>Candida albicans</i>	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1x10 <sup>7</sup> cellule/ml

**Tabella 28:** Pannello di specificità analitica – Organismi e concentrazione senza reattività crociata

Organismo	Concentrazione di analisi senza reattività crociata	Organismo	Concentrazione di analisi senza reattività crociata
<b>Virus</b>			
Adenovirus 2	1x10 <sup>7</sup> vp/ml	Virus dell'Herpes simplex 1	2,5x10 <sup>5</sup> DICT <sub>50</sub> /ml
Cytomegalovirus	5,6x10 <sup>2</sup> DICT <sub>50</sub> /ml	Virus dell'Herpes simplex 2	5x10 <sup>4</sup> DICT <sub>50</sub> /ml
Virus di Epstein-Barr	4,3x10 <sup>6</sup> pv/ml	SV40	1,2 x10 <sup>4</sup> DICT <sub>50</sub> /ml
HIV-1	1,0x10 <sup>6</sup> copie/ml		
<b>Genotipi di HPV senza target</b>			
HPV 6	2,5x10 <sup>6</sup> copie/ml	HPV 61	2,5x10 <sup>6</sup> copie/ml
HPV 11	2,5x10 <sup>6</sup> copie/ml	<b>HPV 67</b>	1 copia/ml
<b>HPV 26</b>	2,5 copie/ml	HPV 69	2,5x10 <sup>6</sup> copie/ml
HPV 30	2,5x10 <sup>6</sup> copie/ml	<b>HPV 70</b>	1 copia/ml
HPV 34	2,5x10 <sup>6</sup> copie/ml	HPV 71	2,5x10 <sup>6</sup> copie/ml
HPV 42	2,5x10 <sup>6</sup> copie/ml	HPV 73	2,5x10 <sup>6</sup> copie/ml
HPV 43	2,5x10 <sup>6</sup> copie/ml	HPV 81	2,5x10 <sup>6</sup> copie/ml
HPV 44	2,5x10 <sup>6</sup> copie/ml	<b>HPV 82</b>	1 copia/ml
HPV 53	2,5x10 <sup>6</sup> copie/ml	HPV 85	2,5x10 <sup>6</sup> copie/ml
HPV 54	2,5x10 <sup>6</sup> copie/ml		

pv = particelle virali

UFC = unità formanti colonie

DICT<sub>50</sub> = dose infettante mediana per colture di tessuti

**Nota** - Le voci in grassetto indicano i genotipi in cui è stata osservata reattività crociata (positività > 5%) quando l'analisi è stata eseguita a concentrazioni più elevate di quelle indicate nella tabella.

La sensibilità analitica dell'Aptima HPV assay in presenza di microrganismi è stata valutata con lo stesso pannello descritto nella Tabella 28, che è stato anche addizionato con una bassa concentrazione di cellule SiHa infettate da HPV (1 cellula per reazione). I criteri di studio per la valutazione dell'effetto della presenza dei microrganismi sulla sensibilità del test si sono basati sulla positività. Nessuno degli altri organismi analizzati ha influito sulla sensibilità dell'Aptima HPV assay.

## Interferenza

Le sostanze descritte nella Tabella 29 sono state addizionate singolarmente alla soluzione PreservCyt all'1% e al 10% v/v o p/v, diluite con STM e quindi analizzate con l'Aptima HPV assay. Tutte le sostanze sono state analizzate in presenza e in assenza di cellule in coltura infette con HPV (SiHa, 3 cellule/reazione). È stata osservata interferenza con due dei sette lubrificanti contenenti poliquaternio 15 e con uno dei cinque farmaci antimicotici contenenti tioconazolo. L'interferenza non è stata osservata con nessuna delle altre sostanze analizzate.

Tabella 29: Sostanze testate per possibile interferenza con l'Aptima HPV assay

Categoria di prodotto	Tipo e marca del prodotto	Concentrazione più alta* analizzata che non ha interferito con le prestazioni del test
<b>Lubrificante</b>	KY Sensual Mist	10% v/v
	KY Warming gelatina	10% p/v
	KY Warming liquido	10% v/v
	Lubrificante intimo di marca CVS	10% p/v
	Lozione per massaggio riscaldante e lubrificante intimo di marca Target	10% v/v
	Lubrificante personale Astroglide	0,3% p/v (0,075% p/v campione di analisi)
	Liquido lubrificante di marca target	0,1% v/v (0,025% v/v campione di analisi)
<b>Spermicida</b>	Gynol II contraccettivo vaginale formula originale	10% p/v
	Gynol II contraccettivo vaginale formula extra forte	10% p/v
	Delfen schiuma contraccettiva vaginale	10% p/v
	Encare contraccettivo vaginale	10% p/v
	Conceptrol contraccettivo vaginale	10% p/v
<b>Farmaco anti-fungino/anti-prurito</b>	Vagisil Maximum Strength	10% p/v
	Monistat Soothing Care	10% p/v
	Monistat 3 Combination Pack	10% p/v
	Tioconazolo 1 marca Target	0,3% p/v (0,075% p/v campione di analisi)
	Miconazolo 3 marca Target	10% p/v
<b>Acido acetico glaciale</b>	EMD M/N AX0073-11	10% v/v
<b>Sangue intero</b>	Sangue intero	10% v/v

\*Lubrificanti personali che contengono poliquaternio 15.



## Risultati attesi sul Panther System: prevalenza di mRNA dell'HPV ad alto rischio

La prevalenza dell'infezione da HPV ad alto rischio varia notevolmente ed è influenzata da diversi fattori fra i quali l'età, che contribuisce in misura maggiore.<sup>32,33</sup> Molti studi hanno esaminato la prevalenza dell'HPV in base ai dati ottenuti dall'individuazione del DNA dell'HPV, tuttavia sono pochi gli studi che riportano la prevalenza in base all'individuazione dell'mRNA dell'HPV oncogeno. Donne provenienti da numerosi centri clinici (n = 18) rappresentative di un'ampia distribuzione geografica e di una popolazione variegata (10 stati all'interno degli Stati Uniti) sono state inserite in uno studio clinico prospettico noto come sperimentazione CLEAR.<sup>34</sup> Come determinato dall'Aptima HPV assay sul Panther System, la prevalenza dei campioni positivi all'mRNA dell'HPV osservata nella sperimentazione clinica è stata suddivisa in categorie, complessivamente, per gruppo di età e per centro di analisi. I risultati sono riportati nella Tabella 30 per le popolazioni cellule squamose atipiche di significato indeterminato (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, ASC-US) e negativo per lesione intraepiteliale o malignità (Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy, NILM).

**Tabella 30:** Prevalenza di mRNA dell'HPV ad alto rischio per gruppo di età, centro di analisi e totale delle due categorie

	Percentuale di positività % (x/n)	
	Popolazione ASC-US (≥ 21 anni)	Popolazione NILM (≥ 30 anni)
<b>Tutti</b>	42,3 (404/956)	4,7 (512/10.860)
<b>Gruppo di età (anni)</b>		
<b>Da 21 a 29</b>	60,0 (251/418)	N/P
<b>Da 30 a 39</b>	38,1 (101/265)	6,8 (286/4.192)
<b>≥ 40</b>	19,0 (52/273)	3,4 (226/6.668)
<b>Centro di analisi</b>		
<b>1</b>	41,5 (134/323)	3,7 (304/8.286)
<b>2</b>	43,1 (137/318)	9,2 (118/1.285)
<b>3</b>	42,2 (133/315)	7,0 (90/1.289)

N/P = non pertinente

## Progetto di studio clinico dell'Aptima HPV Assay con campioni per citologia in fase liquida ThinPrep

L'Aptima HPV assay di Panther System è stato valutato utilizzando i campioni per citologia di riferimento residui raccolti da donne consenzienti durante lo studio clinico prospettico multicentrico statunitense noto come Studio CLEAR.<sup>34</sup>

### Studio CLEAR - Valutazione al follow-up

Lo studio multicentrico, noto come studio CLEAR, è stato condotto allo scopo di determinare le prestazioni cliniche dell'Aptima HPV assay su Tigris DTS System per l'individuazione della neoplasia intraepiteliale cervicale di grado 2 o della cervicopatia di grado più alto ( $\geq$  CIN2). Lo studio CLEAR comprendeva una valutazione al basale e una valutazione al follow-up della durata di 3 anni. Le donne sono state inserite nello studio ASC-US o nello studio NILM in base ai risultati citologici ottenuti durante uno screening routinario del tumore della cervice. La popolazione dello studio ASC-US includeva donne di età pari o superiore a 21 anni con risultati citologici ASC-US e la popolazione dello studio NILM includeva donne di età pari o superiore a 30 anni con risultati citologici NILM. Lo studio NILM è stato progettato a supporto della richiesta di screening aggiuntiva per le donne di età pari o superiore a 30 anni, in quanto le donne in questa fascia di età con risultati citologici più rilevanti rispetto al risultato ASC-US devono procedere alla colposcopia indipendentemente dal loro stato di infezione da HPV.<sup>35</sup>

Sono state arruolate donne provenienti da 18 centri clinici, principalmente cliniche di ostetricia e ginecologia, con un'ampia distribuzione geografica e una popolazione variegata. Le donne risultate idonee sono state assegnate allo studio ASC-US o allo studio NILM in base al loro campione di riferimento per citologia in fase liquida ThinPrep. Al basale, i campioni di riferimento residui di donne partecipanti allo studio ASC-US e allo studio NILM sono stati inizialmente analizzati sia con l'Aptima HPV assay sul Tigris DTS System sia con un test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio. I campioni sono stati quindi archiviati e conservati a  $-70$  °C fino a quando non sono stati analizzati con l'Aptima HPV assay sul Panther System.

Nello studio CLEAR al basale tutte le donne inserite nello studio ASC-US sono state sottoposte a colposcopia, indipendentemente dai risultati del test dell'HPV. Sono stati effettuati due tipi di prelievo: una biopsia con raschiamento endocervicale (Endocervical Curettage, ECC) e una biopsia con puntura cervicale (1 biopsia da ciascuno dei 4 quadranti). Se la lesione era visibile, la biopsia è stata eseguita con puntura (metodo diretto, 1 biopsia per lesione), mentre per i quadranti che non mostravano una lesione visibile la biopsia è stata eseguita alla giunzione squamocolumnare (metodo random).

Nello studio NILM, le donne positive all'Aptima HPV assay sul Tigris DTS System e/o al test del DNA dell'HPV disponibile in commercio, come pure donne scelte a caso negative a entrambi i test sono state sottoposte a colposcopia per una valutazione al basale. Le donne scelte a caso negative a entrambi i test sono state incluse nello studio per correggere il bias di verifica con stime prestazionali adattate generate utilizzando un metodo di imputazione multipla. A ciascuna donna sottoposta a colposcopia è stata effettuata una biopsia ECC. Le biopsie sono state effettuate con puntura solo in presenza di lesioni visibili (metodo diretto, 1 biopsia per lesione).

Lo stato della malattia è stato determinato mediante un pannello di valutazione consensuale degli esami istologici, basato sulle valutazioni concordanti di almeno 2 patologi esperti. I patologi esperti sono stati tenuti all'oscuro dello stato di infezione da HPV della donna, nonché del loro stato citologico e delle rispettive diagnosi istologiche. In caso di disaccordo, i 3 patologi hanno dovuto esaminare i vetrini mediante un microscopio multiteste fino a

raggiungere il consenso. Per evitare il bias, gli sperimentatori, i medici e le donne sono stati tenuti all'oscuro dei risultati del test dell'HPV fino al completamento dell'esame colposcopico. Al basale sono state determinate le prestazioni cliniche dell'Aptima HPV assay sul Panther System per l'individuazione di CIN2 o di grado superiore ( $\geq$  CIN2) e di neoplasia intraepiteliale cervicale di grado 3 o superiore ( $\geq$  CIN3) in relazione allo stato della patologia cervicale stabilito al basale. Sono state determinate anche le prestazioni cliniche del test per il DNA dell'HPV disponibile commercialmente per il confronto diretto con i risultati dell'Aptima HPV assay.

### **CLEAR Trial – Studio CLEAR - Valutazione al follow-up**

Le donne dello studio NILM di 14 centri clinici sono risultate idonee a partecipare alla fase di follow-up della durata di 3 anni dello studio se: i) si erano sottoposte a una visita con colposcopia al basale e non avevano un  $\geq$ CIN2, oppure ii) non si erano sottoposte a una visita con colposcopia al basale. La fase di follow-up dello studio consisteva in visite a cadenza annuale. Durante queste visite, a ogni donna veniva prelevato un campione cervicale per citologia, e alcune donne venivano sottoposte a un test per HPV di tipo commerciale. Le donne con ASC-US o risultati citologici più severi durante il periodo di follow-up venivano sottoposte a una nuova colposcopia eseguita con le stesse procedure di biopsia ed esame istologico impiegate per la valutazione al basale dello studio NILM. Lo stato della patologia cervicale in occasione di una visita di follow-up era considerato "negativo" in base alla citologia NILM oppure, per le donne con risultati anormali nel test citologico, in base a risultati normali o a un pannello di valutazione consensuale degli esami istologici CIN1. Il periodo di follow-up veniva considerato completato per le donne con risultati  $\geq$ CIN2 rilevati durante tale periodo e non dovevano sottoporsi a visite dopo l'individuazione di valori  $\geq$ CIN2. Il follow-up veniva considerato completato per le donne per cui non veniva rilevato un valore  $\geq$ CIN2 durante il periodo di follow-up ma che si erano sottoposte a visita nel 1° e/o nel 2° anno e nel 3° anno di follow-up.

L'obiettivo dello studio di follow-up era confrontare il rischio cumulativo di patologia cervicale a 3 anni nelle donne con risultati Aptima HPV assay positivi al basale rispetto a quelle con risultati Aptima HPV assay negativi. Lo stato della patologia cervicale a 3 anni è stato determinato come segue:

- Stato di patologia cervicale positivo ( $\geq$ CIN2 e/o  $\geq$ CIN3): donne con valori  $\geq$ CIN2 rilevati al basale o durante il follow-up.
- Stato di patologia cervicale negativo ( $<$ CIN2): donne che avevano completato il follow-up senza  $\geq$ CIN2 e che non erano considerate soggette a uno stato di patologia cervicale "indeterminato".
- Stato di patologia cervicale indeterminato: donne che presentavano risultati del test citologico anormali durante il follow-up e che non disponevano di un successivo risultato del pannello di valutazione consensuale degli esami istologici, oppure donne con risultati citologici inadeguati alla loro ultima visita.
- Persa durante il follow-up: donne che non avevano completato il follow-up e non erano considerate soggette a uno stato di patologia cervicale "indeterminato".

Sono state valutate le prestazioni cliniche dell'Aptima HPV assay su Panther System nell'individuazione di  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 in relazione a uno stato di patologia cervicale a 3 anni.

## Prestazioni del Panther System assay

### Popolazione ASC-US di età pari o superiore a 21 anni: prestazioni cliniche dell'Aptima HPV Assay

Complessivamente, nello studio ASC-US sono state inserite 1.252 donne di età pari o superiore a 21 anni con risultati citologici ASC-US. Di queste, 294 sono state ritirate dallo studio. Le restanti 958 donne sono risultate idonee all'analisi sul Panther System. Per due donne sono mancati i campioni e 19 donne hanno avuto una diagnosi di malattia indeterminata; tutte sono state escluse dall'analisi. Le restanti 937 donne valutabili erano di età pari o superiore a 21 anni con risultati citologici ASC-US, risultati dell'Aptima HPV assay sul Panther System e stato conclamato della malattia. Novantuno (91) donne hanno avuto una diagnosi di  $\geq$  CIN2 e quarantuno (41) hanno avuto una diagnosi di  $\geq$  CIN3. La prevalenza di diagnosi  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 nelle donne valutabili con risultati citologici ASC-US è stata rispettivamente del 9,7% e del 4,4%. I risultati dell'Aptima HPV assay basati sulle diagnosi effettuate con il pannello di valutazione consensuale degli esami istologici sono illustrati nella Tabella 31.

**Tabella 31:** Popolazione ASC-US di età pari o superiore a 21 anni: risultati dell'Aptima HPV assay ottenuti dalla diagnosi con pannello di valutazione consensuale degli esami istologici

Risultato dell'Aptima HPV Assay*	Test del DNA dell'HPV	Diagnosi con pannello di valutazione consensuale degli esami istologici						
		Indeterminato**	Normale	CIN1	CIN2	CIN3	Cancro	Totale
Positivo	Positivo	6	178	110	40	32	1	367
Positivo	Negativo	0	5	2	0	2	0	9
Positivo	Nessun risultato***	0	15	11	0	2	0	28
Negativo	Positivo	0	39	15	3	3	0	60
Negativo	Negativo	10	372	53	7	1	0	443
Negativo	Nessun risultato***	3	39	7	0	0	0	49
<b>Totale</b>		19	648	198	50	40	1****	956

\*Tutti i campioni hanno fornito risultati finali validi (dall'analisi iniziale o dopo la risoluzione dei risultati iniziali non validi per cause procedurali).

\*\*19 soggetti sono stati sottoposti a visita colposcopica ma non è stato possibile effettuare una diagnosi per i seguenti motivi: < 5 campioni di biopsia tutti con risultati istologici Normale/CIN1 (n = 15), nessuna biopsia prelevata (n = 3) e vetrini di biopsia smarriti (n = 1).

\*\*\*Per 77 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test del DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.

\*\*\*\*Un soggetto ha avuto una diagnosi di adenocarcinoma in situ (AIS).

Nella Tabella 32 sono riportate le stime delle prestazioni cliniche dell'Aptima HPV assay, che comprendono la sensibilità, la specificità, il valore predittivo positivo (VPP) e il valore predittivo negativo (VPN) per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 basato sulla valutazione di tutte le biopsie e comprendente solo le biopsie dirette, nonché le stime relative al test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio.

**Tabella 32:** Popolazione ASC-US di età pari o superiore a 21 anni: prestazioni dell'Aptima HPV assay e di un test per il DNA dell'HPV per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3

	Prestazioni	Aptima HPV Assay N = 937		Test del DNA dell'HPV N = 863*	
		Stima	(95% CI)	Stima	(95% CI)
$\geq$ CIN2	<b>Tutte le biopsie</b>				
	Sensibilità (%)	84,6 (77/91)	(75,8, 90,6)	88,8 (79/89)	(80,5, 93,8)
	Specificità (%)	62,1 (525/846)	(58,7, 65,3)	55,8 (432/774)	(52,3, 59,3)
	VPP (%)	19,3 (77/398)	(17,3, 21,2)	18,8 (79/421)	(17,0, 20,4)
	VPN (%)	97,4 (525/539)	(96,0, 98,5)	97,7 (432/442)	(96,2, 98,8)
	Prevalenza (%)	9,7 (91/937)		10,3 (89/863)	
	<b>Biopsie dirette**</b>				
	Sensibilità (%)	90,0 (54/60)	(79,9, 95,3)	93,2 (55/59)	(83,8, 97,3)
	Specificità (%)	60,8 (531/874)	(57,5, 63,9)	54,5 (437/802)	(51,0, 57,9)
	VPP (%)	13,6 (54/397)	(12,0, 15,0)	13,1 (55/420)	(11,7, 14,2)
	VPN (%)	98,9 (531/537)	(97,8, 99,6)	99,1 (437/441)	(97,9, 99,7)
	Prevalenza (%)	6,4 (60/934)		6,9 (59/861)	
	$\geq$ CIN3	<b>Tutte le biopsie</b>			
Sensibilità (%)		90,2 (37/41)	(77,5, 96,1)	92,3 (36/39)	(79,7, 97,3)
Specificità (%)		59,7 (535/896)	(56,5, 62,9)	53,3 (439/824)	(49,9, 56,7)
VPP (%)		9,3 (37/398)	(8,0, 10,3)	8,6 (36/421)	(7,4, 9,4)
VPN (%)		99,3 (535/539)	(98,3, 99,8)	99,3 (439/442)	(98,3, 99,8)
Prevalenza (%)		4,4 (41/937)		4,5 (39/863)	
<b>Biopsie dirette**</b>					
Sensibilità (%)		93,1 (27/29)	(78,0, 98,1)	96,4 (27/28)	(82,3, 99,4)
Specificità (%)		59,1 (535/906)	(55,8, 62,2)	52,8 (440/834)	(49,4, 56,1)
VPP (%)		6,8 (27/398)	(5,7, 7,5)	6,4 (27/421)	(5,5, 7,0)
VPN (%)		99,6 (535/537)	(98,8, 100)	99,8 (440/441)	(98,9, 100)
Prevalenza (%)		3,1 (29/935)		3,2 (28/862)	

\*Per 74 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test del DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.

\*\*Il risultato istologico consensuale è stato ottenuto utilizzando solo i risultati delle biopsie dirette. Le donne con biopsia indiretta denotano una colposcopia normale e sono incluse in queste analisi come non affette dalla malattia (< CIN2 o < CIN3, a seconda dei casi). Quando sono state incluse solo biopsie dirette non sempre è stato raggiunto un consenso.

Quando sono state valutate tutte le biopsie, le stime della sensibilità clinica dell'Aptima HPV assay e del test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio, laddove sono disponibili entrambi i risultati del test per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3, sono risultate simili (le differenze nelle stime della sensibilità non sono state significative dal punto di vista statistico). Per  $\geq$  CIN2 la differenza di sensibilità è stata del -4,5% (CI al 95%: -12,2%, 2,5%). Le stime della specificità clinica dell'Aptima HPV assay per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 sono state maggiori rispetto a quelle del test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio (le differenze nelle stime della specificità sono state significative dal punto di vista statistico). Per  $\geq$  CIN2 la differenza di specificità è stata del 6,1% (CI al 95%: 4,2%, 8,2%). I VPN sono stati simili, ma per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 il VPP per l'Aptima HPV assay è stato leggermente più alto rispetto al VPP per il test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio (19,3% contro 18,8%).

Dei 91 casi di  $\geq$  CIN2, 60 (65,9%) sono stati identificati con biopsie dirette e 31 (34,1%) sono stati identificati con biopsie random e/o biopsie ECC (ossia, biopsie indirette). Questi risultati possono essere confrontati con i risultati degli studi presenti in letteratura, dai quali si evince che dal 25% al 40% circa dei casi di  $\geq$  CIN2 sono stati identificati solo con campioni biotipici prelevati con metodi random e/o ECC.<sup>36,37</sup> Utilizzando solo biopsie dirette per determinare lo stato della malattia (supponendo che le donne sottoposte a biopsia indiretta abbiano mostrato risultati istologici normali in quanto non erano presenti lesioni visibili), la prevalenza di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 nello studio è stata rispettivamente del 6,4% e del 3,1%. Le stime della sensibilità clinica per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 sono state maggiori per entrambi i test utilizzando solo biopsie dirette rispetto alle stime calcolate utilizzando tutti i tipi di biopsie. Per entrambi i test, la specificità clinica ottenuta utilizzando solo biopsie dirette è stata simile alla specificità ottenuta con tutti i tipi di biopsie. Di conseguenza, quando sono state utilizzate solo biopsie dirette, la specificità dell'Aptima HPV assay è stata significativamente più alta rispetto a quella del test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio.

Le stime delle prestazioni cliniche dell'Aptima HPV assay e del test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio sono riportate per gruppo di età nella Tabella 33 e nella Tabella 34 (rispettivamente  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3, in base alla valutazione di tutte le biopsie).

**Tabella 33:** Popolazione ASC-US di età pari o superiore a 21 anni: prestazioni dell'Aptima HPV assay e di un test per il DNA dell'HPV per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 per gruppo di età

	Prestazioni	Aptima HPV Assay N = 937		Test del DNA dell'HPV N = 863*	
		Stima	(95% CI)	Stima	(95% CI)
Da 21 a 29 anni		N = 415		N = 389	
	Sensibilità (%)	88,5 (54/61)	(78,2, 94,3)	94,9 (56/59)	(86,1, 98,3)
	Specificità (%)	44,9 (159/354)	(39,8, 50,1)	35,5 (117/330)	(30,5, 40,8)
	VPP (%)	21,7 (54/249)	(19,3, 23,9)	20,8 (56/269)	(19,0, 22,5)
	VPN (%)	95,8 (159/166)	(92,3, 98,1)	97,5 (117/120)	(93,6, 99,4)
	Prevalenza (%)	14,7 (61/415)		15,2 (59/389)	
Da 30 a 39 anni		N = 261		N = 238	
	Sensibilità (%)	85,0 (17/20)	(64,0, 94,8)	80,0 (16/20)	(58,4, 91,9)
	Specificità (%)	66,4 (160/241)	(60,2, 72,1)	61,9 (135/218)	(55,3, 68,1)
	VPP (%)	17,3 (17/98)	(13,1, 21,1)	16,2 (16/99)	(11,8, 19,8)
	VPN (%)	98,2 (160/163)	(95,7, 99,6)	97,1 (135/139)	(94,1, 99,1)
	Prevalenza (%)	7,7 (20/261)		8,4 (20/238)	
$\geq$ 40 anni		N = 261		N = 236	
	Sensibilità (%)	60,0 (6/10)	(31,3, 83,2)	70,0 (7/10)	(39,7, 89,2)
	Specificità (%)	82,1 (206/251)	(76,9, 86,3)	79,6 (180/226)	(73,9, 84,4)
	VPP (%)	11,8 (6/51)	(5,6, 17,7)	13,2 (7/53)	(6,9, 18,7)
	VPN (%)	98,1 (206/210)	(96,6, 99,4)	98,4 (180/183)	(96,6, 99,6)
	Prevalenza (%)	3,8 (10/261)		4,2 (10/236)	

\*Per 74 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test del DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.

**Tabella 34:** Popolazione ASC-US di età pari o superiore a 21 anni: prestazioni dell'Aptima HPV assay e di un test per il DNA dell'HPV per l'individuazione di  $\geq$  CIN3 per gruppo di età

	Prestazioni	Aptima HPV Assay N = 937		Test del DNA dell'HPV N = 863*	
		Stima	(95% CI)	Stima	(95% CI)
Da 21 a 29 anni		N = 415		N = 389	
	Sensibilità (%)	96,3 (26/27)	(81,7, 99,3)	100 (25/25)	(86,7, 100)
	Specificità (%)	42,5 (165/388)	(37,7, 47,5)	33,0 (120/364)	(28,3, 38,0)
	VPP (%)	10,4 (26/249)	(9,0, 11,5)	9,3 (25/269)	(8,2, 10,0)
	VPN (%)	99,4 (165/166)	(97,2, 100)	100 (120/120)	(97,5, 100)
	Prevalenza (%)	6,5 (27/415)		6,4 (25/389)	
Da 30 a 39 anni		N = 261		N = 238	
	Sensibilità (%)	88,9 (8/9)	(56,5, 98,0)	77,8 (7/9)	(45,3, 93,7)
	Specificità (%)	64,3 (162/252)	(58,2, 69,9)	59,8 (137/229)	(53,4, 66,0)
	VPP (%)	8,2 (8/98)	(5,0, 10,1)	7,1 (7/99)	(4,0, 9,2)
	VPN (%)	99,4 (162/163)	(97,6, 100)	98,6 (137/139)	(96,4, 99,8)
	Prevalenza (%)	3,4 (9/261)		3,8 (9/238)	
$\geq$ 40 anni		N = 261		N = 236	
	Sensibilità (%)	60,0 (3/5)	(23,1, 88,2)	80,0 (4/5)	(37,6, 96,4)
	Specificità (%)	81,3 (208/256)	(76,0, 85,6)	78,8 (182/231)	(73,1, 83,6)
	VPP (%)	5,9 (3/51)	(1,6, 9,7)	7,5 (4/53)	(2,9, 10,7)
	VPN (%)	99,0 (208/210)	(98,0, 99,9)	99,5 (182/183)	(98,2, 100)
	Prevalenza (%)	1,9 (5/261)		2,1 (5/236)	

\*Per 74 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test del DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.



Nella Tabella 35 sono riportati il rischio assoluto di malattia ( $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3, in base alla valutazione di tutte le biopsie) deducibile dai risultati dell'Aptima HPV assay e il rischio relativo di malattia deducibile dai risultati positivi rispetto a quelli negativi dell'Aptima HPV assay, nonché le stime relative al test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio. Il rischio relativo di  $\geq$  CIN2 è stato di 7,4 (CI al 95%: 4,3, 13,0), a indicare che una donna positiva all'Aptima HPV assay aveva una probabilità di 7,4 volte di ottenere una diagnosi di  $\geq$  CIN2 rispetto a una donna negativa all'Aptima HPV assay. Il rischio relativo di  $\geq$  CIN3 è stato di 12,5 (CI al 95%: 4,5, 34,9).

**Tabella 35:** Popolazione ASC-US di età pari o superiore a 21 anni: rischio assoluto e relativo di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 per i risultati dell'Aptima HPV assay e di un test per il DNA dell'HPV

	Risultati del test	Aptima HPV Assay N = 937		Test per il DNA dell'HPV N = 863*	
		Rischio assoluto (CI al 95%)	Rischio relativo (CI al 95%)	Rischio assoluto (CI al 95%)	Rischio relativo (CI al 95%)
$\geq$ CIN2	Positivo	19,3 (77/398) (17,3, 21,2)	7,4 (4,3, 13,0)	18,8 (79/421) (17,0, 20,4)	8,3 (4,4, 15,8)
	Negativo	2,6 (14/539) (1,5, 4,0)		2,3 (10/442) (1,2, 3,8)	
	Prevalenza (%)	9,7 (91/937)		10,3 (89/863)	
$\geq$ CIN3	Positivo	9,3 (37/398) (8,0, 10,3)	12,5 (4,5, 34,9)	8,6 (36/421) (7,4, 9,4)	12,6 (3,9, 40,6)
	Negativo	0,7 (4/539) (0,2, 1,7)		0,7 (3/442) (0,2, 1,7)	
	Prevalenza (%)	4,4 (41/937)		4,5 (39/863)	

\*Per 74 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test del DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.

Le stime del rischio assoluto e relativo della malattia ( $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3, in base alla valutazione di tutte le biopsie) per l'Aptima HPV assay e per il test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio sono riportate per gruppo di età nella Tabella 36.

**Tabella 36:** Popolazione ASC-US di età pari o superiore a 21 anni: rischio assoluto e relativo di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 per i risultati dell'Aptima HPV assay e di un test per il DNA dell'HPV per gruppo di età

	Età	Risultati del test	Aptima HPV Assay N = 937		Test del DNA dell'HPV N = 863*	
			Rischio assoluto (95% CI)	Rischio relativo (95% CI)	Rischio assoluto (95% CI)	Rischio relativo (95% CI)
$\geq$ CIN2	Da 21 a 29 anni		N = 415		N = 389	
		Positivo	21,7 (54/249) (19,3, 23,9)	5,1 (2,4, 11,0)	20,8 (56/269) (19,0, 22,5)	8,3 (2,7, 26,1)
		Negativo	4,2 (7/166) (1,9, 7,7)		2,5 (3/120) (0,6, 6,4)	
		Prevalenza (%)	9,7 (61/415)		15,2 (59/389)	
	Da 30 a 39 anni		N = 261		N = 238	
		Positivo	17,3 (17/98) (13,1, 21,1)	9,4 (2,8, 31,3)	16,2 (16/99) (11,8, 19,8)	5,6 (1,9, 16,3)
		Negativo	1,8 (3/163) (0,4, 4,3)		2,9 (4/139) (0,9, 5,9)	
		Prevalenza (%)	7,7 (20/261)		8,4 (20/238)	
	$\geq$ 40 anni		N = 261		N = 236	
Positivo		11,8 (6/51) (5,6, 17,7)	6,2 (1,8, 21,1)	13,2 (7/53) (6,9, 18,7)	8,1 (2,2, 30,1)	
Negativo		1,9 (4/210) (0,6, 3,4)		1,6 (3/183) (0,4, 3,4)		
Prevalenza (%)		3,8 (10/261)		4,2 (10/236)		
$\geq$ CIN3	Da 21 a 29 anni		N = 415		N = 389	
		Positivo	10,4 (26/249) (9,0, 11,5)	17,3 (2,4, 127)	9,3 (25/269) (8,2, 10,0)	Non calcolabile
		Negativo	0,6 (1/166) (0,0, 2,8)		0,0 (0/120) (0,0, 2,5)	
		Prevalenza (%)	6,5 (27/415)		6,4 (25/389)	
	Da 30 a 39 anni		N = 261		N = 238	
		Positivo	8,2 (8/98) (5,0, 10,1)	13,3 (1,7, 105)	7,1 (7/99) (4,0, 9,2)	4,9 (1,0, 23,2)
		Negativo	0,6 (1/163) (0,0, 2,4)		1,4 (2/139) (0,2, 3,6)	
		Prevalenza (%)	3,4 (9/261)		3,8 (9/238)	
	$\geq$ 40 anni		N = 261		N = 236	
Positivo		5,9 (3/51) (1,6, 9,7)	6,2 (1,1, 36,0)	7,5 (4/53) (2,9, 10,7)	13,8 (1,6, 121)	
Negativo		1,0 (2/210) (0,1, 2,0)		0,5 (1/183) (0,0, 1,8)		
Prevalenza (%)		1,9 (5/261)		2,1 (5/236)		

\*Per 74 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test del DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.

### Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: prestazioni cliniche dell'Aptima HPV Assay con campioni per citologia in fase liquida ThinPrep

Complessivamente, nello studio NILM sono state inserite 11.644 donne con risultati citologici NILM, di cui 773 sono state ritirate dallo studio. Le restanti 10.871 donne sono risultate idonee all'analisi sul Panther System. Per undici donne sono mancati i campioni e queste sono state escluse dalla valutazione al basale dell'Aptima HPV assay su Panther System. Le restanti 10.860 donne valutabili erano di età pari o superiore a 30 anni con risultati citologici NILM e risultati dell'Aptima HPV assay sul Panther System. Delle 512 donne con risultati positivi all'Aptima HPV assay sul Panther System, 284 sono state sottoposte a colposcopia al basale. Delle 10.348 donne con risultati negativi per l'Aptima HPV assay, 580 sono state sottoposte a colposcopia. Venti (20) donne hanno avuto una diagnosi  $\geq$  CIN2 e undici (11) una diagnosi  $\geq$  CIN3; 798 donne hanno avuto una diagnosi istologica Normale/CIN1; 46 donne hanno avuto una diagnosi di stato indeterminato della malattia. I risultati dell'Aptima HPV assay su Panther System basati sulle diagnosi preliminari effettuate con il pannello di valutazione consensuale degli esami istologici sono illustrati nella Tabella 37.

**Tabella 37:** Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: risultati dell'Aptima HPV assay e di un test per il DNA dell'HPV basati sulla diagnosi al basale con pannello di valutazione consensuale degli esami istologici

Risultato dell'Aptima HPV Assay*	Test del DNA dell'HPV	Diagnosi con pannello di valutazione consensuale degli esami istologici						
		Indeterminato**	Normale	CIN1	CIN2	CIN3	Cancro	Totale
Positivo	Positivo	11	211	12	4	7	2	247
Positivo	Negativo	2	19	0	0	0	1	22
Positivo	Nessun risultato***	2	12	1	0	0	0	15
Negativo	Positivo	10	170	7	2	1	0	190
Negativo	Negativo	20	353	9	2	0	0	384
Negativo	Nessun risultato***	1	4	0	1	0	0	6
<b>Totale</b>		46	769	29	9	8	3****	864

\*Tutti i campioni hanno fornito risultati finali validi (dall'analisi iniziale o dopo la risoluzione dei risultati iniziali non validi per cause procedurali).

\*\*46 soggetti sono stati sottoposti a visita colposcopica, ma non è stato possibile ottenere una diagnosi per i seguenti motivi: campioni biopici ritenuti inadeguati (n = 29), nessuna biopsia prelevata (n = 15) e vetrini di biopsia smarriti (n = 2).

\*\*\*Per 21 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test del DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.

\*\*\*\*Tre donne hanno avuto una diagnosi di adenocarcinoma in situ (AIS).

In totale, 10.042 donne hanno avuto una diagnosi di stato della malattia non verificato (incluso lo stato indeterminato) (Tabella 38). Poiché lo studio era stato progettato in modo tale da sottoporre a colposcopia solo donne scelte a caso con risultati negativi sia per l'Aptima HPV assay sul Tigris DTS System che per il test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio, in questo gruppo è stata ottenuta un'elevata percentuale di donne con stato della malattia non verificato (96,6%). Per correggere questo bias di verifica, è stato utilizzato un metodo di imputazione multipla per stimare il numero di donne con malattia che sarebbe stato identificato se tutte fossero state sottoposte a colposcopia. Sono state riportate sia le stime delle prestazioni adattate per il bias di verifica sia le stime delle prestazioni preliminari non adattate, basate sulle 818 donne con stato della malattia verificato.

**Tabella 38:** Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: classificazione delle donne NILM valutabili in base ai risultati dell'Aptima HPV assay e di un test per il DNA dell'HPV, stato della malattia ( $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3) e stato di verifica della malattia

Risultato dell'Aptima HPV Assay*		Test del DNA dell'HPV	Donne totali	Stato della malattia verificato: $\geq$ CIN2		Stato della malattia verificato: $\geq$ CIN3		Stato della malattia non verificato
Panther System	Tigris DTS System			Donne malate ( $\geq$ CIN2)	Donne non malate ( $<$ CIN2)	Donne malate ( $\geq$ CIN3)	Donne non malate ( $<$ CIN3)	Donne con stato della malattia sconosciuto (% sconosciuto)
Positivo	Positivo	Positivo	313	13	189	9	193	111 (35,5%)
Positivo	Positivo	Negativo	37	1	18	1	18	18 (48,6%)
Positivo	Positivo	Nessun risultato**	22	0	13	0	13	9 (40,9%)
Positivo	Negativo	Positivo	70	0	34	0	34	36 (51,4%)
Positivo	Negativo	Negativo	60	0	1	0	1	59 (98,3%)
Positivo	Negativo	Nessun risultato**	10	0	0	0	0	10 (100%)
Negativo	Positivo	Positivo	46	0	33	0	33	13 (28,3%)
Negativo	Positivo	Negativo	113	1	41	0	42	71 (62,8%)
Negativo	Positivo	Nessun risultato**	8	0	4	0	4	4 (50,0%)
Negativo	Negativo	Positivo	236	3	144	1	146	89 (37,7%)
Negativo	Negativo	Negativo	9.354	1	321	0	322	9.032 (96,6%)
Negativo	Negativo	Nessun risultato**	591	1	0	0	1	590 (99,8%)
<b>Totale</b>			10.860	20	798	11	807	10.042 (92,5%)

\*Tutti i campioni hanno fornito risultati finali (dall'analisi iniziale o dopo la risoluzione dei risultati non validi per cause procedurali).

\*\*Per 631 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test del DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.

La prevalenza adattata di diagnosi  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 nelle donne con risultati citologici NILM è stata rispettivamente dello 0,9% e dello 0,4%. Le stime adattate del rischio assoluto e relativo per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 al basale sono riportate nella Tabella 39. Il rischio relativo adattato di  $\geq$  CIN2 è stato di 7,5 (CI al 95%: 2,1, 26,3), a indicare che una donna positiva all'Aptima HPV assay ha una probabilità di 7,5 volte di ottenere una diagnosi di  $\geq$  CIN2 rispetto a una donna negativa all'Aptima HPV assay. Il rischio relativo adattato di  $\geq$  CIN3 è stato di 24,9 (CI al 95%: 2,0, 307,0). Le stime non adattate del rischio assoluto e relativo per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 al basale sono mostrate complessivamente nella Tabella 40 e per gruppo di età nella Tabella 41.

**Tabella 39:** Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: rischio assoluto e relativo di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 per i risultati dell'Aptima HPV assay e di un test per il DNA dell'HPV (stime adattate per il bias di verifica) al basale

	Risultati del test	Aptima HPV Assay		Test del DNA dell'HPV	
		Rischio assoluto (CI al 95%)	Rischio relativo (CI al 95%)	Rischio assoluto (CI al 95%)	Rischio relativo (CI al 95%)
$\geq$ CIN2	Positivo	4,5 (2,7, 7,4)	7,5 (2,1, 26,3)	3,7 (2,3, 6,1)	7,3 (1,6, 33,5)
	Negativo	0,6 (0,2, 1,9)		0,5 (0,1, 2,1)	
	Prevalenza (%)	0,9		0,9	
$\geq$ CIN3	Positivo	3,0 (1,6, 5,5)	24,9 (2,0, 307,0)	2,3 (1,3, 4,1)	21,0 (1,0, 423,8)
	Negativo	0,1 (0,0, 1,7)		0,1 (0,0, 2,4)	
	Prevalenza (%)	0,4		0,4	

**Tabella 40:** Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: rischio assoluto e relativo di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 per i risultati dell'Aptima HPV assay e di un test per il DNA dell'HPV (stime non adattate) al basale

	Risultati del test	Aptima HPV Assay N = 818		Test del DNA dell'HPV N = 800*	
		Rischio assoluto (CI al 95%)	Rischio relativo (CI al 95%)	Rischio assoluto (CI al 95%)	Rischio relativo (CI al 95%)
$\geq$ CIN2	Positivo	5,2 (14/269) (3,5, 6,6)	4,8 (1,9, 12,3)	3,8 (16/416) (2,9, 4,5)	4,9 (1,4, 16,8)
	Negativo	1,1 (6/549) (0,5, 1,9)		0,8 (3/384) (0,2, 1,9)	
	Prevalenza (%)	2,4 (20/818)		2,4 (19/800)	
$\geq$ CIN3	Positivo	3,7 (10/269) (2,5, 4,3)	20,4 (2,6, 159)	2,4 (10/416) (1,6, 2,7)	9,2 (1,2, 71,8)
	Negativo	0,2 (1/549) (0,0, 0,8)		0,3 (1/384) (0,0, 1,1)	
	Prevalenza (%)	1,3 (11/818)		1,4 (11/800)	

\*Per 18 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test del DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.

**Tabella 41:** Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: rischio assoluto e relativo di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 per i risultati dell'Aptima HPV assay e di un test per il DNA dell'HPV per gruppo di età (stime non adattate) al basale

	Età	Risultati del test	Aptima HPV Assay N = 818		Test del DNA dell'HPV N = 800*	
			Rischio assoluto (CI al 95%)	Rischio relativo (CI al 95%)	Rischio assoluto (CI al 95%)	Rischio relativo (CI al 95%)
$\geq$ CIN2	Da 30 a 39 anni		N = 383		N = 376	
		Positivo	4,6 (7/153) (2,5, 5,9)	5,3 (1,1, 25,0)	3,3 (7/215) (1,8, 4,1)	2,6 (0,6, 12,4)
		Negativo	0,9 (2/230) (0,1, 2,2)		1,2 (2/161) (0,2, 3,2)	
		Prevalenza (%)	2,3 (9/383)		2,4 (9/376)	
	$\geq$ 40 anni		N = 435		N = 424	
		Positivo	6,0 (7/116) (3,2, 8,5)	4,8 (1,4, 16,1)	4,5 (9/201) (2,9, 5,3)	10,0 (1,3, 78,1)
		Negativo	1,3 (4/319) (0,4, 2,3)		0,4 (1/223) (0,0, 1,8)	
		Prevalenza (%)	2,5 (11/435)		2,4 (10/424)	
$\geq$ CIN3	Da 30 a 39 anni		N = 383		N = 376	
		Positivo	3,3 (5/153) (1,6, 4,1)	7,5 (0,9, 63,7)	2,3 (5/215) (1,1, 2,9)	3,7 (0,4, 31,7)
		Negativo	0,4 (1/230) (0,0, 1,6)		0,6 (1/161) (0,0, 2,2)	
		Prevalenza (%)	1,6 (6/383)		1,6 (6/376)	
	$\geq$ 40 anni		N = 435		N = 424	
		Positivo	4,3 (5/116) (2,2, 5,1)	Non calcolabile	2,5 (5/201) (1,3, 2,8)	Non calcolabile
		Negativo	0,0 (0/319) (0,0, 0,8)		0,0 (0/223) (0,0, 1,1)	
		Prevalenza (%)	1,1 (5/435)		1,2 (5/424)	

\*Per 18 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test del DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.

Nella Tabella 42 sono riportate le stime adattate delle prestazioni cliniche dell'Aptima HPV assay, che comprendono la sensibilità, la specificità, il VPP e il VPN per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 al basale, nonché le stime relative al test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio. Le stime non adattate delle prestazioni cliniche sono riportate nella Tabella 43. L'Aptima HPV assay e il test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio hanno mostrato una sensibilità simile, mentre la specificità è stata significativamente più alta per l'Aptima HPV assay (CI al 95% non sovrapposti). Le stime dei valori predittivi dell'Aptima HPV assay sono state clinicamente rilevanti e simili alle stime per il test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio. I VPN sono stati simili, ma per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 il VPP per l'Aptima HPV assay è stato leggermente più alto rispetto al VPP per il test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio (4,5% contro 3,7%).

**Tabella 42:** Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: prestazioni dell'Aptima HPV assay e di un test per il DNA dell'HPV per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 (stime adattate per il bias di verifica) al basale

	Prestazioni	Aptima HPV Assay		Test del DNA dell'HPV	
		Stima	(95% CI)	Stima	(95% CI)
$\geq$ CIN2	Sensibilità (%)	28,4	(4,9, 51,8)	35,4	(3,8, 66,9)
	Specificità (%)	95,5	(95,1, 95,9)	93,7	(93,2, 94,2)
	VPP (%)	4,5	(2,7, 7,4)	3,7	(2,3, 6,1)
	VPN (%)	99,4	(98,1, 99,8)	99,5	(97,9, 99,9)
	Prevalenza (%)	0,9 (0,0, 1,9)		0,9 (0,0, 1,9)	
$\geq$ CIN3	Sensibilità (%)	54,0	(3,6, 100)	56,4	(0,4, 100)
	Specificità (%)	95,4	(95,0, 95,8)	93,6	(93,1, 94,1)
	VPP (%)	3,0	(1,6, 5,5)	2,3	(1,3, 4,1)
	VPN (%)	99,9	(98,3, 100)	99,9	(97,6, 100)
	Prevalenza (%)	0,4 (0,0, 1,2)		0,4 (0,0, 1,3)	

**Tabella 43:** Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: prestazioni dell'Aptima HPV assay e di un test per il DNA dell'HPV per l'individuazione di  $\geq$  CIN2 e  $\geq$  CIN3 (stime non adattate) al basale

	Prestazioni	Aptima HPV Assay N = 818		Test del DNA dell'HPV N = 800*	
		Stima	(95% CI)	Stima	(95% CI)
$\geq$ CIN2	Sensibilità (%)	70,0 (14/20)	(48,1, 85,5)	84,2 (16/19)	(62,4, 94,5)
	Specificità (%)	68,0 (543/798)	(64,7, 71,2)	48,8 (381/781)	(45,3, 52,3)
	VPP (%)	5,2 (14/269)	(3,5, 6,6)	3,8 (16/416)	(2,9, 4,5)
	VPN (%)	98,9 (543/549)	(98,1, 99,5)	99,2 (381/384)	(98,1, 99,8)
	Prevalenza (%)	2,4 (20/818)		2,4 (19/800)	
$\geq$ CIN3	Sensibilità (%)	90,9 (10/11)	(62,3, 98,4)	90,9 (10/11)	(62,3, 98,4)
	Specificità (%)	67,9 (548/807)	(64,6, 71,0)	48,5 (383/789)	(45,1, 52,0)
	VPP (%)	3,7 (10/269)	(2,5, 4,3)	2,4 (10/416)	(1,6, 2,7)
	VPN (%)	99,8 (548/549)	(99,2, 100)	99,7 (383/384)	(98,9, 100)
	Prevalenza (%)	1,3 (11/818)		1,4 (11/800)	

\*Per 18 donne con risultati dell'Aptima HPV assay non è stato possibile ottenere i risultati del test del DNA dell'HPV principalmente a causa del volume del campione citologico insufficiente.



Il confronto diretto tra l'Aptima HPV assay nel sistema Panther e il test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio dimostra una sensibilità simile e una specificità migliorata significativa dal punto di vista statistico dell'Aptima HPV assay rispetto al test per il DNA dell'HPV disponibile in commercio per l'individuazione di  $\geq$  CIN2, come mostrato dai rapporti delle percentuali dei veri positivi e dei falsi positivi (rispettivamente Tabella 44 e Tabella 45).

**Tabella 44:** Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: rapporto delle percentuali dei veri positivi (Aptima HPV assay/test per il DNA dell'HPV) per le donne con  $\geq$  CIN2 (stime non adattate) al basale

		Test del DNA dell'HPV		Totale
		Positivo	Negativo	
Aptima HPV Assay	Positivo	13	1	14 (73,7%)
	Negativo	3	2	5
	Totale	16 (84,2%)	3	19
Rapporto delle percentuali dei veri positivi = 0,88 (14/16) (CI al 95%: 0,65, 1,10)				

**Tabella 45:** Popolazione NILM di età pari o superiore a 30 anni: rapporto delle percentuali dei falsi positivi (Aptima HPV assay/test per il DNA dell'HPV) per le donne con  $<$  CIN2 (stime non adattate)

		Test del DNA dell'HPV		Totale
		Positivo	Negativo	
Aptima HPV Assay	Positivo	223	19	242 (31,0%)
	Negativo	177	362	539
	Totale	400 (51,2%)	381	781
Rapporto delle percentuali dei falsi positivi = 0,61 (242/400) (CI al 95%: 0,55, 0,66)				

### Popolazione NILM di età uguale o superiore a 30 anni: prestazioni cliniche dell'Aptima HPV Assay su Panther System dopo 3 anni di follow-up

Vi sono state 10.843 donne di età uguale o superiore a 30 anni con risultati al basale validi di citologia NILM e Aptima HPV assay su Panther System che sono risultate idonee per la fase di follow-up. Delle donne senza  $\geq$ CIN2, il 67,0% (7.247/10.823) si è sottoposta a una visita di follow-up con Pap test del 1° anno, il 60,3% (6.517/10.814) a quella del 2° anno e il 58,7% (6.339/10.807) a quella del 3° anno. Complessivamente, il 58,8% (6.375/10.843) delle donne ha completato lo studio (con valori al basale o durante il follow-up  $\geq$ CIN2, e/o visite richieste completate).

Delle 10,843 donne valutabili, 511 (il 4,7%) presentava risultati al basale positivi all'Aptima HPV assay su Panther System. Tra queste 511 donne, a 255 (il 49,9%) è stato diagnosticato uno stato della patologia a 3 anni positivo o negativo in base ai risultati citologici o della colposcopia/biopsia. Le rimanenti 10.332 donne hanno avuto risultati al basale negativi all'Aptima HPV assay su Panther System. Tra queste 10.332 donne, a 5.946 (57,5%) è stato diagnosticato uno stato della patologia a 3 anni positivo o negativo. Tra le 6.201 donne con

stato della patologia a 3 anni, a 47 è stato rilevato un valore  $\geq$ CIN2, comprese 23 con  $\geq$ CIN3; 6.154 donne hanno avuto un valore normale/CIN1 dal pannello di valutazione consensuale degli esami istologici. I risultati al basale dell'Aptima HPV assay su Panther System e del test HPV DNA commerciale e lo stato della patologia a 3 anni (compresa la valutazione al basale e al follow-up) del pannello di valutazione consensuale degli esami istologici sono illustrati nella Tabella 46.

**Tabella 46:** popolazione NILM di età uguale o superiore a 30 anni: classificazione delle donne idonee alla fase di follow-up in base ai risultati al basale dell'Aptima HPV assay, del test HPV DNA e allo stato della patologia ( $\geq$ CIN2,  $\geq$ CIN3, Non verificato) stabilito al basale e al follow-up

Risultato dell'Aptima HPV assay	Test per il DNA dell'HPV	Totale donne	Stato di patologia verificato: $\geq$ CIN2		Stato di patologia verificato: $\geq$ CIN3		Stato di patologia non verificato	
			Donne malate ( $\geq$ CIN2)	Donne non malate (<CIN2)	Donne malate ( $\geq$ CIN3)	Donne non malate ( $\geq$ CIN3)	Perse durante il follow-up	Indeterminato*
Positivo	Positivo	382	23	171	16	178	167	21
Positivo	Negativo	97	1	48	1	48	44	4
Positivo	Nessun risultato**	32	2	10	1	11	17	3
Negativo	Positivo	281	5	129	2	132	130	17
Negativo	Negativo	9,452	15	5,476	3	5,488	3,756	205
Negativo	Nessun risultato**	599	1	320	0	321	264	14
<b>To tale</b>		10,843	47	6,154	23	6,178	4,378	264

\*Donne che presentavano risultati del test citologico anormali al follow-up e che non disponevano di un successivo risultato del pannello di valutazione consensuale degli esami istologici, oltre a donne con risultati citologici inadeguati alla loro ultima visita. 174 donne con stato della patologia indeterminato hanno completato il follow-up secondo il protocollo.

\*\*631 donne con risultati all'Aptima HPV assay non hanno avuto risultati al test HPV DNA principalmente a causa di un insufficiente volume di campione per la citologia.

Il rischio cumulativo di malattia a 3 anni ( $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3) si basa sulla valutazione di Kaplan-Meier (analisi della tabella di sopravvivenza) e comprende le patologie rilevate al basale o durante il follow-up. Le donne che hanno avuto qualche indicazione di patologia (ASC-US o risultati citologici più severi) ma senza un risultato del pannello di valutazione consensuale degli esami istologici sono state incluse nell'analisi utilizzando un metodo di inserimento multiplo per prevedere il numero di donne affette da una patologia che sarebbero state identificate qualora si fossero sottoposte a una colposcopia.

Le stime di rischio assoluto e cumulativo a 3 anni per  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 sono illustrate nella Tabella 47.

**Tabella 47:** Popolazione NILM di età uguale o superiore a 30 anni: rischi cumulativi e assoluti\* a 3 anni per  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 in funzione del risultato al basale di Aptima HPV assay e del test HPV DNA

	Risultato dell'assay	Aptima HPV assay		Test per il DNA dell'HPV	
		Rischio Sassoluto (95% CI)	Rischio relativo (95% CI)	Rischio assoluto (95% CI)	Rischio relativo (95% CI)
$\geq$ CIN2	Positivo	7.90 (5.50, 11.27)	24.45 (13.85, 43.15)	6.43 (4.50, 9.14)	22.71 (12.20, 42.30)
	Negativo	0.32 (0.21, 0.51)		0.28 (0.17, 0.47)	
	Prelavenza (%)	0.68		0.68	
$\geq$ CIN3	Positivo	5.23 (3.34, 8.13)	57.11 (21.09, 154.62)	4.14 (2.62, 6.52)	51.34 (17.74, 148.58)
	Negativo	0.09 (0.04, 0.23)		0.08 (0.03, 0.22)	
	Prelavenza (%)	0.34		0.35	

\*I rischi cumulativi a 3 anni adattati per altri possibili bias sono risultati simili ai rischi riportati in questa tabella. A causa delle differenze previste nei rischi al 1° e 2° anno per i due gruppi di donne dello studio di follow-up (quelle sottoposte a colposcopia al basale e quelle non sottoposte a colposcopia al basale), è stato riportato solo il rischio cumulativo a 3 anni per i gruppi combinati.

La prevalenza cumulativa a 3 anni di  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 nelle donne con citologia NILM al basale è stata rispettivamente dello 0,68% e dell'0,34%. Il rischio relativo di  $\geq$ CIN2 è risultato pari a 24,45 (95% CI 13,85, 43,15), a indicare che un donna con Aptima HPV assay positivo su Panther System ha 24,45 volte più probabilità di avere una  $\geq$ CIN2 rispetto a una donna con Aptima HPV assay negativo. Il rischio relativo per  $\geq$ CIN3 è risultato pari a 57,11 (95% CI: 21,09, 154,62).

## Prestazioni cliniche dell'Aptima HPV Assay con campioni per citologia in fase liquida SurePath

I campioni per citologia in fase liquida SurePath sono stati raccolti da donne canadesi (n = 558) a cui era stato richiesto un follow-up a causa di uno o più Pap test anormali, un'infezione da HPV o altri motivi. Un'aliquota (0,5 ml) di ciascun campione è stata trasferita all'interno di una provetta di trasporto del campione Aptima per poi essere trattata con la soluzione di trasporto Aptima. Un singolo replicato di ciascun campione è stato analizzato con l'Aptima HPV assay. Da ciascun campione è stata tolta un'aliquota a parte (1 ml) da valutare con un test per l'HPV basato sulla PCR disponibile in commercio. La sensibilità clinica per l'individuazione dello stato patologico, definito come risultato istologico  $\geq$  CIN3, è stata calcolata per l'Aptima HPV assay e per il test per l'HPV basato sulla PCR, come mostrato nella Tabella 48, con valori predittivi positivi e negativi.

**Tabella 48:** Prestazioni per l'individuazione di  $\geq$  CIN3 dell'Aptima HPV assay e di un test per l'HPV basato sulla PCR

Prestazioni	Aptima HPV Assay N = 558		Test per l'HPV basato sulla PCR N = 558	
	Stima	(95% CI)	Stima	(95% CI)
Sensibilità (%)	89,3 (25/28)	(72,8 - 96,3)	89,3 (25/28)	(72,8 - 96,3)
Specificità (%)	58,7 (311/530)	(54,4 - 62,8)	49,1 (260/530)	(44,8 - 53,3)
VPP (%)	10,2 (25/244)	(8,4 - 11,7)	8,5 (25/295)	(7,0 - 9,5)
VPN (%)	99,0 (311/314)	(97,6 - 99,8)	98,9 (260/263)	(97,2 - 99,7)
Prevalenza (%)	5,0 (28/558)		5,0 (28/558)	

## Prestazioni dell'Aptima HPV Assay per i campioni raccolti con il kit di raccolta e trasporto dei campioni cervicali

Campioni clinici positivi per l'HPV ad alto rischio e negativi per l'HPV ad alto rischio raccolti da popolazioni di screening (visita di routine) e di riferimento (visita colposcopica) con il kit CSCT Aptima sono stati analizzati con l'Aptima HPV assay sul Panther System e sul Tigris DTS System utilizzando due lotti di reagenti. La concordanza tra il Panther System e il Tigris DTS System per i campioni CSCT è riportata nella Tabella 49.

Per i campioni CSCT, la concordanza complessiva tra il Panther System e il Tigris DTS System è stata  $> 98\%$ , come illustrato nella Tabella 49. Dei 632 campioni clinici analizzati, 69 erano CIN2+ e 38 erano CIN3+. La sensibilità dell'Aptima HPV assay per l'individuazione di CIN2+ era 97,1% (intervallo di confidenza del 95%: 90,0%-99,2%) sul Panther System e 98,6% (intervallo di confidenza del 95%: 92,2-99,7) sul Tigris DTS System. La sensibilità per l'individuazione di CIN3+ era 100% (intervallo di confidenza: 90,8%-100%) su entrambi i sistemi Panther System e Tigris DTS System.

**Tabella 49:** Concordanza tra i risultati dell'Aptima HPV assay ottenuti da campioni CSCT analizzati sul Tigris DTS System e Sul Panther System

		Tigris DTS System		Totale
		Positivo	Negativo	
Panther System	Positivo	490	3	493
	Negativo	9	130	139
	Totale	499	133	632

Concordanza complessiva = 98,1% (intervallo di confidenza del 96,7-98,9)

Concordanza positiva = 98,2% (intervallo di confidenza del 96,6-99,0)

Concordanza negativa = 97,7% (intervallo di confidenza del 93,6-99,2)

### Sensibilità analitica

Il limite di rilevamento (Limit of Detection, LOD) al cutoff clinico è la concentrazione di RNA dell'HPV che fornisce un risultato positivo (al di sopra del cutoff clinico) nel 95% dei casi. Il LOD dell'Aptima HPV assay è stato determinato analizzando i pannelli di diluizione dei trascritti in vitro (In Vitro Transcripts, IVT) per tutti i 14 genotipi ad alto rischio e per tutte e 4 le linee cellulari infette da HPV: SiHa, HeLa, MS751 e ME180 (ATCC, Manassas, Virginia). Per i pannelli IVT, prima di procedere all'analisi il terreno di trasporto del campione è stato addizionato con IVT a varie concentrazioni e successivamente diluito con i singoli campioni negativi per citologia in fase liquida ThinPrep. Per i pannelli di cellule infette da HPV, prima di procedere all'analisi i pool di campioni per citologia in fase liquida ThinPrep negativi all'HPV sono stati addizionati con cellule infette da HPV a varie concentrazioni e successivamente diluiti con il terreno di trasporto del campione. Trenta replicati di ciascun livello di copie sono stati analizzati con ciascuno di due lotti di reagenti, per un totale di 60 replicati. L'analisi è stata eseguita nell'arco di 17 giorni, con 1-12 sessioni analitiche al giorno e 5 replicati di un dato genotipo e di una data concentrazione analizzati in ogni sessione analitica. Il limite di rilevamento del 95% è stato calcolato dall'analisi della regressione probit dei risultati di positività per ciascun pannello di diluizione.

I risultati dell'analisi probit, come riportato nella Tabella 50, mostrano che i limiti di rilevamento del 95% per l'HPV di tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 59 e 68 sono stati inferiori a 100 copie/reazione e i limiti di rilevamento del 95% per i tipi 52, 58 e 66 sono stati compresi tra 100 e 500 copie/reazione. I limiti di rilevamento del 95% per le quattro linee cellulari analizzate sono stati inferiori a 1 cellula/reazione.

**Tabella 50:** Limite di rilevamento al cutoff clinico dell'Aptima HPV assay

Target	Limite di rilevamento* (CI al 95%)
HPV 16	49,4 (37,1 - 73,0)
HPV 18	44,0 (34,4 - 62,1)
HPV 31	32,5 (23,2 - 52,1)
HPV 33	67,5 (48,8 - 106,2)
HPV 35	32,7 (23,6 - 51,4)
HPV 39	20,9 (16,3 - 29,5)
HPV 45	37,1 (27,9 - 54,7)
HPV 51	51,1 (36,3 - 83,9)
HPV 52	410,2 (310,7 - 595,1)
HPV 56	59,4 (46,7 - 81,5)
HPV 58	124,1 (90,7 - 190,1)
HPV 59	81,1 (61,9 - 116,6)
HPV 66	118,5 (83,2 - 202,0)
HPV 68	22,4 (17,1 - 32,4)
SiHa	0,25 (0,19 - 0,36)
HeLa	0,11 (0,09 - 0,14)
ME180	0,10 (0,08 - 0,16)
MS751	0,17 (0,14 - 0,25)

\*Copie per reazione per trascritti in vitro e cellule per reazione per linee cellulari

## Precisione del test

La precisione dell'Aptima HPV assay è stata valutata in due studi utilizzando lo stesso pannello da 20 elementi. Lo studio 1 è stato condotto in 3 centri, 2 esterni e 1 interno, e lo studio 2 è stato condotto internamente. Il pannello comprendeva 13 elementi positivi all'HPV con concentrazioni pari o superiori al limite di rilevamento del test (positività attesa:  $\geq 95\%$ ), 3 elementi positivi all'HPV con concentrazioni inferiori al limite di rilevamento del test (positività attesa: da  $> 0\%$  a  $< 25\%$ ) e 4 elementi negativi all'HPV. Gli elementi del pannello positivi all'HPV sono stati preparati aggiungendo trascritti di RNA in vitro (IVT) alla soluzione PreservCyt diluita con terreno di trasporto del campione (Specimen Transport Medium, STM), oppure cellule in coltura infette da HPV (SiHa, HeLa e MS751; ATCC, Manassas, Virginia) in pool di campioni negativi per citologia in fase liquida ThinPrep diluiti con STM. Gli elementi del pannello negativi all'HPV sono stati preparati con soluzione PreservCyt o con pool di campioni negativi per citologia in fase liquida ThinPrep diluiti con STM.

Nello studio 1, 2 operatori in ciascuno dei 3 centri di analisi (1 strumento per centro) hanno eseguito 2 liste di lavoro dell'Aptima HPV assay al giorno (1 con ciascun lotto di reagenti) nell'arco di 3 giorni. Ogni lista di lavoro conteneva 3 replicati per ciascuno degli elementi del pannello di riproducibilità. Per ciascun elemento del pannello sono state analizzate centootto (108) singole provette di campione (3 centri x 1 strumento x 2 operatori x 2 lotti x 3 liste di lavoro x 3 replicati). Nello studio 2, l'analisi è stata condotta internamente nell'arco di 13 giorni per un totale di 162 reazioni analizzate per ciascun elemento del pannello (1 centro x 3 strumenti x 3 operatori x 3 lotti x 2 liste di lavoro x 3 replicati).

Gli elementi del pannello sono descritti nella Tabella 51a (elementi del pannello con risultati positivi attesi) e nella Tabella 51b (elementi del pannello con risultati negativi attesi) insieme a un riepilogo della concordanza con i risultati attesi e con i valori dell'S/CO dell'analita in base ai percentili della distribuzione dell'S/CO di ordine 2,5, 50 e 97,5. La variabilità dell'S/CO dell'analita per gli elementi del pannello con i risultati positivi attesi è riportata nella Tabella 52 per lo studio 1 e nella Tabella 53 per lo studio 2.

**Tabella 51a:** Studio di precisione 1 e 2 dell'Aptima HPV assay: descrizione del pannello, concordanza positiva e distribuzione percentile dei valori dell'S/CO dell'analita per gli elementi del pannello con risultati positivi attesi

Descrizione del pannello (copie o cellule/reazione)	Studio 1 (3 centri di analisi)	Studio 2 (1 centro di analisi)
	Concordanza positiva % (CI al 95%)	Concordanza positiva % (CI al 95%)
<b>Campione clinico 1 positivo alto per HPV</b>	100 (107/107) (96,5, 100)	100 (161/161) (97,7, 100)
<b>Campione clinico 2 positivo alto per HPV</b>	100 (107/107) (96,5, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>IVT HPV 16 (1.830 copie)</b>	100 (107/107) (96,5, 100)	100 (161/161) (97,1, 100)
<b>IVT HPV 18 (1.550 copie)</b>	100 (107/107) (96,5, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>Campione clinico 1 positivo basso per HPV</b>	94,4 (101/107) (88,3, 97,4)	89,5 (145/162) (83,3, 93,3)
<b>Campione clinico 2 positivo basso per HPV</b>	88,0 (95/108) (80,5, 92,8)	92,0 (149/162) (86,8, 95,3)
<b>Campione clinico 3 positivo basso per HPV</b>	100 (108/108) (96,6, 100)	97,5 (157/161) (93,8, 99,0)
<b>Campione clinico 4 positivo basso per HPV</b>	90,7 (98/108) (83,8, 94,9)	92,6 (150/162) (87,5, 95,7)
<b>IVT HPV 16 (183 copie)</b>	100 (102/102) (96,4, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>IVT HPV 18 (155 copie)</b>	100 (108/108) (96,6, 100)	100 (159/159) (97,6, 100)
<b>Cellule MS751 (0,63 cellule)</b>	100 (108/108) (96,6, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>Cellule HeLa (0,35 cellule)</b>	100 (108/108) (96,6, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>Cellule SiHa (0,90 cellule)</b>	87,9 (94/107) (80,3, 92,8)	89,5 (145/162) (83,8, 93,3)

IVT = trascritto in vitro

\*Concordanza positiva % attesa: ~95%; osservata: inferiore, probabilmente a causa della variabilità di fabbricazione dell'elemento del pannello.



**Tabella 51b:** Studio di precisione 1 e 2 dell'Aptima HPV assay: descrizione del pannello, concordanza negativa e distribuzione percentile dei valori dell'S/CO dell'analita per gli elementi del pannello con risultati negativi attesi

Descrizione del pannello (copie o cellule/reazione)	Studio 1 (3 centri di analisi)	Studio 2 (1 centro di analisi)
	Concordanza negativa % (CI al 95%)	Concordanza negativa % (CI al 95%)
<b>Cellule MS751 (0,005 cellule)</b>	87,0 (94/108) (79,4, 92,1)	93,8 (152/162) (89,0, 96,6)
<b>Cellule SiHa (0,008 cellule)</b>	97,2 (105/108) (92,1, 99,1)	95,7 (155/162) (91,4, 97,9)
<b>Cellule HeLa (0,02 cellule)</b>	70,4 (76/108) (61,2, 78,2)	67,3 (109/162) (59,8, 74,0)
<b>Campione clinico 1 negativo all'HPV</b>	99,1 (107/108) (94,9, 99,8)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>Campione clinico 2 negativo all'HPV</b>	97,2 (105/108) (92,1, 99,1)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>Soluzione 1 PreservCyt</b>	99,1 (107/108) (94,9, 99,8)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>Soluzione 2 PreservCyt</b>	99,1 (107/108) (94,9, 99,8)	100 (161/161) (97,7, 100)

IVT = trascritto in vitro.

\*Concordanza negativa % attesa > 75% e < 100%.

**Tabella 52:** Studio di precisione 1 dell'Aptima HPV assay: variabilità del segnale per gli elementi del pannello con risultati positivi attesi

Descrizione del pannello (copie o cellule/reazione)	n	S/CO medio	Tra gli strumenti		Tra gli operatori		Tra i lotti		Tra le liste di lavoro		All'interno delle liste di lavoro		Totale	
			DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)
<b>Campione clinico 1 positivo alto per HPV</b>	107*	29,34	0,00	0,0	0,00	0,0	1,43	4,9	1,87	6,4	1,49	5,1	2,79	9,5
<b>Campione clinico 2 positivo alto per HPV</b>	107*	30,09	0,55	1,8	0,00	0,0	1,06	3,5	0,73	2,4	2,21	7,3	2,61	8,7
<b>IVT HPV 16 (1.830 copie)</b>	107*	11,20	0,09	0,8	0,16	1,4	0,03	0,3	0,14	1,3	0,46	4,1	0,52	4,6
<b>IVT HPV 18 (1.550 copie)</b>	107*	14,89	0,18	1,2	0,00	0,0	0,20	1,3	0,14	0,9	1,53	10,3	1,56	10,5
<b>Campione clinico 1 positivo basso per HPV</b>	107*	8,24	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	3,23	39,2	3,23	39,2
<b>Campione clinico 2 positivo basso per HPV</b>	108	7,07	0,00	0,0	0,41	5,8	0,00	0,0	0,00	0,0	4,57	64,7	4,59	65,0
<b>Campione clinico 3 positivo basso per HPV</b>	108	10,23	0,26	2,5	0,00	0,0	0,00	0,0	1,32	12,9	3,23	31,6	3,49	34,2
<b>Campione clinico 4 positivo basso per HPV</b>	108	4,68	0,50	10,7	0,20	4,2	0,00	0,0	0,99	21,1	3,02	64,6	3,22	68,9
<b>IVT HPV 16 (183 copie)</b>	102*	11,09	0,08	0,7	0,00	0,0	0,00	0,0	0,26	2,3	0,54	4,9	0,61	5,5
<b>IVT HPV 18 (155 copie)</b>	108	11,78	0,00	0,0	0,43	3,7	0,00	0,0	1,12	9,5	1,97	16,7	2,30	19,6
<b>Cellule MS751 (0,63 cellule)</b>	108	10,73	0,00	0,0	0,59	5,5	0,72	6,7	0,82	7,6	1,86	17,3	2,23	20,8
<b>Cellule HeLa (0,35 cellule)</b>	108	6,78	0,00	0,0	0,56	8,3	0,00	0,0	1,23	18,2	3,08	45,5	3,37	49,7
<b>Cellule SiHa (0,90 cellule)</b>	107*	7,74	0,37	4,8	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	3,85	49,8	3,87	50,1

\*Dodici campioni hanno fornito risultati non validi per l'Aptima HPV assay (1 per il campione clinico 1 positivo alto per HPV, 1 per il campione clinico 2 positivo alto per HPV, 1 per IVT HPV 16 (1.830 copie), 1 per IVT HPV 18 (1.550 copie), 1 per il campione clinico 1 positivo basso per HPV, 6 per IVT HPV 16 (183 copie) e 1 per le cellule SiHa (0,90 cellule)).

CV = coefficiente di variazione; IVT = trascritto in vitro; DS = deviazione standard

**Nota** - La variabilità da alcuni fattori può essere numericamente negativa. Tale circostanza si può verificare se la variabilità dovuta a questi fattori è molto piccola. In questi casi, il valore di DS e CV è indicato come pari a zero.

**Tabella 53:** Studio di precisione 2 dell'Aptima HPV assay: variabilità del segnale per gli elementi del pannello con risultati positivi attesi

Descrizione del pannello (copie o cellule/reazione)	n	S/CO medio	Tra gli strumenti		Tra gli operatori		Tra i lotti		Tra le liste di lavoro		All'interno delle liste di lavoro		Totale	
			DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)	DS	CV (%)
Campione clinico 1 positivo alto per HPV	161*	26,81	0,75	2,8	0,00	0,0	0,91	3,4	0,48	1,8	1,84	6,9	2,24	8,3
Campione clinico 2 positivo alto per HPV	162	28,83	0,00	0,0	0,00	0,0	0,96	3,3	0,65	2,3	2,35	8,2	2,62	9,1
IVT HPV 16 (1.830 copie)	161*	11,07	0,14	1,2	0,00	0,0	0,05	0,5	0,16	1,4	0,32	2,9	0,39	3,5
IVT HPV 18 (1.550 copie)	162	13,34	0,14	1,1	0,12	0,9	1,00	7,5	0,31	2,3	0,75	5,6	1,31	9,8
Campione clinico 1 positivo basso per HPV	162	7,57	0,56	7,5	0,55	7,3	0,63	8,3	0,00	0,0	3,61	47,7	3,75	49,5
Campione clinico 2 positivo basso per HPV	162	7,59	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	5,25	69,2	5,25	69,2
Campione clinico 3 positivo basso per HPV	161*	8,83	0,00	0,0	0,00	0,0	0,26	3,0	0,00	0,0	3,48	39,4	3,49	39,5
Campione clinico 4 positivo basso per HPV	162	4,95	0,00	0,0	0,00	0,0	0,75	15,2	0,00	0,0	3,35	67,6	3,43	69,3
IVT HPV 16 (183 copie)	162	11,02	0,13	1,2	0,11	1,0	0,12	1,1	0,13	1,2	0,54	4,9	0,59	5,4
IVT HPV 18 (155 copie)	159*	11,40	0,16	1,4	0,17	1,5	1,21	10,6	0,23	2,0	1,17	10,3	1,72	15,0
Cellule MS751 (0,63 cellule)	162	9,87	0,76	7,7	0,00	0,0	0,65	6,6	0,65	6,6	1,41	14,3	1,85	18,7
Cellule HeLa (0,35 cellule)	162	7,80	0,55	7,0	0,00	0,0	0,85	10,9	0,00	0,0	2,44	31,3	2,65	33,9
Cellule SiHa (0,90 cellule)	162	7,30	0,32	4,3	0,00	0,0	0,93	12,7	1,04	14,3	3,49	47,8	3,77	51,7

\*Sei campioni hanno fornito risultati non validi per l'Aptima HPV assay (1 per il campione clinico 1 positivo alto per HPV, 1 per IVT HPV 16 (1.830 copie), 1 per il campione clinico 3 positivo basso per HPV, 3 per IVT HPV 18 (155 copie)).

CV = coefficiente di variazione; IVT = trascritto in vitro; DS = deviazione standard

**Nota** - La variabilità da alcuni fattori può essere numericamente negativa. Tale circostanza si può verificare se la variabilità dovuta a questi fattori è molto piccola. In questi casi, il valore di DS e CV è indicato come pari a zero.

## Reattività crociata

L'analisi con gli organismi potenzialmente cross-reattivi per l'Aptima HPV assay è stata eseguita con il Tigris DTS System. Per i risultati consultare il paragrafo *Reattività crociata* (Tabella 28) nella sezione relativa al Tigris DTS System.

**Interferenza**

L'analisi con le sostanze potenzialmente interferenti per l'Aptima HPV assay è stata eseguita con il Tigris DTS System. Per i risultati consultare il paragrafo *Interferenza* (Tabella 29) nella sezione Tigris DTS System.

## Bibliografia

1. **Walboomers, J. M., M.V. Jacobs, M.M. Manos, F.X. Bosch, J.A. Kummer, K.V. Shah, P.J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer, N. Muñoz.** 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* **189**:12-19.
2. **Li N., S. Franceschi, R. Howell-Jones, P. J. Snijders, G. M. Clifford.** 2010. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*, n/a. doi: 10.1002/ijc.25396.
3. **Czegledy J., C. Losif, B.G. Hansson, M. Evander, L. Gergely, and G. Wadell.** 1995. Can a test for E6/E7 transcripts of human papillomavirus type 16 serve as a diagnostic tool for the detection of micrometastasis in cervical cancer? *Int J Cancer.* **64(3)**:211-5.
4. **Doorbar, J.** 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond).* **110(5)**:525-41.
5. **Burd, E.M.** 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* **16(1)**:1-17.
6. **Lambert P.F., H. Pan, H.C. Pitot, A. Liem, M. Jackson, and A.E. Griep.** 1993. Epidermal cancer associated with expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes in the skin of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90(12)**:5583-7.
7. **Kjaer S.K., A.J.C. van den Brule, G., Paull, E.I. Svare, M.E. Sherman, B.L. Thomsen, M. Sunyum, J.E. Bock, P.A. Poll, and C.J.L.M. Meijer.** 2002. 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.* **325(7364)**: 572-579.
8. **Monsonogo J., F.X. Bosch, P. Coursaget, J.T. Cox, E. Franco, I. Frazer, R. Sankaranarayanan, J. Schiller, A. Singer, T.C. Wright Jr, W. Kinney, C.J. Meijer, J. Linder, E. McGoogan, and C. Meijer.** 2004. Cervical cancer control, priorities and new directions. *Int J Cancer.* **108(3)**:329-33. Erratum in: *Int J Cancer.* **108(6)**:945.
9. **Cuschieri, K.S., M.J. Whitley, H.A. Cubie.** 2004. Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence—implications for cervical disease progression and monitoring. *J. Med. Virol.* **73(1)**: 65-70.
10. **Baseman J.G., and L.A. Koutsky.** 2005. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol.* **32 Suppl 1**:S16-24.
11. **Wu R, Belinson SE, Du H, Na W, Qu X, Wu R, et al.** Human papillomavirus messenger RNA assay for cervical cancer screening: the Shenzhen Cervical Cancer Screening Trial I. *International Journal of Gynecological Cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society.* 2010; 20(8):1411-4.
12. **Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghatage P, et al.** Aptima HPV E6/E7 mRNA test is as sensitive as Hybrid Capture 2 Assay but more specific at detecting cervical precancer and cancer. *Journal of Clinical Microbiology.* 2011; 49(2):557-64.
13. **Monsonogo J, Hudgens MG, Zerat L, Zerat J-C, Syrjänen K, Halfon P, et al.** Evaluation of oncogenic human papillomavirus RNA and DNA tests with liquid-based cytology in primary cervical cancer screening: the FASE study. *International Journal of Cancer Journal International du cancer.* 2011;129:691-701.
14. **Monsonogo J, Hudgens MG, Zerat L, Zerat J-C, Syrjänen K, Smith JS.** Risk assessment and clinical impact of liquid-based cytology, oncogenic human papillomavirus (HPV) DNA and mRNA testing in primary cervical cancer screening (the FASE study). *Gynecologic Oncology.* 2012;125:175-80.
15. **Nieves L, Enerson CL, Belinson S, Brainard J, Chiesa-Vottero A, Nagore N, et al.** Primary cervical cancer screening and triage using an mRNA human papillomavirus assay and visual inspection. *International Journal of Gynecological Cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society.* 2013;23(3):513-8.
16. **Cuzick J, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, et al.** Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *British Journal of Cancer.* 2013;108:908-13.
17. **Rebolj M, Preisler S, Ejegod DM, Bonde J, Rygaard C, Lyng E.** Prevalence of human papillomavirus infection in unselected SurePath samples using the APTIMA HPV mRNA assay. *The Journal of Molecular Diagnostics.* 2013;15(5):670-7.
18. **Rebolj M, Bonde J, Ejegod D, Preisler S, Rygaard C, Lyng E.** A daunting challenge: human papillomavirus assays and cytology in primary cervical screening of women below age 30 years. *European Journal of Cancer.* 2015;51:1456-66.
19. **Heideman DAM, Hesselink AT, van Kemenade FJ, Iftner T, Berkhof J, Topal F, et al.** The Aptima HPV assay fulfills the cross-sectional clinical and reproducibility criteria of international guidelines for human papillomavirus test requirements for cervical screening. *Journal of Clinical Microbiology.* 2013;51(11):3653-7.
20. **Pyne MT, Hamula CL, Tardif K, Law C, Schlaberg R.** High-risk HPV detection and genotyping by APTIMA HPV using cervical samples. *Journal of Virological Methods.* 2015;221:95-9.
21. **Iftner T, Becker S, Neis KJ, Castanon A, Iftner A, Holz B, et al.** Head-to-Head Comparison of the RNA368 Based Aptima Human Papillomavirus (HPV) Assay and the DNA-Based Hybrid Capture 2 HPV Test in a Routine Screening Population of Women Aged 30 to 60 Years in Germany. *Journal of Clinical Microbiology.* 2015;53:2509-16.
22. **Rebolj M, Bonde J, Preisler S, Ejegod D, Rygaard C, Lyng E.** Human Papillomavirus Assays and Cytology in Primary Cervical Screening of Women Aged 30 Years and Above. *PLoS One.* 2016 Jan 20;11(1):e0147326.
23. **Rebolj M, Bonde J, Ejegod D, Preisler S, Rygaard C, Lyng E.** A daunting challenge: Human Papillomavirus assays and cytology in primary cervical screening of women below age 30 years. *Eur J Cancer.* 2015 Jul;51(11):1456-66.
24. **Kacian, D.L. and T.J. Fultz.** 1995. Nucleic acid sequence amplification methods. U. S. Patent 5,399,491.
25. **Arnold, L. J., P. W. Hammond, W. A. Wiese, and N. C. Nelson.** 1989. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. *Clin Chem.* **35**: 1588-1594.
26. **Nelson, N. C., A. BenCheikh, E. Matsuda, and M. Becker.** 1996. Simultaneous detection of multiple nucleic acid targets in a homogeneous format. *Biochem.* **35**:8429-8438.

27. **Clad, A., M. Reuschenbach, J. Weinschenk, R. Grote, J. Rahmsdorf, and N. Freudenberg.** Performance of the Aptima high-risk HPV mRNA assay in a referral population in comparison with Hybrid Capture 2 and cytology. 2010. *J Clin Microbiol*, n/a. doi: 10.1128/JCM.01674-10.
28. **Ratnam S., F. Coutless, D. Fontaine, J. Bentley, N. Escott, P. Ghatage, G. Holloway, E. Bartellas, N. Kum, and A. Lear.** 2008. Clinical Correlations of Aptima HPV E6/E7 mRNA Test in Cervical Cancer Screening: Preliminary Results from a Multicentre Candian Study. Presented at EUROGIN 2008, November 12-15, 2008, Scientific Communication SS **8-6**.
29. **Szarewski A., L. Ambroisine, L. Cadman, J. Austin, L. Ho, G. Terry, S. Little, R. Dina, J. McCarthy, H. Buckley, C. Bergeron, P. Soutter, D. Lyons, and J. Cuzick.** 2008. Comparison of predictors for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women with Abnormal Smears. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **17(11)**, November.
30. **Castle P.E., J. Dockter, C. Giachetti, F.A.R. Garcia, M. McCormick, A.L.Mitchell, E.B. Holladay, and D.P. Kolk.** 2007. A Cross-sectional Study of a Prototype Carcinogenic Human Papillomavirus E6/E7 Messenger RNA Assay for Detection of Cervical Pre-cancer and Cancer. *Clin Cancer Res.* **13(9)**. 2599.
31. **Monsonogo J., M.G. Hudgens, L. Zerat, J.C. Zerat, K. Syrjänen, P. Halfon, F. Ruiz, and J.S. Smith.** 2010. Evaluation of oncogenic human papillomavirus RNA and DNA tests with liquid based cytology in primary cervical cancer screening (The FASE study). *Int J Cancer.* n/a. doi 10.1002/ijc.25726.
32. **Datta, S. D., L. A. Koutsky, S. Ratelle, E. R. Unger, J. Shlay, T. McClain, B. Weaver, P. Kerndt, J. Zenilman, M. Hagensee, C. J. Suhr, and H. Weinstock.** 2008. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cytology in Women Screened for Cervical Cancer in the United States, 2003–2005. *Annals Int Med.* **148**:493.
33. **Clifford, G.M., S. Gallus, R. Herrero, N. Muñoz, P. J. F. Snijders, S. Vaccarella, P. T. H. Anh, C. Ferreccio, N. T. Hieu, E. Matos, M. Molano, R. Rajkumar, G. Ronco, S. de Sanjosé, H. R. Shin, S. Sukvirach, J. O. Thomas, S. Tunsakul, C. J. L. M. Meijer, S. Franceschi, and the IARC HPV Prevalence Surveys Study Group.** Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled Analysis. 2005. *The Lancet.* **366**. 991.
34. **Stoler, M.H., T.C. Wright, Jr., J. Cuzick, J. Dockter, J. Reid, D. Getman, C. Giachetti.** 2013. Aptima HPV assay performance in women with atypical squamous cells of undetermined significance cytology results. *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* **208(2)**:144-145.
35. **Wright TC, Jr., Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, and Solomon D.** 2006 Consensus Guidelines for the Management of Women with Abnormal Cervical Cancer Screening Tests. 2007. *Am J Obstet Gynecol* **197** (4); 346-355.
36. **Pretorius R.G., W. H. Zhang, J. L. Belinson, et al.** Colposcopically directed biopsy, random cervical biopsy, and endocervical curettage in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia II or worse. 2004. *Am J Obstet Gynecol.* **191**:430-434.
37. **Pretorius R.G., R. J. Kim, J. L. Belinson, P. Elson, Y-L Qiao.** Inflation of sensitivity of cervical cancer screening tests secondary to correlated error in colposcopy. 2006. *J Low Genit Tract Dis.* **10(1)**:5-9.



Hologic, Inc.  
10210 Genetic Center Drive  
San Diego, CA 92121 USA

Assistenza clienti: +1 800-442-9892  
customersupport@hologic.com

Assistenza tecnica: +1 888 484 4747  
molecularsupport@hologic.com



**Hologic N.V.**  
Da Vincilaan 5  
1930 Zaventem  
Belgium

Per ulteriori informazioni di contatto visitare il sito [www.hologic.com](http://www.hologic.com).

Questo prodotto è destinato esclusivamente all'uso nel campo della diagnostica umana *in vitro*.

Hologic, Aptima, DTS, Leader, Panther, PreservCyt, SB100, ThinPrep e Tigris sono marchi commerciali e/o marchi commerciali registrati di Hologic, Inc. e/o delle aziende consociate negli Stati Uniti e/o in altri paesi.

eppendorf (stilizzato) e REPEATER sono marchi commerciali della Eppendorf AG.

RAININ è un marchio commerciale della Rainin Instruments, LLC.

TECAN e FREEDOM EVO sono marchi commerciali della Tecan Group AG.

SUREPATH e PREPSTAIN sono marchi commerciali di TriPath Imaging, Inc.

Tutti gli altri marchi commerciali che possono apparire in questo foglietto illustrativo appartengono ai rispettivi proprietari.

Questo prodotto potrebbe essere protetto da uno o più brevetti statunitensi identificati nel sito [www.hologic.com/patents](http://www.hologic.com/patents).

© 2007-2018 Hologic, Inc. Tutti i diritti riservati.  
AW-14517-701 Rev. 005

2018-03