

Aptima HPV Assay

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Para exportación de EE. UU. únicamente.

Información general	2
Uso indicado	2
Resumen y explicación de la prueba	2
Principios del procedimiento	3
Advertencias y precauciones	4
Requisitos de conservación y manipulación de los reactivos	6
Recogida y conservación de las muestras	8
Procedimientos de control de calidad	32
Interpretación de las pruebas	33
Limitaciones	34
Rendimiento del ensayo en los DTS Systems	36
Resultados esperados del Tigris DTS System: Prevalencia del mRNA del HPV de alto riesgo	45
Diseño del estudio clínico del Aptima HPV Assay con muestras de citología en solución ThinPrep	46
Rendimiento del ensayo en el Sistema Tigris DTS	48
Resultados esperados con el Panther System: Prevalencia del mRNA del HPV de alto riesgo	78
Diseño del ensayo clínico del Aptima HPV Assay con muestras de citología en solución ThinPrep	79
Rendimiento del ensayo en el Panther System	81
Bibliografía	105

DTS™ Systems	
DTS Systems	10
Reactivos y materiales suministrados	10
Materiales necesarios pero no suministrados	11
Materiales opcionales	12
Procedimiento de prueba en los DTS Systems	12
Notas sobre el procedimiento	18

Tigris™ DTS System	
Tigris DTS System	20
Reactivos y materiales suministrados	20
Materiales necesarios pero no suministrados	21
Materiales opcionales	22
Procedimiento de prueba en el Tigris DTS System	22
Notas sobre el procedimiento	25

Panther™ System	
Panther System	26
Reactivos y materiales suministrados	26
Materiales necesarios pero no suministrados	27
Materiales opcionales	27
Procedimiento de prueba en el Panther System	28
Notas sobre el procedimiento	30

Información general

Uso indicado

El Aptima HPV Assay (Ensayo Aptima HPV) es una prueba de amplificación de diana por sonda de ácidos nucleicos para la detección cualitativa *in vitro* del RNA mensajero (mRNA) vírico E6/E7 procedente de los 14 tipos del virus del papiloma humano (HPV) de alto riesgo (16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68). El Aptima HPV Assay no discrimina entre los 14 tipos de alto riesgo.

- El Aptima HPV Assay está indicado para su uso en la detección de pacientes con resultado de ASC-US (células escamosas atípicas de significado incierto) para la citología con el fin de determinar la necesidad de derivación a colposcopia. Los resultados de esta prueba no tienen como finalidad evitar que las mujeres procedan con la colposcopia.
- El Aptima HPV Assay se puede utilizar con la citología cervical para realizar una detección complementaria (Cotest) para evaluar la presencia o ausencia de tipos de HPV de alto riesgo. Esta información, junto con la evaluación del médico de los antecedentes citológicos, otros factores de riesgo y directrices profesionales, se puede usar como guía en la gestión de los pacientes.
- El Aptima HPV Assay se puede utilizar como Test de primera línea en cribado primario, con o sin citología cervical, para identificar a mujeres con un mayor riesgo de desarrollar cáncer cervical o la presencia de enfermedad de alto riesgo. Esta información, junto con la evaluación del médico del historial citológico de la paciente, otros factores de riesgo u directrices profesionales, se puede usar como guía en la gestión de los pacientes.

Con el Aptima HPV Assay se pueden analizar muestras cervicales recogidas en viales para citología ThinPrep™ con solución PreservCyt™, tanto antes como después de procesar la citología, así como muestras cervicales recogidas con el kit de toma de muestra y transporte Aptima de muestras de citología Aptima. El ensayo puede utilizarse para analizar estos tipos de muestras tanto con el sistema DTS, el sistema Tigris o el sistema Panther. Las muestras cervicales recogidas en solución conservante SurePath pueden analizarse con el Aptima HPV Assay en el sistema Tigris y en el sistema Panther.

Resumen y explicación de la prueba

El cáncer de cuello uterino es uno de los más frecuentes en mujeres de todo el mundo. El HPV es el agente etiológico responsable de más del 99 % de todos los cánceres cervicouterinos.^{1, 2, 3} El HPV es un virus DNA de transmisión sexual común, con más de 100 genotipos.⁴

El genoma vírico del HPV es un DNA bicatenario circular de aproximadamente 7900 pares de bases de longitud. El genoma tiene ocho marcos de lectura abiertos que se superponen. Existen seis genes precoces (E), dos genes tardíos (L) y una larga región de control que no se traduce. Los genes L1 y L2 codifican para las proteínas principal y secundaria de la cápside. Los genes precoces regulan la replicación vírica del HPV. Los genes E6 y E7 de los genotipos de alto riesgo del HPV son oncogenes conocidos. Las proteínas que se expresan a partir del mRNA policistrónico E6/E7 alteran las funciones de las proteínas del retinoblastoma y p53 celular, ocasionando la interrupción de los puntos de comprobación del ciclo celular y la inestabilidad del genoma celular.^{5, 6}

Hay 14 genotipos de HPV que se consideran patógenos o de alto riesgo de enfermedad cervicouterina.⁷ Numerosos estudios han vinculado los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 con la progresión de la enfermedad.^{2, 5, 8} Las pacientes con una

infección persistente con uno de estos tipos tienen un mayor riesgo de desarrollar una displasia grave o un carcinoma de cuello uterino.^{7, 9}

Las infecciones por HPV son muy frecuentes y la mayoría de las mujeres las eliminan en un plazo de 6 a 12 meses.^{8, 10} La presencia de ácidos nucleicos del HPV no significa que exista displasia o cáncer de cuello uterino. No obstante, un enfoque eficaz para la detección de la enfermedad de cuello uterino es centrarse en los elementos oncogénicos del HPV que ocasionan infecciones víricas persistentes y transformación celular.³

Rendimiento clínico del Aptima HPV Assay en la detección primaria del cáncer cervical

El rendimiento clínico del Aptima HPV Assay utilizado en el cribado primario ha sido investigado en múltiples estudios por parte de investigadores independientes. Trece publicaciones^{11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23} revisadas por expertos en diez estudios clínicos individuales demuestran el rendimiento del Aptima HPV en la cribado primario en mujeres inscritas en nueve países (China, Canadá, Francia, México, Inglaterra, Dinamarca, Países Bajos, Estados Unidos y Alemania). Los datos de estos estudios muestran que el Aptima HPV tiene un rendimiento clínico similar comparado con otras pruebas clínicamente validadas de HPV cuando se usan para el cribado primario del precáncer y el cáncer cervical.

Principios del procedimiento

El Aptima HPV Assay consta de tres pasos principales, que tienen lugar en un solo tubo: captura de diana; amplificación mediada por transcripción (Transcription-Mediated Amplification, TMA) de la diana;²⁴ y detección de los productos de la amplificación (amplicones) mediante el ensayo de protección de la hibridación (Hybridization Protection Assay, HPA).²⁵ El ensayo incorpora un control interno (CI) para supervisar la captura, la amplificación y la detección del ácido nucleico, así como los errores del usuario o del instrumento.

Las muestras se recogen o se transfieren a un tubo que contiene medio de transporte de muestras (specimen transport media, STM), una solución que lisa las células, libera el mRNA y lo protege de la degradación durante la conservación. Al realizar el Aptima HPV Assay, el mRNA diana se aísla de la muestra utilizando oligómeros de captura unidos a micropartículas magnéticas. Los oligómeros de captura contienen secuencias complementarias de regiones específicas de las moléculas diana de mRNA del HPV, así como una cadena de residuos de desoxiadenosina. Durante el Paso de hibridación, las regiones específicas de la secuencia de los oligómeros de captura se unen a regiones específicas de la molécula diana de mRNA del HPV. A continuación, el complejo oligómero de captura:diana es capturado separándolo de la solución mediante la disminución de la temperatura de reacción hasta la temperatura ambiente. Esta reducción de temperatura permite la hibridación entre la región desoxiadenosina del oligómero de captura y las moléculas de polidesoxitimidina unidas covalentemente a las partículas magnéticas. Las micropartículas, con las moléculas diana de mRNA del HPV capturadas y unidas a ellas, son atraídas hacia las paredes del tubo de reacción mediante imanes y se aspira el sobrenadante. Las partículas se lavan para eliminar la matriz de muestra residual, que puede contener inhibidores de la amplificación.

Una vez finalizado el proceso captura de diana, el mRNA de HPV se amplifica mediante TMA, un método de amplificación de ácidos nucleicos basado en la transcripción que utiliza dos enzimas, la transcriptasa inversa del MMLV y la RNA polimerasa T7. La transcriptasa inversa se utiliza para generar una copia de DNA de la secuencia de mRNA diana que contiene la secuencia promotora para la RNA polimerasa T7. La RNA polimerasa T7 genera varias copias del amplicón de RNA a partir del molde de copia de DNA.

La detección del amplicón se logra por medio del ensayo de protección de la hibridación (Hybridization Protection Assay, HPA) utilizando sondas de ácido nucleico monocatenarias con marcadores quimioluminiscentes complementarios al amplicón. Las sondas de ácido nucleico marcadas se hibridan específicamente con el amplicón. El reactivo de selección diferencia las sondas hibridadas de las no hibridadas, inactivando el marcador de las sondas no hibridadas. Durante el Paso de detección, la luz emitida por los híbridos de RNA:DNA marcados se mide como señales de fotones denominadas unidades relativas de luz (Relative Light Units, RLU) en un luminómetro. Los resultados finales del ensayo se interpretan en función de la razón señal/valor de corte (Analyte Signal/Cutoff, S/CO) del analito.

A cada reacción se añade un control interno mediante el reactivo de captura de diana. El control interno supervisa los pasos de captura de diana, amplificación y detección del ensayo. La señal del control interno de cada reacción se separa de la señal del HPV mediante la cinética diferencial de emisión de la luz procedente de las sondas con distintos marcadores.²⁶ El amplicón específico del control interno se detecta usando una sonda con emisión rápida de luz (flasher). El amplicón específico del HPV se detecta usando sondas con una cinética de emisión de luz relativamente más lenta (glower). El ensayo de cinética doble (Dual Kinetic Assay, DKA) es un método utilizado para diferenciar entre las señales procedentes de los marcadores flasher y glower.²⁶

Advertencias y precauciones

- A. Para uso diagnóstico *in vitro*.
- B. Para conocer otras advertencias y precauciones específicas, consulte los manuales de usuario de los DTS Systems, el Tigris DTS System y el Panther System.

Relacionadas con el laboratorio

- C. Utilice únicamente el material desechable de laboratorio suministrado o especificado.
- D. Siga las precauciones de rutina del laboratorio. No coma, beba ni fume en las zonas de trabajo designadas. Utilice guantes desechables sin talco, protección ocular y bata de laboratorio cuando manipule las muestras y los reactivos del kit. Lávese bien las manos después de manipular las muestras y los reactivos del kit.
- E. **Advertencia: Irritantes y corrosivos:** Evite el contacto de los reactivos Auto Detect 1 y Auto Detect 2 con la piel, los ojos y las membranas mucosas. Si estos fluidos entran en contacto con la piel o los ojos, lave la zona afectada con agua. Si hay un vertido de estos fluidos, dilúyalo con agua antes de limpiarlo.
- F. Las superficies de trabajo, las pipetas y los otros equipos se deben descontaminar periódicamente con una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 %-3,5 % (de 0,35 M a 0,5 M). Consulte los procedimientos del test para el sistema DTS, para el sistema Tigris y para el sistema Panther DTS para obtener más información.

Específicas de los DTS Systems

- G. Para evitar que las zonas del laboratorio se contaminen con amplicones, deben disponerse de forma que el flujo de trabajo sea unidireccional desde la preparación del reactivo hasta la detección. Las muestras, el equipo y los reactivos no deben devolverse a una zona donde se realizó un Paso anterior. El personal no debe volver a las zonas de trabajo anteriores sin adoptar las medidas adecuadas para evitar la contaminación. Es especialmente aconsejable contar con una zona separada para la detección.

Relacionadas con las muestras

- H. Mantenga las condiciones de temperatura apropiadas durante el envío y la conservación de las muestras para garantizar su integridad. No se ha evaluado la estabilidad de las muestras en condiciones de envío y conservación distintas de las recomendadas.
- I. Las fechas de caducidad que figuran en los kits y en los tubos de recogida y transferencia de muestras se aplican a la zona de recogida o transferencia, y no para el centro de análisis. Las muestras recogidas o transferidas en cualquier momento antes de estas fechas de caducidad son válidas para el análisis, siempre que se hayan transportado y conservado conforme a las instrucciones correspondientes, aunque ya se haya sobrepasado la fecha de caducidad.
- J. Las muestras pueden ser infecciosas. Siga las precauciones universales para realizar este ensayo. El director del laboratorio debe establecer los métodos de manipulación y eliminación adecuados. Este procedimiento solo debe realizarlo el personal que haya recibido la formación adecuada para manipular materiales infecciosos.
- K. Evite la contaminación cruzada durante los pasos de manipulación de las muestras. Compruebe que los recipientes de las muestras no entren en contacto unos con otros y deseche los materiales usados sin pasarlos por encima de los recipientes abiertos. Cámbiese los guantes si entran en contacto con una muestra.
- L. Una vez realizada la perforación, puede salir líquido de los tapones de los tubos en determinadas condiciones. Consulte *Procedimiento de prueba en los DTS Systems*,

Procedimiento de prueba en el Tigris DTS System o Procedimiento de prueba en el Panther System para obtener más información.

- M. Las muestras de citología en solución ThinPrep y en medio de recogida y transporte de muestras de citología (Cervical Specimen Collection and Transport, CSCT) deben rechazarse si el dispositivo de recogida se ha quedado dentro del tubo de muestra.
- N. Las muestras de citología en solución SurePath deben rechazarse si el dispositivo de recogida no está presente en el vial.

Relacionadas con el ensayo

- O. Conserve los reactivos a la temperatura especificada. El uso de reactivos conservados incorrectamente pueden afectar a los resultados del ensayo.
- P. Evite la contaminación microbiana y por ribonucleasa de los reactivos.
- Q. No utilice el kit después de la fecha de caducidad.
- R. No intercambie, mezcle ni combine reactivos de ensayo ni calibradores de kits con números de lotes diferentes.
- S. Los fluidos del Aptima assay, los reactivos Auto Detect Aptima, el conservante del fluido del Aptima System (DTS Systems y Tigris DTS System, únicamente) y los controles del Aptima HPV Assay (DTS Systems y Tigris DTS System, únicamente) no son parte del lote maestro; puede utilizarse cualquier lote.
- T. Es necesario mezclar bien los reactivos para lograr resultados precisos con el ensayo.
- U. Deben utilizarse puntas con tapones hidrófobos.

Específicas de los DTS Systems

- V. Deben dedicarse al menos dos pipetas de repetición al uso con este ensayo: una para los pasos de **captura de diana y amplificación**, y otra para los pasos de **post-amplificación**.
- W. Cuando se utilicen pipetas de repetición para añadir los reactivos, hay que evitar tocar el tubo con la punta de la pipeta para evitar el arrastre de un tubo a otro.
- X. Todas las pipetas deben limpiarse periódicamente tal como se describe en *Notas sobre el procedimiento*.
- Y. Se necesitan al menos dos instrumentos SB100™ independientes, uno para los pasos de captura de diana y amplificación, y otro para la post-amplificación.
- Z. NO reutilice las tarjetas de sellado. Deben utilizarse tarjetas de sellado nuevas para cada Paso.

Requisitos de conservación y manipulación de los reactivos

No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en el vial. Consulte las instrucciones de conservación adicionales a continuación.

- A. Los siguientes reactivos deberán conservarse entre 2 °C y 8 °C (refrigerados) cuando se reciban:
- Reactivo de amplificación de HPV.
 - Reactivo enzimático de HPV.
 - Reactivo de sonda de HPV.
 - Reactivo de control interno de HPV.
 - Calibradores positivos y negativos de HPV.
 - Controles positivos y negativos de HPV (solo en los DTS Systems y el Tigris DTS System).
- B. Los siguientes reactivos deberán conservarse a temperaturas entre 15 °C y 30 °C (temperatura ambiente):
- Solución de reconstitución de reactivo de amplificación de HPV.
 - Solución de reconstitución de reactivo enzimático de HPV.
 - Solución de reconstitución de reactivo de sonda de HPV.
 - Reactivo de captura de diana de HPV.
 - Reactivo de selección de HPV.
 - Solución de lavado.
 - Reactivo de aceite.
 - Tampón para fluido de desactivación.
 - Reactivo Auto Detect 1.
 - Reactivo Auto Detect 2.
 - Conservante del fluido del Aptima System (solo en el Tigris DTS System).
- C. Después de la reconstitución, los siguientes reactivos son estables durante 30 días si se conservan a una temperatura entre 2 °C y 8 °C:
- Reactivo de amplificación de HPV.
 - Reactivo enzimático de HPV.
 - Reactivo de sonda de HPV.
- D. El reactivo de captura de diana en uso (Working Target Capture Reagent, wTCR) es estable durante 30 días si se conserva entre 15 °C y 30 °C. No refrigerar.
- E. Deseche todos los reactivos reconstituidos y el wTCR no utilizados después de 30 días o de la fecha de caducidad del lote maestro, lo que ocurra primero.
- F. Los reactivos del Aptima HPV Assay son estables durante un total de 48 horas si se conservan cargados en el Tigris DTS System.
- G. Los reactivos del Aptima HPV Assay son estables durante un total de 72 horas si se conservan cargados en el Panther System.
- H. Tanto el reactivo de sonda como el reactivo de sonda reconstituido son fotosensibles. Conserve los reactivos protegidos de la luz.
- I. No congele los reactivos.

Recogida y conservación de las muestras

A. Recogida y procesamiento de las muestras:

Muestras de citología en solución ThinPrep:

1. Recoja las muestras de citología en viales para citología ThinPrep con solución PreservCyt y dispositivos de recogida tipo escobilla o cepillo/espátula, siguiendo las instrucciones del fabricante.
2. Antes o después del procesamiento con el ThinPrep 2000 System, el ThinPrep 3000 System, el procesador ThinPrep 5000 o el procesador ThinPrep 5000 con Autoloader, transfiera 1 ml de la muestra de citología en solución ThinPrep a un tubo de transferencia de muestras Aptima, siguiendo las instrucciones del kit de transferencia de muestras Aptima.

Muestras de citología en solución SurePath (Tigris DTS System y Panther System, únicamente):

1. Recoja una muestra de citología en solución SurePath siguiendo las instrucciones de uso de la prueba de citología SurePath o el PrepStain System.
2. Transfiera la muestra de citología en solución SurePath a un tubo de transferencia de muestras Aptima, siguiendo las instrucciones de las instrucciones del kit de transferencia de muestras Aptima.

Muestras en el kit de transporte y recogida de muestras de citología Aptima:

Recoja la muestra siguiendo las instrucciones de uso del kit CSCT Aptima.

B. Transporte y conservación antes del análisis:

Muestras de citología en solución ThinPrep:

1. Transporte las muestras de citología en solución ThinPrep a una temperatura de 2 °C a 30 °C.
2. Las muestras deben transferirse a un tubo de transferencia de muestras Aptima en los 105 días siguientes a su recogida.
3. Antes de la transferencia, las muestras de citología en solución ThinPrep deben conservarse entre 2 °C y 30 °C, y no deben pasar más de 30 días a temperaturas superiores a 8 °C.
4. Las muestras de citología en solución ThinPrep transferidas a tubos de transferencia de muestras Aptima pueden conservarse entre 2 °C y 30 °C durante un máximo de 60 días.
5. Si es necesario conservarlas por más tiempo, las muestras de citología en solución ThinPrep o en solución ThinPrep diluida en tubos de transferencia de muestras pueden conservarse a -20 °C o menos durante un máximo de 24 meses.

Muestras de citología en solución SurePath (Tigris DTS System y Panther System, únicamente):

1. Las muestras de citología en solución SurePath deben transportarse a una temperatura entre 2 °C y 25 °C.
2. Las muestras deben transferirse a un tubo de transferencia de muestras Aptima en los 7 días siguientes a su recogida.
3. Antes de transferirlas, las muestras de citología en solución SurePath deben conservarse a una temperatura entre 2 °C y 25 °C.
4. Las muestras de citología en solución SurePath transferidas a tubos de transferencia de muestras Aptima pueden conservarse entre 2 °C y 25 °C durante un máximo de 7 días.

Muestras en el kit de transporte y recogida de muestras de citología Aptima:

1. Transporte y conserve las muestras entre 2 °C y 30 °C durante un máximo de 60 días.

2. Si es necesario conservarlas por más tiempo, las muestras del kit de transporte se pueden conservar a -20 °C o menos durante un máximo de 24 meses.
- C. Tratamiento de las muestras de citología en solución SurePath (Tigris DTS System y Panther System, únicamente):
- Nota:** Las muestras de citología en solución SurePath deben tratarse con la solución de transferencia Aptima antes de analizarla con el Aptima HPV assay.
1. Solución de transferencia Aptima (Tigris DTS System y Panther System, únicamente)
Las muestras tratadas pueden conservarse a una temperatura de 2 °C a 8 °C durante un máximo de 17 días antes de analizarlas con el Aptima HPV Assay. Consulte las instrucciones del kit de transferencia de muestras Aptima para obtener más información.
- D. Conservación de las muestras después del análisis:
1. Las muestras analizadas deben conservarse en posición vertical en una gradilla.
 2. Los tubos de muestra se deben cubrir con papel aluminio o plástico nuevo y limpio.
 3. Si es necesario congelar o enviar las muestras analizadas, retire los tapones perforables de los tubos de muestra y sustitúyalos por tapones nuevos no perforables. Si es necesario enviar las muestras a otro laboratorio para su análisis, deben mantenerse las temperaturas especificadas. Antes de destapar las muestras anteriormente analizadas y tapadas de nuevo, se deben centrifugar los tubos de muestra durante 5 minutos a 420 RCF (fuerza centrífuga relativa) para llevar todo el líquido al fondo del tubo.
- Nota:** Las muestras deben enviarse de acuerdo con las normativas de transporte nacionales e internacionales aplicables.

DTS Systems

A continuación se detallan los reactivos del Aptima HPV Assay para los DTS Systems. Junto al nombre del reactivo se muestran también los símbolos de identificación del reactivo.

Reactivos y materiales suministrados

Nota: Para obtener información sobre cualquier aviso de riesgo o precaución que pueda estar asociado a los reactivos, consulte la Biblioteca de hojas de datos de seguridad (Safety Data Sheet Library) en www.hologic.com/sds.

Kit de Aptima HPV Assay, 100 pruebas, REF. 302610 (4 cajas)

Los calibradores y controles pueden adquirirse por separado. Consulte los números de referencia de las cajas individuales que figuran a continuación.

Caja refrigerada de HPV Aptima (conservar entre 2 °C y 8 °C al recibirla)

Símbolo	Componente	Cantidad
A	Reactivo de amplificación de HPV <i>Ácidos nucleicos no infecciosos desecados en solución tamponada con < 5 % de agente de volumen.</i>	1 vial
E	Reactivo enzimático de HPV <i>Transcriptasa inversa y RNA polimerasa desecadas en solución de tampón HEPES con < 10 % de reactivo de volumen.</i>	1 vial
P	Reactivo de sonda de HPV <i>Sondas de DNA quimioluminiscentes y no infecciosas (< 500 ng/vial) desecadas en solución de tampón succinato con < 5 % de detergente.</i>	1 vial
IC	Reactivo de control interno de HPV <i>Transcrito no infeccioso de RNA en solución tamponada con < 5 % de detergente.</i>	1 vial

Caja a temperatura ambiente de HPV Aptima (conservar entre 15 °C y 30 °C al recibirla)

Símbolo	Componente	Cantidad
AR	Solución de reconstitución de reactivo de amplificación de HPV <i>Solución acuosa con conservantes.</i>	1 vial
ER	Solución de reconstitución de reactivo enzimático de HPV <i>Solución de tampón HEPES con surfactante y glicerol.</i>	1 vial
PR	Solución de reconstitución de reactivo de sonda de HPV <i>Solución de tampón succinato con < 5 % de detergente.</i>	1 vial
S	Reactivo de selección de HPV <i>Solución de tampón borato 600 mM con surfactante.</i>	1 vial

**Caja a temperatura ambiente de HPV Aptima
(conservar entre 15 °C y 30 °C al recibirla)**

Símbolo	Componente	Cantidad
TCR	Reactivo de captura de diana de HPV <i>Ácidos nucleicos no infecciosos en solución tamponada con fase sólida (< 0,5 mg/ml).</i>	1 vial
	Tarjetas de sellado	1 paquete
	Collares de reconstitución	3

**Caja de calibradores de HPV Aptima (REF. 302554)
(conservar entre 2 °C y 8 °C al recibirla)**

Símbolo	Componente	Cantidad
PCAL	Calibrador positivo de HPV <i>Transcrito no infeccioso de HPV 16 in vitro a 1.000 copias/ml en solución tamponada con < 5 % de detergente.</i>	5 viales
NCAL	Calibrador negativo de HPV <i>Solución tamponada con < 5 % de detergente.</i>	5 viales

**Caja de controles de HPV Aptima (REF. 302556)
(conservar entre 2 °C y 8 °C al recibirla)**

Símbolo	Componente	Cantidad
PC	Control positivo de HPV <i>Células cultivadas negativas y positivas para HPV, lisadas e inactivadas, a una concentración de 25 células/ml en solución tamponada con < 5 % de detergente.</i>	5 viales
NC	Control negativo de HPV <i>Células cultivadas negativas para HPV inactivadas y lisadas, en solución de tampón con < 5 % de detergente.</i>	5 viales

Material necesarios pero no suministrados

Nota: A menos que se indique lo contrario, los materiales disponibles en Hologic aparecen en la lista con el número de referencia.

	REF.
Luminómetro Leader™ HC+	104747
Sistema de captura de diana (Target Capture System, TCS) Hologic	104555
2 baños de calor seco/agitadores vórtex SB100	105524F
Kit de reactivos Auto Detect Aptima	301048C
Kit de fluidos del Aptima assay	302002C
Micropipeta de 1.000 µL RAININ PR1000	104216
2 pipetas Eppendorf Repeater Plus	105725
Puntas para pipeta de repetición (2,5 ml, 5,0 ml, 25,0 ml)	—
Puntas de 1.000 µL P1000	105049

Hologic ofrece de forma exclusiva puntas de diámetros especiales

Unidades de diez tubos (Ten Tube Units, TTU)	TU0022
Gradilla para TTU	104579
Casetes de diez puntas (Ten Tip Cassettes, TTC)	104578
Kit de transferencia de muestras Aptima	301154C
Kit de recogida y transporte de muestras de citología Aptima	302657
Lejía (solución de hipoclorito de sodio al 5 % o 0,7 M como mínimo)	—
Guantes desechables	—
Tapones perforables Aptima	105668
Tapones no perforables de repuesto	103036A

Materiales opcionales

	<u>REF.</u>
Instrumento TECAN Freedom EVO 100/4	900932
Conjunto de placas de la plataforma Aptima DTS 800	105200
Puntas conductoras de 1.000 µL para detección de líquido	10612513 (Tecan)
Depósito de reactivos (cuarto de módulo de 40 ml)	104765
Depósito de reactivos dividido (2 cuartos de módulo de 19 ml)	901172
Potenciador de lejía para limpieza	302101

Procedimiento de prueba en los DTS Systems

A. Preparación del equipo y la zona de trabajo:

1. Antes de iniciar el ensayo, limpie las superficies de trabajo y las pipetas con una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 %-3,5 % (de 0,35 M a 0,5 M). Deje la solución en contacto con las superficies y las pipetas durante 1 minuto como mínimo y luego enjuague con agua. No deje que la solución de lejía se seque. Cubra la superficie de la mesa en la que va a realizar la prueba con un papel de filtro plastificado.
2. Coloque una cantidad suficiente de casetes de diez puntas en el sistema de captura de diana (Target Capture System, TCS). Asegúrese de que el frasco de lavado del TCS esté lleno de solución de lavado y de que el peine múltiple de aspiración esté conectado a la bomba de vacío. Consulte el *Target Capture System Operator's Manual* (Manual del usuario del Sistema de captura de diana).
3. Prepare el instrumento TECAN Freedom EVO siguiendo las instrucciones del manual del usuario y la hoja de aplicaciones para el HPV.
4. Prepare el instrumento SB100 de pre-amplificación siguiendo las instrucciones del manual del usuario y la hoja de aplicaciones para el HPV. Encienda el instrumento e inicie el protocolo "Aptima HPV PREAMP" para permitir que el instrumento se caliente a 62 °C.
5. Una vez finalizado el Paso de amplificación, prepare el instrumento SB100 de post-amplificación siguiendo las instrucciones del manual del usuario y la hoja de aplicaciones para el HPV. Encienda el instrumento e inicie el protocolo "Aptima HPV PSTAMP" para permitir que el instrumento se caliente a 62 °C.
6. Una vez completado el Paso de amplificación, prepare el luminómetro Leader HC+ siguiendo las instrucciones del manual del usuario, después de añadir reactivo de sonda como se describe en los pasos de post-amplificación.

B. Reconstitución de reactivos y preparación de un nuevo kit.

Nota: La reconstitución de los reactivos debe llevarse a cabo antes de iniciar la transferencia de las muestras.

1. Para reconstituir los reactivos de amplificación, enzimático y de sonda de HPV Aptima, combine los frascos de los reactivos liofilizados con la solución de reconstitución. Si las soluciones de reconstitución están refrigeradas, espere a que se equilibren a la temperatura ambiente antes de utilizarlas.
 - a. Empareje cada solución de reconstitución con el reactivo liofilizado correspondiente. Asegúrese de que los colores de las etiquetas de la solución de reconstitución y del reactivo liofilizado coincidan antes de acoplar el collar de reconstitución.
 - b. Abra el vial del reactivo liofilizado e inserte firmemente el extremo ranurado del collar de reconstitución en la abertura del vial (Figura 1, Paso 1).
 - c. Abra el frasco de solución de reconstitución correspondiente, y deje el tapón sobre una superficie de trabajo limpia y cubierta.
 - d. A la vez que sujeta el frasco de la solución sobre la mesa del laboratorio, inserte firmemente el otro extremo del collar de reconstitución en la abertura del frasco (Figura 1, Paso 2).
 - e. Invierta lentamente el frasco y el vial acoplados. Deje que la solución escurra al interior del recipiente de vidrio (Figura 1, Paso 3).
 - f. Agite la solución girándola suavemente en el vial hasta mezclarla bien. Evite que se forme espuma al agitar el vial (Figura 1, Paso 4).
 - g. Espere a que el reactivo liofilizado entre en solución y luego invierta de nuevo el frasco y el vial acoplados, inclinándolos en un ángulo de 45° para reducir al mínimo la formación de espuma (Figura 1, Paso 5). Deje que escurra todo el líquido de nuevo en el frasco.
 - h. Retire el collar de reconstitución y el vial de vidrio (Figura 1, Paso 6).
 - i. Vuelva a tapar el frasco de plástico. Anote las iniciales del usuario y la fecha de reconstitución en los viales de reactivos reconstituídos (Figura 1, Paso 7).
 - j. Deseche el collar de reconstitución y el vial de vidrio (Figura 1, Paso 8).

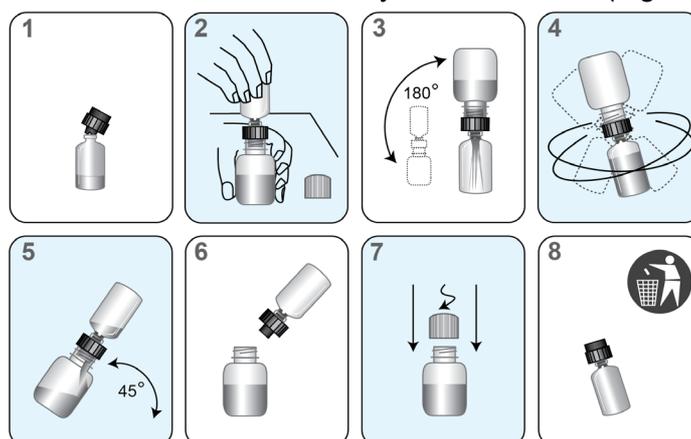


Figura 1. Proceso de reconstitución en los DTS Systems

2. Preparación del reactivo de captura de diana en uso (working Target Capture Reagent, wTCR):
 - a. Empareje los frascos adecuados de TCR y CI.
 - b. Abra el frasco de TCR y deje el tapón sobre una superficie de trabajo limpia y cubierta.

- c. Abra el frasco de CI y vierta todo su contenido en un frasco de TCR. Puede quedar una pequeña cantidad de líquido en el vial de CI.
 - d. Tape el frasco de TCR y agite la solución girándola suavemente hasta mezclar bien el contenido. Evite que se forme espuma durante este Paso.
 - e. Anote en la etiqueta las iniciales del usuario y la fecha actual.
 - f. Deseche el frasco de CI y el tapón correspondiente.
 - g. Se pueden formar precipitados en el wTCR. Los precipitados se pueden disolver calentando el wTCR a una temperatura entre 42 °C y 60 °C durante no más de 90 minutos. Espere a que el wTCR se equilibre a la temperatura ambiente antes de utilizarlo.
3. Prepare el reactivo de selección.

Si el reactivo de selección contiene precipitados, caliéntelo a 60 °C ± 1 °C durante 45 minutos como máximo para facilitar la disolución del precipitado. Mezcle suavemente el frasco cada 5 a 10 minutos. Espere a que el reactivo de selección se equilibre a la temperatura ambiente antes de utilizarlo. No lo utilice si persiste el precipitado o el contenido está turbio.

C. Preparación de los reactivos previamente reconstituidos:

1. Los reactivos de amplificación, enzimático y de sonda reconstituidos anteriormente deben alcanzar la temperatura ambiente (de 15 °C a 30 °C) antes de que se inicie el ensayo.
2. Si el reactivo de sonda reconstituido contiene precipitados que no entran en solución a temperatura ambiente, caliéntelo a una temperatura no superior a 60 °C durante 1 ó 2 minutos. Después de resuspender el contenido, mézclelo suavemente por inversión. No utilice el reactivo si tiene precipitados o está turbio.
3. Si el wTCR contiene precipitados, caliéntelo entre 42 °C y 60 °C durante 90 minutos como máximo. Espere a que el wTCR se equilibre a la temperatura ambiente antes de utilizarlo.
4. Si el reactivo de selección contiene precipitados, caliéntelo a 60 °C ± 1 °C durante 45 minutos como máximo para facilitar la disolución del precipitado. Mezcle suavemente el frasco cada 5 a 10 minutos. Espere a que el reactivo de selección se equilibre a la temperatura ambiente antes de utilizarlo. No lo utilice si persiste el precipitado o el contenido está turbio.
5. Mezcle bien cada reactivo invirtiéndolo suavemente antes de utilizarlo. Evite que se forme espuma durante inversión de los reactivos.

D. Preparación de las gradillas:

1. Antes del procesamiento, deje que los calibradores, los controles y las muestras se equilibren a la temperatura ambiente.
2. No agite las muestras en un mezclador vórtex.
3. Inspeccione los tubos de muestra antes de perforarlos. Si un tubo de muestra contiene burbujas o tiene un volumen inferior al observado habitualmente, centrifugue el tubo durante 5 minutos a 420 RCF para asegurarse de que no queda líquido en el tapón.

Nota: Si no se sigue el Paso 3, podría perderse líquido por el tapón del tubo de muestra.

4. Coloque suficientes TTU en la gradilla de TTU para todos los calibradores, controles y muestras.

5. (Opcional) Cree una lista de trabajo con el software Aptima Worklist Editor. Consulte el apartado Worklist Editor del *Aptima Assay Software Operator's Manual* (Manual del usuario del software del Aptima Assay) para obtener instrucciones específicas.

Opción de pipeteo manual:

1. Mezcle bien el wTCR (TCR más CI). Con una pipeta de repetición, añada 100 µL de wTCR a cada tubo de reacción.
2. Con una micropipeta, perfore el tapón del tubo de muestra teniendo cuidado de no introducir la punta hasta el fondo del tubo.
3. Utilice una punta de pipeta nueva para cada calibrador, control y muestra.
4. Agregue 400 µL de calibrador negativo a los primeros tres tubos de la primera TTU.
5. Agregue 400 µL de calibrador positivo a los tubos 4-6 de la primera TTU.
6. Agregue 400 µL de control negativo al tubo 7 de la primera TTU.
7. Agregue 400 µL de control positivo al tubo 8 de la primera TTU.
8. Agregue 400 µL de cada muestra a los tubos restantes.
9. Una vez que haya pipeteado todas las muestras, cubra las TTU con tarjetas de sellado y continúe con la captura de diana.

Opción de instrumento TECAN Freedom EVO.

Consulte la *TECAN Freedom EVO 100/4 Application Sheet for the Aptima HPV Assay* (Hoja de aplicaciones del TECAN Freedom EVO 100/4 para el Aptima HPV Assay) para obtener instrucciones específicas sobre cómo añadir el wTCR y las muestras si se utiliza este instrumento.

E. Captura de diana.

Para obtener información detallada sobre el uso del instrumento SB100 con el Aptima HPV Assay, consulte la *SB100 Dry Heat Bath/Vortexer Application Sheet for the Aptima HPV Assay* (Hoja de aplicaciones del baño de calor seco/agitador vórtex SB100 para el Aptima HPV Assay).

Para obtener información sobre la utilización del sistema de captura de diana de Hologic, consulte el *Target Capture System Operator's Manual* (Manual del usuario del sistema de captura de diana).

Nota: La pipeta de repetición utilizada en los pasos de captura de diana y amplificación debe utilizarse solo en estos pasos. Consulte Advertencias y precauciones para obtener más información.

1. Cubra las tarjetas de sellado con el marco SB100.
2. Cuando el instrumento SB100 haya alcanzado los 62 °C, sujete juntos el marco y la gradilla para asegurarse de que todas las TTU estén fijadas en su posición en la gradilla, y deposite la gradilla en el bloque de calentamiento. Tenga cuidado de que el contenido no salpique en las tarjetas de sellado. Gire los mandos negros hasta que los cojinetes encajen en los orificios del marco.
3. Pulse la tecla adecuada para iniciar el programa.
4. Cuando lo indique la pantalla del SB100 una vez finalizada la última incubación, retire con cuidado la gradilla del bloque de calentamiento, teniendo cuidado de que el contenido no salpique en las tarjetas de sellado.
5. Coloque la gradilla en la base magnética del sistema de captura de diana (Target Capture System, TCS) durante 5 a 10 minutos. Realice los siguientes pasos de lavado:
 - a. Cebe las líneas de la bomba de la estación de distribución bombeando solución de lavado a través del peine múltiple de distribución. Bombee suficiente líquido a

través del sistema de forma que no queden burbujas de aire en la línea y que las 10 boquillas suministren un flujo continuo de líquido.

- b. Encienda la bomba de vacío y desconecte el peine múltiple de aspiración del primer conector entre el peine múltiple y la botella trampa. Asegúrese de que el medidor de vacío cumple las especificaciones de la prueba de fugas. Pueden pasar 15 segundos hasta que se alcance esta lectura. Vuelva a conectar el peine múltiple y asegúrese de que el medidor de vacío cumple las especificaciones del nivel de vacío. Deje encendida la bomba de vacío hasta que finalicen todos los pasos de la captura de diana y el peine múltiple de aspiración esté seco.
 - c. Acople firmemente el peine múltiple de aspiración al primer conjunto de puntas. aspire todo el líquido bajando las puntas al interior de la primera TTU hasta que las puntas entren levemente en contacto con el fondo de los tubos. No mantenga las puntas en contacto con el fondo de los tubos.
 - d. Una vez finalizada la aspiración, expulse las puntas en el casete de puntas original. Repita los pasos de aspiración con el resto de las TTU, usando una punta dedicada para cada muestra.
 - e. Coloque el peine múltiple de distribución sobre cada TTU y, con la bomba de la estación de distribución, añada 1,0 ml de solución de lavado a cada uno de los tubos de la TTU.
 - f. Cubra los tubos con una tarjeta de sellado y retire la gradilla del TCS.
6. Cubra las tarjetas de sellado con el marco SB100 y deposítelo en el bloque de calentamiento del SB100. Seleccione la tecla adecuada para agitar en vórtex los tubos. Una vez finalizada la agitación en vórtex, retire la gradilla.
 7. En el instrumento SB100, pulse la tecla adecuada para continuar con el precalentamiento del bloque.
 8. Coloque la gradilla nuevamente en el TCS y repita los pasos de aspiración 5c y 5d anteriores.
 9. Después de la aspiración final, retire la gradilla de la base magnética del TCS e inspeccione los tubos visualmente para asegurarse de que se ha aspirado todo el líquido y todos los tubos contienen un sedimento de partículas magnéticas. Si hay líquido visible, coloque la gradilla nuevamente en la base del TCS base durante 2 minutos y repita la aspiración de la TTU con las mismas puntas utilizadas anteriormente para cada muestra.
 10. Continúe con el Paso de amplificación.

F. Amplificación:

1. Añada reactivo de amplificación y de aceite.

Opción de pipeteo manual:

- a. Con la pipeta de repetición, añada 75 μ L de reactivo de amplificación reconstituido a cada tubo de reacción. Todas las mezclas de reacción de la gradilla deben estar de color rojo.
- b. Con la pipeta de repetición, añada 200 μ L de reactivo de aceite.
- c. Cubra los tubos con tarjetas de sellado.
- d. Continúe con el Paso 2.

Opción de instrumento TECAN Freedom EVO.

Consulte la *TECAN Freedom EVO 100/4 Application Sheet for the Aptima HPV Assay* (Hoja de aplicaciones del TECAN Freedom EVO 100/4 para el Aptima HPV

Assay) para obtener instrucciones específicas sobre la adición de los reactivos de amplificación y de aceite si utiliza este instrumento.

2. Cubra las tarjetas de sellado con el marco SB100 y deposite la gradilla en el bloque de calentamiento.
3. Pulse la tecla adecuada para iniciar la incubación.
4. Cuando el sistema se lo indique, retire el marco SB100. Retire y deseche las tarjetas de sellado, y añada 25 µL de reactivo enzimático reconstituido con una pipeta de repetición mientras la gradilla todavía está en el bloque de calentamiento.
5. Cubra los tubos con tarjetas de sellado nuevas y el marco SB100.
6. Pulse la tecla adecuada para iniciar la incubación de amplificación.
7. Una vez finalizado el Paso de incubación, retire la gradilla del instrumento SB100 y continúe con el Paso de post-amplificación.

G. Post-amplificación

Encienda el instrumento SB100 de post-amplificación y seleccione el protocolo "Aptima HPV PSTAMP" para permitir que el instrumento se caliente a 62 °C.

Para obtener información específica sobre la utilización del instrumento SB100 con el Aptima HPV Assay, consulte la *SB100 Dry Heat Bath/Vortexer Application Sheet for the Aptima HPV Assay* (Hoja de aplicaciones del baño de calor seco/agitador vórtex SB100 para el Aptima HPV Assay).

Nota: La pipeta de repetición utilizada en la detección debe emplearse solo en estos pasos. Consulte el apartado Advertencias y precauciones.

Nota: Los pasos de post-amplificación deben realizarse en una zona separada de donde se realizó la preparación de los reactivos y los pasos de pre-amplificación. Consulte las Notas sobre el procedimiento.

1. Retire y deseche las tarjetas de sellado.
2. Con una pipeta de repetición, añada 100 µL de reactivo de sonda reconstituido a cada tubo de reacción. Todas las mezclas de reacción deben tener un color amarillo.
3. Cubra los tubos con tarjetas de sellado y el marco SB100, y deposite la gradilla en el bloque de calentamiento.
4. Pulse la tecla adecuada para iniciar los pasos de agitación en vórtex e incubación.
5. Una vez finalizado el Paso de incubación, retire la gradilla e incube a temperatura ambiente durante 5 minutos. Asegúrese de seleccionar la tecla adecuada en el teclado del SB100 para iniciar el tiempo de incubación.
6. Cuando finalicen los 5 minutos, tal como se indica en la pantalla del SB100, añada 250 µL de reactivo de selección a cada tubo de reacción con la pipeta de repetición. Todas las mezclas de reacción deben tener un color rosa.
7. Cubra los tubos con tarjetas de sellado y con el marco SB100, y deposite la gradilla en el bloque de calentamiento. Pulse la tecla adecuada para iniciar los pasos de agitación en vórtex e incubación.
8. Una vez finalizada la incubación, retire la gradilla del instrumento SB100 y continúe con la detección.

H. Detección:

1. El Paso de detección debe realizarse entre 18 °C y 28 °C.
2. Asegúrese de que se dispone de un volumen suficiente de reactivos Auto Detect 1 y 2 para todas las pruebas.

3. Prepare el luminómetro Leader HC+ colocando una TTU vacía en la posición del casete número 1 y ejecutando el protocolo WASH (Lavado). Consulte el *Leader HC+ Luminometer Operator's Manual* (Manual del usuario del luminómetro Leader HC+) para obtener instrucciones específicas.
4. Cargue las TTU en el luminómetro.
5. Inicie una sesión en el software del Aptima HPV Assay. Si se ha creado una lista de trabajo, asegúrese de que la ruta adecuada está habilitada para que el software del Aptima HPV Assay pueda localizar la lista de trabajo correcta.
6. Haga clic en **NEW RUN** (NUEVO CICLO). Si no se ha creado una lista de trabajo, introduzca el número de tubos (calibradores, controles y muestras). Haga clic en **NEXT** (SIGUIENTE) para iniciar el ciclo.

Nota: El ciclo debe completarse en las 2 horas siguientes a la finalización de la incubación del Paso de selección.

7. Prepare el fluido de desactivación mezclando volúmenes iguales de solución de hipoclorito de sodio al 5 %-7 % (de 0,7 M a 1,0 M) y tampón para fluido de desactivación Aptima en un recipiente plástico grande con tapa. Etiquete el recipiente de plástico y anote la fecha de caducidad. El fluido de desactivación es estable a temperatura ambiente durante 4 semanas.
8. Después de retirar las TTU usadas del luminómetro, colóquelas en el recipiente con fluido de desactivación. Mantenga las TTU en el recipiente durante 15 minutos antes de desecharlas. El director del laboratorio debe establecer los métodos de manipulación y eliminación adecuados.

Notas sobre el procedimiento

A. Calibradores.

Cada ciclo de 100 pruebas como máximo debe contener tres réplicas de cada calibrador negativo y positivo. Para que funcionen adecuadamente con el software del Aptima HPV Assay, las tres réplicas del calibrador negativo, seguidas por las tres réplicas del calibrador positivo, deben colocarse en las seis primeras posiciones de la primera TTU. Su colocación en una posición errónea hará que el ciclo falle.

B. Controles.

Cada ciclo de 100 pruebas como máximo debe contener una réplica del control negativo y otra del control positivo. El control negativo debe ocupar la séptima posición de tubo, seguido del control positivo en la octava posición de tubo. Su colocación en una posición errónea hará que el ciclo falle.

C. Pipeteo de las muestras:

1. El volumen de muestra añadido a cada tubo de reacción debe ser de $400 \mu\text{L} \pm 100 \mu\text{L}$. Se recomienda comprobar visualmente la cantidad pipeteada en la TTU para asegurarse de que se ha transferido el volumen adecuado. Se necesita el volumen de muestra adecuado para obtener resultados precisos. Si no se ha pipeteado el volumen adecuado, vuelva a pipetear el reactivo de captura de diana en uso y la muestra en un nuevo tubo de reacción.
2. Dispense con cuidado las muestras en cada tubo, evitando el contacto con el borde del tubo para reducir el riesgo de arrastre de un tubo a otro.

D. Temperatura:

1. La temperatura ambiente se define entre 15 °C y 30 °C.
2. La detección es sensible a la temperatura. La temperatura del laboratorio en la zona de detección debe estar entre 18 °C y 28 °C.

E. Tiempo.

Las reacciones de captura de diana, amplificación, hibridación y selección dependen del tiempo. Cumpla los tiempos especificados en *Procedimiento de prueba en los DTS Systems*.

F. Talco en los guantes.

Al igual que en cualquier otro sistema de reactivos, el exceso de talco de algunos guantes puede contaminar los tubos abiertos. Se recomienda utilizar guantes sin talco.

G. Descontaminación

1. Las superficies de la mesa del laboratorio y las pipetas se deben descontaminar periódicamente con una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 %- 3,5 % (de 0,35 M a 0,5 M). Deje la solución en contacto con las superficies durante 1 minuto como mínimo y luego enjuague con agua. No deje que la solución de lejía se seque. Las soluciones de cloro pueden picar el equipo y el metal. Enjuague bien el equipo con agua para evitar que se pique.
2. Desinfecte el instrumento TECAN Freedom EVO siguiendo las instrucciones del manual del usuario.
3. Desinfecte los instrumentos SB100 siguiendo las instrucciones de la *SB100 Dry Heat Bath/Vortexer Application Sheet for the Aptima HPV Assay (Hoja de aplicaciones del baño de calor seco/agitador vórtex SB100 para el Aptima HPV Assay)*.
4. Descontamine el sistema de captura de diana siguiendo las instrucciones del *Target Capture System Operator's Manual (Manual del usuario del sistema de captura de diana)*.
5. Limpie las superficies de la unidad TCS y de las puntas de expulsión de tampón de lavado con toallas de papel humedecidas con una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 %-3,5 % (de 0,35 M a 0,5 M). A continuación, enjuague con agua y seque por completo las superficies con toallas de papel.
6. Sumerja las gradillas de TTU en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 %-3,5 % (de 0,35 M a 0,5 M), asegurándose de que queden cubiertas por la solución. Mantenga las gradillas sumergidas durante 10 minutos. Una exposición más prolongada puede dañar las gradillas. Enjuague bien con agua las gradillas y colóquelas sobre un paño limpio y absorbente; deje secar las gradillas por completo al aire. Para prolongar la vida de las gradillas, déjelas secar en posición vertical, no invertida.
7. Las TTU deben descontaminarse con fluido de desactivación tal como se describe en el Paso de detección. No reutilice las TTU.

Tigris DTS System

A continuación se indican los reactivos del Aptima HPV Assay para el Tigris DTS System. Junto al nombre del reactivo se muestran también los símbolos de identificación del reactivo.

Reactivos y materiales suministrados

Kit de Aptima HPV Assay, 250 pruebas, REF. 302611 (4 cajas)

Los calibradores y los controles pueden adquirirse por separado. Consulte los números de referencia de las cajas individuales que figuran a continuación.

Caja refrigerada de HPV Aptima (conservar entre 2 °C y 8 °C al recibirla)

Símbolo	Componente	Cantidad
A	Reactivo de amplificación de HPV <i>Ácidos nucleicos no infecciosos desecados en solución tamponada con < 5 % de agente de volumen.</i>	1 vial
E	Reactivo enzimático de HPV <i>Transcriptasa inversa y RNA polimerasa desecadas en solución de tampón HEPES con < 10 % de reactivo de volumen.</i>	1 vial
P	Reactivo de sonda de HPV <i>Sondas de DNA quimioluminiscentes y no infecciosas (< 500 ng/vial) desecadas en solución de tampón succinato con < 5 % de detergente.</i>	1 vial
IC	Reactivo de control interno de HPV <i>Transcrito no infeccioso de RNA en solución tamponada con < 5 % de detergente.</i>	1 vial

Caja a temperatura ambiente de HPV Aptima (conservar entre 15 °C y 30 °C al recibirla)

Símbolo	Componente	Cantidad
AR	Solución de reconstitución de reactivo de amplificación de HPV <i>Solución acuosa con conservantes.</i>	1 vial
ER	Solución de reconstitución de reactivo enzimático de HPV <i>Solución de tampón HEPES con surfactante y glicerol.</i>	1 vial
PR	Solución de reconstitución de reactivo de sonda de HPV <i>Solución de tampón succinato con < 5 % de detergente.</i>	1 vial
S	Reactivo de selección de HPV <i>Solución de tampón borato 600 mM con surfactante.</i>	1 vial
TCR	Reactivo de captura de diana de HPV <i>Ácidos nucleicos no infecciosos en solución tamponada con fase sólida (< 0,5 mg/ml).</i>	1 vial
	Collares de reconstitución	3
	Hoja de códigos de barras del lote maestro	1 hoja

Caja de calibradores de HPV Aptima (REF. 302554)
(conservar entre 2 °C y 8 °C al recibirla)

Símbolo	Componente	Cantidad
PCAL	Calibrador positivo de HPV <i>Transcrito no infeccioso de HPV 16 in vitro a 1.000 copias/ml en solución tamponada con < 5 % de detergente.</i>	5 viales
NCAL	Calibrador negativo de HPV <i>Solución tamponada con < 5 % de detergente.</i>	5 viales

Caja de controles de HPV Aptima (REF. 302556)
(conservar entre 2 °C y 8 °C al recibirla)

Símbolo	Componente	Cantidad
PC	Control positivo de HPV <i>Células cultivadas negativas y positivas para HPV, lisadas e inactivadas, a una concentración de 25 células/ml en solución tamponada con < 5 % de detergente.</i>	5 viales
NC	Control negativo de HPV <i>Células cultivadas negativas para HPV inactivadas y lisadas, en solución de tampón con < 5 % de detergente.</i>	5 viales

Materiales necesarios pero no suministrados

Nota: A menos que se indique lo contrario, los materiales disponibles en Hologic aparecen en la lista con el número de referencia.

	<u>REF.</u>
Tigris DTS System	105118
Kit de fluidos del Aptima assay <i>(solución de lavado Aptima, tampón para fluido de desactivación Aptima y reactivo de aceite Aptima)</i>	302382
Kit de reactivos Auto Detect Aptima	301048
Kit de conservante del fluido del Aptima System	302380
Puntas conductoras de 1.000 µL para detección de líquido	10612513 (Tecan)
Kit del ciclo del Tigris DTS System	301191
<i>Unidades multitubo (Multi-tube units, MTU)</i>	<i>104772-02</i>
<i>Bolsa para puntas/MTU desechadas</i>	<i>900907</i>
<i>Deflectores de MTU desechadas</i>	<i>900931</i>
<i>Cubiertas para MTU desechadas</i>	<i>105523</i>
Kit de transferencia de muestras Aptima	301154C
Kit de recogida y transporte de muestras de citología Aptima	302657
Tapones perforables Aptima	105668
Tapones no perforables de repuesto	103036A
Tapones de repuesto para las soluciones de reconstitución de los reactivos de amplificación y de sonda	CL0041
Tapones de repuesto para la solución de reconstitución del reactivo enzimático	501616
Tapones de repuesto para el TCR y el reactivo de selección	CL0040

Lejía (solución de hipoclorito de sodio al 5 % o 0,7 M como mínimo)	—
Agua para el Tigris DTS System	—
<i>consulte las especificaciones en el Tigris DTS System Operator's Manual (Manual del usuario del Tigris DTS System)</i>	
Guantes desechables	—
Kit de solución de transferencia Aptima (solo para muestras en SurePath)	303658

Materiales opcionales

	<u>REF.</u>
Potenciador de lejía para limpieza	302101

Procedimiento de prueba en el Tigris DTS System

Nota: Consulte el *Tigris DTS System Operator's Manual (Manual del usuario del Tigris DTS System)* para obtener información adicional sobre los procedimientos en el Tigris DTS System.

A. Preparación de la zona de trabajo.

Limpie las superficies de trabajo donde se prepararán los reactivos y las muestras. Limpie las superficies de trabajo con una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 %-3,5 % (de 0,35 M a 0,5 M). Deje la solución de hipoclorito de sodio en contacto con las superficies durante 1 minuto como mínimo y luego enjuague con agua. No deje que la solución de hipoclorito de sodio se seque. Cubra la superficie de la mesa en la que se van a preparar los reactivos y las muestras con un papel de filtro plastificado.

B. Preparación de los reactivos de un nuevo kit.

Nota: La reconstitución de los reactivos debe llevarse a cabo antes de iniciar cualquier tarea en el Tigris DTS System.

1. Para reconstituir los reactivos de amplificación, enzimático y de sonda, combine los frascos de los reactivos liofilizados con la solución de reconstitución. Si las soluciones de reconstitución están refrigeradas, espere a que se equilibren a la temperatura ambiente antes de utilizarlas.
 - a. Empareje cada solución de reconstitución con el reactivo liofilizado correspondiente. Asegúrese de que los colores de las etiquetas de la solución de reconstitución y del reactivo liofilizado coincidan antes de acoplar el collar de reconstitución.
 - b. Compruebe los números de lote en la hoja de códigos de barras del lote maestro para asegurarse de que está emparejando los reactivos adecuados.
 - c. Abra el vial del reactivo liofilizado e inserte firmemente el extremo ranurado del collar de reconstitución en la abertura del vial (Figura 2, Paso 1).
 - d. Abra la solución de reconstitución correspondiente y deje el tapón sobre una superficie de trabajo limpia y cubierta.
 - e. A la vez que sujeta el frasco de la solución sobre la mesa del laboratorio, inserte firmemente el otro extremo del collar de reconstitución en la abertura del frasco (Figura 2, Paso 2).
 - f. Invierta lentamente los frascos acoplados. Deje que la solución pase del frasco al vial de vidrio (Figura 2, Paso 3).
 - g. Agite la solución girándola suavemente en el frasco hasta mezclarla bien. Evite que se forme espuma al agitar el frasco (Figura 2, Paso 4).

- h. Espere a que el reactivo liofilizado entre en solución y luego invierta de nuevo los frascos acoplados, inclinándolos en un ángulo de 45° para reducir al mínimo la formación de espuma (Figura 2, Paso 5). Deje que escurra todo el líquido de nuevo en el frasco de plástico.
- i. Retire el collar de reconstitución y el vial de vidrio (Figura 2, Paso 6).
- j. Vuelva a tapar el frasco de plástico. Anote las iniciales del usuario y la fecha de reconstitución en todos los viales de reactivos reconstituidos (Figura 2, Paso 7).
- k. Deseche el collar de reconstitución y el vial de vidrio (Figura 2, Paso 8).

Advertencia: Evite que se forme espuma al reconstituir los reactivos. La espuma afecta a la detección del nivel en el Tigris DTS System.

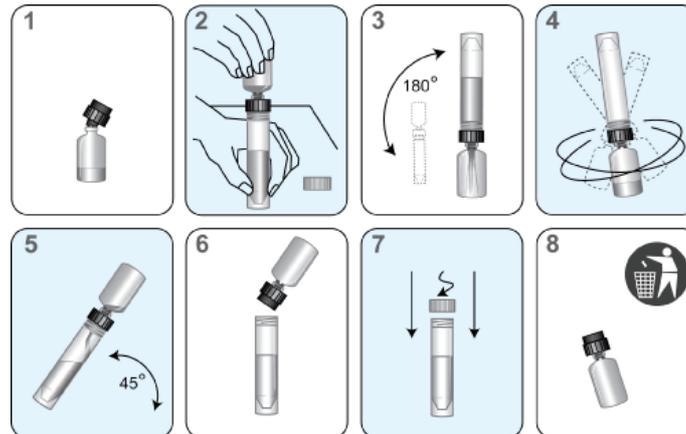


Figura 2. Proceso de reconstitución en el Tigris DTS System

2. Prepare el reactivo de captura de diana en uso (working Target Capture Reagent, wTCR):
 - a. Empareje los frascos adecuados de TCR y CI.
 - b. Compruebe los números de lote de los reactivos en la Hoja de códigos de barras del lote maestro para asegurarse de que está emparejando los reactivos adecuados del kit.
 - c. Abra el frasco de TCR y deje el tapón sobre una superficie de trabajo limpia y cubierta.
 - d. Abra el frasco de CI y vierta el contenido completo en el frasco de TCR. Es normal que quede una pequeña cantidad de líquido en el frasco del CI.
 - e. Tape el frasco de TCR y agite la solución girándola suavemente para mezclar el contenido. Evite que se forme espuma durante este Paso.
 - f. Anote en la etiqueta las iniciales del usuario y la fecha actual.
 - g. Deseche el frasco de CI y el tapón correspondiente.
 - h. Se pueden formar precipitados en el wTCR, lo que puede dar lugar a resultados no válidos debido a errores en la verificación del volumen. El precipitado se puede disolver calentando el wTCR a una temperatura entre 42 °C y 60 °C durante 90 minutos como máximo. Espere a que el wTCR se equilibre a la temperatura ambiente antes de utilizarlo. No utilice el reactivo si persiste el precipitado.
3. Prepare el reactivo de selección:
 - a. Compruebe el número de lote del reactivo en la hoja de códigos de barras del lote maestro para asegurarse de que forma parte del kit.

- b. Si el reactivo de selección contiene precipitados, caliéntelo a $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 45 minutos como máximo para facilitar su disolución. Mezcle suavemente el frasco cada 5 a 10 minutos. Espere a que el reactivo de selección se equilibre a la temperatura ambiente antes de utilizarlo. No lo utilice si persiste el precipitado o el contenido está turbio.

Nota: Mezcle bien todos los reactivos por inversión suave antes de cargarlos en el sistema. Evite que se forme espuma durante inversión de los reactivos.

C. Preparación de los reactivos previamente reconstituidos:

1. Los reactivos de amplificación, enzimático y de sonda reconstituidos con anterioridad deben alcanzar la temperatura ambiente (de $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$) antes de que se inicie el ensayo.
2. Si el reactivo de sonda reconstituido contiene precipitados que no entran en solución a temperatura ambiente, caliéntelo a una temperatura no superior a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 a 2 minutos. No utilice el reactivo si tiene precipitados o está turbio.
3. Si el wTCR contiene precipitados, caliéntelo entre $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 minutos como máximo. Espere a que el wTCR se equilibre a la temperatura ambiente antes de utilizarlo. No utilice el reactivo si persiste el precipitado.
4. Si el reactivo de selección contiene precipitados, caliéntelo a $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 45 minutos como máximo para facilitar la disolución del precipitado. Mezcle suavemente el frasco cada 5 a 10 minutos. Espere a que el reactivo de selección se equilibre a la temperatura ambiente antes de utilizarlo. No lo utilice si persiste el precipitado o el contenido está turbio.
5. Mezcle bien cada reactivo por inversión suave antes de cargarlo en el sistema. Evite que se forme espuma durante inversión de los reactivos.
6. No llene en exceso los frascos de reactivos. El Tigris DTS System reconocerá y rechazará los frascos demasiado llenos.

D. Manipulación de las muestras:

1. Antes del procesamiento, deje que los calibradores, los controles y las muestras se equilibren a la temperatura ambiente.
2. **No agite las muestras en un mezclador vórtex.**
3. Las muestras de citología en solución SurePath deben tratarse con proteinasa K antes de analizarlas con el Aptima HPV Assay, siguiendo con las instrucciones de *Recogida y conservación de las muestras*, apartado C.
4. Inspeccione los tubos de muestra antes de cargarlos en la gradilla. Si un tubo de muestra contiene burbujas o tiene un volumen inferior al observado habitualmente, centrifugue el tubo durante 5 minutos a 420 RCF para asegurarse de que no queda líquido en el tapón.

Nota: Si no se sigue el Paso 4, podría perderse líquido por el tapón del tubo de muestra.

E. Preparación del sistema.

Prepare el instrumento y la lista de trabajo siguiendo las instrucciones del *Tigris DTS System Operator's Manual* (Manual del usuario del Tigris DTS System) y del apartado *Notas sobre el procedimiento* que aparece a continuación.

Notas sobre el procedimiento

A. Calibradores:

1. Cada lista de trabajo debe contener 3 réplicas del calibrador negativo y del calibrador positivo. Para que funcionen adecuadamente con el software del Aptima HPV Assay, el calibrador negativo debe estar situado en la primera posición de tubo de la primera gradilla de la lista de trabajo y el calibrador positivo debe estar situado en la segunda posición de tubo de la primera gradilla de la lista de trabajo.
2. Cualquier intento de pipetear más de tres réplicas de un tubo de calibrador puede dar lugar a errores de volumen insuficiente.

B. Controles:

1. El software del Aptima HPV Assay requiere controles al inicio y al final de cada ciclo. El control negativo debe colocarse en la tercera posición de tubo de la primera gradilla y en la penúltima posición de tubo de la última gradilla de la lista de trabajo. El control positivo debe colocarse en la cuarta posición de tubo de la primera gradilla y en la última posición de tubo de la última gradilla de la lista de trabajo.
2. Cualquier intento de pipetear más de una vez de un tubo de control puede dar lugar a errores de volumen insuficiente.

C. Temperatura.

La temperatura ambiente se define entre 15 °C y 30 °C.

D. Talco en los guantes.

Al igual que en cualquier otro sistema de reactivos, el exceso de talco de algunos guantes puede contaminar los tubos abiertos. Se recomienda utilizar guantes sin talco.

Panther System

A continuación se detallan los reactivos para el Aptima HPV Assay en el Panther System. Junto al nombre del reactivo se muestran también los símbolos de identificación del reactivo.

Reactivos y materiales suministrados

Aptima HPV Assay, 250 pruebas, REF. 303093 (3 cajas)

Aptima HPV Assay, 100 pruebas, REF. 302929 (3 cajas)

Los calibradores pueden adquirirse por separado. Consulte los números de referencia individuales a continuación.

Caja refrigerada de HPV Aptima (conservar entre 2 °C y 8 °C al recibirla)

Símbolo	Componente	Cantidad
A	Reactivo de amplificación de HPV <i>Ácidos nucleicos no infecciosos desecados en solución tamponada con < 5 % de agente de volumen.</i>	1 vial
E	Reactivo enzimático de HPV <i>Transcriptasa inversa y RNA polimerasa desecadas en solución de tampón HEPES con < 10 % de reactivo de volumen.</i>	1 vial
P	Reactivo de sonda de HPV <i>Sondas de DNA quimioluminiscentes y no infecciosas (< 500 ng/vial) desecadas en solución de tampón succinato con < 5 % de detergente.</i>	1 vial
IC	Reactivo de control interno de HPV <i>Transcrito no infeccioso de RNA en solución tamponada con < 5 % de detergente.</i>	1 vial

Caja a temperatura ambiente de HPV Aptima (conservar a temperatura ambiente, entre 15 °C y 30 °C, al recibirla)

Símbolo	Componente	Cantidad
AR	Solución de reconstitución de reactivo de amplificación de HPV <i>Solución acuosa con conservantes.</i>	1
ER	Solución de reconstitución de reactivo enzimático de HPV <i>Solución de tampón HEPES con surfactante y glicerol.</i>	1
PR	Solución de reconstitución de reactivo de sonda de HPV <i>Solución de tampón succinato con < 5 % de detergente.</i>	1
S	Reactivo de selección de HPV <i>Solución de tampón borato 600 mM con surfactante.</i>	1
TCR	Reactivo de captura de diana de HPV <i>Ácidos nucleicos no infecciosos en solución tamponada con fase sólida (< 0,5 mg/ml).</i>	1
	Collares de reconstitución	3
	Hoja de códigos de barras del lote maestro	1 hoja

**Caja de calibradores de HPV Aptima (REF. 302554)
(conservar entre 2 °C y 8 °C al recibirla)**

Símbolo	Componente	Cantidad
PCAL	Calibrador positivo de HPV <i>Transcrito no infeccioso de HPV 16 in vitro a 1.000 copias/ml en solución tamponada con < 5 % de detergente.</i>	5 viales
NCAL	Calibrador negativo de HPV <i>Solución tamponada con < 5 % de detergente.</i>	5 viales

Materiales necesarios pero no suministrados

Nota: A menos que se indique lo contrario, los materiales disponibles en Hologic aparecen en la lista con el número de referencia.

	<u>REF</u>
Panther System	303095
Kit de análisis Panther	303096
<i>Kit de fluidos del Aptima assay</i>	303014
<i>(solución de lavado Aptima, tampón para fluido de desactivación Aptima y reactivo de aceite Aptima)</i>	
<i>Kit de reactivos Auto Detect Aptima</i>	303013
<i>Unidades multitubo (Multi-tube units, MTU)</i>	104772-02
<i>Kit de bolsas para desechos Panther</i>	902731
<i>Tapa del recipiente de desechos Panther</i>	504405
Puntas conductoras de 1.000 µL para detección de líquido	10612513 (Tecan)
Kit de transferencia de muestras Aptima	301154C
Kit de recogida y transporte de muestras de citología Aptima	302657
Tapones perforables Aptima	105668
Tapones no perforables de repuesto	103036A
Tapones de repuesto para los kits de 250 pruebas:	
<i>Soluciones de reconstitución del reactivo de amplificación y el reactivo de sonda</i>	CL0041
<i>Solución de reconstitución del reactivo enzimático</i>	501616
<i>TCR y reactivo de selección</i>	CL0040
Tapones de repuesto para los kits de 100 pruebas:	
<i>Soluciones de reconstitución del reactivo de amplificación y el reactivo de sonda</i>	CL0041
<i>Solución de reconstitución del reactivo enzimático</i>	CL0041
<i>TCR y reactivo de selección</i>	501604
Lejía (solución de hipoclorito de sodio al 5 % o 0,7 M como mínimo)	—
Guantes desechables	—
Kit de solución de transferencia Aptima (solo para muestras en SurePath)	303658

Materiales opcionales

	<u>REF</u>
Potenciador de lejía para limpieza	302101

Procedimiento de prueba en el Panther System

Nota: Consulte el *Panther System Operator's Manual (Manual del usuario del Panther System)* para obtener más información sobre el procedimiento en este sistema.

A. Preparación de la zona de trabajo.

Limpie las superficies de trabajo donde se prepararán los reactivos y las muestras. Limpie las superficies de trabajo con una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 %-3,5 % (de 0,35 M a 0,5 M). Deje la solución de hipoclorito de sodio en contacto con las superficies durante 1 minuto como mínimo y luego enjuague con agua. No deje que la solución de hipoclorito de sodio se seque. Cubra la superficie de la mesa en la que se van a preparar los reactivos y las muestras con un papel de filtro plastificado.

B. Preparación de los reactivos de un nuevo kit.

Nota: La reconstitución de los reactivos debe llevarse a cabo antes de iniciar cualquier tarea en el Panther System.

1. Para reconstituir los reactivos de amplificación, enzimático y de sonda, combine los frascos de los reactivos liofilizados con la solución de reconstitución. Si las soluciones de reconstitución están refrigeradas, espere a que se equilibren a la temperatura ambiente antes de utilizarlas.
 - a. Empareje cada solución de reconstitución con el reactivo liofilizado correspondiente. Asegúrese de que los colores de las etiquetas de la solución de reconstitución y del reactivo coincidan antes de acoplar el collar de reconstitución.
 - b. Compruebe los números de lote en la hoja de códigos de barras del lote maestro para asegurarse de que está emparejando los reactivos adecuados.
 - c. Abra el vial del reactivo liofilizado e inserte firmemente el extremo ranurado del collar de reconstitución en la abertura del vial (Figura 3, Paso 1).
 - d. Abra la solución de reconstitución correspondiente y deje el tapón sobre una superficie de trabajo limpia y cubierta.
 - e. A la vez que sujeta el frasco de la solución sobre la mesa del laboratorio, inserte firmemente el otro extremo del collar de reconstitución en el frasco (Figura 3, Paso 2).
 - f. Invierta lentamente los frascos acoplados. Deje que la solución pase del frasco al vial de vidrio (Figura 3, Paso 3).
 - g. Agite la solución girándola suavemente en el frasco hasta mezclarla bien. Evite que se forme espuma al agitar el frasco (Figura 3, Paso 4).
 - h. Espere a que el reactivo liofilizado entre en solución y luego invierta de nuevo los frascos acoplados, inclinándolos en un ángulo de 45° para reducir al mínimo la formación de espuma (Figura 3, Paso 5). Deje que escurra todo el líquido de nuevo en el frasco de plástico.
 - i. Retire el collar de reconstitución y el vial de vidrio (Figura 3, Paso 6).
 - j. Vuelva a tapar el frasco de plástico. Anote las iniciales del usuario y la fecha de reconstitución en todos los viales de reactivos reconstituidos (Figura 3, Paso 7).
 - k. Deseche el collar de reconstitución y el vial (Figura 3, Paso 8).

Advertencia: Evite que se forme espuma al reconstituir los reactivos. La espuma afecta a la detección del nivel en el Panther System.

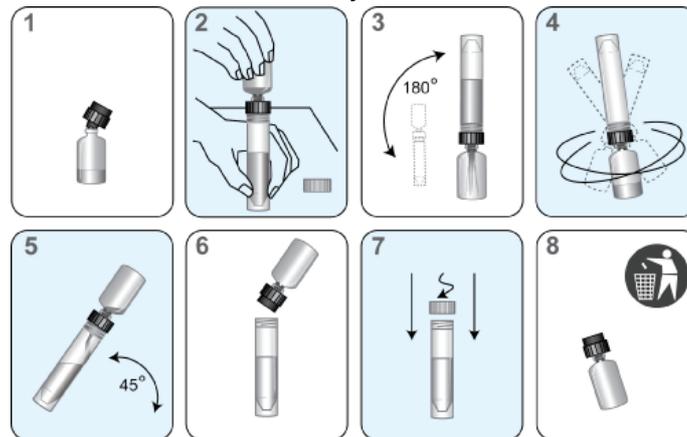


Figura 3. Proceso de reconstitución en el Panther System

2. Prepare el reactivo de captura de diana en uso (working Target Capture Reagent, wTCR):
 - a. Empareje los frascos adecuados de TCR y CI.
 - b. Compruebe los números de lote de los reactivos en la Hoja de códigos de barras del lote maestro para asegurarse de que está emparejando los reactivos adecuados del kit.
 - c. Abra el frasco de TCR y deje el tapón sobre una superficie de trabajo limpia y cubierta.
 - d. Abra el frasco de CI y vierta el contenido completo en el frasco de TCR. Es normal que quede una pequeña cantidad de líquido en el frasco del CI.
 - e. Tape el frasco de TCR y agite la solución girándola suavemente para mezclar el contenido. Evite que se forme espuma durante este Paso.
 - f. Anote en la etiqueta las iniciales del usuario y la fecha actual.
 - g. Deseche el frasco de CI y el tapón correspondiente.
 - h. Se pueden formar precipitados en el wTCR, lo que puede dar lugar a resultados no válidos debido a errores en la verificación del volumen. El precipitado se puede disolver calentando el wTCR a una temperatura entre 42 °C y 60 °C durante 90 minutos como máximo. Espere a que el wTCR se equilibre a la temperatura ambiente antes de utilizarlo. No utilice el reactivo si persiste el precipitado.
3. Prepare el reactivo de selección:
 - a. Compruebe el número de lote del reactivo en la hoja de códigos de barras del lote maestro para asegurarse de que forma parte del kit.
 - b. Si el reactivo de selección contiene precipitados, caliéntelo a 60 °C ± 1 °C durante 45 minutos como máximo para facilitar la disolución del precipitado. Mezcle suavemente el frasco cada 5 a 10 minutos. Espere a que el reactivo de selección se equilibre a la temperatura ambiente antes de utilizarlo. No lo utilice si persiste el precipitado o el contenido está turbio.

Nota: Mezcle bien todos los reactivos por inversión suave antes de cargarlos en el sistema. Evite que se forme espuma durante inversión de los reactivos.

C. Preparación de los reactivos previamente reconstituidos:

1. Los reactivos de amplificación, enzimático y de sonda reconstituidos con anterioridad deben alcanzar la temperatura ambiente (de 15°C a 30°C) antes de que se inicie el ensayo.
2. Si el reactivo de sonda reconstituido contiene precipitados que no entran en solución a temperatura ambiente, caliéntelo a una temperatura no superior a 60 °C durante 1 a 2 minutos. No utilice el reactivo si tiene precipitados o está turbio.
3. Si el wTCR contiene precipitados, caliéntelo entre 42 °C y 60 °C durante 90 minutos como máximo. Espere a que el wTCR se equilibre a la temperatura ambiente antes de utilizarlo. No utilice el reactivo si persiste el precipitado.
4. Si el reactivo de selección contiene precipitados, caliéntelo a 60 °C ± 1 °C durante 45 minutos como máximo para facilitar la disolución del precipitado. Mezcle suavemente el frasco cada 5 a 10 minutos. Espere a que el reactivo de selección se equilibre a la temperatura ambiente antes de utilizarlo. No lo utilice si persiste el precipitado o el contenido está turbio.
5. Mezcle bien cada reactivo por inversión suave antes de cargarlo en el sistema. Evite que se forme espuma durante inversión de los reactivos.
6. No llene en exceso los frascos de reactivos. El Panther System reconocerá y rechazará los frascos demasiado llenos.

D. Manipulación de las muestras:

1. Antes del procesamiento, deje que los calibradores y las muestras se equilibren a la temperatura ambiente.
2. **No agite las muestras en un mezclador vórtex.**
3. Inspeccione los tubos de muestra antes de cargarlos en la gradilla. Si un tubo de muestra contiene burbujas o tiene un volumen inferior al observado habitualmente, centrifugue el tubo durante 5 minutos a 420 RCF para asegurarse de que no queda líquido en el tapón.

Nota: Si no se sigue el Paso 3, podría perderse líquido por el tapón del tubo de muestra.

E. Preparación del sistema:

1. Prepare el sistema siguiendo las instrucciones del *Panther System Operator's Manual* (Manual del usuario del Panther System) y las *Notas sobre el procedimiento* que aparecen a continuación. Asegúrese de utilizar gradillas de reactivos y adaptadores para TCR del tamaño adecuado.
2. Cargue las muestras.

Notas sobre el procedimiento

A. Calibradores:

1. Para que el software del Aptima HPV Assay funcione correctamente en el Panther System, se requieren tres réplicas del calibrador positivo y tres réplicas del calibrador negativo. Puede cargar un vial de cada calibrador en cualquier posición de la gradilla en cualquier carril del compartimento de muestras del Panther System. El pipeteo de las muestras comenzará cuando se cumpla una de las dos condiciones siguientes:
 - a. El sistema está procesando un calibrador positivo y otro negativo.
 - b. Se han registrado resultados válidos para los calibradores en el sistema.

2. Una vez que se hayan pipeteado y se estén procesando los tubos de calibradores de un kit de reactivos específico, se pueden procesar las muestras con el kit de reactivos del ensayo asociado en un tiempo máximo de 24 horas, a menos que:
 - a. Los calibradores no sean válidos.
 - b. Se retire del sistema el kit de reactivos del ensayo asociado.
 - c. El kit de reactivos del ensayo asociado haya sobrepasado los límites de estabilidad.
 3. Cualquier intento de pipetear más de tres réplicas de un tubo de calibrador puede dar lugar a errores de procesamiento.
- B. Temperatura.
La temperatura ambiente se define entre 15 °C y 30 °C.
- C. Talco en los guantes.
Al igual que en cualquier otro sistema de reactivos, el exceso de talco de algunos guantes puede contaminar los tubos abiertos. Se recomienda utilizar guantes sin talco.

Procedimientos de control de calidad

A. Criterios de validez del ciclo.

El software determina automáticamente la validez del ciclo. El software invalidará un ciclo en cualquiera de las siguientes condiciones:

- Hay más de una réplica no válida del calibrador negativo.
- Hay más de una réplica no válida del calibrador positivo.
- Hay un control negativo no válido (DTS Systems y Tigris DTS System únicamente).
- Hay un control positivo no válido (DTS Systems y Tigris DTS System únicamente).

El usuario puede invalidar un ciclo en caso de problemas técnicos, del usuario o del instrumento, si los documenta durante la realización del ensayo.

Los ciclos no válidos deben repetirse. Los ciclos anulados deben repetirse.

B. Criterios de aceptación de los calibradores.

En la Tabla siguiente se definen los criterios de RLU para las réplicas de los calibradores negativos y positivos.

Calibrador negativo	
Analito	≥ 0 y ≤ 45.000 RLU
CI	≥ 75.000 y ≤ 400.000 RLU
Calibrador positivo	
Analito	≥ 480.000 y $\leq 1.850.000$ RLU
CI	≤ 450.000 RLU

C. Cálculo del valor de corte del CI.

El valor de corte del control interno se determina a partir de la señal del control interno (flasher) de las réplicas válidas del calibrador negativo.

$$\text{Valor de corte del CI} = 0,5 \times [\text{valor medio de RLU del control interno de las réplicas válidas del calibrador negativo}]$$

D. Cálculo del valor de corte del analito.

El valor de corte del analito se determina a partir de la señal del analito (glower) de las réplicas válidas del calibrador negativo, así como de la señal del analito de las réplicas válidas del calibrador positivo

$$\text{Valor de corte del analito} = [\text{valor medio de RLU del analito de las réplicas válidas del calibrador negativo}] + [0,09 \times \text{valor medio de RLU del analito de las réplicas válidas del calibrador positivo}]$$

E. Cálculo de la razón señal/valor de corte (Analyte Signal/Cutoff, S/CO) del analito.

La S/CO del analito se determina a partir del valor de RLU del analito de la muestra de prueba y del valor de corte del analito para el ciclo.

$$\text{S/CO del analito} = \frac{\text{RLU del analito de la muestra de prueba}}{\text{Valor de corte de analito}}$$

F. Criterios de aceptación de los controles (DTS Systems y Tigris DTS System únicamente).

El control negativo debe tener un resultado negativo válido (RLU del CI \geq valor de corte del CI y S/CO del analito $< 0,50$). El control positivo debe tener un resultado positivo válido (S/CO del analito $\geq 0,50$).

Interpretación de las pruebas

El software del ensayo determina automáticamente los resultados de las pruebas. El resultado de una prueba puede ser negativo, positivo o no válido, según se determine a partir del RLU del CI y la S/CO del analito. El resultado de una prueba también puede no ser válido debido a que otros parámetros (forma anormal de la curva cinética) se encuentran fuera de los límites normales esperados. Los resultados iniciales no válidos de las pruebas deben repetirse.

Las muestras del kit CSCT Aptima pueden diluirse para contrarrestar la presencia de posibles sustancias inhibidoras. Diluya una parte de la muestra no válida en 8 partes de medio de transporte de muestras (la solución presente en los tubos del kit CSCT); p. ej., 560 µL de muestra en un tubo nuevo del kit CSCT que contenga 4,5 ml de medio de transporte de muestras. Invierta suavemente la muestra diluida para mezclarla; evite que se forme espuma. Pruebe la muestra diluida siguiendo el procedimiento habitual del ensayo.

Nota: Se requiere un volumen mínimo de 1,7 ml para analizar una alícuota de muestra. No diluya una muestra diluida no válida. Si se obtiene un resultado no válido con una muestra diluida, se debe obtener una muestra nueva de la paciente.

Resultado del Aptima HPV Assay	Criterios
Negativo	<i>S/CO del analito < 0,50 CI ≥ Valor de corte del CI CI ≤ 2.000.000 RLU</i>
Positivo	<i>S/CO del analito ≥ 0,50 CI ≤ 2.000.000 RLU Analito ≤ 13.000.000 RLU</i>
No válido	<i>CI > 2.000.000 RLU o S/CO del analito < 0,50 y CI < Valor de corte del CI o Analito > 13.000.000 RLU</i>

Limitaciones

- A. No se ha evaluado el uso de tipos de muestras distintos a los identificados en el apartado de uso indicado.
- B. No se ha evaluado el rendimiento del Aptima HPV Assay en personas vacunadas contra el HPV.
- C. El Aptima HPV Assay no se ha evaluado en casos de sospecha de abuso sexual.
- D. La prevalencia de la infección por HPV en una población puede afectar al rendimiento. Los valores de predicción positivos disminuyen cuando las pruebas se realizan en poblaciones con una baja prevalencia o en personas sin riesgo de infección.
- E. Las muestras de citología en solución ThinPrep que contengan menos de 1 ml después de la preparación del frotis para citología ThinPrep no se consideran adecuadas para el Aptima HPV Assay.
- F. No se han evaluado las consecuencias sobre el resultado de la citología de extraer 1 ml de una muestra de citología en solución SurePath antes del procesamiento citológico.
- G. Los resultados de las pruebas pueden verse afectados por la recogida, la conservación o el procesamiento inadecuados de las muestras.
- H. El control interno supervisa los pasos de captura de diana, amplificación y detección del ensayo. No está concebido como un control de la idoneidad de las muestras de cuello uterino.
- I. El control interno supervisa los pasos de captura de diana, amplificación y detección del ensayo. No está concebido como un control de la idoneidad de las muestras de cuello uterino. Un resultado negativo en el Aptima HPV Assay no excluye la posibilidad de anomalías citológicas, ni de CIN2, CIN3 o cáncer subyacentes o futuros.
- J. Los lubricantes personales que contienen Polyquaternium 15 pueden interferir con el rendimiento del ensayo si están presentes en concentraciones superiores al 0,025 % (v/v o p/v) en una muestra de prueba.
- K. Los medicamentos antimicóticos con tioconazol pueden interferir con el rendimiento del ensayo si están presentes en concentraciones superiores al 0,075 % (p/v) en una muestra de prueba.
- L. El Aptima HPV assay proporciona resultados cualitativos. Por consiguiente, no se puede establecer una correlación entre la magnitud de la señal de un ensayo positivo y el nivel de expresión de mRNA en una muestra.
- M. La detección del mRNA del HPV de alto riesgo depende del número de copias presente en la muestra y puede verse afectada por los métodos de recogida de muestras, factores relacionados con la paciente, el estadio de la infección y la presencia de sustancias interferentes.
- N. La infección por HPV no es un indicador de HSIL citológico ni de CIN de grado alto subyacente, y tampoco significa que aparecerá CIN2, CIN3 o cáncer. La mayoría de las mujeres infectadas con uno o más tipos de HPV de alto riesgo no desarrolla CIN2, CIN3 ni cáncer.

- O. No se han evaluado los efectos de otras variables potenciales, como el flujo vaginal, el uso de tampones, duchas vaginales, etc., ni de las variables relacionadas con la recogida de muestras.
- P. El uso de este producto debe limitarse al personal que haya recibido formación sobre el uso del Aptima HPV Assay.
- Q. La contaminación cruzada de las muestras puede dar lugar a resultados positivos falsos. La tasa de arrastre del Aptima HPV Assay en el Tigris DTS System, determinada en un estudio no clínico, es del 0,3 %.
- R. Los resultados del Aptima HPV Assay deben interpretarse conjuntamente con los demás datos clínicos y de laboratorio de que disponga el médico.
- S. Esta prueba puede producir resultados positivos falsos. Los transcritos *in vitro* de los genotipos de HPV de bajo riesgo 26, 67, 70 y 82 mostraron reactividad cruzada con el Aptima HPV Assay.
- T. El material de control positivo no está concebido para supervisar el rendimiento en el valor de corte del ensayo.

Rendimiento del ensayo en los DTS Systems

Rendimiento clínico del Aptima HPV Assay con muestras de citología en solución ThinPrep

Se recogieron más de 700 muestras de citología en solución ThinPrep de mujeres europeas remitidas para seguimiento debido a: uno o más resultados de citología anormales, infección por HPV u otros motivos. Se diluyó un mililitro (1,0 ml) de cada muestra en 2,9 ml de medio de transporte de muestras Aptima y se analizó una sola réplica con el Aptima HPV Assay. Para la mayoría de las muestras, se contó con la citología, la histología y los resultados de una prueba comercial de DNA del HPV (HPV-DNA). El estado de HPV de alto riesgo de cada muestra se determinó por la concordancia entre el Aptima assay y la prueba comercial de DNA del HPV, así como por el análisis adicional de las muestras con resultados discordantes mediante una prueba de genotipificación del DNA amplificado. Se determinó la sensibilidad y la especificidad de la detección de ácidos nucleicos del HPV. La sensibilidad y la especificidad clínicas para la detección de la enfermedad, definida como neoplasia intraepitelial de cuello uterino (Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN) de grado histológico 2 o más, se calcularon tanto para la población completa de muestras como para subconjuntos específicos basados en los resultados de la citología.

La sensibilidad y la especificidad del Aptima HPV Assay para la detección del HPV de alto riesgo se muestra en la Tabla 1 para las 781 muestras analizadas en los DTS Systems. La sensibilidad del ensayo fue del 92,6 %, la especificidad del 98,5 %, y los valores de predicción positivos y negativos para la detección de HPV de alto riesgo alcanzaron el 98,8 % y el 90,9 % respectivamente.

Tabla 1: Sensibilidad y especificidad del Aptima HPV Assay en DTS Systems para la detección de HPV de alto riesgo

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

Sensibilidad (IC del 95 %) = 92,6 % (89,8-94,7)
 Especificidad (IC del 95 %) = 98,5 % (96,6-99,4)
 Valor de predicción positivo = 98,8 %
 Valor de predicción negativo = 90,9 %

La sensibilidad y la especificidad clínicas del Aptima HPV Assay para la detección de \geq CIN2 se muestran en la Tabla 2a para las 753 muestras con resultados histológicos analizadas en DTS Systems. La sensibilidad clínica del ensayo fue del 90,8 %, la especificidad, del 55,7 %, y los valores de predicción positivos y negativos para la detección de \geq CIN2 fueron del 32,1 % y del 96,3 % respectivamente. La sensibilidad del Aptima HPV Assay fue similar a la del ensayo HPV-DNA, que fue del 95,0 % (Tabla 2b), pero la especificidad del Aptima HPV Assay fue significativamente superior a la del HPV-DNA, que fue del 47,4 % para la detección de lesiones \geq CIN2 en esta población. De las 753 muestras con resultados histológicos, 159 tuvieron un resultado de citología ASCUS. La sensibilidad y la especificidad del Aptima HPV Assay en esta población fueron del 92,3 % y del 41,4 % respectivamente para la detección de \geq CIN2.

También se llevaron a cabo análisis similares con un criterio de valoración clínico de \geq CIN3. La sensibilidad y la especificidad clínicas del Aptima HPV Assay para la detección de \geq CIN3 se muestran en la Tabla 3a para las 753 muestras con resultados histológicos analizadas en

DTS Systems. La sensibilidad clínica del ensayo fue del 97,7 %, la especificidad, del 52,9 %, y los valores de predicción positivos y negativos para la detección de \geq CIN3 fueron del 21,3 % y del 99,4 %, respectivamente. Una vez más, la sensibilidad del Aptima HPV Assay fue similar a la del ensayo HPV-DNA, cuya sensibilidad para la detección de \geq CIN3 fue del 98,9 % (Tabla 3b). La especificidad del Aptima HPV Assay fue significativamente mayor que la del ensayo HPV-DNA, que fue del 44,4 % para la detección de lesiones \geq CIN3 en esta población. De las 753 muestras con resultados histológicos, 159 tuvieron un resultado de citología ASCUS. La sensibilidad y la especificidad del Aptima HPV Assay en esta población fueron del 100 % y del 40,1 % respectivamente para la detección de \geq CIN3.

Estos resultados, que arrojan una sensibilidad similar y una especificidad significativamente superior con el Aptima HPV Assay, en comparación con la detección de DNA de alto riesgo, son similares a los resultados obtenidos en otros estudios.^{27,28,29,30,31}

Tabla 2a: Sensibilidad y especificidad del Aptima HPV Assay para la detección de la enfermedad (\geq CIN2) en los DTS Systems

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

Sensibilidad (IC del 95 %) = 90,8 % (84,9-94,5)
 Especificidad (IC del 95 %) = 55,7 % (51,8-59,6)
 Valor de predicción positivo = 32,1 %
 Valor de predicción negativo = 96,3 %

Tabla 2b: Sensibilidad y especificidad del ensayo HPV-DNA para la detección de la enfermedad (\geq CIN2)

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

Sensibilidad (IC del 95 %) = 95,0 % (90,1-97,6)
 Especificidad (IC del 95 %) = 47,4 % (43,5-51,4)
 Valor de predicción positivo = 29,4 %
 Valor de predicción negativo = 97,6 %

Tabla 3a: Sensibilidad y especificidad del Aptima HPV Assay para la detección de la enfermedad (\geq CIN3) en los DTS Systems

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

Sensibilidad (IC del 95 %) = 97,7 % (92,0-99,4)
 Especificidad (IC del 95 %) = 52,9 % (49,1-56,6)
 Valor de predicción positivo = 21,3 %
 Valor de predicción negativo = 99,4 %

Tabla 3b: Sensibilidad y especificidad del ensayo HPV-DNA para la detección de la enfermedad (\geq CIN3)

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

Sensibilidad (IC del 95 %) = 98,9 % (93,8-99,8)
 Especificidad (IC del 95 %) = 44,4 % (40,7-48,2)
 Valor de predicción positivo = 18,9 %
 Valor de predicción negativo = 99,7 %

Rendimiento clínico del Aptima HPV Assay con muestras en medio de recogida y transporte de muestras de citología

Se recogieron muestras emparejadas de citología en solución ThinPrep y en el kit CSCT Aptima de 728 mujeres. Se diluyó un mililitro (1,0 ml) de cada muestra de citología en solución ThinPrep en 2,9 ml de medio de transporte de muestras Aptima y se analizó una sola réplica con el Aptima HPV Assay en los DTS Systems. También se analizó una sola réplica de cada muestra de CSCT con el Aptima HPV Assay. Se determinó el porcentaje de concordancia entre las muestras de citología en solución ThinPrep y las muestras de CSCT con el Aptima HPV Assay, y se muestra en la Tabla 4.

El porcentaje de concordancia positiva fue del 95,1 % (IC del 95 %: 91,6-97,2); el porcentaje de concordancia negativa fue del 95,9 % (IC del 95 %: 93,7-97,3); y la concordancia global fue del 95,6 % (IC del 95 %: 93,9-96,9). Se observó una fuerte correlación entre las muestras de citología en solución y las muestras en el kit de transporte ($\kappa = 0,90$).

Tabla 4: Concordancia global de los resultados del Aptima HPV Assay con muestras de citología en solución ThinPrep y muestras de CSCT Aptima analizadas en los DTS Systems.

		Muestra de citología en solución ThinPrep		Total
		+	-	
Muestra en el kit CSCT Aptima	+	233	20	253
	-	12	463	475
Total		245	483	728

Concordancia positiva = 95,1 % (91,6-97,2)
 Concordancia negativa = 95,9 % (93,7-97,3)
 Concordancia global = 95,6 % (93,9-96,9)
 Coeficiente Kappa = 0,90

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del Aptima HPV Assay para la detección del HPV de alto riesgo se determinó analizando muestras clínicas negativas individuales de citología en solución ThinPrep, enriquecidas con transcritos *in vitro* de HPV o con distintas concentraciones de células infectadas. Se analizaron treinta réplicas de cada nivel de copia con cada uno de los dos lotes de reactivos, para un total de 60 réplicas. Se llevó a cabo un análisis de regresión Probit y se determinó el límite de detección del 95 % predicho para cada tipo de HPV (Tabla 5).

El análisis de regresión Probit muestra que los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 56, 58, 59, 66 y 68 del HPV tienen límites de detección del 95 % predichos inferiores a 100 copias/

reacción, y que los tipos 51 y 52 tienen límites de detección del 95 % predichos entre 100 y 300 copias/reacción.

Tabla 5: Límites de detección del 95 % predichos del Aptima HPV Assay, determinados mediante un análisis Probit de los datos de los DTS Systems

Diana	Límite de detección del 95 %* (límites fiduciales del 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)

*copias por reacción para los transcritos *in vitro* y células por reacción para las líneas celulares

Reproducibilidad del ensayo

La reproducibilidad del Aptima HPV Assay se determinó analizando por triplicado 16 miembros del grupo de muestras en 2 ciclos con 2 lotes de reactivos, en 3 instrumentos y con 3 usuarios. Las pruebas se realizaron durante 20 días en el mismo centro. Los miembros del grupo de muestras se describen en la Tabla 6. Seis de los miembros del grupo de muestras eran negativos para el HPV (3 en medio de transporte de muestras Aptima y 3 eran mezclas de muestras de citología en solución ThinPrep), cuatro eran positivos bajos para el HPV (límite de detección de ~95 %) y seis eran positivos moderados para el HPV (\geq ~3x el límite de detección del 95 %). Los miembros del grupo de muestras positivas bajas y moderadas estaban compuestos por transcritos *in vitro* (IVT) o por células cultivadas infectadas por el HPV en medio de transporte de muestras Aptima.

Tabla 6: Grupo de muestras de reproducibilidad del Aptima HPV Assay

Miembro del grupo de muestras	Descripción	Concentración	Resultado de HPV esperado
1	STM Lote 1	--	Negativo
2	SiHa positivas bajas	1 célula/reacción	Positivo
3	HeLa positivas bajas	0,15 célula/reacción	Positivo
4	Mezcla clínica 1	--	Negativo
5	ME180 positivas moderadas	1 célula/reacción	Positivo
6	MS751 positivas moderadas	1 célula/reacción	Positivo
7	SiHa y HeLa positivas moderadas	10 células/reacción y 1 célula/reacción	Positivo
8	STM Lote 2	--	Negativo
9	Mezcla clínica 2	--	Negativo
10	HPV 16 IVT positivas bajas	30 copias/reacción	Positivo
11	HPV 18 IVT positivas bajas	30 copias/reacción	Positivo
12	STM Lote 3	--	Negativo
13	HPV 16 IVT positivas moderadas	100 copias/reacción	Positivo
14	HPV 18 IVT positivas moderadas	100 copias/reacción	Positivo
15	HPV 16 y HPV 18 positivas moderadas	100/100 copias/reacción	Positivo
16	Mezcla clínica 3	--	Negativo

Se analizaron 108 puntos de datos para cada miembro del grupo de muestras de reproducibilidad en los DTS Systems; los resultados se resumen en la Tabla 7. El porcentaje de positivos en los grupos de muestras negativas osciló entre 0 y 3,7; las muestras positivas bajas fueron \geq 98 y las positivas moderadas fueron 100. La concordancia con los resultados esperados fue $>$ 96 % para todos los miembros del grupo de muestras.

Se determinó la S/CO media del CI para los 6 miembros negativos del grupo de muestras (1, 4, 8, 9, 12 y 16); se calculó la variabilidad entre instrumentos, entre técnicos, entre lotes y entre ciclos, así como la variabilidad intraciclo. La S/CO media del CI para los miembros negativos del grupo de muestras osciló entre 1,76 y 1,92. El coeficiente de variación (CV) de los valores de S/CO del CI fue bastante bajo, $<$ 10 %, para todos los parámetros evaluados. La variabilidad de los valores de S/CO del analito de los miembros negativos del grupo de muestras no se analizó debido a la variabilidad inherente cuando se observan valores de cero.

Se determinó la S/CO media del analito para los 10 miembros positivos del grupo de muestras (2-3, 5-7, 10-11 y 13-15); se calculó la variabilidad entre instrumentos, entre

técnicos, entre lotes y entre ciclos, así como la variabilidad intraciclo. La media de los valores de S/CO del analito osciló entre 9,00 y 10,70 para los grupos de muestras positivas bajas, y entre 8,84 y 15,75 para los grupos de muestras positivas moderadas. Los dos miembros del grupo de muestras que contenían 2 tipos de HPV de alto riesgo, las muestras 7 y 15, tuvieron valores medios de S/CO del analito de 22,90 y 23,37, respectivamente. Los CV de los miembros positivos bajos y positivos moderados del grupo de muestras fueron < 35 % y < 15 %, respectivamente, con la variabilidad intraciclo más alta observada. No se evaluaron los valores de S/CO del CI para los miembros positivos del grupo de muestras porque las RLU del CI no indican el rendimiento de una reacción individual en una muestra positiva para el analito.

Tabla 7: Reproducibilidad del Aptima HPV Assay en DTS Systems

					S/CO medio		Análisis de variabilidad de S/CO*											
							Entre instrumentos		Entre técnicos		Entre lotes		Entre ciclos		Intraciclo		Total	
Miembro del grupo de muestras	Descripción	N	% de positivos	Concordancia	CI	Analito	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	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. bajos	108	99,1	98,1 %	--	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. bajos	108	100	99,1 %	--	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 [^]	100	100 %	--	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 %	--	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 [^]	100	100 %	--	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. bajos	108	99,1	99,1 %	--	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. bajos	108	98,1	98,1 %	--	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 %	--	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 %	--	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 %	--	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

*Análisis de variabilidad de la S/CO del CI en los grupos de muestras negativas (1, 4, 8, 9, 12, 16); análisis de variabilidad de la S/CO del analito en los grupos de muestras positivas (2, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 13, 14, 15)

[^]1 reacción no válida no reanalizada

S/CO = razón señal/valor de corte

DE = desviación estándar

-- = no aplicable

Reactividad cruzada

La especificidad analítica del Aptima HPV Assay se evaluó con medio de solución PreservCyt diluido con medio de transporte de muestras Aptima y enriquecido con bacterias, levaduras u hongos cultivados, virus cultivados o transcritos *in vitro* de HPV de bajo riesgo. La sensibilidad analítica se evaluó con el mismo grupo de muestras enriquecidas con una baja concentración de células SiHa infectadas con HPV (1 célula/reacción). Los microorganismos y las concentraciones de prueba se identifican en la Tabla 8. No se observó ningún efecto sobre la especificidad o la sensibilidad del Aptima HPV Assay con ninguno de los microorganismos analizados.

Tabla 8: Grupo de muestras de especificidad analítica

Microorganismo	Concentración de prueba	Microorganismo	Concentración de prueba
Bacterias			
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Listeria monocytogenes</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Actinomyces israelii</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Micrococcus luteus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Mobiluncus curtisii</i>	2 x 10 ⁷ UFC/ml
<i>Atopobium vaginae</i>	5 x 10 ⁷ UFC/ml	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Bacillus cereus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Mycoplasma fermentans</i>	5 x 10 ⁷ UFC/ml
<i>Bacteroides fragilis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Mycoplasma genitalium</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Mycoplasma hominis</i>	5 x 10 ⁷ UFC/ml
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Bifidobacterium breve</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae y Chlamydia trachomatis</i>	5 x 10 ⁸ UFC/ml 1,5 x 10 ⁴ TCID 50/ml
<i>Campylobacter fetus-fetus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Neisseria meningitidis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	2 x 10 ⁴ TCID 50/ml	<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Clostridium difficile</i>	6 x 10 ⁷ UFC/ml	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Propionibacterium acnes</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Corynebacterium genitalium</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Proteus mirabilis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Corynebacterium xerosis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Proteus vulgaris</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Providencia stuartii</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Escherichia coli</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Ruminococcus productus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Finexordia magna</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Serratia marcescens</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Staphylococcus aureus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Gardnerella vaginalis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Haemophilus ducreyi</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Lactobacillus crispatus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Lactobacillus jensenii</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml		

Tabla 8: Grupo de muestras de especificidad analítica (continuación)

Microorganismo	Concentración de prueba	Microorganismo	Concentración de prueba
Levaduras/protozoarios			
<i>Candida albicans</i>	1 x 10 ⁶ UFC/ml	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1 x 10 ⁷ células/ml
Virus			
Adenovirus 2	1 x 10 ⁶ vp/ml	Virus Herpes simplex 1	2,5 x 10 ⁵ TCID 50/ml
Citomegalovirus	33 TCID 50/ml	Virus Herpes simplex 2	5 x 10 ⁴ TCID 50/ml
Virus Epstein-Barr	4 x 10 ⁷ vp/ml	SV40	1,2 x 10 ⁴ TCID 50/ml
VIH-1	1,0 x 10 ⁶ copias/ml		
Genotipos de HPV no diana			
HPV 6	2,5 x 10 ⁶ copias/ml	HPV 53	2,5 x 10 ⁶ copias/ml
HPV 11	2,5 x 10 ⁶ copias/ml	HPV 61	2,5 x 10 ⁶ copias/ml
HPV 42	2,5 x 10 ⁶ copias/ml	HPV 71	2,5 x 10 ⁶ copias/ml
HPV 43	2,5 x 10 ⁶ copias/ml	HPV 81	2,5 x 10 ⁶ copias/ml
HPV 44	2,5 x 10 ⁶ copias/ml		

Interferencias

Las sustancias descritas en la Tabla 9 se añadieron individualmente a solución PreservCyt y medio de transporte de muestras (Specimen Transport Media, STM) Aptima al 1 % y al 10 % v/v o p/v, y se analizaron con el Aptima HPV Assay. Todas las sustancias se analizaron en presencia y en ausencia de células cultivadas infectadas con HPV (SiHa, 3 células/reacción). No se observaron interferencias con ninguna de las sustancias analizadas, con excepción de dos de los cinco lubricantes que contenían Polyquaternium 15 en concentraciones > 0,025 % en la muestra de prueba y de un medicamento antimicótico que contenía tioconazol en concentraciones > 0,075 % en la muestra de prueba.

Tabla 9: Sustancias analizadas para determinar posibles interferencias con el Aptima HPV Assay

Categoría del producto	Marca o tipo de producto
Lubricante	KY Sensual Mist (v/v)
	KY Warming Jelly (p/v)
	KY Warming Liquid (v/v)
	Lubricante personal Astroglide*
	Lubricante líquido marca Target*
Espemicida	Anticonceptivo vaginal Gynol II, fórmula original (p/v)
	Anticonceptivo vaginal Gynol II, extra fuerte (p/v)
	Espuma anticonceptiva vaginal Delfen (p/v)
	Anticonceptivo vaginal Encare (p/v)
	Anticonceptivo vaginal Conceptrol (p/v)
Medicamentos antimicóticos/antiprurito	Vagisil máxima potencia (p/v)
	Monistat Soothing Care (p/v)
	Monistat 3, envase combinado (p/v)
	Tioconazol 1 marca Target (p/v)
	Miconazol 3 marca Target (p/v)
Ácido acético glacial	EMD M/N AX0073-11 (v/v)
Sangre completa	Sangre completa (v/v)

*Lubricantes personales que contienen Polyquaternium 15.

Resultados esperados del Tigris DTS System: Prevalencia del mRNA del HPV de alto riesgo

La prevalencia de la infección por HPV de alto riesgo varía notablemente y depende de varios factores, el más importante de los cuales es la edad.^{32,33} La prevalencia del HPV determinada por la detección del DNA del HPV se ha investigado en un gran número de estudios; sin embargo, pocos estudios indican la prevalencia basada en la detección del mRNA oncogénico del HPV. Se incluyó a mujeres de distintos centros clínicos (n=18) que representaban una amplia distribución geográfica y una población diversa (10 estados de Estados Unidos) en un estudio clínico prospectivo conocido como el ensayo CLEAR.³⁴ La prevalencia de las muestras positivas para mRNA del HPV observada en el ensayo clínico se categorizó en total, por grupo de edad y por centro de análisis. Los resultados de las poblaciones ASC-US (células escamosas atípicas de importancia no determinada) y NILM (negativas para lesiones o tumores intraepiteliales) se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Prevalencia del mRNA del HPV de alto riesgo por grupo de edad, centro de análisis y todos combinados

	Tasa de positivos % (x/n)	
	Población ASC-US (≥ 21 años)	Población NILM (≥ 30 años)
Todos	41,8 (400/958)	5,0 (540/10.871)
Grupo de edad (años)		
De 21 a 29	60,3 (252/418)	--
De 30 a 39	36,8 (98/266)	6,9 (289/4199)
≥ 40	18,2 (50/274)	3,8 (251/6672)
Centro de análisis		
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)

-- = no aplicable

Diseño del estudio clínico del Aptima HPV Assay con muestras de citología en solución ThinPrep

Se llevó a cabo un estudio clínico multicéntrico y prospectivo en EE. UU., conocido como el estudio CLEAR, para determinar el rendimiento clínico del Aptima HPV Assay para la detección de la neoplasia intraepitelial de cuello uterino de grado 2 o patologías del cuello uterino más graves (\geq CIN2). El estudio CLEAR incluía una evaluación inicial y una evaluación de seguimiento de 3 años.³⁴

Ensayo CLEAR – Evaluación inicial

Al inicio del estudio CLEAR (fase de inicio), se incluyó a las mujeres en el estudio ASC-US o en el estudio NILM en función de los resultados de la citología obtenidos durante las pruebas de cribado de rutina de cáncer de cuello uterino. La población del estudio ASC-US incluyó a mujeres mayores de 21 años con resultados de citología ASC-US, y la población del estudio NILM incluyó a mujeres mayores de 30 años con resultados de citología NILM. El estudio NILM se diseñó en apoyo a la reivindicación del cribado complementario para mujeres mayores de 30 años, ya que las mujeres de esta edad con resultados de citología superiores a ASC-US deben someterse a una colposcopia independientemente del estado del HPV.³⁵

Se inscribieron mujeres de 18 centros clínicos, en su mayoría de clínicas de obstetricia y ginecología, con una amplia distribución geográfica, que constituían una población diversa. Las mujeres elegibles fueron asignadas al estudio ASC-US o NILM en función de los resultados de la muestra de citología en solución ThinPrep remitida. Al inicio, el material residual de las muestras de mujeres del estudio ASC-US y del estudio NILM remitidas se analizó tanto con el Aptima HPV Assay como con una prueba comercial de DNA del HPV.

Al inicio, todas las mujeres del estudio ASC-US se remitieron para una colposcopia, independientemente de los resultados de las pruebas de HPV. Se obtuvieron biopsias por legrado endocervical (LEC) o biopsias de cuello uterino en sacabocados (1 biopsia de cada uno de los 4 cuadrantes). En los casos en los que la lesión era visible, se obtuvo una biopsia en sacabocados (método dirigido; 1 biopsia por lesión) y en los cuadrantes sin una lesión visible, la biopsia se obtuvo de la unión escamocolumnar (método aleatorio).

En el estudio NILM, las mujeres con resultados positivos en el Aptima HPV Assay o la prueba comercial de DNA del HPV, así como mujeres con resultados negativos en ambos ensayos seleccionadas aleatoriamente, se remitieron para una colposcopia para la evaluación inicial. Las mujeres seleccionadas aleatoriamente con resultados negativos en ambos ensayos se incluyeron para corregir por el sesgo de verificación con cálculos de rendimiento ajustados, generados mediante un método de imputación múltiple. Se obtuvo una biopsia por LEC de cada mujer que se sometió a colposcopia. Solo se obtuvieron biopsias en sacabocados de las lesiones visibles (método dirigido; 1 biopsia por lesión).

El estado de la enfermedad se determinó mediante un grupo de consenso de la revisión histológica, basado en la concordancia de al menos 2 patólogos expertos. Los patólogos expertos no tuvieron acceso al resultado de HPV de las mujeres. Tampoco tuvieron acceso al resultado de la citología, ni a los diagnósticos histológicos de los otros patólogos. Si los 3 patólogos estaban en desacuerdo, los 3 patólogos revisaban las láminas en un microscopio multicabezal para alcanzar un consenso. Los resultados de la prueba de HPV no se mostraron a los investigadores, los médicos ni las mujeres hasta después de la visita de la colposcopia, con el fin de evitar sesgos. Al inicio se evaluó el rendimiento clínico del Aptima HPV Assay para la detección de \geq CIN2 y la neoplasia intraepitelial de cuello uterino de grado 3 o superior (\geq CIN3) con relación al estado citológico inicial. También se determinó el

rendimiento clínico de la prueba comercial de DNA del HPV para su comparación directa con los resultados del Aptima HPV Assay.

Ensayo CLEAR– Evaluación de seguimiento

Las mujeres del estudio NILM de los 14 centros clínicos eran aptas para participar en la fase de seguimiento de 3 años del estudio si: i) tuvieron una visita de colposcopia al inicio y no tuvieron \geq CIN2, o ii) no tuvieron una visita de colposcopia al inicio. La fase de seguimiento del estudio consistía en visitas anuales. En estas visitas, a todas las mujeres se les tomaron muestras para citología cervical, y se analizó a algunas mujeres con una prueba comercial de HPV. Las mujeres con ASC-US o resultados citológicos más graves durante el periodo de seguimiento fueron derivadas a colposcopia utilizando los mismos procedimientos de biopsia y examen histológico utilizados para la evaluación inicial del estudio NILM. El estado de la lesión cervical en la visita de seguimiento se consideró “negativo” basándose en la citología NILM o, en el caso de mujeres con resultados anómalos en la citología, basándose en resultados normales o de CIN1 según el grupo de consenso de la revisión histológica. Las mujeres a las que se detectó un \geq CIN2 durante el periodo de seguimiento se consideró que habían completado el seguimiento y no acudieron a las visitas después de la detección de \geq CIN2. Las mujeres a las que no se detectó un \geq CIN2 durante el periodo de seguimiento, pero que acudieron a una visita del estudio en el año 1 de seguimiento y/o el año 2 de seguimiento y que acudieron a una visita del año 3 de seguimiento and se consideró que habían completado el seguimiento.

El objetivo del estudio de seguimiento era comparar el riesgo acumulado a los 3 años de enfermedad cervical en mujeres con resultados iniciales positivos para el Aptima HPV Assay con el riesgo acumulado a los 3 años de enfermedad cervical en mujeres con resultados iniciales negativos para el Aptima HPV Assay. El estado de la lesión cervical a los 3 años se determinó del siguiente modo:

- Estado positivo de la enfermedad cervical (\geq CIN2 y/o \geq CIN3) – Mujeres a las que se detectó \geq CIN2 al inicio o durante el seguimiento.
- Estado negativo de la enfermedad cervical (<CIN2) – Mujeres que completaron el seguimiento sin detección de \geq CIN2 y que se consideró que tenían un estado de enfermedad cervical “indeterminado”.
- Estado de enfermedad cervical indeterminado – Mujeres con resultados anómalos en la citología durante el seguimiento y que no tuvieron un resultado posterior del grupo de consenso de la revisión histológica, o mujeres con una citología inadecuada en su última visita.
- Pérdida de seguimiento – Mujeres que no completaron el seguimiento y que no se consideró que tuvieran un estado de enfermedad cervical “indeterminado”.

El rendimiento clínico del Aptima HPV Assay para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3 se evaluó respecto al estado de la enfermedad cervical a los 3 años.

Rendimiento del ensayo en el Sistema Tigris DTS

Población ASC-US \geq 21 años: rendimiento clínico del Aptima HPV Assay con muestras de citología en solución ThinPrep

En total, se incluyó a 1252 mujeres mayores de 21 años con resultados de citología ASC-US en el estudio ASC-US. De ellas, 294 mujeres se retiraron del estudio y 19 tuvieron un diagnóstico no determinado de la enfermedad; todas ellas se excluyeron del análisis. Las 939 mujeres evaluables restantes eran mayores de 21 años y tenían resultados de citología ASC-US, resultados del Aptima HPV Assay y un estado de enfermedad concluyente. Noventa y una (91) mujeres tenían \geq CIN2 y cuarenta y una (41) \geq CIN3. La prevalencia de \geq CIN2 y \geq CIN3 en las mujeres evaluables con resultados de citología ASC-US fue del 9,7 % y del 4,4 %, respectivamente. Los resultados del Aptima HPV Assay por diagnóstico del grupo de consenso de la revisión histológica se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Población ASC-US \geq 21 años: resultados del Aptima HPV Assay por diagnóstico del grupo de consenso de la revisión histológica

Resultado del Aptima HPV Assay*	Prueba de DNA del HPV	Diagnóstico del grupo de consenso de la revisión histológica						Total
		No determinado**	Normal	CIN1	CIN2	CIN3	Cáncer	
Positivo	Positivo	6	170	113	41	32	1	363
Positivo	Negativo	0	7	0	1	2	0	10
Positivo	Sin resultado***	0	14	11	0	2	0	27
Negativo	Positivo	0	47	13	2	3	0	65
Negativo	Negativo	10	371	55	6	1	0	443
Negativo	Sin resultado***	3	40	7	0	0	0	50
Total		19	649	199	50	40	1****	958

*Todas las muestras tuvieron resultados finales válidos (tras el análisis inicial o después de la resolución de las muestras inicialmente no válidas por procedimiento).

**En 19 casos, las mujeres acudieron a la visita de colposcopia pero no fue posible llegar a un diagnóstico por los siguientes motivos: < 5 muestras de biopsia, todas ellas obtenidas con resultados histológicos normales/CIN1 (n=15), no se recogieron biopsias (n=3) o se perdieron las preparaciones de la biopsia (n=1).

***77 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

****Una mujer presentó adenocarcinoma in situ (AIS).

Los cálculos de rendimiento clínico del Aptima HPV Assay, incluidos los cálculos de sensibilidad, especificidad, y valor de predicción positivo (VPP) y negativo (VPN) para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3, basados en la evaluación de todas las biopsias o solo de las biopsias dirigidas, se muestran en la Tabla 12, al igual que los cálculos con la prueba comercial de DNA del HPV.

Tabla 12: Población ASC-US ≥ 21 años: rendimiento del Aptima HPV Assay y de una prueba de DNA del HPV para la detección de ≥CIN2 y ≥CIN3

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

*74 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

**El resultado histológico de consenso se obtuvo únicamente a partir de los resultados de las biopsias dirigidas. Las mujeres sin biopsias dirigidas reflejan una colposcopia normal y se incluyen en estos análisis como sin enfermedad (<CIN2 o <CIN3, según corresponda). Al incluir exclusivamente las biopsias dirigidas, en algunos casos no fue posible alcanzar un consenso.

Al evaluar todas las biopsias, los cálculos de sensibilidad clínica del Aptima HPV Assay y de la prueba comercial de DNA del HPV (cuando se disponía de los resultados de ambos ensayos para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3) fueron similares. Las diferencias en sensibilidad no fueron estadísticamente significativas: diferencia de sensibilidad = -2,3 % (IC del 95 %: -9,5 %, 4,8 %). Los cálculos de especificidad clínica del Aptima HPV Assay para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3 fueron más elevados que los obtenidos con la prueba comercial de DNA del HPV (las diferencias en los cálculos de especificidad fueron estadísticamente significativas). Para \geq CIN2, la diferencia en especificidad fue del 6,8 % (IC del 95 %: 4,9 %, 9,0 %). Los VPN fueron similares excepto para la detección de \geq CIN2, el VPP para el Aptima HPV Assay fue ligeramente más elevado que el VPP para la prueba comercial de DNA del HPV (20,1 % frente al 18,7 %).

De los 91 casos de \geq CIN2, 60 (65,9 %) fueron identificados en las biopsias dirigidas y 31 (34,1 %) en las biopsias aleatorias o de LEC (es decir, no en las biopsias dirigidas). Estos hallazgos son similares a los resultados de los estudios publicados, en los que entre un 25 % y un 40 % de los casos de \geq CIN2, aproximadamente, se identificaron únicamente en las muestras de biopsias aleatorias o de LEC.^{36,37} Cuando se utilizaron únicamente las biopsias dirigidas para determinar el estado de la enfermedad (presuponiendo que las mujeres sin biopsias dirigidas tenían resultados histológicos normales puesto que no presentaban lesiones visibles), la prevalencia de \geq CIN2 y \geq CIN3 en el estudio fue del 6,4 % y del 3,1 %, respectivamente. Los cálculos de sensibilidad clínica para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3 fueron más elevados para ambos ensayos cuando se utilizaron únicamente biopsias dirigidas que cuando se utilizaron todas las biopsias. Para ambos ensayos, la especificidad clínica fue similar cuando se utilizaron solo biopsias dirigidas y cuando se utilizaron todas las biopsias. En consecuencia, cuando se utilizaron únicamente las biopsias dirigidas, la especificidad del Aptima HPV Assay fue significativamente mayor que la de la prueba comercial de DNA del HPV.

Los cálculos de rendimiento clínico del Aptima HPV Assay y de la prueba comercial de DNA del HPV se muestran, por grupo de edad, en las Tablas 13 y 14 (\geq CIN2 y \geq CIN3, respectivamente, basadas en la evaluación de todas las biopsias).

Tabla 13: Población ASC-US ≥ 21 años: rendimiento del Aptima HPV Assay y de una prueba de DNA del HPV para la detección de ≥CIN2 por grupo de edad

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

*74 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

Tabla 14: Población ASC-US ≥ 21 años: rendimiento del Aptima HPV Assay y de una prueba de DNA del HPV para la detección de ≥CIN3 por grupo de edad

	Rendimiento	Aptima HPV Assay N=939		Prueba de DNA del HPV N=865*	
		Cálculo	(IC del 95 %)	Cálculo	(IC del 95 %)
De 21 a 29 años		N=415		N=389	
	Sensibilidad (%)	96,3 (26/27)	(81,7, 99,3)	100 (25/25)	(86,7, 100)
	Especificidad (%)	42,3 (164/388)	(37,5, 47,2)	33,0 (120/364)	(28,3, 38,0)
	VPP (%)	10,4 (26/250)	(8,9, 11,4)	9,3 (25/269)	(8,2, 10,0)
	VPN (%)	99,4 (164/165)	(97,2, 100)	100 (120/120)	(97,5, 100)
	Prevalencia (%)	6,5 (27/415)		6,4 (25/389)	
De 30 a 39 años		N=262		N=239	
	Sensibilidad (%)	88,9 (8/9)	(56,5, 98,0)	77,8 (7/9)	(45,3, 93,7)
	Especificidad (%)	65,6 (166/253)	(59,6, 71,2)	59,6 (137/230)	(53,1, 65,7)
	VPP (%)	8,4 (8/95)	(5,2, 10,4)	7,0 (7/100)	(3,9, 9,1)
	VPN (%)	99,4 (166/167)	(97,6, 100)	98,6 (137/139)	(96,4, 99,8)
	Prevalencia (%)	3,4 (9/262)		3,8 (9/239)	
≥ 40 Años		N=262		N=237	
	Sensibilidad (%)	60,0 (3/5)	(23,1, 88,2)	80,0 (4/5)	(37,6, 96,4)
	Especificidad (%)	82,1 (211/257)	(77,0, 86,3)	78,9 (183/232)	(73,2, 83,6)
	VPP (%)	6,1 (3/49)	(1,6, 10,2)	7,5 (4/53)	(2,9, 10,7)
	VPN (%)	99,1 (211/213)	(98,0, 99,9)	99,5 (183/184)	(98,2, 100)
	Prevalencia (%)	1,9 (5/262)		2,1 (5/237)	

*74 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

El riesgo absoluto de enfermedad (\geq CIN2 y \geq CIN3, basado en la evaluación de todas las biopsias) según el resultado del Aptima HPV Assay, y el riesgo relativo de enfermedad según los resultados positivos frente a negativos del Aptima HPV Assay, se muestran en la Tabla 15, al igual que los cálculos obtenidos con la prueba comercial de DNA del HPV. El riesgo relativo de \geq CIN2 fue de 9,1 (IC del 95 %: 5,0, 16,5), lo que indica que una mujer con un resultado positivo en el Aptima HPV Assay tiene 9,1 veces más posibilidades de tener \geq CIN2 que una mujer con un resultado negativo en el Aptima HPV Assay. El riesgo relativo de \geq CIN3 fue de 12,8 (IC del 95 %: 4,6, 35,6).

Tabla 15: Población ASC-US \geq 21 años: riesgo absoluto y relativo de \geq CIN2 y \geq CIN3 según los resultados del Aptima HPV Assay y de una prueba de DNA del HPV

	Resultado del ensayo	Aptima HPV Assay N=939		Prueba de DNA del HPV N=865*	
		Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)	Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)
\geq CIN2	Positivo	20,1 (79/394) (18,1, 22,0)	9,1 (5,0, 16,5)	18,7 (79/422) (17,0, 20,4)	8,3 (4,4, 15,8)
	Negativo	2,2 (12/545) (1,2, 3,5)		2,3 (10/443) (1,2, 3,8)	
	Prevalencia (%)	9,7 (91/939)		10,3 (89/865)	
\geq CIN3	Positivo	9,4 (37/394) (8,1, 10,4)	12,8 (4,6, 35,6)	8,5 (36/422) (7,4, 9,4)	12,6 (3,9, 40,6)
	Negativo	0,7 (4/545) (0,2, 1,7)		0,7 (3/443) (0,2, 1,7)	
	Prevalencia (%)	4,4 (41/939)		4,5 (39/865)	

*74 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

Los cálculos de riesgo absoluto y relativo de enfermedad (\geq CIN2 y \geq CIN3, basados en la evaluación de todas las biopsias) para el Aptima HPV Assay y la prueba comercial de DNA del HPV por grupo de edad se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16: Población ASC-US \geq 21 años: riesgo absoluto y relativo de \geq CIN2 y \geq CIN3 por grupo de edad según los resultados del Aptima HPV Assay y de una prueba de DNA del HPV

	Edad	Resultado del ensayo	Aptima HPV Assay N=939		Prueba de DNA del HPV N=865*	
			Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)	Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)
\geq CIN2	De 21 a 29 años		N=415		N=389	
		Positivo	22,0 (55/250) (19,6, 24,2)	6,1 (2,7, 13,7)	20,8 (56/269) (19,0, 22,5)	8,3 (2,7, 26,1)
		Negativo	3,6 (6/165) (1,5, 7,0)		2,5 (3/120) (0,6, 6,4)	
		Prevalencia (%)	14,7 (61/415)		15,2 (59/389)	
	De 30 a 39 años		N=262		N=239	
		Positivo	18,9 (18/95) (14,7, 22,7)	15,8 (3,8, 66,7)	16,0 (16/100) (11,8, 19,6)	5,6 (1,9, 16,1)
		Negativo	1,2 (2/167) (0,2, 3,5)		2,9 (4/139) (0,9, 5,9)	
		Prevalencia (%)	7,6 (20/262)		8,4 (20/239)	
	\geq 40 años		N=262		N=237	
		Positivo	12,2 (6/49) (5,8, 18,4)	6,5 (1,9, 22,2)	13,2 (7/53) (6,9, 18,7)	8,1 (2,2, 30,2)
		Negativo	1,9 (4/213) (0,6, 3,4)		1,6 (3/184) (0,4, 3,4)	
		Prevalencia (%)	3,8 (10/262)		4,2 (10/237)	
\geq CIN3	De 21 a 29 años		N=415		N=389	
		Positivo	10,4 (26/250) (8,9, 11,4)	17,2 (2,4, 125)	9,3 (25/269) (8,2, 10,0)	No calculable
		Negativo	0,6 (1/165) (0,0, 2,8)		0,0 (0/120) (0,0, 2,5)	
		Prevalencia (%)	6,5 (27/415)		6,4 (25/389)	
	De 30 a 39 años		N=262		N=239	
		Positivo	8,4 (8/95) (5,2, 10,4)	14,1 (1,8, 111)	7,0 (7/100) (3,9, 9,1)	4,9 (1,0, 22,9)
		Negativo	0,6 (1/167) (0,0, 2,4)		1,4 (2/139) (0,2, 3,6)	
		Prevalencia (%)	3,4 (9/262)		3,8 (9/239)	
	\geq 40 años		N=262		N=237	
		Positivo	6,1 (3/49) (1,6, 10,2)	6,5 (1,1, 38,0)	7,5 (4/53) (2,9, 10,7)	13,9 (1,6, 122)
		Negativo	0,9 (2/213) (0,1, 2,0)		0,5 (1/184) (0,0, 1,8)	
		Prevalencia (%)	1,9 (5/262)		2,1 (5/237)	

*74 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

Población NILM \geq 30 años: rendimiento clínico del Aptima HPV Assay con muestras de citología en solución ThinPrep al inicio

En total, se incluyó a 11.644 mujeres con resultados de citología NILM en el estudio NILM. De ellas, 773 mujeres se retiraron del estudio y se excluyeron de la evaluación inicial. Las 10.871 mujeres evaluables restantes eran mayores de 30 años, tenían resultados de citología NILM y contaban con resultados del Aptima HPV Assay. De las 540 mujeres con resultados positivos del Aptima HPV Assay, 335 se sometieron a una colposcopia al inicio. De las 10.331 mujeres con resultados negativos del Aptima HPV Assay, 530 se sometieron a una colposcopia al inicio. Veinte (20) mujeres tuvieron \geq CIN2 y once (11) \geq CIN3; 799 mujeres tuvieron una histología normal/CIN1 y 46, un estado de enfermedad no determinado. Los resultados del Aptima HPV Assay según el diagnóstico del grupo de consenso de la revisión histológica al inicio se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17: Población NILM \geq 30 años: resultados del Aptima HPV Assay y de una prueba de DNA del HPV diagnóstico del grupo de consenso de la revisión histológica al inicio

Resultado del Aptima HPV Assay*	Prueba de DNA del HPV	Diagnóstico del grupo de consenso de la revisión histológica						
		No determinado	Normal	CIN1	CIN2	CIN3	Cáncer	Total
Positivo	Positivo	11	212	11	4	7	2	247
Positivo	Negativo	7	59	0	1	0	1	68
Positivo	Sin resultado**	3	16	1	0	0	0	20
Negativo	Positivo	10	170	8	2	1	0	191
Negativo	Negativo	15	313	9	1	0	0	338
Negativo	Sin resultado**	0	0	0	1	0	0	1
Total		46	770	29	9	8	3***	865

*Todas las muestras tuvieron resultados finales válidos (tras el análisis inicial o después de la resolución de las muestras inicialmente no válidas por procedimiento).

**21 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

***Tres mujeres tuvieron adenocarcinoma in situ (AIS).

En total, 10.052 mujeres tuvieron un estado de enfermedad no verificado al inicio (incluidos los no determinados) (Tabla 18). Debido a que solo se remitieron para colposcopia mujeres aleatoriamente seleccionadas con resultados negativos tanto en el Aptima HPV Assay como en la prueba comercial de DNA del HPV, la proporción de mujeres con un estado de enfermedad no verificado fue elevada en este grupo (96,6 %) Para compensar este sesgo en la verificación, se utilizó un método de imputación múltiple para calcular el número de mujeres con enfermedad que podrían haber sido identificadas en el caso de que se hubiera realizado una colposcopia a todas las mujeres. Se presentan los cálculos de rendimiento ajustados y no ajustados por el sesgo de verificación, basados en las 819 mujeres con un estado de enfermedad verificado al inicio.

Tabla 18: Población NILM \geq 30 años: clasificación de mujeres NILM evaluables por resultados del Aptima HPV Assay de la prueba de DNA del HPV, estado de enfermedad (\geq CIN2 y \geq CIN3), y estado de verificación de la enfermedad

Resultado del Aptima HPV Assay*	Prueba de DNA del HPV	Total de mujeres	Estado de enfermedad verificado: \geq CIN2		Estado de enfermedad verificado: \geq CIN3		Estado de enfermedad no verificado
			Mujeres enfermas (\geq CIN2)	Mujeres no enfermas (<CIN2)	Mujeres enfermas (\geq CIN3)	Mujeres no enfermas (<CIN3)	Mujeres con un estado de enfermedad desconocido (% desconocido)
Positivo	Positivo	360	13	223	9	227	124 (34,4 %)
Positivo	Negativo	150	2	59	1	60	89 (59,3 %)
Positivo	Sin resultado**	30	0	17	0	17	13 (43,3 %)
Negativo	Positivo	306	3	178	1	180	125 (40,8 %)
Negativo	Negativo	9.420	1	322	0	323	9.097 (96,6 %)
Negativo	Sin resultado**	605	1	0	0	1	604 (99,8 %)
Total		10.871	20	799	11	808	10.052 (92,5 %)

*Todas las muestras tuvieron resultados finales válidos (tras el análisis inicial o después de la resolución de las muestras inicialmente no válidas por procedimiento).

**635 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

La prevalencia ajustada de \geq CIN2 y \geq CIN3 en mujeres con resultados de citología NILM fue del 0,9 % y del 0,4 %, respectivamente. Los cálculos ajustados de riesgo absoluto y relativo para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3 se muestran en la Tabla 19. El riesgo relativo ajustado de \geq CIN2 fue de 8,1 (IC del 95 %: 2,3, 28,1), lo que indica que una mujer con un resultado positivo en el Aptima HPV Assay tiene 8,1 veces más posibilidades de tener \geq CIN2 que una mujer con un resultado negativo en el Aptima HPV Assay. El riesgo relativo ajustado de \geq CIN3 al inicio fue de 34,5 (IC del 95 %: 2,7, 443,3). Los cálculos no ajustados de riesgo absoluto y relativo para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3 al inicio se muestran, en total, en la Tabla 20 y, por grupo de edad, en la Tabla 21.

Tabla 19: Población NILM \geq 30 años: riesgo absoluto y relativo de \geq CIN2 y \geq CIN3 para los resultados del Aptima HPV Assay y de la prueba de DNA del HPV (cálculos ajustados por el sesgo de verificación) al inicio

Resultado del ensayo		Aptima HPV Assay		Prueba de DNA del HPV	
		Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)	Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)
\geq CIN2	Positivo	4,7 (2,9, 7,6)	8,1 (2,3, 28,1)	3,7 (2,3, 6,0)	7,3 (1,6, 33,4)
	Negativo	0,6 (0,2, 1,9)		0,5 (0,1, 2,1)	
	Prevalencia (%)	0,9		0,9	
\geq CIN3	Positivo	3,3 (1,4, 7,6)	34,5 (2,7, 443,3)	2,3 (1,3, 4,1)	21,0 (1,0, 423,4)
	Negativo	0,1 (0,0, 1,6)		0,1 (0,0, 2,4)	
	Prevalencia (%)	0,4		0,4	

Tabla 20: Población NILM \geq 30 años: riesgo absoluto y relativo de \geq CIN2 y \geq CIN3 para los resultados del Aptima HPV Assay y de la prueba de DNA del HPV (cálculos no ajustados) al inicio

Resultado del ensayo		Aptima HPV Assay N=819		Prueba de DNA del HPV N=801*	
		Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)	Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)
\geq CIN2	Positivo	4,8 (15/314) (3,4, 5,8)	4,8 (1,8, 13,1)	3,8 (16/417) (2,9, 4,4)	4,9 (1,4, 16,7)
	Negativo	1,0 (5/505) (0,4, 1,9)		0,8 (3/384) (0,2, 1,9)	
	Prevalencia (%)	2,4 (20/819)		2,4 (19/801)	
\geq CIN3	Positivo	3,2 (10/314) (2,2, 3,7)	16,1 (2,1, 125)	2,4 (10/417) (1,6, 2,7)	9,2 (1,2, 71,6)
	Negativo	0,2 (1/505) (0,0, 0,9)		0,3 (1/384) (0,0, 1,1)	
	Prevalencia (%)	1,3 (11/819)		1,4 (11/801)	

*18 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

Tabla 21: Población NILM \geq 30 años: riesgo absoluto y relativo de \geq CIN2 y \geq CIN3 para los resultados del Aptima HPV Assay y de la prueba de DNA del HPV, por grupo de edad (cálculos no ajustados) al inicio

	Edad	Resultado del ensayo	Aptima HPV Assay N=819		Prueba de DNA del HPV N=801*	
			Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)	Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)
\geq CIN2	De 30 a 39 años		N=384		N=377	
		Positivo	4,8 (8/167) (2,1, 9,2)	10,4 (1,3, 82,3)	3,2 (7/216) (1,3, 6,6)	2,6 (0,5, 12,4)
		Negativo	0,5 (1/217) (0,0, 2,5)		1,2 (2/161) (0,2, 4,4)	
		Prevalencia (%)	2,3 (9/384)		2,4 (9/377)	
	\geq 40 Años		N=435		N=424	
		Positivo	4,8 (7/147) (1,9, 9,6)	3,4 (1,0, 11,5)	4,5 (9/201) (2,1, 8,3)	10,0 (1,3, 78,1)
		Negativo	1,4 (4/288) (0,4, 3,5)		0,4 (1/223) (0,0, 2,5)	
		Prevalencia (%)	2,5 (11/435)		2,4 (10/424)	
\geq CIN3	30 De 21 a 39 años		N=384		N=377	
		Positivo	3,0 (5/167) (1,0, 6,8)	6,5 (0,8, 55,1)	2,3 (5/216) (0,8, 5,3)	3,7 (0,4, 31,6)
		Negativo	0,5 (1/217) (0,0, 2,5)		0,6 (1/161) (0,0, 3,4)	
		Prevalencia (%)	1,6 (6/384)		1,6 (6/377)	
	\geq 40 Años		N=435		N=424	
		Positivo	3,4 (5/147) (1,1, 7,8)	No calculable	2,5 (5/201) (0,8, 5,7)	No calculable
		Negativo	0,0 (0/288) (0,0, 1,3)		0,0 (0/223) (0,0, 1,6)	
		Prevalencia (%)	1,1 (5/435)		1,2 (5/424)	

*18 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

Los cálculos ajustados de rendimiento clínico del Aptima HPV Assay, incluidos los cálculos de sensibilidad, especificidad, y valor de predicción positivo (VPP) y negativo (VPN) para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3 se muestran en la Tabla 22, al igual que los cálculos con la prueba comercial de DNA del HPV. Los cálculos no ajustados de rendimiento clínico se muestran en la Tabla 23. El Aptima HPV Assay y la prueba comercial de DNA del HPV mostraron una sensibilidad similar, mientras que la especificidad fue significativamente mayor con el Aptima HPV Assay (los IC del 95 % no se superponen). Los cálculos de los valores de predicción del Aptima HPV Assay fueron clínicamente relevantes y similares a los cálculos de la prueba comercial de DNA del HPV. Los VPN fueron similares excepto para la detección de \geq CIN2, el VPP para el Aptima HPV Assay fue ligeramente más elevado que el VPP para la prueba comercial de DNA del HPV (4,7 % frente al 3,7 %).

Tabla 22: Población NILM \geq 30 años: rendimiento del Aptima HPV Assay y de la prueba de DNA del HPV para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3 (cálculos ajustados por el sesgo de verificación) al inicio

	Rendimiento	Aptima HPV Assay		Prueba de DNA del HPV	
		Cálculo	(IC del 95 %)	Cálculo	(IC del 95 %)
\geq CIN2	Sensibilidad (%)	31,0	(5,9, 56,1)	35,4	(3,8, 66,9)
	Especificidad (%)	95,2	(94,8, 95,6)	93,7	(93,2, 94,2)
	VPP (%)	4,7	(2,9, 7,6)	3,7	(2,3, 6,0)
	VPN (%)	99,4	(98,1, 99,8)	99,5	(97,9, 99,9)
	Prevalencia (%)	0,9		0,9	
\geq CIN3	Sensibilidad (%)	61,5	(14,0, 100)	56,4	(0,4, 100)
	Especificidad (%)	95,2	(94,8, 95,6)	93,6	(93,1, 94,1)
	VPP (%)	3,3	(1,4, 7,6)	2,3	(1,3, 4,1)
	VPN (%)	99,9	(98,4, 100)	99,9	(97,6, 100)
	Prevalencia (%)	0,4		0,4	

Tabla 23: Población NILM ≥ 30 años: rendimiento del Aptima HPV Assay y de la prueba de DNA del HPV para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3 (cálculos no ajustados) al inicio

	Rendimiento	Aptima HPV Assay N=819		Prueba de DNA del HPV N=801*	
		Cálculo	(IC del 95 %)	Cálculo	(IC del 95 %)
\geq CIN2	Sensibilidad (%)	75,0 (15/20)	(53,1, 88,8)	84,2 (16/19)	(62,4, 94,5)
	Especificidad (%)	62,6 (500/799)	(59,2, 65,9)	48,7 (381/782)	(45,2, 52,2)
	VPP (%)	4,8 (15/314)	(3,4, 5,8)	3,8 (16/417)	(2,9, 4,4)
	VPN (%)	99,0 (500/505)	(98,1, 99,6)	99,2 (381/384)	(98,1, 99,8)
	Prevalencia (%)	2,4 (20/819)		2,4 (19/801)	
\geq CIN3	Sensibilidad (%)	90,9 (10/11)	(62,3, 98,4)	90,9 (10/11)	(62,3, 98,4)
	Especificidad (%)	62,4 (504/808)	(59,0, 65,7)	48,5 (383/790)	(45,0, 52,0)
	VPP (%)	3,2 (10/314)	(2,2, 3,7)	2,4 (10/417)	(1,6, 2,7)
	VPN (%)	99,8 (504/505)	(99,1, 100)	99,7 (383/384)	(98,9, 100)
	Prevalencia (%)	1,3 (11/819)		1,4 (11/801)	

*18 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

La comparación directa del Aptima HPV Assay y de la prueba comercial de DNA del HPV muestra una sensibilidad similar y una especificidad significativamente mayor del Aptima HPV Assay frente a la prueba comercial de DNA del HPV para la detección de \geq CIN2, tal como indican las razones entre las tasas de positivos verdaderos y falsos (Tablas 24 y 25, respectivamente).

Tabla 24: Población NILM \geq 30 años: razón de tasas de positivos verdaderos (Aptima HPV Assay/prueba de DNA del HPV) para mujeres con \geq CIN2 (cálculos no ajustados) al inicio

		Prueba de DNA del HPV		Total
		Positivo	Negativo	
Aptima HPV Assay	Positivo	13	2	15 (78,9 %)
	Negativo	3	1	4
	Total	16 (84,2 %)	3	19
Razón de tasas de positivos verdaderos = 0,94 (15/16) (IC del 95 %: 0,67, 1,20)				

Tabla 25: Población NILM \geq 30 años: razón de tasas de positivos falsos (Aptima HPV Assay/prueba de DNA del HPV) para mujeres con $<$ CIN2 (cálculos no ajustados) al inicio

		Prueba de DNA del HPV		Total
		Positivo	Negativo	
Aptima HPV Assay	Positivo	223	59	282 (36,1 %)
	Negativo	178	322	500
	Total	401 (51,3 %)	381	782
Razón de tasas de positivos falsos = 0,70 (282/401) (IC del 95 %: 0,64, 0,77)				

Población NILM de ≥30 años: rendimiento clínico del Aptima HPV Assay tras 3 años de seguimiento

Había 10.854 mujeres evaluables de 30 o más años de edad con resultados de citología de NILM y resultados válidos para el Aptima HPV Assay al inicio que eran aptas para la fase de seguimiento. De las mujeres sin ≥CIN2, el 66,9 % (7.251/10.834) de las mujeres completaron una visita de citología de seguimiento en el año 1, el 60,2 % (6.522/10.825) el año 2 y el 58,6 % (6.344/10.818) el año 3. En general, el 58,8 % (6.380/10.854) de las mujeres completaron el estudio (tuvieron ≥CIN2 al inicio o durante el seguimiento, y/o completaron las visitas requeridas).

De las 10.854 mujeres, 540 (5,0 %) tuvieron resultados positivos para el Aptima HPV Assay al inicio. De esas 540 mujeres, 263 (48,7 %) tuvieron un estado de la enfermedad positivo o negativo a los 3 años según los resultados de la citología o la colposcopia/biopsia. Las 10.314 mujeres restantes tuvieron resultados negativos para el Aptima HPV Assay al inicio. De esas 10.314 mujeres, 5.943 (57,6 %) tuvieron un estado de la enfermedad positivo o negativo a los 3 años. De las 6.206 mujeres con estado de la enfermedad a los 3 años, 47 mujeres tuvieron ≥CIN2 incluidas 23 con ≥CIN3; 6.159 mujeres tuvieron un resultado normal/CIN1 según el grupo de consenso de la revisión histológica. Los resultados iniciales del Aptima HPV Assay y una prueba comercial de DNA del HPV, y el estado de la enfermedad a los 3 años (incluye la evaluación inicial y de seguimiento) según el grupo de consenso de la revisión histológica se presentan en la Tabla 26.

Tabla 26: Población NILM ≥ 30 años: clasificación de mujeres aptas para la fase de seguimiento según los resultados iniciales del Aptima HPV Assay, los resultados iniciales de la prueba de DNA del HPV, y estado de la enfermedad (≥CIN2, ≥CIN3, Sin verificar) determinado en las fases inicial y de seguimiento

Resultado del Aptima HPV Assay	Prueba de DNA del HPV	Total de mujeres	Estado de la enfermedad verificado: ≥CIN2		Estado de la enfermedad verificado: ≥CIN3		Estado de la enfermedad sin verificar	
			Mujeres con enfermedad (≥CIN2)	Mujeres sin enfermedad (<CIN2)	Mujeres con enfermedad (≥CIN3)	Mujeres sin enfermedad (<CIN3)	Perdido para el seguimiento	Indeterminado*
Positivo	Positivo	360	22	154	15	161	165	19
Positivo	Negativo	150	2	72	1	73	68	8
Positivo	Sin 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	Sin resultado**	605	1	321	0	322	269	14
Total		10.854	47	6.159	23	6.183	4.384	264

*Las mujeres con resultados citológicos anómalos durante el seguimiento y sin un resultado posterior del grupo de consenso de la revisión histológica, y las mujeres con una citología inadecuada en su última visita. 174 mujeres con estado indeterminado de la enfermedad completaron el seguimiento según el protocolo.

**635 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV principalmente debido a un volumen de muestra citológica insuficiente. El riesgo acumulado a los tres años de enfermedad (≥CIN2 and ≥CIN3) se basa en la estimación de Kaplan-Meier (análisis de tabla de vida) e incluye la enfermedad detectada al inicio o en el seguimiento.

Las mujeres que tuvieron alguna indicación de enfermedad (ASC-US o resultados citológicos más graves), pero son resultado del grupo de consenso de la revisión histológica fueron incluidas en el análisis mediante el uso de un método de imputación múltiple para predecir el número de mujeres con enfermedad que se habría identificado si las mujeres se hubieran sometido a una colposcopia.

Las estimaciones del riesgo absoluto y relativo acumulado a los 3 años para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3 se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27: Población NILM \geq 30 años: riesgos absoluto y relativo* acumulado a los 3 años de \geq CIN2 y \geq CIN3 para resultados del Aptima HPV Assay y una prueba de DNA del HPV al inicio

	Resultado del ensayo	Aptima HPV Assay		Prueba de DNA del HPV	
		Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)	Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)
\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)	
	Prevalencia (%)	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)	
	Prevalencia (%)	0,34		0,35	

*Los riesgos acumulados a los 3 años ajustados para otros posibles sesgos fueron similares a los riesgos en esta tabla. Debido a las diferencias anticipadas en los riesgos en el año 1 y en el año 2 para los dos grupos de mujeres en el estudio de seguimiento (aquellas con colposcopia al inicio y aquellas sin colposcopia al inicio), solo se notificó el riesgo acumulado a los tres años para los grupos combinados.

La prevalencia acumulada a los 3 años de \geq CIN2 y \geq CIN3 en mujeres con resultados citológicos de NILM al inicio fue de 0,68 % y 0,34 %, respectivamente. El riesgo relativo de \geq CIN2 era 22,55 (IC del 95 %: 12,68, 40,10), lo que indica que una mujer con positivo para el Aptima HPV Assay tiene 22,55 veces más probabilidades de tener \geq CIN2 que una mujer con negativo para el Aptima HPV Assay. El riesgo relativo de \geq CIN3 era 44,12 (IC del 95 %: 16,91, 115,10).

Rendimiento clínico del Aptima HPV Assay con muestras de citología en solución SurePath

Muestras en SurePath tratadas con solución de transferencia Aptima

Se recogieron muestras de citología en solución SurePath de mujeres canadienses (n=558) remitidas para seguimiento debido a: uno o más resultados de citología anormales, infección por HPV u otros motivos. Se transfirió una alícuota (0,5 ml) de cada muestra a un tubo de transferencia de muestras Aptima y después se trató con la solución de transferencia Aptima. Se analizó una sola réplica de cada muestra con el Aptima HPV Assay. Además, se extrajo una alícuota (1 ml) más de cada muestra para evaluarla con una prueba comercial de PRC del HPV. Se calculó la sensibilidad clínica para la detección de la enfermedad, definida como un resultado histológico \geq CIN3, tanto para el Aptima HPV Assay como para la prueba de PCR del HPV, como se muestra en la Tabla 28, con los valores de predicción positivos y negativos.

Tabla 28: Rendimiento del Aptima HPV Assay y de una prueba de PRC del HPV para la detección de \geq CIN3

Rendimiento	Aptima HPV Assay N=558		Prueba comercial de PRC del HPV N=558	
	Valor calculado	(IC del 95 %)	Valor calculado	(IC del 95 %)
Sensibilidad (%)	89,3 (25/28)	(72,8 - 96,3)	89,3 (25/28)	(72,8 - 96,3)
Especificidad (%)	56,8 (301/530)	(52,5 - 60,9)	49,1 (260/530)	(44,8 - 53,3)
VPP (%)	9,8 (25/254)	(8,1 - 11,2)	8,5 (25/295)	(7,0 - 9,5)
VPN (%)	99,0 (301/304)	(97,6 - 99,8)	98,9 (260/263)	(97,2 - 99,7)
Prevalencia (%)	5,0 (28/558)		5,0 (28/558)	

Tabla 29: Sensibilidad del Aptima HPV Assay con muestras de citología en solución SurePath y ThinPrep

Genotipo del HPV	Copias/ reacción	ThinPrep	SurePath
		% de positivos (IC del 95 %)	% de positivos (IC del 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)

Rendimiento del Aptima HPV Assay con muestras en medio de recogida y transporte de muestras de citología

Se recogieron muestras emparejadas de citología en solución ThinPrep y en el kit CSCT Aptima de 735 mujeres. Se diluyó un mililitro (1,0 ml) de cada muestra de citología en solución ThinPrep en 2,9 ml de medio de transporte de muestras Aptima y se analizó una sola réplica con el Aptima HPV Assay en el Tigris DTS System. También se analizó una sola réplica de cada muestra de CSCT con el Aptima HPV Assay. Se determinó el porcentaje de concordancia entre las muestras de citología en solución ThinPrep y las muestras de CSCT con el Aptima HPV Assay; los resultados se muestran en la Tabla 30.

El porcentaje de concordancia positiva fue del 95,9 % (IC del 95 %: 92,6-97,8); el porcentaje de concordancia negativa fue del 95,5 % (IC del 95 %: 93,3-97,0); y la concordancia global fue del 95,6 % (IC del 95 %: 93,9-96,9). Se observó una fuerte correlación entre las muestras de citología en solución y las muestras en el kit de transporte ($\kappa = 0,90$)

Tabla 30: Concordancia global de los resultados del Aptima HPV Assay entre las muestras de citología en solución ThinPrep y las muestras en el kit de recogida y transporte de muestras de citología Aptima analizadas en el Tigris DTS System

		Muestra de citología en solución ThinPrep		Total
		Positivo	Negativo	
Muestra en el kit CSCT Aptima	Positivo	234	22	256
	Negativo	10	469	479
	Total	244	491	735

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

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

Concordancia global = 95,6 % (93,9-96,9)

Coefficiente Kappa = 0,90

Sensibilidad analítica

El límite de detección (LD) en el valor de corte clínico es la concentración de RNA del HPV que arroja un resultado positivo (superior al valor de corte clínico) el 95 % de las veces. El LD del Aptima HPV Assay se determinó analizando grupos de muestras de dilución de transcritos *in vitro* (IVT) para cada uno de los 14 genotipos de alto riesgo y 4 líneas celulares infectadas con el HPV: SiHa, HeLa, MS751 y ME180 (ATCC, Manassas, Virginia). Para los grupos de muestras de IVT, los medios de transporte de las muestras se enriquecieron con IVT a distintas concentraciones y luego se diluyeron con muestras individuales de citología en solución ThinPrep negativas antes de su análisis. Para los grupos de muestras celulares infectadas con HPV, las mezclas de muestras de citología en solución ThinPrep negativas para el HPV se enriquecieron con células infectadas con HPV a distintas concentraciones y luego se diluyeron con medios de transporte de muestras antes de su análisis. Se analizaron treinta réplicas de cada nivel de copias con cada uno de los dos lotes de reactivos, para un total de 60 réplicas. Se realizaron análisis durante 14 días, con 1 a 12 ciclos por día y 5 réplicas de un genotipo y una concentración dados analizadas en cada ciclo. Se calculó el límite de detección del 95 % a partir del análisis de regresión Probit de los resultados de positividad de cada grupo de muestras de dilución.

Los resultados del análisis Probit, Tabla 31, muestran que los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 38, 45, 58, 59 y 68 del HPV tuvieron límites de detección del 95 % inferiores a 100 copias/reacción; y los tipos 51, 52, 56 y 66 tuvieron límites de detección del 95 % entre 100 y 300 copias/reacción. Las cuatro líneas celulares analizadas tuvieron límites de detección del 95 % inferiores a 1 célula/reacción.

Tabla 31: Límite de detección en el valor de corte clínico del Aptima HPV Assay

Diana	Límite de detección* (IC del 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)

*copias por reacción para los transcritos *in vitro* y células por reacción para las líneas celulares

Precisión del ensayo

La precisión del Aptima HPV Assay se evaluó en dos estudios con el mismo grupo de 20 muestras. El estudio 1 se llevó a cabo en 3 centros de análisis externos para determinar la reproducibilidad del ensayo. El estudio 2 se llevó a cabo internamente para determinar la repetibilidad del ensayo. El grupo de muestras incluyó 10 miembros positivos para el HPV con concentraciones iguales o superiores al límite de detección del ensayo (positividad esperada $\geq 95\%$), 4 miembros positivos para el HPV con concentraciones inferiores al límite de detección del ensayo (positividad esperada: $> 0\%$ a $< 25\%$) y 6 miembros negativos para el HPV. Los miembros del grupo de muestras positivas para HPV se prepararon añadiendo transcritos *in vitro* (IVT) de RNA a medio de transporte de muestras (Specimen Transport Medium, STM) o células cultivadas (SiHa, HeLa, ME180 y MS751; ATCC, Manassas, Virginia) infectadas con HPV en solución PreservCyt. Los miembros del grupo de muestras negativas para HPV se prepararon con STM o con una mezcla de muestras sobrantes de citología en solución ThinPrep.

En el estudio 1, 2 usuarios de cada uno de los 3 centros de análisis (1 instrumento por centro) analizaron 1 lista de trabajo del Aptima HPV Assay al día durante 3 días con cada uno de los 3 lotes de reactivos. Cada lista de trabajo tenía 3 réplicas de cada uno de los miembros del grupo de muestras de reproducibilidad. Se analizaron ciento sesenta y dos (162) tubos de muestra individuales de cada miembro del grupo de muestras (3 centros x 1 instrumento x 2 usuarios x 3 lotes x 3 listas de trabajo x 3 réplicas). En el estudio 2, los análisis se llevaron a cabo internamente durante 20 días, con un total de 162 reacciones analizadas por cada miembro del grupo de muestras (1 centro x 3 instrumentos x 3 usuarios x 3 lotes x 2 listas de trabajo x 3 réplicas).

Los miembros del grupo de muestras se describen en la Tabla 32a (miembros del grupo de muestras con resultados positivos esperados) y en la Tabla 32b (miembros del grupo de muestras con resultados negativos esperados), junto con un resumen de la concordancia con los resultados esperados y los valores de S/CO del analito en los percentiles 2,5°, 50° y 97,5° de la distribución de S/CO. La variabilidad de la S/CO del analito para los miembros del grupo de muestras con resultados positivos esperados se muestra en la Tabla 33 para el estudio 1 y en la Tabla 34 para el estudio 2.

La concordancia positiva para los miembros positivos para el HPV del grupo de muestras con concentraciones iguales o superiores al límite de detección del ensayo oscilaron entre el 95,1 % y el 100 % en el estudio 1, y entre el 93,2 % y el 100 % en el estudio 2 para 9 de los 10 miembros del grupo de muestras. El otro miembro positivo para el HPV del grupo de muestras mostró una concordancia del 77,2 % en el estudio 1 y del 79,0 % en el estudio 2; estos valores fueron menores de lo esperado, pero coherentes entre los dos estudios. La concordancia negativa para los miembros negativos del grupo de muestras con HPV alto con concentraciones inferiores al límite de detección del ensayo osciló entre el 78,8 % y el 93,8 % en el estudio 1 y entre el 82,1 % y el 95,7 % en el estudio 2. La concordancia con los resultados esperados de los miembros negativos para HPV del grupo de muestras oscilaron entre el 96,9 % y el 100 % en el estudio 1 y entre el 96,3 % y el 100 % en el estudio 2.

Tabla 32a: Estudios 1 y 2 de reproducibilidad del Aptima HPV Assay: descripción del grupo de muestras, concordancia positiva y distribución percentil de los valores de S/CO del analito para los miembros del grupo de muestras con resultados positivos esperados

Descripción del grupo de muestras (copias o células/ reacción)	Estudio 1 (3 centros de análisis)	Estudio 2 (1 centro de análisis)
	% de concordancia positiva (IC del 95 %)	% de concordancia positiva (IC del 95 %)
HPV 16 y HPV 18 IVT (100 copias)	100 (161/161) (97,7, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
Células SiHa (3 células) y HeLa (7,5 células)	100 (162/162) (97,7, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
HPV 18 IVT (100 copias)	100 (162/162) (97,7, 100)	100 (160/160) (97,7, 100)
HPV 16 IVT (100 copias)	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)
HPV 18 IVT (30 copias)	99,4 (161/162) (96,6, 99,9)	100 (162/162) (97,7, 100)
HPV 16 IVT (30 copias)	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*. El IVT se añadió a STM y las células se añadieron a solución PreservCyt.

*% de concordancia positiva esperada ~95 %; la concordancia observada fue menor, lo que podría deberse a la variabilidad en la fabricación del miembro del grupo de muestras.

Tabla 32b: Estudios 1 y 2 de reproducibilidad del Aptima HPV Assay: descripción del grupo de muestras, concordancia negativa y distribución percentil de los valores de S/CO del analito para los miembros del grupo de muestras con resultados negativos esperados

Descripción del grupo de muestras (copias o células/ reacción)	Estudio 1 (3 centros de análisis)	Estudio 2 (1 centro de análisis)
	% de concordancia negativa (IC del 95 %)	% de concordancia negativa (IC del 95 %)
HPV 18 IVT (1 copia)*	78,8 (126/160) (71,8, 84,4)	83,3 (135/162) (76,8, 88,3)
HPV 16 IVT (1 copia)*	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)
ThinPrep mezcla 1	97,5 (158/162) (93,8, 99,0)	97,5 (158/162) (93,8, 99,0)
ThinPrep mezcla 2	96,9 (157/162) (93,0, 98,7)	96,3 (156/162) (92,2, 98,3)
ThinPrep mezcla 3	100 (162/162) (97,7, 100)	99,4 (161/162) (96,6, 99,9)

STM = medio de transporte de muestras; IVT = transcrito *in vitro*. El IVT se añadió a STM y las células se añadieron a solución PreservCyt.

*% de concordancia negativa esperado > 75 % y < 100 %.

Tabla 33: Estudio 1 de reproducibilidad del Aptima HPV Assay: variabilidad de la señal para los miembros del grupo de muestras con resultados positivos esperados

Descripción del grupo de muestras (copias o células/reacción)	n	S/CO medio	Entre centros		Entre técnicos		Entre lotes		Entre listas de trabajo		Intra-listas de trabajo		Total	
			DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)
HPV 16 y HPV 18 IVT (100 copias)	161 [^]	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) y 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
HPV 18 IVT (100 copias)	162	11,8	0	0	0	0	0,8	6,4	0,1	0,9	1,2	10,1	1,4	12,0
HPV 16 IVT (100 copias)	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
HPV 18 IVT (30 copias)	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
HPV 16 IVT (30 copias)	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

DE = desviación estándar; CV = coeficiente de variación; IVT = transcrito *in vitro*; S/CO = razón señal/valor de corte

[^]Una de las muestras produjo un resultado no válido con el Aptima HPV Assay y no se incluyó en el análisis.

Nota: La variabilidad debida a varios factores puede ser numéricamente negativa. Esto puede ocurrir cuando la variabilidad debida a esos factores es muy pequeña. En esos casos, la DE y el CV se indican como 0.

Tabla 34: Estudio 2 de reproducibilidad del Aptima HPV Assay: variabilidad de la señal para los miembros del grupo de muestras con resultados positivos esperados

Descripción del grupo de muestras (copias o células/reacción)	n	S/CO medio	Entre instrumentos		Entre técnicos		Entre lotes		Entre listas de trabajo		Intra-listas de trabajo		Total	
			DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)
HPV 16 y HPV 18 IVT (100 copias)	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) y 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
HPV 18 IVT (100 copias)	160 [^]	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
HPV 16 IVT (100 copias)	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
HPV 18 IVT (30 copias)	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
HPV 16 IVT (30 copias)	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 [^]	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

DE = desviación estándar; CV = coeficiente de variación; IVT = transcrito *in vitro*; S/CO = razón señal/valor de corte

[^]Cinco muestras tuvieron resultados no válidos con el Aptima HPV Assay (2 para HPV 18 IVT [100 copias], 3 para células HeLa [2,5 células]), y no se incluyeron en el análisis.

Nota: La variabilidad debida a varios factores puede ser numéricamente negativa. Esto puede ocurrir cuando la variabilidad debida a esos factores es muy pequeña. En esos casos, la DE y el CV se indican como 0.

También se llevó a cabo un tercer estudio para determinar la reproducibilidad del ensayo, analizando un grupo de 6 miembros de muestras clínicas de citología en solución ThinPrep mezcladas. Se prepararon 6 mezclas únicas de restos de muestras de citología negativas para el HPV en solución ThinPrep como matriz y dos de ellas se analizaron como miembros negativos para el HPV del grupo de muestras. Se utilizaron cuatro mezclas únicas de muestras de citología en solución ThinPrep positivas para el HPV para preparar los miembros positivos bajos (n=2) y altos (n=2) para el HPV del grupo de muestras. Los miembros positivos bajos del grupo de muestras tenían concentraciones en el límite de detección del ensayo (positividad esperada: $\geq 95\%$ determinada para cada mezcla individual positiva para el HPV a partir del análisis de diluciones seriadas de las mezclas). Los miembros positivos altos del grupo de muestras tenían concentraciones de 1-2 logs por encima del límite de detección calculado para cada mezcla positiva para el HPV individual (positividad esperada: 100%). El día del análisis, se transfirió cada miembro del grupo de muestras (1 ml) a un tubo de transferencia de muestras Aptima que contenía STM. El análisis se llevó a cabo internamente por 2 técnicos con 1 lote de reactivos y 3 instrumentos durante 6 días (3 días por cada técnico), analizando 2 ciclos por día en los que el grupo de muestras se analizó por duplicado.

Los miembros del grupo de muestras se describen en la Tabla 35, junto con un resumen de la concordancia con los resultados esperados y los valores de S/CO del analito en los percentiles 2,5°, 50° y 97,5° de la distribución de la señal. La variabilidad de la S/CO del

analito para los miembros del grupo de muestras con resultados positivos esperados se muestra en la Tabla 36.

La concordancia fue del 100 % para los miembros del grupo de muestras positivas altas para el HPV, de $\geq 98,6$ % para los miembros del grupo de muestras positivas bajas para el HPV y de $\geq 94,4$ % para los miembros del grupo de muestras negativas para el HPV.

Tabla 35: Estudio 3 de reproducibilidad del Aptima HPV Assay: descripción del grupo de muestras, porcentaje de concordancia

Descripción del grupo de muestras	% de concordancia (IC del 95 %)
Positivos bajos 1	98,6 (71/72) (92,5, 99,8)
Positivos bajos 2	100 (72/72) (94,9, 100)
Positivos altos 1	100 (72/72) (94,9, 100)
Positivos altos 2	100 (72/72) (94,9, 100)
Negativo 1	98,6 (71/72) (92,5, 99,8)
Negativo 2	94,4 (68/72) (86,6, 97,8)

Tabla 36: Estudio 3 de reproducibilidad del Aptima HPV Assay: análisis de la señal de los miembros del grupo de muestras con resultados positivos esperados

Descripción del grupo de muestras	n	S/CO medio	Entre instrumentos		Entre técnicos		Entre lotes		Entre listas de trabajo		Intra-listas de trabajo		Total	
			DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)
Positivos bajos 1	72	9,8	0	0	0	0	0	0	2,2	22,8	3,0	30,4	3,7	38,0
Positivos bajos 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
Positivos altos 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
Positivos altos 2	72	23,9	0	0	0	0	0	0	2,9	12,3	3,0	12,4	4,2	17,4

DE = desviación estándar; CV = coeficiente de variación; S/CO = razón señal/valor de corte

Nota: La variabilidad debida a varios factores puede ser numéricamente negativa. Esto puede ocurrir cuando la variabilidad debida a esos factores es muy pequeña. En esos casos, la DE y el CV se indican como 0.

Reactividad cruzada

La especificidad analítica del Aptima HPV Assay se evaluó con medio de solución PreservCyt diluido 1:2,9 con STM y enriquecido con bacterias, levaduras u hongos cultivados, virus cultivados o transcritos *in vitro* de HPV de bajo riesgo. Los microorganismos y las concentraciones de prueba se identifican en la Tabla 37. Los criterios del estudio para evaluar el efecto de la presencia de microorganismos sobre la especificidad del ensayo se basó en la positividad. Se observó reactividad cruzada con los genotipos de HPV de bajo riesgo 26, 67, 70 y 82, pero no con ninguno de los demás microorganismos evaluados.

Tabla 37: Grupo de muestras de especificidad analítica: microorganismos y concentración sin reactividad cruzada

Microorganismo	Concentración de prueba sin reactividad cruzada	Microorganismo	Concentración de prueba sin reactividad cruzada
Bacterias			
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Listeria monocytogenes</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Actinomyces israelii</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Micrococcus luteus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Mobiluncus curtisii</i>	2 x 10 ⁷ UFC/ml
<i>Atopobium vaginae</i>	5 x 10 ⁷ UFC/ml	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Bacillus cereus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Mycoplasma fermentans</i>	5 x 10 ⁷ UFC/ml
<i>Bacteroides fragilis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Mycoplasma genitalium</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Mycoplasma hominis</i>	5 x 10 ⁷ UFC/ml
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Bifidobacterium breve</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> y <i>Chlamydia trachomatis</i>	2,5 x 10 ⁷ UFC/ml 2,3 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /ml
<i>Campylobacter fetus-fetus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Neisseria meningitidis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	3,2 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /ml	<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Clostridium difficile</i>	6 x 10 ⁷ UFC/ml	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Propionibacterium acnes</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Corynebacterium genitalium</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Proteus mirabilis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Corynebacterium xerosis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Proteus vulgaris</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Providencia stuartii</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Escherichia coli</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Ruminococcus productus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Fingoldia magna</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Serratia marcescens</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Staphylococcus aureus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Gardnerella vaginalis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Haemophilus ducreyi</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Lactobacillus crispatus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Lactobacillus jensenii</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml		

Tabla 37: Grupo de muestras de especificidad analítica: microorganismos y concentración sin reactividad cruzada (*continuación*)

Microorganismo	Concentración de prueba sin reactividad cruzada	Microorganismo	Concentración de prueba sin reactividad cruzada
Levaduras/protozoarios			
<i>Candida albicans</i>	1 x 10 ⁸ UFC/ml	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1 x 10 ⁷ células/ml
Virus			
Adenovirus 2	1 x 10 ⁷ vp/ml	Virus Herpes simplex 1	2,5 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /ml
Citomegalovirus	5,6 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /ml	Virus Herpes simplex 2	5 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /ml
Virus Epstein-Barr	4,3 x 10 ⁶ vp/ml	SV40	1,2 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /ml
VIH-1	1,0 x 10 ⁶ copias/ml		
Genotipos de HPV no diana			
HPV 6	2,5 x 10 ⁶ copias/ml	HPV 61	2,5 x 10 ⁶ copias/ml
HPV 11	2,5 x 10 ⁶ copias/ml	HPV 67	1 copia/ml
HPV 26	2,5 copias/ml	HPV 69	2,5 x 10 ⁵ copias/ml
HPV 30	2,5 x 10 ⁶ copias/ml	HPV 70	1 copia/ml
HPV 34	2,5 x 10 ⁶ copias/ml	HPV 71	2,5 x 10 ⁶ copias/ml
HPV 42	2,5 x 10 ⁶ copias/ml	HPV 73	2,5 x 10 ⁶ copias/ml
HPV 43	2,5 x 10 ⁶ copias/ml	HPV 81	2,5 x 10 ⁵ copias/ml
HPV 44	2,5 x 10 ⁶ copias/ml	HPV 82	1 copia/ml
HPV 53	2,5 x 10 ⁶ copias/ml	HPV 85	2,5 x 10 ⁶ copias/ml
HPV 54	2,5 x 10 ⁶ copias/ml		

vp = partículas víricas

UFC = unidades formadoras de colonias

TCID₅₀ = dosis infecciosa 50 en cultivo de tejidos

Nota: Los genotipos para los que se observó reactividad cruzada (> 5 % de positivos) a concentraciones superiores a las indicadas en la Tabla se muestran en **negrita**.

La sensibilidad analítica del Aptima HPV Assay en presencia de microorganismos se evaluó con el mismo grupo de muestras descrito en la Tabla 37, que también se enriqueció con una concentración baja de células SiHa infectadas con HPV (1 célula por reacción). Los criterios del estudio para evaluar el efecto de la presencia de microorganismos sobre la sensibilidad del ensayo se basó en la positividad. La sensibilidad del Aptima HPV Assay no se vio afectada por la presencia de ninguno de los microorganismos evaluados.

Interferencias

Las sustancias que se describen en la Tabla 38 se añadieron individualmente a solución PreservCyt a una concentración del 1 % y del 10 % v/v o p/v, se diluyeron con STM y después se analizaron con el Aptima HPV Assay. Todas las sustancias se analizaron en presencia y en ausencia de células cultivadas infectadas con HPV (SiHa, 3 células/reacción). Se observaron interferencias con dos de los siete lubricantes que contenían Polyquaternium 15 y con uno de los cinco antimicóticos que contenían tioconazol. No se observaron interferencias con ninguna de las otras sustancias analizadas.

Tabla 38: Sustancias analizadas para determinar posibles interferencias con el Aptima HPV Assay.

Categoría del producto	Marca o tipo de producto	Concentración más alta* utilizada que no interfirió con el rendimiento del ensayo
Lubricante	KY Sensual Mist	10 % v/v
	KY Warming Jelly	10 % p/v
	KY Warming Liquid	10 % v/v
	Lubricante personal marca CVS	10 % p/v
	Loción de masaje de calentamiento y lubricante personal marca Target	10 % v/v
	Lubricante personal Astroglide	0,3 % p/v (muestra de prueba al 0,075 % p/v)
	Lubricante líquido marca Target	0,1 % v/v (muestra de prueba al 0,025 % v/v)
Espemicida	Anticonceptivo vaginal Gynol II, fórmula original	10 % p/v
	Anticonceptivo vaginal Gynol II, extra fuerte	10 % p/v
	Espuma anticonceptiva vaginal Delfen	10 % p/v
	Anticonceptivo vaginal Encare	10 % p/v
	Anticonceptivo vaginal Conceptrol	10 % p/v
Medicamentos antimicóticos/antiprurito	Vagisil máxima potencia	10 % p/v
	Monistat Soothing Care	10 % p/v
	Monistat 3, envase combinado	10 % p/v
	Tioconazol 1 marca Target	0,3 % p/v (muestra de prueba al 0,075 % p/v)
	Miconazol 3 marca Target	10 % p/v
Ácido acético glacial	EMD M/N AX0073-11	10 % v/v
Sangre completa	sangre completa	10 % v/v

*Lubricantes personales que contienen Polyquaternium 15.

Resultados esperados con el Panther System: Prevalencia del mRNA del HPV de alto riesgo

La prevalencia de la infección por HPV de alto riesgo varía ampliamente y depende de varios factores, el más importante de los cuales es la edad.^{32,33} La prevalencia del HPV determinada por la detección del DNA del HPV se ha investigado en un gran número de estudios; sin embargo, pocos estudios indican la prevalencia basada en la detección del mRNA oncogénico del HPV. Se incluyó a mujeres de distintos centros clínicos (n = 18) que representaban una amplia distribución geográfica y una población diversa (10 estados de Estados Unidos) en un estudio clínico prospectivo conocido como el ensayo CLEAR.³⁴ La prevalencia de las muestras positivas para mRNA del HPV, según los resultados del Aptima HPV Assay en el Panther System, observada en el ensayo clínico se categorizó en total, por grupo de edad y por centro de análisis. Los resultados se muestran en la Tabla 39 para las poblaciones células escamosas atípicas de importancia no determinada (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, ASC-US) y negativas para lesiones o tumores intraepiteliales (Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy, NILM).

Tabla 39: Prevalencia del mRNA del HPV de alto riesgo por grupo de edad, centro de análisis y todos combinados

	Tasa de positivos % (x/n)	
	Población ASC-US (≥ 21 años)	Población NILM (≥ 30 años)
Todo	42,3 (404/956)	4,7 (512/10.860)
Grupo de edad (años)		
De 21 a 29	60,0 (251/418)	--
De 30 a 39	38,1 (101/265)	6,8 (286/4.192)
≥ 40	19,0 (52/273)	3,4 (226/6.668)
Centro de análisis		
1	41,5 (134/323)	3,7 (304/8.286)
2	43,1 (137/318)	9,2 (118/1.285)
3	42,2 (133/315)	7,0 (90/1.289)

-- = no aplicable

Diseño del ensayo clínico del Aptima HPV Assay con muestras de citología en solución ThinPrep

El Aptima HPV Assay en el sistema Panther se evaluó utilizando el sobrante de las muestras de citología remitidas, tomadas de las mujeres que dieron su consentimiento durante el estudio clínico multicéntrico y prospectivo en EE.UU., conocido como el ensayo CLEAR.³⁴

Ensayo CLEAR – Evaluación inicial

Se llevó a cabo el ensayo CLEAR para determinar el rendimiento clínico del Aptima HPV Assay para la detección de la neoplasia intraepitelial de cuello uterino de grado 2 o patologías del cuello uterino más graves (\geq CIN2). El ensayo CLEAR incluía una evaluación inicial y una evaluación de seguimiento de 3 años. Se incluyó a las mujeres en el estudio ASC-US o en el estudio NILM en función de los resultados de la citología obtenidos durante las pruebas de cribado de rutina de cáncer de cuello uterino. La población del estudio ASC-US incluyó a mujeres mayores de 21 años con resultados de citología ASC-US, y la población del estudio NILM incluyó a mujeres mayores de 30 años con resultados de citología NILM. El estudio NILM se diseñó en apoyo a la reivindicación del cribado complementario para mujeres mayores de 30 años, ya que las mujeres de esta edad con resultados de citología superiores a ASC-US deben someterse a una colposcopia independientemente del estado del HPV.³⁵

Se inscribieron mujeres de 18 centros clínicos, en su mayoría de clínicas de obstetricia y ginecología, con una amplia distribución geográfica, que constituían una población diversa. Las mujeres elegibles fueron asignadas al estudio ASC-US o al estudio NILM en función de los resultados de la muestra de citología en solución ThinPrep remitida. Al inicio, el sobrante de las muestras remitidas de mujeres del estudio ASCUS y del estudio NILM se analizó inicialmente con el Aptima HPV Assay en el Tigris DTS System y con una prueba comercial de DNA del HPV. Se obtuvieron entonces las muestras y se conservaron a -70 °C hasta que se analizaron con el Aptima HPV Assay en el Panther System.

Al inicio del ensayo CLEAR (fase inicial), todas las mujeres del estudio ASC-US fueron remitidas para una colposcopia, independientemente de los resultados obtenidos en la prueba del HPV. Se obtuvieron biopsias por legrado endocervical (LEC) o biopsias de cuello uterino en sacabocados (1 biopsia de cada uno de los 4 cuadrantes). En los casos en los que la lesión era visible, se obtuvo una biopsia en sacabocados (método dirigido; 1 biopsia por lesión) y en los cuadrantes sin una lesión visible, la biopsia se obtuvo de la unión escamocolumnar (método aleatorio).

En el estudio NILM, las mujeres con resultados positivos en el Aptima HPV Assay en el Tigris DTS System o la prueba comercial de DNA del HPV, así como mujeres con resultados negativos en ambos ensayos seleccionadas aleatoriamente, se remitieron para una colposcopia para la evaluación inicial. Las mujeres seleccionadas aleatoriamente con resultados negativos en ambos ensayos se incluyeron para corregir por el sesgo de verificación con cálculos de rendimiento ajustados, generados mediante un método de imputación múltiple. Se obtuvo una biopsia por LEC de cada mujer que se sometió a colposcopia. Solo se obtuvieron biopsias en sacabocados de las lesiones visibles (método dirigido; 1 biopsia por lesión).

El estado de la enfermedad se determinó mediante un grupo de consenso de la revisión histológica, basado en la concordancia de al menos 2 patólogos expertos. Los patólogos expertos no tuvieron acceso al estado de HPV de las mujeres. Tampoco tuvieron acceso al estado citológico, ni a los diagnósticos histológicos de los otros patólogos. Si los 3 patólogos

estuvieran en desacuerdo, los 3 patólogos revisarían los cortes en un microscopio multicabezal para alcanzar un consenso. Los resultados de las pruebas del HPV no se mostraron a los investigadores, los médicos ni las mujeres hasta después de la visita de la colposcopia, con el fin de evitar sesgos.

Al inicio se evaluó el rendimiento clínico del Aptima HPV Assay para la detección de \geq CIN2 y la neoplasia intraepitelial de cuello uterino de grado 3 o patologías del cuello uterino más graves (\geq CIN3) con relación al estado citológico determinado al inicio. También se determinó el rendimiento clínico de la prueba de DNA del HPV aprobada por la FDA para su comparación directa con los resultados del Aptima HPV Assay.

Ensayo CLEAR– Evaluación de seguimiento

Las mujeres del estudio NILM de 14 centros clínicos eran aptas para participar en la fase de seguimiento de 3 años del estudio si: i) tuvieron una visita de colposcopia al inicio y no tuvieron \geq CIN2, o ii) no tuvieron una visita de colposcopia al inicio. La fase de seguimiento del estudio consistía de visitas anuales. En estas visitas, a todas las mujeres se les tomaron muestras para citología cervical, y se analizó a algunas mujeres con una prueba comercial de HPV. Las mujeres con ASC-US o resultados citológicos más graves durante el periodo de seguimiento fueron derivadas a colposcopia utilizando los mismos procedimientos de biopsia y examen histológico utilizados para la evaluación inicial del estudio NILM. El estado de la enfermedad cervical en la visita de seguimiento se consideró “negativo” basándose en la citología de NILM o, en el caso de mujeres con resultados anormales en la citología, basándose en resultados normales o de CIN1 según el grupo de consenso de la revisión histológica. Las mujeres a las que se detectó un \geq CIN2 durante el periodo de seguimiento se consideró que habían completado el seguimiento y no acudieron a las visitas después de la detección de \geq CIN2. Las mujeres a las que no se detectó un \geq CIN2 durante el periodo de seguimiento, pero que acudieron a una visita del estudio en el año 1 de seguimiento y/o el año 2 de seguimiento y que acudieron a una visita del año 3 de seguimiento and se consideró que habían completado el seguimiento.

El objetivo del estudio de seguimiento era comparar el riesgo acumulado a los 3 años de enfermedad cervical en mujeres con resultados iniciales positivos para el Aptima HPV Assay con el riesgo acumulado a los 3 años de enfermedad cervical en mujeres con resultados iniciales negativos para el Aptima HPV Assay. El estado de la enfermedad cervical a los 3 años se determinó del siguiente modo:

- Estado positivo de la enfermedad cervical (\geq CIN2 y/o \geq CIN3) – Mujeres a las que se detectó \geq CIN2 al inicio o durante el seguimiento.
- Estado negativo de la enfermedad cervical (<CIN2) – Mujeres que completaron el seguimiento sin detección de \geq CIN2 y que se consideró que tenían un estado de enfermedad cervical “indeterminado”.
- Estado de enfermedad cervical indeterminado – Mujeres con resultados anormales en la citología durante el seguimiento y que no tuvieron un resultado posterior del grupo de consenso de la revisión histológica, o mujeres con una citología inadecuada en su última visita.
- Pérdida para el seguimiento – Mujeres que no completaron el seguimiento y que no se consideró que tuvieran un estado de enfermedad cervical “indeterminado”.

El rendimiento clínico del Aptima HPV Assay para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3 se evaluó respecto al estado de la enfermedad cervical a los 3 años.

Rendimiento del ensayo en el Panther System

Población ASC-US ≥ 21 años: rendimiento clínico del Aptima HPV Assay

En total, se incluyó a 1.252 mujeres mayores de 21 años con resultados de citología ASC-US en el estudio ASC-US; de ellas, 294 mujeres se retiraron del estudio. Las 958 mujeres restantes cumplían los requisitos para los análisis en el Panther System. Faltaron las muestras de 2 mujeres y 19 tuvieron un diagnóstico no determinado de la enfermedad; todas ellas se excluyeron del análisis. Las 937 mujeres evaluables restantes eran mayores de 21 años y tenían resultados de citología ASC-US, resultados del Aptima HPV Assay en el Panther System y un estado de enfermedad concluyente. Noventa y una (91) mujeres tenían ≥CIN2 y cuarenta y una (41) ≥CIN3. La prevalencia de ≥CIN2 y ≥CIN3 en mujeres evaluables con resultados de citología ASC-US fue del 9,7 % y del 4,4 %, respectivamente. Los resultados del Aptima HPV Assay según el diagnóstico del grupo de consenso de la revisión histológica se muestran en la Tabla 40.

Tabla 40: Población ASC-US ≥ 21 años: resultados del Aptima HPV Assay según el diagnóstico del grupo de consenso de la revisión histológica

Resultado del Aptima HPV Assay*	Prueba de DNA del HPV	Diagnóstico del grupo de consenso de la revisión histológica						
		Indeterminado**	Normal	CIN1	CIN2	CIN3	Cáncer	Total
Positivo	Positivo	6	178	110	40	32	1	367
Positivo	Negativo	0	5	2	0	2	0	9
Positivo	Sin resultado***	0	15	11	0	2	0	28
Negativo	Positivo	0	39	15	3	3	0	60
Negativo	Negativo	10	372	53	7	1	0	443
Negativo	Sin resultado***	3	39	7	0	0	0	49
Total		19	648	198	50	40	1****	956

*Todas las muestras tuvieron resultados finales válidos (tras el análisis inicial o después de la resolución de las muestras inicialmente no válidas por procedimiento).

**En 19 casos, las mujeres acudieron a la visita de colposcopia pero no fue posible llegar a un diagnóstico por los siguientes motivos: < 5 muestras de biopsia, todas ellas obtenidas con resultados histológicos normales/CIN1 (n=15), no se recogieron biopsias (n=3) o se perdieron las preparaciones de la biopsia (n=1).

***77 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

****Una mujer presentó adenocarcinoma in situ (AIS).

Los cálculos de rendimiento clínico del Aptima HPV Assay, incluidos los cálculos de sensibilidad, especificidad, y valor de predicción positivo (VPP) y negativo (VPN) para la detección de ≥CIN2 y ≥CIN3, basados en la evaluación de todas las biopsias o solo de las biopsias dirigidas, se muestran en la Tabla 41, al igual que los cálculos con la prueba comercial de DNA del HPV.

Tabla 41: Población ASC-US ≥ 21 años: rendimiento del Aptima HPV Assay y de una prueba de DNA del HPV para la detección de ≥CIN2 y ≥CIN3

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

*74 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

**El resultado histológico de consenso se obtuvo únicamente a partir de los resultados de las biopsias dirigidas. Las mujeres sin biopsias dirigidas reflejan una colposcopia normal y se incluyen en estos análisis como sin enfermedad (<CIN2 o <CIN3, según corresponda). Al incluir exclusivamente las biopsias dirigidas, en algunos casos no fue posible alcanzar un consenso.

Al evaluar todas las biopsias, los cálculos de sensibilidad clínica del Aptima HPV Assay y de la prueba comercial de DNA del HPV para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3, cuando se disponía de los resultados de ambos ensayos, fueron similares (las diferencias en los cálculos de sensibilidad no fueron estadísticamente significativos). Para \geq CIN2, la diferencia en sensibilidad fue del -4,5 % (IC del 95 %: -12,2 %, 2,5 %). Los cálculos de especificidad clínica del Aptima HPV Assay para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3 fueron más elevados que los obtenidos con la prueba comercial de DNA del HPV (las diferencias en los cálculos de especificidad fueron estadísticamente significativas). Para \geq CIN2, la diferencia en especificidad fue del 6,1 % (IC del 95 %: 4,2 %, 8,2 %). Los VPN fueron similares excepto para la detección de \geq CIN2, el VPP para el Aptima HPV Assay fue ligeramente más elevado que el VPP para la prueba comercial de DNA del HPV (19,3 % frente al 18,8 %).

De los 91 casos de \geq CIN2, 60 (65,9 %) fueron identificados en las biopsias dirigidas y 31 (34,1 %), en las biopsias aleatorias o de LEC (es decir, no en las biopsias dirigidas). Estos hallazgos son comparables a los resultados de los estudios publicados, en los que entre un 25 % y un 40 % de los casos de \geq CIN2, aproximadamente, se identificaron únicamente en las muestras de biopsias aleatorias o de LEC.^{36,37} Cuando se utilizaron únicamente las biopsias dirigidas para determinar el estado de la enfermedad (presuponiendo que las mujeres sin biopsias dirigidas tenían resultados histológicos normales puesto que no presentaban lesiones visibles), la prevalencia de \geq CIN2 y \geq CIN3 en el estudio fue del 6,4 % y del 3,1 %, respectivamente. Los cálculos de sensibilidad clínica para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3 fueron más elevados para ambos análisis cuando se utilizaron únicamente biopsias dirigidas que cuando se utilizaron todas las biopsias. Para ambos ensayos, la especificidad clínica cuando se utilizaron solo biopsias dirigidas fue similar a la obtenida cuando se utilizaron todas las biopsias. En consecuencia, cuando se utilizaron únicamente las biopsias dirigidas, la especificidad del Aptima HPV Assay fue significativamente mayor que la de la prueba comercial de DNA del HPV.

Los cálculos de rendimiento clínico del Aptima HPV Assay y de la prueba comercial de DNA del HPV se muestran, por grupo de edad, en las Tablas 42 y 43 (\geq CIN2 y \geq CIN3, respectivamente, basadas en la evaluación de todas las biopsias).

Tabla 42: Población ASC-US ≥ 21 años: rendimiento del Aptima HPV Assay y de una prueba de DNA del HPV para la detección de ≥CIN2 por grupo de edad

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

*74 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

Tabla 43: Población ASC-US ≥ 21 años: rendimiento del Aptima HPV Assay y de una prueba de DNA del HPV para la detección de ≥CIN3 por grupo de edad

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

*74 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

El riesgo absoluto de enfermedad (\geq CIN2 y \geq CIN3, basado en la evaluación de todas las biopsias) según el resultado del Aptima HPV Assay, y el riesgo relativo de enfermedad según los resultados positivos frente a negativos del Aptima HPV Assay, se muestran en la Tabla 44, al igual que los cálculos obtenidos con la prueba comercial de DNA del HPV. El riesgo relativo de \geq CIN2 fue de 7,4 (IC del 95 %: 4,3, 13,0), lo que indica que una mujer con un resultado positivo en el Aptima HPV Assay tiene 7,4 veces más posibilidades de tener \geq CIN2 que una mujer con un resultado negativo en el Aptima HPV Assay. El riesgo relativo de \geq CIN3 fue de 12,5 (IC del 95 %: 4,5, 34,9).

Tabla 44: Población ASC-US \geq 21 años: riesgos absoluto y relativo de \geq CIN2 y \geq CIN3 para los resultados del Aptima HPV Assay y de una prueba de DNA del HPV

	Resultado del ensayo	Aptima HPV Assay N=937		Prueba de DNA del HPV N=863*	
		Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)	Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)
\geq CIN2	Positivo	19,3 (77/398) (17,3, 21,2)	7,4 (4,3, 13,0)	18,8 (79/421) (17,0, 20,4)	8,3 (4,4, 15,8)
	Negativo	2,6 (14/539) (1,5, 4,0)		2,3 (10/442) (1,2, 3,8)	
	Prevalencia (%)	9,7 (91/937)		10,3 (89/863)	
\geq CIN3	Positivo	9,3 (37/398) (8,0, 10,3)	12,5 (4,5, 34,9)	8,6 (36/421) (7,4, 9,4)	12,6 (3,9, 40,6)
	Negativo	0,7 (4/539) (0,2, 1,7)		0,7 (3/442) (0,2, 1,7)	
	Prevalencia (%)	4,4 (41/937)		4,5 (39/863)	

*74 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

Los cálculos de riesgo absoluto y relativo de enfermedad (\geq CIN2 y \geq CIN3, basados en la evaluación de todas las biopsias) para el Aptima HPV Assay y la prueba comercial de DNA del HPV por grupo de edad se muestran en la Tabla 45.

Tabla 45: Población ASC-US \geq 21 años: riesgos absoluto y relativo de \geq CIN2 y \geq CIN3 por grupo de edad para los resultados del Aptima HPV Assay y de una prueba de DNA del HPV

	Edad	Resultado del ensayo	Aptima HPV Assay N=937		Prueba de DNA del HPV N=863*	
			Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)	Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)
\geq CIN2	De 21 a 29 años		N=415		N=389	
		Positivo	21,7 (54/249) (19,3, 23,9)	5,1 (2,4, 11,0)	20,8 (56/269) (19,0, 22,5)	8,3 (2,7, 26,1)
		Negativo	4,2 (7/166) (1,9, 7,7)		2,5 (3/120) (0,6, 6,4)	
		Prevalencia (%)	9,7 (61/415)		15,2 (59/389)	
	De 30 a 39 años		N=261		N=238	
		Positivo	17,3 (17/98) (13,1, 21,1)	9,4 (2,8, 31,3)	16,2 (16/99) (11,8, 19,8)	5,6 (1,9, 16,3)
		Negativo	1,8 (3/163) (0,4, 4,3)		2,9 (4/139) (0,9, 5,9)	
		Prevalencia (%)	7,7 (20/261)		8,4 (20/238)	
	\geq 40 años		N=261		N=236	
Positivo		11,8 (6/51) (5,6, 17,7)	6,2 (1,8, 21,1)	13,2 (7/53) (6,9, 18,7)	8,1 (2,2, 30,1)	
Negativo		1,9 (4/210) (0,6, 3,4)		1,6 (3/183) (0,4, 3,4)		
Prevalencia (%)		3,8 (10/261)		4,2 (10/236)		
\geq CIN3	De 21 a 29 años		N=415		N=389	
		Positivo	10,4 (26/249) (9,0, 11,5)	17,3 (2,4, 127)	9,3 (25/269) (8,2, 10,0)	No calculable
		Negativo	0,6 (1/166) (0,0, 2,8)		0,0 (0/120) (0,0, 2,5)	
		Prevalencia (%)	6,5 (27/415)		6,4 (25/389)	
	De 30 a 39 años		N=261		N=238	
		Positivo	8,2 (8/98) (5,0, 10,1)	13,3 (1,7, 105)	7,1 (7/99) (4,0, 9,2)	4,9 (1,0, 23,2)
		Negativo	0,6 (1/163) (0,0, 2,4)		1,4 (2/139) (0,2, 3,6)	
		Prevalencia (%)	3,4 (9/261)		3,8 (9/238)	
	\geq 40 años		N=261		N=236	
Positivo		5,9 (3/51) (1,6, 9,7)	6,2 (1,1, 36,0)	7,5 (4/53) (2,9, 10,7)	13,8 (1,6, 121)	
Negativo		1,0 (2/210) (0,1, 2,0)		0,5 (1/183) (0,0, 1,8)		
Prevalencia (%)		1,9 (5/261)		2,1 (5/236)		

*74 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

Población NILM \geq 30 años: rendimiento clínico del Aptima HPV Assay con muestras de citología en solución ThinPrep al inicio

En total, se incluyó a 11.644 mujeres con resultados de citología NILM en el estudio NILM. De ellas, 773 mujeres se retiraron del estudio. Las 10.871 mujeres restantes cumplían los requisitos para los análisis en el Panther System. Faltaron las muestras de 11 mujeres, y se excluyeron de la evaluación inicial del Aptima HPV Assay en el Panther System. Las 10.860 mujeres evaluables restantes eran mayores de 30 años, tenían resultados de citología NILM y contaban con resultados del Aptima HPV Assay en el Panther System. De las 512 mujeres con resultados positivos del Aptima HPV Assay en el Panther System, 284 se sometieron a una colposcopia al inicio. De las 10.348 mujeres con resultados negativos del Aptima HPV Assay, 580 se sometieron a una colposcopia al inicio. Veinte (20) mujeres tenían \geq CIN2 y once (11) tenían \geq CIN3; 798 mujeres tenían una histología normal/CIN1; 46 mujeres tenían un estado de enfermedad indeterminado. Los resultados del Aptima HPV Assay en el Panther System según el diagnóstico del grupo de consenso de la revisión histológica al inicio se muestran en la Tabla 46.

Tabla 46: Población NILM \geq 30 años: resultados del Aptima HPV Assay y de una prueba de DNA del HPV según el diagnóstico del grupo de consenso de la revisión histológica al inicio

Resultado del Aptima HPV Assay*	Prueba de DNA del HPV	Diagnóstico del grupo de consenso de la revisión histológica						
		Indeterminado**	Normal	CIN1	CIN2	CIN3	Cáncer	Total
Positivo	Positivo	11	211	12	4	7	2	247
Positivo	Negativo	2	19	0	0	0	1	22
Positivo	Sin resultado***	2	12	1	0	0	0	15
Negativo	Positivo	10	170	7	2	1	0	190
Negativo	Negativo	20	353	9	2	0	0	384
Negativo	Sin resultado***	1	4	0	1	0	0	6
Total		46	769	29	9	8	3****	864

*Todas las muestras tuvieron resultados finales válidos (tras el análisis inicial o después de la resolución de las muestras inicialmente no válidas por procedimiento).

**En 46 casos, las mujeres acudieron a la visita de colposcopia pero no fue posible llegar a un diagnóstico por los siguientes motivos: muestras de biopsia que resultaron inadecuadas (n=29), no se recogieron biopsias (n=15) o se perdieron las preparaciones de la biopsia (n=2).

***21 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

****Tres mujeres presentaron adenocarcinoma in situ (AIS).

En total, 10.042 mujeres tuvieron un estado de enfermedad no verificado al inicio (incluidos los no determinados) (Tabla 47). Debido a que solo se remitieron para colposcopia mujeres aleatoriamente seleccionadas con resultados negativos tanto en el Aptima HPV Assay en el Tigris DTS System como en la prueba comercial de DNA del HPV, la proporción de mujeres con un estado de enfermedad no verificado fue elevada en este grupo (96,6 %). Para compensar este sesgo en la verificación, se utilizó un método de imputación múltiple para calcular el número de mujeres con enfermedad que podrían haber sido identificadas en el caso de que se hubiera realizado una colposcopia a todas las mujeres. Se presentan los cálculos de rendimiento ajustados y no ajustados por el sesgo de verificación, basados en las 818 mujeres con un estado de enfermedad verificado al inicio.

Tabla 47: Población NILM ≥ 30 años: clasificación de mujeres NILM evaluables por resultados del Aptima HPV Assay y de una prueba de DNA del HPV, estado de enfermedad (≥CIN2 y ≥CIN3), y estado de verificación de la enfermedad

Resultado del Aptima HPV Assay*		Prueba de DNA del HPV	Total de mujeres	Estado de enfermedad verificado: ≥CIN2		Estado de enfermedad verificado: ≥CIN3		Estado de enfermedad no verificado
Sistema Panther	Tigris DTS System			Mujeres enfermas (≥CIN2)	Mujeres no enfermas (<CIN2)	Mujeres enfermas (≥CIN3)	Mujeres no enfermas (<CIN3)	Mujeres con un estado de enfermedad desconocido (% desconocido)
Positivo	Positivo	Positivo	313	13	189	9	193	111 (35,5 %)
Positivo	Positivo	Negativo	37	1	18	1	18	18 (48,6 %)
Positivo	Positivo	Sin resultado**	22	0	13	0	13	9 (40,9 %)
Positivo	Negativo	Positivo	70	0	34	0	34	36 (51,4 %)
Positivo	Negativo	Negativo	60	0	1	0	1	59 (98,3 %)
Positivo	Negativo	Sin resultado**	10	0	0	0	0	10 (100 %)
Negativo	Positivo	Positivo	46	0	33	0	33	13 (28,3 %)
Negativo	Positivo	Negativo	113	1	41	0	42	71 (62,8 %)
Negativo	Positivo	Sin resultado**	8	0	4	0	4	4 (50,0 %)
Negativo	Negativo	Positivo	236	3	144	1	146	89 (37,7 %)
Negativo	Negativo	Negativo	9.354	1	321	0	322	9.032 (96,6 %)
Negativo	Negativo	Sin resultado**	591	1	0	0	1	590 (99,8 %)
Total			10.860	20	798	11	807	10.042 (92,5 %)

*Todas las muestras tuvieron resultados finales válidos (tras el análisis inicial o después de la resolución de las muestras inicialmente no válidas por procedimiento).

**631 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

La prevalencia ajustada de \geq CIN2 y \geq CIN3 en mujeres con resultados de citología NILM fue del 0,9 % y del 0,4 %, respectivamente. Los cálculos ajustados de riesgo absoluto y relativo para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3 se muestran en la Tabla 48. El riesgo relativo ajustado de \geq CIN2 fue de 7,5 (IC del 95 %: 2,1, 26,3), lo que indica que una mujer con un resultado positivo en el Aptima HPV Assay tiene 7,5 veces más posibilidades de tener \geq CIN2 que una mujer con un resultado negativo en el Aptima HPV Assay. El riesgo relativo ajustado de \geq CIN3 al inicio fue de 24,9 (IC del 95 %: 2,0, 307,0). Los cálculos no ajustados de riesgo absoluto y relativo para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3 al inicio se muestran, en total, en la Tabla 49 y, por grupo de edad, en la Tabla 50.

Tabla 48: Población NILM \geq 30 años: riesgos absoluto y relativo de \geq CIN2 y \geq CIN3 para los resultados del Aptima HPV Assay y de una prueba de DNA del HPV (cálculos ajustados por el sesgo de verificación) al inicio

	Resultado del ensayo	Aptima HPV Assay		Prueba de DNA del HPV	
		Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)	Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)
\geq CIN2	Positivo	4,5 (2,7, 7,4)	7,5 (2,1, 26,3)	3,7 (2,3, 6,1)	7,3 (1,6, 33,5)
	Negativo	0,6 (0,2, 1,9)		0,5 (0,1, 2,1)	
	Prevalencia (%)	0,9		0,9	
\geq CIN3	Positivo	3,0 (1,6, 5,5)	24,9 (2,0, 307,0)	2,3 (1,3, 4,1)	21,0 (1,0, 423,8)
	Negativo	0,1 (0,0, 1,7)		0,1 (0,0, 2,4)	
	Prevalencia (%)	0,4		0,4	

Tabla 49: Población NILM \geq 30 años: riesgos absoluto y relativo de \geq CIN2 y \geq CIN3 para los resultados del Aptima HPV Assay y de una prueba de DNA del HPV (cálculos no ajustados) al inicio

	Resultado del ensayo	Aptima HPV Assay N=818		Prueba de DNA del HPV N=800*	
		Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)	Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)
\geq CIN2	Positivo	5,2 (14/269) (3,5, 6,6)	4,8 (1,9, 12,3)	3,8 (16/416) (2,9, 4,5)	4,9 (1,4, 16,8)
	Negativo	1,1 (6/549) (0,5, 1,9)		0,8 (3/384) (0,2, 1,9)	
	Prevalencia (%)	2,4 (20/818)		2,4 (19/800)	
\geq CIN3	Positivo	3,7 (10/269) (2,5, 4,3)	20,4 (2,6, 159)	2,4 (10/416) (1,6, 2,7)	9,2 (1,2, 71,8)
	Negativo	0,2 (1/549) (0,0, 0,8)		0,3 (1/384) (0,0, 1,1)	
	Prevalencia (%)	1,3 (11/818)		1,4 (11/800)	

*18 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

Tabla 50: Población NILM ≥ 30 años: riesgos absoluto y relativo de ≥CIN2 y ≥CIN3 por grupo de edad para los resultados del Aptima HPV Assay y de una prueba de DNA del HPV (cálculos no ajustados) al inicio

	Edad	Resultado del ensayo	Aptima HPV Assay N=818		Prueba de DNA del HPV N=800*	
			Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)	Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)
≥CIN2	De 30 a 39 años		N=383		N=376	
		Positivo	4,6 (7/153) (2,5, 5,9)	5,3 (1,1, 25,0)	3,3 (7/215) (1,8, 4,1)	2,6 (0,6, 12,4)
		Negativo	0,9 (2/230) (0,1, 2,2)		1,2 (2/161) (0,2, 3,2)	
		Prevalencia (%)	2,3 (9/383)		2,4 (9/376)	
	≥ 40 Años		N=435		N=424	
		Positivo	6,0 (7/116) (3,2, 8,5)	4,8 (1,4, 16,1)	4,5 (9/201) (2,9, 5,3)	10,0 (1,3, 78,1)
		Negativo	1,3 (4/319) (0,4, 2,3)		0,4 (1/223) (0,0, 1,8)	
		Prevalencia (%)	2,5 (11/435)		2,4 (10/424)	
≥CIN3	De 30 a 39 años		N=383		N=376	
		Positivo	3,3 (5/153) (1,6, 4,1)	7,5 (0,9, 63,7)	2,3 (5/215) (1,1, 2,9)	3,7 (0,4, 31,7)
		Negativo	0,4 (1/230) (0,0, 1,6)		0,6 (1/161) (0,0, 2,2)	
		Prevalencia (%)	1,6 (6/383)		1,6 (6/376)	
	≥ 40 años		N=435		N=424	
		Positivo	4,3 (5/116) (2,2, 5,1)	No calculable	2,5 (5/201) (1,3, 2,8)	No calculable
		Negativo	0,0 (0/319) (0,0, 0,8)		0,0 (0/223) (0,0, 1,1)	
		Prevalencia (%)	1,1 (5/435)		1,2 (5/424)	

*18 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

Los cálculos ajustados de rendimiento clínico del Aptima HPV Assay, incluidos los cálculos de sensibilidad, especificidad, y valor de predicción positivo (VPP) y negativo (VPN) para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3 al inicio se muestran en la Tabla 51, al igual que los cálculos con la prueba comercial de DNA del HPV. Los cálculos no ajustados de rendimiento clínico se muestran en la Tabla 52. El Aptima HPV Assay y la prueba comercial de DNA del HPV mostraron una sensibilidad similar, mientras que la especificidad fue significativamente mayor con el Aptima HPV Assay (los IC del 95 % no se superponen). Los cálculos de los valores de predicción del Aptima HPV Assay fueron clínicamente relevantes y similares a los cálculos de la prueba comercial de DNA del HPV. Los VPN fueron similares excepto para la detección de \geq CIN2, el VPP para el Aptima HPV Assay fue ligeramente más elevado que el VPP para la prueba comercial de DNA del HPV (4,5 % frente al 3,7 %).

Tabla 51: Población NILM \geq 30 años: rendimiento del Aptima HPV Assay y de una prueba de DNA del HPV para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3 (cálculos ajustados por el sesgo de verificación) al inicio

	Rendimiento	Aptima HPV Assay		Prueba de DNA del HPV	
		Cálculo	(IC del 95 %)	Cálculo	(IC del 95 %)
\geq CIN2	Sensibilidad (%)	28,4	(4,9, 51,8)	35,4	(3,8, 66,9)
	Especificidad (%)	95,5	(95,1, 95,9)	93,7	(93,2, 94,2)
	VPP (%)	4,5	(2,7, 7,4)	3,7	(2,3, 6,1)
	VPN (%)	99,4	(98,1, 99,8)	99,5	(97,9, 99,9)
	Prevalencia (%)	0,9 (0,0, 1,9)		0,9 (0,0, 1,9)	
\geq CIN3	Sensibilidad (%)	54,0	(3,6, 100)	56,4	(0,4, 100)
	Especificidad (%)	95,4	(95,0, 95,8)	93,6	(93,1, 94,1)
	VPP (%)	3,0	(1,6, 5,5)	2,3	(1,3, 4,1)
	VPN (%)	99,9	(98,3, 100)	99,9	(97,6, 100)
	Prevalencia (%)	0,4 (0,0, 1,2)		0,4 (0,0, 1,3)	

Tabla 52: Población NILM ≥ 30 años: rendimiento del Aptima HPV Assay y de una prueba de DNA del HPV para la detección de ≥CIN2 y ≥CIN3 (cálculos no ajustados) al inicio

	Rendimiento	Aptima HPV Assay N=818		Prueba de DNA del HPV N=800*	
		Cálculo	(IC del 95 %)	Cálculo	(IC del 95 %)
≥CIN2	Sensibilidad (%)	70,0 (14/20)	(48,1, 85,5)	84,2 (16/19)	(62,4, 94,5)
	Especificidad (%)	68,0 (543/798)	(64,7, 71,2)	48,8 (381/781)	(45,3, 52,3)
	VPP (%)	5,2 (14/269)	(3,5, 6,6)	3,8 (16/416)	(2,9, 4,5)
	VPN (%)	98,9 (543/549)	(98,1, 99,5)	99,2 (381/384)	(98,1, 99,8)
	Prevalencia (%)	2,4 (20/818)		2,4 (19/800)	
≥CIN3	Sensibilidad (%)	90,9 (10/11)	(62,3, 98,4)	90,9 (10/11)	(62,3, 98,4)
	Especificidad (%)	67,9 (548/807)	(64,6, 71,0)	48,5 (383/789)	(45,1, 52,0)
	VPP (%)	3,7 (10/269)	(2,5, 4,3)	2,4 (10/416)	(1,6, 2,7)
	VPN (%)	99,8 (548/549)	(99,2, 100)	99,7 (383/384)	(98,9, 100)
	Prevalencia (%)	1,3 (11/818)		1,4 (11/800)	

*18 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV debido principalmente a un volumen insuficiente de la muestra de citología.

La comparación directa del Aptima HPV Assay en el Panther System y de la prueba comercial de DNA del HPV muestra una sensibilidad similar y una especificidad mejorada de forma estadísticamente significativa del Aptima HPV Assay frente a la prueba comercial de DNA del HPV para la detección de \geq CIN2, tal como indican las razones entre las tasas de positivos verdaderos y falsos (Tablas 53 y 54, respectivamente).

Tabla 53: Población NILM \geq 30 años: razón de tasas de positivos verdaderos (Aptima HPV Assay/ prueba de DNA del HPV) para mujeres con \geq CIN2 (cálculos no ajustados) al inicio

		Prueba de DNA del HPV		Total
		Positivo	Negativo	
Aptima HPV Assay	Positivo	13	1	14 (73,7 %)
	Negativo	3	2	5
	Total	16 (84,2 %)	3	19
Razón de tasas de positivos verdaderos = 0,88 (14/16) (IC del 95 %: 0,65, 1,10)				

Tabla 54: Población NILM \geq 30 años: razón de tasas de positivos falsos (Aptima HPV Assay/ prueba de DNA del HPV) para mujeres con $<$ CIN2 (cálculos no ajustados) al inicio

		Prueba de DNA del HPV		Total
		Positivo	Negativo	
Aptima HPV Assay	Positivo	223	19	242 (31,0 %)
	Negativo	177	362	539
	Total	400 (51,2 %)	381	781
Razón de tasas de positivos falsos = 0,61 (242/400) (IC del 95 %: 0,55, 0,66)				

Población NILM de \geq 30 años: rendimiento clínico del Aptima HPV Assay en el Sistema Panther tras 3 años de seguimiento

Había 10.843 mujeres evaluables de 30 o más años de edad con resultados de citología de NILM y resultados válidos para el Aptima HPV Assay al inicio que eran aptas para la fase de seguimiento. De las mujeres sin \geq CIN2, el 67,0 % (7.247/10.823) de las mujeres completaron una visita de citología de seguimiento en el año 1, el 60,3 % (6.517/10.814) el año 2 y el 58,7 % (6.339/10.807) el año 3. En general, el 58,8 % (6.375/10.843) de las mujeres completaron el estudio (tuvieron \geq CIN2 al inicio o durante el seguimiento, y/o completaron las visitas requeridas).

De las 10.843 mujeres, 511 (4,7 %) tuvieron resultados positivos para el Aptima HPV Assay al inicio. De esas 511 mujeres, 255 (49,9 %) tuvieron un estado de la enfermedad positivo o negativo a los 3 años según los resultados de la citología o la colposcopia/biopsia. Las 10.332 mujeres restantes tuvieron resultados negativos para el Aptima HPV Assay al inicio. De esas 10.332 mujeres, 5.946 (57,5 %) tuvieron un estado de la enfermedad positivo o negativo a los 3 años. De las 6.201 mujeres con estado de la enfermedad a los 3 años, 47 mujeres tuvieron \geq CIN2 incluidas 23 con \geq CIN3; 6.154 mujeres tuvieron un resultado normal/

CIN1 según el grupo de consenso de la revisión histológica. Los resultados iniciales del Aptima HPV Assay y una prueba comercial de DNA del HPV, y el estado de la enfermedad a los 3 años (incluye la evaluación inicial y de seguimiento) según el grupo de consenso de la revisión histológica se presentan en la Tabla 55.

Tabla 55: Población NILM \geq 30 años: clasificación de mujeres aptas para la fase de seguimiento según los resultados iniciales del Aptima HPV Assay, los resultados iniciales de la prueba de DNA del HPV, y estado de la enfermedad (\geq CIN2, \geq CIN3, Sin verificar) determinado en las fases inicial y de seguimiento

Resultado del Aptima HPV Assay	Prueba de DNA del HPV	Total de mujeres	Estado de la enfermedad verificado: \geq CIN2		Estado de la enfermedad verificado: \geq CIN3		Estado de la enfermedad sin verificar	
			Mujeres con enfermedad (\geq CIN2)	Mujeres sin enfermedad (<CIN2)	Mujeres con enfermedad (\geq CIN3)	Mujeres sin enfermedad (<CIN3)	Perdido para el seguimiento	Indeterminado*
Positivo	Positivo	382	23	171	16	178	167	21
Positivo	Negativo	97	1	48	1	48	44	4
Positivo	Sin 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	Sin resultado**	599	1	320	0	321	264	14
Total		10.843	47	6.154	23	6.178	4.378	264

*Las mujeres con resultados citológicos anormales durante el seguimiento y sin un resultado posterior del grupo de consenso de la revisión histológica, y las mujeres con una citología inadecuada en su última visita. 174 mujeres con estado indeterminado de la enfermedad completaron el seguimiento según el protocolo.

**631 mujeres con resultados del Aptima HPV Assay no tuvieron resultados de la prueba de DNA del HPV principalmente debido a un volumen de muestra citológica insuficiente.

El riesgo acumulado a los tres años de enfermedad (\geq CIN2 and \geq CIN3) se basa en la estimación de Kaplan-Meier (análisis de tabla de vida) e incluye la enfermedad detectada al inicio o en el seguimiento. Las mujeres que tuvieron alguna indicación de enfermedad (ASC-US o resultados citológicos más graves), pero son resultado del grupo de consenso de la revisión histológica fueron incluidas en el análisis mediante el uso de un método de imputación múltiple para predecir el número de mujeres con enfermedad que se habría identificado si las mujeres se hubieran sometido a una colposcopia.

Las estimaciones del riesgo absoluto y relativo acumulado a los 3 años para la detección de \geq CIN2 y \geq CIN3 se muestran en la Tabla 56.

Tabla 56: Población NILM \geq 30 años: riesgos absoluto y relativo* acumulado a los 3 años de \geq CIN2 y \geq CIN3 para resultados del Aptima HPV Assay y una prueba de DNA del HPV al inicio

	Resultado del ensayo	Aptima HPV Assay		Prueba de DNA del HPV	
		Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)	Riesgo absoluto (IC del 95 %)	Riesgo relativo (IC del 95 %)
\geq CIN2	Positivo	7,90 (5,50, 11,27)	24,45 (13,85, 43,15)	6,43 (4,50, 9,14)	22,71 (12,20, 42,30)
	Negativo	0,32 (0,21, 0,51)		0,28 (0,17, 0,47)	
	Prevalencia (%)	0,68		0,68	
\geq CIN3	Positivo	5,23 (3,34, 8,13)	57,11 (21,09, 154,62)	4,14 (2,62, 6,52)	51,34 (17,74, 148,58)
	Negativo	0,09 (0,04, 0,23)		0,08 (0,03, 0,22)	
	Prevalencia (%)	0,34		0,35	

*Los riesgos acumulados a los 3 años ajustados para otros posibles sesgos fueron similares a los riesgos en esta tabla. Debido a las diferencias anticipadas en los riesgos en el año 1 y en el año 2 para los dos grupos de mujeres en el estudio de seguimiento (aquellas con colposcopia al inicio y aquellas sin colposcopia al inicio), solo se notificó el riesgo acumulado a los tres años para los grupos combinados.

La prevalencia acumulada a los 3 años de \geq CIN2 y \geq CIN3 en mujeres con resultados citológicos de NILM al inicio fue de 0,68 % y 0,34 %, respectivamente. El riesgo relativo de \geq CIN2 era 24,45 (IC del 95 %: 13,85, 43,15), lo que indica que una mujer con positivo para el Aptima HPV Assay tiene 22,55 veces más probabilidades de tener \geq CIN2 que una mujer con negativo para el Aptima HPV Assay. El riesgo relativo de \geq CIN3 era 57,11 (IC del 95 %: 21,09, 154,62).

Rendimiento clínico del Aptima HPV Assay con muestras de citología en solución SurePath

Se recogieron muestras de citología en solución SurePath de mujeres canadienses (n=558) remitidas para seguimiento debido a: uno o más resultados de citología anormales, infección por HPV u otros motivos. Se transfirió una alícuota (0,5 ml) de cada muestra a un tubo de transferencia de muestras Aptima y después se trató con la solución de transferencia Aptima. Se analizó una sola réplica de cada muestra con el Aptima HPV Assay. Además, se extrajo una alícuota (1 ml) más de cada muestra para evaluarla con una prueba comercial de PRC del HPV. Se calculó la sensibilidad clínica para la detección de la enfermedad, definida como un resultado histológico \geq CIN3, tanto para el Aptima HPV Assay como para la prueba de PCR del HPV, como se muestra en la Tabla 57, con los valores de predicción positivos y negativos.

Tabla 57: Rendimiento del Aptima HPV Assay y de una prueba de PRC del HPV para la detección de \geq CIN3

Rendimiento	Aptima HPV Assay N=558		Prueba de PRC del HPV N=558	
	Cálculo	(IC del 95 %)	Cálculo	(IC del 95 %)
Sensibilidad (%)	89,3 (25/28)	(72,8 - 96,3)	89,3 (25/28)	(72,8 - 96,3)
Especificidad (%)	58,7 (311/530)	(54,4 - 62,8)	49,1 (260/530)	(44,8 - 53,3)
VPP (%)	10,2 (25/244)	(8,4 - 11,7)	8,5 (25/295)	(7,0 - 9,5)
VPN (%)	99,0 (311/314)	(97,6 - 99,8)	98,9 (260/263)	(97,2 - 99,7)
Prevalencia (%)	5,0 (28/558)		5,0 (28/558)	

Rendimiento del Aptima HPV Assay con muestras recogidas con el kit de recogida y transporte de muestras de citología

Se recogieron muestras clínicas positivas y negativas para el HPV de alto riesgo de poblaciones examinadas (visitas de rutina) y remitidas (visita de colposcopia) con el kit CSCT Aptima y se analizaron con el Aptima HPV Assay en el Panther System y el Tigris DTS System utilizando dos lotes de reactivos. La concordancia entre el Panther System y el Tigris DTS System para muestras de CSCT se muestra en la Tabla 58.

Para las muestras de CSCT, la concordancia global entre el Panther System y el Tigris DTS System fue > 98 %, como se muestra en la Tabla 58. De las 632 muestras clínicas, 69 fueron CIN2+ y 38, CIN3+. La sensibilidad del Aptima HPV Assay para la detección de CIN2+ fue del 97,1 % (IC del 95 %: 90,0 %-99,2 %) en el sistema Panther y del 98,6 % (IC del 95 %: 92,2 %-99,7 %) en el Tigris DTS System. La sensibilidad para la detección de CIN3+ fue del 100 % (IC: 90,8 %-100 %) tanto en el sistema Panther como en el Tigris DTS System.

Tabla 58: Concordancia de los resultados del Aptima HPV Assay con muestras de CSCT Aptima analizadas en el Tigris DTS System y el Panther System

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

Concordancia global = 98,1 % (IC 96,7-98,9)

Concordancia positiva = 98,2 % (IC 96,6-99,0)

Concordancia negativa = 97,7 % (IC 93,6-99,2)

Sensibilidad analítica

El límite de detección (LD) en el valor de corte clínico es la concentración de RNA del HPV que arroja un resultado positivo (superior al valor de corte clínico) el 95 % de las veces. El LD del Aptima HPV Assay se determinó analizando grupos de muestras de dilución de transcritos in vitro (IVT) para cada uno de los 14 genotipos de alto riesgo y 4 líneas celulares infectadas con el HPV: SiHa, HeLa, MS751 y ME180 (ATCC, Manassas, Virginia). Para los grupos de muestras de IVT, los medios de transporte de las muestras se enriquecieron con IVT a distintas concentraciones y luego se diluyeron con muestras individuales de citología en solución ThinPrep negativas antes de su análisis. Para los grupos de muestras celulares infectadas con HPV, las mezclas de muestras de citología en solución ThinPrep negativas para el HPV se enriquecieron con células infectadas con HPV a distintas concentraciones y luego se diluyeron con medios de transporte de muestras antes de su análisis. Se analizaron treinta réplicas de cada nivel de copias con cada uno de los dos lotes de reactivos, para un total de 60 réplicas. Se realizaron análisis durante 17 días, con 1 a 12 ciclos por día y 5 réplicas de un genotipo y una concentración dados analizadas en cada ciclo. Se calculó el límite de detección del 95 % a partir del análisis de regresión Probit de los resultados de positividad de cada grupo de muestras de dilución.

Los resultados del análisis de regresión Probit en la Tabla 59 muestran que los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 59 y 68 del HPV tienen límites de detección del 95 % inferiores a 100 copias/reacción, y que los tipos 52, 58 y 66 tienen límites de detección del 95 % entre 100 y 500 copias/reacción. Las cuatro líneas celulares analizadas tuvieron límites de detección del 95 % inferiores a 1 célula/reacción.

Tabla 59: Límite de detección en el valor de corte clínico del Aptima HPV Assay

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

*Copias por reacción para los transcritos in vitro y células por reacción para las líneas celulares

Precisión del ensayo

La precisión del Aptima HPV Assay se evaluó en dos estudios con el mismo grupo de muestras de 20 miembros. El estudio 1 se realizó en 3 centros, 2 externos y 1 interno, y el estudio 2 se realizó internamente. El grupo de muestras incluyó 13 miembros positivos para el HPV con concentraciones iguales o superiores al límite de detección del ensayo (positividad esperada: $\geq 95\%$), 3 miembros positivos para el HPV con concentraciones inferiores al límite de detección del ensayo (positividad esperada: $>0\%$ a $<25\%$), y 4 miembros negativos para el HPV. Los miembros del grupo de muestras positivas para el HPV se prepararon añadiendo transcritos in vitro (IVT) de RNA a solución PreservCyt diluida con medio de transporte de muestras (Specimen Transport Medium, STM) o células cultivadas (SiHa, HeLa, y MS751; ATCC, Manassas, Virginia) infectadas con HPV en una mezcla de muestras de citología negativas en solución ThinPrep diluidas con STM. Los miembros del grupo de muestras negativos para el HPV se prepararon con solución PreservCyt o con una mezcla de muestras negativas de citología en solución ThinPrep diluidas con STM.

En el estudio 1, 2 usuarios de cada uno de los 3 centros de análisis (1 instrumento por centro) analizaron 1 lista de trabajo del Aptima HPV Assay al día durante 3 días con cada uno de los 3 lotes de reactivos. Cada lista de trabajo contenía 3 réplicas de cada uno de los miembros del grupo de muestras de reproducibilidad. Se analizaron ciento ocho (108) tubos de muestra individuales para cada miembro del grupo de muestras (3 centros x 1 instrumento x 2 técnicos x 2 lotes x 3 listas de trabajo x 3 réplicas). En el estudio 2, los análisis se llevaron a cabo internamente durante 13 días, con un total de 162 reacciones analizadas por cada miembro del grupo de muestras (1 centro x 3 instrumentos x 3 técnicos x 3 lotes x 2 listas de trabajo x 3 réplicas).

Los miembros del grupo de muestras se describen en la Tabla 60a (miembros del grupo de muestras con resultados positivos esperados) y en la Tabla 60b (miembros del grupo de muestras con resultados negativos esperados), junto con un resumen de la concordancia con los resultados esperados y los valores de S/CO del analito en los percentiles 2,5°, 50° y 97,5° de la distribución de S/CO. La variabilidad de la S/CO del analito para los miembros del grupo de muestras con resultados positivos esperados se muestra en la Tabla 61 para el estudio 1 y en la Tabla 62 para el estudio 2.

Tabla 60a: Estudios 1 y 2 de precisión del Aptima HPV Assay: descripción del grupo de muestras, concordancia positiva y distribución percentil de los valores de S/CO del analito para los miembros del grupo de muestras con resultados positivos esperados

Descripción del grupo de muestras (copias o células/reacción)	Estudio 1 (3 centros de análisis)	Estudio 2 (1 centro de análisis)
	% de concordancia positiva (IC del 95 %)	% de concordancia positiva (IC del 95 %)
Muestra clínica 1 positiva alta para el HPV	100 (107/107) (96,5, 100)	100 (161/161) (97,7, 100)
Muestra clínica 2 positiva alta para el HPV	100 (107/107) (96,5, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
HPV 16 IVT (1.830 copias)	100 (107/107) (96,5, 100)	100 (161/161) (97,1, 100)
HPV 18 IVT (1.550 copias)	100 (107/107) (96,5, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
Muestra clínica 1 positiva baja para el HPV	94,4 (101/107) (88,3, 97,4)	89,5 (145/162) (83,3, 93,3)
Muestra clínica 2 positiva baja para el HPV	88,0 (95/108) (80,5, 92,8)	92,0 (149/162) (86,8, 95,3)
Muestra clínica 3 positiva baja para el HPV	100 (108/108) (96,6, 100)	97,5 (157/161) (93,8, 99,0)
Muestra clínica 4 positiva baja para el HPV	90,7 (98/108) (83,8, 94,9)	92,6 (150/162) (87,5, 95,7)
HPV 16 IVT (183 copias)	100 (102/102) (96,4, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
HPV 18 IVT (155 copias)	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

*% de concordancia positiva esperado ~95 %; la concordancia observada fue menor, lo que podría deberse posiblemente a la variabilidad en la fabricación del miembro del grupo de muestras.

Tabla 60b: Estudios 1 y 2 de precisión del Aptima HPV Assay: descripción del grupo de muestras, concordancia negativa y distribución percentil de los valores de S/CO del analito para los miembros del grupo de muestras con resultados negativos esperados

Descripción del grupo de muestras (copias o células/reacción)	Estudio 1 (3 centros de análisis)	Estudio 2 (1 centro de análisis)
	% de concordancia negativa (IC del 95 %)	% de concordancia negativa (IC del 95 %)
Células MS751 (0,005 células)	87,0 (94/108) (79,4, 92,1)	93,8 (152/162) (89,0, 96,6)
Células SiHa (0,008 células)	97,2 (105/108) (92,1, 99,1)	95,7 (155/162) (91,4, 97,9)
Células HeLa (0,02 células)	70,4 (76/108) (61,2, 78,2)	67,3 (109/162) (59,8, 74,0)
Muestra clínica 1 negativa para el HPV	99,1 (107/108) (94,9, 99,8)	100 (162/162) (97,7, 100)
Muestra clínica 2 negativa para el HPV	97,2 (105/108) (92,1, 99,1)	100 (162/162) (97,7, 100)
Solución PreservCyt 1	99,1 (107/108) (94,9, 99,8)	100 (162/162) (97,7, 100)
Solución PreservCyt 2	99,1 (107/108) (94,9, 99,8)	100 (161/161) (97,7, 100)

IVT = transcrito in vitro.

*% de concordancia negativa esperado > 75 % y < 100 %.

Tabla 61: Estudio 1 de precisión del Aptima HPV Assay: variabilidad de la señal para los miembros del grupo de muestras con resultados positivos esperados

Descripción del grupo de muestras (copias o células/reacción)	n	S/CO medio	Entre instrumentos		Entre técnicos		Entre lotes		Entre listas de trabajo		Intra-listas de trabajo		Total	
			DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)
Muestra clínica 1 positiva alta para el 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
Muestra clínica 2 positiva alta para el 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
HPV 16 IVT (1.830 copias)	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
HPV 18 IVT (1.550 copias)	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
Muestra clínica 1 positiva baja para el 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
Muestra clínica 2 positiva baja para el 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
Muestra clínica 3 positiva baja para el 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
Muestra clínica 4 positiva baja para el 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
HPV 16 IVT (183 copias)	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
HPV 18 IVT (155 copias)	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

*Doce muestras tuvieron resultados no válidos con el Aptima HPV Assay (1 para la muestra clínica 1 positiva alta para el HPV, 1 para la muestra clínica 2 positiva alta para el HPV, 1 para HPV 16 IVT (1.830 copias), 1 para HPV 18 IVT (1.550 copias), 1 para la muestra clínica 1 positiva baja para el HPV, 6 para HPV 16 IVT (183 copias) y 1 para células SiHa (0,90 células)).

CV = coeficiente de variación; IVT = transcrito in vitro; DE = desviación estándar

Nota: La variabilidad debida a varios factores puede ser numéricamente negativa. Esto puede suceder si la variabilidad debida a esos factores es muy pequeña. En estos casos, la DE y el CV se indican como cero.

Tabla 62: Estudio 2 de precisión del Aptima HPV Assay: variabilidad de la señal para los miembros del grupo de muestras con resultados positivos esperados

Descripción del grupo de muestras (copias o células/reacción)	n	S/CO medio	Entre instrumentos		Entre técnicos		Entre lotes		Entre listas de trabajo		Intra-listas de trabajo		Total	
			DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)	DE	CV (%)
Muestra clínica 1 positiva alta para el 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
Muestra clínica 2 positiva alta para el 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
HPV 16 IVT (1.830 copias)	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
HPV 18 IVT (1.550 copias)	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
Muestra clínica 1 positiva baja para el 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
Muestra clínica 2 positiva baja para el 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
Muestra clínica 3 positiva baja para el 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
Muestra clínica 4 positiva baja para el 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
HPV 16 IVT (183 copias)	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
HPV 18 IVT (155 copias)	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 muestras tuvieron resultados no válidos con el Aptima HPV Assay (1 para la muestra clínica 1 positiva alta para el HPV, 1 para HPV 16 IVT (1.830 copias), 1 para la muestra clínica 3 positiva baja para el HPV, 3 para HPV 18 IVT (155 copias)).

CV = coeficiente de variación; IVT = transcrito in vitro; DE = desviación estándar

Nota: La variabilidad debida a varios factores puede ser numéricamente negativa. Esto puede suceder si la variabilidad debida a esos factores es muy pequeña. En estos casos, la DE y el CV se indican como cero.

Reactividad cruzada

Los análisis con microorganismos que podrían producir reacciones cruzadas en el Aptima HPV Assay se llevaron a cabo en el Tigris DTS System. Los resultados se presentan en *Reactividad cruzada* (Tabla 37), en el apartado Tigris DTS System.

Interferencias

Los análisis con sustancias que podrían interferir con el Aptima HPV Assay se llevaron a cabo en el Tigris DTS System. Los resultados se presentan en *Interferencias* (Tabla 38), en el apartado Tigris DTS System.

Bibliografía

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. Suntum, 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

Asistencia al cliente: +1 844 Hologic (+1 844 465 6442)
customersupport@hologic.com

Asistencia técnica: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com



Emergo Europe
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

Para obtener más información, visite www.hologic.com.

Este producto está indicado únicamente para su uso en el campo del diagnóstico *in vitro* en humanos.

Hologic, Aptima, DTS, Leader, Panther, PreservCyt, SB100, ThinPrep y Tigris son marcas comerciales y/o marcas comerciales registradas de Hologic, Inc. y/o de sus subsidiarias en los Estados Unidos y/o en otros países.

eppendorf (estilizado) y REPEATER son marcas comerciales de Eppendorf AG.

RAININ es marca comercial de Rainin Instruments, LLC.

TECAN y FREEDOM EVO son marcas comerciales de Tecan Group AG.

SUREPATH y PREPSTAIN son marcas comerciales de TriPath Imaging, Inc.

Todas las demás marcas comerciales que puedan aparecer en estas instrucciones pertenecen a de sus respectivos propietarios.

© 2007-2017 Hologic, Inc. Reservados todos los derechos.
AW-14517-301 Rev. 003

2017-04