

## Aptima HPV Assay

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Exclusivamente para exportação dos EUA.

<b>Informações gerais</b> .....	<b>2</b>
Utilização prevista .....	2
Resumo e explicação do teste .....	2
Princípios do procedimento .....	3
Advertências e precauções .....	4
Requisitos de conservação e manuseamento dos reagentes .....	6
Colheita e conservação de espécimes .....	7
<b>Procedimentos de controlo de qualidade</b> .....	<b>31</b>
<b>Interpretação do teste</b> .....	<b>32</b>
<b>Limitações</b> .....	<b>33</b>
<b>Desempenho do ensaio nos Sistemas DTS</b> .....	<b>35</b>
<b>Resultados previstos do Tigris DTS System: Prevalência de mRNA do HPV de alto risco</b> .....	<b>44</b>
<b>Desenho do Estudo Clínico Aptima HPV Assay com Espécimes de Citologia Líquida ThinPrep</b> .....	<b>45</b>
<b>Desempenho do ensaio no Tigris DTS System</b> .....	<b>47</b>
<b>Resultados previstos do Panther System: Prevalência de mRNA do HPV de alto risco</b> .....	<b>77</b>
<b>Desenho do estudo clínico do Aptima HPV Assay com espécimes de citologia líquida ThinPrep</b> .....	<b>78</b>
<b>Desempenho do ensaio no Panther System</b> .....	<b>80</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>104</b>

### Sistemas DTS™

<b>Sistemas DTS</b> .....	<b>9</b>
Reagentes e materiais fornecidos .....	9
Materiais necessários, mas disponíveis separadamente ....	10
Materiais opcionais .....	11
<b>Procedimento de teste dos Sistemas DTS</b> .....	<b>11</b>
Notas sobre o procedimento .....	17

### Panther™ System

<b>Panther System</b> .....	<b>25</b>
Reagentes e materiais fornecidos .....	25
Materiais necessários, mas disponíveis separadamente ....	26
Materiais opcionais .....	27
<b>Procedimento de teste no Panther System</b> .....	<b>27</b>
Notas sobre o procedimento .....	29

### Tigris™ DTS System

<b>Tigris DTS System</b> .....	<b>19</b>
Reagentes e materiais fornecidos .....	19
Materiais necessários, mas disponíveis separadamente ....	20
Materiais opcionais .....	21
<b>Procedimento de teste do Tigris DTS System</b> .....	<b>21</b>
Notas sobre o procedimento .....	24

## Informações gerais

### Utilização prevista

O Aptima HPV Assay (Ensaio do HPV Aptima) é um teste com sonda de amplificação do ácido nucleico alvo para a detecção qualitativa *in vitro* do RNA mensageiro (messenger RNA, mRNA) viral E6/E7 de 14 tipos de alto risco do vírus do papiloma humano (human papillomavirus, HPV) (16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68). O Aptima HPV Assay não discrimina entre os 14 tipos de alto risco.

- O Aptima HPV assay está indicado para utilização na selecção de doentes com resultados do exame de papanicolau com ASC-US (células escamosas atípicas de significado indeterminado) para determinar a necessidade para encaminhamento para colposcopia. Os resultados deste teste não se destinam a impedir que as mulheres prossigam para colposcopia.
- O Aptima HPV assay pode ser utilizado com citologia cervical para seleccionar por associação (co-testes) para avaliar a presença ou ausência de tipos de HPV de alto risco. Esta informação, juntamente com a avaliação do historial de citologia por parte do médico, outros factores de risco e directrizes profissionais, pode ser utilizada para guiar a gestão dos doentes.
- O Aptima HPV assay pode ser utilizado como teste de selecção principal de primeira linha, com ou sem citologia cervical, para identificar mulheres com maior risco de desenvolvimento de cancro do colo do útero ou de presença de doença de alto grau. Esta informação, juntamente com a avaliação do historial de selecção do doente por parte do médico, outros factores de risco e directrizes profissionais, pode ser utilizada para guiar a gestão dos doentes.

Os espécimes cervicais colhidos em frascos do exame de Papanicolau ThinPrep™ com Solução PreservCyt™ podem ser testados com o Aptima HPV Assay antes ou depois do processamento do teste de Papanicolau, bem como os espécimes cervicais colhidos com o Kit Aptima de Colheita e Transporte de Espécimes Cervicais. O ensaio pode ser utilizado para testar estes tipos de espécimes quer com os Sistemas de amostragem directa a partir do tubo (Direct Tube Sampling, DTS), com o Tigris DTS System ou com o Panther System. Os espécimes do colo do útero colhidos no Fluido Conservante SurePath podem ser analisados com o Aptima HPV Assay no Tigris DTS System e no Panther System.

### Resumo e explicação do teste

O cancro do colo do útero é um dos tipos de cancro feminino mais comuns em todo o mundo. O HPV é o agente etiológico responsável por mais de 99% de todos os cancros do colo do útero.<sup>1, 2, 3</sup> O HPV é um vírus de DNA comum, sexualmente transmissível, e constituído por mais de 100 genótipos.<sup>4</sup>

O genoma viral do HPV é um DNA circular de cadeia dupla com um comprimento aproximado de 7900 pares de bases. O genoma tem oito grelhas de leitura abertas sobrepostas. Há seis genes precoces (E), dois genes tardios (L) e uma longa região de controlo não traduzida. Os genes L1 e L2 codificam as proteínas das cápsides major e minor. Os genes precoces regulam a replicação viral do HPV. Os genes E6 e E7 dos genótipos de alto risco do HPV são oncogenes conhecidos. As proteínas expressas do mRNA policistrónico E6/E7 alteram as funções das proteínas celulares p53 e retinoblastoma, dando origem à falha dos pontos de verificação do ciclo celular e à instabilidade do genoma da célula.<sup>5, 6</sup>

Catorze dos genótipos do HPV são considerados patogénicos ou de alto risco para doença do colo do útero.<sup>7</sup> Diversos estudos têm associado os genótipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45,

51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 à progressão da doença.<sup>2, 5, 8</sup> Os doentes que apresentem uma infecção persistente com um desses tipos possuem um maior risco de desenvolver displasia grave ou carcinoma do colo do útero.<sup>7, 9</sup>

As infecções por HPV são muito comuns e a maioria das mulheres irão eliminar infecções por HPV no prazo de 6 a 12 meses.<sup>8, 10</sup> A presença de ácido nucleico de HPV não significa que estejam presentes displasia do colo do útero ou cancro do colo do útero. Uma abordagem mais eficaz à detecção de doença cervical consiste em visar os elementos oncogénicos do HPV que fomentam a infecção viral persistente e a transformação celular.<sup>3</sup>

### **Desempenho clínico do Aptima HPV Assay na selecção principal para cancro do colo do útero**

O desempenho clínico do Aptima HPV assay, quando utilizado numa modalidade de selecção principal, foi investigado em vários estudos por investigadores independentes. Treze publicações revistas por homólogos<sup>11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23</sup> a partir de dez estudos clínicos separados indicam o desempenho do Aptima HPV na selecção principal de mulheres inscritas em nove países (China, Canadá, França, México, Inglaterra, Dinamarca, Holanda, EUA e Alemanha). Os dados destes estudos mostram que o Aptima HPV tem um desempenho clínico semelhante comparativamente a outros testes HPV clinicamente validados quando utilizado para selecção principal para pré-cancro e cancro do colo do útero.

### **Princípios do procedimento**

O Aptima HPV Assay envolve três passos principais, os quais ocorrem num único tubo: captação do alvo, amplificação do alvo por amplificação mediada por transcrição (Transcription-Mediated Amplification, TMA),<sup>11</sup> e detecção dos produtos de amplificação pelo ensaio de protecção da hibridação (Hybridization Protection Assay, HPA).<sup>25</sup> O ensaio incorpora um controlo interno (Internal Control, IC) para controlar a captação, amplificação e detecção do ácido nucleico, bem como o erro do operador ou do instrumento.

Os espécimes são colhidos ou transferidos para um tubo que contém um meio de transporte de espécimes (specimen transport media, STM) que submete as células ao processo de lise, liberta o mRNA e o protege da degradação durante a conservação. Quando se executa o Aptima HPV Assay, o mRNA alvo é isolado do espécime através da utilização de oligómeros de captação que estão ligados a micropartículas magnéticas. Os oligómeros de captação contêm sequências complementares para regiões específicas das moléculas alvo do mRNA do HPV, bem como uma cadeia de resíduos de desoxiadenosina. Durante o passo de hibridação, as regiões específicas das sequências dos oligómeros de captação ligam-se a regiões específicas das moléculas alvo do mRNA do HPV. O complexo do oligómero de captação/alvo é então captado e retirado da solução reduzindo a temperatura da reacção para a temperatura ambiente. Esta redução da temperatura permite que a hibridação ocorra entre a região da desoxiadenosina no oligómero de captação e as moléculas de polidesoxitimidina que estão ligadas por covalência às partículas magnéticas. As micropartículas, incluindo as moléculas alvo do mRNA do HPV captadas ligadas a elas, são arrastadas para a parte lateral do tubo de reacção pela utilização de ímanes e o sobrenadante é aspirado. As partículas são lavadas para remover a matriz de espécime residual que possa conter inibidores de amplificação.

Terminada a captação do alvo, o mRNA do HPV é amplificado por TMA, que é um método de amplificação do ácido nucleico baseado na transcrição e que utiliza duas enzimas: a transcriptase reversa MMLV e a polimerase do RNA T7. A transcriptase reversa é utilizada para gerar uma cópia do DNA da sequência alvo do mRNA contendo uma sequência

promotora para a polimerase do RNA T7. A polimerase do RNA T7 produz várias cópias do produto de amplificação do RNA a partir do modelo da cópia do DNA.

A detecção do produto de amplificação é feita através do HPA utilizando sondas de ácido nucleico de cadeia simples marcadas por quimioluminescência que são complementares do produto de amplificação. As sondas de ácido nucleico marcadas são hibridadas especificamente no produto de amplificação. O Reagente de Selecção diferencia entre sondas hibridadas e não hibridadas através da desactivação da marca nas sondas não hibridadas. Durante o passo de detecção, a luz emitida a partir dos híbridos RNA:DNA marcados é medida como sinais de fótons denominados Unidades de Luz Relativa (Relative Light Units, RLU) num luminómetro. Os resultados finais do ensaio são interpretados com base no sinal para "cutoff" (S/CO) do analito.

O IC é adicionado a cada reacção através do Reagente de Captação do Alvo. O IC controla os passos da captação, amplificação e detecção do alvo do ensaio. O sinal de IC de cada reacção é distinguido do sinal do HPV pela diferente cinética de emissão de luz de sondas com marcas distintas.<sup>26</sup> O produto de amplificação específico do IC é detectado utilizando uma sonda com uma emissão de luz rápida (sinal intermitente). O produto de amplificação específico do HPV é detectado com a utilização de sondas com cinética de emissão de luz relativamente mais lenta (sinal contínuo). O ensaio cinético Dual (Dual Kinetic Assay, DKA) é um método usado para diferenciar entre os sinais das marcas do sinal intermitente e do sinal contínuo.<sup>26</sup>

## Advertências e precauções

- A. Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- B. Para mais advertências e precauções específicas, consulte os Manuais dos Operadores dos Sistemas DTS, do Tigris DTS System e do Panther System.

## Relacionados com o laboratório

- C. Utilize apenas os artigos de laboratório descartáveis que sejam fornecidos ou especificados.
- D. Empregue todas as precauções laboratoriais de rotina. Não coma, não beba nem fume nas áreas de trabalho designadas. Utilize luvas sem pó descartáveis, protecção ocular e batas de laboratório quando manusear espécimes e reagentes de um kit. Lave bem as mãos depois de manusear os espécimes e os reagentes do kit.
- E. **Advertência: Irritantes e Corrosivos:** Evite o contacto do Auto Detect 1 e 2 com a pele, olhos e membranas mucosas. Se estes fluidos entrarem em contacto com a pele ou os olhos, lave bem com água a zona afectada. Se estes fluidos derramarem, dilua o derrame com água antes de o limpar e secar.
- F. As superfícies de trabalho, as pipetas e outro equipamento têm de ser regularmente descontaminados com solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M). Consulte o *Procedimento de Teste de Sistemas DTS*, *Procedimento de Teste do Sistema Tigris DTS* ou o *Procedimento de Teste do Sistema Panther DTS* para mais informação.

## Específicos do Sistema DTS

- G. Para ajudar a prevenir que as áreas de laboratório fiquem contaminadas com o produto de amplificação, a área do laboratório deve estar disposta de modo a ter um fluxo de trabalho unidireccional, desde a preparação do reagente até à detecção. Os espécimes, equipamentos e reagentes não devem ser devolvidos à área onde um passo anterior

tenha sido executado. Além disso, os técnicos não devem voltar às áreas de trabalho anteriores sem as devidas medidas de protecção contra contaminação. Recomenda-se vivamente que haja uma área separada dedicada à detecção.

### Relacionados com os espécimes

- H. Mantenha as condições de temperatura adequadas durante o envio e conservação dos espécimes, de modo a garantir a integridade dos espécimes. A estabilidade do espécime não foi avaliada em condições de envio e conservação para além das recomendadas.
- I. As datas de validade indicadas nos kits e tubos de colheita/transferência de espécimes referem-se ao local da colheita/transferência e não às instalações de testes. Os espécimes colhidos/transferidos a qualquer momento antes destas datas de validade são válidos para efeitos de testes, desde que tenham sido transportados e conservados de acordo com o folheto informativo apropriado, mesmo que estas datas de validade tenham passado.
- J. Os espécimes podem ser infecciosos. Empregue Precauções Universais ao executar este ensaio. Os métodos de manuseamento e eliminação adequados devem ser estabelecidos pelo director do laboratório. Apenas o pessoal com a devida formação no manuseamento de materiais infecciosos deve ter permissão para realizar este procedimento.
- K. Evite a contaminação cruzada durante os passos de manuseamento dos espécimes. Certifique-se de que os recipientes de espécimes não entram em contacto uns com os outros e deite fora os materiais usados sem passá-los por cima de recipientes abertos. Mude de luvas se elas entrarem em contacto com o espécime.
- L. Após a perfuração, o líquido pode esguichar pelas tampas dos tubos em certas condições. Consulte *Procedimento de teste dos Sistemas DTS*, *Procedimento de teste do Tigris DTS System*, ou *Procedimento de teste no Panther System* para obter mais informações.
- M. Os espécimes de citologia líquida ThinPrep e de Colheita e Transporte de Espécimes do Colo do Útero (Cervical Specimen Collection and Transport, CSCT) devem ser rejeitados se tiver sido deixado um dispositivo de recolha no tubo de amostra.
- N. Os espécimes de citologia líquida SurePath devem ser rejeitados se não estiver presente um dispositivo de colheita no frasco.

### Relacionados com o ensaio

- O. Armazene os reagentes às temperaturas especificadas. O desempenho do ensaio pode ser afectado pela utilização de reagentes conservados de forma incorrecta.
- P. Evite a contaminação microbiana ou com ribonuclease dos reagentes.
- Q. Não utilize o kit após a data de validade.
- R. Não troque, misture ou combine reagentes do ensaio ou calibradores de kits com números de lote diferentes.
- S. Os Fluidos do Aptima Assay, os Reagentes Aptima Auto Detect, o Conservante do Fluido do Sistema Aptima (apenas DTS Systems e Tigris DTS System) e os Controlos do Aptima HPV assay (apenas DTS Systems e Tigris DTS System) não fazem parte do lote mestre; qualquer lote pode ser utilizado.

- T. É necessário misturar bem os reagentes do ensaio para alcançar resultados exactos.
- U. Tem de utilizar pontas com encaixes hidrofóbicos.

### Específicos do Sistema DTS

- V. Tem de haver pelo menos dois pipetadores de repetição dedicados a este ensaio: um para utilizar nos passos da **Captação** e da **Amplificação do Alvo** e outro para utilizar no passo **Pós-Amplificação**.
- W. Quando utilizar pipetadores de repetição para adição de reagentes, não toque no tubo com a ponta da pipeta para evitar a contaminação cruzada de um tubo para outro.
- X. Todos os pipetadores têm de ser limpos regularmente conforme descrito nas *Notas sobre o procedimento*.
- Y. São necessários pelo menos dois instrumentos SB100™ individuais: um para a Captação/Amplificação do Alvo e outro para a Pós-Amplificação.
- Z. NÃO reutilize cartões vedantes. Para cada passo, deve utilizar novos cartões vedantes.

### Requisitos de conservação e manuseamento dos reagentes

Não utilize reagentes que ultrapassem o prazo de validade indicado nos frascos. Consulte outras instruções de conservação abaixo.

- A. Os seguintes reagentes são conservados a uma temperatura de 2 °C a 8 °C (refrigerados) após a recepção:
  - Reagente de Amplificação do HPV
  - Reagente Enzimático do HPV
  - Reagente de Sonda do HPV
  - Reagente de Controlo Interno do HPV
  - Calibradores positivos e calibradores negativos do HPV
  - Controlos positivos e negativos do HPV (apenas sistemas DTS e sistema Tigris DTS)
- B. Os seguintes reagentes são conservados a uma temperatura de 15 °C a 30 °C (temperatura ambiente):
  - Solução de Reconstituição de Amplificação do HPV
  - Solução de reconstituição enzimática do HPV
  - Solução de reconstituição de sondas do HPV
  - Reagente de captura do alvo do HPV
  - Reagente de selecção do HPV
  - Solução de lavagem
  - Reagente de óleo
  - Tampão para o fluido de desactivação
  - Reagente Auto Detect 1
  - Reagente Auto Detect 2
  - Conservante do Fluido do Sistema Aptima (apenas para o Tigris DTS System)

- C. Após a reconstituição, os seguintes reagentes permanecem estáveis durante 30 dias desde que conservados a uma temperatura de 2 °C a 8 °C:
  - Reagente de Amplificação do HPV
  - Reagente Enzimático do HPV
  - Reagente de Sonda do HPV
- D. O reagente de captação do alvo de trabalho (working Target Capture Reagent, wTCR) permanece estável durante 30 dias desde que conservado a uma temperatura de 15 °C a 30 °C. Não refrigere.
- E. Deite fora quaisquer reagentes reconstituídos e o wTCR não utilizados após 30 dias ou após a data de validade do lote principal, conforme o que ocorrer primeiro.
- F. Os reagentes do Aptima HPV Assay permanecem estáveis durante 48 horas quando conservados no Tigris DTS System.
- G. Os reagentes do Aptima HPV Assay permanecem estáveis durante 72 horas quando conservados no Panther System.
- H. O Reagente de Sonda e o Reagente de Sonda Reconstituído são fotossensíveis. Conserve os reagentes ao abrigo da luz.
- I. Não congele os reagentes.

## Colheita e conservação de espécimes

### A. Colheita e processamento de espécimes

#### *Espécimes de citologia líquida ThinPrep*

1. Efectue a colheita de espécimes do colo do útero em frascos de exame de Papanicolau ThinPrep que contenham Solução PreservCyt com dispositivos de colheita tipo vassoura ou escova/espátula de acordo com as instruções do fabricante.
2. Antes ou depois do processamento com o ThinPrep 2000 System, o ThinPrep 3000 System, o ThinPrep 5000 Processor ou o ThinPrep 5000 Processor com Autoloader, transfira 1 ml de espécime de citologia líquida ThinPrep para um tubo de Transferência de Espécimes Aptima, de acordo com o folheto informativo do Kit de Transferência de Espécimes Aptima.

#### *Espécimes de citologia líquida SurePath (apenas Tigris DTS System e Panther System)*

1. Proceda à colheita de um espécime de citologia líquida SurePath de acordo com as instruções de utilização do exame de Papanicolau SurePath e/ou do PrepStain System.
2. Transfira o espécime de citologia líquida SurePath para um tubo de Transferência de Espécimes Aptima, de acordo com as instruções no folheto informativo do Kit de Transferência de Espécies Aptima.

#### *Espécimes do Kit Aptima de Colheita e Transporte de Espécimes Cervicais*

Proceda à colheita do espécime de acordo com as instruções de utilização do Kit CSCT Aptima.

### B. Transporte e conservação antes do teste

#### *Espécimes de citologia líquida ThinPrep*

1. Transporte os espécimes de citologia líquida ThinPrep a uma temperatura de 2 °C a 30 °C.

2. Os espécimes devem ser transferidos para um Tubo de Transferência de Espécimes Aptima num prazo de 105 dias após a colheita.
3. Antes da transferência, os espécimes de citologia líquida ThinPrep devem ser conservados a uma temperatura de 2 °C a 30 °C, e não mais de 30 dias a temperaturas acima de 8 °C.
4. Os espécimes de citologia líquida ThinPrep transferidos para um Tubo de Transferência de Espécimes Aptima podem ser conservados a uma temperatura de 2 °C a 30 °C durante um máximo de 60 dias.
5. Se for necessário um período de conservação mais longo, o espécime de citologia líquida ThinPrep ou o espécime de citologia líquida ThinPrep diluído no tubo de Transferência de Espécimes pode ser conservado a uma temperatura igual ou inferior a -20 °C durante um máximo de 24 meses.

*Espécimes de citologia líquida SurePath (apenas Tigris DTS System e Panther System)*

1. Transporte os espécimes de citologia líquida SurePath a uma temperatura de 2 °C a 25 °C.
2. Os espécimes devem ser transferidos para um Tubo de Transferência de Espécimes Aptima num prazo de 7 dias após a colheita.
3. Antes da transferência, os espécimes de citologia líquida SurePath devem ser conservados a temperaturas de 2 °C a 25 °C.
4. Os espécimes de citologia líquida SurePath transferidos para um tubo de Transferência de Espécimes Aptima podem ser conservados a uma temperatura de 2 °C a 25 °C durante um máximo de 7 dias.

*Espécimes do Kit Aptima de Colheita e Transporte de Espécimes Cervicais*

1. Transporte e conserve os espécimes a uma temperatura de 2 °C a 30 °C durante um máximo de 60 dias.
2. Se for necessário um período de conservação mais longo, os espécimes do kit de transporte podem ser conservados a uma temperatura de -20 °C ou menos durante um máximo de 24 meses.

C. Tratamento dos espécimes de citologia líquida SurePath (apenas Tigris DTS System e Panther System)

**Nota:** Os espécimes de citologia líquida SurePath têm de ser tratados com a Solução de Transferência Aptima antes de serem analisados com o Aptima HPV Assay.

1. Solução de Transferência Aptima (apenas Tigris DTS System e Panther System)

As amostras tratadas podem ser conservadas entre 2 °C e 8 °C durante até 17 dias antes da realização de testes com o Aptima HPV Assay. Consulte mais detalhes no folheto informativo do Kit de Transferência de Espécimes Aptima.

D. Conservação de espécimes após o teste

1. Os espécimes que tenham sido analisados devem ser conservados na vertical num suporte.
2. Os tubos de espécimes devem ser tapados com uma barreira de plástico ou de folha de alumínio nova e limpa.
3. Se os espécimes analisados tiverem de ser congelados ou transportados, retire a tampa perfurável e coloque novas tampas não perfuráveis nos tubos de espécimes. Se os espécimes tiverem de ser transportados para a realização de testes noutras instalações, as temperaturas especificadas deverão ser mantidas. Antes de destapar amostras que já tenham sido testadas e novamente tapadas, os tubos de espécimes devem ser centrifugados durante 5 minutos a 420 de Força Centrifuga Relativa (Relative Centrifugal Force, RCF) para levar todo o líquido para o fundo do tubo.

**Nota:** Os espécimes devem ser transportados de acordo com os regulamentos de transporte nacionais e internacionais em vigor.



## Sistemas DTS

Os reagentes para o Aptima HPV Assay estão indicados abaixo para os Sistemas DTS. Os Símbolos de Identificação do Reagente também estão indicados ao lado do nome do reagente.

### Reagentes e materiais fornecidos

**Nota:** Para obter informações sobre quaisquer declarações de perigo e de precaução que possam estar associadas a estes reagentes, consulte a Biblioteca de fichas de dados de segurança (Safety Data Sheet Library) em [www.hologic.com/sds](http://www.hologic.com/sds).

**Kit do Aptima HPV Assay**, 100 testes, Código de Produto 302610 (4 embalagens)

Os Calibradores e Controlos podem ser adquiridos em separado. Veja abaixo os códigos de produto das embalagens individuais.

#### Embalagem refrigerada do Aptima HPV (conservar a uma temperatura de 2 °C a 8 °C após a recepção)

Símbolo	Componente	Quantidade
<b>A</b>	<b>Reagente de Amplificação do HPV</b> <i>Ácidos nucleicos não infecciosos desidratados em solução tamponada com &lt; 5% de agente de volume.</i>	1 frasco
<b>E</b>	<b>Reagente Enzimático do HPV</b> <i>Transcriptase reversa e polimerase do RNA desidratadas em solução tamponada com HEPES com &lt; 10% de reagente de volume.</i>	1 frasco
<b>P</b>	<b>Reagente de Sonda do HPV</b> <i>Sondas de DNA quimioluminescentes não infecciosas (&lt; 500 ng/frasco) desidratadas em solução tamponada com succinato contendo &lt; 5% de detergente.</i>	1 frasco
<b>IC</b>	<b>Reagente de Controlo Interno do HPV</b> <i>Transcrito de RNA não infeccioso em solução tamponada com &lt; 5% de detergente.</i>	1 frasco

#### Embalagem à temperatura ambiente do Aptima HPV (conservar a uma temperatura de 15 °C a 30 °C após a recepção)

Símbolo	Componente	Quantidade
<b>AR</b>	<b>Solução de Reconstituição de Amplificação do HPV</b> <i>Solução aquosa contendo conservantes.</i>	1 frasco
<b>ER</b>	<b>Solução de reconstituição enzimática do HPV</b> <i>Solução tampão com HEPES contendo um agente tensoactivo e glicerol.</i>	1 frasco
<b>PR</b>	<b>Solução de reconstituição de sondas do HPV</b> <i>Solução tamponada com succinato contendo &lt; 5% de detergente.</i>	1 frasco
<b>S</b>	<b>Reagente de selecção do HPV</b> <i>Solução tamponada com 600 mM de borato contendo agente tensoactivo.</i>	1 frasco

**Embalagem à temperatura ambiente do Aptima HPV  
(conservar a uma temperatura de 15 °C a 30 °C após a recepção)**

Símbolo	Componente	Quantidade
TCR	<b>Reagente de captação do alvo do HPV</b> <i>Ácido nucleico não infeccioso numa solução tamponada contendo fase sólida (&lt; 0,5 mg/ml).</i>	1 frasco
	<b>Cartões Vedantes</b>	1 embalagem
	<b>Colarinhos de Reconstituição</b>	3

**Embalagem de calibradores Aptima HPV (Código de Produto 302554)  
(conservar a uma temperatura de 2 °C a 8 °C após a recepção)**

Símbolo	Componente	Quantidade
PCAL	<b>Calibrador Positivo do HPV</b> <i>Transcrito in vitro de HPV 16 não infeccioso a 1000 cópias por ml numa solução tamponada contendo &lt; 5% de detergente.</i>	5 frascos
NCAL	<b>Calibrador Negativo do HPV</b> <i>Solução tamponada contendo &lt; 5% de detergente.</i>	5 frascos

**Embalagem de controlos Aptima HPV (Código do Produto 302556)  
(conservar a uma temperatura de 2 °C a 8 °C após a recepção)**

Símbolo	Componente	Quantidade
PC	<b>Controlo Positivo do HPV</b> <i>Células cultivadas HPV negativas e HPV positivas, desactivadas e lisadas a 25 células por ml numa solução tamponada contendo &lt; 5% de detergente.</i>	5 frascos
NC	<b>Controlo Negativo do HPV</b> <i>Células cultivadas HPV negativas, desactivadas e lisadas, numa solução tamponada contendo &lt; 5% de detergente.</i>	5 frascos

**Materiais necessários, mas disponíveis separadamente**

**Nota:** Os materiais disponíveis na Hologic têm a indicação do código de produto, a menos que seja especificado em contrário.

	<u>Código de Produto</u>
Luminómetro Leader™ HC+	104747
Sistema de Captação do Alvo (Target Capture System, TCS) Hologic	104555
2 Bacias de Calor Seco/Agitadores SB100	105524F
Kit Aptima Auto Detect	301048C
Kit de Fluidos do Aptima Assay	302002C
Micropipetador, 1000 µl RAININ PR1000	104216
2 pipetadores eppendorf Repeater Plus	105725
Pontas de pipetador de repetição (2,5 ml, 5,0 ml, 25,0 ml)	—
Pontas, 1000 µl P1000	105049
<i>Pontas de diâmetro especial apenas disponíveis na Hologic</i>	
Unidades de Dez Tubos (Ten Tube Units, TTU)	TU0022
Suporte de TTU	104579

Cassetes de Dez Pontas (Ten Tip Cassettes, TTC)	104578
Kit de Transferência de Espécimes Aptima	301154C
Kit Aptima de Colheita e Transporte de Espécimes Cervicais	302657
Lixívia (mínimo de 5% ou 0,7 M de solução de hipoclorito de sódio)	—
Luvras descartáveis	—
Tampas Perfuráveis Aptima	105668
Tampas não perfuráveis de substituição	103036A

## Materiais opcionais

	<u>Código de Produto</u>
Instrumento TECAN Freedom EVO 100/4	900932
Conjunto da Placa do Tabuleiro Aptima, DTS 800	105200
Pontas, 1000 µl, condutoras, detecção de líquido	10612513 (Tecan)
Reservatório de reagente (módulo de quarto de 40 ml)	104765
Reservatório de reagente dividido (19 ml x 2 módulos de quarto)	901172
Intensificador de Lixívia para limpeza	302101

## Procedimento de teste dos Sistemas DTS

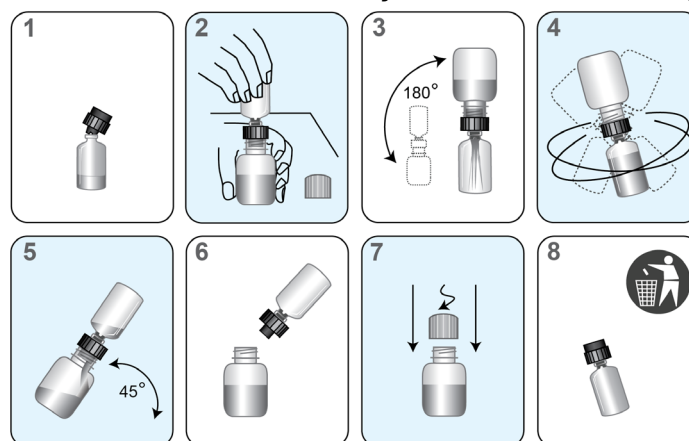
### A. Preparação da área de trabalho/equipamento

1. Antes de iniciar o ensaio, limpe as superfícies de trabalho e os pipetadores com 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M) de solução de hipoclorito de sódio. Deixe a solução entrar em contacto com as superfícies e os pipetadores durante pelo menos 1 minuto e depois enxagúe com água. Não deixe a solução secar. Cubra a superfície da bancada em que será executado o teste com capas absorventes para bancadas de laboratórios com forro plástico limpas.
2. Coloque um número suficiente de Cassetes de Dez Pontas no Sistema de Captação do Alvo (Target Capture System, TCS). Assegure-se de que a garrafa de lavagem do TCS está cheia com solução de lavagem e que o tubo de aspiração está ligado à bomba de vácuo. Consulte o *Target Capture System Operator's Manual* (Manual do Operador do Sistema de Captação do Alvo).
3. Prepare o instrumento TECAN Freedom EVO de acordo com as instruções no respectivo manual do operador e na HPV Application Sheet (Ficha de Aplicação do HPV).
4. Prepare o instrumento SB100 de pré-amplificação de acordo com as instruções no respectivo manual do operador e na HPV Application Sheet (Ficha de Aplicação do HPV). Ligue o instrumento e inicie o protocolo "APTIMA HPV PREAMP" para que o instrumento aqueça até 62 °C.
5. Terminado o passo de amplificação, prepare o instrumento SB100 de pós-amplificação de acordo com as instruções no respectivo manual do operador e na HPV Application Sheet (Ficha de aplicação do HPV). Ligue o instrumento e inicie o protocolo "APTIMA HPV PSTAMP" para que o instrumento aqueça até 62 °C.
6. Terminado o passo de amplificação, prepare o Luminómetro Leader HC+ de acordo com as instruções no respectivo manual do operador depois de adicionar o Reagente de Sonda conforme descrito nos passos Pós-Amplificação.

### B. Reconstituição/preparação dos reagentes de um novo kit

**Nota:** A reconstituição dos reagentes deve ser feita antes de se iniciar a transferência de espécimes.

1. Para reconstituir os Reagentes Aptima de Amplificação, Enzimático e de Sonda, combine os frascos de reagente liofilizado com a solução de reconstituição. Se estiverem refrigeradas, deixe as soluções de reconstituição alcançar a temperatura ambiente antes de serem utilizadas:
  - a. Emparelhe cada solução de reconstituição com o respectivo reagente liofilizado. Antes de aplicar o colarinho de reconstituição, certifique-se de que a solução de reconstituição e o reagente liofilizado têm cores de etiqueta correspondentes.
  - b. Abra o frasco do reagente liofilizado e insira bem a extremidade com entalhe do colarinho de reconstituição na abertura do frasco (Figura 1, Passo 1).
  - c. Abra o frasco da solução de reconstituição correspondente e coloque a tampa numa superfície de trabalho limpa e coberta.
  - d. Segurando o frasco de solução na bancada, insira com firmeza a outra extremidade do colarinho de reconstituição na abertura do frasco (Figura 1, Passo 2).
  - e. Inverta suavemente os frascos montados. Deixe a solução vaziar para dentro do recipiente de vidro (Figura 1, Passo 3).
  - f. Agite suavemente a solução no frasco para a misturar bem. Evite criar espuma quando agitar o frasco (Figura 1, Passo 4).
  - g. Aguarde que o reagente liofilizado se dissolva e depois inverta os frascos montados, inclinando-os a um ângulo de 45° para minimizar a espuma (Figura 1, Passo 5). Deixe o líquido vaziar novamente para o frasco.
  - h. Retire o colarinho de reconstituição e o frasco de vidro (Figura 1, Passo 6).
  - i. Volte a colocar a tampa no frasco de plástico. Registe as iniciais do operador e a data de reconstituição nos frascos de reagente reconstituídos (Figura 1, Passo 7).
  - j. Deite fora o colarinho de reconstituição e o frasco de vidro (Figura 1, Passo 8).



**Figura 1. Processo de reconstituição dos Sistemas DTS**

2. Prepare o Reagente de Captação do Alvo de trabalho (working Target Capture Reagent, wTCR).
  - a. Emparelhe os frascos de TCR e de Controlo Interno (Internal Control, IC) adequados.
  - b. Abra o frasco de TCR e deposite a tampa numa superfície de trabalho limpa e coberta.
  - c. Abra o frasco de IC e deite todo o conteúdo num frasco de TCR. Uma pequena quantidade de líquido pode permanecer no frasco de IC.
  - d. Tape o frasco de TCR e agite suavemente a solução para misturar bem o conteúdo. Evite formar espuma durante este passo.

- e. Anote as iniciais do operador e a data actual na etiqueta.
- f. Deite fora o frasco e a tampa do IC.
- g. Pode ocorrer formação de precipitado no wTCR. O precipitado pode ser dissolvido aquecendo o wTCR a uma temperatura de 42 °C a 60 °C até um máximo de 90 minutos. Deixe o wTCR equilibrar à temperatura ambiente antes de ser utilizado.

### 3. Prepare o Reagente de Selecção

Se o Reagente de Selecção contiver precipitado, aqueça o Reagente de Selecção a 60 °C ± 1 °C por um máximo de 45 minutos para facilitar a dissolução do precipitado. Misture o frasco suavemente a cada 5 a 10 minutos. Deixe o Reagente de Selecção equilibrar à temperatura ambiente antes de ser utilizado. Não utilize se o precipitado ou a nebulosidade persistir.

### C. Preparação de reagentes previamente reconstituídos

1. Os Reagentes de Sonda, Amplificação e Enzimático previamente reconstituídos têm de alcançar a temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) antes do início do ensaio.
2. Se o Reagente de Sonda reconstituído contiver precipitado que não se dissolva novamente à temperatura ambiente, aqueça-o a uma temperatura máxima de 60 °C durante 1 ou 2 minutos. Após a ressuspensão, misture o frasco invertendo-o suavemente. Não utilize se houver precipitado ou nebulosidade.
3. Se o wTCR contiver precipitado, aqueça o wTCR a uma temperatura de 42 °C a 60 °C durante um máximo de 90 minutos. Deixe o wTCR equilibrar à temperatura ambiente antes de ser utilizado.
4. Se o Reagente de Selecção contiver precipitado, aqueça o Reagente de Selecção a 60 °C ± 1 °C por um máximo de 45 minutos para facilitar a dissolução do precipitado. Misture o frasco suavemente a cada 5 a 10 minutos. Deixe o Reagente de Selecção equilibrar à temperatura ambiente antes de ser utilizado. Não utilize se o precipitado ou a nebulosidade persistir.
5. Misture bem cada reagente invertendo-o suavemente antes de ser utilizado. Evite formar espuma durante a inversão dos reagentes.

### D. Configuração do suporte

1. Deixe as amostras (calibradores, controlos e espécimes) alcançar a temperatura ambiente antes de serem processadas.
2. Não coloque as amostras no agitador.
3. Inspeccione os tubos de amostras antes de os furar. Se um tubo de amostra contiver bolhas ou um volume mais inferior ao normalmente observado, centrifugue o tubo durante 5 minutos a 420 RCF para garantir que não há líquido na tampa.

**Nota:** Se não executar o passo 3, poderá sair líquido da tampa do tubo de espécime.

4. Nos suportes de TTU, coloque TTU suficientes para acomodar os calibradores, controlos e espécimes.
5. (Opcional) Crie uma lista de trabalho utilizando o software Aptima Worklist Editor. Consulte a secção do Worklist Editor no *Aptima Assay Software Operator's Manual* (Manual do Operador do Software do Aptima HPV Assay) para obter instruções específicas.

### Opção de pipetagem manual

1. Misture bem o wTCR (TCR mais IC). Utilizando um pipetador de repetição, adicione 100 µl de wTCR a cada tubo de reacção.

2. Utilizando um micropipetador, fure a tampa do tubo de amostra, tendo o cuidado de não bater com a ponta no fundo do tubo.
3. Utilize uma nova ponta de pipeta para cada calibrador, controlo e espécime.
4. Adicione 400 µl do Calibrador Negativo aos três primeiros tubos da primeira TTU.
5. Adicione 400 µl do Calibrador Positivo aos tubos 4-6 da primeira TTU.
6. Adicione 400 µl do Controlo Negativo ao tubo 7 da primeira TTU.
7. Adicione 400 µl do Controlo Positivo ao tubo 8 da primeira TTU.
8. Adicione 400 µl de cada espécime aos tubos restantes.
9. Quando todas as amostras tiverem sido pipetadas, cubra as TTU com cartões vedantes e avance com a Captação do Alvo.

#### Opção do instrumento TECAN Freedom EVO

Consulte a *TECAN Freedom EVO 100/4 Application Sheet for the Aptima HPV Assay* (Ficha de Aplicação do TECAN Freedom EVO 100/4 para o Aptima HPV Assay) para obter instruções específicas sobre a adição de wTCR e de amostras, se utilizar este instrumento.

#### E. Captação do Alvo

Para obter informações detalhadas sobre a utilização do instrumento SB100 com o Aptima HPV Assay, consulte a *SB100 Dry Heat Bath/Vortexer Application Sheet for the Aptima HPV Assay* (Ficha de Aplicação da Bacia de Calor Seco/Agitador SB100 para o Aptima HPV Assay).

Para informações sobre a utilização do Sistema de Captação do Alvo Hologic, consulte o *Target Capture System Operator's Manual* (Manual do Operador do Sistema de Captação do Alvo).

**Nota:** O pipetador de repetição utilizado na captação e amplificação do alvo deve estar dedicado apenas a estes passos. Consulte o *Procedimento de teste do Tigris DTS System* para obter mais informações.

1. Cubra os cartões vedantes com a estrutura do SB100.
2. Assim que o instrumento SB100 tiver alcançado os 62 °C, segurando na estrutura e no suporte juntos para assegurar que as TTU estejam fixas no suporte, leve o suporte para o bloco de aquecimento. Tenha cuidado para não salpicar o conteúdo nos cartões vedantes. Rode os manípulos pretos até os rolamentos ficarem encaixados nos orifícios da estrutura.
3. Prima a tecla apropriada para iniciar o programa.
4. Quando indicado pelo visor do SB100 terminada a última incubação, retire suavemente o suporte do bloco de aquecimento, tendo cuidado para não salpicar o conteúdo nos cartões vedantes.
5. Coloque o suporte na base magnética do Sistema de Captação do Alvo (Target Capture System, TCS) durante 5 a 10 minutos. Execute os seguintes passos de lavagem:
  - a. Purgue as linhas da bomba da Estação de Distribuição bombeando a Solução de Lavagem através do tubo de distribuição. Bombeie líquido suficiente pelo sistema para que não existam bolhas de ar na linha e todos os 10 bicos forneçam um fluxo de líquido constante.
  - b. Ligue a bomba de vácuo e desligue o tubo de aspiração no primeiro conector entre o tubo e a garrafa colectora. Certifique-se de que o vacuómetro cumpre a especificação do teste de fuga. Pode demorar 15 segundos a alcançar esta leitura. Volte a ligar o tubo de aspiração e assegure-se de que o vacuómetro cumpre a especificação do nível de vácuo. Deixe a bomba de vácuo ligada até que todos os passos da captação do alvo estejam concluídos e o tubo de aspiração esteja seco.

- c. Fixe bem o tubo de aspiração no primeiro conjunto de pontas. aspire todo o líquido baixando as pontas para a primeira TTU até as pontas entrarem brevemente em contacto com o fundo dos tubos. Não mantenha as pontas em contacto com o fundo dos tubos.
  - d. Terminada a aspiração, ejecte as pontas para a respectiva cassette de pontas original. Repita os passos da aspiração para as TTU restantes, utilizando uma ponta dedicada para cada espécime.
  - e. Coloque o tubo de distribuição sobre cada TTU e, utilizando a bomba da Estação de Distribuição, forneça 1,0 ml de Solução de Lavagem a cada tubo da TTU.
  - f. Cubra os tubos com um cartão vedante e retire o suporte do TCS.
6. Cubra os cartões vedantes com a estrutura do SB100 e leve o suporte para o bloco de aquecimento do SB100. Seleccione a tecla adequada para agitar os tubos. Terminado o vórtice, retire o suporte.
  7. No instrumento SB100, prima a tecla apropriada para prosseguir com o pré-aquecimento do bloco.
  8. Coloque o suporte de volta no TCS e repita os passos de aspiração nos pontos 5c e 5d acima.
  9. Após a aspiração final, retire o suporte da base magnética do TCS e inspeccione os tubos visualmente para assegurar que todo o líquido tenha sido aspirado e que todos os tubos contêm bolinhas de partículas magnéticas. Se for visível qualquer líquido, coloque o suporte de novo na base do TCS durante 2 minutos e repita a aspiração para essa TTU utilizando as mesmas pontas utilizadas anteriormente para cada espécime.
  10. Avance para o passo da Amplificação.

#### F. Amplificação

1. Adicione o Reagente de Amplificação e de Óleo.

##### Opção de pipetagem manual

- a. Utilizando o pipetador de repetição, adicione 75 µl do Reagente de Amplificação reconstituído a cada tubo de reacção. Todas as misturas de reacção no suporte deverão estar vermelhas.
- b. Utilizando o pipetador de repetição, adicione 200 µl de Reagente de Óleo.
- c. Cubra os tubos com cartões vedantes.
- d. Avance para o Passo 2.

##### Opção do instrumento TECAN Freedom EVO

Consulte a *TECAN Freedom EVO 100/4 Application Sheet for the Aptima HPV Assay* (Ficha de Aplicação TECAN Freedom EVO 100/4 para o Aptima HPV Assay) para obter instruções específicas sobre a adição dos Reagentes de Amplificação e de Óleo, se utilizar este instrumento.

2. Cubra os cartões vedantes com a estrutura do SB100 e leve o suporte para o bloco de aquecimento.
3. Prima a tecla apropriada para iniciar a incubação.
4. Quando indicado, retire a estrutura do SB100. Retire e deite fora os cartões vedantes e adicione 25 µl do Reagente Enzimático reconstituído utilizando um pipetador de repetição, enquanto o suporte ainda estiver no bloco de aquecimento.
5. Cubra os tubos com novos cartões vedantes e a estrutura do SB100.
6. Prima a tecla apropriada para iniciar a incubação de amplificação.

7. Terminado o passo de incubação, retire o suporte do instrumento SB100 e prossiga com o passo Pós-Amplificação.

#### G. Pós-amplificação

Ligue o instrumento SB100 de pós-amplificação e seleccione o protocolo "APTIMA HPV PSTAMP" para que o instrumento aqueça até 62 °C.

Para obter informações específicas sobre a utilização do instrumento SB100 com o Aptima HPV Assay, consulte a *SB100 Dry Heat Bath/Vortexer Application Sheet for the Aptima HPV Assay* (Ficha de Aplicação da Bacia de Calor Seco/Agitador SB100 para o Aptima HPV Assay).

**Nota:** O pipetador de repetição utilizado na detecção deve estar dedicado apenas a estes passos. Consulte a secção "Advertências e precauções".

**Nota:** Os passos pós-amplificação devem ser realizados numa área diferente dos passos de preparação de reagentes e pré-amplificação. Consulte a secção "Notas sobre o procedimento".

1. Retire os cartões vedantes e deite-os fora.
2. Utilizando o pipetador de repetição, adicione 100 µl do Reagente de Sonda reconstituído a cada tubo de reacção. Todas as misturas de reacção deverão estar amarelas.
3. Cubra os tubos com os cartões vedantes e a estrutura do SB100 e leve o suporte para o bloco de aquecimento.
4. Prima a tecla apropriada para iniciar os passos de agitação/incubação.
5. Terminado o passo de incubação, retire o suporte e deixe-o a incubar à temperatura ambiente durante 5 minutos. Assegure-se de que selecciona a tecla apropriada no teclado do SB100 para iniciar o período de incubação.
6. Terminados os 5 minutos, conforme indicado pelo visor do SB100, adicione 250 µl de Reagente de Selecção a cada tubo de reacção utilizando um pipetador de repetição. Todas as misturas de reacção deverão estar cor-de-rosa.
7. Cubra os tubos com os cartões vedantes e a estrutura do SB100 e leve o suporte para o bloco de aquecimento. Prima a tecla apropriada para iniciar os passos de agitação/incubação.
8. Terminada a incubação, retire o suporte do instrumento SB100 e avance para a Detecção.

#### H. Detecção

1. O passo da detecção deve ser realizado a uma temperatura de 18 °C a 28 °C.
2. Assegure-se de que há volume suficiente de Auto Detect 1 e 2 para completar os testes.
3. Prepare o Luminómetro Leader HC+ colocando uma TTU vazia na posição 1 da cassete e executando o protocolo WASH. Para obter instruções específicas, consulte o *Leader HC+ Luminometer Operator's Manual* (Manual do Operador do Luminómetro Leader HC+).
4. Coloque as TTU no luminómetro.
5. Inicie a sessão no Software do Aptima HPV Assay. Caso uma lista de trabalho tenha sido criada, assegure-se de que está activado o caminho correcto, para que o Software do Aptima HPV Assay possa localizar a lista de trabalho correcta.
6. Clique em **NEW RUN** (Nova Execução). Caso uma lista de trabalho não tenha sido criada, introduza o número de tubos (Calibradores, Controlos e espécimes). Clique em **NEXT** (Seguinte) para iniciar a execução.

**Nota:** A execução deve ser realizada num período de 2 horas após o final da incubação do passo de selecção.



7. Prepare Fluido de Desactivação misturando volumes idênticos de 5% a 7% (0,7 M a 1,0 M) de solução de hipoclorito de sódio e de Tampão Aptima para Fluido de Desactivação num recipiente de plástico com tampa grande. Coloque uma etiqueta e escreva a data de validade no recipiente de plástico. O Fluido de Desactivação permanece estável durante 4 semanas à temperatura ambiente.
8. Depois de ter retirado as TTU utilizadas do luminómetro, coloque as TTU no recipiente com Fluido de Desactivação. Deixe as TTU no recipiente durante 15 minutos, antes de as deitar fora. Os métodos de manuseamento e eliminação adequados devem ser estabelecidos pelo director do laboratório.

## Notas sobre o procedimento

### A. Calibradores

Cada execução de um máximo de 100 testes deve conter três réplicas do Calibrador Negativo e do Calibrador Positivo. Para trabalhar adequadamente com o Software do Aptima HPV Assay, as três réplicas do Calibrador Negativo, seguidas das três réplicas do Calibrador Positivo, devem estar nas primeiras seis posições da primeira TTU. A colocação na posição errada causa a falha da execução.

### B. Controlos

Cada execução de um máximo de 100 testes deve conter uma réplica do Controlo Negativo e do Controlo Positivo. O Controlo Negativo deve estar na sétima posição dos tubos, seguido do Controlo Positivo na oitava posição dos tubos. A colocação na posição errada causa a falha da execução.

### C. Pipetagem de amostras

1. O volume de amostra adicionado ao tubo de reacção deve ser  $400 \mu\text{l} \pm 100 \mu\text{l}$ .  
Recomenda-se a inspecção visual do volume pipetado para a TTU para assegurar uma transferência adequada do volume. É necessário um volume de espécime adequado para fornecer resultados exactos. Se o volume adequado não tiver sido pipetado, volte a pipetar o Reagente de Captação do Alvo de trabalho e o espécime para um novo tubo de reacção.
2. Deite as amostras em cada tubo com cuidado, evitando o contacto com o rebordo para minimizar a hipótese de contaminação cruzada de um tubo para outro.

### D. Temperatura

1. A temperatura ambiente define-se como uma temperatura entre 15 °C e 30 °C.
2. A Detecção é sensível à temperatura. A temperatura do laboratório na área de detecção deve estar entre 18 °C e 28 °C.

### E. Tempo

As reacções da captação do alvo, da amplificação, da hibridação e da selecção dependem todas do tempo. Respeite os tempos especificados no *Procedimento de teste dos Sistemas DTS*.

### F. Pó das luvas

Como em qualquer sistema de reagentes, o excesso de pó nalgumas luvas pode causar a contaminação de tubos abertos. É recomendada a utilização de luvas sem pó.

## G. Descontaminação

1. As superfícies das bancadas de laboratório e os pipetadores têm de ser descontaminados regularmente com 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M) de solução de hipoclorito de sódio. Deixe a solução entrar em contacto com as superfícies durante pelo menos 1 minuto e depois enxagúe com água. Não deixe a solução secar. As soluções com cloro podem provocar corrosão nos equipamentos e metais. Enxagúe bem o equipamento com água para evitar a corrosão.
2. Descontamine o instrumento TECAN Freedom EVO de acordo com as instruções no Manual do Operador.
3. Descontamine os instrumentos SB100 conforme as instruções na *SB100 Dry Heat Bath/Vortexer Application Sheet for the Aptima HPV Assay* (Ficha de Aplicação da Bacia de Calor Seco/Agitador SB100 para o Aptima HPV Assay).
4. Descontamine o Sistema de Captação do Alvo conforme as instruções no *Target Capture System Operator's Manual* (Manual do Operador do Sistema de Captação do Alvo).
5. Limpe as superfícies da unidade TCS e lave as pontas de ejeção de tampão com toalhas de papel humedecidas com 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M) de solução de hipoclorito de sódio. Depois, enxagúe com água e seque as superfícies totalmente com toalhas de papel.
6. Mergulhe os suportes de TTU em 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M) de solução de hipoclorito de sódio, garantindo que estejam cobertos pela solução. Mantenha os suportes mergulhados durante 10 minutos. Uma exposição mais prolongada pode danificar os suportes. Enxagúe bem os suportes com água, coloque-os numa superfície absorvente limpa e deixe-os secar completamente. Para prolongar a vida útil dos suportes, deixe-os secar direitos e não virados ao contrário.
7. As TTU devem ser descontaminadas com o Fluido de Desactivação, conforme descrito no passo da Detecção. Não volte a utilizar as TTU.

## Tigris DTS System

Os reagentes para o Aptima HPV Assay estão indicados abaixo para o Tigris DTS System. Os Símbolos de Identificação do Reagente também estão indicados ao lado do nome do reagente.

### Reagentes e materiais fornecidos

**Kit do Aptima HPV Assay, 250 testes, Código de Produto 302611 (4 embalagens)**

Os Calibradores e Controlos podem ser adquiridos em separado. Veja abaixo os códigos de produto das embalagens individuais.

#### Embalagem refrigerada do Aptima HPV (conservar a uma temperatura de 2 °C a 8 °C após a recepção)

Símbolo	Componente	Quantidade
<b>A</b>	<b>Reagente de Amplificação do HPV</b> <i>Ácidos nucleicos não infecciosos desidratados em solução tamponada com &lt; 5% de agente de volume.</i>	1 frasco
<b>E</b>	<b>Reagente Enzimático do HPV</b> <i>Transcriptase reversa e polimerase do RNA desidratadas em solução tamponada com HEPES com &lt; 10% de reagente de volume.</i>	1 frasco
<b>P</b>	<b>Reagente de Sonda do HPV</b> <i>Sondas de DNA quimioluminescentes não infecciosas (&lt; 500 ng/frasco) desidratadas em solução tamponada com succinato contendo &lt; 5% de detergente.</i>	1 frasco
<b>IC</b>	<b>Reagente de Controlo Interno do HPV</b> <i>Transcrito de RNA não infeccioso em solução tamponada com &lt; 5% de detergente.</i>	1 frasco

#### Embalagem à temperatura ambiente do Aptima HPV (conservar a uma temperatura de 15 °C a 30 °C após a recepção)

Símbolo	Componente	Quantidade
<b>AR</b>	<b>Solução de Reconstituição de Amplificação do HPV</b> <i>Solução aquosa contendo conservantes.</i>	1 frasco
<b>ER</b>	<b>Solução de reconstituição enzimática do HPV</b> <i>Solução tampão com HEPES contendo um agente tensioactivo e glicerol.</i>	1 frasco
<b>PR</b>	<b>Solução de reconstituição de sondas do HPV</b> <i>Solução tamponada com succinato contendo &lt; 5% de detergente.</i>	1 frasco
<b>S</b>	<b>Reagente de selecção do HPV</b> <i>Solução tamponada com 600 mM de borato contendo agente tensioactivo.</i>	1 frasco
<b>TCR</b>	<b>Reagente de captação do alvo do HPV</b> <i>Ácido nucleico não infeccioso numa solução tamponada contendo fase sólida (&lt; 0,5 mg/ml).</i>	1 frasco
	<b>Colarinhos de Reconstituição</b>	3
	<b>Ficha de Códigos de Barras do Lote Principal</b>	1 folha

**Embalagem de calibradores Aptima HPV (Código de Produto 302554)  
(conservar a uma temperatura de 2 °C a 8 °C após a recepção)**

Símbolo	Componente	Quantidade
<b>PCAL</b>	<b>Calibrador Positivo do HPV</b> <i>Transcrito in vitro de HPV 16 não infeccioso a 1000 cópias por ml numa solução tamponada contendo &lt; 5% de detergente.</i>	5 frascos
<b>NCAL</b>	<b>Calibrador Negativo do HPV</b> <i>Solução tamponada contendo &lt; 5% de detergente.</i>	5 frascos

**Embalagem de controlos Aptima HPV (Código do Produto 302556)  
(conservar a uma temperatura de 2 °C a 8 °C após a recepção)**

Símbolo	Componente	Quantidade
<b>PC</b>	<b>Controlo Positivo do HPV</b> <i>Células cultivadas HPV negativas e HPV positivas, desactivadas e lisadas a 25 células por ml numa solução tamponada contendo &lt; 5% de detergente.</i>	5 frascos
<b>NC</b>	<b>Controlo Negativo do HPV</b> <i>Células cultivadas HPV negativas, desactivadas e lisadas, numa solução tamponada contendo &lt; 5% de detergente.</i>	5 frascos

**Materiais necessários, mas disponíveis separadamente**

**Nota:** Os materiais disponíveis na Hologic têm a indicação do código de produto, a menos que seja especificado em contrário.

	<u>Código de Produto</u>
Tigris DTS System	105118
Kit de Fluidos do Aptima Assay <i>(Solução de Lavagem Aptima, Tampão Aptima para Fluido de Desactivação e Reagente de Óleo Aptima)</i>	302382
Kit Aptima Auto Detect	301048
Kit de Conservante do Fluido do Sistema Aptima	302380
Pontas, 1000 µl, condutoras, detecção de líquido	10612513 (Tecan)
Kit de Execução do Tigris DTS System <i>Unidades Multitubos (Multi-tube Units, MTU)</i>	301191 104772-02
<i>Saco de Resíduos de MTU-Pontas</i>	900907
<i>Deflectores do Recipiente de Resíduos de MTU</i>	900931
<i>Tampas do Recipiente de Resíduos de MTU</i>	105523
Kit de Transferência de Espécimes Aptima	301154C
Kit Aptima de Colheita e Transporte de Espécimes Cervicais	302657
Tampas Perfuráveis Aptima	105668
Tampas não perfuráveis de substituição	103036A
Tampas sobresselentes para soluções de reconstituição dos Reagentes de Amplificação e de Sonda	CL0041
Tampas sobresselentes para a solução de reconstituição do Reagente Enzimático	501616
Tampas sobresselentes para o TCR e o Reagente de Selecção	CL0040
Lixívia (mínimo de 5% ou 0,7 M de solução de hipoclorito de sódio)	—

Água para o Tigris DTS System	—
<i>Consulte o Tigris DTS System Operator's Manual (Manual do Operador do Tigris DTS System) para especificações</i>	
Luvas descartáveis	—
Kit de Solução de Transferência Aptima (apenas para espécimes conservados em SurePath)	303658

## Materiais opcionais

	<u>Código de Produto</u>
Intensificador de Lixívia para limpeza	302101

## Procedimento de teste do Tigris DTS System

**Nota:** Consulte o *Tigris DTS System Operator's Manual (Manual do Operador do Tigris DTS System)* para mais informações sobre o procedimento do Tigris DTS System.

### A. Preparação da área de trabalho

Limpe as superfícies de trabalho onde serão preparados os reagentes e as amostras. Limpe as superfícies de trabalho com 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M) de solução de hipoclorito de sódio. Deixe a solução de hipoclorito de sódio entrar em contacto com as superfícies durante pelo menos 1 minuto e depois enxagúe com água. Não deixe a solução de hipoclorito de sódio secar. Cubra a superfície da bancada onde serão preparados os reagentes e as amostras com capas limpas e absorventes para bancadas de laboratórios com forro plástico.

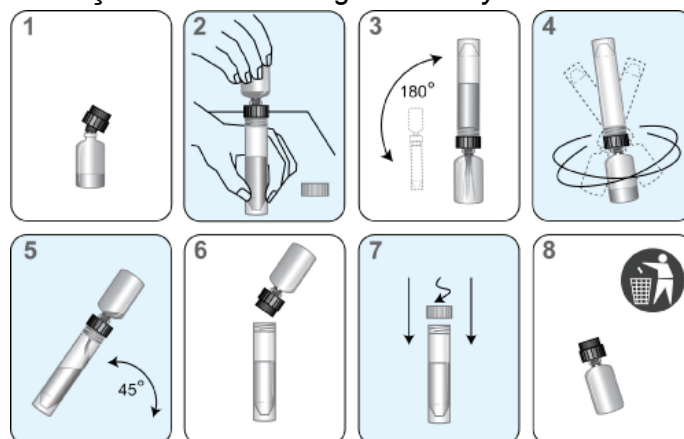
### B. Preparação dos reagentes de um novo kit

**Nota:** A *Reconstituição dos Reagentes deve ser realizada antes de qualquer trabalho no Tigris DTS System.*

1. Para reconstituir os Reagentes de Amplificação, Enzimático e de Sonda, combine os frascos do reagente liofilizado com a solução de reconstituição. Se estiverem refrigeradas, deixe as soluções de reconstituição alcançar a temperatura ambiente antes de serem utilizadas.
  - a. Emparelhe cada solução de reconstituição com o respectivo reagente liofilizado. Antes de aplicar o colarinho de reconstituição, certifique-se de que a solução de reconstituição e o reagente liofilizado têm cores de etiqueta correspondentes.
  - b. Verifique os números do lote na Ficha de Códigos de Barras do Lote Principal para garantir que estão emparelhados os reagentes adequados.
  - c. Abra o frasco do reagente liofilizado e insira bem a extremidade com entalhe do colarinho de reconstituição na abertura do frasco (Figura 2, Passo 1).
  - d. Abra a solução de reconstituição correspondente e coloque a tampa sobre uma superfície de trabalho limpa e coberta.
  - e. Segurando o frasco de solução na bancada, insira bem a outra extremidade do colarinho de reconstituição na abertura do frasco (Figura 2, Passo 2).
  - f. Inverta suavemente os frascos montados. Deixe a solução vazar do frasco para o frasco de vidro (Figura 2, Passo 3).
  - g. Agite suavemente a solução no frasco para a misturar bem. Evite criar espuma quando agitar o frasco (Figura 2, Passo 4).

- h. Aguarde que o reagente liofilizado se dissolva e depois inverta novamente os frascos montados, inclinando-os a um ângulo de 45° para minimizar a formação de espuma (Figura 2, Passo 5). Deixe o líquido vaziar todo de novo para o frasco de plástico.
- i. Retire o colarinho de reconstituição e o frasco de vidro (Figura 2, Passo 6).
- j. Volte a colocar a tampa no frasco de plástico. Registe as iniciais do operador e a data de reconstituição em todos os frascos de reagente reconstituídos (Figura 2, Passo 7).
- k. Deite fora o colarinho de reconstituição e o frasco de vidro (Figura 2, Passo 8).

**Advertência:** Evite formar espuma quando reconstituir os reagentes. A espuma compromete a detecção de nível no Tigris DTS System.



**Figura 2. Processo de reconstituição do Tigris DTS System**

2. Prepare o Reagente de Captação do Alvo de trabalho (wTCR):
  - a. Emparelhe os frascos de TCR e de Controlo Interno (Internal Control, IC) adequados.
  - b. Verifique os números do lote de reagente na Ficha de Códigos de Barras do Lote Principal para garantir que estão emparelhados os reagentes adequados do kit.
  - c. Abra o frasco de TCR e deposite a tampa numa superfície de trabalho limpa e coberta.
  - d. Abra o frasco de IC e deite todo o conteúdo no frasco de TCR. Uma pequena quantidade de líquido deverá ficar no frasco de IC.
  - e. Tape o frasco de TCR e agite suavemente a solução para misturar o conteúdo. Evite formar espuma durante este passo.
  - f. Anote as iniciais do operador e a data actual na etiqueta.
  - g. Deite fora o frasco e a tampa do IC.
  - h. É possível que haja formação de precipitado no wTCR, o que pode resultar em resultados inválidos devido aos erros de verificação de volume. O precipitado pode ser dissolvido aquecendo o wTCR a uma temperatura de 42 °C a 60 °C durante um máximo de 90 minutos. Deixe o wTCR equilibrar à temperatura ambiente antes de ser utilizado. Não utilize se o precipitado persistir.

3. Prepare o Reagente de Selecção
  - a. Verifique o número do lote de reagente na Ficha de Códigos de Barras do Lote Principal para garantir que pertence ao kit.
  - b. Se o Reagente de Selecção contiver precipitado, aqueça o Reagente de Selecção a  $60\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por um máximo de 45 minutos para facilitar a dissolução do precipitado. Misture o frasco suavemente a cada 5 a 10 minutos. Deixe o Reagente de Selecção equilibrar à temperatura ambiente antes de ser utilizado. Não utilize se o precipitado ou a nebulosidade persistir.

**Nota:** *Misture bem todos os reagentes invertendo-os suavemente, antes de os colocar no sistema. Evite formar espuma durante a inversão dos reagentes.*

C. Preparação de reagentes previamente reconstituídos

1. Os Reagentes de Sonda, Amplificação e Enzimático previamente reconstituídos têm de alcançar a temperatura ambiente ( $15\text{ °C}$  a  $30\text{ °C}$ ) antes do início do ensaio.
2. Se o Reagente de Sonda reconstituído contiver precipitado que não se dissolva novamente à temperatura ambiente, aqueça-o a uma temperatura máxima de  $60\text{ °C}$  durante 1 ou 2 minutos. Não utilize se houver precipitado ou nebulosidade.
3. Se o wTCR contiver precipitado, aqueça o wTCR a uma temperatura de  $42\text{ °C}$  a  $60\text{ °C}$  durante um máximo de 90 minutos. Deixe o wTCR equilibrar à temperatura ambiente antes de ser utilizado. Não utilize se o precipitado persistir.
4. Se o Reagente de Selecção contiver precipitado, aqueça o Reagente de Selecção a  $60\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por um máximo de 45 minutos para facilitar a dissolução do precipitado. Misture o frasco suavemente a cada 5 a 10 minutos. Deixe o Reagente de Selecção equilibrar à temperatura ambiente antes de ser utilizado. Não utilize se o precipitado ou a nebulosidade persistir.
5. Misture bem cada reagente invertendo-o suavemente antes de ser colocado no sistema. Evite formar espuma durante a inversão dos reagentes.
6. Não ateste frascos de reagente. O Tigris DTS System reconhece e rejeita os frascos que tenham sido atestados.

D. Manuseamento de amostras

1. Deixe as amostras (calibradores, controlos e espécimes) alcançar a temperatura ambiente antes de serem processadas.
2. **Não coloque as amostras no agitador.**
3. Os espécimes de citologia líquida SurePath devem ser tratados com proteinase K antes de serem testados com o Aptima HPV Assay de acordo com as instruções *no Procedimento de teste do Tigris DTS System, secção C.*
4. Inspeccione os tubos de amostras antes de os colocar no suporte. Se um tubo de amostra contiver bolhas ou um volume mais inferior ao normalmente observado, centrifugue o tubo durante 5 minutos a 420 RCF para garantir que não há líquido na tampa.

**Nota:** *Se não executar o passo 4, poderá sair líquido da tampa do tubo de espécime.*

E. Preparação do sistema

Configure o instrumento e a lista de trabalho de acordo com as instruções no *Tigris DTS System Operator's Manual* (Manual do Operador do Tigris DTS System) e na *secção Notas sobre o procedimento* abaixo.

## Notas sobre o procedimento

### A. Calibradores

1. Cada lista de trabalho deve conter 3 réplicas do Calibrador Negativo e do Calibrador Positivo. Para funcionar adequadamente com o Software do Aptima HPV Assay, o Calibrador Negativo tem de estar na primeira posição de tubos do primeiro suporte da lista de trabalho e o Calibrador Positivo tem de estar na segunda posição de tubos do primeiro suporte da lista de trabalho.
2. As tentativas de pipetar mais de três réplicas a partir de um tubo de calibrador podem originar erros de volume insuficiente.

### B. Controlos

1. O Software do Aptima HPV Assay exige controlos de início e de fim da execução. O Controlo Negativo tem de estar na terceira posição de tubos do primeiro suporte e na penúltima posição do último suporte da lista de trabalho. O Controlo Positivo tem de estar na quarta posição de tubos do primeiro suporte e na última posição do último suporte da lista de trabalho.
2. As tentativas de pipetar mais de uma vez a partir de um tubo de controlo podem originar erros de volume insuficiente.

### C. Temperatura

A temperatura ambiente define-se como uma temperatura entre 15 °C e 30 °C.

### D. Pó das luvas

Como em qualquer sistema de reagentes, o excesso de pó nalgumas luvas pode causar a contaminação de tubos abertos. É recomendada a utilização de luvas sem pó.



## Panther System

Os reagentes para o Aptima HPV Assay estão indicados abaixo para o Panther System. Os Símbolos de Identificação do Reagente também estão indicados ao lado do nome do reagente.

### Reagentes e materiais fornecidos

**Aptima HPV Assay**, 250 testes, Código de Produto 303093 (3 embalagens)

**Aptima HPV Assay**, 100 testes, Código de Produto 302929 (3 embalagens)

Os calibradores podem ser adquiridos à parte. Veja abaixo os códigos de produto individuais.

#### Embalagem refrigerada do Aptima HPV (conservar a uma temperatura de 2 °C a 8 °C após a recepção)

Símbolo	Componente	Quantidade
<b>A</b>	<b>Reagente de Amplificação do HPV</b> <i>Ácidos nucleicos não infecciosos desidratados em solução tamponada com &lt; 5% de agente de volume.</i>	1 frasco
<b>E</b>	<b>Reagente Enzimático do HPV</b> <i>Transcriptase reversa e polimerase do RNA desidratadas em solução tamponada com HEPES com &lt; 10% de reagente de volume.</i>	1 frasco
<b>P</b>	<b>Reagente de Sonda do HPV</b> <i>Sondas de DNA quimioluminescentes não infecciosas (&lt; 500 ng/frasco) desidratadas em solução tamponada com succinato contendo &lt; 5% de detergente.</i>	1 frasco
<b>IC</b>	<b>Reagente de Controlo Interno do HPV</b> <i>Transcrito de RNA não infeccioso em solução tamponada com &lt; 5% de detergente.</i>	1 frasco

#### Embalagem à temperatura ambiente do Aptima HPV (conservar à temperatura ambiente de 15 °C a 30 °C após a recepção)

Símbolo	Componente	Quantidade
<b>AR</b>	<b>Solução de Reconstituição de Amplificação do HPV</b> <i>Solução aquosa contendo conservantes.</i>	1
<b>ER</b>	<b>Solução de reconstituição enzimática do HPV</b> <i>Solução tampão com HEPES contendo um agente tensoactivo e glicerol.</i>	1
<b>PR</b>	<b>Solução de reconstituição de sondas do HPV</b> <i>Solução tamponada com succinato contendo &lt; 5% de detergente.</i>	1
<b>S</b>	<b>Reagente de selecção do HPV</b> <i>Solução tamponada com 600 mM de borato contendo agente tensoactivo.</i>	1

**Embalagem à temperatura ambiente do Aptima HPV  
(conservar à temperatura ambiente de 15 °C a 30 °C após a recepção)**

Símbolo	Componente	Quantidade
TCR	<b>Reagente de captação do alvo do HPV</b> <i>Ácido nucleico não infeccioso numa solução tamponada contendo fase sólida (&lt; 0,5 mg/ml).</i>	1
	<b>Colarinhos de Reconstituição</b>	3
	<b>Ficha de Códigos de Barras do Lote Principal</b>	1 folha

**Embalagem de calibradores Aptima HPV (Código de Produto 302554)  
(conservar a uma temperatura de 2 °C a 8 °C após a recepção)**

Símbolo	Componente	Quantidade
PCAL	<b>Calibrador Positivo do HPV</b> <i>Transcrito in vitro de HPV 16 não infeccioso a 1000 cópias por ml numa solução tamponada contendo &lt; 5% de detergente.</i>	5 frascos
NCAL	<b>Calibrador Negativo do HPV</b> <i>Solução tamponada contendo &lt; 5% de detergente.</i>	5 frascos

**Materiais necessários, mas disponíveis separadamente**

**Nota:** Os materiais disponíveis na Hologic têm a indicação do código de produto, a menos que seja especificado em contrário.

	<u>Código de Produto</u>
Panther System	303095
Kit de Execução Panther	303096
<i>Kit de Fluidos do Aptima Assay</i>	303014
<i>(Solução de Lavagem Aptima, Tampão Aptima para Fluido de Desactivação e Reagente de Óleo Aptima)</i>	
<i>Kit Aptima Auto Detect</i>	303013
<i>Unidades Multitubos (Multi-tube units, MTU)</i>	104772-02
<i>Kit do Saco de Resíduos Panther</i>	902731
<i>Tampa do Recipiente de Resíduos Panther</i>	504405
Pontas, 1000 µl, condutoras, detecção de líquido	10612513 (Tecan)
Kit de Transferência de Espécimes Aptima	301154C
Kit Aptima de Colheita e Transporte de Espécimes Cervicais	302657
Tampas Perfuráveis Aptima	105668
Tampas não perfuráveis de substituição	103036A
Tampas sobresselentes para kits de 250 testes:	
<i>Soluções de reconstituição do Reagente de Amplificação e do Reagente de Sonda</i>	CL0041
<i>Solução de reconstituição do Reagente Enzimático</i>	501616
<i>TCR e Reagente de Selecção</i>	CL0040
Tampas sobresselentes para kits de 100 testes:	
<i>Soluções de reconstituição do Reagente de Amplificação e do Reagente de Sonda</i>	CL0041
<i>Solução de reconstituição do Reagente Enzimático</i>	CL0041
<i>TCR e Reagente de Selecção</i>	501604
Lixívia (mínimo de 5% ou 0,7 M de solução de hipoclorito de sódio)	—

Luvas descartáveis	—
Kit de Solução de Transferência Aptima (apenas para espécimes conservados em SurePath)	303658

## Materiais opcionais

	<u>Código de Produto</u>
Intensificador de Lixívia para limpeza	302101

## Procedimento de teste no Panther System

**Nota:** Consulte o *Panther System Operator's Manual (Manual do Operador do Panther System)* para mais informações sobre o procedimento do Panther System.

### A. Preparação da área de trabalho

Limpe as superfícies de trabalho onde serão preparados os reagentes e as amostras. Limpe as superfícies de trabalho com 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M) de solução de hipoclorito de sódio. Deixe a solução de hipoclorito de sódio entrar em contacto com as superfícies durante pelo menos 1 minuto e depois enxagúe com água. Não deixe a solução de hipoclorito de sódio secar. Cubra a superfície da bancada onde serão preparados os reagentes e as amostras com capas limpas e absorventes para bancadas de laboratórios com forro plástico.

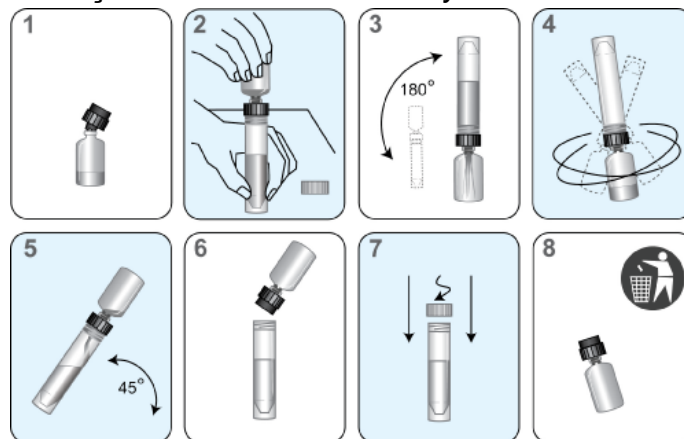
### B. Preparação dos reagentes de um novo kit

**Nota:** A *Reconstituição do Reagente deve ser realizada antes de qualquer trabalho no Panther System.*

1. Para reconstituir os Reagentes de Amplificação, Enzimático e de Sonda, combine os frascos do reagente liofilizado com a solução de reconstituição. Se estiverem refrigeradas, deixe as soluções de reconstituição alcançar a temperatura ambiente antes de serem utilizadas.
  - a. Emparelhe cada solução de reconstituição com o respectivo reagente liofilizado. Certifique-se de que a solução de reconstituição e o reagente têm cores de etiqueta correspondentes antes de aplicar o colarinho de reconstituição.
  - b. Verifique os números do lote na Ficha de Códigos de Barras do Lote Principal para garantir que estão emparelhados os reagentes adequados.
  - c. Abra o frasco do reagente liofilizado e insira bem a extremidade com entalhe do colarinho de reconstituição na abertura do frasco (Figura 3, Passo 1).
  - d. Abra a solução de reconstituição correspondente e coloque a tampa sobre uma superfície de trabalho limpa e coberta.
  - e. Segurando o frasco de solução na bancada, insira bem a outra extremidade do colarinho de reconstituição no frasco (Figura 3, Passo 2).
  - f. Inverta suavemente os frascos montados. Deixe a solução vazar do frasco para o frasco de vidro (Figura 3, Passo 3).
  - g. Agite suavemente a solução no frasco para a misturar bem. Evite criar espuma quando agitar o frasco (Figura 3, Passo 4).
  - h. Aguarde que o reagente liofilizado se dissolva e depois inverta novamente os frascos montados, inclinando-os a um ângulo de 45° para minimizar a formação de espuma (Figura 3, Passo 5). Deixe o líquido vazar todo de novo para o frasco de plástico.
  - i. Retire o colarinho de reconstituição e o frasco de vidro (Figura 3, Passo 6).

- j. Volte a colocar a tampa no frasco de plástico. Registe as iniciais do operador e a data de reconstituição em todos os frascos de reagente reconstituídos (Figura 3, Passo 7).
- k. Deite fora o colarinho de reconstituição e o frasco (Figura 3, Passo 8).

**Advertência:** Evite formar espuma quando reconstituir os reagentes. A espuma compromete a detecção de nível no Panther System.



**Figura 3. Processo de reconstituição do Panther System**

2. Prepare o Reagente de Captação do Alvo de trabalho (working Target Capture Reagent, wTCR):
  - a. Emparelhe os frascos de TCR e de Controlo Interno (Internal Control, IC) adequados.
  - b. Verifique os números do lote de reagente na Ficha de Códigos de Barras do Lote Principal para garantir que estão emparelhados os reagentes adequados do kit.
  - c. Abra o frasco de TCR e deposite a tampa numa superfície de trabalho limpa e coberta.
  - d. Abra o frasco de IC e deite todo o conteúdo no frasco de TCR. Uma pequena quantidade de líquido deverá ficar no frasco de IC.
  - e. Tape o frasco de TCR e agite suavemente a solução para misturar o conteúdo. Evite formar espuma durante este passo.
  - f. Anote as iniciais do operador e a data actual na etiqueta.
  - g. Deite fora o frasco e a tampa do IC.
  - h. É possível que haja formação de precipitado no wTCR, o que pode resultar em resultados inválidos devido aos erros de verificação de volume. O precipitado pode ser dissolvido aquecendo o wTCR a uma temperatura de 42 °C a 60 °C durante um máximo de 90 minutos. Deixe o wTCR equilibrar à temperatura ambiente antes de ser utilizado. Não utilize se o precipitado persistir.
3. Prepare o Reagente de Selecção
  - a. Verifique o número do lote de reagente na Ficha de Códigos de Barras do Lote Principal para garantir que pertence ao kit.
  - b. Se o Reagente de Selecção contiver precipitado, aqueça o Reagente de Selecção a 60 °C ± 1 °C por um máximo de 45 minutos para facilitar a dissolução do precipitado. Misture o frasco suavemente a cada 5 a 10 minutos. Deixe o Reagente de Selecção equilibrar à temperatura ambiente antes de ser utilizado. Não utilize se o precipitado ou a nebulosidade persistir.

**Nota:** Misture bem todos os reagentes invertendo-os suavemente, antes de os colocar no sistema. Evite formar espuma durante a inversão dos reagentes.

#### C. Preparação de reagentes previamente reconstituídos

1. Os Reagentes de Sonda, Amplificação e Enzimático previamente reconstituídos têm de alcançar a temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) antes do início do ensaio.
2. Se o Reagente de Sonda reconstituído contiver precipitado que não se dissolva novamente à temperatura ambiente, aqueça-o a uma temperatura máxima de 60 °C durante 1 ou 2 minutos. Não utilize se houver precipitado ou nebulosidade.
3. Se o wTCR contiver precipitado, aqueça o wTCR a uma temperatura de 42 °C a 60 °C durante um máximo de 90 minutos. Deixe o wTCR equilibrar à temperatura ambiente antes de ser utilizado. Não utilize se o precipitado persistir.
4. Se o Reagente de Selecção contiver precipitado, aqueça o Reagente de Selecção a 60 °C ± 1 °C por um máximo de 45 minutos para facilitar a dissolução do precipitado. Misture o frasco suavemente a cada 5 a 10 minutos. Deixe o Reagente de Selecção equilibrar à temperatura ambiente antes de ser utilizado. Não utilize se o precipitado ou a nebulosidade persistir.
5. Misture bem cada reagente invertendo-o suavemente antes de o colocar no sistema. Evite formar espuma durante a inversão dos reagentes.
6. Não ateste frascos de reagente. O Panther System reconhece e rejeita os frascos que tenham sido atestados.

#### D. Manuseamento de amostras

1. Deixe as amostras (calibradores e espécimes) alcançar a temperatura ambiente antes de serem processadas.
2. **Não agite os espécimes no vortex.**
3. Inspeccione os tubos de amostras antes de os colocar no suporte. Se um tubo de amostra contiver bolhas ou um volume mais inferior ao normalmente observado, centrifugue o tubo durante 5 minutos a 420 RCF para garantir que não há líquido na tampa.

**Nota:** Se não executar o passo 3, poderá sair líquido da tampa do tubo de espécime.

#### E. Preparação do sistema

1. Configure o sistema de acordo com as instruções no *Panther System Operator's Manual* (Manual do Operador do Panther System) e na secção *Notas sobre o procedimento* abaixo. Certifique-se de que são utilizados suportes de reagente e adaptadores de TCR de dimensão adequada.
2. Coloque as amostras.

### Notas sobre o procedimento

#### A. Calibradores

1. Para funcionar adequadamente com o software do Aptima HPV Assay no Panther System, são necessárias três réplicas do Calibrador Positivo e três réplicas do Calibrador Negativo. Um frasco de cada calibrador pode ser colocado em qualquer posição do suporte em qualquer Pista da Zona de Amostras no Panther System. A pipetagem de espécimes começa quando se verificar uma das duas condições seguintes:
  - a. O sistema está actualmente a processar um Calibrador Positivo e um Calibrador Negativo.

- b. Resultados válidos para os calibradores estão registados no sistema.
  2. Uma vez pipetados os tubos de calibrador e quando estiverem a ser processados para um kit de reagente específico, os espécimes podem ser executados com o respectivo kit de reagente de ensaio até 24 horas, a menos que:
    - a. os calibradores não sejam válidos;
    - b. o respectivo kit de reagente de ensaio seja retirado do sistema;
    - c. o respectivo kit de reagente de ensaio tenha ultrapassado os limites de estabilidade.
  3. As tentativas de pipetar mais de três réplicas a partir de um tubo de calibrador podem originar erros de processamento.
- B. Temperatura  
A temperatura ambiente define-se como uma temperatura entre 15 °C e 30 °C.
- C. Pó das luvas  
Como em qualquer sistema de reagentes, o excesso de pó nalgumas luvas pode causar a contaminação de tubos abertos. É recomendada a utilização de luvas sem pó.

## Procedimentos de controlo de qualidade

### A. Critérios de validade da execução

O software determina automaticamente a validade da execução. O software invalida uma execução, se qualquer das seguintes condições ocorrer:

- Mais de uma réplica de Calibrador Negativo inválido.
- Mais de uma réplica de Calibrador Positivo inválido.
- Um Controlo Negativo inválido (apenas Sistemas DTS e Sistema Tigris DTS).
- Um Controlo Positivo inválido (apenas Sistemas DTS e Tigris DTS System).

Uma execução pode ser invalidada por um operador se forem observadas e documentadas dificuldades técnicas, do operador ou do instrumento durante a realização do ensaio.

Uma execução inválida tem de ser repetida. As execuções abortadas devem ser repetidas.

### B. Critérios de aceitação do calibrador

A tabela abaixo define os critérios de RLU para as réplicas dos Calibradores Negativo e Positivo.

<b>Calibrador negativo</b>	
Analito	$\geq 0$ e $\leq 45\ 000$ RLU
IC	$\geq 75\ 000$ e $\leq 400\ 000$ RLU
<b>Calibrador positivo</b>	
Analito	$\geq 480\ 000$ e $\leq 1\ 850\ 000$ RLU
IC	$\leq 450\ 000$ RLU

### C. Cálculo do cutoff do IC

O cutoff do IC é determinado a partir do sinal do IC (sinal intermitente) das réplicas do Calibrador Negativo válido.

$$\text{Cutoff do IC} = 0,5 \times [\text{média da RLU do IC das réplicas do Calibrador Negativo válido}]$$

### D. Cálculo do cutoff do analito

O cutoff do analito é determinado a partir do sinal do analito (sinal contínuo) das réplicas do Calibrador Negativo válido, bem como do sinal do analito das réplicas do Calibrador Positivo válido

$$\text{“Cutoff” do analito} = [\text{média da RLU do analito das réplicas do Calibrador Negativo válido}] + [0,09 \times \text{média da RLU do analito das réplicas do Calibrador Positivo válido}]$$

### E. Cálculo do sinal para cutoff (S/CO) do analito

O S/CO do analito é determinado a partir da RLU do analito da amostra de teste e do cutoff do analito para a execução.

$$\text{S/CO do analito} = \frac{\text{RLU do analito da amostra de teste}}{\text{cutoff do analito}}$$

### F. Critérios de aceitação do controlo (apenas Sistemas DTS e Tigris DTS System)

O Controlo Negativo tem de ter um resultado negativo válido (RLU do IC  $\geq$  cutoff do IC e S/CO do analito  $< 0,50$ ). O Controlo Positivo tem de ter um resultado positivo válido (S/CO do analito  $\geq 0,50$ ).

## Interpretação do teste

Os resultados dos testes de ensaios são automaticamente determinados pelo software do ensaio. Um resultado de teste pode ser negativo, positivo ou inválido conforme determinado pelo RLU do IC e do S/CO para o analito. Um resultado de teste também pode ser inválido devido a outros parâmetros (forma anormal da curva cinética) que estejam fora dos intervalos de valores normalmente esperados. Os resultados de testes inválidos iniciais devem ser repetidos.

Os espécimes do Kit CSCT Aptima podem ser diluídos para transpor potenciais substâncias inibitórias. Dilua 1 parte do espécime inválido em 8 partes de meio de transporte de espécimes (a solução nos tubos do kit CSCT); por ex., 560 µl do espécime para um novo tubo do kit CSCT que contém 4,5 ml de meio de transporte de espécimes. Inverta suavemente o espécime diluído para misturá-lo; evite a criação de espuma. Teste o espécime diluído em conformidade com o procedimento de ensaio padrão.

**Nota:** É necessário um volume mínimo de 1,7 ml para testar 1 alíquota da amostra. Não dilua um espécime diluído inválido. Se um espécime diluído produzir um resultado inválido, deverá ser obtido um novo espécime do doente.

<b>Resultado do Aptima HPV Assay</b>	<b>Critérios</b>
<b>Negativa</b>	<i>S/CO do analito &lt; 0,50 IC ≥ cutoff do IC IC ≤ 2 000 000 RLU</i>
<b>Positiva</b>	<i>S/CO do analito ≥ 0,50 IC ≤ 2 000 000 RLU Analito ≤ 13 000 000 RLU</i>
<b>Inválida</b>	<i>IC &gt; 2 000 000 RLU ou S/CO do analito &lt; 0,50 e IC &lt; cutoff do IC ou Analito &gt; 13 000 000 RLU</i>



## Limitações

- A. Não foram avaliados outros tipos de espécimes para além dos identificados na utilização prevista.
- B. O desempenho do Aptima HPV Assay não foi avaliado para indivíduos vacinados contra o HPV.
- C. O Aptima HPV Assay não foi avaliado em casos de suspeita de abuso sexual.
- D. A prevalência de infecção por HPV numa população pode afectar o desempenho. Os valores de prognóstico positivo diminuem quando se examinam populações com baixa prevalência ou indivíduos sem risco de infecção.
- E. Os espécimes de citologia líquida ThinPrep com menos de 1 ml após a preparação de lâminas para o exame de Papanicolau ThinPrep são consideradas inadequadas para o Aptima HPV Assay.
- F. A remoção de 1 ml de espécime de citologia líquida SurePath antes do processamento citológico não foi avaliada relativamente ao impacto do resultado de citologia.
- G. Os resultados dos testes podem ser afectados por uma colheita, conservação ou processamento de espécimes incorrecto.
- H. O Controlo Interno monitoriza os passos de captura do alvo, amplificação e detecção do ensaio. Não se destina a controlar a adequação da amostra do colo do útero.
- I. Um resultado negativo no Aptima HPV Assay não exclui a possibilidade de anormalidades citológicas nem de CIN2, CIN3 ou cancro subjacente ou no futuro.
- J. A presença de lubrificantes pessoais que contenham Poliuretano 15 pode interferir com o desempenho do ensaio, quando presentes numa amostra de teste a concentrações superiores a 0,025% (v/v ou p/v).
- K. Os medicamentos antifúngicos que contenham tioconazol podem interferir com o desempenho do ensaio, quando presentes numa amostra de teste a concentrações superiores a 0,075% (v/p).
- L. O Aptima HPV Assay proporciona resultados qualitativos. Portanto, não se pode fazer uma correlação entre a magnitude de um sinal de ensaio positivo e o nível de expressão do mRNA num espécime.
- M. A detecção de mRNA do HPV de alto risco está dependente do número de cópias presentes no espécime e pode ser afectada pelos métodos de colheita do espécime, de factores do doente, da fase da infecção e da presença de substâncias interferentes.
- N. A infecção por HPV não é um indicador de HSIL citológica nem de CIN subjacente de alto grau, nem implica que CIN2, CIN3 ou cancro se irão desenvolver. A maioria das mulheres infectadas com um ou mais tipos de HPV de alto risco não desenvolvem CIN2, CIN3 ou cancro.
- O. Os efeitos de outras variáveis potenciais como descarga vaginal, utilização de tampões, duches vaginais, etc., e a colheita dos espécimes não foram avaliados.
- P. A utilização deste produto deve ser limitada a pessoal com formação na utilização do Aptima HPV Assay.

- Q. A contaminação cruzada de amostras pode originar resultados falsos positivos. A taxa de contaminação cruzada do Aptima HPV Assay no Tigris DTS System foi determinada como sendo 0,3% num estudo não clínico.
- R. Os resultados do Aptima HPV Assay devem ser interpretados em conjunto com outros dados laboratoriais e clínicos de que o médico disponha.
- S. Podem ocorrer resultados positivos falsos com este teste. Transcritos *in vitro* dos genótipos de HPV 26, 67, 70 e 82 de baixo risco apresentaram reactividade cruzada com o Aptima HPV Assay.
- T. O material de controlo positivo não se destina a monitorizar o desempenho no cutoff do ensaio.

## Desempenho do ensaio nos Sistemas DTS

### Desempenho clínico do Aptima HPV Assay com espécimes de citologia líquida ThinPrep

Mais de 700 espécimes de citologia líquida ThinPrep foram colhidos de mulheres europeias encaminhadas para seguimento devido a: um ou mais exames Papanicolau anormais, infecção por HPV ou outra razão. Um mililitro (1,0 ml) de cada espécime foi diluído em 2,9 ml de meio de transporte de espécimes Aptima e uma única réplica foi testada com o Aptima HPV Assay. A citologia, a histologia e os resultados de um teste do DNA do HPV (HPV-DNA) disponível no mercado estavam disponíveis para a maior parte dos espécimes. O estado de HPV de alto risco de cada espécime foi determinado pela concordância entre o Aptima e o teste do HPV-DNA disponível no mercado e por outra análise dos espécimes com resultados discordantes utilizando um teste de genotipagem do DNA amplificado. A sensibilidade e a especificidade para a detecção de ácido nucleico do HPV foram determinadas. A sensibilidade e a especificidade clínicas para a detecção de doença - definida como uma Neoplasia Intraepitelial Cervical (Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN) 2 ou um resultado histológico mais alto - também foram calculadas para toda a população de espécimes, bem como para subconjuntos específicos baseados em resultados citológicos.

A sensibilidade e a especificidade do Aptima HPV Assay para a detecção de HPV de alto risco são apresentadas na Tabela 1 para os 781 espécimes testados nos Sistemas DTS. A sensibilidade do ensaio foi de 92,6%, a especificidade de 98,5% e os valores de prognóstico positivos e negativos para a detecção de HPV de alto risco foram de 98,8% e 90,9%, respectivamente.

**Tabela 1:** Sensibilidade e especificidade do Aptima HPV Assay nos Sistemas DTS para detecção de HPV de alto risco

		HPV de alto risco		Total
		+	-	
Aptima HPV	+	412	5	417
	-	33	331	364
	Total	445	336	781

Sensibilidade (CI de 95%) = 92,6% (89,8-94,7)  
 Especificidade (CI de 95%) = 98,5% (96,6-99,4)  
 Valor de prognóstico positivo = 98,8%  
 Valor de prognóstico negativo = 90,9%

A sensibilidade e a especificidade clínicas do Aptima HPV Assay para a detecção de  $\geq$ CIN2 são apresentadas na Tabela 2a para os 753 espécimes com resultados histológicos testados nos Sistemas DTS. A sensibilidade clínica do ensaio foi de 90,8%, a especificidade de 55,7% e os valores de prognóstico positivos e negativos para a detecção de  $\geq$ CIN2 foram de 32,1% e 96,3%, respectivamente. A sensibilidade do Aptima HPV Assay foi semelhante à do HPV-DNA, que foi de 95,0% (Tabela 2b), mas a especificidade do Aptima HPV Assay foi significativamente mais alta do que a especificidade do HPV-DNA, que foi de 47,4% nesta população para a detecção de lesões  $\geq$ CIN2. Dos 753 espécimes com resultados histológicos, 159 tinham um resultado citológico ASCUS. A sensibilidade e a especificidade do Aptima HPV Assay nesta população foi de 92,3% e 41,4%, respectivamente, para a detecção de  $\geq$ CIN2.

Análises semelhantes também foram executadas utilizando um parâmetro de avaliação clínico de  $\geq$ CIN3. A sensibilidade e a especificidade clínica do Aptima HPV Assay para a detecção de  $\geq$ CIN3 são apresentadas na Tabela 3a para os 753 espécimes com resultados histológicos

testados nos Sistemas DTS. A sensibilidade clínica do ensaio foi de 97,7%, a especificidade de 52,9% e os valores de prognóstico positivos e negativos para a detecção de  $\geq$ CIN3 foram de 21,3% e 99,4%, respectivamente. Mais uma vez, a sensibilidade do Aptima HPV Assay foi semelhante à do HPV-DNA, para o qual a sensibilidade para a detecção de  $\geq$ CIN3 foi de 98,9% (Tabela 3b), e a especificidade do Aptima HPV Assay foi significativamente mais alta do que a especificidade do HPV-DNA, que foi de 44,4% nesta população para a detecção de lesões  $\geq$ CIN3. Dos 753 espécimes com resultados histológicos, 159 tinham um resultado citológico ASCUS. A sensibilidade e a especificidade do Aptima HPV Assay nesta população foi de 100% e 40,1%, respectivamente, para a detecção de  $\geq$ CIN3.

Estes resultados, que deram sensibilidade semelhante e especificidade significativamente mais alta para o Aptima HPV Assay, comparados com a detecção de DNA de alto risco, são semelhantes aos resultados obtidos noutros estudos.<sup>27,28,29,30,31</sup>

**Tabela 2a:** Sensibilidade e especificidade do Aptima HPV Assay nos Sistemas DTS para detecção de doença ( $\geq$ CIN2)

		$\geq$ CIN2	< CIN2	Total
Aptima HPV	+	128	271	399
	-	13	341	354
Total		141	612	753

Sensibilidade (CI de 95%) = 90,8% (84,9-94,5)  
 Especificidade (CI de 95%) = 55,7% (51,8-59,6)  
 Valor de prognóstico positivo = 32,1%  
 Valor de prognóstico negativo = 96,3%

**Tabela 2b:** Sensibilidade e especificidade do ensaio HPV-DNA para detecção de doença ( $\geq$ CIN2)

		$\geq$ CIN2	< CIN2	Total
HPV-DNA	+	134	322	456
	-	7	290	297
Total		141	612	753

Sensibilidade (CI de 95%) = 95,0% (90,1-97,6)  
 Especificidade (CI de 95%) = 47,4% (43,5-51,4)  
 Valor de prognóstico positivo = 29,4%  
 Valor de prognóstico negativo = 97,6%

**Tabela 3a:** Sensibilidade e especificidade do Aptima HPV Assay nos Sistemas DTS para detecção de doença ( $\geq$ CIN3)

		$\geq$ CIN3	< CIN3	Total
Aptima HPV	+	85	314	399
	-	2	352	354
Total		87	666	753

Sensibilidade (CI de 95%) = 97,7% (92,0-99,4)  
 Especificidade (CI de 95%) = 52,9% (49,1-56,6)  
 Valor de prognóstico positivo = 21,3%  
 Valor de prognóstico negativo = 99,4%

**Tabela 3b:** Sensibilidade e especificidade do ensaio HPV-DNA para detecção de doença ( $\geq$ CIN3)

		$\geq$ CIN3	< CIN3	Total
HPV-DNA	+	86	370	456
	-	1	296	297
Total		87	666	753

Sensibilidade (CI de 95%) = 98,9% (93,8-99,8)  
 Especificidade (CI de 95%) = 44,4% (40,7-48,2)  
 Valor de prognóstico positivo = 18,9%  
 Valor de prognóstico negativo = 99,7%

## Desempenho clínico do Aptima HPV Assay com Colheita e Transporte de Espécimes Cervicais

Os espécimes de citologia líquida ThinPrep emparelhados e os espécimes do Kit CSCT Aptima foram colhidos em 728 sujeitos. Um mililitro (1,0 ml) de cada espécime de citologia líquida ThinPrep foi diluído em 2,9 ml de meio de transporte de espécimes Aptima e uma única réplica foi testada com o Aptima HPV Assay nos Sistemas DTS. Uma única réplica de cada espécime de CSCT também foi testada com o Aptima HPV Assay. A concordância percentual do Aptima HPV Assay entre os espécimes de citologia líquida ThinPrep e os espécimes de CSCT foi determinada e é indicada na Tabela 4.

A concordância positiva percentual foi de 95,1% (CI de 95%: 91,6-97,2); a concordância negativa percentual foi de 95,9% (CI de 95%: 93,7-97,3); a concordância geral foi de 95,6% (CI de 95%: 93,9-96,9). Observou-se uma forte correlação entre os espécimes de citologia líquida e os espécimes do kit de transporte ( $\kappa = 0,90$ ).

**Tabela 4:** Concordância geral dos resultados do Aptima HPV Assay a partir de espécimes de citologia líquida ThinPrep e espécimes de CSCT Aptima testados nos sistemas DTS

		Espécime de citologia líquida ThinPrep		Total
		+	-	
Espécime do kit Aptima CSCT	+	233	20	253
	-	12	463	475
	Total	245	483	728

Concordância positiva = 95,1% (91,6-97,2)  
 Concordância negativa = 95,9% (93,7-97,3)  
 Concordância geral = 95,6% (93,9-96,9)  
 Coeficiente kappa = 0,90

## Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica do Aptima HPV Assay para a detecção de HPV de alto risco foi determinada através do teste de espécimes individuais negativos de citologia líquida clínica ThinPrep aditivados com transcritos de HPV *in vitro* ou células infectadas em várias concentrações. Trinta réplicas de cada nível de cópias foram testadas com cada um de dois lotes de reagente para um total de 60 réplicas. A análise de regressão probit foi executada e o limite de detecção previsto de 95% foi determinado para cada tipo de HPV (Tabela 5).

A análise de regressão probit mostra que o HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 56, 58, 59, 66 e 68 tinham limites de detecção previstos de 95% inferiores a 100 cópias/reacção; e os tipos 51 e 52 tinham limites de detecção previstos de 95% entre 100 e 300 cópias/reacção.

**Tabela 5:** Limite de detecção previsto de 95% do Aptima HPV Assay determinado pela análise probit dos dados dos Sistemas DTS

Alvo	Limite de detecção de 95%* (limites fiduciais de 95%)
HPV 16	74 (54 - 113)
HPV 18	52 (39 - 76)
HPV 31	19 (14 - 27)
HPV 33	24 (18 - 37)
HPV 35	27 (22 - 38)
HPV 39	32 (23 - 49)
HPV 45	28 (17 - 90)
HPV 51	198 (147 - 289)
HPV 52	239 (187 - 324)
HPV 56	48 (36 - 71)
HPV 58	99 (74 - 146)
HPV 59	89 (68 - 127)
HPV 68	27 (20 - 40)
HPV 66	68 (50 - 105)

\*cópias por reacção para transcritos *in vitro* e células por reacção para linhas celulares

## Reprodutibilidade do ensaio

A reprodutibilidade do Aptima HPV Assay foi determinada através do teste de 16 membros do painel em triplicado, em 2 execuções com 2 lotes de reagente, em 3 instrumentos por 3 operadores. Os testes foram realizados durante 20 dias num único centro. Os membros do painel são descritos na Tabela 6. Seis dos membros do painel eram HPV negativos (3 eram meio de transporte de espécimes Aptima e 3 eram espécimes de citologia líquida ThinPrep agrupados), quatro eram HPV positivos baixos (limite de detecção de ~95%) e seis eram HPV positivos moderados ( $\geq \sim 3x$  o limite de detecção de 95%). Os membros do painel com positivos baixos e positivos moderados eram compostos por transcritos *in vitro* (in vitro transcript, IVT) ou células cultivadas infectadas pelo HPV em meio de transporte de espécimes Aptima.

**Tabela 6:** Painel de reprodutibilidade do Aptima HPV Assay

Membro do painel	Descrição	Concentração	Resultado do HPV esperado
1	STM Lote 1	N/A	Negativa
2	SiHa Positivo Baixo	1 célula/reacção	Positiva
3	HeLa Positivo Baixo	0,15 célula/reacção	Positiva
4	Grupo clínico 1	N/A	Negativa
5	ME180 Positivo Moderado	1 célula/reacção	Positiva
6	MS751 Positivo Moderado	1 célula/reacção	Positiva
7	SiHa e HeLa Positivo Moderado	10 células/reacção e 1 célula/reacção	Positiva
8	STM Lote 2	N/A	Negativa
9	Grupo clínico 2	N/A	Negativa
10	HPV 16 IVT Positivo Baixo	30 cópias/reacção	Positiva
11	HPV 18 IVT Positivo Baixo	30 cópias/reacção	Positiva
12	STM Lote 3	N/A	Negativa
13	HPV 16 IVT Positivo Moderado	100 cópias/reacção	Positiva
14	HPV 18 IVT Positivo Moderado	100 cópias/reacção	Positiva
15	HPV 16 e HPV 18 Positivo Moderado	100/100 cópias/reacção	Positiva
16	Grupo clínico 3	N/A	Negativa

Foram analisados para os Sistemas DTS cento e oito pontos de dados para cada membro do painel de reprodutibilidade, cujos resultados estão resumidos na Tabela 7. A percentagem de positivos para os painéis negativos variou entre 0 e 3,7; o positivo baixo foi  $\geq 98$ ; e o positivo moderado foi 100. A concordância com o resultado esperado foi  $> 96\%$  para todos os membros do painel.

A relação S/CO média do IC foi determinada para os 6 membros negativos do painel (1, 4, 8, 9, 12 e 16); a variabilidade entre instrumentos, operadores, lotes e execuções foi calculada, bem como a variabilidade intra-execução. A relação S/CO média do IC para os membros negativos do painel variou entre 1,76 e 1,92. O coeficiente de variação (coefficient of variation, CV) para os valores da relação S/CO do IC foi bastante baixo:  $< 10\%$  para todos os parâmetros avaliados. A variabilidade dos valores da relação S/CO do analito para os membros negativos do painel não foi analisada para os membros negativos do painel devido à variabilidade inerente quando se observam valores de zero.

A relação S/CO média do analito foi determinada para os 10 membros positivos do painel (2-3, 5-7, 10-11 e 13-15); a variabilidade entre instrumentos, operadores, lotes e execuções foi calculada, bem como a variabilidade intra-execução. Os valores da relação S/CO média do analito variaram entre 9,00 e 10,70 para os painéis de positivos baixos e entre 8,84 e 15,75 para os painéis de positivos moderados. Os dois membros do painel contendo 2 tipos de HPV de alto risco, os painéis 7 e 15, tiveram valores da relação S/CO média do analito de 22,90 e 23,37, respectivamente. Os CV para os membros de painel com positivos baixos

e positivos moderados foram < 35% e < 15%, respectivamente, com a maior variabilidade observada numa execução. Os valores da relação S/CO do IC não foram avaliados para os membros positivos do painel porque as RLU do IC não são indicativas do desempenho de uma reacção individual numa amostra de analito positivo.

**Tabela 7:** Reprodutibilidade do Aptima HPV Assay nos Sistemas DTS

					S/CO Média		Análise da variabilidade da relação S/CO*											
							Entre instrumentos		Entre operadores		Entre lotes		Entre execuções		Intra-execução		Total	
Membro do painel	Descrição	N	% positivo	Concordância	IC	Analito	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)
1	Neg	108	0,0	100%	1,92	0,00	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	1,9	0,0	0,7	0,1	5,8	0,1	6,3
2	Pos baixo	108	99,1	98,1%	N/A	10,68	0,3	2,6	0,0	0,0	0,4	4,1	0,0	0,0	2,0	19,0	2,1	19,6
3	Pos baixo	108	100	99,1%	N/A	10,65	0,5	4,7	0,0	0,0	0,3	2,5	0,3	3,0	2,4	22,3	2,5	23,1
4	Neg	108	0,0	100%	1,80	0,00	0,0	2,1	0,0	1,8	0,0	0,2	0,0	0,7	0,1	6,6	0,1	7,2
5	Pos mod	107 <sup>^</sup>	100	100%	N/A	8,84	0,2	1,8	0,1	0,8	0,2	2,3	0,0	0,0	0,6	7,2	0,7	7,8
6	Pos mod	108	100	100%	N/A	15,75	0,4	2,4	0,4	2,6	1,1	7,0	0,1	0,9	0,6	3,9	1,4	8,7
7	Pos mod	107 <sup>^</sup>	100	100%	N/A	22,90	0,7	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	9,1	2,2	9,7
8	Neg	108	0,0	100%	1,85	0,00	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0	1,1	0,0	1,5	0,1	6,1	0,1	6,8
9	Neg	108	3,7	96,3%	1,76	0,06	0,0	0,0	0,1	3,6	0,0	0,0	0,0	1,3	0,1	7,5	0,1	8,4
10	Pos baixo	108	99,1	99,1%	N/A	10,61	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	16,8	1,8	16,8
11	Pos baixo	108	98,1	98,1%	N/A	9,04	0,0	0,0	0,4	4,1	0,0	0,0	0,9	10,0	2,9	32,6	3,1	34,3
12	Neg	108	0,0	100%	1,85	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	1,0	0,1	7,6	0,1	7,8
13	Pos mod	108	100	100%	N/A	10,99	0,1	1,4	0,1	0,8	0,0	0,2	0,0	0,0	0,4	3,9	0,5	4,2
14	Pos mod	108	100	100%	N/A	12,22	0,3	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	12,8	1,6	13,0
15	Pos mod	108	100	100%	N/A	23,37	0,7	2,8	0,3	1,5	0,0	0,0	0,1	0,6	2,5	10,5	2,6	11,0
16	Neg	108	0,9	99,1%	1,79	0,03	0,0	2,3	0,0	1,7	0,0	0,0	0,0	1,1	0,1	7,5	0,1	8,1

\*análise de variabilidade da relação S/CO do controlo interno para os painéis negativos (1, 4, 8, 9, 12, 16); análise de variabilidade da relação S/CO do analito para os painéis positivos (2, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 13, 14, 15)

<sup>^</sup>1 reacção inválida não foi novamente testada

S/CO = relação sinal/cutoff

DP = desvio padrão

N/A = não aplicável



## Reactividade cruzada

A especificidade analítica do Aptima HPV Assay foi avaliada com meio de solução PreservCyt diluído em meio de transporte de espécimes Aptima e aditivado com bactérias, leveduras ou fungos cultivados; vírus cultivados; ou transcritos de HPV de baixo risco *in vitro*. A sensibilidade analítica foi avaliada com o mesmo painel aditivado com uma baixa concentração de células SiHa infectadas pelo HPV (1 célula por reacção). Os organismos e as concentrações de teste são identificados na Tabela 8. Não se observou qualquer efeito na especificidade ou sensibilidade do Aptima HPV Assay com qualquer dos organismos testados.

**Tabela 8:** Painel da especificidade analítica

Organismo	Concentração de teste	Organismo	Concentração de teste
<b>Bactérias</b>			
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Listeria monocytogenes</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Actinomyces israelii</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Micrococcus luteus</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Mobiluncus curtisii</i>	2x10 <sup>7</sup> CFU/ml
<i>Atopobium vaginae</i>	5x10 <sup>7</sup> CFU/ml	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Bacillus cereus</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Mycoplasma fermentans</i>	5x10 <sup>7</sup> CFU/ml
<i>Bacteroides fragilis</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Mycoplasma genitalium</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Mycoplasma hominis</i>	5x10 <sup>7</sup> CFU/ml
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Bifidobacterium breve</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae e Chlamydia trachomatis</i>	5x10 <sup>8</sup> CFU/ml 1,5x10 <sup>4</sup> TCID 50/ml
<i>Campylobacter fetus-fetus</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Neisseria meningitidis</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	2x10 <sup>4</sup> TCID 50/ml	<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Clostridium difficile</i>	6x10 <sup>7</sup> CFU/ml	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Propionibacterium acnes</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Corynebacterium genitalium</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Proteus mirabilis</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Corynebacterium xerosis</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Proteus vulgaris</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Enterobacter cloacae</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Providencia stuartii</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Enterococcus faecalis</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Escherichia coli</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Ruminococcus productus</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Fingoldia magna</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Serratia marcescens</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Staphylococcus aureus</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Gardnerella vaginalis</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Haemophilus ducreyi</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Lactobacillus crispatus</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Lactobacillus jensenii</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml		

**Tabela 8:** Painel da especificidade analítica (*continuação*)

Organismo	Concentração de teste	Organismo	Concentração de teste
<b>Leveduras/protozoários</b>			
<i>Candida albicans</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1x10 <sup>7</sup> células/ml
<b>Vírus</b>			
Adenovirus 2	1x10 <sup>6</sup> vp/ml	Vírus Herpes simplex 1	2,5x10 <sup>5</sup> TCID 50/ml
Citomegalovírus	33 TCID 50/ml	Vírus Herpes simplex 2	5x10 <sup>4</sup> TCID 50/ml
Vírus Epstein-Barr	4x10 <sup>7</sup> vp/ml	SV40	1,2 x10 <sup>4</sup> TCID 50/ml
HIV-1	1,0x10 <sup>6</sup> cópias/ml		
<b>Genótipos de HPV não visados</b>			
HPV 6	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml	HPV 53	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml
HPV 11	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml	HPV 61	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml
HPV 42	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml	HPV 71	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml
HPV 43	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml	HPV 81	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml
HPV 44	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml		

## Interferência

As substâncias descritas na Tabela 9 foram aditivadas individualmente em solução PreservCyt e em meio de transporte de espécimes (Specimen Transport Media, STM) Aptima a 1% e 10% de v/v ou p/v e testadas com o Aptima HPV Assay. Todas as substâncias foram testadas na presença e na ausência de células cultivadas infectadas pelo HPV (SiHa, 3 células/reacção). Não se observou interferência com qualquer das substâncias testadas, excepto com dois dos cinco lubrificantes que continham Poliquatérnio 15 a concentrações > 0,025% na amostra de teste e com uma medicação antifúngica que continha tioconazol a concentrações > 0,075% na amostra de teste.

**Tabela 9:** Substâncias testadas quanto a possível interferência com o Aptima HPV Assay

<b>Categoria do produto</b>	<b>Marca ou tipo de produto</b>
<b>Lubrificante</b>	KY Sensual Mist (v/v)
	KY Warming Jelly (p/v)
	KY Warming Liquid (v/v)
	Astroglide Personal Lubricant*
	Target Brand Lubricating Liquid*
<b>Espemicida</b>	Gynol II Vaginal Contraceptive Original Formula (p/v)
	Gynol II Vaginal Contraceptive Extra Strength (p/v)
	Delfen Vaginal Contraceptive Foam (p/v)
	Encare Vaginal Contraceptive (p/v)
	Conceptrol Vaginal Contraceptive (p/v)
<b>Medicação Antifúngica/Anticomichão</b>	Vagisil Maximum Strength (p/v)
	Monistat Soothing Care (p/v)
	Monistat 3 Combination Pack (p/v)
	Target Brand Tioconazole 1 (p/v)
	Target Brand Mioconazole 3 (p/v)
<b>Ácido Acético Glacial</b>	EMD M/N AX0073-11 (v/v)
<b>Sangue Total</b>	Sangue total (v/v)

\*Lubrificantes pessoais que contêm Poliquatérnio 15.

## Resultados previstos do Tigris DTS System: Prevalência de mRNA do HPV de alto risco

A prevalência de infecção por HPV de alto risco varia amplamente e é influenciada por diversos factores, para os quais a idade é o factor com mais preponderância.<sup>32,33</sup> Diversos estudos investigaram a prevalência do HPV conforme determinado pela detecção de DNA do HPV, contudo, poucos estudos reportaram a prevalência baseada na detecção do mRNA do HPV oncogénico. Foram inscritas num estudo clínico prospectivo conhecido por ensaio CLEAR<sup>34</sup> mulheres provenientes de diversas clínicas (n=18) representando uma ampla distribuição geográfica e uma população diversa (10 estados dos Estados Unidos da América). A prevalência de amostras de mRNA do HPV positivo observadas no ensaio clínico foi, em geral, categorizada de acordo com o grupo etário e com o local de teste. Os resultados são apresentados na Tabela 10 para as populações de células escamosas atípicas de significado indeterminado (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, ASC-US) e negativo para lesão intraepitelial ou malignidade (Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy, NILM).

**Tabela 10:** Prevalência de mRNA do HPV de alto risco por grupo etário, local de teste e todas em conjunto

	Taxa de positividade % (x/n)	
	População ASC-US (≥ 21 anos)	População NILM (≥ 30 anos)
Tudo	41,8 (400/958)	5,0 (540/10 871)
Grupo etário (anos)		
21 a 29	60,3 (252/418)	N/A
30 a 39	36,8 (98/266)	6,9 (289/4199)
≥ 40	18,2 (50/274)	3,8 (251/6672)
Local de teste		
1	41,6 (134/322)	4,7 (172/3682)
2	41,4 (150/362)	5,2 (194/3702)
3	42,3 (116/274)	5,0 (174/3487)

N/A = não aplicável

## Desenho do Estudo Clínico Aptima HPV Assay com Espécimes de Citologia Líquida ThinPrep

Realizou-se um estudo clínico prospectivo e multicêntrico nos EUA, designado ensaio CLEAR, para determinar o desempenho clínico do Aptima HPV Assay na detecção de neoplasia intraepitelial cervical de grau 2 ou doença cervical mais grave ( $\geq$ CIN2). O ensaio CLEAR incluiu uma avaliação de linha de referência e uma avaliação de acompanhamento de 2 anos.<sup>34</sup>

### Ensaio CLEAR – Avaliação na linha de referência

Na linha de referência do ensaio CLEAR (Fase de Linha de Referência), as mulheres foram inscritas tanto no Estudo ASC-US como no Estudo NILM com base em resultados citológicos provenientes de rastreios de rotina ao cancro do colo do útero. A população do Estudo ASC-US incluiu mulheres com 21 anos e idade superior com resultados citológicos de ASC-US e a população do Estudo NILM incluiu mulheres com 30 anos e idade superior com resultados citológicos de NILM. O Estudo NILM foi concebido para apoiar a reivindicação de rastreio auxiliar para mulheres com 30 anos e idade superior, pois as mulheres nesta faixa etária com resultados citológicos mais altos do que ASC-US devem seguir para colposcopia independentemente do seu estado de HPV.<sup>35</sup>

Foram inscritas mulheres provenientes de 18 clínicas, sobretudo clínicas de obstetrícia/ginecologia, que abrangeram uma ampla distribuição geográfica e uma população diversificada. As mulheres elegíveis foram designadas para o Estudo ASC-US ou o Estudo NILM com base no espécime de encaminhamento de citologia de base líquida ThinPrep. Na linha de referência, os espécimes de encaminhamento residuais de mulheres no Estudo ASC-US e no Estudo NILM foram testados com o Aptima HPV Assay e com um teste do DNA de HPV disponível no mercado.

Na linha de referência, todas as mulheres no Estudo ASC-US foram encaminhadas para colposcopia, independentemente dos seus resultados do teste de HPV. Foi obtida uma curetagem endocervical (endocervical curettage, ECC), biopsia e biopsias cervicais por punção (1 biopsia de cada um dos 4 quadrantes). Caso fosse visível uma lesão, era obtida uma biopsia de punção (método direccionado; 1 biopsia por lesão) e quadrantes sem uma lesão visível foram submetidos a biopsia na junção escamo-colunar (método aleatório).

No Estudo NILM, as mulheres positivas com o Aptima HPV Assay e/ou o teste do DNA do HPV disponível no mercado, bem como as mulheres seleccionadas aleatoriamente que tinham sido negativas com os dois ensaios, foram encaminhadas para colposcopia para a avaliação da linha de referência. Estas mulheres seleccionadas aleatoriamente que tinham sido negativas para os dois ensaios foram incluídas para correcção relativa do desvio de verificação com estimativas de desempenho ajustadas geradas recorrendo a um método de imputação múltipla. Foi obtida uma biopsia ECC de cada uma das mulheres que realizaram colposcopia. As biopsias por punção foram obtidas apenas de lesões visíveis (método direccionado; 1 biopsia por lesão).

Foi determinado o estado da doença por um Consenso do Painel de Revisão de Histologia, que foi baseado na concordância de, pelo menos, 2 patologistas especialistas. O estado de HPV da mulher não foram apresentados aos patologistas especialistas. O estado de citologia também não foi apresentado, bem como os diagnósticos de histologia um do outro. Se os 3 patologistas discordassem, os 3 analisariam as lâminas num microscópio com várias cabeças para chegar a um consenso. Os resultados do teste do HPV não foram apresentados aos investigadores, médicos e mulheres até depois da conclusão da visita de colposcopia, com o intuito de evitar desvio. Na linha de referência, o desempenho clínico do

Aptima HPV Assay em relação à detecção de  $\geq$ CIN2 e neoplasia intraepitelial cervical de grau 3 ou doença cervical mais grave ( $\geq$ CIN3) foi determinado relativamente ao estado da doença cervical determinado na linha de referência. O desempenho clínico do teste de DNA disponível no mercado foi também determinado para comparação directa com os resultados do Aptima HPV Assay.

### Ensaio CLEAR – Avaliação de Acompanhamento

As mulheres do Estudo NILM de 14 centros clínicos eram elegíveis para participar na Fase de Acompanhamento de 3 anos do estudo se: i) tivessem realizado uma consulta de colposcopia na linha de referência e não tivessem  $\geq$ CIN2, ou ii) não tivessem realizado uma consulta de colposcopia na linha de referência. A Fase de Acompanhamento do estudo foi constituída por consultas anuais. Nestas consultas, foi realizada amostragem cervical para citologia para cada mulher e algumas mulheres foram testadas com um teste de HPV comercialmente disponível. As mulheres com ASC-US ou resultados de citologia mais graves durante o período de acompanhamento foram encaminhadas para colposcopia utilizando os mesmos procedimentos de exame de biopsia e histológico realizados para a avaliação na linha de referência do estudo NILM. O estado da doença cervical na consulta de acompanhamento foi considerado "negativo" com base na citologia NILM ou, para mulheres com resultados anormais do teste de citologia, com base nos resultados normais ou nos resultados do Painel de Revisão de Histologia de Consenso CIN1. As mulheres que tiveram  $\geq$ CIN2 detectado durante o período de acompanhamento foram consideradas com tendo concluído o acompanhamento e não realizaram consultas depois de  $\geq$ CIN2 ter sido detectado. As mulheres a quem não foi detectado  $\geq$ CIN2 durante o período de acompanhamento mas que realizaram uma consulta do estudo no ano 1 do acompanhamento e/ou no ano 2 do acompanhamento e que realizaram uma consulta do estudo no ano 3 do acompanhamento foram consideradas com tendo concluído o acompanhamento.

O objectivo do estudo de acompanhamento consistiu em comparar o risco acumulado de 3 anos de doença cervical nas mulheres com resultados positivos no Aptima HPV assay na linha de referência com o risco acumulado de 3 anos de doença cervical em mulheres com resultados negativos no Aptima HPV assay na linha de referência. O estado da doença cervical de 3 anos foi determinado da seguinte forma:

- Estado positivo de doença cervical ( $\geq$ CIN2 e/ou  $\geq$ CIN3) – Mulheres a quem foi detectado  $\geq$ CIN2 na linha de referência ou durante o acompanhamento.
- Estado negativo de doença cervical ( $<$ CIN2) – Mulheres que concluíram o acompanhamento sem detecção de  $\geq$ CIN2 que não foram consideradas como tendo estado "indeterminado" de doença cervical.
- Estado indeterminado de doença cervical – Mulheres que tiveram resultados anormais no teste de citologia durante o acompanhamento e que não tiveram um resultado do Painel de Revisão de Histologia de Consenso subsequente, ou mulheres com citologia inadequada na sua última consulta.
- Perdido para acompanhamento – Mulheres que não concluíram o acompanhamento e que não foram consideradas como tendo um estado "indeterminado" de doença cervical.

O desempenho clínico do Aptima HPV assay para a detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 foi avaliado relativamente ao estado de doença cervical de 3 anos.

## Desempenho do ensaio no Tigris DTS System

### População ASC-US ≥ 21 anos: Desempenho Clínico do Aptima HPV Assay com Espécimes de Citologia Líquida ThinPrep

Na totalidade, verificaram-se 1252 mulheres com 21 anos e idade superior com resultados citológicos de ASC-US inscritas no Estudo ASC-US. Destas, 294 mulheres foram retiradas e 19 tiveram um diagnóstico de doença indeterminada; foram todas excluídas da análise. As restantes 939 mulheres susceptíveis de serem avaliadas tinham 21 anos de idade ou idade superior com resultados citológicos de ASC-US, resultados do Aptima HPV Assay e um estado de doença conclusivo. Noventa e uma (91) mulheres tinham ≥CIN2 e quarenta e uma (41) tinham ≥CIN3. A prevalência de ≥CIN2 e ≥CIN3 em mulheres susceptíveis de serem avaliadas com resultados citológicos de ASC-US foi de 9,7% e 4,4%, respectivamente. Os resultados do Aptima HPV Assay através do Consenso dos diagnósticos do Painel de Revisão de Histologia são apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11:** População ASC-US ≥ 21 anos: Resultados do Aptima HPV Assay através do consenso do diagnóstico do painel de revisão de histologia

Resultado do Aptima HPV Assay*	Teste do DNA do HPV	Consenso do diagnóstico do painel de revisão de histologia						Total
		Indeterminado**	Normal	CIN1	CIN2	CIN3	Cancro	
Positiva	Positiva	6	170	113	41	32	1	363
Positiva	Negativa	0	7	0	1	2	0	10
Positiva	Sem resultado***	0	14	11	0	2	0	27
Negativa	Positiva	0	47	13	2	3	0	65
Negativa	Negativa	10	371	55	6	1	0	443
Negativa	Sem resultado***	3	40	7	0	0	0	50
<b>Total</b>		19	649	199	50	40	1****	958

\*Todas as amostras apresentaram resultados finais válidos (quando foi realizado o teste inicial ou após resolução de resultados inválidos iniciais por procedimento).

\*\*19 indivíduos realizaram a visita de colposcopia, porém, não foi possível determinar um diagnóstico pelas seguintes razões: < 5 de espécimes de biopsia obtidos, todos com resultados histológicos normais/CIN1 (n=15), não foram colhidas biopsias (n=3) e lâminas da biopsia perdidas (n=1).

\*\*\*77 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não tinham resultados do teste do DNA do HPV sobretudo devido ao volume insuficiente do espécime de citologia.

\*\*\*\*Um indivíduo apresentava adenocarcinoma in situ (AIS).

As estimativas de desempenho clínico do Aptima HPV Assay, incluindo sensibilidade, especificidade, valor de prognóstico positivo (positive predictive value, PPV), valor de prognóstico negativo (negative predictive value, NPV) para a detecção de ≥CIN2 e ≥CIN3 baseados na avaliação de todas as biopsias e incluindo todas as biopsias direccionadas, são apresentados na Tabela 12, tal como acontece com as estimativas para o teste do DNA do HPV disponível no mercado.

**Tabela 12:** População ASC-US ≥ 21 anos: Desempenho do Aptima HPV Assay e de um Teste do DNA do HPV para a detecção de ≥CIN2 e ≥CIN3

	Desempenho	Aptima HPV Assay N=939		Teste do DNA do HPV N=865*	
		Estimativa	(CI de 95%)	Estimativa	(CI de 95%)
≥CIN2	<b>Todas as biopsias</b>				
	Sensibilidade (%)	86,8 (79/91)	(78,4, 92,3)	88,8 (79/89)	(80,5, 93,8)
	Especificidade (%)	62,9 (533/848)	(59,6, 66,0)	55,8 (433/776)	(52,3, 59,3)
	PPV (%)	20,1 (79/394)	(18,1, 22,0)	18,7 (79/422)	(17,0, 20,4)
	NPV (%)	97,8 (533/545)	(96,5, 98,8)	97,7 (433/443)	(96,2, 98,8)
	Prevalência (%)	9,7 (91/939)		10,3 (89/865)	
	<b>Biopsias direccionadas**</b>				
	Sensibilidade (%)	93,3 (56/60)	(84,1, 97,4)	93,2 (55/59)	(83,8, 97,3)
	Especificidade (%)	61,5 (539/876)	(58,3, 64,7)	54,5 (438/804)	(51,0, 57,9)
	PPV (%)	14,2 (56/393)	(12,7, 15,6)	13,1 (55/421)	(11,7, 14,2)
	NPV (%)	99,3 (539/543)	(98,3, 99,8)	99,1 (438/442)	(97,9, 99,7)
	Prevalência (%)	6,4 (60/936)		6,8 (59/863)	
≥CIN3	<b>Todas as biopsias</b>				
	Sensibilidade (%)	90,2 (37/41)	(77,5, 96,1)	92,3 (36/39)	(79,7, 97,3)
	Especificidade (%)	60,2 (541/898)	(57,0, 63,4)	53,3 (440/826)	(49,9, 56,6)
	PPV (%)	9,4 (37/394)	(8,1, 10,4)	8,5 (36/422)	(7,4, 9,4)
	NPV (%)	99,3 (541/545)	(98,3, 99,8)	99,3 (440/443)	(98,3, 99,8)
	Prevalência (%)	4,4 (41/939)		4,5 (39/865)	
	<b>Biopsias direccionadas**</b>				
	Sensibilidade (%)	93,1 (27/29)	(78,0, 98,1)	96,4 (27/28)	(82,3, 99,4)
	Especificidade (%)	59,6 (541/908)	(56,4, 62,7)	52,8 (441/836)	(49,4, 56,1)
	PPV (%)	6,9 (27/394)	(5,8, 7,6)	6,4 (27/422)	(5,5, 7,0)
	NPV (%)	99,6 (541/543)	(98,8, 100)	99,8 (441/442)	(98,9, 100)
	Prevalência (%)	3,1 (29/937)		3,2 (28/864)	

\*74 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não tinham resultados do teste do DNA do HPV sobretudo devido ao volume insuficiente do espécime de citologia.

\*\*O resultado do consenso de histologia foi obtido recorrendo apenas a resultados de biopsias direccionadas. As mulheres sem biopsias direccionadas reflectem uma colposcopia normal e são incluídas nestas análises como não sofrendo de doenças (<CIN2 ou <CIN3, conforme adequado). Nem sempre foi alcançado um consenso quando foram incluídas apenas biopsias direccionadas.



Quando foram avaliadas todas as biopsias, as estimativas de sensibilidade clínica do Aptima HPV Assay e do teste do DNA do HPV disponível no mercado, onde foram disponibilizados os resultados dos dois ensaios para a detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3, foram semelhantes (as diferenças nas estimativas de sensibilidade não foram estatisticamente significativas: Diferença de sensibilidade = -2,3% [CI de 95%: -9,5%, 4,8%]). As estimativas de especificidade clínica do Aptima HPV Assay para a detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 foram superiores às do teste do DNA do HPV disponível no mercado (as diferenças nas estimativas de especificidade foram estatisticamente significativas). Para  $\geq$ CIN2, a diferença de especificidade foi de 6,8% (CI de 95%: 4,9%, 9,0%). Os NPV foram semelhantes, porém, para a detecção de  $\geq$ CIN2, o PPV para o Aptima HPV Assay foi ligeiramente superior ao PPV para o teste do DNA do HPV disponível no mercado (20,1% vs. 18,7%).

Dos 91 casos de  $\geq$ CIN2, 60 (65,9%) foram identificados em biopsias direccionadas e 31 (34,1%) foram identificados a partir de biopsias aleatórias e/ou ECC (ou seja, não em biopsias direccionadas). Estas conclusões são comparáveis a resultados de estudos publicados, nos quais aproximadamente 25% a 40% dos casos de  $\geq$ CIN2 foram identificados apenas a partir de espécimes de biopsias aleatórias e/ou ECC.<sup>36,37</sup> Utilizando apenas biopsias direccionadas para determinar o estado da doença (assumindo que as mulheres sem biopsias direccionadas apresentavam resultados histológicos normais, pois não se encontravam presentes lesões visíveis), a prevalência de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 no estudo foi de 6,4% e 3,1% respectivamente. As estimativas de sensibilidade clínica para a detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 foram superiores para os dois testes utilizando apenas biopsias direccionadas do que as estimativas calculadas utilizando todas as biopsias. Para os dois ensaios, a especificidade clínica utilizando apenas biopsias direccionadas foi semelhante à especificidade obtida com todas as biopsias incluídas. Em conformidade, quando foram utilizadas apenas biopsias direccionadas, a especificidade do Aptima HPV Assay foi significativamente superior à do teste do DNA do HPV disponível no mercado.

As estimativas de desempenho clínico do Aptima HPV Assay e do teste do DNA do HPV disponível no mercado são apresentadas por grupo etário na Tabela 13 e na Tabela 14 ( $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3, respectivamente, com base na avaliação de todas as biopsias).

**Tabela 13:** População ASC-US ≥ 21 anos: Desempenho do Aptima HPV Assay e de um Teste do DNA do HPV para a detecção de ≥CIN2 por grupo estário

	Desempenho	Aptima HPV Assay N=939		Teste do DNA do HPV N=865*	
		Estimativa	(CI de 95%)	Estimativa	(CI de 95%)
21 a 29 anos		N=415		N=389	
	Sensibilidade (%)	90,2 (55/61)	(80,2, 95,4)	94,9 (56/59)	(86,1, 98,3)
	Especificidade (%)	44,9 (159/354)	(39,8, 50,1)	35,5 (117/330)	(30,5, 40,8)
	PPV (%)	22,0 (55/250)	(19,6, 24,2)	20,8 (56/269)	(19,0, 22,5)
	NPV (%)	96,4 (159/165)	(93,0, 98,5)	97,5 (117/120)	(93,6, 99,4)
	Prevalência (%)	14,7 (61/415)		15,2 (59/389)	
30 a 39 anos		N=262		N=239	
	Sensibilidade (%)	90,0 (18/20)	(69,9, 97,2)	80,0 (16/20)	(58,4, 91,9)
	Especificidade (%)	68,2 (165/242)	(62,1, 73,7)	61,6 (135/219)	(55,1, 67,8)
	PPV (%)	18,9 (18/95)	(14,7, 22,7)	16,0 (16/100)	(11,8, 19,6)
	NPV (%)	98,8 (165/167)	(96,5, 99,8)	97,1 (135/139)	(94,1, 99,1)
	Prevalência (%)	7,6 (20/262)		8,4 (20/239)	
≥ 40 Anos		N=262		N=237	
	Sensibilidade (%)	60,0 (6/10)	(31,3, 83,2)	70,0 (7/10)	(39,7, 89,2)
	Especificidade (%)	82,9 (209/252)	(77,8, 87,1)	79,7 (181/227)	(74,0, 84,4)
	PPV (%)	12,2 (6/49)	(5,8, 18,4)	13,2 (7/53)	(6,9, 18,7)
	NPV (%)	98,1 (209/213)	(96,6, 99,4)	98,4 (181/184)	(96,6, 99,6)
	Prevalência (%)	3,8 (10/262)		4,2 (10/237)	

\*74 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não tinham resultados do teste do DNA do HPV sobretudo devido ao volume insuficiente do espécime de citologia.

**Tabela 14:** População ASC-US ≥ 21 anos: Desempenho do Aptima HPV Assay e de um Teste do DNA do HPV para a detecção de ≥CIN3 por grupo etário

	Desempenho	Aptima HPV Assay N=939		Teste do DNA do HPV N=865*	
		Estimativa	(CI de 95%)	Estimativa	(CI de 95%)
21 a 29 anos		N=415		N=389	
	Sensibilidade (%)	96,3 (26/27)	(81,7, 99,3)	100 (25/25)	(86,7, 100)
	Especificidade (%)	42,3 (164/388)	(37,5, 47,2)	33,0 (120/364)	(28,3, 38,0)
	PPV (%)	10,4 (26/250)	(8,9, 11,4)	9,3 (25/269)	(8,2, 10,0)
	NPV (%)	99,4 (164/165)	(97,2, 100)	100 (120/120)	(97,5, 100)
	Prevalência (%)	6,5 (27/415)		6,4 (25/389)	
30 a 39 anos		N=262		N=239	
	Sensibilidade (%)	88,9 (8/9)	(56,5, 98,0)	77,8 (7/9)	(45,3, 93,7)
	Especificidade (%)	65,6 (166/253)	(59,6, 71,2)	59,6 (137/230)	(53,1, 65,7)
	PPV (%)	8,4 (8/95)	(5,2, 10,4)	7,0 (7/100)	(3,9, 9,1)
	NPV (%)	99,4 (166/167)	(97,6, 100)	98,6 (137/139)	(96,4, 99,8)
	Prevalência (%)	3,4 (9/262)		3,8 (9/239)	
≥ 40 Anos		N=262		N=237	
	Sensibilidade (%)	60,0 (3/5)	(23,1, 88,2)	80,0 (4/5)	(37,6, 96,4)
	Especificidade (%)	82,1 (211/257)	(77,0, 86,3)	78,9 (183/232)	(73,2, 83,6)
	PPV (%)	6,1 (3/49)	(1,6, 10,2)	7,5 (4/53)	(2,9, 10,7)
	NPV (%)	99,1 (211/213)	(98,0, 99,9)	99,5 (183/184)	(98,2, 100)
	Prevalência (%)	1,9 (5/262)		2,1 (5/237)	

\*74 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não tinham resultados do teste do DNA do HPV sobretudo devido ao volume insuficiente do espécime de citologia.

O risco absoluto de doença ( $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3, com base na avaliação de todas as biopsias) conforme o resultado do Aptima HPV Assay e o risco relativo de doença para resultados do Aptima HPV Assay positivo versus negativo são apresentados na Tabela 15, tal como acontece com as estimativas para o teste do DNA do HPV disponível no mercado. O risco relativo de  $\geq$ CIN2 foi de 9,1 (CI de 95%: 5,0, 16,5), indicando que uma mulher que teve um resultado positivo com o Aptima HPV Assay tinha 9,1 vezes mais probabilidade de ter  $\geq$ CIN2 do que uma mulher que tenha tido um resultado negativo com o Aptima HPV Assay. O risco relativo de  $\geq$ CIN3 foi de 12,8 (CI de 95%: 4,6, 35,6).

**Tabela 15:** População ASC-US  $\geq$  21 anos: Riscos absolutos e relativos de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 para os resultados do Aptima HPV Assay e de um Teste do DNA do HPV

	Resultado do ensaio	Aptima HPV Assay N=939		Teste do DNA do HPV N=865*	
		Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)	Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)
$\geq$ CIN2	Positiva	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)
	Negativa	2,2 (12/545) (1,2, 3,5)		2,3 (10/443) (1,2, 3,8)	
	Prevalência (%)	9,7 (91/939)		10,3 (89/865)	
$\geq$ CIN3	Positiva	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)
	Negativa	0,7 (4/545) (0,2, 1,7)		0,7 (3/443) (0,2, 1,7)	
	Prevalência (%)	4,4 (41/939)		4,5 (39/865)	

\*74 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não tinham resultados do teste do DNA do HPV sobretudo devido ao volume insuficiente do espécime de citologia.

As estimativas de risco absoluto e relativo de doença ( $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3, com base em todas as avaliações de biopsias) para o Aptima HPV Assay e o teste do DNA do HPV disponível no mercado são apresentados por grupo etário na Tabela 16.

**Tabela 16:** População ASC-US  $\geq$  21 anos: Riscos absolutos e negativos de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 para os resultados do Aptima HPV Assay e de um Teste do DNA do HPV por grupo etário

	Idade	Resultado do ensaio	Aptima HPV Assay N=939		Teste do DNA do HPV N=865*	
			Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)	Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)
$\geq$ CIN2	21 a 29 anos		N=415		N=389	
		Positiva	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)
		Negativa	3,6 (6/165) (1,5, 7,0)		2,5 (3/120) (0,6, 6,4)	
		Prevalência (%)	14,7 (61/415)		15,2 (59/389)	
	30 a 39 anos		N=262		N=239	
		Positiva	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)
		Negativa	1,2 (2/167) (0,2, 3,5)		2,9 (4/139) (0,9, 5,9)	
		Prevalência (%)	7,6 (20/262)		8,4 (20/239)	
	$\geq$ 40 anos		N=262		N=237	
		Positiva	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)
		Negativa	1,9 (4/213) (0,6, 3,4)		1,6 (3/184) (0,4, 3,4)	
		Prevalência (%)	3,8 (10/262)		4,2 (10/237)	
$\geq$ CIN3	21 a 29 anos		N=415		N=389	
		Positiva	10,4 (26/250) (8,9, 11,4)	17,2 (2,4, 125)	9,3 (25/269) (8,2, 10,0)	Não calculável
		Negativa	0,6 (1/165) (0,0, 2,8)		0,0 (0/120) (0,0, 2,5)	
		Prevalência (%)	6,5 (27/415)		6,4 (25/389)	
	30 a 39 anos		N=262		N=239	
		Positiva	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)
		Negativa	0,6 (1/167) (0,0, 2,4)		1,4 (2/139) (0,2, 3,6)	
		Prevalência (%)	3,4 (9/262)		3,8 (9/239)	
	$\geq$ 40 anos		N=262		N=237	
		Positiva	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)
		Negativa	0,9 (2/213) (0,1, 2,0)		0,5 (1/184) (0,0, 1,8)	
		Prevalência (%)	1,9 (5/262)		2,1 (5/237)	

\*74 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não tinham resultados do teste do DNA do HPV sobretudo devido ao volume insuficiente do espécime de citologia.

### População NILM ≥ 30 anos: Desempenho Clínico do Aptima HPV Assay com Espécimes de Citologia Líquida ThinPrep na Linha de Referência

Na totalidade, verificaram-se 11 644 mulheres com resultados citológicos de NILM inscritas no Estudo NILM. Destas, 773 mulheres foram retiradas e excluídas da avaliação na linha de referência. As restantes 10 871 mulheres susceptíveis de serem avaliadas tinham 30 anos ou idade superior com resultados citológicos de NILM e resultados do Aptima HPV Assay. Das 540 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay positivos, 335 realizaram colposcopia na linha de referência. Das 10 331 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay negativos, 530 realizaram colposcopia na linha de referência. Vinte (20) mulheres tinham ≥CIN2 e onze (11) tinham ≥CIN3; 799 mulheres tinham histologia normal/CIN1; 46 mulheres tinham um estado de doença indeterminado. Os resultados do Aptima HPV Assay pelo diagnóstico do Painel de Consenso de Estudo Histológico na linha de referência são apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17:** População NILM ≥ 30 anos: Resultados do Aptima HPV Assay e de um Teste de DNA do HPV por diagnóstico do painel de consenso de estudo histológico na linha de referência

Resultado do Aptima HPV Assay*	Teste do DNA do HPV	Consenso do diagnóstico do painel de revisão de histologia						
		Indeterminado	Normal	CIN1	CIN2	CIN3	Cancro	Total
Positiva	Positiva	11	212	11	4	7	2	247
Positiva	Negativa	7	59	0	1	0	1	68
Positiva	Sem resultado**	3	16	1	0	0	0	20
Negativa	Positiva	10	170	8	2	1	0	191
Negativa	Negativa	15	313	9	1	0	0	338
Negativa	Sem resultado**	0	0	0	1	0	0	1
<b>Total</b>		46	770	29	9	8	3***	865

\*Todas as amostras apresentaram resultados finais válidos (quando foi realizado o teste inicial ou após resolução de resultados iniciais inválidos por procedimento).

\*\*21 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não tinham resultados do teste do DNA do HPV sobretudo devido ao volume insuficiente do espécime de citologia.

\*\*\*Três mulheres apresentavam adenocarcinoma in situ (AIS).

Na totalidade, 10 052 mulheres apresentavam um estado de doença não verificado (incluindo indeterminado) na linha de referência (Tabela 18). Devido a apenas terem sido encaminhadas para colposcopia mulheres seleccionadas aleatoriamente com resultados negativos para o Aptima HPV Assay e para o teste do DNA do HPV disponível no mercado, a proporção de mulheres com estado de doença não verificado neste grupo foi elevada (96,6%). Para ajustar este desvio de verificação, foi utilizado um método de imputação múltipla para efectuar a estimativa de mulheres com doença que teriam sido identificadas caso todas as mulheres tivessem sido submetidas a colposcopia. São apresentadas tanto as estimativas de desempenho ajustadas do desvio de verificação como as estimativas de desempenho não ajustadas com base nas 819 mulheres com estado de doença verificado na linha de referência.

**Tabela 18:** População NILM  $\geq$  30 anos: Classificação de mulheres NILM susceptíveis de serem avaliadas de acordo com os resultados do Aptima HPV Assay e do teste do DNA do HPV, estado da doença ( $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3) e estado de verificação da doença na linha de referência

Resultado do Aptima HPV Assay*	Teste do DNA do HPV	Total de mulheres	Estado de doença verificada: $\geq$ CIN2		Estado de doença verificada: $\geq$ CIN3		Estado de doença não verificada
			Mulheres doentes ( $\geq$ CIN2)	Mulheres não doentes ( $<$ CIN2)	Mulheres doentes ( $\geq$ CIN3)	Mulheres não doentes ( $<$ CIN3)	Mulheres com estado de doença desconhecido (% desconhecida)
Positiva	Positiva	360	13	223	9	227	124 (34,4%)
Positiva	Negativa	150	2	59	1	60	89 (59,3%)
Positiva	Sem resultado**	30	0	17	0	17	13 (43,3%)
Negativa	Positiva	306	3	178	1	180	125 (40,8%)
Negativa	Negativa	9420	1	322	0	323	9097 (96,6%)
Negativa	Sem resultado**	605	1	0	0	1	604 (99,8%)
<b>Total</b>		10 871	20	799	11	808	10 052 (92,5%)

\*Todas as amostras apresentaram resultados finais válidos (quando foi realizado o teste inicial ou após resolução de resultados iniciais inválidos por procedimento).

\*\*635 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não tinham resultados do teste do DNA do HPV sobretudo devido ao volume insuficiente do espécime de citologia.

A prevalência ajustada de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 em mulheres com resultados citológicos de NILM foi de 0,9% e 0,4%, respectivamente. As estimativas ajustadas de risco absoluto e negativo para a detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 na linha de referência são demonstradas na Tabela 19. O risco relativo ajustado de  $\geq$ CIN2 foi de 8,1 (CI de 95%: 2,3, 28,1), indicando que uma mulher que teve um resultado positivo com o Aptima HPV Assay tem 8,1 vezes mais probabilidade de ter  $\geq$ CIN2 do que uma mulher que tenha tido um resultado negativo com o Aptima HPV Assay. O risco relativo ajustado de  $\geq$ CIN3 foi de 34,5 (CI de 95%: 2,7, 443,3). As estimativas não ajustadas de risco absoluto e relativo para a detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 na linha de referência são apresentadas em geral na Tabela 20 e por grupo etário na Tabela 21.

**Tabela 19:** População NILM  $\geq$  30 anos Risco absoluto e relativo de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 para os resultados do Aptima HPV Assay e de um teste do DNA do HPV (estimativas ajustadas do desvio de verificação) na linha de referência

Resultado do ensaio		Aptima HPV Assay		Teste do DNA do HPV	
		Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)	Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)
$\geq$ CIN2	Positiva	4,7 (2,9, 7,6)	8,1 (2,3, 28,1)	3,7 (2,3, 6,0)	7,3 (1,6, 33,4)
	Negativa	0,6 (0,2, 1,9)		0,5 (0,1, 2,1)	
	Prevalência (%)	0,9		0,9	
$\geq$ CIN3	Positiva	3,3 (1,4, 7,6)	34,5 (2,7, 443,3)	2,3 (1,3, 4,1)	21,0 (1,0, 423,4)
	Negativa	0,1 (0,0, 1,6)		0,1 (0,0, 2,4)	
	Prevalência (%)	0,4		0,4	

**Tabela 20:** População NILM  $\geq$  30 anos: Risco absoluto e relativo de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 para os resultados do Aptima HPV Assay e de um teste do DNA do HPV (estimativas não ajustadas) na linha de referência

Resultado do ensaio		Aptima HPV Assay N=819		Teste do DNA do HPV N=801*	
		Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)	Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)
$\geq$ CIN2	Positiva	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)
	Negativa	1,0 (5/505) (0,4, 1,9)		0,8 (3/384) (0,2, 1,9)	
	Prevalência (%)	2,4 (20/819)		2,4 (19/801)	



**Tabela 20:** População NILM  $\geq 30$  anos: Risco absoluto e relativo de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 para os resultados do Aptima HPV Assay e de um teste do DNA do HPV (estimativas não ajustadas) na linha de referência (*continuação*)

Resultado do ensaio		Aptima HPV Assay N=819		Teste do DNA do HPV N=801*	
		Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)	Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)
$\geq$ CIN3	Positiva	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)
	Negativa	0,2 (1/505) (0,0, 0,9)		0,3 (1/384) (0,0, 1,1)	
	Prevalência (%)	1,3 (11/819)		1,4 (11/801)	

\*18 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não tinham resultados do teste do DNA do HPV sobretudo devido ao volume insuficiente do espécime de citologia.

**Tabela 21:** População NILM ≥ 30 anos: Risco absoluto e relativo de ≥CIN2 e ≥CIN3 para os resultados do Aptima HPV Assay e de um teste do DNA do HPV por grupo etário (estimativas não ajustadas) na linha de referência

	Idade	Resultado do ensaio	Aptima HPV Assay N=819		Teste do DNA do HPV N=801*	
			Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)	Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)
≥CIN2	30 a 39 anos		N=384		N=377	
		Positiva	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)
		Negativa	0,5 (1/217) (0,0, 2,5)		1,2 (2/161) (0,2, 4,4)	
		Prevalência (%)	2,3 (9/384)		2,4 (9/377)	
	≥ 40 Anos		N=435		N=424	
		Positiva	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)
		Negativa	1,4 (4/288) (0,4, 3,5)		0,4 (1/223) (0,0, 2,5)	
		Prevalência (%)	2,5 (11/435)		2,4 (10/424)	
≥CIN3	30 a 39 anos		N=384		N=377	
		Positiva	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)
		Negativa	0,5 (1/217) (0,0, 2,5)		0,6 (1/161) (0,0, 3,4)	
		Prevalência (%)	1,6 (6/384)		1,6 (6/377)	
	≥ 40 Anos		N=435		N=424	
		Positiva	3,4 (5/147) (1,1, 7,8)	Não calculável	2,5 (5/201) (0,8, 5,7)	Não calculável
		Negativa	0,0 (0/288) (0,0, 1,3)		0,0 (0/223) (0,0, 1,6)	
		Prevalência (%)	1,1 (5/435)		1,2 (5/424)	

\*18 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não tinham resultados do teste do DNA do HPV sobretudo devido ao volume insuficiente do espécime de citologia.

As estimativas do desempenho clínico ajustado do Aptima HPV Assay, incluindo sensibilidade, especificidade, PPV e NPV para a detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 são apresentadas na Tabela 22, tal como as estimativas para o teste do DNA do HPV disponível no mercado. As estimativas do desempenho clínico não ajustadas são apresentadas na Tabela 23. O Aptima HPV Assay e o teste do DNA do HPV disponível no mercado apresentaram sensibilidade semelhante, ao passo que a especificidade foi significativamente superior para o Aptima HPV Assay (CI não sobrepostos de 95%). As estimativas do valor de prognóstico do Aptima HPV Assay foram clinicamente relevantes e semelhantes às estimativas para o teste do DNA do HPV disponível no mercado. Os NPV foram semelhantes, porém, para a detecção de  $\geq$ CIN2, o PPV para o Aptima HPV Assay foi ligeiramente superior ao PPV para o teste do DNA do HPV disponível no mercado (4,7% vs. 3,7%).

**Tabela 22:** População NILM  $\geq$  30 anos: Desempenho do Aptima HPV Assay e de um teste do DNA do HPV para a detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 (estimativas ajustadas do desvio de verificação) na linha de referência

	Desempenho	Aptima HPV Assay		Teste do DNA do HPV	
		Estimativa	(CI de 95%)	Estimativa	(CI de 95%)
$\geq$ CIN2	Sensibilidade (%)	31,0	(5,9, 56,1)	35,4	(3,8, 66,9)
	Especificidade (%)	95,2	(94,8, 95,6)	93,7	(93,2, 94,2)
	PPV (%)	4,7	(2,9, 7,6)	3,7	(2,3, 6,0)
	NPV (%)	99,4	(98,1, 99,8)	99,5	(97,9, 99,9)
	Prevalência (%)	0,9		0,9	
$\geq$ CIN3	Sensibilidade (%)	61,5	(14,0, 100)	56,4	(0,4, 100)
	Especificidade (%)	95,2	(94,8, 95,6)	93,6	(93,1, 94,1)
	PPV (%)	3,3	(1,4, 7,6)	2,3	(1,3, 4,1)
	NPV (%)	99,9	(98,4, 100)	99,9	(97,6, 100)
	Prevalência (%)	0,4		0,4	

**Tabela 23:** População NILM ≥ 30 anos: Desempenho do Aptima HPV Assay e de um teste do DNA do HPV para a detecção de ≥CIN2 e ≥CIN3 (estimativas não ajustadas) na linha de referência

	Desempenho	Aptima HPV Assay N=819		Teste do DNA do HPV N=801*	
		Estimativa	(CI de 95%)	Estimativa	(CI de 95%)
≥CIN2	Sensibilidade (%)	75,0 (15/20)	(53,1, 88,8)	84,2 (16/19)	(62,4, 94,5)
	Especificidade (%)	62,6 (500/799)	(59,2, 65,9)	48,7 (381/782)	(45,2, 52,2)
	PPV (%)	4,8 (15/314)	(3,4, 5,8)	3,8 (16/417)	(2,9, 4,4)
	NPV (%)	99,0 (500/505)	(98,1, 99,6)	99,2 (381/384)	(98,1, 99,8)
	Prevalência (%)	2,4 (20/819)		2,4 (19/801)	
≥CIN3	Sensibilidade (%)	90,9 (10/11)	(62,3, 98,4)	90,9 (10/11)	(62,3, 98,4)
	Especificidade (%)	62,4 (504/808)	(59,0, 65,7)	48,5 (383/790)	(45,0, 52,0)
	PPV (%)	3,2 (10/314)	(2,2, 3,7)	2,4 (10/417)	(1,6, 2,7)
	NPV (%)	99,8 (504/505)	(99,1, 100)	99,7 (383/384)	(98,9, 100)
	Prevalência (%)	1,3 (11/819)		1,4 (11/801)	

\*18 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não tinham resultados do teste do DNA do HPV sobretudo devido ao volume insuficiente do espécime de citologia.

A comparação directa entre Aptima HPV Assay e o teste do DNA do HPV disponível no mercado demonstra sensibilidade semelhante e especificidade melhorada significativa estatisticamente do Aptima HPV Assay em relação ao teste de DNA do HPV disponível no mercado para a detecção de  $\geq$ CIN2, conforme demonstrado pelas relações de taxas de resultados positivos reais ou de resultados positivos falsos (Tabela 24 e Tabela 25, respectivamente).

**Tabela 24:** População NILM  $\geq$  30 anos: Relação de taxas de resultados positivos reais (Aptima HPV Assay/teste do DNA do HPV) para mulheres com  $\geq$ CIN2 (estimativas não ajustadas) na linha de referência

		Teste do DNA do HPV		Total
		Positiva	Negativa	
Aptima HPV Assay	Positiva	13	2	15 (78,9%)
	Negativa	3	1	4
	Total	16 (84,2%)	3	19
<b>Relação de taxas de resultados positivos reais = 0,94 (15/16) (CI de 95%: 0,67, 1,20)</b>				

**Tabela 25:** População NILM  $\geq$  30 anos: Relação de taxas de resultados positivos falsos (Aptima HPV Assay/teste do DNA do HPV) para mulheres com  $<$ CIN2 (estimativas não ajustadas) na linha de referência

		Teste do DNA do HPV		Total
		Positiva	Negativa	
Aptima HPV Assay	Positiva	223	59	282 (36,1%)
	Negativa	178	322	500
	Total	401 (51,3%)	381	782
<b>Relação de taxas de resultados positivos falsos = 0,70 (282/401) (CI de 95%: 0,64, 0,77)</b>				

### População ≥ 30 Anos de NILM: Desempenho Clínico do Aptima HPV Assay Após 3 anos de Acompanhamento

Haviam 10 854 mulheres avaliáveis com 30 ou mais anos de idade com resultados de citologia NILM e resultados válidos de Aptima HPV assay na linha de referência que eram elegíveis para a Fase de Acompanhamento. Das mulheres sem ≥CIN2, 66,9% (7 251/10 834) das mulheres realizaram uma consulta de papanicolau de acompanhamento no ano 1, 60,2% (6 522/10 825) no ano 2 e 58,6% (6 344/10 818) no ano 3. Na globalidade, 58,8% (6 380/10 854) das mulheres concluíram o estudo (tinham ≥CIN2 na linha de referência ou durante o acompanhamento e/ou realizaram as consultas necessárias).

Das 10 854 mulheres, 540 (5,0%) tiveram resultados positivos no Aptima HPV assay na linha de referência. Destas 540 mulheres, 263 (48,7%) tiveram estado positivo ou negativo de doença a 3 anos com base em resultados de citologia ou colposcopia/biopsia. As restantes 10 314 mulheres tiveram resultados negativos no Aptima HPV assay na linha de referência. Destas 10 314 mulheres, 5 943 (57,6%) tiveram um estado positivo ou negativo da doença a 3 anos. Das 6 206 mulheres com estado de doença a 3 anos, 47 mulheres tinham ≥CIN2, incluindo 23 com ≥CIN3; 6 159 mulheres tiveram normal/CIN1 pelo Painel de Revisão de Histologia de Consenso. Os resultados na linha de referência do Aptima HPV assay e de um ensaio de DNA do HPV comercialmente disponível e do estado da doença a 3 anos (inclui avaliação na linha de referência e no acompanhamento) pelo Painel de Revisão de Histologia de Consenso são apresentados na Tabela 26.

**Tabela 26:** População ≥ 30 Anos de NILM: Classificação de Mulheres Elegíveis para a Fase de Acompanhamento por Resultados no HPV Assay na Linha de Referência, Resultados de Teste de DNA do HPV na linha de referência e Estado de Doença (≥CIN2, ≥CIN3, Não verificado) Determinado nas Fases de Linha de Referência e de Acompanhamento

Resultado no Aptima HPV Assay	Teste de ADN HPV	Total de Mulheres	Estado de Doença Verificado: ≥CIN2		Estado de Doença Verificado: ≥CIN3		Estado de Doença Não Verificado	
			Mulheres Doentes (≥CIN2)	Mulheres Não Doentes (<CIN2)	Mulheres Doentes (≥CIN3)	Mulheres Não Doentes (<CIN3)	Perdidas para Acompanhamento	Indeterminado*
Positivo	Positivo	360	22	154	15	161	165	19
Positivo	Negativo	150	2	72	1	73	68	8
Positivo	Sem Resultado**	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	Sem Resultado**	605	1	321	0	322	269	14
<b>Total</b>		10 854	47	6 159	23	6 183	4 384	264

\*Mulheres que tenham resultados anormais no teste de citologia durante o acompanhamento e que não tenham um resultado do Painel de Revisão de Histologia de Consenso subsequente e mulheres com citologia inadequada na sua última consulta. 174 mulheres com estado indeterminado de doença concluíram o acompanhamento de acordo com o protocolo.

\*\*635 mulheres com resultados no Aptima HPV assay não tiveram resultados no teste de ADN HPV principalmente devido a volume insuficiente do espécime de citologia.

O risco acumulado de 3 anos de doença (≥CIN2 e ≥CIN3) baseia-se na estimativa Kaplan-Meier (análise vida-tabela) e inclui doença detectada na linha de referência ou no acompanhamento. As mulheres que tinham alguma indicação de doença (ASC-US ou resultados de citologia mais graves) mas sem resultado de Painel de Revisão de Histologia de Consenso foram incluídas na análise utilizando um método de imputação múltiplo para prever o número de mulheres com doença que teriam sido identificadas se as mulheres tivessem sido submetidas a colposcopia.

As estimativas de risco absoluto e relativo acumulado de 3 anos para detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 são mostradas na Tabela 27.

**Tabela 27:** População  $\geq$  30 Anos de NILM: Riscos Absoluto e Relativo Acumulado de 3 Anos\* de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 para Resultados do Aptima HPV Assay e de um Teste de DNA do HPV na Linha de Referência

	Resultado do Ensaio	Aptima HPV Assay		Teste de ADN HPV	
		Risco Absoluto (95% CI)	Risco Relativo (95% CI)	Risco Absoluto (95% CI)	Risco 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)	
	Prevalência (%)	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)	
	Prevalência (%)	0,34		0,35	

\*Os riscos cumulativos de 3 anos ajustados para outros desvios possíveis foram semelhantes aos riscos apresentados nesta tabela. Devido às diferenças previstas nos riscos no ano 1 e no ano 2 para os dois grupos de mulheres no estudo de acompanhamento (grupo de mulheres com colposcopia na linha de referência e grupo de mulheres sem colposcopia na linha de referência), apenas foi reportado o risco cumulativo de 3 anos para os grupos combinados.

A prevalência acumulada de 3 anos de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 em mulheres com resultados de citologia NILM na linha de referência foi de 0,68% e 0,34%, respectivamente. O risco relativo de  $\geq$ CIN2 foi de 22,55 (95% CI: 12,68, 40,10), indicando que uma mulher que é positiva no Aptima HPV assay tem 22,55 vezes mais probabilidade de ter  $\geq$ CIN2 do que uma mulher que é negativa no Aptima HPV assay. O risco relativo de  $\geq$ CIN3 foi de 44,12 (95% CI: 16,91, 115,10).

## Desempenho clínico do Aptima HPV Assay com espécimes de citologia líquida SurePath

**Espécimes conservados em SurePath tratados com a Solução de Transferência Aptima**

Espécimes de citologia líquida SurePath foram colhidos de mulheres canadianas (n=558) encaminhadas para acompanhamento devido a um ou mais exames Papanicolau anormais, infecção pelo HPV ou outra razão. Uma alíquota (0,5 ml) de cada espécime foi transferida para um tubo de Transferência de Espécimes Aptima e depois tratada com a Solução de Transferência Aptima. Uma única réplica de cada espécime foi testada com o Aptima HPV Assay. Uma alíquota individual (1 ml) de cada espécime foi retirada para ser avaliada com um teste de PCR para o HPV disponível no mercado. A sensibilidade clínica para a detecção da doença, definida como resultado histológico  $\geq$ CIN3, foi calculada tanto para o Aptima HPV Assay como para o teste de PCR para o HPV, conforme apresentado na Tabela 28, com os valores de prognóstico positivos e negativos.

**Tabela 28:** Desempenho do Aptima HPV Assay e do teste de PCR para o HPV para a detecção de  $\geq$ CIN3

Desempenho	Aptima HPV Assay N=558		Teste de PCR para o HPV N=558	
	Estimativa	(CI de 95%)	Estimativa	(CI de 95%)
<b>Sensibilidade (%)</b>	89,3 (25/28)	(72,8 - 96,3)	89,3 (25/28)	(72,8 - 96,3)
<b>Especificidade (%)</b>	56,8 (301/530)	(52,5 - 60,9)	49,1 (260/530)	(44,8 - 53,3)
<b>PPV (%)</b>	9,8 (25/254)	(8,1 - 11,2)	8,5 (25/295)	(7,0 - 9,5)
<b>NPV (%)</b>	99,0 (301/304)	(97,6 - 99,8)	98,9 (260/263)	(97,2 - 99,7)
<b>Prevalência (%)</b>	5,0 (28/558)		5,0 (28/558)	



**Tabela 29:** Sensibilidade do Aptima HPV Assay com espécimes de citologia líquida SurePath e ThinPrep

Genótipo de HPV	Cópias/ reação	ThinPrep	SurePath
		% positiva (CI de 95%)	% positiva (CI de 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)

## Desempenho do Aptima HPV Assay com Colheita e Transporte de Espécimes Cervicais

Os espécimes de citologia líquida ThinPrep emparelhados e os espécimes do Kit CSCT Aptima foram colhidos em 735 sujeitos. Um mililitro (1,0 ml) de cada espécime de citologia líquida ThinPrep foi diluído em 2,9 ml de meio de transporte de espécimes Aptima e uma única réplica foi testada com o Aptima HPV assay no Tigris DTS System. Uma única réplica de cada espécime de CSCT também foi testada com o Aptima HPV assay. A concordância percentual do Aptima HPV assay entre o espécime de citologia líquida ThinPrep e o espécime do CSCT foi determinada e os resultados são indicados na Tabela 30.

A concordância positiva percentual foi de 95,9% (CI de 95%: 92,6-97,8); a concordância negativa percentual foi de 95,5% (CI de 95%: 93,3-97,0); a concordância geral foi de 95,6% (CI de 95%: 93,9-96,9). Observou-se uma forte correlação entre os espécimes de citologia líquida e os espécimes do kit de transporte ( $\kappa = 0,90$ )

**Tabela 30:** Concordância geral dos Resultados do Aptima HPV assay de Espécimes de Citologia Líquida ThinPrep e de espécimes do Kit Aptima de Colheita e Transporte de Espécimes do Colo do Útero testadas no Tigris DTS System

		Espécime de citologia líquida ThinPrep		Total
		Positiva	Negativa	
Espécime do kit Aptima CSCT	Positiva	234	22	256
	Negativa	10	469	479
	Total	244	491	735

Concordância positiva = 95,9% (92,6-97,8)  
 Concordância negativa = 95,5% (93,3-97,0)  
 Concordância geral = 95,6% (93,9-96,9)  
 Coeficiente kappa = 0,90

## Sensibilidade analítica

O limite de detecção (Limit of Detection, LOD) no “cutoff” clínico consiste numa concentração de RNA do HPV que é positiva (acima do “cutoff” clínico) 95% das vezes. Determinou-se o LOD do Aptima HPV Assay testando painéis de diluição de transcritos *in vitro* (IVT) para todos os 14 genótipos de alto risco e 4 linhas celulares infectadas com HPV: SiHa, HeLa, MS751 e ME180 (ATCC, Manassas, Virgínia). No caso dos painéis de IVT, o meio de transporte de espécimes foi aditivado com IVT com várias concentrações e depois diluído com espécimes de citologia líquida ThinPrep individuais negativos antes de serem realizados testes. No caso de painéis de células infectadas com HPV, grupos de espécimes de citologia líquida ThinPrep negativos para HPV foram aditivados com células infectadas com HPV com várias concentrações e depois diluídos com meio de transporte de espécimes antes de serem realizados testes. Trinta réplicas de cada nível de cópias foram testadas com cada um de dois lotes de reagente para um total de 60 réplicas. Realizaram-se testes durante 14 dias, com 1 a 12 execuções por dia e 5 réplicas de um dado genótipo, com testes de concentração em cada execução. O limite de detecção de 95% foi calculado a partir da análise de regressão Probit dos resultados de positividade para cada painel de diluição.

Os resultados da análise Probit, Tabela 31, mostram que os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 38, 45, 58, 59 e 68 de HPV tinham limites de detecção de 95% inferiores a 100 cópias/reacção, tendo os tipos 51, 52, 56 e 66 limites de detecção de 95% entre 100 e 300 cópias/reacção. As quatro linhas celulares testadas tinham limites de detecção de 95% inferiores a 1 célula/reacção.

**Tabela 31:** Limite de detecção no “cutoff” clínico do Aptima HPV Assay

Alvo	Limite de detecção* (CI de 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)

\*cópias por reacção para transcritos *in vitro* e células por reacção para linhas celulares

## Precisão do Ensaio

A precisão do Aptima HPV Assay foi avaliada em dois estudos utilizando o mesmo painel de 20 membros. O estudo 1 foi conduzido em 3 locais de teste externos para determinar a reprodutibilidade do ensaio. O estudo 2 foi conduzido nas instalações para medir a repetibilidade do ensaio. O painel incluiu 10 membros de HPV positivo com concentrações no ou acima do limite de detecção do ensaio (positividade esperada:  $\geq 95\%$ ), 4 membros de HPV positivo com concentrações abaixo do limite de detecção do ensaio (positividade esperada:  $> 0\%$  a  $< 25\%$ ) e 6 membros de HPV negativos. Os membros do painel de HPV positivos foram preparados aditivando transcritos de RNA *in vitro* (IVT) em meios de transporte de espécimes (specimen transport medium, STM) ou células cultivadas infectadas pelo HPV (SiHa, HeLa, ME180 e MS751; ATCC, Manassas, Virginia) na solução PreservCyt. Os membros do painel negativo de HPV foram preparados com STM ou espécimes de citologia líquida residuais ThinPrep agrupados.

No estudo 1, 2 operadores em cada um dos 3 locais de teste (1 instrumento por local) efectuaram uma lista de trabalho do Aptima HPV Assay por dia durante 3 dias para cada um dos 3 lotes de reagente. Cada lista de trabalho continha 3 réplicas de cada um dos membros do painel de reprodutibilidade. Foram testados cento e sessenta e dois (162) tubos de amostra individuais para cada membro do painel (3 locais x 1 instrumento x 2 operadores x 3 lotes x 3 listas de trabalho x 3 réplicas). No estudo 2, o teste foi efectuado nas instalações durante 20 dias com um total de 162 reacções testadas para cada membro do painel (1 local x 3 instrumentos x 3 operadores x 3 lotes x 2 listas de trabalho x 3 réplicas).

Os membros do painel são descritos na Tabela 32a (membros do painel com resultados positivos esperados) e na Tabela 32 (membros do painel com resultados negativos esperados) juntamente com um resumo da concordância com resultados esperados e valores de S/CO do analito ao 2,5º, 50º e 97,5º percentis da distribuição do S/CO. A variabilidade do S/CO do analito para os membros do painel com resultados positivos esperados é indicada na Tabela 33 para o Estudo 1 e na Tabela 34 para o Estudo 2.

A concordância positiva para membros do painel de HPV positivo com concentrações no ou acima do limite de detecção do ensaio variaram de 95,1% a 100% no Estudo 1 e de 93,2% a 100% no Estudo 2 para 9 dos 10 membros do painel. O restante membro do painel positivo de HPV resultou numa concordância de 77,2% no Estudo 1 e 79,0% no Estudo 2, a qual foi mais baixa do que o esperado, mas foi consistente entre os 2 estudos. A concordância negativa dos membros do painel negativo do HPV alto com concentrações abaixo do limite de detecção do ensaio variou de 78,8% a 93,8% no Estudo 1 e 82,1% a 95,7% no Estudo 2. A concordância com resultados esperados para os membros do painel de HPV negativo variou de 96,9% a 100% no Estudo 1 e de 96,3% a 100% no Estudo 2.

**Tabela 32a:** Reprodutibilidade do Aptima HPV Assay no Estudo 1 e 2: Descrição do painel, Concordância positiva e Percentil de distribuição dos valores de S/CO do analito para os membros do painel com resultados positivos esperados

Descrição do painel (cópias ou células/reacção)	Estudo 1 (3 locais de teste)	Estudo 2 (1 local de teste)
	% de concordância positiva (CI de 95%)	% de concordância positiva (CI de 95%)
IVT de HPV 16 e HPV 18 (100 cópias)	100 (161/161) (97,7, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
Células SiHa (3 células) e células HeLa (7,5 células)	100 (162/162) (97,7, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
IVT de HPV 18 (100 cópias)	100 (162/162) (97,7, 100)	100 (160/160) (97,7, 100)
IVT de HPV 16 (100 cópias)	100 (162/162) (97,7, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
Células MS751 (1 célula)	99,4 (161/162) (96,6, 99,9)	96,9 (157/162) (93,0, 98,7)
Células ME180 (0,3 células)	95,1 (154/162) (90,6, 97,5)	93,2 (151/162) (88,3, 96,2)
IVT de HPV 18 (30 cópias)	99,4 (161/162) (96,6, 99,9)	100 (162/162) (97,7, 100)
IVT de HPV 16 (30 cópias)	100 (162/162) (97,7, 100)	97,5 (158/162) (93,8, 99,0)
Células HeLa (2,5 células)	100 (162/162) (97,7, 100)	95,6 (152/159) (91,2, 97,9)
Células SiHa (1 célula)*	77,2 (125/162) (70,1, 83,0)	79,0 (128/162) (72,1, 84,6)

IVT = transcrito *in vitro*. IVT foi aditivado em STM e as células foram aditivadas em solução PreservCyt.

\*A % esperada de concordância positiva foi de ~95%; foi observada mais baixa possivelmente devido à variabilidade de fabrico do membro do painel.

**Tabela 32b:** Reprodutibilidade do Aptima HPV Assay no Estudo 1 e 2: Descrição do painel, Concordância negativa e Percentil de distribuição dos valores de S/CO do analito para os membros do painel com resultados negativos esperados

Descrição do painel (cópias ou células/reacção)	Estudo 1 (3 locais de teste)	Estudo 2 (1 local de teste)
	% de concordância negativa (CI de 95%)	% de concordância negativa (CI de 95%)
IVT de HPV 18 (1 cópia)*	78,8 (126/160) (71,8, 84,4)	83,3 (135/162) (76,8, 88,3)
IVT de HPV 16 (1 cópia)*	80,9 (131/162) (74,1, 86,2)	88,3 (143/162) (82,4, 92,4)
Células HeLa (0,05 células)*	79,0 (128/162) (72,1, 84,6)	82,1 (133/162) (75,5, 87,2)
Células SiHa (0,03 células)*	93,8 (152/162) (89,0, 96,6)	95,7 (155/162) (91,4, 97,9)
STM Lote 1	100 (162/162) (97,7, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
STM Lote 2	99,4 (160/161) (96,6, 99,9)	100 (162/162) (97,7, 100)
STM Lote 3	99,4 (161/162) (96,6, 99,9)	99,4 (161/162) (96,6, 99,9)
Grupo 1 de ThinPrep	97,5 (158/162) (93,8, 99,0)	97,5 (158/162) (93,8, 99,0)
Grupo 2 de ThinPrep	96,9 (157/162) (93,0, 98,7)	96,3 (156/162) (92,2, 98,3)
Grupo 3 de ThinPrep	100 (162/162) (97,7, 100)	99,4 (161/162) (96,6, 99,9)

STM = meio de transporte de espécimes; IVT = transcrito *in vitro*. IVT foi aditivado em STM e as células foram aditivadas em solução PreservCyt.

\* % de concordância negativa esperada > 75% e < 100%.

**Tabela 33:** Reprodutibilidade do Aptima HPV Assay no Estudo 1: Variabilidade do sinal para os membros do painel com resultados positivos esperados

Descrição do painel (cópias ou células/reacção)	n	S/CO Média	Entre locais		Entre operadores		Entre lotes		Entre listas de trabalho		Nas próprias listas de trabalho		Total	
			DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)
IVT de HPV 16 e HPV 18 (100 cópias)	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
Células SiHa (3 células) e células HeLa (7,5 células)	162	17,9	0	0	1,4	8,1	0	0	0,6	3,1	5,1	28,6	5,3	29,9
IVT de HPV 18 (100 cópias)	162	11,8	0	0	0	0	0,8	6,4	0,1	0,9	1,2	10,1	1,4	12,0
IVT de HPV 16 (100 cópias)	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
Células MS751 (1 célula)	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
Células ME180 (0,3 células)	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 de HPV 18 (30 cópias)	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 de HPV 16 (30 cópias)	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
Células HeLa (2,5 células)	162	12,4	0	0	0,4	3,3	0,4	3,1	0	0	2,3	18,4	2,4	19,0
Células SiHa (1 célula)	162	7,5	0,3	3,7	1,0	13,0	0	0	0	0	4,8	63,6	4,9	65,0

DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; IVT = transcrito *in vitro*; S/CO = relação de sinal para cutoff

<sup>^</sup>Uma amostra apresentou um resultado do Aptima HPV Assay inválido e não foi incluída na análise.

**Nota:** A variabilidade de alguns factores pode ser numericamente negativa. Tal pode ocorrer se a variabilidade provocada por esses factores for muito diminuta. Nestes casos, DP e CV são apresentados a 0.

**Tabela 34:** Reprodutibilidade do Aptima HPV Assay no Estudo 2: Variabilidade do sinal para os membros do painel com resultados positivos esperados

Descrição do painel (cópias ou células/reacção)	n	S/CO Média	Entre instrumento s		Entre operadores		Entre lotes		Entre listas de trabalho		Nas próprias listas de trabalho		Total	
			DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)
IVT de HPV 16 e HPV 18 (100 cópias)	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
Células SiHa (3 células) e células HeLa (7,5 células)	162	18,6	0	0	1,7	9,3	0	0	3,5	18,6	3,7	20,0	5,4	28,9
IVT de HPV 18 (100 cópias)	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 de HPV 16 (100 cópias)	162	10,8	0	0	0,1	1,3	0	0	0,2	2,2	0,7	6,1	0,7	6,6
Células MS751 (1 célula)	162	13,6	0	0	0,6	4,3	0	0	2,5	18,4	2,1	15,2	3,3	24,2
Células ME180 (0,3 células)	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 de HPV 18 (30 cópias)	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 de HPV 16 (30 cópias)	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
Células HeLa (2,5 células)	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
Células SiHa (1 célula)	162	7,4	0,9	12,5	0	0	0,7	9,3	1,8	24	4,2	56,8	4,7	63,8

DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; IVT = transcrito *in vitro*; S/CO = relação de sinal para cutoff

<sup>^</sup>Cinco amostras apresentaram resultados do Aptima HPV Assay inválidos (2 para IVT de HPV 18 (100 cópias), 3 para células HeLa (2,5 células)) e não foram incluídas na análise.

**Nota:** A variabilidade de alguns factores pode ser numericamente negativa. Tal pode ocorrer se a variabilidade provocada por esses factores for muito diminuta. Nestes casos, DP e CV são apresentados a 0.

Foi realizado um terceiro estudo para determinar a reprodutibilidade do ensaio testando um painel de 6 membros de espécimes clínicos de citologia líquida ThinPrep agrupados. Foram preparados seis grupos únicos de espécimes residuais de citologia líquida ThinPrep de HPV negativo como matriz, dois dos quais foram testados como membros do painel de HPV negativo. Foram utilizados quatro grupos únicos de espécimes de citologia líquida ThinPrep de HPV positivo para preparar os membros do painel de HPV positivo baixos (n=2) e altos (n=2). Os membros do painel positivo baixos apresentavam concentrações no limite de detecção do ensaio (positividade esperada:  $\geq 95\%$  determinada para cada grupo de HPV positivo individual a partir do teste de diluições de série dos grupos). Os membros do painel positivo alto apresentavam concentrações a 1-2 logaritmos acima do limite de detecção estimado para cada grupo positivo de HPV individual (positividade esperada: 100% de positividade). Cada membro do painel foi transferido (1 ml) para um tubo de Transferência de Espécimes Aptima contendo STM no dia do teste. O teste foi realizado nas instalações por 2 operadores utilizando 1 lote de reagentes, 3 instrumentos durante 6 dias (3 dias para cada operador), testando 2 execuções por dia nas quais o painel foi testado em duplicado.

Os membros do painel são descritos na Tabela 35, juntamente com um resumo da concordância com os resultados esperados e os valores do S/CO do analito ao 2,5°, 50° e 97,5° percentis do sinal de distribuição. A variabilidade do S/CO do analito para os membros do painel com resultados positivos esperados é apresentada na Tabela 36.



A concordância foi de 100% para os membros do painel de HPV positivo alto,  $\geq 98,6\%$  para os membros do painel de HPV positivo baixo e  $\geq 94,4\%$  para os membros do painel de HPV negativo.

**Tabela 35:** Reprodutibilidade do Aptima HPV Assay no Estudo 3: Descrição do painel, concordância percentual

Descrição do painel	% de concordância (CI de 95%)
Positivo baixo 1	98,6 (71/72) (92,5, 99,8)
Positivo baixo 2	100 (72/72) (94,9, 100)
Positivo alto 1	100 (72/72) (94,9, 100)
Positivo alto 2	100 (72/72) (94,9, 100)
Negativa 1	98,6 (71/72) (92,5, 99,8)
Negativa 2	94,4 (68/72) (86,6, 97,8)

**Tabela 36:** Reprodutibilidade do Aptima HPV Assay no Estudo 3: Análise do sinal para os membros do painel com resultados positivos esperados

Descrição do painel	n	S/CO Média	Entre instrumentos		Entre operadores		Entre lotes		Entre listas de trabalho		Nas próprias listas de trabalho		Total	
			DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)
Positivo baixo 1	72	9,8	0	0	0	0	0	0	2,2	22,8	3,0	30,4	3,7	38,0
Positivo baixo 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
Positivo alto 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
Positivo alto 2	72	23,9	0	0	0	0	0	0	2,9	12,3	3,0	12,4	4,2	17,4

DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; S/CO = relação de sinal para cutoff

**Nota:** A variabilidade de alguns factores pode ser numericamente negativa. Tal pode ocorrer se a variabilidade provocada por esses factores for muito diminuta. Nestes casos, DP e CV são apresentados a 0.

## Reactividade cruzada

A especificidade analítica do Aptima HPV Assay foi avaliada com meio de solução PreservCyt diluído de 1:2,9 em STM e aditivado com bactérias, leveduras ou fungos cultivados; vírus cultivados; ou transcritos de HPV de baixo risco *in vitro*. Os organismos e as concentrações de teste são identificados na Tabela 37. Os critérios do estudo para a avaliação do efeito da presença de microrganismos na especificidade do ensaio basearam-se na positividade. Foi observada reactividade cruzada com genótipos de HPV 26, 67, 70 e 82 de baixo risco, mas não com qualquer um dos outros organismos testados.

**Tabela 37:** Painel de especificidade analítica: Organismos e concentração sem reactividade cruzada

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

**Tabela 37:** Painel de especificidade analítica: Organismos e concentração sem reactividade cruzada (continuação)

Organismo	Concentração de teste sem reactividade cruzada	Organismo	Concentração de teste sem reactividade cruzada
<b>Leveduras/protozoários</b>			
<i>Candida albicans</i>	1x10 <sup>6</sup> CFU/ml	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1x10 <sup>7</sup> células/ml
<b>Vírus</b>			
Adenovirus 2	1x10 <sup>7</sup> vp/ml	Vírus Herpes simplex 1	2,5x10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml
Citomegalovírus	5,6x10 <sup>2</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Vírus Herpes simplex 2	5x10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> /ml
Vírus Epstein-Barr	4,3x10 <sup>6</sup> vp/ml	SV40	1,2 x10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> /ml
HIV-1	1,0x10 <sup>6</sup> cópias/ml		
<b>Genótipos de HPV não visados</b>			
HPV 6	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml	HPV 61	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml
HPV 11	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml	<b>HPV 67</b>	1 cópia/ml
<b>HPV 26</b>	2,5 cópias/ml	HPV 69	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml
HPV 30	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml	<b>HPV 70</b>	1 cópia/ml
HPV 34	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml	HPV 71	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml
HPV 42	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml	HPV 73	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml
HPV 43	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml	HPV 81	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml
HPV 44	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml	<b>HPV 82</b>	1 cópia/ml
HPV 53	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml	HPV 85	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml
HPV 54	2,5x10 <sup>6</sup> cópias/ml		

vp = partículas virais (viral particles)      CFU = unidades formadoras de colónias (colony forming units)  
 TCID<sub>50</sub> = dose infecciosa de culturas de tecidos 50

**Nota:** A negrito encontram-se os tipos em que foi observada reactividade cruzada (> 5% positividade) a concentrações superiores às indicadas na tabela.

A sensibilidade analítica do Aptima HPV Assay na presença de microrganismos foi avaliada com o mesmo painel descrito na Tabela 37, o qual foi também aditivado com uma baixa concentração de células SiHa infectadas com HPV (1 célula por reacção). Os critérios do estudo para a avaliação do efeito da presença de microrganismos na sensibilidade do ensaio basearam-se na positividade. A sensibilidade do Aptima HPV Assay não foi afectada por nenhum dos organismos testados.

## Interferência

As substâncias descritas na Tabela 38 foram aditivadas individualmente numa solução PreservCyt a 1% e 10% v/v ou p/v, diluídas com STM e, posteriormente, testadas com o Aptima HPV Assay. Todas as substâncias foram testadas na presença e na ausência de células cultivadas infectadas pelo HPV (SiHa, 3 células/reacção). Foi observada interferência com dois dos sete lubrificantes que continham Poliquatérnio 15 e um dos cinco medicamentos antifúngicos que continham tioconazol. Não foi observada interferência com qualquer outras das substâncias testadas.

**Tabela 38:** Substâncias testadas quanto a possível interferência com o Aptima HPV Assay

<b>Categoria do produto</b>	<b>Marca ou tipo de produto</b>	<b>Concentração mais alta* testada que não interferiu com o desempenho do ensaio</b>
<b>Lubrificante</b>	KY Sensual Mist	10% v/v
	KY Warming Jelly	10% p/v
	KY Warming Liquid	10% v/v
	Lubrificante pessoal, marca CVS	10% p/v
	Loção aquecedora para massagem e lubrificante pessoal, Target Brand	10% v/v
	Astroglide Personal Lubricant	0,3% p/v (0,075% p/v da amostra testada)
	Target Brand Lubricating Liquid	0,1% v/v (0,025% v/v da amostra testada)
<b>Espemicida</b>	Gynol II Vaginal Contraceptive Original Formula	10% p/v
	Gynol II Vaginal Contraceptive Extra Strength	10% p/v
	Delfen Vaginal Contraceptive Foam	10% p/v
	Encare Vaginal Contraceptive	10% p/v
	Conceptrol Vaginal Contraceptive	10% p/v
<b>Medicação Antifúngica/ Anticomichão</b>	Vagisil Maximum Strength	10% p/v
	Monistat Soothing Care	10% p/v
	Monistat 3 Combination Pack	10% p/v
	Target Brand Tioconazole 1	0,3% p/v (0,075% p/v da amostra testada)
	Target Brand Miconazole 3	10% p/v
<b>Ácido Acético Glacial</b>	EMD M/N AX0073-11	10% v/v
<b>Sangue Total</b>	sangue total	10% v/v

\*Lubrificantes pessoais que contêm Poliquatérnio 15.

## Resultados previstos do Panther System: Prevalência de mRNA do HPV de alto risco

A prevalência de infecção com HPV de alto risco varia amplamente e é influenciada por diversos factores, sendo a idade o factor com maior preponderância.<sup>32,33</sup> Há muitos estudos que investigaram a prevalência do HPV determinada pela detecção de DNA do HPV; contudo, poucos estudos indicaram a prevalência com base na detecção de mRNA do HPV oncogénico. Inscreveram-se num estudo clínico prospectivo conhecido como ensaio CLEAR mulheres de várias clínicas (n=18), representando uma ampla distribuição geográfica e uma população diversificada (10 estados dos Estados Unidos da América).<sup>34</sup> Conforme determinada pelo Aptima HPV Assay no Panther System, a prevalência de amostras positivas para mRNA do HPV observada no ensaio clínico foi categorizada, em geral, de acordo com o grupo etário e o local do teste. Os resultados são apresentados na Tabela 39 para as populações de células escamosas atípicas de significado indeterminado (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, ASC-US) e negativo para lesão intraepitelial ou malignidade (Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy, NILM).

**Tabela 39:** Prevalência de mRNA do HPV de alto risco por grupo etário, local de teste e tudo em conjunto

	Taxa de Positividade % (x/n)	
	População ASC-US (≥ 21 anos)	População NILM (≥ 30 anos)
<b>Tudo</b>	42,3 (404/956)	4,7 (512/10 860)
<b>Grupo etário (anos)</b>		
<b>21 a 29</b>	60,0 (251/418)	N/A
<b>30 a 39</b>	38,1 (101/265)	6,8 (286/4192)
<b>≥ 40</b>	19,0 (52/273)	3,4 (226/6668)
<b>Local de teste</b>		
<b>1</b>	41,5 (134/323)	3,7 (304/8286)
<b>2</b>	43,1 (137/318)	9,2 (118/1285)
<b>3</b>	42,2 (133/315)	7,0 (90/1289)

N/A = não aplicável

## Desenho do estudo clínico do Aptima HPV Assay com espécimes de citologia líquida ThinPrep

O Aptima HPV assay no Sistema Panther foi avaliado utilizando espécimes residuais de citologia de encaminhamento colhidos de mulheres que deram o seu consentimento durante o estudo clínico prospectivo e multicêntrico nos EUA conhecido como o ensaio CLEAR.<sup>34</sup>

### Ensaio CLEAR – Avaliação na Linha de Referência

O ensaio CLEAR, para determinar o desempenho clínico do Aptima HPV Assay no Sistema Tigris DTS na detecção de neoplasia intraepitelial cervical de grau 2 ou doença cervical mais grave ( $\geq$ CIN2). O Ensaio CLEAR incluiu uma avaliação na linha de referência e uma avaliação de acompanhamento de 3 anos. As mulheres foram inscritas tanto no Estudo ASC-US como no Estudo NILM com base nos respectivos resultados de citologia provenientes de rastreios de rotina ao cancro do colo do útero. A população do Estudo ASC-US incluiu mulheres com 21 anos e idade superior com resultados citológicos de ASC-US e a população do Estudo NILM incluiu mulheres com 30 anos e idade superior com resultados citológicos de NILM. O Estudo NILM foi concebido para apoiar a reivindicação de rastreio auxiliar para mulheres com idade igual ou superior a 30 anos, dado que as mulheres nesta faixa etária com resultados citológicos mais altos do que ASC-US devem seguir para colposcopia, independentemente do seu estado de HPV.<sup>35</sup>

Foram inscritas mulheres provenientes de 18 clínicas, sobretudo clínicas de obstetrícia/ginecologia, que abrangeram uma ampla distribuição geográfica e uma população diversificada. As mulheres elegíveis foram designadas para o Estudo ASC-US ou o Estudo NILM com base no espécime de citologia de base líquida ThinPrep encaminhado. Na linha de referência, os espécimes residuais encaminhados de mulheres no Estudo ASC-US e no Estudo NILM foram inicialmente testados com o Aptima HPV Assay no Tigris DTS System e com um teste de DNA do HPV disponível no mercado. Os espécimes foram então arquivados e conservados a -70 °C até serem testados com o Aptima HPV Assay no Panther System.

Na linha de referência do ensaio CLEAR (Fase de Linha de Referência), todas as mulheres no Estudo ASC-US foram encaminhadas para colposcopia, independentemente dos seus resultados do teste de HPV. Foi obtida uma curetagem endocervical (ECC), biopsia e biopsias cervicais por punção (1 biopsia de cada um dos 4 quadrantes). Caso fosse visível uma lesão, era obtida uma biopsia por punção (método direccionado; 1 biopsia por lesão) e quadrantes sem uma lesão visível foram submetidos a biopsia na junção escamo-colunar (método aleatório).

No Estudo NILM, as mulheres positivas com o Aptima HPV Assay no Tigris DTS System e/ou com o teste de DNA do HPV disponível no mercado, bem como as mulheres seleccionadas aleatoriamente que tinham sido negativas com os dois ensaios, foram encaminhadas para colposcopia para a avaliação da linha de referência. As mulheres seleccionadas aleatoriamente que tinham sido negativas com os dois ensaios foram incluídas para correcção relativa ao desvio de verificação com estimativas de desempenho ajustadas, geradas recorrendo a um método de imputação múltipla. Foi obtida uma biopsia ECC de cada uma das mulheres que realizaram colposcopia. As biopsias por punção foram obtidas apenas de lesões visíveis (método direccionado; 1 biopsia por lesão).

O estado da doença foi determinado por um Consenso do Painel de Revisão de Histologia, que foi baseado na concordância de, pelo menos, 2 patologistas especialistas. Os estados de HPV das mulheres não foram apresentados aos patologistas especialistas. O estado de citologia também não foi apresentado, nem os diagnósticos de histologia de cada um. Se os

3 patologistas discordassem, os 3 analisariam as lâminas num microscópio com várias cabeças para chegar a um consenso. Os resultados do teste do HPV não foram apresentados aos investigadores, médicos e mulheres até depois da conclusão da consulta de colposcopia, com o intuito de evitar desvio.

Na linha de referência, o desempenho clínico do Aptima HPV Assay em relação à detecção de  $\geq$ CIN2 e neoplasia intraepitelial cervical de grau 3 ou doença cervical mais grave ( $\geq$ CIN3) foi determinado relativamente ao estado da doença cervical determinado na linha de referência. O desempenho clínico do teste de DNA do HPV disponível no mercado também foi determinado para comparação directa com os resultados do Aptima HPV Assay.

## Ensaio CLEAR – Avaliação de Acompanhamento

As mulheres do Estudo NILM de 14 centros clínicos eram elegíveis para participar na Fase de Acompanhamento de 3 anos do estudo se: i) tivessem realizado uma consulta de colposcopia na linha de referência e não tivessem  $\geq$ CIN2, ou ii) não tivessem realizado uma consulta de colposcopia na linha de referência. A Fase de Acompanhamento do estudo foi constituída por consultas anuais. Nestas consultas, foi realizada amostragem cervical para citologia para cada mulher e algumas mulheres foram também testadas com um teste de HPV disponível no mercado. As mulheres com ASC-US ou resultados de citologia mais graves durante o período de acompanhamento foram encaminhadas para colposcopia utilizando os mesmos procedimentos de exame de biopsia e histológico realizados para a avaliação na linha de referência do estudo NILM. O estado da doença cervical na consulta de acompanhamento foi considerado "negativo" com base na citologia NILM ou, para mulheres com resultados anormais do teste de citologia, com base nos resultados normais ou nos resultados do Painel de Revisão de Histologia de Consenso CIN1. As mulheres que tiveram  $\geq$ CIN2 detectado durante o período de acompanhamento foram consideradas com tendo concluído o acompanhamento e não realizaram consultas depois de  $\geq$ CIN2 ter sido detectado. As mulheres a quem não foi detectado  $\geq$ CIN2 durante o período de acompanhamento mas que realizaram uma consulta do estudo no ano 1 do acompanhamento e/ou no ano 2 do acompanhamento e que realizaram uma consulta do estudo no ano 3 do acompanhamento foram consideradas com tendo concluído o acompanhamento.

O objectivo do estudo de acompanhamento consistiu em comparar o risco acumulado de 3 anos de doença cervical nas mulheres com resultados positivos no Aptima HPV assay na linha de referência com o risco acumulado de 3 anos de doença cervical em mulheres com resultados negativos no Aptima HPV assay na linha de referência. O estado da doença cervical de 3 anos foi determinado da seguinte forma:

- Estado positivo de doença cervical ( $\geq$ CIN2 e/ou  $\geq$ CIN3) – Mulheres a quem foi detectado  $\geq$ CIN2 na linha de referência ou durante o acompanhamento.
- Estado negativo de doença cervical ( $<$ CIN2) – Mulheres que concluíram o acompanhamento sem detecção de  $\geq$ CIN2 e que não foram consideradas como tendo estado "indeterminado" de doença cervical.
- Estado indeterminado de doença cervical – Mulheres que tiveram resultados anormais no teste de citologia durante o acompanhamento e que não tiveram um resultado do Painel de Revisão de Histologia de Consenso subsequente, ou mulheres com citologia inadequada na sua última consulta.
- Perdido para acompanhamento – Mulheres que não concluíram o acompanhamento e que não foram consideradas como tendo um estado "indeterminado" de doença cervical.

O desempenho clínico do Aptima HPV assay no Panther System para a detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 foi avaliado relativamente ao estado de doença cervical de 3 anos.

## Desempenho do ensaio no Panther System

### População ASC-US ≥ 21 anos: Desempenho clínico do Aptima HPV Assay

Na totalidade, 1252 mulheres com idade igual ou superior a 21 anos com resultados citológicos de ASC-US foram inscritas no Estudo ASC-US; destas, excluíram-se 294 mulheres. As restantes 958 mulheres foram consideradas elegíveis para testes no Panther System. Havia amostras em falta para duas mulheres e 19 tiveram um diagnóstico de doença indeterminada; foram todas excluídas da análise. As restantes 937 mulheres elegíveis para avaliação tinham idade igual ou superior a 21 anos e resultados citológicos de ASC-US, resultados do Aptima HPV Assay no Panther System e um estado de doença conclusivo. Noventa e uma (91) mulheres tinham ≥CIN2 e quarenta e uma (41) tinham ≥CIN3. A prevalência de ≥CIN2 e ≥CIN3 em mulheres elegíveis para avaliação com resultados citológicos de ASC-US foi de 9,7% e 4,4%, respectivamente. Os resultados do Aptima HPV Assay através do Consenso dos Diagnósticos do Painel de Revisão de Histologia são apresentados na Tabela 40.

**Tabela 40:** População ASC-US ≥ 21 anos: Resultados do Aptima HPV Assay através do consenso dos diagnósticos do painel de revisão de histologia

Resultado do Aptima HPV Assay*	Teste do DNA do HPV	Consenso do diagnóstico do painel de revisão de histologia						
		Indeterminado**	Normal	CIN1	CIN2	CIN3	Cancro	Total
Positiva	Positiva	6	178	110	40	32	1	367
Positiva	Negativa	0	5	2	0	2	0	9
Positiva	Sem resultado***	0	15	11	0	2	0	28
Negativa	Positiva	0	39	15	3	3	0	60
Negativa	Negativa	10	372	53	7	1	0	443
Negativa	Sem resultado***	3	39	7	0	0	0	49
<b>Total</b>		19	648	198	50	40	1****	956

\*Todas as amostras apresentaram resultados finais válidos (quando foi realizado o teste inicial ou após resolução de resultados iniciais inválidos por procedimento).

\*\*19 participantes compareceram na consulta de colposcopia; no entanto, não foi possível determinar um diagnóstico pelas seguintes razões: < 5 de espécimes de biopsia obtidos, todos com resultados de histologia normais/CIN1 (n=15), não foram colhidas biopsias (n=3) e lâminas da biopsia perdidas (n=1).

\*\*\*77 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não apresentaram resultados do teste de DNA do HPV devido, sobretudo, ao volume insuficiente do espécime citológico.

\*\*\*\*Uma mulher apresentava adenocarcinoma in situ (AIS).

As estimativas de desempenho clínico do Aptima HPV Assay, incluindo sensibilidade, especificidade, valor de prognóstico positivo (positive predictive value, PPV) e valor de prognóstico negativo (negative predictive value, NPV) para a detecção de ≥CIN2 e ≥CIN3, baseadas na avaliação de todas as biopsias e incluindo apenas biopsias direccionadas, são apresentadas na Tabela 41, bem como as estimativas para o teste de DNA do HPV



**Tabela 41:** População ASC-US ≥ 21 anos: Desempenho do Aptima HPV Assay e de um teste de DNA do HPV disponível no mercado para a detecção de ≥CIN2 e ≥CIN3

	Desempenho	Aptima HPV Assay N=937		Teste do DNA do HPV N=863*	
		Estimativa	(CI de 95%)	Estimativa	(CI de 95%)
≥CIN2	<b>Todas as biopsias</b>				
	Sensibilidade (%)	84,6 (77/91)	(75,8, 90,6)	88,8 (79/89)	(80,5, 93,8)
	Especificidade (%)	62,1 (525/846)	(58,7, 65,3)	55,8 (432/774)	(52,3, 59,3)
	PPV (%)	19,3 (77/398)	(17,3, 21,2)	18,8 (79/421)	(17,0, 20,4)
	NPV (%)	97,4 (525/539)	(96,0, 98,5)	97,7 (432/442)	(96,2, 98,8)
	Prevalência (%)	9,7 (91/937)		10,3 (89/863)	
	<b>Biopsias direccionadas**</b>				
	Sensibilidade (%)	90,0 (54/60)	(79,9, 95,3)	93,2 (55/59)	(83,8, 97,3)
	Especificidade (%)	60,8 (531/874)	(57,5, 63,9)	54,5 (437/802)	(51,0, 57,9)
	PPV (%)	13,6 (54/397)	(12,0, 15,0)	13,1 (55/420)	(11,7, 14,2)
	NPV (%)	98,9 (531/537)	(97,8, 99,6)	99,1 (437/441)	(97,9, 99,7)
	Prevalência (%)	6,4 (60/934)		6,9 (59/861)	
≥CIN3	<b>Todas as biopsias</b>				
	Sensibilidade (%)	90,2 (37/41)	(77,5, 96,1)	92,3 (36/39)	(79,7, 97,3)
	Especificidade (%)	59,7 (535/896)	(56,5, 62,9)	53,3 (439/824)	(49,9, 56,7)
	PPV (%)	9,3 (37/398)	(8,0, 10,3)	8,6 (36/421)	(7,4, 9,4)
	NPV (%)	99,3 (535/539)	(98,3, 99,8)	99,3 (439/442)	(98,3, 99,8)
	Prevalência (%)	4,4 (41/937)		4,5 (39/863)	
	<b>Biopsias direccionadas**</b>				
	Sensibilidade (%)	93,1 (27/29)	(78,0, 98,1)	96,4 (27/28)	(82,3, 99,4)
	Especificidade (%)	59,1 (535/906)	(55,8, 62,2)	52,8 (440/834)	(49,4, 56,1)
	PPV (%)	6,8 (27/398)	(5,7, 7,5)	6,4 (27/421)	(5,5, 7,0)
	NPV (%)	99,6 (535/537)	(98,8, 100)	99,8 (440/441)	(98,9, 100)
	Prevalência (%)	3,1 (29/935)		3,2 (28/862)	

\*74 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não apresentaram resultados do teste de DNA do HPV devido, sobretudo, ao volume insuficiente do espécime citológico.

\*\*O resultado do consenso de histologia foi obtido recorrendo apenas a resultados de biopsias direccionadas. As mulheres sem biopsias direccionadas reflectem uma colposcopia normal e são incluídas nestas análises como não sofrendo de doenças (<CIN2 ou <CIN3, conforme adequado). Nem sempre foi alcançado um consenso quando foram incluídas apenas biopsias direccionadas.

Quando foram avaliadas todas as biopsias, as estimativas de sensibilidade clínica do Aptima HPV Assay e do teste de DNA do HPV disponível no mercado para detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 foram semelhantes nos casos em que estavam disponíveis os resultados dos dois ensaios (as diferenças nas estimativas de sensibilidade não foram estatisticamente significativas). No caso de  $\geq$ CIN2, a diferença de sensibilidade foi de -4,5% (CI de 95%: -12,2%, 2,5%). As estimativas de especificidade clínica do Aptima HPV Assay para a detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 foram superiores às do teste de DNA do HPV disponível no mercado (as diferenças nas estimativas de especificidade foram estatisticamente significativas). No caso de  $\geq$ CIN2, a diferença de especificidade foi de 6,1% (CI de 95%: 4,2%, 8,2%). Os NPV foram semelhantes mas, para a detecção de  $\geq$ CIN2, o PPV para o Aptima HPV Assay foi ligeiramente superior ao PPV para o teste de DNA do HPV disponível no mercado (19,3% vs. 18,8%).

Dos 91 casos de  $\geq$ CIN2, 60 (65,9%) foram identificados em biopsias direccionadas e 31 (34,1%) foram identificados a partir de biopsias aleatórias e/ou ECC (ou seja, não em biopsias direccionadas). Estas conclusões são comparáveis a resultados de estudos publicados, nos quais aproximadamente 25% a 40% dos casos de  $\geq$ CIN2 foram identificados apenas a partir de espécimes de biopsias aleatórias e/ou ECC.<sup>36,37</sup> Utilizando apenas biopsias direccionadas para determinar o estado da doença (assumindo que as mulheres sem biopsias direccionadas apresentavam resultados histológicos normais, pois não se encontravam presentes lesões visíveis), a prevalência de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 no estudo foi de 6,4% e 3,1% respectivamente. As estimativas de sensibilidade clínica para a detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 foram superiores para os dois testes utilizando apenas biopsias direccionadas, em relação às estimativas calculadas utilizando todas as biopsias. Para os dois ensaios, a especificidade clínica utilizando apenas biopsias direccionadas foi semelhante à especificidade obtida com todas as biopsias incluídas. Em conformidade, quando foram utilizadas apenas biopsias direccionadas, a especificidade do Aptima HPV Assay foi significativamente superior à do teste de DNA do HPV disponível no mercado.

As estimativas de desempenho clínico do Aptima HPV Assay e do teste de DNA do HPV disponível no mercado são apresentadas por grupo etário na Tabela 42 e na Tabela 43 ( $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3, respectivamente, com base na avaliação de todas as biopsias).

**Tabela 42:** População ASC-US ≥ 21 anos: Desempenho do Aptima HPV Assay e de um teste de DNA do HPV para a detecção de ≥CIN2 por grupo etário

	Desempenho	Aptima HPV Assay N=937		Teste do DNA do HPV N=863*	
		Estimativa	(CI de 95%)	Estimativa	(CI de 95%)
<b>21 a 29 anos</b>		N=415		N=389	
	Sensibilidade (%)	88,5 (54/61)	(78,2, 94,3)	94,9 (56/59)	(86,1, 98,3)
	Especificidade (%)	44,9 (159/354)	(39,8, 50,1)	35,5 (117/330)	(30,5, 40,8)
	PPV (%)	21,7 (54/249)	(19,3, 23,9)	20,8 (56/269)	(19,0, 22,5)
	NPV (%)	95,8 (159/166)	(92,3, 98,1)	97,5 (117/120)	(93,6, 99,4)
	Prevalência (%)	14,7 (61/415)		15,2 (59/389)	
<b>30 a 39 anos</b>		N=261		N=238	
	Sensibilidade (%)	85,0 (17/20)	(64,0, 94,8)	80,0 (16/20)	(58,4, 91,9)
	Especificidade (%)	66,4 (160/241)	(60,2, 72,1)	61,9 (135/218)	(55,3, 68,1)
	PPV (%)	17,3 (17/98)	(13,1, 21,1)	16,2 (16/99)	(11,8, 19,8)
	NPV (%)	98,2 (160/163)	(95,7, 99,6)	97,1 (135/139)	(94,1, 99,1)
	Prevalência (%)	7,7 (20/261)		8,4 (20/238)	
<b>≥ 40 anos</b>		N=261		N=236	
	Sensibilidade (%)	60,0 (6/10)	(31,3, 83,2)	70,0 (7/10)	(39,7, 89,2)
	Especificidade (%)	82,1 (206/251)	(76,9, 86,3)	79,6 (180/226)	(73,9, 84,4)
	PPV (%)	11,8 (6/51)	(5,6, 17,7)	13,2 (7/53)	(6,9, 18,7)
	NPV (%)	98,1 (206/210)	(96,6, 99,4)	98,4 (180/183)	(96,6, 99,6)
	Prevalência (%)	3,8 (10/261)		4,2 (10/236)	

\*74 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não apresentaram resultados do teste de DNA do HPV devido, sobretudo, ao volume insuficiente do espécime citológico.

**Tabela 43:** População ASC-US ≥ 21 anos: Desempenho do Aptima HPV Assay e de um teste de DNA do HPV para a detecção de ≥CIN3 por grupo etário

	Desempenho	Aptima HPV Assay N=937		Teste do DNA do HPV N=863*	
		Estimativa	(CI de 95%)	Estimativa	(CI de 95%)
21 a 29 anos		N=415		N=389	
	Sensibilidade (%)	96,3 (26/27)	(81,7, 99,3)	100 (25/25)	(86,7, 100)
	Especificidade (%)	42,5 (165/388)	(37,7, 47,5)	33,0 (120/364)	(28,3, 38,0)
	PPV (%)	10,4 (26/249)	(9,0, 11,5)	9,3 (25/269)	(8,2, 10,0)
	NPV (%)	99,4 (165/166)	(97,2, 100)	100 (120/120)	(97,5, 100)
	Prevalência (%)	6,5 (27/415)		6,4 (25/389)	
30 a 39 anos		N=261		N=238	
	Sensibilidade (%)	88,9 (8/9)	(56,5, 98,0)	77,8 (7/9)	(45,3, 93,7)
	Especificidade (%)	64,3 (162/252)	(58,2, 69,9)	59,8 (137/229)	(53,4, 66,0)
	PPV (%)	8,2 (8/98)	(5,0, 10,1)	7,1 (7/99)	(4,0, 9,2)
	NPV (%)	99,4 (162/163)	(97,6, 100)	98,6 (137/139)	(96,4, 99,8)
	Prevalência (%)	3,4 (9/261)		3,8 (9/238)	
≥ 40 anos		N=261		N=236	
	Sensibilidade (%)	60,0 (3/5)	(23,1, 88,2)	80,0 (4/5)	(37,6, 96,4)
	Especificidade (%)	81,3 (208/256)	(76,0, 85,6)	78,8 (182/231)	(73,1, 83,6)
	PPV (%)	5,9 (3/51)	(1,6, 9,7)	7,5 (4/53)	(2,9, 10,7)
	NPV (%)	99,0 (208/210)	(98,0, 99,9)	99,5 (182/183)	(98,2, 100)
	Prevalência (%)	1,9 (5/261)		2,1 (5/236)	

\*74 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não apresentaram resultados do teste de DNA do HPV devido, sobretudo, ao volume insuficiente do espécime citológico.

O risco absoluto de doença ( $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3, com base na avaliação de todas as biopsias), conforme o resultado do Aptima HPV Assay, e o risco relativo de doença para resultados do Aptima HPV Assay positivos versus negativos são apresentados na Tabela 44, bem como as estimativas para o teste de DNA do HPV disponível no mercado. O risco relativo de  $\geq$ CIN2 foi de 7,4 (CI de 95%: 4,3, 13,0), indicando que uma mulher que tinha tido um resultado positivo com o Aptima HPV Assay tinha 7,4 vezes mais probabilidade de ter  $\geq$ CIN2 do que uma mulher que tinha tido um resultado negativo com o Aptima HPV Assay. O risco relativo de  $\geq$ CIN3 foi de 12,5 (CI de 95%: 4,5, 34,9).

**Tabela 44:** População ASC-US  $\geq$  21 anos: Riscos absolutos e relativos de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 para os resultados do Aptima HPV Assay e de um teste de DNA do HPV

	Resultado do ensaio	Aptima HPV Assay N=937		Teste de DNA do HPV N=863*	
		Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)	Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)
$\geq$ CIN2	Positiva	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)
	Negativa	2,6 (14/539) (1,5, 4,0)		2,3 (10/442) (1,2, 3,8)	
	Prevalência (%)	9,7 (91/937)		10,3 (89/863)	
$\geq$ CIN3	Positiva	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)
	Negativa	0,7 (4/539) (0,2, 1,7)		0,7 (3/442) (0,2, 1,7)	
	Prevalência (%)	4,4 (41/937)		4,5 (39/863)	

\*74 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não apresentaram resultados do teste de DNA do HPV devido, sobretudo, ao volume insuficiente do espécime citológico.

As estimativas de risco absoluto e relativo de doença ( $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3, com base na avaliação de todas as biopsias) para o Aptima HPV Assay e o teste de DNA do HPV disponível no mercado são apresentadas por grupo etário na Tabela 45.

**Tabela 45:** População ASC-US  $\geq$  21 anos: Riscos absolutos e relativos de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 para os resultados do Aptima HPV Assay e de um teste de DNA do HPV por grupo etário

	Idade	Resultado do ensaio	Aptima HPV Assay N=937		Teste do DNA do HPV N=863*	
			Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)	Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)
$\geq$ CIN2	21 a 29 anos		N=415		N=389	
		Positiva	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)
		Negativa	4,2 (7/166) (1,9, 7,7)		2,5 (3/120) (0,6, 6,4)	
		Prevalência (%)	9,7 (61/415)		15,2 (59/389)	
	30 a 39 anos		N=261		N=238	
		Positiva	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)
		Negativa	1,8 (3/163) (0,4, 4,3)		2,9 (4/139) (0,9, 5,9)	
		Prevalência (%)	7,7 (20/261)		8,4 (20/238)	
	$\geq$ 40 anos		N=261		N=236	
		Positiva	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)
		Negativa	1,9 (4/210) (0,6, 3,4)		1,6 (3/183) (0,4, 3,4)	
		Prevalência (%)	3,8 (10/261)		4,2 (10/236)	
$\geq$ CIN3	21 a 29 anos		N=415		N=389	
		Positiva	10,4 (26/249) (9,0, 11,5)	17,3 (2,4, 127)	9,3 (25/269) (8,2, 10,0)	Não calculável
		Negativa	0,6 (1/166) (0,0, 2,8)		0,0 (0/120) (0,0, 2,5)	
		Prevalência (%)	6,5 (27/415)		6,4 (25/389)	
	30 a 39 anos		N=261		N=238	
		Positiva	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)
		Negativa	0,6 (1/163) (0,0, 2,4)		1,4 (2/139) (0,2, 3,6)	
		Prevalência (%)	3,4 (9/261)		3,8 (9/238)	
	$\geq$ 40 anos		N=261		N=236	
		Positiva	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)
		Negativa	1,0 (2/210) (0,1, 2,0)		0,5 (1/183) (0,0, 1,8)	
		Prevalência (%)	1,9 (5/261)		2,1 (5/236)	

\*74 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não apresentaram resultados do teste de DNA do HPV devido, sobretudo, ao volume insuficiente do espécime citológico.

### População NILM ≥ 30 anos: Desempenho clínico do Aptima HPV Assay com Espécimes de Citologia Líquida ThinPrep na Linha de Referência

Na totalidade, foram inscritas 11 644 mulheres com resultados citológicos de NILM no Estudo NILM; destas, 773 mulheres foram excluídas. As restantes 10 871 mulheres foram consideradas elegíveis para testes no Panther System. Havia amostras em falta para onze mulheres, tendo sido excluídas da avaliação na linha de referência do Aptima HPV assay no Panther System. As restantes 10 860 mulheres elegíveis para avaliação tinham idade igual ou superior a 30 anos com resultados citológicos de NILM e resultados do Aptima HPV Assay no Panther System. Das 512 mulheres com resultados positivos do Aptima HPV Assay no Panther System, 284 compareceram na colposcopia na linha de referência. Das 10 348 mulheres com resultados negativos do Aptima HPV Assay, 580 compareceram na colposcopia na linha de referência. Vinte (20) mulheres tinham ≥CIN2 e onze (11) tinham ≥CIN3; 798 mulheres tinham histologia normal/CIN1; 46 mulheres apresentavam um estado de doença indeterminado. Os resultados do Aptima HPV Assay no Panther System através do Consenso dos diagnósticos do Painel de Revisão de Histologia são apresentados na Tabela 46.

**Tabela 46:** População NILM ≥ 30 anos: Resultados do Aptima HPV Assay e de um teste de DNA do HPV através do consenso dos diagnósticos do painel de revisão de histologia na linha de referência

Resultado do Aptima HPV Assay*	Teste do DNA do HPV	Consenso do diagnóstico do painel de revisão de histologia						
		Indeterminado**	Normal	CIN1	CIN2	CIN3	Cancro	Total
Positiva	Positiva	11	211	12	4	7	2	247
Positiva	Negativa	2	19	0	0	0	1	22
Positiva	Sem resultado***	2	12	1	0	0	0	15
Negativa	Positiva	10	170	7	2	1	0	190
Negativa	Negativa	20	353	9	2	0	0	384
Negativa	Sem resultado***	1	4	0	1	0	0	6
<b>Total</b>		46	769	29	9	8	3****	864

\*Todas as amostras apresentaram resultados finais válidos (quando foi realizado o teste inicial ou após resolução de resultados iniciais inválidos por procedimento).

\*\*46 participantes compareceram na consulta de colposcopia; no entanto, não foi possível determinar um diagnóstico pelas seguintes razões: espécimes de biopsia avaliados como inadequados (n=29), não foram colhidas biopsias (n=15) e lâminas da biopsia perdidas (n=2).

\*\*\*21 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não apresentaram resultados do teste de DNA do HPV devido, sobretudo, ao volume insuficiente do espécime citológico.

\*\*\*\*Três mulheres apresentavam adenocarcinoma in situ (AIS).

Na totalidade, 10 042 mulheres apresentavam um estado de doença não verificado na linha de referência, incluindo indeterminado (Tabela 47). Dado que apenas mulheres seleccionadas aleatoriamente com resultados negativos do Aptima HPV Assay no Tigris DTS System e do teste de DNA do HPV disponível no mercado foram encaminhadas para colposcopia, a proporção de mulheres com um estado de doença não verificado foi elevada neste grupo (96,6%). Para ajustar este desvio de verificação, foi utilizado um método de imputação múltipla para efectuar a estimativa do número de mulheres com doença que teriam sido identificadas caso todas as mulheres tivessem sido submetidas a colposcopia. São apresentadas tanto as estimativas de desempenho ajustadas em relação ao desvio de verificação, como as estimativas de desempenho não ajustadas com base nas 818 mulheres com estado de doença verificado na linha de referência.

**Tabela 47:** População NILM  $\geq$  30 anos: Classificação de mulheres NILM elegíveis para avaliação através dos resultados do Aptima HPV Assay de um teste de DNA do HPV, estado da doença ( $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3) e estado de verificação da doença

Resultado do Aptima HPV Assay*		Teste do DNA do HPV	Total de mulheres	Estado de doença verificada: $\geq$ CIN2		Estado de doença verificada: $\geq$ CIN3		Estado de doença não verificada
Panther System	Tigris DTS System			Mulheres doentes ( $\geq$ CIN2)	Mulheres não doentes (<CIN2)	Mulheres doentes ( $\geq$ CIN3)	Mulheres não doentes (<CIN3)	Mulheres com estado de doença desconhecido (% desconhecida)
Positiva	Positiva	Positiva	313	13	189	9	193	111 (35,5%)
Positiva	Positiva	Negativa	37	1	18	1	18	18 (48,6%)
Positiva	Positiva	Sem resultado**	22	0	13	0	13	9 (40,9%)
Positiva	Negativa	Positiva	70	0	34	0	34	36 (51,4%)
Positiva	Negativa	Negativa	60	0	1	0	1	59 (98,3%)
Positiva	Negativa	Sem resultado**	10	0	0	0	0	10 (100%)
Negativa	Positiva	Positiva	46	0	33	0	33	13 (28,3%)
Negativa	Positiva	Negativa	113	1	41	0	42	71 (62,8%)
Negativa	Positiva	Sem resultado**	8	0	4	0	4	4 (50,0%)
Negativa	Negativa	Positiva	236	3	144	1	146	89 (37,7%)
Negativa	Negativa	Negativa	9354	1	321	0	322	9 032 (96,6%)
Negativa	Negativa	Sem resultado**	591	1	0	0	1	590 (99,8%)
<b>Total</b>			10 860	20	798	11	807	10 042 (92,5%)

\*Todas as amostras apresentaram resultados finais (quando foi realizado o teste inicial ou após resolução de resultados iniciais inválidos de acordo com o procedimento).

\*\*631 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não apresentaram resultados do teste de DNA do HPV devido, sobretudo, ao volume insuficiente do espécime citológico.



A prevalência ajustada de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 em mulheres com resultados citológicos de NILM foi de 0,9% e 0,4%, respectivamente. As estimativas ajustadas de risco absoluto e relativo para a detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 na linha de referência são apresentadas na Tabela 48. O risco relativo ajustado de  $\geq$ CIN2 foi de 7,5 (CI de 95%: 2,1, 26,3), indicando que uma mulher que tinha tido um resultado positivo com o Aptima HPV Assay tinha 7,5 vezes mais probabilidade de ter  $\geq$ CIN2 do que uma mulher que tinha tido um resultado negativo com o Aptima HPV Assay. O risco relativo ajustado de  $\geq$ CIN3 foi de 24,9 (CI de 95%: 2,0, 307,0). As estimativas não ajustadas de risco absoluto e relativo para a detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 na linha de referência são apresentadas em geral na Tabela 49 e por grupo etário na Tabela 50.

**Tabela 48:** População NILM  $\geq$  30 anos: Riscos absolutos e relativos de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 para os resultados do Aptima HPV Assay e de um teste de DNA do HPV (estimativas ajustadas em relação ao desvio de verificação) na linha de referência

	Resultado do ensaio	Aptima HPV Assay		Teste do DNA do HPV	
		Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)	Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)
$\geq$ CIN2	Positiva	4,5 (2,7, 7,4)	7,5 (2,1, 26,3)	3,7 (2,3, 6,1)	7,3 (1,6, 33,5)
	Negativa	0,6 (0,2, 1,9)		0,5 (0,1, 2,1)	
	Prevalência (%)	0,9		0,9	
$\geq$ CIN3	Positiva	3,0 (1,6, 5,5)	24,9 (2,0, 307,0)	2,3 (1,3, 4,1)	21,0 (1,0, 423,8)
	Negativa	0,1 (0,0, 1,7)		0,1 (0,0, 2,4)	
	Prevalência (%)	0,4		0,4	

**Tabela 49:** População NILM  $\geq$  30 anos: Riscos absolutos e relativos de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 para os resultados do Aptima HPV Assay e de um teste de DNA do HPV (estimativas não ajustadas) na linha de referência

	Resultado do ensaio	Aptima HPV Assay N=818		Teste do DNA do HPV N=800*	
		Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)	Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)
$\geq$ CIN2	Positiva	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)
	Negativa	1,1 (6/549) (0,5, 1,9)		0,8 (3/384) (0,2, 1,9)	
	Prevalência (%)	2,4 (20/818)		2,4 (19/800)	
$\geq$ CIN3	Positiva	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)
	Negativa	0,2 (1/549) (0,0, 0,8)		0,3 (1/384) (0,0, 1,1)	
	Prevalência (%)	1,3 (11/818)		1,4 (11/800)	

\*18 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não apresentaram resultados do teste de DNA do HPV devido, sobretudo, ao volume insuficiente do espécime citológico.

**Tabela 50:** População NILM ≥ 30 anos: Riscos absolutos e relativos de ≥CIN2 e ≥CIN3 para os resultados do Aptima HPV Assay e de um teste de DNA do HPV por grupo etário (estimativas não ajustadas) na linha de referência

	Idade	Resultado do ensaio	Aptima HPV Assay N=818		Teste do DNA do HPV N=800*	
			Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)	Risco absoluto (CI de 95%)	Risco relativo (CI de 95%)
≥CIN2	30 a 39 anos		N=383		N=376	
		Positiva	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)
		Negativa	0,9 (2/230) (0,1, 2,2)		1,2 (2/161) (0,2, 3,2)	
		Prevalência (%)	2,3 (9/383)		2,4 (9/376)	
	≥ 40 idade		N=435		N=424	
		Positiva	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)
		Negativa	1,3 (4/319) (0,4, 2,3)		0,4 (1/223) (0,0, 1,8)	
		Prevalência (%)	2,5 (11/435)		2,4 (10/424)	
≥CIN3	30 a 39 anos		N=383		N=376	
		Positiva	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)
		Negativa	0,4 (1/230) (0,0, 1,6)		0,6 (1/161) (0,0, 2,2)	
		Prevalência (%)	1,6 (6/383)		1,6 (6/376)	
	≥ 40 anos		N=435		N=424	
		Positiva	4,3 (5/116) (2,2, 5,1)	Não calculável	2,5 (5/201) (1,3, 2,8)	Não calculável
		Negativa	0,0 (0/319) (0,0, 0,8)		0,0 (0/223) (0,0, 1,1)	
		Prevalência (%)	1,1 (5/435)		1,2 (5/424)	

\*18 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não apresentaram resultados do teste de DNA do HPV devido, sobretudo, ao volume insuficiente do espécime citológico.

As estimativas ajustadas do desempenho clínico do Aptima HPV Assay, incluindo sensibilidade, especificidade, PPV e NPV para a detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 na linha de referência são apresentadas na Tabela 51, bem como as estimativas para o teste de DNA do HPV disponível no mercado. As estimativas não ajustadas do desempenho clínico são apresentadas na Tabela 52. O Aptima HPV Assay e o teste de DNA do HPV disponível no mercado apresentaram sensibilidade semelhante, ao passo que a especificidade foi significativamente superior para o Aptima HPV Assay (CI não sobrepostos de 95%). As estimativas do valor de prognóstico do Aptima HPV Assay foram clinicamente relevantes e semelhantes às estimativas para o teste de DNA do HPV disponível no mercado. Os NPV foram semelhantes mas, para a detecção de  $\geq$ CIN2, o PPV para o Aptima HPV Assay foi ligeiramente superior ao PPV para o teste de DNA do HPV disponível no mercado (4,5% vs. 3,7%).

**Tabela 51:** População NILM  $\geq$  30 anos: Desempenho do Aptima HPV Assay e de um teste de DNA do HPV para a detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 (estimativas ajustadas em relação ao desvio de verificação) na linha de referência

	Desempenho	Aptima HPV Assay		Teste do DNA do HPV	
		Estimativa	(CI de 95%)	Estimativa	(CI de 95%)
$\geq$ CIN2	Sensibilidade (%)	28,4	(4,9, 51,8)	35,4	(3,8, 66,9)
	Especificidade (%)	95,5	(95,1, 95,9)	93,7	(93,2, 94,2)
	PPV (%)	4,5	(2,7, 7,4)	3,7	(2,3, 6,1)
	NPV (%)	99,4	(98,1, 99,8)	99,5	(97,9, 99,9)
	Prevalência (%)	0,9 (0,0, 1,9)		0,9 (0,0, 1,9)	
$\geq$ CIN3	Sensibilidade (%)	54,0	(3,6, 100)	56,4	(0,4, 100)
	Especificidade (%)	95,4	(95,0, 95,8)	93,6	(93,1, 94,1)
	PPV (%)	3,0	(1,6, 5,5)	2,3	(1,3, 4,1)
	NPV (%)	99,9	(98,3, 100)	99,9	(97,6, 100)
	Prevalência (%)	0,4 (0,0, 1,2)		0,4 (0,0, 1,3)	

**Tabela 52:** População NILM  $\geq 30$  anos: Desempenho do Aptima HPV Assay e de um teste de DNA do HPV para a detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 (estimativas não ajustadas) na linha de referência

	Desempenho	Aptima HPV Assay N=818		Teste do DNA do HPV N=800*	
		Estimativa	(CI de 95%)	Estimativa	(CI de 95%)
$\geq$ CIN2	Sensibilidade (%)	70,0 (14/20)	(48,1, 85,5)	84,2 (16/19)	(62,4, 94,5)
	Especificidade (%)	68,0 (543/798)	(64,7, 71,2)	48,8 (381/781)	(45,3, 52,3)
	PPV (%)	5,2 (14/269)	(3,5, 6,6)	3,8 (16/416)	(2,9, 4,5)
	NPV (%)	98,9 (543/549)	(98,1, 99,5)	99,2 (381/384)	(98,1, 99,8)
	Prevalência (%)	2,4 (20/818)		2,4 (19/800)	
$\geq$ CIN3	Sensibilidade (%)	90,9 (10/11)	(62,3, 98,4)	90,9 (10/11)	(62,3, 98,4)
	Especificidade (%)	67,9 (548/807)	(64,6, 71,0)	48,5 (383/789)	(45,1, 52,0)
	PPV (%)	3,7 (10/269)	(2,5, 4,3)	2,4 (10/416)	(1,6, 2,7)
	NPV (%)	99,8 (548/549)	(99,2, 100)	99,7 (383/384)	(98,9, 100)
	Prevalência (%)	1,3 (11/818)		1,4 (11/800)	

\*18 mulheres com resultados do Aptima HPV Assay não apresentaram resultados do teste de DNA do HPV devido, sobretudo, ao volume insuficiente do espécime citológico.

A comparação directa entre o Aptima HPV Assay no Panther System e o teste de DNA do HPV disponível no mercado demonstra uma sensibilidade semelhante e uma especificidade melhorada estatisticamente significativa do Aptima HPV Assay em relação ao teste de DNA do HPV disponível no mercado para a detecção de  $\geq$ CIN2, conforme demonstrado pelas relações de taxas de resultados positivos reais e de resultados positivos falsos (Tabela 53 e Tabela 54, respectivamente).

**Tabela 53:** População NILM  $\geq$  30 anos: Relação de taxas de resultados positivos reais (Aptima HPV Assay/teste de DNA do HPV) para mulheres com  $\geq$ CIN2 (estimativas não ajustadas) na linha de referência

		Teste do DNA do HPV		Total
		Positiva	Negativa	
Aptima HPV Assay	Positiva	13	1	14 (73,7%)
	Negativa	3	2	5
	Total	16 (84,2%)	3	19
<b>Relação de taxas de resultados positivos reais = 0,88 (14/16) (95% CI: 0,65, 1,10)</b>				

**Tabela 54:** População NILM  $\geq$  30 anos: Relação de taxas de resultados positivos falsos (Aptima HPV Assay/teste de DNA do HPV) para mulheres com  $<$ CIN2 (estimativas não ajustadas) na linha de referência

		Teste do DNA do HPV		Total
		Positiva	Negativa	
Aptima HPV Assay	Positiva	223	19	242 (31,0%)
	Negativa	177	362	539
	Total	400 (51,2%)	381	781
<b>Relação de taxas de resultados positivos falsos = 0,61 (242/400) (95% CI: 0,55, 0,66)</b>				

### População $\geq$ 30 Anos de NILM: Desempenho Clínico do Aptima HPV Assay no Panther System Após 3 anos de Acompanhamento

Haviam 10 843 mulheres com 30 ou mais anos de idade com resultados de citologia NILM e resultados válidos de Aptima HPV assay na linha de referência que eram elegíveis para a Fase de Acompanhamento. Das mulheres sem  $\geq$ CIN2, 67,0% (7 247/10 823) das mulheres realizaram uma consulta de papanicolau de acompanhamento no ano 1, 60,3% (6 517/10 814) no ano 2 e 58,7% (6 339/10 807) no ano 3. Na globalidade, 58,8% (6 375/10 843) das mulheres concluíram o estudo (tinham  $\geq$ CIN2 na linha de referência ou durante o acompanhamento e/ou realizaram as consultas necessárias).

Das 10 843 mulheres elegíveis, 511 (4,7%) tiveram resultados positivos no Aptima HPV assay no Panther System na linha de referência. Destas 511 mulheres, 255 (49,9%) tiveram estado positivo ou negativo de doença a 3 anos com base em resultados de citologia ou colposcopia/biopsia. As restantes 10 332 mulheres tiveram resultados negativos no Aptima

HPV assay no Panther System na linha de referência. Destas 10 332 mulheres, 5 946 (57,5%) tiveram um estado positivo ou negativo da doença a 3 anos. Das 6 201 mulheres com estado de doença a 3 anos, 47 mulheres tinham  $\geq$ CIN2, incluindo 23 com  $\geq$ CIN3; 6 154 mulheres tiveram normal/CIN1 pelo Painel de Revisão de Histologia de Consenso. Os resultados na linha de referência do Aptima HPV assay no Panther System e de um ensaio de DNA do HPV disponível no mercado e do estado da doença a 3 anos (inclui avaliação na linha de referência e no acompanhamento) pelo Painel de Revisão de Histologia de Consenso são apresentados na Tabela 55.

**Tabela 55:** População  $\geq$  30 Anos de NILM: Classificação de Mulheres Elegíveis para a Fase de Acompanhamento por Resultados no HPV Assay na Linha de Referência, Resultados de Teste de DNA do HPV na linha de referência e Estado de Doença ( $\geq$ CIN2,  $\geq$ CIN3, Não verificado) Determinado nas Fases de Linha de Referência e de Acompanhamento

Resultado no Aptima HPV Assay	Teste de DNA do HPV	Total de Mulheres	Estado de Doença Verificado: $\geq$ CIN2		Estado de Doença Verificado: $\geq$ CIN3		Estado de Doença Não Verificado	
			Mulheres Doentes ( $\geq$ CIN2)	Mulheres Não Doentes (<CIN2)	Mulheres Doentes ( $\geq$ CIN3)	Mulheres Não Doentes (<CIN3)	Perdidas para Acompanhamento	Indeterminado*
Positivo	Positivo	382	23	171	16	178	167	21
Positivo	Negativo	97	1	48	1	48	44	4
Positivo	Sem Resultado**	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	Sem Resultado**	599	1	320	0	321	264	14
<b>Total</b>		10 843	47	6 154	23	6 178	4 378	264

\*Mulheres que tiverem resultados anormais no teste de citologia durante o acompanhamento e que não tiverem um resultado do Painel de Revisão de Histologia de Consenso subsequente e mulheres com citologia inadequada na sua última consulta. 174 mulheres com estado indeterminado de doença concluíram o acompanhamento de acordo com o protocolo.

\*\*631 mulheres com resultados no Aptima HPV assay não tiveram resultados no teste de DNA do HPV principalmente devido a volume insuficiente do espécime de citologia.

O risco acumulado de 3 anos de doença ( $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3) baseia-se na estimativa Kaplan-Meier (análise vida-tabela) e inclui doença detectada na linha de referência ou no acompanhamento. As mulheres que tinham alguma indicação de doença (ASC-US ou resultados de citologia mais graves) mas sem resultado de Painel de Revisão de Histologia de Consenso foram incluídas na análise utilizando um método de imputação múltiplo para prever o número de mulheres com doença que teriam sido identificadas se as mulheres tivessem sido submetidas a colposcopia.

As estimativas de risco absoluto e relativo acumulado de 3 anos para detecção de  $\geq$ CIN2 e  $\geq$ CIN3 são mostradas na Tabela 56.

**Tabela 56:** População ≥ 30 Anos de NILM: Riscos Absoluto e Relativo Acumulado de 3 Anos\* de ≥CIN2 e ≥CIN3 para Resultados do Aptima HPV Assay e de um Teste de DNA do HPV na Linha de Referência

	Resultado do Ensaio	Aptima HPV Assay		Teste de ADN HPV	
		Risco Absoluto (95% CI)	Risco Relativo (95% CI)	Risco Absoluto (95% CI)	Risco Relativo (95% CI)
≥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)	
	Prevalência (%)	0,68		0,68	
≥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)	
	Prevalência (%)	0,34		0,35	

\*Os riscos acumulados de 3 anos ajustados para outros desvios possíveis foram semelhantes aos riscos desta tabela. Devido às diferenças previstas nos riscos no ano 1 e no ano 2 para os dois grupos de mulheres no estudo de acompanhamento (mulheres com colposcopia na linha de referência e mulheres sem colposcopia na linha de referência), foi indicado apenas o risco acumulado de 3 anos para os grupos combinados.

A prevalência acumulada de 3 anos de ≥CIN2 e ≥CIN3 em mulheres com resultados de citologia NILM na linha de referência foi de 0,68% e 0,34%, respectivamente. O risco relativo de ≥CIN2 foi de 24,45 (95% CI 13,85, 43,15), indicando que uma mulher que é positiva no Aptima HPV assay no Panther System tem 24,45 vezes mais probabilidade de ter ≥CIN2 do que uma mulher que é negativa no Aptima HPV assay. O risco relativo de ≥CIN3 foi de 57,11 (95% CI: 21,09, 154,62).

## Desempenho clínico do Aptima HPV Assay com espécimes de citologia líquida SurePath

Foram colhidos espécimes de citologia líquida SurePath de mulheres canadianas (n=558) encaminhadas para seguimento devido a um ou mais exames Papanicolau anómalos, infecção por HPV ou outra razão. Uma alíquota (0,5 ml) de cada espécime foi transferida para um Tubo de Transferência de Espécimes Aptima e depois tratada com a Solução de Transferência Aptima. Uma única réplica de cada espécime foi testada com o Aptima HPV Assay. Uma alíquota individual (1 ml) de cada espécime foi retirada para ser avaliada com um teste de PCR para o HPV disponível no mercado. A sensibilidade clínica para a detecção da doença, definida como um resultado histológico  $\geq$ CIN3, foi calculada tanto para o Aptima HPV Assay como para o teste de PCR para o HPV, conforme apresentada na Tabela 57, com os valores de prognóstico positivos e negativos.

**Tabela 57:** Desempenho do Aptima HPV Assay e de um teste de PCR para o HPV para a detecção de  $\geq$ CIN3

Desempenho	Aptima HPV Assay N=558		Teste de PCR para o HPV N=558	
	Estimativa	(CI de 95%)	Estimativa	(CI de 95%)
Sensibilidade (%)	89,3 (25/28)	(72,8 - 96,3)	89,3 (25/28)	(72,8 - 96,3)
Especificidade (%)	58,7 (311/530)	(54,4 - 62,8)	49,1 (260/530)	(44,8 - 53,3)
PPV (%)	10,2 (25/244)	(8,4 - 11,7)	8,5 (25/295)	(7,0 - 9,5)
NPV (%)	99,0 (311/314)	(97,6 - 99,8)	98,9 (260/263)	(97,2 - 99,7)
Prevalência (%)	5,0 (28/558)		5,0 (28/558)	

## Desempenho clínico do Aptima HPV Assay com colheita de espécimes com o kit de colheita e transporte de espécimes cervicais

Espécimes clínicos positivos para HPV de alto risco e negativos para HPV de alto risco colhidos tanto de populações de rastreios (consulta de rotina) como de encaminhamentos (consulta para colposcopia) foram testados com o Aptima HPV Assay no Panther System e Tigris DTS System utilizando dois lotes de reagente. A concordância entre o Panther System e o Tigris DTS System para espécimes de CSCT é apresentada na Tabela 58.

No caso dos espécimes de CSCT, a concordância global entre o Panther System e o Tigris DTS System foi  $> 98\%$ , como mostra a Tabela 58. Dos 632 espécimes clínicos testados, 69 foram CIN2+ e 38 CIN3+. A sensibilidade do Aptima HPV Assay para a detecção de CIN2+ foi de 97,1% (CI de 95%: 90,0%-99,2%) no Panther System e de 98,6% (CI de 95%: 92,2%-99,7%) no Tigris DTS System. A sensibilidade para a detecção de CIN3+ foi de 100% (CI: 90,8%-100%) tanto para o Panther System como para o Tigris DTS System.



**Tabela 58:** Concordância dos Resultados do Aptima HPV Assay Provenientes de Espécimes de Aptima CSCT Testados no Tigris DTS System e no Panther System

		Tigris DTS System		Total
		Positiva	Negativa	
Panther System	Positiva	490	3	493
	Negativa	9	130	139
	Total	499	133	632

Concordância global = 98,1% (CI 96,7-98,9)

Concordância positiva = 98,2% (CI 96,6-99,0)

Concordância negativa = 97,7% (CI 93,6-99,2)

### Sensibilidade analítica

O limite de detecção (Limit of Detection, LOD) no “cutoff” clínico consiste numa concentração de RNA do HPV que é positiva (acima do “cutoff” clínico) 95% das vezes. Determinou-se o LOD do Aptima HPV Assay testando painéis de diluição de transcritos *in vitro* (IVT) para todos os 14 genótipos de alto risco e 4 linhas celulares infectadas com HPV: SiHa, HeLa, MS751 e ME180 (ATCC, Manassas, Virgínia). No caso dos painéis de IVT, o meio de transporte de espécimes foi aditivado com IVT com várias concentrações e depois diluído com espécimes de citologia líquida ThinPrep individuais negativos antes de serem realizados testes. No caso de painéis de células infectadas com HPV, grupos de espécimes de citologia líquida ThinPrep negativos para HPV foram aditivados com células infectadas com HPV com várias concentrações e depois diluídos com meio de transporte de espécimes antes de serem realizados testes. Trinta réplicas de cada nível de cópias foram testadas com cada um de dois lotes de reagente para um total de 60 réplicas. Realizaram-se testes durante 17 dias, com 1 a 12 execuções por dia e 5 réplicas de um dado genótipo, com testes de concentração em cada execução. O limite de detecção de 95% foi calculado a partir da análise de regressão Probit dos resultados de positividade para cada painel de diluição.

Os resultados da análise Probit, Tabela 59, mostram que os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 59 e 68 de HPV tinham limites de detecção de 95% inferiores a 100 cópias/reacção, tendo os tipos 52, 58 e 66 limites de detecção de 95% entre 100 e 500 cópias/reacção. As quatro linhas celulares testadas tinham limites de detecção de 95% inferiores a 1 célula/reacção.

**Tabela 59:** Limite de detecção no “cutoff” clínico do Aptima HPV Assay

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

\*Cópias por reacção para transcritos *in vitro* e células por reacção para linhas celulares

## Precisão do Ensaio

A precisão do Aptima HPV Assay foi avaliada em dois estudos utilizando o mesmo painel de 20 membros. O Estudo 1 decorreu em 3 locais, 2 externos e 1 interno, e o Estudo 2 decorreu internamente. O painel incluiu 13 membros positivos para HPV com concentrações iguais ou superiores ao limite de detecção do ensaio (positividade prevista:  $\geq 95\%$ ), 3 membros positivos para HPV com concentrações abaixo do limite de detecção do ensaio (positividade prevista:  $>0\%$  a  $<25\%$ ) e 4 membros negativos para HPV. Os membros do painel positivos para HPV foram preparados aditivando transcritos de RNA *in vitro* (IVT) a solução PreservCyt diluída com meio de transporte de espécimes (specimen transport medium, STM) ou células cultivadas infectadas pelo HPV (SiHa, HeLa e MS751; ATCC, Manassas, Virgínia) a espécimes de citologia líquida ThinPrep negativos agrupados e diluídos com STM. Os membros do painel negativos para HPV foram preparados com solução PreservCyt ou espécimes de citologia líquida ThinPrep negativos agrupados e diluídos com STM.

No Estudo 1, 2 operadores em cada um dos 3 locais de teste (1 instrumento por local) efectuaram 2 listas de trabalho do Aptima HPV Assay por dia (1 com cada lote de reagente) durante 3 dias. Cada lista de trabalho continha 3 réplicas de cada um dos membros do painel de reprodutibilidade. Foram testados cento e oito (108) tubos de amostra individuais para cada membro do painel (3 locais x 1 instrumento x 2 operadores x 2 lotes x 3 listas de trabalho x 3 réplicas). No Estudo 2, os testes foram efectuados internamente durante 13 dias, com um total de 162 reacções testadas para cada membro do painel (1 local x 3 instrumentos x 3 operadores x 3 lotes x 2 listas de trabalho x 3 réplicas).

Os membros do painel são descritos na Tabela 60a (membros do painel com resultados positivos esperados) e na Tabela 60b (membros do painel com resultados negativos esperados), juntamente com um resumo da concordância com resultados esperados e valores de S/CO do analito ao 2,5.º, 50.º e 97,5.º percentis da distribuição do S/CO. A variabilidade do S/CO do analito para os membros do painel com resultados positivos esperados é indicada na Tabela 61 para o Estudo 1 e na Tabela 62 para o Estudo 2.

**Tabela 60a:** Precisão do Aptima HPV Assay nos Estudos 1 e 2: Descrição do painel, concordância positiva e percentil de distribuição dos valores de S/CO do analito para os membros do painel com resultados positivos esperados

Descrição do painel (cópias ou células/reacção)	Estudo 1 (3 locais de teste)	Estudo 2 (1 local de teste)
	% de concordância positiva (CI de 95%)	% de concordância positiva (CI de 95%)
Amostra clínica positiva alta 1 do HPV	100 (107/107) (96,5, 100)	100 (161/161) (97,7, 100)
Amostra clínica positiva alta 2 do HPV	100 (107/107) (96,5, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
IVT de HPV 16 (1830 cópias)	100 (107/107) (96,5, 100)	100 (161/161) (97,1, 100)
IVT de HPV 18 (1550 cópias)	100 (107/107) (96,5, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
Amostra clínica positiva baixa 1 do HPV	94,4 (101/107) (88,3, 97,4)	89,5 (145/162) (83,3, 93,3)
Amostra clínica positiva baixa 2 do HPV	88,0 (95/108) (80,5, 92,8)	92,0 (149/162) (86,8, 95,3)
Amostra clínica positiva baixa 3 do HPV	100 (108/108) (96,6, 100)	97,5 (157/161) (93,8, 99,0)
Amostra clínica positiva baixa 4 do HPV	90,7 (98/108) (83,8, 94,9)	92,6 (150/162) (87,5, 95,7)
IVT de HPV 16 (183 cópias)	100 (102/102) (96,4, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
IVT de HPV 18 (155 cópias)	100 (108/108) (96,6, 100)	100 (159/159) (97,6, 100)
Células MS751 (0,63 células)	100 (108/108) (96,6, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
Células HeLa (0,35 células)	100 (108/108) (96,6, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
Células SiHa (0,90 células)	87,9 (94/107) (80,3, 92,8)	89,5 (145/162) (83,8, 93,3)

IVT = transcrito *in vitro*

\*A % esperada de concordância positiva foi de ~ 95%; observou-se um valor mais baixo possivelmente devido à variabilidade de fabrico do membro do painel.

**Tabela 60b:** Precisão do Aptima HPV Assay nos Estudos 1 e 2: Descrição do painel, concordância negativa e percentil de distribuição dos valores de S/CO do analito para os membros do painel com resultados negativos esperados

Descrição do painel (cópias ou células/reacção)	Estudo 1 (3 locais de teste)	Estudo 2 (1 local de teste)
	% de concordância negativa (CI de 95%)	% de concordância negativa (CI de 95%)
<b>Células MS751 (0,005 células)</b>	87,0 (94/108) (79,4, 92,1)	93,8 (152/162) (89,0, 96,6)
<b>Células SiHa (0,008 células)</b>	97,2 (105/108) (92,1, 99,1)	95,7 (155/162) (91,4, 97,9)
<b>Células HeLa (0,02 células)</b>	70,4 (76/108) (61,2, 78,2)	67,3 (109/162) (59,8, 74,0)
<b>Amostra clínica negativa 1 do HPV</b>	99,1 (107/108) (94,9, 99,8)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>Amostra clínica negativa 2 do HPV</b>	97,2 (105/108) (92,1, 99,1)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>Solução PreservCyt 1</b>	99,1 (107/108) (94,9, 99,8)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>Solução PreservCyt 2</b>	99,1 (107/108) (94,9, 99,8)	100 (161/161) (97,7, 100)

IVT = transcrito *in vitro*.

\*% de concordância negativa esperada > 75% e < 100%.

**Tabela 61:** Precisão do Aptima HPV Assay no Estudo 1: Variabilidade do sinal para os membros do painel com resultados positivos esperados

Descrição do painel (cópias ou células/reacção)	n	S/CO Média	Entre instrumentos		Entre operadores		Entre lotes		Entre listas de trabalho		Nas próprias listas de trabalho		Total	
			DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)
Amostra clínica positiva alta 1 do HPV	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
Amostra clínica positiva alta 2 do HPV	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
IVT de HPV 16 (1830 cópias)	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
IVT de HPV 18 (1550 cópias)	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
Amostra clínica positiva baixa 1 do HPV	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
Amostra clínica positiva baixa 2 do HPV	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
Amostra clínica positiva baixa 3 do HPV	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
Amostra clínica positiva baixa 4 do HPV	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
IVT de HPV 16 (183 cópias)	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
IVT de HPV 18 (155 cópias)	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
Células MS751 (0,63 células)	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
Células HeLa (0,35 células)	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
Células SiHa (0,90 células)	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

\*Doze amostras apresentaram resultados do Aptima HPV Assay inválidos (1 para a amostra clínica positiva alta 1 do HPV, 1 para a amostra clínica positiva alta 2 do HPV, 1 para IVT de HPV 16 [1830 cópias], 1 para IVT de HPV 18 [1550 cópias], 1 para a amostra clínica positiva baixa 1 do HPV, 6 para IVT de HPV 16 [183 cópias] e 1 para células SiHa [0,90 células]).

CV = coeficiente de variação; IVT = transcrito *in vitro*; DP = desvio padrão

**Nota:** A variabilidade de alguns factores pode ser numericamente negativa. Tal pode ocorrer se a variabilidade provocada por esses factores for muito diminuta. Nestes casos, DP e CV são apresentados como 0.

**Tabela 62:** Precisão do Aptima HPV Assay no Estudo 2: Variabilidade do sinal para os membros do painel com resultados positivos esperados

Descrição do painel (cópias ou células/reacção)	n	S/CO Média	Entre instrumentos		Entre operadores		Entre lotes		Entre listas de trabalho		Nas próprias listas de trabalho		Total	
			DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)	DP	CV (%)
Amostra clínica positiva alta 1 do 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
Amostra clínica positiva alta 2 do 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 de HPV 16 (1830 cópias)	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 de HPV 18 (1550 cópias)	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
Amostra clínica positiva baixa 1 do 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
Amostra clínica positiva baixa 2 do 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
Amostra clínica positiva baixa 3 do 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
Amostra clínica positiva baixa 4 do 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 de HPV 16 (183 cópias)	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 de HPV 18 (155 cópias)	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
Células MS751 (0,63 células)	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
Células HeLa (0,35 células)	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
Células SiHa (0,90 células)	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

\*Seis amostras apresentaram resultados do Aptima HPV Assay inválidos (1 para amostra clínica positiva alta 1 do HPV, 1 para IVT de HPV 16 [1830 cópias], 1 para amostra clínica positiva baixa 3 do HPV, 3 para IVT de HPV 18 [155 cópias]).

CV = coeficiente de variação; IVT = transcrito *in vitro*; DP = desvio padrão

**Nota:** A variabilidade de alguns factores pode ser numericamente negativa. Tal pode ocorrer se a variabilidade provocada por esses factores for muito diminuta. Nestes casos, DP e CV são apresentados como 0.

## Reactividade cruzada

Os testes de organismos potencialmente com reactividade cruzada para o Aptima HPV Assay foram realizados utilizando o Tigris DTS System. Consulte os resultados em *Reactividade cruzada* (Tabela 37) na secção Tigris DTS System.

## Interferência

Os testes com potenciais substâncias de interferência para o Aptima HPV Assay foram realizados utilizando o Tigris DTS System. Consulte os resultados em *Interferência* (Tabela 38) na secção 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. Sunsum, 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 30years. *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 Canadian 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

Apoio ao Cliente: +1 844 Hologic (+1 844 465 6442)  
customersupport@hologic.com

Suporte técnico: +1 888 484 4747  
molecularsupport@hologic.com



**Emergo Europe**  
Prinsessegracht 20  
2514 AP The Hague  
The Netherlands

Para obter mais informações sobre contactos, aceda a [www.hologic.com](http://www.hologic.com).

Este produto destina-se a ser utilizado apenas no domínio do diagnóstico *in vitro* de seres humanos.

Hologic, Aptima, DTS, Leader, Panther, PreservCyt, SB100, ThinPrep e Tigris são marcas comerciais e/ou marcas registadas da Hologic, Inc. e/ou respectivas subsidiárias nos EUA e/ou em outros países.

eppendorf (estilizado) e REPEATER são marcas comerciais da Eppendorf AG.

RAININ é uma marca comercial da Rainin Instruments, LLC.

TECAN e FREEDOM EVO são marcas comerciais da Tecan Group AG.

SUREPATH e PREPSTAIN são marcas comerciais da TriPath Imaging, Inc.

Quaisquer outras marcas comerciais que possam aparecer neste folheto informativo pertencem aos respectivos proprietários.

© 2007-2017 Hologic, Inc. Todos os direitos reservados.  
AW-14517-601 Rev. 003

2017-04