



Hybrid Capture<sup>®</sup> 2

GC-ID DNA Test

Instrucciones de uso

## **digene<sup>®</sup> HC2 GC-ID DNA Test**

Ensayo de hibridación de ácidos nucleicos *in vitro* mediante amplificación de la señal y uso de quimioluminiscencia en microplaca para la detección cualitativa del ADN de *Neisseria gonorrhoeae* (GC) en muestras cervicouterinas.

Para utilizar con:

digene<sup>®</sup> HC2 DNA Collection Device  
digene<sup>®</sup> Female Swab Specimen Collection Kit  
Solución Hologic PreservCyt<sup>®</sup>

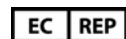
### **CAMBIOS CLAVE RESPECTO A LA VERSIÓN ANTERIOR DE LAS INSTRUCCIONES DE USO**

1. Se han actualizado las marcas de productos.
2. Se han eliminado las referencias y los datos de las pruebas reflejas.

Para uso profesional exclusivamente, por personal de laboratorio cualificado y con la formación adecuada. Lea detenidamente estas instrucciones de uso antes de utilizar la prueba.



QIAGEN Gaithersburg, Inc.  
1201 Clopper Road  
Gaithersburg, MD 20878 USA



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Str. 1  
D-40724 Hilden  
Germany

©2011 QIAGEN



La marca CE indica que la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test cumple los requisitos de la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*.

IVD



96

REF 5140-1330

L2172ES Rev. 3

# ÍNDICE

<b>NOMBRE Y USO PREVISTO</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN Y EXPLICACIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO</b> .....	<b>1</b>
<b>MATERIAL Y REACTIVOS SUMINISTRADOS</b> .....	<b>3</b>
<b>MATERIAL REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO</b> .....	<b>4</b>
<b>ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES</b> .....	<b>5</b>
PRECAUCIONES DE SEGURIDAD.....	5
INFORMACIÓN DE SEGURIDAD Y RIESGOS PARA LA SALUD.....	6
PRECAUCIONES DE USO.....	7
<b>PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE REACTIVOS</b> .....	<b>8</b>
<b>RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS</b> .....	<b>10</b>
MUESTRAS CERVICOUTERINAS EN STM.....	10
MUESTRAS CERVICOUTERINAS EN SOLUCIÓN PRESERV CYT DE HOLOGIC.....	11
<b>PROCEDIMIENTO DE LA TÉCNICA</b> .....	<b>11</b>
ANÁLISIS DE UN VOLUMEN ELEVADO DE MUESTRAS UTILIZANDO EL SISTEMA DE CAPTURA RÁPIDA.....	11
MÉTODO MANUAL.....	12
DESNATURALIZACIÓN.....	12
Procedimiento De Preparación De Calibradores, Controles De Calidad Y Muestras En STM.....	13
Procedimiento De Preparación De Muestras En Solución PreservCyt.....	14
HIBRIDACIÓN.....	18
CAPTURA DE LOS HÍBRIDOS.....	19
DETECCIÓN DE LOS HÍBRIDOS.....	20
LAVADO.....	21
Método Del Lavador Automático De Placas.....	21
Método De Lavado Manual.....	22
AMPLIFICACIÓN DE LA SEÑAL.....	22
<b>CRITERIOS PARA VERIFICAR LA CALIBRACIÓN DEL ENSAYO</b> .....	<b>23</b>
<b>CÁLCULO DEL VALOR DE CORTE</b> .....	<b>24</b>
<b>CONTROL DE CALIDAD</b> .....	<b>25</b>
<b>INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS MUESTRAS</b> .....	<b>25</b>
<b>LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO</b> .....	<b>26</b>
<b>RESULTADOS PREVISTOS</b> .....	<b>27</b>
PREVALENCIA.....	27
VALORES PRONÓSTICO POSITIVOS Y NEGATIVOS.....	27
DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS: RESULTADOS PARA RLU/CO CON LA PRUEBA <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA TEST.....	27
<b>EFICACIA DEL ENSAYO</b> .....	<b>29</b>
RESULTADOS DEL ESTUDIO CLÍNICO SEGÚN LA MUESTRA.....	29
REPRODUCIBILIDAD.....	32
PRECISIÓN.....	34
Precisión Con Muestras En Solución PreservCyt.....	35
SENSIBILIDAD ANALÍTICA.....	36
Otras Consideraciones Para Las Muestras En Solución PreservCyt.....	37
ESPECIFICIDAD ANALÍTICA.....	39
HOMOLOGÍA DE LAS SONDAS CON TODO EL ADN PLASMÍDICO Y GENÓMICO.....	41
EFECTO DE LA SANGRE Y OTRAS SUSTANCIAS SOBRE LAS MUESTRAS EN STM.....	42
EFECTO DE LA SANGRE Y OTRAS SUSTANCIAS SOBRE LAS MUESTRAS EN LA SOLUCIÓN PRESERV CYT.....	42

PRECISIÓN EN EL VALOR DE CORTE DE LA PRUEBA <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA TEST CON MUESTRAS CLÍNICAS RECOGIDAS EN STM.....	43
INFORMACIÓN HISTÓRICA.....	44
EQUIVALENCIA ENTRE LAS MUESTRAS EN STM Y EN SOLUCIÓN PRESERVCYT.....	45
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>46</b>
<b>GUÍA PARA LA RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS.....</b>	<b>47</b>
CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN .....	52
<b>INFORMACIÓN DE CONTACTO DE QIAGEN .....</b>	<b>53</b>
<b>RESUMEN DE LA PRUEBA <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA TEST.....</b>	<b>54</b>

## NOMBRE Y USO PREVISTO

La prueba *digene*® Hybrid Capture® 2 (HC2) GC-ID DNA Test es un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos *in vitro* que utiliza amplificación de la señal y quimioluminiscencia en microplaca para la detección cualitativa del ADN de *Neisseria gonorrhoeae* (GC) en muestras cervicouterinas recogidas con *digene* HC2 DNA Collection Device (con escobillón cervical y *digene* Specimen Transport Medium™ (STM) y *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (torunda y STM) o bien, muestras recogidas con un dispositivo tipo cepillo y colocadas en solución Hologic PreservCyt®. El uso de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test está indicado en mujeres sintomáticas o asintomáticas como prueba de infección por *Neisseria gonorrhoeae*.

Si hay que analizar un volumen elevado de muestras, la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test puede realizarse utilizando la aplicación del instrumento del Sistema Rapid Capture® (RCS).

Para uso diagnóstico *in vitro*

IVD

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

*Neisseria gonorrhoeae* son diplococos gramnegativos inmóviles con unos requisitos para su multiplicación bastante complejos. Son microorganismos aerobios, que proliferan de manera óptima a temperaturas entre 35 y 37 °C en presencia de un 3 al 7% de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa ≥70%. El posible diagnóstico de infección por *Neisseria gonorrhoeae* se obtiene tradicionalmente aislando microorganismos a partir de cultivos de muestras clínicas y utilizando un colorante de Gram para el examen morfológico. El diagnóstico definitivo se puede obtener con una prueba positiva para la oxidasa y/o la catalasa del cultivo. Los resultados se pueden confirmar adicionalmente con pruebas de degradación de carbohidratos, de aglutinación y de la fermentación de azúcares, entre otros. Las pruebas de detección de antígenos y de sondas de ácidos nucleicos son más definitivos y directos para detectar *Neisseria gonorrhoeae*. Un ensayo de inmunoenzimas ha demostrado ser tan sensible y específico como el colorante de Gram para la detección de gonococos en muestras uretrales y de primera evacuación de la orina masculinas, pero tiene menor sensibilidad cuando se aplica a muestras endocervicales.<sup>1,2</sup> Como la prueba de detección de antígenos puede presentar una reacción cruzada con *Neisseria* comensal y especies relacionadas<sup>3</sup>, esta prueba solo puede utilizarse para realizar diagnósticos provisionales.<sup>3</sup>

Más recientemente, se han utilizado pruebas de hibridación de ácidos nucleicos en la evaluación de muestras clínicas para detectar *Neisseria gonorrhoeae* en poblaciones de alto riesgo utilizando tanto muestras uretrales masculinas como endocervicales.

## PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

La prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test con la tecnología *digene* Hybrid Capture 2 es un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos con amplificación de la señal que usa la detección por quimioluminiscencia en microplaca. Las muestras que contienen el ADN diana se hibridan con una sonda de ARN específica para GC. Los híbridos de ADN-ARN resultantes se capturan en la superficie de los pocillos de una microplaca, recubiertos con anticuerpos específicos para los híbridos de ADN-ARN. A continuación, los híbridos inmovilizados reaccionan con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina, específicos de los híbridos de ADN-ARN, y se detectan mediante un sustrato quimioluminiscente. Varias moléculas de fosfatasa alcalina se conjugan con cada anticuerpo. Varios anticuerpos conjugados se unen a cada híbrido capturado, amplificando así significativamente la señal. A medida que la fosfatasa alcalina unida degrada el sustrato, se emite luz, que se mide en unidades de luz relativas (RLU) en un luminómetro. La intensidad de la luz emitida indica la presencia o ausencia del ADN diana en la muestra.

Una medición de RLU igual o superior a un cociente especificado para el valor de corte (CO) positivo indica la presencia de ADN de GC en la muestra. Una medición de RLU inferior a un cociente especificado para el valor de corte positivo indica la ausencia de ADN de GC o niveles de ADN de GC por debajo del límite de detección del ensayo.

La sonda de GC contiene una mezcla de sondas elegida específicamente para eliminar o minimizar la reactividad cruzada con secuencias de ADN de células humanas, otras especies bacterianas o especies de *Neisseria* distintas a la *Neisseria gonorrhoeae*. La sonda de GC suministrada con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test es complementaria a 9.700 pb aproximadamente o al 0,5% del ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae* ( $1,9 \times 10^6$  pb).<sup>4</sup> Una sonda es complementaria al 100% del plásmido críptico de 4200 pb.

El análisis de un volumen elevado de muestras con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test puede realizarse utilizando un sistema de pipeteo y dilución automático de uso general denominado Sistema de captura rápida (RCS). Este instrumento, que utiliza una aplicación específica para la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test, analiza un máximo de 352 muestras en ocho horas. Para poder analizar un volumen elevado de muestras, el sistema RCS realiza todas las fases del método analítico, excepto la desnaturalización de la muestra, la detección de la señal quimioluminiscente y el informe de los resultados.

## MATERIAL Y REACTIVOS SUMINISTRADOS

Un kit de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test (REF 5140-1330) contiene 96 pruebas. El número de resultados de pacientes variará en función del número de usos del kit:

- 1 uso = 88 resultados de pacientes
- 2 usos = 80 resultados de pacientes
- 3 usos = 72 resultados de pacientes
- 4 usos = 64 resultados de pacientes

<b>Tinte indicador</b> INDIC Contiene 0,05% p/v de azida sódica.	1 x 0,35 ml
<b>Reactivo de desnaturalización*</b> REAG DENAT Solución diluida de hidróxido de sodio (NaOH).	1 x 50 ml
<b>Diluyente de sonda*</b> DIL PROBE Solución tampón con 0,05% p/v de azida sódica.	1 x 5 ml
<b>Sonda de GC</b> PROBE GC Sonda de ARN de GC en solución tampón.	1 x 200 µl
<b>Calibrador negativo</b> CAL - ADN portador en medio de transporte de muestras (STM) con 0,05% p/v de azida sódica.	1 x 2 ml
<b>Calibrador positivo de GC (PC)</b> CAL GC + 1,0 pg/ml de ADN de GC clonado y ADN portador en STM con 0,05% p/v de azida sódica.	1 x 1 ml
<b>Control de calidad CT (QC CT)</b> QC CT 5,0 pg/ml de ADN de CT clonado y ADN portador en STM con 0,05% p/v de azida sódica.	1 x 1 ml
<b>Control de calidad GC (QC GC)</b> QC GC 5,0 pg/ml de ADN de GC clonado y ADN portador en STM con 0,05% p/v de azida sódica.	1 x 1 ml
<b>Microplaca de captura</b> PLATE CAPTURE Recubierta con anticuerpos anti híbridos ARN:ADN policlonales de cabra.	respectivamente 1
<b>Reactivo de detección 1</b> REAG DET 1 Anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina anti híbridos ARN:ADN en solución tampón con 0,05% p/v de azida sódica.	1 x 12 ml
<b>Reactivo de detección 2</b> REAG DET 2 CDP-Star® con Emerald II (sustrato quimioluminiscente).	1 x 12 ml
<b>Tampón de lavado concentrado*</b> BUF WASH X 30 Contiene 1,5% p/v de azida sódica.	1 x 100 ml

\*Consulte el apartado de *Advertencias y precauciones* de este prospecto para obtener información de salud y seguridad.

## MATERIAL REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO

### Equipo y accesorios de diagnóstico *in vitro* del sistema Hybrid Capture<sup>A</sup>

Sistema *digene* Hybrid Capture 2 ("Sistema *digene* HC2"), compuesto por un luminómetro aprobado por QIAGEN ("luminómetro"), un PC aprobado por QIAGEN y periféricos para el PC (monitor, teclado, ratón, impresora y cable de impresora), software del sistema *digene* HC2 ("software de análisis de ensayos *digene*"), protocolos de ensayo del sistema *digene* HC2 para CT/GC, software de la placa LumiCheck y el *Manual de usuario del software del sistema digene HC2*

Agitador rotatorio I del sistema Hybrid Capture  
Incubador de placas I del sistema Hybrid Capture  
Lavador automático de placas del sistema Hybrid Capture  
Agitador de tubos para múltiples muestras (MST) Vortexer 2 del sistema Hybrid Capture (opcional)<sup>B</sup>  
Placa de conversión con tapa (opcional) para uso manual, necesaria si se utiliza el sistema Rapid Capture con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test y muestras PreservCyt)  
Gradilla de muestras *digene* con tapa (opcional para uso manual; (necesaria si se utiliza el sistema Rapid Capture con la prueba *digene* HC2 GC-ID Test y muestras *digene* HC2 recogidas con el *digene* HC2 DNA Collection Device)  
Placa para muestras de Digene con tapa (opcional)  
Pipeta EXPAND-4 y soporte (opcional)<sup>C</sup>  
*digene* HC2 DNA Collection Device<sup>D</sup>  
Kit de torundas para recogida de muestras cervicouterinas *digene* (consta de 2 torundas y *digene* Specimen Transport Medium)<sup>D</sup>  
Dispensador de sellador de tubos y dispositivo de corte (opcional, se emplea con el agitador MST Vortexer 2)

Sistema Rapid Capture (opcional para analizar un volumen elevado de muestras)<sup>E</sup>  
Aparato de lavado  
Microplacas de hibridación  
Tapas para microplacas  
Tiras vacías de microplaca (Costar, modelo nº 2581); opcionales, para usar con el Lavador automático de placas I  
Puntas de pipeta extra largas para eliminar la muestra  
Tubos de recogida de muestras  
Placa para tubos de recogida de muestras  
Tapones de rosca para tubos de recogida de muestras  
Depósitos de reactivo desechables  
Película selladora para tubos DuraSeal<sup>®</sup>

### Equipo y accesorios de uso general en el laboratorio

Baño a  $65 \pm 2$  °C de tamaño suficiente para admitir una gradilla de conversión (36 x 21 x 9 cm) o dos gradillas de muestras *digene* (cada una de 31,7 x 15,2 x 6,4 cm)  
Microcentrífuga (opcional, para centrifugar los viales de sonda y obtener el máximo volumen de la sonda)  
Agitador Vortex con adaptador para tubos  
Micropipeta de canal único; ajuste variable para volúmenes de 20-200 µl y 200-1000 µl  
Pipeta de repetición con desplazamiento positivo, como la pipeta Eppendorf Repeater<sup>®</sup> o equivalente  
Pipeta de 8 canales: ajuste variable para volúmenes de 25 a 200 µl  
Reloj avisador  
Solución de hipoclorito sódico a una concentración final del 0,5% (de lejía de uso doméstico)  
Parafilm<sup>®</sup> o equivalente  
Puntas de pipeta con filtro desechables para micropipeta de canal único (20 a 200 µl y 200 a 1000 µl)  
Puntas desechables para la pipeta Eppendorf Repeater<sup>®</sup>: (25 y 500 µl)  
Puntas desechables para la pipeta de 8 canales (25 a 200 µl)  
Toallitas Kimtowels<sup>®</sup> o servilletas de papel equivalentes, con bajo contenido en pelusa  
Papel desechable para poyata  
Guantes sin talco  
Tubos de polipropileno de fondo cóncavo y tapón a presión, de 5 ml y/o 15 ml (para la dilución de la sonda)  
Tubos de polipropileno de 2,0 ml con tapón para microcentrífuga

### Equipo y accesorios adicionales para la preparación de muestras en solución PreservCyt

Centrífuga de rotor basculante capaz de alcanzar  $2900 \pm 150$  x g y alojar tubos de centrífuga cónicos de polipropileno de 10 ml o 15 ml  
Pipetas serológicas o de traspaso de 5 ml  
Kit de conversión de muestras *digene* HC2<sup>A</sup>  
Puntas desechables para la pipeta Eppendorf Repeater<sup>®</sup> (50 y 100 µl)

#### Para el procedimiento de agitación manual:

Tubos de conversión de muestras *digene* HC2 (cónicos de 15 ml)<sup>F</sup>, tubos cónicos Sarstedt<sup>®</sup> de 10 ml con tapón o tubos de centrífuga de polipropileno, con fondo cónico, de 15 ml, marca VWR<sup>®</sup> o Corning<sup>®</sup> con tapón  
Placa para tubos cónicos de 10 ml o 15 ml

#### Para el procedimiento con el agitador de tubos para múltiples muestras Vortexer 2

Tubos de conversión de muestras *digene* HC2 (cónicos de 15 ml)<sup>F</sup>  
Agitador de tubos para múltiples muestras (MST) Vortexer 2  
Placa de conversión con tapa (específica para tubos cónicos de 15 ml)  
Dispensador de sellador de tubos y dispositivo de corte  
Película selladora para tubos DuraSeal (se utiliza con el agitador MST Vortexer 2)

<sup>A</sup> Sólo se puede adquirir de QIAGEN el equipo y los accesorios validados con las pruebas *digene* HC2 CT/GC DNA Test.

<sup>B</sup> Hace falta también cuando se utilice la aplicación RCS semiautomática.

<sup>C</sup> Artículo personalizado. Se pueden utilizar otras pipetas multicanal expandibles personalizadas, siempre que proporcionen un espacio de punta de 3,2 cm al expandirse. O bien, se puede utilizar una pipeta de canal único que pueda dispensar 75 µl.

- <sup>D</sup> La eficacia de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test se estableció únicamente con los kits de recogida indicados.
- <sup>E</sup> Consulte en el *Manual de usuario del sistema de captura rápida* las instrucciones específicas a la utilización de dicho sistema para analizar un volumen elevado de muestras.
- <sup>F</sup> Para garantizar la eficacia del ensayo cuando se utiliza el procedimiento con el agitador de tubos para múltiples muestras Vortexer 2, deben utilizarse los tubos de conversión de muestras *digene* HC2 (marca VWR o Corning®) suministrados por QIAGEN .

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

LEA DETENIDAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES ANTES DE UTILIZAR LA PRUEBA.

### PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

TODAS LAS MUESTRAS deben considerarse potencialmente infecciosas. Ningún método de análisis conocido puede ofrecer una garantía absoluta de que las muestras no transmitirán una infección. Se recomienda manipular las muestras humanas de acuerdo con las prácticas nacionales y locales apropiadas de seguridad biológica.<sup>5,6,7,8</sup> Siga estas prácticas de seguridad biológica con los materiales que contengan o se sospeche que contienen agentes infecciosos. Estas precauciones incluyen, aunque no exclusivamente, las siguientes:

1. No use la boca para pipetear.
2. No fume, coma ni beba en las zonas en las que se manipulan reactivos o muestras.
3. Use guantes desechables sin talco para manipular los reactivos y las muestras. Lávese perfectamente las manos después de realizar la prueba.
4. Limpie y desinfecte todos los derrames de muestras con un desinfectante para tuberculosis, como hipoclorito sódico al 0,5% v/v u otro desinfectante adecuado.<sup>9,10</sup>
5. Descontamine y deseche todas las muestras, reactivos y otros materiales potencialmente contaminados de acuerdo con las normativas nacionales y locales.<sup>11,12</sup>

Algunos reactivos contienen azida sódica. La azida sódica puede formar azidas de plomo o cobre con las tuberías del laboratorio. Estas azidas podrían explotar por percusión, por ejemplo, si se golpean las tuberías con un martillo. Para evitar la formación de azidas de plomo o cobre, haga pasar abundante agua por las tuberías después de desechar soluciones que contengan azida sódica. Para eliminar la contaminación de tuberías antiguas que se sospeche que acumulan azidas, el National Institute for Occupational Safety and Health recomienda lo siguiente: (1) extraiga el líquido utilizando un tubo de goma o plástico como sifón, (2) llene la tubería con una solución de hipoclorito sódico al 10% v/v, (3) deje el hipoclorito en la tubería durante 16 horas y (4) aclare con abundante agua.



## INFORMACIÓN DE SEGURIDAD Y RIESGOS PARA LA SALUD

Los materiales que se mencionan a continuación se han evaluado de acuerdo con los requisitos de las directivas comunitarias 2001/59/CE y 99/45/CE.



T

### **Concentrado de tampón de lavado. Contiene azida sódica: Tóxico (T)**

R25: Tóxico por ingestión.

R52/53: Nocivo para los organismos acuáticos, puede causar reacciones adversas a largo plazo en el entorno acuático.

S36/37/39: Úsense indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.

S45: En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).



C

### **Reactivo de desnaturalización. Contiene hidróxido sódico: Corrosivo (C)**

R35: Provoca quemaduras graves.

S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua, y acúdase a un médico.

S36/37/39: Úsense indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.

S45: En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta)



Xi

### **Diluyente de sonda. Contiene BES y ácido acético: Irritante (Xi)**

R36/38: Irritante para piel y ojos.

S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua, y acúdase a un médico.

S36/37/39: Úsense indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.

INFORMACIÓN PARA EMERGENCIAS DISPONIBLE LAS 24 HORAS


**PUEDA OBTENERSE INFORMACIÓN MÉDICA DE EMERGENCIA EN INGLÉS, FRANCÉS Y ALEMÁN LAS 24 HORAS DEL DÍA EN:**

**CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA DE MAINZ, ALEMANIA**


TEL: +49-6131-19240

Consulte en el *Manual de usuario del sistema de captura rápida* las advertencias y precauciones adicionales específicas a la utilización de dicho sistema para analizar un volumen elevado de muestras.

## PRECAUCIONES DE USO

1. Para uso diagnóstico *in vitro* exclusivamente.
2. Escobillón cervical para utilizar exclusivamente en mujeres que no estén embarazadas.
3. No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad indicada junto al símbolo  en la etiqueta de la caja exterior.
4. Si se realiza el ensayo fuera de los límites de tiempo y temperatura indicados, se pueden obtener resultados no válidos. Los ensayos que no se ajusten a los límites de tiempo y temperatura establecidos no son válidos y deberán repetirse.
5. Para obtener resultados fiables, siga al pie de la letra el procedimiento de la técnica de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test, los criterios para verificar la calibración del ensayo, el control de calidad y la interpretación de los resultados de las muestras.
6. Es importante pipetear el volumen exacto de reactivos indicado y mezclar bien después de añadir cada reactivo. De lo contrario, se podrían obtener resultados erróneos en la prueba. Asegurarse de que se producen los cambios de color indicado confirmará que se han cumplido estas condiciones.
7. Estos componentes se han comprobado como una unidad. **No** intercambie componentes de otras fuentes o de lotes distintos.
8. Los ácidos nucleicos son muy sensibles a la degradación por las nucleasas del entorno. Existen nucleasas presentes en la piel humana y en las superficies o materiales manipulados por personas. Limpie y cubra las superficies de trabajo con papel desechable para poyata **y use guantes sin talco para realizar todos los pasos del ensayo.**
9. Debe prestarse atención a evitar la contaminación de la microplaca de captura y del reactivo de detección 2 con fosfatasa alcalina exógena durante la realización del ensayo. Pueden contener fosfatasa alcalina: el reactivo de detección 1, las bacterias, la saliva, el cabello y la grasa de la piel. **Es especialmente importante tapar la microplaca de captura después del paso de lavado y durante el paso de incubación del reactivo de detección 2, ya que la fosfatasa alcalina exógena podría reaccionar con el reactivo de detección 2 y producir resultados positivos falsos.**
10. Proteja el reactivo de detección 2 de la exposición prolongada a la luz directa. Use el reactivo dentro del período de tiempo indicado inmediatamente después de dispensar las alícuotas y evite la exposición a la luz solar directa.
11. La pipeta de repetición debe purgarse antes de dispensar el reactivo y se debe comprobar periódicamente la ausencia de burbujas de aire grandes. Un exceso de burbujas de aire grandes en la punta de la pipeta de repetición puede hacer que se dispense un volumen inexacto y debe evitarse; para ello, llene la pipeta, dispense todo el líquido y llénela de nuevo. Consulte las instrucciones de uso específicas en los manuales de instrucciones de la pipeta.
12. La dispensación de los reactivos de detección 1 y 2 con pipetas multicanal debe realizarse utilizando la técnica de pipeteo inverso (véase *Detección de los híbridos*). Compruebe que todas las puntas de la pipeta multicanal ajusten y se llenen correctamente.
13. Tenga cuidado durante el lavado para asegurarse de que se hayan lavado todos los micropocillos correctamente, como se indica en las instrucciones de lavado manual. Un lavado inadecuado aumentará el fondo y puede causar resultados positivos falsos. Los restos de tampón de lavado en los pocillos pueden disminuir la señal u ocasionar problemas de reproducibilidad.
14. Espere como mínimo 60 minutos a que el incubador de placas I alcance la temperatura de  $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  desde el estado frío. Si no se espera este período de calentamiento, podría fundirse la microplaca de hibridación. Véase la información detallada en el Manual de usuario del incubador de placas I.

## PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE REACTIVOS

1. Al recibir el kit, guárdelo a una temperatura entre 2 y 8 °C. El tampón de lavado concentrado, el reactivo de desnaturalización y el indicador se pueden conservar entre 2 y 30 °C, según se desee.
2. No utilice el kit después de la fecha de caducidad indicada junto al símbolo  en la etiqueta de la caja exterior o de la fecha de caducidad de los reactivos preparados (véase más adelante).
3. Todos los reactivos suministrados están listos para utilizarse, con excepción del reactivo de desnaturalización, la mezcla de la sonda para GC y el tampón de lavado.

Consulte en el *Manual de usuario del sistema de captura rápida* la preparación de la mezcla de la sonda para GC, el tampón de lavado, el reactivo de detección 1 y el reactivo de detección 2 ya que esas instrucciones son específicas a la utilización de ese sistema para analizar un volumen elevado de muestras.

### Método de preparación de reactivos

<b>Reactivo de desnaturalización</b>	<p><b>PREPARE PRIMERO:</b></p> <p>Añada 5 gotas de indicador al frasco del reactivo de desnaturalización y mezcle bien. El reactivo de desnaturalización debe tener un color púrpura oscuro uniforme.</p> <p>Una vez preparado, el reactivo de desnaturalización es estable durante tres meses si se conserva a una temperatura entre 2 y 8 °C. Etiquételo con la nueva fecha de caducidad. Si disminuye la intensidad del color, añada 3 gotas más de indicador y mezcle bien antes de utilizar.</p> <p><b>Advertencia:</b> el reactivo de desnaturalización es corrosivo. Use una indumentaria y guantes adecuados, así como protección para los ojos y la cara. Tenga cuidado al manipular.</p>																		
<b>Mezcla de sonda para GC (preparada a partir de la sonda de GC y diluyente de sonda)</b>	<p><b>PREPÁRELA DURANTE LA INCUBACIÓN DE DESNATURALIZACIÓN DE LA MUESTRA:</b></p> <p><b>IMPORTANTE: EN OCASIONES, LA SONDA SE QUEDA PEGADA A LA TAPA DEL VIAL.</b></p> <p><b>Nota:</b> <b>extreme</b> las precauciones en este paso para evitar la contaminación de la sonda y la mezcla de la sonda con RNasa. Use puntas de pipeta con filtro para pipetear la sonda. El diluyente de sonda es viscoso. <b>Al preparar la mezcla de la sonda para GC, asegúrese de mezclar perfectamente. Se debe formar un remolino visible en el líquido durante el paso de mezclado. Un mezclado incompleto puede reducir la señal.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrifugue brevemente el vial de la sonda de GC para llevar el líquido hasta el fondo del vial. Dé unos golpecitos suaves en el tubo para mezclar.</li> <li>• Determine la cantidad de mezcla de la sonda que necesita (25 µl/prueba). Se recomienda preparar un poco más de mezcla de la sonda para tener en cuenta el volumen que se queda en las puntas de las pipetas o en las paredes del vial. Véanse los volúmenes recomendados a continuación. El menor número de pocillos que se recomienda usar cada vez es 24. Si se desea utilizar menos de 24 pocillos por ensayo, se reducirá el número total de pruebas por kit, debido al volumen limitado de la sonda y del diluyente de sonda.</li> <li>• Transfiera la cantidad necesaria de diluyente de sonda a un nuevo recipiente desechable. En función del número de pruebas, se recomienda usar un tubo de polipropileno de fondo cóncavo y tapón a presión de 5 ó 15 ml. Haga una dilución 1:25 de la sonda de GC en el diluyente de sonda para preparar la mezcla de la sonda.</li> </ul> <table border="1" data-bbox="568 1470 1315 1669"> <thead> <tr> <th>Nº de pruebas/tiras</th> <th>Volumen del diluyente de sonda*</th> <th>Volumen de la sonda*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>96/12</td> <td>4,0 ml</td> <td>160,0 µl</td> </tr> <tr> <td>72/9</td> <td>3,0 ml</td> <td>120,0 µl</td> </tr> <tr> <td>48/6</td> <td>2,0 ml</td> <td>80,0 µl</td> </tr> <tr> <td>24/3</td> <td>1,0 ml</td> <td>40,0 µl</td> </tr> <tr> <td>Por pocillo</td> <td>0,045 ml</td> <td>1,8 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Estos valores incluyen el volumen adicional recomendado.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Añada la sonda al diluyente colocando la punta de la pipeta contra la pared interna del tubo, justo por encima del menisco y expulsando el contenido. <b>No sumerja la punta en el diluyente de sonda.</b></li> <li>• Agite durante al menos 5 segundos a la máxima velocidad del Vortex para mezclar perfectamente. <b>Se debe formar un remolino visible.</b> Etiquete como "mezcla de la sonda de GC" y conserve en un recipiente limpio y cerrado hasta utilizar. <b>La mezcla de la sonda que no se utilice se debe desechar.</b></li> </ul>	Nº de pruebas/tiras	Volumen del diluyente de sonda*	Volumen de la sonda*	96/12	4,0 ml	160,0 µl	72/9	3,0 ml	120,0 µl	48/6	2,0 ml	80,0 µl	24/3	1,0 ml	40,0 µl	Por pocillo	0,045 ml	1,8 µl
Nº de pruebas/tiras	Volumen del diluyente de sonda*	Volumen de la sonda*																	
96/12	4,0 ml	160,0 µl																	
72/9	3,0 ml	120,0 µl																	
48/6	2,0 ml	80,0 µl																	
24/3	1,0 ml	40,0 µl																	
Por pocillo	0,045 ml	1,8 µl																	

<p><b>Tampón de lavado</b></p>	<p><b>PREPÁRELO DURANTE LA FASE DE CAPTURA:</b></p> <p><b>Para el Lavador automático de placas</b> , el tampón de lavado se puede preparar como se describe a continuación y conservar en un recipiente cerrado, o bien, se puede preparar 1 litro cada vez y colocarlo en los depósitos del Lavador automático de placas . La tabla siguiente muestra los volúmenes que hay que mezclar.</p> <p><b>Consulte las instrucciones de cuidado y mantenimiento adicionales en el Manual de usuario del lavador automático de placas.</b></p> <p><b>Advertencia:</b> El tampón de lavado concentrado es tóxico por ingestión. Use una indumentaria y guantes adecuados, así como protección para los ojos y la cara. Para minimizar la exposición, añada agua al tampón de lavado cuando lo prepare.</p> <table border="1" data-bbox="516 478 1312 625"> <thead> <tr> <th><u>Cantidad de tampón de lavado concentrado</u></th> <th><u>Cantidad de agua destilada o desionizada</u></th> <th><u>Volumen final de tampón de lavado</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>33,3 ml</td> <td>966,7 ml</td> <td>1 L</td> </tr> <tr> <td>66,6 ml</td> <td>1.933,4 ml</td> <td>2 L</td> </tr> <tr> <td>100,0 ml</td> <td>2.900,0 ml</td> <td>3 L</td> </tr> </tbody> </table> <p><b>Nota: Es muy importante dejar el lavador automático de placas encendido en todo momento. Esto permite llevar a cabo el lavado de mantenimiento después de ocho horas de inactividad.</b></p> <p><b>Antes de cada ensayo, compruebe que el depósito de residuos del lavador automático de placas esté vacío y que el depósito de aclarado esté lleno de agua destilada o desionizada.</b></p> <p>Consulte las instrucciones de cuidado y mantenimiento adicionales en el Manual de usuario del lavador automático de placas.</p> <p><b>Para el método de lavado manual de las placas:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mezcle bien el tampón de lavado concentrado.</li> <li>• Diluya 100 ml de tampón de lavado concentrado con 2,9 l de agua destilada o desionizada y mezcle bien (el volumen final debe ser de 3 l).</li> <li>• Cierre el recipiente para evitar la contaminación o evaporación.</li> </ul> <p>Una vez preparado, el tampón de lavado es estable durante tres meses a una temperatura entre 2 y 30 °C. Etiquételo con la nueva fecha de caducidad. Si el tampón de lavado se ha mantenido en refrigeración, espere a que se equilibre a una temperatura entre 20 y 25 °C antes de utilizarlo.</p> <p>Se recomienda limpiar con hipoclorito sódico al 0,5% el aparato de lavado y los tubos, y aclararlos a fondo con agua destilada o desionizada una vez cada tres meses para evitar la posible contaminación con la fosfatasa alcalina presente en bacterias y mohos.</p>	<u>Cantidad de tampón de lavado concentrado</u>	<u>Cantidad de agua destilada o desionizada</u>	<u>Volumen final de tampón de lavado</u>	33,3 ml	966,7 ml	1 L	66,6 ml	1.933,4 ml	2 L	100,0 ml	2.900,0 ml	3 L
<u>Cantidad de tampón de lavado concentrado</u>	<u>Cantidad de agua destilada o desionizada</u>	<u>Volumen final de tampón de lavado</u>											
33,3 ml	966,7 ml	1 L											
66,6 ml	1.933,4 ml	2 L											
100,0 ml	2.900,0 ml	3 L											

**Volumen de los reactivos listos para usar**

<p><b>Reactivos de detección 1 y 2</b></p>	<p><b>INMEDIATAMENTE ANTES DE UTILIZARLOS:</b></p> <p>Mezcle perfectamente el reactivo y a continuación, <u> mida </u> con cuidado el volumen adecuado de reactivo de detección 1 o de reactivo de detección 2 y añádalo a un depósito de reactivo limpio, siguiendo las directrices que se indican a continuación. Para evitar su contaminación, estos reactivos <b>NO DEBEN</b> devolverse a los frascos originales: <b>Deseche el material sobrante después de utilizarlo.</b> Si no se cuenta con una pipeta de 8 canales, se puede utilizar en su lugar una pipeta de repetición adecuada. En este caso, el reactivo debe dividirse en alícuotas en tubos de polipropileno de un tamaño suficiente para el volumen que se indica a continuación.</p> <table border="1" data-bbox="714 1596 1120 1795"> <thead> <tr> <th><u>Nº de pruebas/tiras</u></th> <th><u>Volumen del reactivo de detección 1 ó 2</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>96/12</td> <td>Contenido del frasco</td> </tr> <tr> <td>72/9</td> <td>7,0 ml</td> </tr> <tr> <td>48/6</td> <td>5,0 ml</td> </tr> <tr> <td>24/3</td> <td>3,0 ml</td> </tr> <tr> <td>1 prueba</td> <td>0,125 ml</td> </tr> </tbody> </table>	<u>Nº de pruebas/tiras</u>	<u>Volumen del reactivo de detección 1 ó 2</u>	96/12	Contenido del frasco	72/9	7,0 ml	48/6	5,0 ml	24/3	3,0 ml	1 prueba	0,125 ml
<u>Nº de pruebas/tiras</u>	<u>Volumen del reactivo de detección 1 ó 2</u>												
96/12	Contenido del frasco												
72/9	7,0 ml												
48/6	5,0 ml												
24/3	3,0 ml												
1 prueba	0,125 ml												

## RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras cervicouterinas recogidas y transportadas utilizando el *digene* HC2 DNA Collection Device (con escobillón cervical y *digene* Specimen Transport Medium) y el kit de torundas para recogida de muestras cervicouterinas *digene* (torunda y *digene* Specimen Transport Medium), o las muestras recogidas con un dispositivo tipo cepillo y colocadas en solución PreservCyt de Hologic son las únicas muestras recomendadas para utilizar con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Las muestras recogidas por otros medios o transportadas en otras soluciones no son aptas para utilizar con este análisis. La eficacia de este kit se estableció únicamente con los kits de recogida indicados. Si se va a realizar una exploración por colposcopia, las muestras cervicouterinas deben recogerse antes de la aplicación del ácido acético o el yodo. Consulte las instrucciones de uso del *digene* HC2 DNA Collection Device si necesita información adicional sobre los procedimientos de manipulación y recogida de muestras.

### MUESTRAS CERVICOUTERINAS EN STM

Las muestras en STM pueden conservarse durante un máximo de dos semanas a temperatura ambiente y enviarse sin refrigerar al laboratorio de análisis. Las muestras deben enviarse en un recipiente aislado, utilizando una empresa de transporte urgente (de un día para otro) o prioritario (2 días). En el laboratorio de análisis, las muestras deben conservarse a una temperatura entre 2 y 8 °C si el ensayo va a realizarse en un plazo de una semana. Si se va a realizar posterior a una semana, conserve las muestras a -20 °C durante 3 meses como máximo. Se ha añadido un conservante al *digene* Specimen Transport Medium para retardar la proliferación bacteriana y mantener la integridad del ADN. Este conservante **no está indicado** para preservar la viabilidad de los microorganismos ni de las células. Las muestras recogidas en *digene* Specimen Transport Medium no pueden utilizarse para cultivo ni para otros métodos de análisis.

La estabilidad de las muestras en STM durante 2 semanas a temperatura ambiente, más una semana adicional a una temperatura entre 2 y 8 °C se basa en pruebas internas con 90 muestras clínicas simuladas. Estas 90 muestras incluían 40 que contenían bajas concentraciones de microorganismos de GC [en el límite de detección del ensayo (LOD) o cerca de éste], 35 que eran muestras moderadamente positivas (aproximadamente de 2 a 5 veces el LOD) y 5 muestras positivas altas que sobrepasaban 10 veces el LOD. Las 10 muestras restantes dieron negativo a la infección por GC, aunque 5 contenían un nivel elevado de microorganismos de CT. Las estimaciones analíticas del ensayo se basan en muestras conservadas a una temperatura entre 2 y 8 °C o congeladas y analizadas en 1 a 2 semanas desde su obtención.

#### Notas:

1. Se sometió una alícuota no desnaturalizada de cada una de estas 90 muestras a temperaturas extremas que pretendían simular las condiciones de transporte (conservación a -20 °C durante 3 días, luego a 50 °C durante 5 días y 2 semanas adicionales a temperatura ambiente). Aunque se observó una pérdida de señal (RLU/CO) después de 8 días bajo estas condiciones, la interpretación cualitativa de los resultados no se vio alterada. Tras las dos semanas de incubación adicionales a temperatura ambiente, no se observaron diferencias cualitativas con muestras que contenían niveles bajos de microorganismos:
2. Para evitar que se destapen los tubos de muestras que se envían o se conservan congelados:
  - Recubra los tapones con Parafilm® antes de enviar las muestras previamente congeladas. Éstas se pueden enviar congeladas o a una temperatura entre 20 y 25 °C.
  - Al sacar las muestras del congelador para realizar la prueba, sustituya inmediatamente los tapones por tapones de rosca para tubos de recogida de muestras.
3. El *digene* HC2 DNA Collection Device no debe utilizarse en mujeres embarazadas. Recoja las muestras de mujeres embarazadas utilizando solamente el kit de torundas para recogida de muestras cervicouterinas *digene*.

## MUESTRAS CERVICOUTERINAS EN SOLUCIÓN PRESERVCYT DE HOLOGIC

Las muestras recogidas con un dispositivo tipo cepillo y colocadas en solución PreservCyt de Hologic para utilizarlas en preparaciones de ThinPrep® Pap Test de Hologic pueden utilizarse con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Las muestras se recogen de la forma habitual y las preparaciones para ThinPrep Pap Test se elaboran siguiendo las instrucciones de Hologic.

Las muestras en solución PreservCyt pueden conservarse hasta un mes a temperatura ambiente (de 20 a 25 °C), después de la recogida y antes del procesamiento para la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Las muestras en solución PreservCyt no se pueden congelar. Para procesar estas muestras, véase el *Procedimiento de preparación de muestras en solución PreservCyt*.

## PROCEDIMIENTO DE LA TÉCNICA

**Las muestras pueden contener microorganismos infecciosos y deben manipularse con las precauciones pertinentes.** La prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test se puede realizar manualmente (como se indica en estas instrucciones de uso) o utilizando el instrumento del sistema de captura rápida para el análisis de un volumen elevado de muestras.

### ANÁLISIS DE UN VOLUMEN ELEVADO DE MUESTRAS UTILIZANDO EL SISTEMA DE CAPTURA RÁPIDA

El sistema de captura rápida (RCS) es un sistema de pipeteo y dilución automático de uso general que se puede utilizar con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test cuando se vaya a analizar un volumen elevado de muestras. Este sistema analiza 352 muestras como máximo en ocho horas, incluido un período de 3,5 horas durante el que no es necesaria ninguna intervención por parte del usuario; pueden generarse resultados de 704 muestras como máximo en 13 horas. La desnaturalización de las muestras en la fase de preparación se realiza independientemente del sistema RCS, en el tubo de recogida principal (al igual que para el método manual de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test que se describe a continuación) antes de colocarlo en la plataforma del sistema RCS. Además, la detección de la señal por quimioluminiscencia y el informe de resultados se realizan utilizando el sistema del luminómetro aprobado por QIAGEN, común a ambos métodos, el manual y el del sistema RCS. Cada paso del método analítico de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test se realiza en la misma secuencia exacta que el procedimiento de la técnica manual. La aplicación RCS permite realizar escalonadamente el procedimiento con 4 microplacas como máximo, conteniendo cada una las muestras, así como los calibradores y los controles de calidad necesarios del ensayo.

**Cuando se vaya a utilizar el sistema de captura rápida, consulte el *Manual de usuario del sistema de captura rápida* facilitado con el instrumento además de estas instrucciones de uso para obtener la información descriptiva y del procedimiento necesarias.**

## MÉTODO MANUAL

### Preparación

1. Espere al menos 60 minutos para que el incubador de placas I alcance la temperatura de  $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  desde el estado frío. Véase la información detallada en el *Manual de usuario del incubador de placas I*.
2. Confirme que el baño de agua esté a  $65^{\circ}\text{C}$  y el nivel de agua sea suficiente para cubrir todo el volumen dentro de los tubos de las muestras.
3. Saque las muestras y **todos** los reactivos necesarios del frigorífico **antes de comenzar el ensayo**. Espere de 15 a 30 minutos para que alcancen a una temperatura entre  $20$  y  $25^{\circ}\text{C}$ .
4. Cree un diseño de placa mediante el software de análisis de ensayos *digene* con protocolos de ensayo *digene* para GC. Para obtener información detallada, consulte el manual de usuario correspondiente del software.
5. El calibrador negativo, el calibrador positivo y los controles de calidad deben prepararse **nuevos** para cada ensayo. Mezcle bien los calibradores y los controles de calidad. Si se va a utilizar el agitador MST Vortexer 2, pipetee  $500\ \mu\text{l}$  de cada en tubos para la recogida de muestras vacíos correctamente etiquetados. O bien, pipetee  $200\ \mu\text{l}$  de cada en tubos de polipropileno de  $2\ \text{ml}$  para microcentrífuga correctamente etiquetados.
6. **El calibrador negativo y el calibrador positivo se deben analizar PRIMERO** por triplicado para cada lote de muestras a analizar. Los controles de calidad y las muestras deben analizarse una sola vez. Los calibradores, los controles de calidad y las muestras se deben analizar en una configuración de columnas de 8 micropocillos, de modo que se coloquen las réplicas del calibrador negativo (NC) en A1, B1, C1; el calibrado positivo (PC) en D1, E1, F1; QC CT en G1; QC GC en H1; luego las muestras empezando en A2. Vea el ejemplo de diseño a continuación. Para una configuración correcta de los calibradores, los controles de calidad y las muestras en el software, consulte el Manual de usuario correspondiente del luminómetro aprobado por QIAGEN y el manual de usuario correspondiente del software de análisis de ensayos *digene*.

### EJEMPLO DE DISEÑO PARA UNA PRUEBA DE 24 MICROPOCILLOS:

Fila	Columna		
	1	2	3
A	NC	Muestra 1	Muestra 9
B	NC	Muestra 2	Muestra 10
C	NC	Muestra 3	Muestra 11
D	PC	Muestra 4	Muestra 12
E	PC	Muestra 5	Muestra 13
F	PC	Muestra 6	Muestra 14
G	QC CT	Muestra 7	Muestra 15
H	QC GC	Muestra 8	Muestra 16

## DESNATURALIZACIÓN

### Notas:

- **Precaución:** el reactivo de desnaturalización es corrosivo. Use una indumentaria y guantes adecuados, así como protección para los ojos y la cara. Tenga cuidado al manipularlo y utilice guantes sin talco.
- **Importante:** algunas muestras pueden contener sangre u otro material biológico que enmascare el cambio de color al añadir el reactivo de desnaturalización. Es posible que las muestras que tengan un color oscuro antes de añadir el reactivo de desnaturalización no muestren el cambio de color apropiado en estos pasos. En estos casos, la ausencia del cambio de color apropiado no afecta a los resultados del ensayo. El mezclado correcto se puede verificar observando los cambios de color de los calibradores y los controles de calidad.
- Durante el paso de desnaturalización, asegúrese de que el nivel de agua del baño sea adecuado para cubrir completamente todo el volumen de la muestra en los tubos.

- Las muestras se pueden preparar hasta el paso de desnaturalización y conservarse a una temperatura entre 2 y 8 °C durante toda la noche o a -20 °C durante un máximo de 3 meses. Se puede realizar un máximo de 3 ciclos de congelación/descongelación, con un máximo de 2 horas a temperatura ambiente durante cada ciclo de descongelación. Mezcle bien antes de utilizar.
- Los calibradores y los controles de calidad se pueden preparar hasta el paso de desnaturalización y conservarse a una temperatura entre 2 y 8 °C durante toda la noche, **pero no se pueden congelar**. Si se han congelado los calibradores y los controles de calidad, deberán desecharse.
- Después de la desnaturalización y la incubación, las muestras ya no se consideran infecciosas<sup>13</sup>; sin embargo, el personal debe continuar observando las precauciones nacionales y locales.

## PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE CALIBRADORES, CONTROLES DE CALIDAD Y MUESTRAS EN STM

### Notas:

- No retire el dispositivo de recogida de muestras antes de la desnaturalización.
  - Para evitar que se produzcan resultados falsos positivos, es fundamental que el material de todos los calibradores, controles de calidad y muestras en STM entre en contacto con el reactivo de desnaturalización. La mezcla después de añadir el reactivo de desnaturalización es un paso crítico: **asegúrese de que el agitador de tubos para múltiples muestras Vortexer 2 esté puesto en 100 (velocidad máxima) y de que se forme un remolino visible de líquido durante la agitación, de forma que el líquido lave toda la superficie interior del tubo. Si agita manualmente, asegúrese de que cada calibrador, control de calidad y muestra se mezcle individualmente, agitando cada uno de ellos en un Vortex durante al menos 5 segundos a velocidad máxima, de forma que el remolino de líquido lave toda la superficie interna del tubo, y después, invierta el tubo una vez.**
1. Retire y deseche los tapones de los tubos de los calibradores, los controles de calidad y las muestras en STM.  
**Nota:** los tapones de los tubos de muestra se consideran potencialmente infecciosos. Deséchelos de acuerdo con las normativas nacionales y locales.
  2. Con una pipeta ajustable o de repetición, pipetee el reactivo de desnaturalización con el indicador a cada calibrador, control de calidad o muestra en STM. Tenga cuidado de no tocar las paredes del tubo, ya que esto podría producir la contaminación cruzada de las muestras. El volumen necesario del reactivo de desnaturalización es el equivalente a la mitad del volumen de la muestra. En la tabla siguiente se indica el volumen exacto para cada tipo de calibrador, control de calidad y muestra.
    - **Diluya el resto del reactivo de desnaturalización en el frasco antes de dispensarlo de acuerdo con los procedimientos de laboratorio nacionales y locales.**

Calibrador, control de calidad o muestra	Volumen necesario del reactivo de desnaturalización
Calibrador negativo, calibrador positivo y control de calidad, 200 µl	100 µl
Calibrador negativo, calibrador positivo y control de calidad, 500 µl	250 µl
Muestra cervical, 1 ml	500 µl



3. Mezcle las muestras utilizando uno de los dos métodos siguientes.

Método del agitador de tubos para múltiples muestras Vortexer 2

**Nota:** Las muestras QIAGEN mezcladas mediante el agitador MST Vortexer 2 **se deben** hibridizar con el método de microplaca de hibridización y de calentador Microplate Heater I. En caso necesario, consulte el Manual de usuario del agitador MST Vortexer 2 para instrucciones adicionales.

- a) Cubra los tubos del calibrador, el control de calidad y las muestras en STM con película selladora para tubos DuraSeal<sup>®</sup>, extendiendo la película sobre los tubos colocados en la placa.
- b) Coloque la tapa de la placa sobre los tubos cubiertos con la película y fíjela en su sitio con los dos clips laterales. Recorte la película sobrante con el dispositivo de corte.
- c) Coloque la placa en el agitador de tubos para múltiples muestras Vortexer 2 y sujétela con la abrazadera. Verifique que el ajuste de velocidad esté en el 100 (velocidad máxima) y encienda el agitador, colocándolo en la posición ON. Agite los tubos durante 10 segundos.

Método de agitación manual/individual de cada tubo

- a) Vuelva a tapar los tubos del calibrador, el control de calidad y las muestras en STM con tapones de rosca limpios para tubos de recogida de muestras.
  - b) Mezcle perfectamente el contenido de cada tubo agitándolo a alta velocidad durante 5 segundos.
  - c) Invierta una vez cada tubo de muestra para lavar el interior del tubo, el tapón y el borde.
  - d) Devuelva el tubo a la placa.
4. Independientemente del método de agitación utilizado, **se debe formar un remolino visible de líquido en el interior de cada tubo durante la agitación, de forma que el líquido lave toda la superficie interior del tubo.** Los calibradores, los controles de calidad y las muestras deben adquirir un color púrpura.
5. Incube los tubos en la placa en un baño a  $65 \pm 2$  °C durante  $45 \pm 5$  minutos (los calibradores, controles de calidad y muestras desnaturalizados se pueden analizar inmediatamente. Los calibradores y los controles de calidad pueden conservarse durante toda la noche a una temperatura entre 2 y 8 °C como se describe en las **Notas** anteriores). Si desea información sobre la conservación de las muestras, consulte *Punto de interrupción opcional*. Durante esta incubación, prepare la mezcla de la sonda de GC. Consulte el apartado *Preparación y conservación de reactivos*.

## PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS EN SOLUCIÓN PRESERVCYT

**Notas:**

- Consulte todos los detalles en las instrucciones de uso del Kit de conversión de muestras *digene* HC2.
- Al procesar una alícuota de 4 ml de solución PreservCyt, se obtiene material suficiente para 2 pruebas, cuando se realiza el análisis manualmente. El volumen mínimo que se puede procesar es 4 ml. Consulte la sección *Equivalencia entre las muestras en STM y Solución PreservCyt* para obtener más detalles acerca del volumen residual mínimo.
- Prepare las muestras en solución PreservCyt en lotes de 36 o menos; de lo contrario, se pueden desprender los concentrados de células al decantar el sobrenadante. Esto es importante para la integridad del concentrado de células durante el paso de decantación. Si desea preparar más viales de solución PreservCyt, no empiece a prepararlos hasta que termine de preparar el primer lote.

Utilice el reactivo de desnaturalización (DNR) suministrado con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test (véase *Preparación y conservación de reactivos*) o el DNR suministrado con el Kit de conversión de muestras *digene* HC2. Para preparar el DNR suministrado con el Kit de conversión de muestras *digene* HC2, añada 3 gotas de indicador al frasco de DNR y mezcle bien. La solución debe tener un color púrpura oscuro uniforme. Para determinar el volumen necesario, utilice la tabla 1.

**Tabla 1.** Requisitos de volumen: Preparación de los reactivos.

Número de pruebas	Volumen de solución PreservCyt	Volumen de tampón de conversión
1-2	4 ml	0,4 ml
3	6 ml	0,6 ml
4	8 ml	0,8 ml
5	10 ml	1,0 ml
6	12 ml	1,2 ml

- Etiquete un tubo de conversión de muestras *digene* HC2, un tubo cónico Sarstedt de 10 ml o un tubo cónico VWR o Corning de 15 ml con el número de identificación de la muestra que corresponda.
- Procese una sola muestra a la vez:
  - Agite vigorosamente a mano cada vial de solución PreservCyt hasta lograr una dispersión homogénea de las células.
  - Con una pipeta, traspase inmediatamente el volumen apropiado de muestra en solución PreservCyt al tubo etiquetado, ya que las células se posan muy rápidamente. Añada la solución PreservCyt al fondo del tubo cónico para reducir al mínimo la adhesión del material celular al interior del tubo.
- Añada a cada tubo el volumen apropiado de tampón de conversión de muestras (véase la tabla 1).
- Tape y agite cada tubo en un agitador Vortex con adaptador para tubos de modo que se mezcle perfectamente su contenido.

**Nota:** El procedimiento con el agitador MST Vortexer 2 no ha sido validado para agitar muestras en solución PreservCyt con el tampón de conversión de muestras antes de la centrifugación y por tanto, no debe utilizarse en este paso.

- Centrifugue los tubos en una centrífuga con rotor basculante a  $2.900 \pm 150 \times g$  durante  $15 \pm 2$  minutos.
- Durante la centrifugación, prepare la mezcla del *digene* Specimen Transport Medium/Denaturation Reagent (STM/DNR) en una proporción 2:1, según se indica en la tabla 2.

**Nota:** La mezcla STM/DNR debe prepararse nueva cada día que se vaya a realizar el ensayo.

- Para determinar el volumen total de mezcla STM/DNR necesario, utilice como guía el volumen inicial de la muestra en solución PreservCyt y multiplique los volúmenes de STM y DNR “por tubo” por el número de muestras que desee procesar (véase la tabla 2).

**Tabla 2.** Requisitos de volumen: STM/DNR.

Nº de pruebas	Volumen de solución PreservCyt	Volumen de STM por tubo para la mezcla final de STM/DNR*	Volumen de DNR por tubo para la mezcla final de STM/DNR*	Mezcla STM/DNR añadida al tubo
1-2	4 ml	120 µl	60 µl	150 µl
3	6 ml	170 µl	85 µl	225 µl
4	8 ml	220 µl	110 µl	300 µl
5	10 ml	270 µl	135 µl	375 µl
6	12 ml	320 µl	160 µl	450 µl

\* Los volúmenes indicados en estas columnas no deben añadirse directamente al tubo de muestra.

- Utilice un agitador Vortex para mezclar perfectamente la solución.
- Saque los tubos de la centrífuga uno a uno y colóquelos en una placa o en la placa de conversión. Debe haber un concentrado de color rosa/naranja en el fondo de cada tubo.

**Nota:** Las muestras que no tengan un concentrado visible después de la centrifugación no son aceptables para realizar la prueba y se deben desechar.

8. Procese cada tubo individualmente:
  - a. Quite el tapón y déjelo aparte, sobre una servilleta de papel limpia con bajo contenido en pelusa.
  - b. Decante con cuidado el sobrenadante.
  - c. Mantenga el tubo en posición invertida y seque suavemente (aprox. 6 veces) el tubo con servilletas de papel absorbentes con bajo contenido en pelusa, hasta que ya no gotee líquido del tubo. Utilice cada vez una zona limpia distinta de la servilleta. **No** permita que el concentrado de células se deslice por el tubo durante el secado.

**Notas:**

- Al secar, no utilice la misma zona de la servilleta de papel absorbente con bajo contenido en pelusa más de una vez.
- Es importante que en este proceso se elimine la máxima cantidad posible de solución PreservCyt. No obstante, es normal que observe cierta cantidad de solución PreservCyt residual después del secado.

- d. Coloque el tubo en una placa o en la placa de conversión.

### **Agitación y desnaturalización**

#### Procedimiento de agitación manual

1. Añada el volumen apropiado de STM/DNR a cada concentrado (véase la tabla 2). Tape de nuevo los tubos y resuspenda los concentrados agitando cada tubo individualmente durante al menos 30 segundos a la velocidad máxima del Vortex. Si algún concentrado no se resuspende fácilmente, agite durante 10 a 30 segundos más o hasta que se suelte del fondo del tubo. Si el concentrado permanece sin disgregarse después de la agitación adicional (máximo 2 minutos en total), anote la identificación de la muestra y continúe con el siguiente paso.
2. Coloque los tubos en una placa.
3. Coloque la placa en un baño a  $65 \pm 2$  °C durante  $15 \pm 2$  minutos. Asegúrese de que el nivel de agua cubra completamente el líquido de los tubos.
4. Saque la placa con las muestras del baño y agite las muestras individualmente durante 15 a 30 segundos.

**Nota:** Asegúrese de que todos los concentrados se hayan resuspendido en este paso. Las muestras que aún tengan concentrados visibles no son válidas para realizar la prueba y deben desecharse.

5. Vuelva a colocar la placa en el baño a  $65 \pm 2$  °C y continúe la desnaturalización durante  $30 \pm 3$  minutos más.
6. Continúe con el paso de *hibridación* que se describe a continuación o consulte las indicaciones para la conservación y tratamiento de las muestras desnaturalizadas en *Punto de interrupción opcional*.

#### Procedimiento con el agitador de tubos para múltiples muestras (MST) Vortexer 2

**Notas:**

- El procedimiento con el agitador de tubos para múltiples muestras (MST) Vortexer 2 está validado para procesar muestras en solución PreservCyt después de la centrifugación y el decantado del sobrenadante.
- El agitador MST Vortexer 2 es el único diseñado para el procesamiento de muestras en solución PreservCyt. La placa de conversión con tapa está diseñada específicamente para los tubos de conversión de muestras *digene* HC2 (tubos cónicos de 15 ml, marca VWR o Corning). Sólo debe utilizarse un tipo de tubo al mismo tiempo en la placa de conversión. El uso de tubos de otras marcas no está validado.
- Es necesario cumplir estrictamente los tiempos de agitación especificados para la placa de conversión con tapa.

- La placa de conversión con tapa no puede utilizarse para agitar los controles, los calibradores ni los controles de calidad del kit de la prueba *digene* HC2 DNA Test. La altura de los tubos de STM impide que se agiten correctamente si se utiliza la placa de conversión con tapa.
1. Después de secar cada tubo cónico de 15 ml etiquetado, colóquelo en la posición adecuada en la placa de conversión.
  2. Añada el volumen apropiado de mezcla STM/DNR a cada concentrado (tabla 2).
  3. Cubra los tubos cónicos de 15 ml con película selladora para tubos DuraSeal, extendiendo la película sobre todos los tubos de la placa.
  4. Coloque la tapa de la placa sobre los tubos cubiertos con la película y sujétela en su sitio con dos abrazaderas laterales. Una vez que la tapa esté bien sujeta, corte la película sobrante con el dispositivo de corte.
  5. Mueva la palanca roja hasta que quede en posición horizontal.
  6. Coloque la placa de conversión con tapa sobre el agitador MST Vortexer 2 de forma que la esquina de la diagonal más larga de la placa quede situada en la esquina frontal derecha. Coloque la placa con tapa sobre la plataforma del agitador MST Vortexer 2 de forma que quede bien acoplada entre las guías. Baje la palanca hasta que quede en posición vertical para sujetar la placa en su sitio. La placa debe quedar fija.
  7. Compruebe que la velocidad esté establecida en 100 (velocidad máxima) y que el interruptor del generador de impulsos (Pulser) esté en la posición OFF.
  8. Encienda el agitador (interruptor en posición ON). **Agite los tubos durante 30 segundos.**
  9. Apague el agitador (interruptor en posición OFF).
  10. Extraiga la placa de conversión con tapa del agitador MST Vortexer 2, levantando la palanca roja.
  11. Coloque la placa en el baño a  $65 \pm 2$  °C durante  $15 \pm 2$  minutos. Asegúrese de que el nivel de agua del baño cubra completamente el líquido de todos los tubos.
  12. Después de 15 minutos de incubación, extraiga la placa con las muestras del baño.
  13. Para evitar salpicaduras, seque el exceso de agua antes de colocar la placa en el agitador MST Vortexer 2.
  14. Asegure la placa de conversión con tapa en el agitador MST Vortexer 2 como se describió en el paso 6.
  15. Compruebe que la velocidad esté ajustada a 100 y encienda el agitador (interruptor en posición ON). **Agite los tubos durante 1 minuto.**
  16. Apague el agitador (interruptor en posición OFF).
 

**Nota:** El procedimiento con el agitador MST Vortexer 2 normaliza la velocidad, el tiempo y el proceso de mezclado, eliminándose la necesidad de comprobar visualmente los concentrados de células, como ocurre cuando se utiliza el procedimiento de agitación manual.
  17. Vuelva a colocar la placa en el baño a  $65 \pm 2$  °C y continúe la desnaturalización durante  $30 \pm 3$  minutos más.
  18. Saque la placa del baño, séquela y sujétela en el agitador.
  19. Encienda el agitador (interruptor en posición ON). **Agite durante 10 segundos al máximo.**
  20. Apague el agitador (interruptor en posición OFF). Extraiga la placa.
  21. Quite inmediatamente la tapa de la placa y la película selladora para tubos DuraSeal de las muestras.
  22. Continúe con el paso de *hibridación* que se describe a continuación o consulte las indicaciones para la conservación y tratamiento de las muestras desnaturalizadas en *Punto de interrupción opcional*.

## PUNTO DE INTERRUPCIÓN OPCIONAL

Después de la desnaturalización, las muestras en STM y las muestras en solución PreservCyt convertidas se pueden conservar a una temperatura entre 2 y 8 °C hasta el día siguiente o bien, a -20 °C durante un máximo de 3 meses. Si se desea conservar las muestras en refrigeración durante toda la noche, se pueden dejar en la placa de conversión, colocando la película para tubos DuraSeal y la tapa de la placa. Antes de congelar a -20°C, es necesario quitar la tapa de la placa y la película DuraSeal, y colocar los tapones en todos los tubos. En cualquier caso, es necesario dejar que las muestras se equilibren a una temperatura entre 20 y 25 °C y agitarlas perfectamente antes de continuar con el paso de *hibridación*.

**Nota:** No conserve ni transporte las muestras desnaturalizadas en hielo seco.

Es posible realizar un máximo de 3 ciclos de congelación/descongelación, con un máximo de 2 horas a temperatura ambiente durante cada ciclo de descongelación.

## HIBRIDACIÓN

### Notas:

- La mezcla de la sonda de GC es viscosa. Asegúrese de que se mezcle completamente y de que se dispense totalmente la cantidad necesaria en cada pocillo de la microplaca de hibridación. Consulte el apartado *Preparación y conservación de reactivos*.
- Si la muestra desnaturalizada se había conservado a -20 °C, deje que se descongele hasta alcanzar una temperatura de 20 a 25 °C y agítela perfectamente antes de proceder a la hibridación.
- Precaliente el incubador de placas I a  $65 \pm 2$  °C durante al menos 60 minutos antes de utilizarlo. Consulte las instrucciones necesarias en el *Manual de usuario del incubador de placas I*.

1. Obtenga y rotule una microplaca de hibridación.
2. Saque los controles, calibradores y muestras del baño después de la incubación. Si utiliza el agitador de tubos para múltiples muestras Vortexer 2, agite la placa completa de muestras en STM durante 5 segundos, como mínimo, a la velocidad máxima. En el caso de las muestras en solución PreservCyt, agite la placa de conversión completa durante un mínimo de 10 segundos a la velocidad máxima. O bien, agite cada tubo individualmente en un Vortex durante al menos 5 segundos.
3. Con una pipeta, ponga 75 µl de cada control, calibrador o muestra en el **fondo** de un pocillo de la microplaca de hibridación vacío siguiendo el diseño de placa creado durante la fase de *preparación*. Evite tocar las paredes de los pocillos y limite la formación de burbujas de aire. Utilice una punta de pipeta extra larga limpia para cada traspaso, con el fin de evitar la contaminación cruzada de los controles, calibradores y muestras. En el caso de las muestras en STM, no es necesario retirar el dispositivo de recogida de muestras del tubo de transporte de muestras. Las muestras desnaturalizadas se pueden tapar con los tapones de rosca para tubos de recogida de muestras y conservar con los dispositivos de recogida de muestras en los tubos. Las muestras en solución PreservCyt desnaturalizadas pueden volver a taparse con los tapones originales.

### Nota:

- **Se pueden obtener resultados falsos positivos si no se traspasan con cuidado las alícuotas de las muestras. Durante el traspaso de una muestra, no permita que la punta de la pipeta toque el interior del tubo al extraer la alícuota de 75 µl.**
4. Después de traspasar la última muestra, tape la placa e **incube la microplaca de hibridación durante 10 minutos a 20-25 °C.**

5. Transfiera la mezcla de la sonda preparada y perfectamente agitada a un depósito de reactivo desechable. Con una pipeta de 8 canales y puntas nuevas para cada fila, añada con cuidado 25 µl de la mezcla de la sonda a cada pocillo que contenga controles, calibradores o muestras. Dispense la mezcla de sondas en cada pocillo de hibridación, evitando que salpique. No toque las paredes de los pocillos.

**Nota:** Para el paso anterior, utilice una micropipeta de 8 canales equipada con puntas de 25 a 200 µl que pueda dispensar de 25 a 75 µl. Si el número de pocillos es reducido, utilice una micropipeta de canal único (con puntas de 25 a 200 µl) en lugar de la de 8 canales.

6. Cubra la microplaca de hibridación con una tapa. Agite la microplaca de hibridación en el agitador rotatorio I a  $1100 \pm 100$  rpm durante  $3 \pm 2$  minutos. *Después de la agitación, los controles, los calibradores y las muestras deben adquirir un color amarillo.* Si queda algún pocillo de color púrpura, es posible que no haya recibido la cantidad adecuada de mezcla de la sonda. Añada 25 µl de mezcla de la sonda a las muestras que sigan teniendo un color púrpura y agite de nuevo. Si los pocillos continúan de color púrpura después de este procedimiento, reanalicé las muestras.

7. Incube en el incubador de placas I precalentado y equilibrado a  $65 \pm 2$  °C durante  $60 \pm 5$  minutos.

**Notas:**

- Al colocar la microplaca de hibridación en el incubador de placas I, tenga cuidado de que no salpique.
- Después de agitar, las muestras en la solución PreservCyt adquieren un color rosa en vez de amarillo.

## CAPTURA DE LOS HÍBRIDOS

1. Deje en la microplaca de captura únicamente el número de pocillos necesario y retire los demás. Devuelva los micropocillos no utilizados a la bolsa original y vuelva a sellarla. Con un rotulador, numere cada columna 1, 2, 3... y rotule la microplaca con un identificador apropiado. Las muestras se añadirán a los pocillos según el ejemplo de diseño preparado anteriormente en el apartado *Preparación*.
2. Saque con cuidado la microplaca de hibridación que contiene los calibradores, los controles y las muestras del incubador de placas I. Quite inmediatamente la tapa de la placa y colóquela sobre una superficie limpia.
3. Traspase el contenido completo (aproximadamente 100 µl) de los controles, calibradores y muestras de los pocillos de la microplaca de hibridación al fondo del micropocillo de captura correspondiente, utilizando una pipeta de 8 canales. Use puntas de pipeta nuevas en la pipeta multicanal para cada columna traspasada y deje que todas las puntas se escurran bien para asegurarse de que traspasa toda la muestra. Si lo desea, puede estabilizar la pipeta apoyando las puntas de la pipeta **por la mitad** en el borde superior de los micropocillos de captura (véase el Diagrama 1).

### DIAGRAMA 1: PIPETEO CORRECTO



4. Cubra la microplaca con la tapa y agítela en el agitador rotatorio I a  $1100 \pm 100$  rpm, a una temperatura entre 20 y 25 °C, durante  $60 \pm 5$  minutos.
5. Durante esta incubación, prepare el tampón de lavado y revise los depósitos de aclarado y residuos del lavador automático de placas si corresponde. Consulte el apartado *Preparación y conservación de reactivos*.

6. Cuando finalice el paso de captura, retire la microplaca de captura del agitador rotatorio I y quite con cuidado la tapa de la placa. Vacíe el líquido de los pocillos tirándolo en la pila: invierta completamente la placa sobre la pila y sacúdala vigorosamente con un movimiento hacia abajo, teniendo cuidado de no acercarse mucho al fondo de la pila para que no salpique. **No vuelva a invertir la placa**; séquela mediante unos 2 ó 3 golpecitos sobre toallitas Kimtowels<sup>®</sup> limpias o servilletas de papel equivalentes con bajo contenido en pelusa. Asegúrese de que ha eliminado todo el líquido de los pocillos y de que la parte superior de la placa está seca.

## DETECCIÓN DE LOS HÍBRIDOS

### Notas:

- Añada las soluciones a la placa de izquierda a derecha, utilizando una pipeta de 8 canales.
  - Se recomienda utilizar la técnica de pipeteo inverso para aumentar la reproducibilidad en la dispensación del reactivo. Para esta técnica, las puntas de pipeta se llenan inicialmente en exceso, utilizando el segundo tope del control de aspiración/dispensación (émbolo) de la pipeta. Véase el procedimiento a continuación. Limpie las puntas en un depósito de reactivo o en una servilleta de papel limpia con bajo contenido en pelusa para eliminar el exceso de reactivo antes de aplicarlo a la placa.
  - Si lo desea, puede estabilizar la pipeta apoyando las puntas de la pipeta por la mitad en el borde superior de los micropocillos. Tenga cuidado de no tocar las paredes de los micropocillos, ya que esto podría producir la contaminación cruzada de las muestras. Consulte el Diagrama 1 mostrado anteriormente.
1. Dispense el volumen apropiado del reactivo de detección 1 en un depósito de reactivo desechable (consulte las instrucciones en el apartado *Preparación y conservación de reactivos*). Con una pipeta de 8 canales y utilizando la técnica de pipeteo inverso que se describe más abajo, dispense con cuidado 75 µl del reactivo de detección 1 en cada pocillo de la microplaca de captura.

Técnica de pipeteo inverso:

- a) Coloque las puntas en la pipeta de 8 canales; asegúrese de que todas las puntas estén puestas firmemente.
  - b) Presione el émbolo de la pipeta pasando por el primer tope, hasta el segundo tope.
  - c) Sumerja las puntas en la solución del reactivo de detección 1.
  - d) Suelte lentamente el émbolo y deje que las puntas se llenen con la solución.
  - e) Dispense la solución en los micropocillos (75 µl) soltando el émbolo hasta el primer tope. No suelte el émbolo hasta que no haya vuelto a introducir las puntas en la solución del reactivo de detección 1.
  - f) Vuelva a llenar las puntas y repita los pasos hasta llenar todos los pocillos. Llene los pocillos de la microplaca de izquierda a derecha. *Compruebe que se han llenado todos los pocillos, observando la intensidad del color rosa. Todos los pocillos deben tener una intensidad similar.*
2. Cubra la placa con una tapa e incúbelas a una temperatura entre 20 y 25 °C durante 30 a 45 minutos.

## LAVADO

Lave la placa de captura utilizando uno de los dos métodos siguientes.

### MÉTODO DEL LAVADOR AUTOMÁTICO DE PLACAS

**Nota:** Mantenga siempre el lavador automático de placas encendido. Asegúrese de que el depósito de aclarado esté lleno y de que el depósito de residuos esté vacío. El lavador automático de placas aclara de forma rutinaria el sistema para limpiarlo. Consulte en caso necesario las instrucciones detalladas en el Manual de usuario en el *Manual de usuario del lavador automático de placas*.

#### ANTES DE CADA USO:

- Verifique que el depósito de lavado esté lleno al menos hasta la marca de 1 litro con solución de tampón de lavado. Si no es así, prepare la solución de tampón de lavado. Consulte el apartado *Preparación y conservación de reactivos*.
  - Asegúrese de que el depósito de aclarado esté lleno con agua destilada o desionizada.
  - Asegúrese de que el depósito de residuos esté vacío y bien tapado.
  - El lavador automático de placas realiza automáticamente un aclarado antes de cada lavado y un aclarado después de cada lavado.
1. Quite la tapa de la placa y coloque la placa en la plataforma del lavador automático de placas.
  2. Compruebe que está encendido y que la pantalla indica "Digene Wash Ready" o "P1".

**Nota:** Si únicamente se utiliza parte de una tira de pocillos de captura, los pocillos vacíos de la microplaca deben colocarse en la placa de captura para completar la columna antes de realizar el lavado. Consulte el apartado *Accesorios* si desea obtener información para pedidos.
  3. Seleccione el número de tiras que desea lavar, pulsando la tecla "Rows" y a continuación, "+" o "-" para ajustar el número. Pulse la tecla "Rows" para volver a "Digene Wash Ready" o "P1".
  4. Pulse "Start/Stop" para comenzar.
  5. El lavador automático de placas realizará seis ciclos de llenado y aspiración, que tardan aproximadamente 10 minutos. Se hace una breve pausa durante el programa, para garantizar que no se retire la placa prematuramente. Cuando el lavador automático de placas finalice el lavado, se indicará "Digene Wash Ready" o "P1".
  6. Cuando termine el programa, retire la microplaca del lavador. La placa debe verse de color blanco, sin restos de líquido rosa en los micropocillos.



## MÉTODO DE LAVADO MANUAL

**Nota:** Un lavado inadecuado puede hacer que aumente el fondo y producir resultados falsos positivos (debido a los restos de fosfatasa alcalina). Para asegurarse de la eficacia del lavado con el aparato de lavado, éste debe colocarse a 61 cm como mínimo y a no más de 91 cm por encima de la zona de lavado de modo que la placa esté entre los 61 cm y los 91 cm por debajo del aparato de lavado cuando se lave. La llave de paso del aparato de lavado debe girarse totalmente a la posición “abierta” cuando se esté utilizando y a la posición “cerrada” cuando no se esté utilizando. El aparato de lavado debe contener durante el uso 1,0 l como mínimo de tampón de lavado para garantizar una presión adecuada.

1. Elimine el reactivo de detección 1 de los pocillos colocando toallitas Kimtowels limpias (o servilletas de papel equivalentes con bajo contenido en pelusa) sobre la placa e invirtiendo la placa con cuidado. Antes de invertir la placa, asegúrese de que el papel esté en contacto con toda la superficie de la placa. Deje escurrir la placa durante 1 a 2 minutos. Seque bien la placa con toallitas Kimtowels limpias (o servilletas de papel equivalentes con bajo contenido en pelusa). Deseche con cuidado las toallitas de papel con bajo contenido en pelusa usadas para evitar la contaminación con fosfatasa alcalina en los pasos siguientes.
2. Con el aparato de lavado, lave la placa manualmente 6 veces. Cada pocillo debe lavarse hasta que rebose el líquido para quitar el conjugado de la parte superior de los pocillos. El lavado se inicia en el pocillo A1 y continúa en zig-zag hacia la derecha y hacia abajo. Una vez llenados todos los pocillos, vacíe el líquido en la pila con un movimiento seco hacia abajo. El segundo lavado se inicia en el pocillo H12, avanzando en zig-zag hacia la izquierda y hacia arriba. Esta secuencia de 2 lavados se repite 2 veces más hasta un total de 6 lavados por pocillo.
3. Después del lavado, seque la placa invirtiéndola sobre toallitas Kimtowels limpias (o servilletas de papel equivalentes con bajo contenido en pelusa) y dando 3 ó 4 golpecitos firmemente. Vuelva a colocar las toallitas de papel con bajo contenido en pelusa y seque de nuevo. Deje la placa invertida y espere 5 minutos a que escurra. Seque nuevamente la placa.
4. La placa debe verse de color blanco, sin restos de líquido rosa en los micropocillos.

## AMPLIFICACIÓN DE LA SEÑAL

### Notas:

- Use un par de guantes nuevos sin talco para manipular el reactivo de detección 2.
  - Dispense en el depósito de reactivo **únicamente** la cantidad de reactivo necesaria para realizar el ensayo y evitar así la contaminación del reactivo de detección 2. Consulte el apartado *Preparación y conservación de reactivos*. **NO devuelva el reactivo de detección 2 al frasco original. Deseche el material sobrante después de utilizarlo.**
  - El reactivo de detección 2 debe añadirse sin interrupción. El tiempo de incubación de todos los pocillos debe ser lo más parecido posible.
  - Tenga cuidado de no tocar las paredes del micropocillo y de que el reactivo no salpique las puntas, ya que podría ocasionar la contaminación cruzada de las muestras (véase el Diagrama 1).
1. Con una pipeta de 8 canales y utilizando la técnica de pipeteo inverso descrita anteriormente, dispense con cuidado 75 µl del reactivo de detección 2 en cada pocillo de la microplaca de captura. *Todos los micropocillos deben adquirir un color amarillo.* Compruebe que se han llenado todos los pocillos con precisión, observando la intensidad del color. Todos los pocillos deben tener una intensidad similar.
  2. Cubra la microplaca con una tapa o con Parafilm limpio (o equivalente), e incúbela a 20-25 °C durante 15 minutos. Evite la exposición a la luz solar directa.
  3. Lea la microplaca en el luminómetro aprobado por QIAGEN después de 15 minutos de incubación (y en ningún caso después de 30 minutos de incubación).
  4. El software de análisis de ensayos *digene* permite introducir la información pertinente del ensayo directamente en el software.
  5. Si no utilizó una microplaca completa, retire los micropocillos usados del soporte de la microplaca, aclare perfectamente el soporte con agua destilada o desionizada, séquelo y consérvelo para el siguiente ensayo.

## CRITERIOS PARA VERIFICAR LA CALIBRACIÓN DEL ENSAYO

La verificación de la calibración del ensayo se lleva a cabo para garantizar que los reactivos y los materiales de calibración y control de calidad suministrados funcionan correctamente, permitiendo la determinación precisa del valor de corte del ensayo. El software de análisis de ensayos *digene* calcula automáticamente los criterios de verificación y los verifica como válidos o no válidos (no debe utilizarse el software Digene Qualitative con las *digene* HC2 GC-ID DNA Tests). La prueba hc2 GC-ID DNA Test exige que se realice una calibración para cada ensayo; por tanto, es necesario verificar cada ensayo de acuerdo con los criterios siguientes. Este procedimiento de verificación no debe utilizarse como un sustituto de una prueba de control de calidad interno.

### 1. Calibrador negativo

El calibrador negativo debe analizarse por triplicado en cada ensayo. El valor promedio de RLU del calibrador negativo debe ser  $\geq 10$  y  $\leq 150$  RLU para poder continuar. El coeficiente de variación (%CV) de las réplicas del calibrador negativo debe ser  $\leq 25\%$ . Si el %CV es  $> 25\%$ , el software desechará la réplica con el valor de RLU que más se aleje del promedio como valor atípico y volverá a calcular el promedio y el %CV utilizando las dos réplicas restantes. El %CV recalculado debe ser  $\leq 25\%$ ; de lo contrario, **la verificación de la calibración del ensayo no es válida y es necesario repetir el ensayo con todas las muestras de pacientes. En este caso, no deberán comunicarse los resultados de las muestras de pacientes.**

### 2. Calibrador positivo

El calibrador positivo debe analizarse por triplicado en cada ensayo. El %CV de las réplicas del calibrador positivo debe ser  $\leq 20\%$ . Si el %CV es  $> 20\%$ , el software desechará la réplica con el valor de RLU que más se aleje del promedio como valor atípico y volverá a calcular el promedio y el %CV utilizando las dos réplicas restantes. El %CV recalculado debe ser  $\leq 20\%$ ; de lo contrario, **la verificación de la calibración del ensayo no es válida y es necesario repetir el ensayo con todas las muestras de pacientes. En este caso, no deberán comunicarse los resultados de las muestras de pacientes.**

### 3. Cociente del promedio PC/promedio NC

El promedio de las réplicas del calibrador positivo (promedio PC) y del promedio de las réplicas del calibrador negativo (promedio NC) se utilizan para calcular el cociente del promedio PC/promedio NC. El software calculará el cociente del promedio PC/promedio NC. Este cociente debe cumplir los criterios siguientes para verificar la calibración del ensayo **antes de que se puedan interpretar los resultados de las muestras**: Si el cociente es  $\geq 2,0$  y  $\leq 20$ , el software procederá a calcular el valor de corte. Si el cociente es  $< 2,0$  ó  $> 20$ , **la verificación de la calibración del ensayo no se considera válida y se debe repetir el ensayo con todas las muestras de pacientes. En consecuencia, no deberán comunicarse los resultados de las muestras de pacientes.**

**Nota:** Para determinar la reproducibilidad de los calibradores de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test, se recopilaron los resultados generados con el *digene* Microplate Luminometer 2000 (DML 2000) durante estudios internos en los que se realizaron 62 ensayos utilizando la aplicación del sistema de captura rápida y 43 ensayos utilizando el método manual (véase la tabla 3). Los resultados mostraron que la media del %CV del calibrador positivo de estos 105 ensayos fue igual o inferior al 6,5% y que la media del %CV del calibrador negativo fue igual o inferior al 14,6%. Como indica el valor promedio de RLU del calibrador negativo promedio de 43 obtenido para los ensayos manuales en comparación con el promedio de la aplicación RCS de 54, ésta ha mostrado producir valores de RLU del calibrador negativo (NC) que se desvían ligeramente hacia arriba con relación al método manual. Esta desviación ha mostrado no causar ningún efecto en los resultados de la prueba generados utilizando cualquiera de los métodos opcionales. El promedio del umbral de RLU del calibrador negativo se ha definido como 250 RLU, en función de un cálculo estadístico con una desviación estándar (SD) de  $\pm 3$  del valor promedio de RLU del control negativo observado para el sistema de la prueba *digene* HC2 CT/GC DNA Test observado durante pruebas exhaustivas que se llevaron a cabo durante el desarrollo de la aplicación RCS. El límite superior de esa desviación estándar de  $\pm 3$  se extendió un 20% más para garantizar que pueda alcanzarse el umbral de RLU del control negativo (NC RLU) en la práctica clínica habitual.

El valor promedio de RLU del control negativo debe observarse habitualmente en  $\leq 150$  y el CV  $\leq 25\%$ . Cada laboratorio debe verificar la eficacia del control de calidad y de la calibración conforme al documento C24-2A del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). El promedio de RLU con la aplicación RCS puede sobrepasar ocasionalmente 150, posiblemente con la disminución correspondiente del cociente PC/NC, el cual ha demostrado producir, conforme a la tabla 3, un valor medio en la calibración de 8,29. En este caso, los resultados son aceptables siempre que el RLU del control negativo permanezca  $\leq 250$  y el cociente PC/NC sea  $\geq 2,0$ . Si el valor de RLU del control negativo (NC RLU) sobrepasara 250 o el cociente PC/NC fuera inferior a 2,0 o superior a 20, el ensayo no sería válido.

**Tabla 3.** Resumen estadístico de los valores del calibrador negativo y del calibrador positivo de los ensayos tratados con la aplicación RCS y con el método manual.

Método	Nº de placas	Promedios PC/NC calculados				Controles de calidad del kit de la prueba (Promedio RLU/CO)	
		Promedio	Mediana	Mín.	Máy.	QC CT	QC GC
RCS	62	8,29	8,99	3,95	12,72	0,22	4,73
Manual	43	8,22	8,83	2,59	12,88	0,23	4,07

Método	Calibrador	Promedios RLU calculados				Promedio del %CV calculado
		Promedio	Mediana	Mín.	Máy.	
RCS	Negativo	54	46	24	127	14,4
	Positivo	399	405	179	606	6,5
Manual	Negativo	43	36	16	120	14,6
	Positivo	295	309	167	415	4,7

## CÁLCULO DEL VALOR DE CORTE

Una vez que se haya verificado un ensayo conforme a los criterios indicados arriba, las réplicas válidas del calibrador positivo se utilizarán para establecer los valores de corte de RLU y determinar las muestras que son positivas. Los valores de corte de RLU se calculan como se indica a continuación:

Valor de corte de RLU = promedio de RLU del calibrador positivo

Ejemplo de cálculo del valor de corte:

	Valores de RLU de NC	Valores de RLU de PC
	97	312
	101	335
	91	307
Valor promedio	96	318
%CV	4,9	4,7
Promedio PC / promedio NC	N/A	3,31

Por tanto, el valor de corte de RLU (promedio PC) es = 318

El software de análisis de ensayos *digene* convertirá todos los valores de RLU de las muestras en un cociente del valor de corte de RLU (CO) correspondiente. Por ejemplo, todos los ensayos deben expresarse como RLU/CO de las muestras.

**Nota:** Los valores de RLU/CO y los resultados positivos/negativos de todas las muestras analizadas se incluyen en el informe de análisis de datos del software de análisis de ensayos *digene*.

## CONTROL DE CALIDAD

La prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test incluye muestras para control de calidad. Consulte las instrucciones para introducir los números de lote y las fechas de caducidad de los controles de calidad en el Manual de usuario correspondiente del software de análisis de ensayos *digene*. Estos controles deben incluirse en cada ensayo y el valor de RLU/CO de cada control de calidad debe estar dentro de los siguientes rangos aceptables para que el ensayo se considere válido. **Si los controles de calidad están fuera de estos rangos, el ensayo no se considera válido y se debe repetir.** En consecuencia, no se deben comunicar los resultados de pacientes de ningún ensayo que no sea válido.

	QC CT	QC GC
RLU/CO mínimo	0	1,0
RLU/CO máximo	0,9999	20,00
%CV máximo	20,00	20,00

1. Los controles de calidad suministrados con el kit son dianas de ADN de CT y GC clonado, compuestas de la misma construcción de plásmidos para cada microorganismo individual (uno de CT y otro de GC), al igual que el calibrador positivo suministrado con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test.
2. Este material de control de calidad no es el mismo que el microorganismo de GC en la matriz de la muestra y no es un control de calidad apropiado para el procesamiento del *digene* Specimen Transport Medium o de la solución PreservCyt.
3. El calibrador positivo se utiliza para normalizar los resultados de las muestras estableciendo el valor de corte de RLU. Los controles suministrados con este kit deben utilizarse para el control de calidad interno. Se pueden analizar otros controles, de acuerdo con las directrices o los requisitos de las normativas locales, estatales o nacionales, o de las organizaciones de acreditación.
4. Para probar la eficacia de la lisis y desnaturalización de las muestras, los laboratorios deberán crear periódicamente controles de preparación de las muestras añadiendo  $\geq 5000$  CFU/ml de *Neisseria gonorrhoeae* (auxotipo 1, 5 o la cepa Tipo de ATCC) a un tubo nuevo con solución de transporte de muestras. Incube la muestra durante 1 hora como mínimo a temperatura ambiente antes de analizar del mismo modo que si se tratara de una muestra clínica. Deberá obtenerse un cociente RLU/CO  $\geq 2,50$  si la muestra se trata correctamente. O bien, se pueden utilizar también para este fin paneles de prueba de muestras disponibles en el mercado que contengan microorganismos de GC.
5. Únicamente se han establecido rangos aceptables de los calibradores y los controles de calidad para los luminómetros aprobados por QIAGEN. El calibrador negativo y los controles de calidad detectan fallos significativos de los reactivos y no garantizan la precisión del ensayo.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS MUESTRAS

Según los criterios de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test:

1. Las muestras con cocientes RLU/CO  $\geq 2,50$  se consideran "Positivas para ADN de *Neisseria gonorrhoeae*". La viabilidad y/o infectividad del microorganismo no se puede deducir porque puede persistir ADN diana en ausencia de microorganismos viables.
2. Las muestras con cocientes RLU/CO  $< 1,00$  no contienen ADN de *Neisseria gonorrhoeae* o contienen niveles de ADN por debajo del límite de detección del ensayo. Éstas deben interpretarse y notificarse como "No se detecta ADN de *Neisseria gonorrhoeae*". Un resultado negativo no descarta la infección por *Neisseria gonorrhoeae* porque los resultados dependen de la adecuada recogida de las muestras y ADN suficiente para su detección.
3. Las muestras con cocientes RLU/CO  $\geq 1,00$  y  $< 2,50$  se consideran ambiguas. Los resultados pueden considerarse presumiblemente positivos para el ADN de *Neisseria gonorrhoeae*. Sin embargo, se recomienda repetir la prueba con una muestra nueva de la paciente o realizar pruebas adicionales con un método de análisis alternativo debido al valor pronóstico reducido de un resultado positivo con estos valores de RLU/CO.\*

4. Se recomienda confirmar los resultados positivos con otro método si se duda o cuestiona la posibilidad de infección por *Neisseria gonorrhoeae* cuando se consideren otros hallazgos clínicos o de laboratorio. Estudios analíticos realizados con esta prueba han mostrado una reactividad cruzada limitada con ciertas secuencias de ADN que podrían producir un resultado falso positivo. Consulte más información en *Especificidad analítica*.
- \* Durante la evaluación clínica de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test, se confirmaron como positivos mediante cultivo de GC 3 de 17 resultados ambiguos; los 14 restantes aparentemente fueron falsos positivos. En una evaluación posterior, se observaron 5 muestras con un RLU/CO inicial entre 1,00 y 2,50, tres de las cuales fueron positivas con el cultivo de GC. La repetición del análisis por duplicado en estas tres muestras con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test produjo resultados  $\geq 1,00$  para RLU/CO. Las 2 muestras restantes fueron negativas al cultivo y también resultaron negativas cuando se repitió la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test dos veces.

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Consulte en el *Manual de usuario del sistema de captura rápida* las limitaciones adicionales del procedimiento específicas a la utilización de dicho sistema para analizar un volumen elevado de muestras.

- Solo para uso en diagnóstico *in vitro*.
- Para obtener resultados fiables, siga al pie de la letra los apartados sobre el procedimiento de la técnica de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test, el control de calidad y la interpretación de los resultados de las muestras.
- La prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test solamente se puede utilizar con muestras cervicouterinas recogidas con el *digene* HC2 DNA Collection Device y colocadas en solución de transporte de muestras (STM), con muestras cervicouterinas recogidas con el kit de torundas para recogida de muestras cervicouterinas *digene* y colocadas en STM, o con muestras recogidas con un dispositivo tipo cepillo y colocadas en solución PreservCyt de Hologic.
- Los resultados de esta prueba deben interpretarse solamente en combinación con la información obtenida a partir de la evaluación clínica de la paciente y de otros procedimientos.
- La prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test proporciona resultados cualitativos. No se ha demostrado que el valor numérico (cociente) por encima del valor de corte determinado para la muestra de la paciente esté relacionado con la cantidad de ADN de GC presente en la muestra de la paciente.
- Un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección por *Neisseria gonorrhoeae* puesto que la detección depende del número de microorganismos presentes en la muestra y pueden influir los métodos de recogida de la muestra utilizados, factores de la paciente, el estadio de la infección y/o la cepa de *Neisseria gonorrhoeae*.
- La prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test no tiene como fin determinar el éxito de un tratamiento.
- La prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test solo se ha validado utilizando el lavador automático de placas con los valores especificados en las instrucciones del ensayo. Este estudio de validación se realizó en QIAGEN y los datos que justifican su uso están en sus archivos. No se acepta el uso de otros lavadores de placas ni de otros valores del lavador de placas con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test.
- Para minimizar la variabilidad de los resultados obtenidos con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test, es necesario que el personal del laboratorio que realice el análisis alcance un nivel aceptable de competencia técnica. Cada laboratorio debe verificar también la competencia técnica con el análisis. Para ello, se sugiere analizar periódicamente paneles de prueba de muestras disponibles en el mercado que contengan microorganismos de GC o ADN de GC, en consonancia con los procedimientos de calidad del centro.

## RESULTADOS PREVISTOS

### PREVALENCIA

La prevalencia de infección de las muestras positivas por *Neisseria gonorrhoeae* varía dependiendo de características de la población como edad, sexo y factores de riesgo. La prevalencia de *Neisseria gonorrhoeae* observada en la población del estudio clínico utilizando la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test varió entre el 1,1% y el 13,0%. La prevalencia se calculó suponiendo que las 17 muestras con resultados ambiguos del estudio fueron positivas para el ADN de GC (Tabla 4). Ocho de estas 17 muestras se confirmaron como positivas mediante el cultivo de GC o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

**Tabla 4.** Prevalencia de resultados positivos con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test por centro de análisis.

Centro de análisis	Nº positivos/Nº analizados	% de prevalencia
1	60/460	13,0
2	34/302	11,3
3	23/324	7,1
4	10/390	2,6
5	4/349	1,1
Total	131/1825	7,2

### VALORES PRONÓSTICO POSITIVOS Y NEGATIVOS

Los valores pronóstico positivos y negativos (PPV y NPV) hipotéticos para distintas tasas de prevalencia utilizando la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test se calcularon empleando la sensibilidad y especificidad globales determinadas individualmente para las muestras recogidas con el cepillo cervical *digene* HC2 DNA Collection Device (escobillón cervical) y las obtenidas con el kit de torundas para recogida de muestras cervicouterinas *digene* (torunda). La Tabla 5 representa los valores PPV y NPV hipotéticos de las muestras obtenidas con escobillón (sensibilidad y especificidad globales del 92,6% y 98,5% respectivamente) y la Tabla 6 representa los valores PPV y NPV hipotéticos de las muestras obtenidas con las torundas (sensibilidad y especificidad globales del 93,0% y 98,8% respectivamente).

**Tabla 5.** Valores pronóstico hipotéticos de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test para diferentes tasas de prevalencia (escobillón).

Tasa de prevalencia (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	92,6	98,5	76,5	99,6
10	92,6	98,5	87,3	99,2
15	92,6	98,5	91,6	98,7
20	92,6	98,5	76,3	99,60

**Tabla 6.** Valores pronóstico hipotéticos de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test para diferentes tasas de prevalencia (torunda).

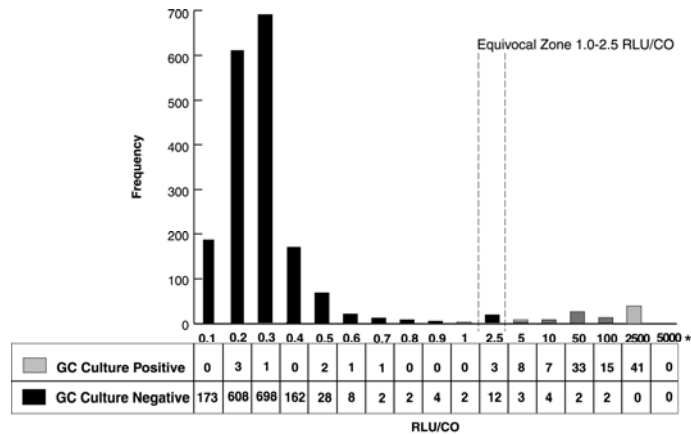
Tasa de prevalencia (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	93,0	98,8	79,8	99,7
10	93,0	98,8	88,3	99,4
15	93,0	98,8	91,6	99,1
20	93,0	98,8	93,3	98,7

### DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS: RESULTADOS PARA RLU/CO CON LA PRUEBA *digene* HC2 GC-ID DNA TEST

La distribución de los cocientes RLU/CO con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test observados durante el estudio clínico multicéntrico se indican a continuación (Figura 1). Estos datos incluyen muestras analizadas con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test y de las que se dispuso de resultados de cultivos de GC (n=1826). La interpretación de los resultados se realizó conforme a los criterios siguientes: Las muestras con valores de RLU/CO < 1,00 se consideraron negativas. Las muestras con valores de RLU/CO ≥ 2,50 se consideraron positivas. Las muestras con valores RLU/CO ≥ 1,00 y < 2,50 se consideraron ambiguas.

Se observa una clara separación de los cocientes RLU/CO entre los resultados positivos y los resultados negativos obtenidos con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test. El noventa y nueve por ciento (1676/1690) de los resultados negativos con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test tienen valores de RLU/CO entre 0,0 y 0,5. Cinco (5/1690) de los resultados negativos con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test produjeron un RLU/CO entre 0,6 y 0,8. En general, menos del uno por ciento (< 0,9%, 17/1825) de los resultados de las muestras se encuentran dentro de la zona ambigua del ensayo, siendo el 47% (8/17) de éstas positivas mediante cultivo de GC o PCR. El ochenta y nueve por ciento (93/104) de los resultados positivos con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test tienen valores de RLU/CO entre 10 y 2500.

**Figura 1.** Distribución de frecuencias de los resultados de RLU/CO con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test.



\* Indica el límite superior del rango, incluyendo el valor indicado.

## EFICACIA DEL ENSAYO

### RESULTADOS DEL ESTUDIO CLÍNICO SEGÚN LA MUESTRA

La eficacia del ensayo de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test se determinó comparando los resultados del ensayo con los resultados del cultivo de gonorrea. Se analizaron mil ochocientos veinticinco (1825) muestras de pacientes de 5 centros diferentes, entre ellos, clínicas de ETS, de Planificación Familiar, y de Obstetricia y Ginecología. Se realizó una PCR en las muestras que resultaron positivas con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test y negativas con el cultivo. Los resultados de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test NO se aclararon con los resultados de la PCR y, por tanto, ésta no influyó en los cálculos de la eficacia de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Los resultados del estudio clínico de las muestras recogidas con el *digene* HC2 DNA Collection Device (escobillón cervical) se muestran en la Tabla 7 y los de las muestras recogidas con el kit de torundas para recogida de muestras cervicouterinas *digene* (torunda) en la Tabla 8.

La eficacia del ensayo de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test se calculó aplicando un valor de corte tanto de 1,0 como de 2,5 sin considerar las posibles muestras positivas que se encuentren en la zona ambigua descrita en el apartado *Interpretación de los resultados* de estas instrucciones de uso. Por tanto, la eficacia de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test podría variar en su laboratorio dependiendo de la distribución de los valores que se encuentren dentro de la zona ambigua y los resultados nuevos que se obtengan al repetir el análisis en las posibles muestras positivas (zona ambigua). Como punto de referencia, menos del 0,9% de las muestras (17/1825) analizadas durante el estudio clínico multicéntrico utilizadas para establecer la eficacia de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test se encontraron dentro de este rango. Vea la Distribución de las frecuencias de los resultados de RLU/CO en el apartado *Resultados previstos* de estas instrucciones de uso si desea más información.

No se han generado datos suficientes para determinar con exactitud si la sensibilidad y el valor pronóstico positivo de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test utilizando el kit de torundas para recogida de muestras cervicouterinas *digene* son equivalentes a la sensibilidad y al valor pronóstico positivo observado en muestras recogidas utilizando el *digene* HC2 DNA Collection Device. Como el uso del *digene* HC2 DNA Collection Device está contraindicado en la recogida de muestras cervicouterinas de mujeres embarazadas, la capacidad de la prueba para detectar la presencia de ADN de GC podría reducirse en esta población de pacientes o cuando se utilice una torunda para obtener la muestra. Las estimaciones de la eficacia del ensayo se basan en muestras conservadas a una temperatura entre 2 y 8 °C o congeladas y analizadas en 1 a 2 semanas desde su obtención.

No se ha determinado la sensibilidad clínica ni la especificidad de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test para detectar aquellas pacientes con una infección clínicamente activa que pueda ser transmitida a sus parejas o causar secuelas relacionadas con GC en comparación con todos los métodos comerciales de amplificación de ácidos nucleicos (NAA) para la detección del ADN de GC. En estudios clínicos, el análisis con un ensayo comercial modificado de NAA mostró resultados positivos en algunas muestras positivas con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test obtenidas de pacientes con cultivos negativos. La sensibilidad estimada se basa en el número de resultados positivos con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test hallados en pacientes con cultivos positivos para *Neisseria gonorrhoeae*. Por tanto, la sensibilidad de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test solo se puede deducir con relación a los resultados positivos con cultivo que podrían tener una sensibilidad del 60 al 85%.



**Tabla 7.** Resultados de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test frente al cultivo de GC para las muestras obtenidas con escobillón. Más abajo se muestra la eficacia del ensayo calculada utilizando valores de RLU/CO de 1,0 y 2,5; los valores entre paréntesis representan la eficacia considerando el valor de RLU/CO de 2,5. Los intervalos de confianza del 95% incluyen ambos rangos cuando las estimaciones variaban para cada uno de los valores de RLU/CO evaluados.

	Centro <sup>2</sup>	<i>digene</i> HC2 GC-ID: Cultivo: n=	POS POS	POS NEG	NEG POS	NEG NEG	Sensibilidad	PPV	Especificidad	NPV	<i>digene</i> HC2 GC-ID+ Cultivo- PCR <sup>1+</sup>
<b>Sintomática</b>											
IC 95%	1	351	39 (38)	7 (3)	1 (2)	304 (308)	97,50 (95,00) 83,1-99,9	84,78 (92,68) 80,1-98,5	97,75 (99,04) 97,2-99,8	99,67 (99,35) 98,2-100	5/7 (2/3)
IC 95%	2	188	13	2	4	169	76,47 50,1-93,2	86,67 59,5-98,3	98,83 95,8-99,9	97,69 94,2-99,4	1/2
IC 95%	3	233	14	6 (3)	1	212 (215)	93,33 68,1-99,8	70,00 (82,35) 56,6-96,2	97,25 (98,62) 96,0-99,7	99,54 97,4-100	0 <sup>3</sup> /6
IC 95%	4	163	4	0	0	159	100,00 39,8-100	100,00 39,8-100	100,00 97,7-100	100,00 97,7-100	N/A
	<b>Todos</b>	<b>935</b>	<b>70 (69)</b>	<b>15 (8)</b>	<b>6 (7)</b>	<b>844 (851)</b>	<b>92,11 (90,79)</b> <b>83,6-97,1</b>	<b>82,35 (89,61)</b> <b>80,1-95,4</b>	<b>98,25 (99,07)</b> <b>98,2-99,6</b>	<b>99,29 (99,18)</b> <b>98,5-99,7</b>	<b>6<sup>3</sup>/15</b>
<b>IC 95% Asintomática</b>											
IC 95%	1	101	10 (9)	2	0 (1)	89	100,00 (90,00) 69,2-100	83,33 (81,82) 51,6-97,9	97,80 92,3-99,7	100,00 (98,89) 95,9-100	2/2
IC 95%	2	12	2	0	0	10	100,00 15,8-100	100,00 15,8-100	100,00 69,2-100	100,00 69,2-100	N/A
IC 95%	3	84	1 (0)	0	0 (1)	83	100,00 (0,00) 2,5-100	100,00 2,5-100	100,00 95,7-100	100,00 (98,81) 95,7-100	N/A
IC 95%	4	226	4	2 (0)	1	219 (221)	80,00 28,4-99,5	66,67 (100,00) 39,8-100	99,10 (100,00) 98,3-100	99,55 97,5-100	1/2 (N/A)
IC 95%	5	1	0	0	0	1	N/A	N/A	100,00 2,5-100	100,00 2,5-100	N/A
	<b>Todos</b>	<b>424</b>	<b>17 (15)</b>	<b>4 (2)</b>	<b>1 (3)</b>	<b>402 (404)</b>	<b>94,44 (83,33)</b> <b>72,7-99,9</b>	<b>80,95 (88,24)</b> <b>63,6-98,5</b>	<b>99,01 (99,51)</b> <b>98,2-99,9</b>	<b>99,75 (99,26)</b> <b>98,6-100</b>	<b>3/4 (2/2)</b>
<b>IC 95% TODAS</b>											
IC 95%	1	452	49 (47)	9 (5)	1 (3)	393 (397)	98,00 (94,00) 89,4-100	84,48 (90,38) 79,0-96,8	97,76 (98,76) 97,1-99,6	99,75 (99,25) 98,6-100	7/9 (4/5)
IC 95%	2	200	15	2	4	179	78,95 54,4-94,0	88,24 63,6-98,5	98,90 96,1-99,9	97,81 94,5-99,4	1/2
IC 95%	3	317	15 (14)	6 (3)	1 (2)	295 (298)	93,75 (87,50) 69,8-99,8	71,43 (82,35) 56,6-96,2	98,01 (99,00) 97,1-99,8	99,66 (99,33) 98,1-100	0 <sup>3</sup> /6
IC 95%	4	389	8	2 (0)	1	378 (380)	88,89 51,8-99,7	80,00 (100,00) 63,1-100	99,47 (100,00) 99,0-100	99,74 98,5-100	1/2 (N/A)
IC 95%	5	1	0	0	0	1	N/A	N/A	100,00 2,5-100	100,00 2,5-100	N/A
	<b>Todos</b>	<b>1359</b>	<b>87 (84)</b>	<b>19 (10)</b>	<b>7 (10)</b>	<b>1246 (1255)</b>	<b>92,55 (89,36)</b> <b>85,3-97,0</b>	<b>82,08 (89,36)</b> <b>81,3-94,8</b>	<b>98,50 (99,21)</b> <b>98,6-99,6</b>	<b>99,44 (99,21)</b> <b>98,9-99,8</b>	<b>9<sup>3</sup>/19</b>

<sup>1</sup> Esta información se proporciona a efectos informativos solamente; los resultados de las muestras no se aclararon mediante PCR.

<sup>2</sup> El centro número 5 no tenía ninguna muestra obtenida con escobillón de pacientes sintomáticas.

<sup>3</sup> No se realizó PCR en dos casos.

N/A = No Aplicable.

**Tabla 8.** Resultados de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test frente al cultivo de GC para las muestras obtenidas con torunda. Más abajo se muestra la eficacia del ensayo calculada utilizando valores de RLU/CO de 1,0 y 2,5. Los valores entre paréntesis representan la eficacia considerando el valor de RLU/CO de 2,5. Los intervalos de confianza del 95% incluyen ambos rangos cuando las estimaciones variaban para cada uno de los valores de RLU/CO evaluados.

Centro <sup>2</sup>	<i>digene</i> HC2GC-ID: Cultivo: n=	POS POS	POS NEG	NEG POS	NEG NEG	Sensibilidad	PPV	Especificidad	NPV	<i>digene</i> HC2GC- ID+ Cultivo- PCR <sup>1+</sup>
<b>Sintomática</b>										
1	354	34 (31)	2 (3)	2 (5)	316 (315)	94,44 (87,18)	94,44 (91,18)	99,37 (99,06)	99,37 (98,44)	N/A
IC 95%						81,34-99,32	81,34-99,32	97,75-99,92	97,75-99,92	
2	92	13	2 (0)	1	76 (78)	92,86	86,67 (100)	97,44 (100)	98,70 (98,73)	0/2
IC 95%						66,1-99,8	75,3-100	95,4-100	93,2-100	
3	5	2	0	0	3	100	100	100	100	N/A
IC 95%						15,8-100	15,8-100	29,2-100	29,2-100	
5	162	0	3 (1)	0	159 (161)	N/A	0,00	98,15 (99,38)	100	1 <sup>3</sup> /3
IC 95%							2,5-100	96,6-100	97,7-100	
<b>Todos</b>	<b>613</b>	<b>49 (46)</b>	<b>7 (4)</b>	<b>3 (6)</b>	<b>554 (557)</b>	<b>94,23 (88,46)</b>	<b>87,50 (92,00)</b>	<b>98,75 (99,29)</b>	<b>99,46 (98,93)</b>	<b>1<sup>3</sup>/5</b>
IC 95%						84,05-98,79	75,93-94,82	97,45-99,50	98,43-99,89	
<b>Asintomática</b>										
1	61	1	0	1	59	50,00	100	100	98,33	N/A
IC 95%						1,26-98,74	2,50-100	93,94-100	91,06-99,96	
2	10	2	0	0	8	100	100	100	100	N/A
IC 95%						15,8-100	15,8-100	63,1-100	63,1-100	
3	2	0	0	0	2	N/A	N/A	100	100	N/A
IC 95%								15,8-100	15,8-100	
4	1	0	0	0	1	N/A	N/A	100	100	N/A
IC 95%								2,5-100	2,5-100	
5	186	1	0	0	185	100	100	100	100	N/A
IC 95%						2,5-100	2,5-100	98,0-100	98,0-100	
<b>Todos</b>	<b>260</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>255</b>	<b>80,00</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>99,61</b>	<b>N/A</b>
IC 95%						28,36-99,49	39,76-100	98,56-100	97,84-99,99	
<b>TODAS</b>										
1	415	35 (32)	5 (3)	3 (6)	372 (374)	92,11 (84,21)	87,50 (91,43)	98,67 (99,20)	99,20 (98,42)	N/A
IC 95%						78,62-98,34	73,20-95,81	96,93-99,57	97,68-99,83	
2	102	15	2 (0)	1	84 (86)	93,75	88,24 (100)	97,67 (100)	98,82 (98,85)	0/2
IC 95%						69,8-99,8	63,6-100	91,9-100	93,6-100	
3	7	2	0	0	5	100	100	100	100	N/A
IC 95%						15,8-100	15,8-100	47,8-100	47,8-100	
4	1	0	0	0	1	N/A	N/A	100	100	N/A
IC 95%								2,5-100	2,5-100	
5	348	1	3 (1)	0	344 (346)	100	25,00 (50,00)	99,14 (99,71)	100	1 <sup>3</sup> /3
IC 95%						2,5-100	1,3-98,7	98,4-100	98,9-100	
<b>Todos</b>	<b>873</b>	<b>53 (50)</b>	<b>10 (4)</b>	<b>4 (7)</b>	<b>806 (812)</b>	<b>92,98 (87,72)</b>	<b>84,13 (92,59)</b>	<b>98,77 (99,51)</b>	<b>99,51 (92,59)</b>	<b>1<sup>3</sup>/5</b>
IC 95%						83,00-98,05	72,74-92,12	97,76-99,41	98,74-99,87	

<sup>1</sup> Esta información se proporciona a efectos informativos solamente; los resultados de las muestras no se aclararon mediante PCR.

<sup>2</sup> El centro número 4 no tenía ninguna muestra obtenida con escobillón de pacientes sintomáticas.

<sup>3</sup> No se realizó PCR en dos casos.

N/A = No Aplicable

## REPRODUCIBILIDAD

Se realizó un estudio de reproducibilidad como parte del ensayo clínico multicéntrico para determinar la reproducibilidad interensayo, interdiaria, entre centros y la total de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test utilizando un panel compuesto por dianas de ADN de *Neisseria gonorrhoeae* y muestras clínicas positivas y negativas con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test.

Se analizó un panel con 10 miembros de muestras enmascaradas clínicas y no clínicas desnaturalizadas, que constaba de 8 muestras positivas y 2 negativas. Los análisis se realizaron en réplicas de seis, dos veces al día durante un período de tres días en cada uno de cuatro centros (3 centros externos y QIAGEN). Cada centro generó 36 puntos de datos por cada diana analizada. Todas las muestras se desnaturalizaron y conservaron congeladas antes de los análisis. Se observó una concordancia del 100% para los 1152 resultados positivos previstos (1152/1152) y una concordancia del 100% para los 288 resultados negativos previstos (288/288). La concordancia global fue del 100% (1440/1440), con un intervalo de confianza del 95% de 99,7 a 100 y Kappa = 1,00. No se observó una variabilidad significativa interensayo, interdiaria ni entre centros; por tanto, los datos obtenidos de todos los ensayos en cada centro se combinaron y se presentan a continuación (Tabla 9).

**Tabla 9.** Reproducibilidad de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test en un ensayo multicéntrico.

Nº diana	Centro 1		Centro 2		Centro 3		Centro 4		Total		
	$\bar{X}$ RLU /CO	% Conc	$\bar{X}$ RLU /CO	% Conc	$\bar{X}$ RLU /CO	% Conc	$\bar{X}$ RLU /CO	% Conc	$\bar{X}$ RLU /CO	Observado/previsto	% Conc
1	2,5	100	2,1	100	2,7	100	2,6	100	2,5	144/144	100
2	4,8	100	4,2	100	5,0	100	5,2	100	4,8	144/144	100
3	29,4	100	23,3	100	30,1	100	30,4	100	28,3	144/144	100
4	51,5	100	43,0	100	52,1	100	54,1	100	50,2	144/144	100
5	2,5	100	2,0	100	2,5	100	2,5	100	2,4	144/144	100
6	4,7	100	3,5	100	4,9	100	4,8	100	4,5	144/144	100
7	14,0	100	10,6	100	13,9	100	14,1	100	13,2	144/144	100
8	16,7	100	12,7	100	17,4	100	18,2	100	16,3	144/144	100
9	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	144/144	100
10	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	144/144	100
<b>TOTAL</b>										1440/1440	100

Se realizó un segundo estudio de competencia/reproducibilidad en tres centros externos utilizando el microorganismo completo de *Neisseria gonorrhoeae* (GC) añadido a una matriz de muestras clínicas simuladas de células epiteliales. Las 25 muestras analizadas contenían representaciones de negativas, positivas bajas (en el límite de detección o cerca de éste) y medias con 2 cepas de GC, mezcla de infecciones por *Chlamydia trachomatis* (CT) y muestras que contenían sangre. Se esperaba que doce muestras fueran positivas y trece negativas. En la Tabla 10 se muestra el porcentaje de concordancia entre los resultados observados y los previstos de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test en los tres centros de análisis individuales y de todos los centros combinados. La Tabla 11 incluye los valores de la sensibilidad, especificidad, concordancia y Kappa para cada centro.

**Tabla 10.** % de concordancia de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test por centro.

Centro	Observado frente a previsto	% de concordancia*
1	25/25	100% (86,28%-100%)
2	25/25	100% (86,28%-100%)
3	25/25	100% (86,28%-100%)
Centros combinados	75/75	100% (95,20%-100%)

\* Las cifras entre paréntesis indican los intervalos de confianza del 95%.

**Tabla 11.** Resumen de la estadística de los resultados de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test (valor de corte de 1,0).

Parámetro estadístico	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Global
Sensibilidad	100% (73,54%-100%)*	100% (73,54%-100%)	100% (73,54%-100%)	100% (90,26%-100%)
Especificidad	100% (75,29%-100%)	100% (75,29%-100%)	100% (75,29%-100%)	100% (90,97%-100%)
Concordancia	100% (86,28%-100%)	100% (86,28%-100%)	100% (86,28%-100%)	100% (95,20%-100%)
K	1,0	1,0	1,0	1,0

\* Las cifras entre paréntesis indican los intervalos de confianza del 95%.

En pruebas rutinarias de competencia, las 12 muestras ambiguas presentadas en la Tabla 10 que contenían todas ellas bajas concentraciones del microorganismo de GC ( $\sim 5 \times 10^4$  microorganismos/ml), se interpretarían como posibles positivas conforme al apartado *Interpretación de los resultados* de estas instrucciones de uso. Por tanto, el ensayo ha demostrado la capacidad de detectar ADN de GC en muestras con concentraciones de microorganismos detectables en el límite de detección del ensayo o cerca de éste. Se observaron datos adicionales de esto al analizar un panel disponible que contenía muestras con concentraciones bajas de microorganismos en un rango que podía ser detectado con ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. Los análisis en tres centros externos y en QIAGEN produjeron el 100% de resultados positivos (o posibles positivos) para las muestras del panel que contenían microorganismos de GC. En dos casos, los valores de RLU/CO estaban en la zona ambigua del ensayo (véase la Tabla 12 a continuación).

**Tabla 12.** Resultados del panel de muestras con CT y GC.

Resultado de la prueba <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test			
Centro	RLU/CO	Interpretación	Resultado previsto
1	0,12	NEG	NEG
	10,45	POS	POS
	10,26	POS	POS
	9,74	POS	POS
	0,14	NEG	NEG
2	0,09	NEG	NEG
	9,31	POS	POS
	9,93	POS	POS
	9,69	POS	POS
	0,09	NEG	NEG
3	0,11	NEG	NEG
	11,00	POS	POS
	12,08	POS	POS
	9,45	POS	POS
	0,10	NEG	NEG
4	0,07	NEG	NEG
	8,54	POS	POS
	7,27	POS	POS
	8,09	POS	POS
	0,08	NEG	NEG

## PRECISIÓN

Se realizó un estudio de precisión en tres centros para determinar la precisión intraensayo y total de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test utilizando un panel de muestras clínicas simuladas positivas y negativas enmascaradas. Además, se evaluó la precisión intra e interinstrumental observada con dos luminómetros independientes utilizando el mismo panel. Los dos modelos de luminómetro fueron: el DML 2000, que es uno de los luminómetros recomendados para utilizar con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test y el luminómetro MLX; el luminómetro MLX fue uno de los modelos de luminómetro utilizado durante la evaluación clínica que ya no está disponible. Uno de los tres centros tuvo dificultades con otras pruebas *digene* HC2 de ADN realizados como parte de este estudio que se atribuyeron a la técnica del ensayo probablemente causados por una formación incorrecta o inadecuada del personal. Aunque no influyó en los resultados de las pruebas de precisión de las pruebas *digene* HC2 GC-ID DNA Test, el técnico que realizó las pruebas volvió a recibir formación en la técnica correcta del ensayo.

La Tabla 13 muestra la eficacia de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test de todos los centros combinados (incluido el centro que tuvo problemas técnicos antes de volver a formar al técnico sobre la técnica correcta del ensayo). El ensayo demostró una precisión equivalente tras la formación del técnico, aunque para el miembro del panel 3 (que contenía bajas concentraciones del microorganismo de GC) los valores de RLU/CO observados se encontraban dentro o cerca de la zona ambigua del ensayo de 1,0 a 2,5. A efectos del análisis de estos datos, todos esos valores de RLU/CO que se entraban dentro de la zona ambigua o superaban el 2,5 se interpretaron como positivos. Aunque no es evidente en la tabla, los resultados cualitativos tuvieron una concordancia del 100% (54/54) (IC del 95% de 93,4 a 100%) con los resultados previstos en los tres centros.

**Tabla 13.** Estimaciones de la precisión intrainstrumental, interinstrumental, intraensayo y total de RLU/CO por prueba y diana.

Miembro panel	n	Promedio RLU/CO	Intrainstrumental		Interinstrumental		Intraensayo		Total	
			Desviación estándar (SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)
1	54	0,0974	0,0104	10,6818	0,0017	1,7328	0,0275	28,2556	0,0275	28,1978
2	54	0,0967	0,0111	11,5031	0,0015	1,5618	0,0338	34,9362	0,0342	35,4230
3	54	3,2335	0,1502	4,6462	0,0356	1,0997	0,3520	10,8869	0,3866	11,9551
4	54	3,8407	0,2078	5,4092	0,0525	1,3671	0,3401	8,8541	0,3487	9,0802
5	54	16,1676	1,0507	6,4986	0,1122	0,6940	2,1788	13,4766	2,1437	13,2589
6	54	18,0704	1,0539	5,8321	0,3456	1,9124	2,3701	13,1158	2,3316	12,9027

A efectos del análisis de estos datos, todos esos valores de RLU/CO que estaban dentro de la zona ambigua o superaban el 2,5 se interpretaron como positivos. Se realizó un estudio de precisión adicional en QIAGEN para determinar la precisión total de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test utilizando el DML 2000. Se preparó un panel de precisión de seis miembros utilizando una matriz de muestras clínicas simuladas que constaba de células epiteliales cultivadas suspendidas en *digene* Specimen Transport Medium (STM) y que constaba de dos muestras negativas, dos muestras positivas bajas y dos muestras positivas de nivel medio, conteniendo todas ellas un escobillón de recogida. Dos técnicos analizaron cada panel por triplicado, dos paneles por placa, durante el transcurso de 5 días. Se utilizó un panel desnaturalizado nuevo por placa. Los resultados de la precisión total de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test recopilados en los cinco días de análisis se presentan en la Tabla 14. Aunque no es evidente en estas tablas, la interpretación cualitativa de los resultados tuvo una concordancia del 100% con el resultado previsto (120/120; IC del 95% de 96,97-100%) cuando se utiliza un RLU/CO de 1,0.

**Tabla 14.** Precisión total de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test.

Miembro panel	n	Promedio RLU/CO	SD	%CV	Promedio -2xSD	Promedio +2xSD
1	120	0,11	0,0361	32,28	0,04	0,18
2	120	0,11	0,0283	26,45	0,05	0,16
3	120	3,03	0,3212	10,62	2,38	3,67
4	120	4,06	0,4151	10,23	3,23	4,89
5	120	14,41	2,2239	15,44	9,96	18,85
6	120	13,34	1,7298	12,97	9,88	16,80

## PRECISIÓN CON MUESTRAS EN SOLUCIÓN PRESERVICYT

Se llevó a cabo un estudio multicéntrico para determinar la precisión del ensayo entre laboratorios e interdiaria con muestras en solución PreservCyt. Se analizó un panel de 12 miembros, con muestras de pacientes simuladas recogidas en solución PreservCyt en dos laboratorios externos a QIAGEN. Cada laboratorio analizó el panel por triplicado, dos veces al día durante 3 días, utilizando el mismo lote de reactivos. El panel de 12 miembros con muestras simuladas en solución PreservCyt se preparó con cantidades variables de GC (auxotipo 22; ATCC 27631) para crear el panel que se muestra en la Tabla 15.

**Tabla 16.** Panel de precisión de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test con muestras simuladas en solución PreservCyt.

Muestra a granel	Miembros del panel*	Resultado previsto de la prueba <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test	RLU/CO aproximado
A	1P, 2P, 7P, 8P	Positivo bajo para GC	~5
B	3P, 4P, 9P, 10P	Positivo intermedio para GC	~10
C	5N, 11N	Negativo	~0,20
D	6N, 12N	Negativo	~0,20

\*El identificador de la muestra indica el estado conocido de *Neisseria gonorrhoeae* [positivo (P) o negativo (N)]

A efectos del análisis de datos, se combinaron los miembros del panel derivados de la misma muestra a granel.

**Tabla 16.** Resultados cualitativos por muestra a granel – procedimiento de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test.

Mezcla de muestras a granel	Positivas para GC n (%)	Ambiguas n (%)	Negativas n (%)	Total
<b>Negativas (5N, 11N)</b>	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
<b>Negativas (6N, 12N)</b>	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
<b>Total negativas</b>	0 (0,0)	0 (0,0)	216 (100)	216
<b>Positivas bajas (1P, 2P, 7P, 8P)</b>	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
<b>Positivas intermedias (3P, 4P, 9P, 10P)</b>	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
<b>Total positivas</b>	432 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	432

**Tabla 17.** Desviaciones estándar (SD) y coeficientes de variación (CV) de la precisión por laboratorio y día: prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test en solución PreservCyt

Muestra	N	Promedio RLU/CO	SD intraensayo	SD interensayo	SD interdiaria	SD entre centros	SD total	%CV
Negativas (5N, 11N)	108	0,201	0,037	0,019	0*	0,032	0,052	25,9
Negativas (6N, 12N)	108	0,198	0,055	0,016	0,019	0,021	0,064	32,3
Positivas intermedias para GC (3P, 4P, 9P, 10P)	216	7,981	0,906	1,203	0	0,243	1,526	19,1
Positivas bajas para GC (1P, 2P 7P, 8P)	216	4,648	0,675	0,478	0,308	0	0,883	19,0

\*Los componentes con varianza negativa se establecieron en cero.

### SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica (límites de detección) de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test se determinó analizando directamente una serie de diluciones de un panel de muestras que constaba de 114 aislados diferentes de *Neisseria gonorrhoeae*. Los 114 aislados representaban 13 auxotipos, 5 serotipos, 10 cepas resistentes a antibióticos, 6 aislados de cepas sin plásmidos y 2 aislados sin caracterizar que se hallaron discordantes en el ensayo multicéntrico. Se analizaron cuatro series de diluciones de cada uno de los aislados utilizando la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test con el fin de establecer los límites de detección de la prueba. El límite de detección de cada auxotipo de *Neisseria* se resume en la Tabla 18. El rango del límite de detección que se indica es la dilución de cada auxotipo que se detectó en la zona ambigua del ensayo de 1,0-2,5 para el RLU/CO, o muy cerca de ésta.

La sensibilidad analítica de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test varió de 25 a 50,000 CFU/ensayo para los 114 aislados de *Neisseria* analizados, incluidos auxotipos, serotipos, cepas sin plásmidos y resistentes a antibióticos. Solamente se detectaron una de las seis cepas sin plásmidos y uno de los cinco serotipos IA-5 de *Neisseria gonorrhoeae* analizados en 50.000 CFU/ensayo; no se detectaron ninguno de los otros 112 aislados en concentraciones de más de 5000 CFU/ensayo. El límite de detección medio de los 114 aislados variaba de 974 a 2887 CFU/ensayo cuando se tenían en cuenta diluciones de aislados que se encontraban tanto dentro de la zona ambigua del ensayo como por encima de 2,5 para el RLU/CO. El límite de detección medio global fue de 1931 CFU/ensayo ( $3,8 \times 10^4$  CFU/ml). Quizás sea necesario volver a analizar las muestras clínicas que contengan microorganismos en el límite de detección, o cerca de éste, con un método de análisis alternativo o con una muestra nueva de la paciente según se define en el apartado *Interpretación de los resultados* de estas instrucciones de uso.

**Tabla 18.** Resumen de los límites detectables de la sensibilidad de los auxotipos, serotipos, cepas sin plásmidos y resistentes a antibióticos de GC.

Auxotipo	Concentración detectable	
	CFU/ml	CFU/ensayo
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo 1	1000	50
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo 12	500-5000	25 - 250
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo 16	$10^3$ - $10^4$	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo 22	$10^4$ - $10^5$	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo 5	500-5000	25 - 250
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo 9	$5 \times 10^4$	2500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo AHU (5 aislados)	$10^4$ - $10^5$	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo Arg (5 aislados)	$10^4$ - $10^5$	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo AU (5 aislados)	$10^3$ - $10^4$	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo PAU (5 aislados)	$10^3$ - $10^5$	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo Pro (5 aislados)	$10^4$ - $10^5$	500 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo Proto (5 aislados)	$10^3$ - $10^4$	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Intermedia a ciprofloxacina (Cipl) (5 aislados)	$10^3$ - $10^5$	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Resistente a ciprofloxacina (Cip R) (4 aislados)	$10^3$ - $10^4$	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> CMRNG (5 aislados)	$10^4$ - $10^5$	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Otro-5423	$10^4$ - $10^5$	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Otro-5658	$10^3$ - $10^4$	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> PenR (5 aislados)	$10^4$ - $10^5$	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PenR (5 aislados)	$10^3$ - $10^6$	50 - 50.000
<i>N. gonorrhoeae</i> Cepas sin plásmidos (6 aislados)	$10^4$ - $10^5$	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 3.05 (5 aislados)	$10^4$ - $10^5$	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 3.2	$10^3$ - $10^5$	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 4.4 (4 aislados)	$10^4$ - $10^5$	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Serotipo IA-1 o IA-2 (5 aislados)	$10^4$ - $10^6$	500 - 50.000
<i>N. gonorrhoeae</i> Serotipo I A-5 (4 aislados)	$10^3$ - $10^4$	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Serotipo I B-1 (5 aislados)	$10^3$ - $10^5$	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Serotipo I B-4 o IB-15 (5 aislados)	$10^3$ - $10^5$	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Resistente a espectinomicina (SpecR)	$10^5$	5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TetR (5 aislados)	$10^3$ - $10^5$	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TRNG American (5 aislados)	$10^4$ - $10^5$	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TRNG Dutch (5 aislados)	$10^4$ - $10^5$	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Cepa tipo	500-5000	25 - 250

#### OTRAS CONSIDERACIONES PARA LAS MUESTRAS EN SOLUCIÓN PRESERVCYT

Los estudios de límite de detección descritos en el apartado anterior del STM no se repitieron con muestras en solución PreservCyt, ya que se espera que la sensibilidad analítica del ensayo sea independiente del tipo de muestra (en STM o en solución PreservCyt), en particular puesto que las muestras en solución PreservCyt se someten a un procedimiento de conversión (si desea información más detallada, consulte las instrucciones de uso del Kit de conversión de muestras de *digene* HC2) que hace que las muestras en solución PreservCyt tengan una composición similar a la de las muestras en STM antes de utilizarlas con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test.

No obstante, debido a que las muestras en solución PreservCyt se someten a un paso de centrifugación durante el procedimiento de conversión, fue necesario evaluar el posible efecto de la centrifugación sobre la sensibilidad analítica de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Para evaluar el posible efecto de la centrifugación sobre la sensibilidad analítica, se prepararon ochenta y ocho (88) pares de muestras negativas para ADN de *Neisseria gonorrhoeae* en STM y solución PreservCyt, utilizando cantidades equivalentes del microorganismo *Neisseria gonorrhoeae* (cepa NRL 33151 sin plásmidos). Se analizaron las muestras pareadas y se calculó la sensibilidad analítica comparando los valores medios de RLU/CO obtenidos [(PreservCyt:STM) x100].



**Tabla 19.** Comparación de la sensibilidad analítica – prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test – Muestras pareadas en solución PreservCyt y STM.

	Prueba <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test		RLU/CO PC:STM
	STM	PreservCyt	
<b>Número de muestras</b>	88	88	-
<b>RLU/CO medio</b>	3,97	4,91	1,24
<b>Mediana de RLU/CO</b>	4,01	4,93	1,23
<b>Desviación estándar</b>	0,34	1,00	-
<b>RLU/CO mínimo</b>	3,06	2,30	-
<b>RLU/CO máximo</b>	4,77	7,10	-

En otro estudio se realizó una comparación similar con muestras de pacientes simuladas y pareadas. Las muestras de pacientes en solución PreservCyt se obtuvieron de un centro externo a QIAGEN y se analizaron con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test para identificar las muestras positivas. Estas muestras positivas se combinaron para generar un total de 10 mezclas concentradas de muestras en PreservCyt. De estas mezclas se tomaron dos alícuotas, que se prepararon y procesaron para obtener concentrados de células. Los concentrados se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfatos (PBS). La alícuota A se preparó añadiendo el concentrado de células resuspendido a STM y la alícuota B, añadiendo el concentrado resuspendido a PreservCyt. Ambas alícuotas se analizaron con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test, con los resultados siguientes:

**Tabla 20.** Comparación de la sensibilidad analítica – prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test – Muestras pareadas de pacientes simuladas (mezcladas) en solución PreservCyt y en STM

	Prueba <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test		RLU/CO PC: STM
	STM	PreservCyt	
<b>Número de muestras</b>	10	10	-
<b>RLU/CO medio</b>	4,80	4,32	0,90
<b>Mediana de RLU/CO</b>	2,66	2,47	0,93
<b>Desviación estándar</b>	5,44	5,08	-
<b>RLU/CO mínimo</b>	1,16	1,02	-
<b>RLU/CO máximo</b>	18,97	17,26	-

## ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Se analizó una batería de bacterias, virus, plásmidos y material celular humano o productos sanguíneos que pueden encontrarse en el aparato anogenital femenino para determinar si se produciría reactividad cruzada con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Se analizaron todos los microorganismos a concentraciones de  $10^5$  y  $10^7$  microorganismos o CFU por ml, y siempre que fue posible con  $10^9$  microorganismos o CFU por ml, salvo que se indique lo contrario a continuación. El ADN purificado de virus y plásmidos se analizó en la variedad de concentraciones que se indica a continuación.

Bacterias analizadas:

---

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Neisseria caviae</i> (2 aislados) <sup>e</sup>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Neisseria cuniculi</i> (3 aislados) <sup>f</sup>
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Neisseria cinera</i> (6 aislados)
<i>Achromobacter xerosis</i>	<i>Neisseria flavescens</i> (4 aislados)
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Neisseria species g</i> *
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Neisseria lactamica</i> (6 aislados) <sup>d</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> (Grupo A, B, C, W135, Y)
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Neisseria mucosa</i> (6 aislados) <sup>d</sup>
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Neisseria polysaccharea</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i> (6 aislados)	<i>Neisseria sicca</i> (6 aislados)
<i>Candida albicans</i>	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Neisseria subflava biovar flava</i> (5 aislados)
<i>Chlamydia pneumoniae</i> <sup>b</sup>	<i>Neisseria subflava biovar perflava</i> (4 aislados) <sup>h</sup>
<i>Chlamydia psittaci</i> <sup>a</sup> (2 cepas)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> <sup>b</sup> (serotipo B, Ba, E, J, L3) <sup>c</sup>	<i>Peptostreptococcus asaccharalyticus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Peptostreptococcus productus</i>
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Escherichia coli</i> (aislado clínico) <sup>†</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>a</sup>
<i>Escherichia coli</i> (HB101) <sup>†</sup>	<i>Salmonella minnesota</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Gemella heamolysans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ProtA +)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> (Grp B)
<i>Kingella denitrificans</i> <sup>d</sup>	<i>Streptococcus pyogenes</i> (Grp A)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptomyces griseus</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Mobiluncus curtisii</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i> <sup>i</sup>
<i>Mobiluncus mulieris</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Moraxella lacunata</i>	
<i>Mycoplasma hominis</i>	
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	

---

### Concentraciones analizadas (microorganismos/ml o CFU/ml de la especie *Neisseria*):

<sup>a</sup>  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $9 \times 10^4$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^8$

<sup>b</sup>  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^7$  y  $2 \times 10^8$

<sup>c</sup>  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$

<sup>d</sup>  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^8$

<sup>e</sup>  $1,1 \times 10^6$ ;  $1,1 \times 10^7$ ;  $1,1 \times 10^8$

<sup>f</sup>  $9,7 \times 10^6$ ;  $9,7 \times 10^8$ ;  $9,7 \times 10^8$

<sup>g</sup>  $2 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^8$  y  $2 \times 10^9$

<sup>h</sup>  $4,8 \times 10^4$ ;  $4,8 \times 10^6$ ;  $4,8 \times 10^8$

<sup>i</sup>  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$

<sup>†</sup> Se analizó tanto la cepa de *E. coli* utilizada para cultivar plásmidos (HB101) como un aislado clínico de *E. coli*.

\* Cepa de *Neisseria* de ATCC que tiene características tanto de *Neisseria gonorrhoeae* como de *Neisseria meningitidis* (Nº de ATCC 43831).

Todas las bacterias distintas de la *Neisseria gonorrhoeae* que pueden encontrarse en el aparato urogenital, con la excepción de las tres cepas de *Neisseria* comensal y *Chlamydia psittaci*, resultaron negativas con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Solamente se observó una reactividad cruzada moderada que se interpretaría como un posible positivo con *Chlamydia psittaci* y *Neisseria lactamica*. Tal reactividad cruzada no debería influir en la interpretación de los resultados de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test de las muestras urogenitales. Los microorganismos que demostraron cierto grado de reactividad cruzada son:

	Interpretación	Concentración a la que se observó reactividad cruzada
<i>Chlamydia psittaci</i> (1 de 2 aislados)	Posible positivo*	1 x 10 <sup>7</sup> microorganismos/ml
<i>Neisseria lactamica</i> (1 de 6 aislados)	Posible positivo*	1 x 10 <sup>9</sup> CFU/ml
<i>Neisseria meningitidis</i> (Grupo Y, 1 de 2 aislados)	Positivo	1 x 10 <sup>7</sup> CFU/ml
<i>Neisseria mucosa</i> (1 de 6 aislados)	Positivo	5 x 10 <sup>5</sup> CFU/ml

\* RLU/CO dentro de la zona ambigua del ensayo de 1,00 a 2,50.

Las tres cepas de *Neisseria* comensal: *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis* y *Neisseria mucosa* se encuentran principalmente en la nasofaringe y en las vías respiratorias altas. Se aíslan raramente, o nunca, del aparato urogenital.<sup>13,14</sup> Es más, se determinó que el Grupo Y del aislado de *Neisseria meningitidis* de reactividad cruzada era un lipopolisacárido sin tipificación que se encuentra raramente en la población general. Puede detectarse *Chlamydia psittaci* en la piel de personas que trabajan con o manipulan especies aviarias, pero no se ha detectado en el aparato anogenital.<sup>15</sup>

Además, no todos los aislados de la cepa en particular produjeron reactividad cruzada con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test, disminuyendo la probabilidad de que se genere un resultado positivo falso con una muestra clínica si esa cepa está presente. Por ejemplo, cinco de los seis aislados de *Neisseria lactamica* o *Neisseria mucosa* analizados resultaron negativos con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test, así como una de las dos cepas de *Chlamydia psittaci*. Por tanto, no se espera que la reactividad cruzada de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test observada con las tres cepas de *Neisseria* comensal y *Chlamydia psittaci* lleven a una interpretación clínica falsa de un resultado positivo al analizar muestras anogenitales.

A continuación se indica una lista de ADN vírico, ADN plasmídico y material celular humano o productos sanguíneos analizados y las concentraciones que se analizaron:

Citomegalovirus <sup>a</sup>	Virus del papiloma humano tipo 6 <sup>f</sup>
Virus de Epstein-Barr <sup>b</sup>	Virus del papiloma humano tipo 11 <sup>f</sup>
Suero positivo para antígeno de superficie del virus de la hepatitis B <sup>c</sup>	Virus del papiloma humano tipo 16 <sup>f</sup>
Herpes simple I <sup>d</sup>	Virus del papiloma humano tipo 18 <sup>f</sup>
Herpes simple II <sup>d</sup>	pBR322 <sup>i</sup>
Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) <sup>b,g</sup>	SV40 <sup>i</sup>
ADN genómico humano <sup>e</sup>	PGEM <sup>®</sup> 3Z <sup>i</sup>
ADN placentario humano <sup>e</sup>	PGEM <sup>®</sup> 3Zf(-) <sup>i</sup>
Sangre completa humana <sup>h</sup>	Células epiteliales humanas <sup>k</sup>

Concentraciones analizadas:

- <sup>a</sup> 1 x 10<sup>5</sup>, 1 x 10<sup>7</sup>, 1 x 10<sup>9</sup> partículas víricas/ml  
<sup>b</sup> 1 x 10<sup>5</sup>, 1 x 10<sup>7</sup>, 1 x 10<sup>8</sup> partículas víricas/ml  
<sup>c</sup> 2,9 x 10<sup>8</sup>, 1,1 x 10<sup>9</sup> partículas víricas/ml  
<sup>d</sup> 6,1 x 10<sup>6</sup>, 2,4 x 10<sup>7</sup> partículas víricas/ml  
<sup>e</sup> 2,7 x 10<sup>2</sup>, 1,1 x 10<sup>3</sup> copias/ml  
<sup>f</sup> 1,1 x 10<sup>8</sup>, 4,6 x 10<sup>8</sup> partículas víricas/ml  
<sup>g</sup> 2 x 10<sup>6</sup>, 2 x 10<sup>7</sup>, 2 x 10<sup>8</sup> partículas víricas/ml  
<sup>h</sup> 5%, 10%, 50%  
<sup>i</sup> 2,1 x 10<sup>8</sup>, 8,3 x 10<sup>8</sup> copias/ml  
<sup>j</sup> 1 ng/ml, 4 ng/ml  
<sup>k</sup> 1 x 10<sup>5</sup>, 1 x 10<sup>6</sup>, 1 x 10<sup>7</sup> células/ml

Ninguno de los virus analizados mostró reactividad cruzada con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test; sin embargo, se observó reactividad cruzada con los plásmidos pBR322, pGEM<sup>®</sup> 3Z y pGEM<sup>®</sup> 3Zf(-). Las demás preparaciones de ADN analizadas, incluido ADN humano, fueron negativas. La sangre y las células epiteliales humanas no mostraron reactividad cruzada con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Es previsible que se produzca reactividad cruzada entre el plásmido pBR322 y la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test debido al modo en que crea la sonda de GC. La presencia de secuencias homólogas a pBR322 se ha descrito en muestras genitales humanas y podrían producir resultados positivos falsos en presencia de niveles elevados de plásmido bacteriano. Sin embargo, ninguna muestra de las 103 analizadas en un estudio clínico multicéntrico en EE.UU. que resultaron positivas para *Neisseria gonorrhoeae* con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test fue identificada como positiva falsa debido a reactividad cruzada por secuencias de pBR322. Por tanto, la probabilidad de obtener un resultado falso positivo con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test debido a la reactividad cruzada con secuencias homólogas a pBR322 parece ser baja. Aunque la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test podría mostrar reactividad cruzada con *Chlamydia psittaci*, pBR322, pGEM y varias especies de *Neisseria* comensal, la probabilidad de que estos microorganismos influyan en la interpretación de la prueba es remota, como demuestran los resultados del estudio clínico multicéntrico.

### HOMOLOGÍA DE LAS SONDAS CON TODO EL ADN PLASMÍDICO Y GENÓMICO

Las sondas genómicas son homólogas al 0,5% aproximadamente del genoma de *Neisseria gonorrhoeae*. A continuación se desglosa cada sonda de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test:

Sonda	Tipo	Tamaño aproximado de la inserción (bp)	% de genoma
pGC1	Genómico	6.400	0,34%
pGC2		3.300	0,17%
		9.700 (Total)	0,51%
pGC3	Plásmido críptico	4.200	N/A*

\*Esto representa la secuencia completa de la sonda.

## EFEECTO DE LA SANGRE Y OTRAS SUSTANCIAS SOBRE LAS MUESTRAS EN STM

Se evaluó el efecto de la sangre y de otras sustancias definidas que pudieran interferir en la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Se añadió sangre completa y un producto de marca para higiene vaginal, cremas antimicóticas y geles anticonceptivos (agentes que se pueden encontrar con frecuencia en las muestras cervicouterinas) a muestras positivas y negativas en STM (muestras clínicas mezcladas), en las concentraciones que suelen encontrarse en las muestras cervicouterinas (véase la Tabla 21). No se obtuvieron resultados positivos falsos con ninguno de los cuatro agentes a ninguna concentración. Un estudio de sustancias no definidas presentes en una población de 100 muestras clínicas negativas mostró que las sustancias no definidas no parecen inhibir la generación de una señal positiva en la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test en comparación con la señal generada cuando se realiza la prueba para detectar microorganismos de GC en STM.

**Tabla 21.** Efecto de otras sustancias en los resultados de la prueba.

		Resultado de la prueba <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test				Medios de transporte de muestras (STM)	
Otras sustancias	Conc.	Muestras clínicas mezcladas		Positivo*		Positivo*	
		Negativo	Observado	RLU/CO	Observado	RLU/CO	Observado
Ninguna (control)		0,15	NA	3,41	NA	2,70	NA
Sangre	1%	0,21	+37%	3,17	-7%	3,21	+19%
	5%	0,19	+22%	3,11	-9%	3,05	+13%
Prod. higiene vaginal	1%	0,21	+37%	3,48	+2%	2,80	+4%
	5%	0,18	+20%	3,47	+2%	3,20	+18%
Crema antimicótica	1%	0,19	+20%	3,60	+5%	2,95	+9%
	5%	0,20	+30%	3,52	+3%	3,09	+14%
Gel anticonceptivo	1%	0,08	-54%	3,18	-7%	2,98	+10%
	5%	0,08	-54%	3,24	+5%	3,10	+15%

\* Añadidos  $10^3$  CFU/ml del auxotipo 1 del microorganismo *Neisseria gonorrhoeae*.

## EFEECTO DE LA SANGRE Y OTRAS SUSTANCIAS SOBRE LAS MUESTRAS EN LA SOLUCIÓN PRESERVCYT

Como se ha indicado en el apartado anterior para las muestras en STM, no se evaluaron otras sustancias específicas que pudieran causar interferencias con las muestras en solución PreservCyt. No obstante, no es previsible que las muestras en solución PreservCyt presenten un perfil de interferencias distinto del de las muestras en STM, ya que el lugar anatómico de recogida de las muestras endocervicales es idéntico para ambos tipos de muestras y además, las muestras en solución PreservCyt se someten a un procedimiento de conversión (detallado en las instrucciones de uso del Kit de conversión de muestras *digene* HC2) que las deja con una composición similar a la de las muestras en STM.

Pueden quedar restos mínimos del tampón de conversión de muestras (SCB)<sup>1</sup> en las muestras en solución PreservCyt totalmente convertidas. Por tanto, se llevó a cabo un estudio analítico para verificar la eficacia analítica de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test en presencia de distintas cantidades de SCB. Se prepararon concentraciones variables de ADN de GC de plásmido en STM. Se añadió a cada muestra un volumen adicional de SCB y se analizaron tres alícuotas de cada muestra para obtener un valor medio de RLU/CO de cada muestra en presencia de solución PreservCyt o SCB. La comparación de estos valores medios de RLU/CO de cada muestra con los valores medios de RLU/CO de cada muestra control en STM no produjo ningún resultado falso positivo ni negativo.

<sup>1</sup> El tampón de conversión de muestras es una solución tamponada con eosina Y y 0,05% (p/v) de azida sódica, necesaria para la conversión de una muestra en PreservCyt. Véanse los detalles específicos en las instrucciones de uso del Kit de conversión de muestras *digene* HC2 de QIAGEN .

## PRECISIÓN EN EL VALOR DE CORTE DE LA PRUEBA *digene* HC2 GC-ID DNA TEST CON MUESTRAS CLÍNICAS RECOGIDAS EN STM

En un estudio se determinó la reproducibilidad de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test con muestras clínicas recogidas en STM utilizando 30 mezclas clínicas (15 positivas y 15 negativas), preparadas combinando muestras previamente desnaturalizadas y analizadas recogidas con escobillón cervical y colocadas en STM. Las muestras se analizaron en réplicas de cuatro durante 5 días, obteniéndose un total de 20 réplicas por muestra. Los análisis se realizaron con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Se calcularon el valor promedio de RLU/CO, los intervalos de confianza del 95% sobre el promedio (IC del 95%) y el porcentaje de resultados positivos para cada muestra durante cinco días, indicándose en la Tabla 22.

**Tabla 22.** Promedio del RLU/CO con intervalos de confianza y porcentaje de positivos de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test (orden decreciente por promedio de RLU/CO).

Nº	RLU/CO	IC 95%	% de positivos
1	1,92	1,31-2,00	100 (20/20)
2	1,22	1,16-1,29	100 (20/20)
3	1,21	1,16-1,25	100 (20/20)
4	1,21	1,16-1,25	90 (18/20)
5	1,17	1,03-1,28	100 (20/20)
6	1,14	1,09-1,18	90 (18/20)
7	1,08	1,04-1,12	80 (16/20)
8	1,05	1,00-1,09	70 (14/20)
9	1,05	1,01-1,09	70 (14/20)
10	1,02	0,98-1,06	65 (13/20)
11	1,00	0,96-1,03	65 (13/20)
12	1,00	0,97-1,03	45 (9/20)
13	1,00	0,96-1,03	40 (8/20)
14	0,98	0,95-1,02	45 (9/20)
15	0,91	0,89-0,94	10 (2/20)
16	0,90	0,87-0,92	0 (0/20)
17	0,87	0,84-0,91	5 (1/20)
18	0,86	0,83-0,89	0 (0/20)
19	0,84	0,82-0,85	0 (0/20)
20	0,82	0,79-0,85	0 (0/20)
21	0,79	0,75-0,82	0 (0/20)
22	0,77	0,78-0,80	0 (0/20)
23	0,76	0,74-0,79	0 (0/20)
24	0,75	0,78-0,79	0 (0/20)
25	0,73	0,70-0,75	0 (0/20)
26	0,56	0,54-0,59	0 (0/20)
27	0,56	0,54-0,59	0 (0/20)
28	0,56	0,53-0,59	0 (0/20)
29	0,54	0,52-0,56	0 (0/20)
30	0,12	0,11-0,13	0 (0/20)

Las muestras con un promedio de RLU/CO del 20% o más por encima del valor de corte fueron positivas o posibles positivas el 97% de las veces, mientras que las muestras con un promedio de RLU/CO del 20% o más por debajo del valor de corte fueron negativas el 100% de las veces. Estos resultados indican que las muestras un 20% o más alejadas del valor de corte producirán previsiblemente resultados uniformes con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test.

Las muestras con valores cerca del valor de corte del ensayo siguieron siendo en su mayoría positivas o negativas; aquellas que estaban por encima del valor de corte del ensayo, pero dentro del 20% de éste, siguieron siendo positivas o posibles positivas el 69,4% de las veces. Aquellas muestras por debajo del valor de corte, pero dentro del 20% de éste, siguieron siendo negativas el 91,4% de las veces.

Estos resultados demuestran que la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test proporciona resultados reproducibles con muestras clínicas recogidas en STM cuyos valores de RLU/CO estén dentro del 20% del valor de corte del ensayo.

## INFORMACIÓN HISTÓRICA

Anteriormente se utilizaba el luminómetro Dynex modelo MLX, además del DML 2000, para generar datos y determinar la eficacia de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test. El luminómetro MLX ya no está disponible, utilizándose todavía solamente el DML 2000 para generar resultados. Los siguientes datos se generaron a partir del ensayo clínico multicéntrico para determinar la reproducibilidad del calibrador positivo y del calibrador negativo, facilitándose a continuación como información histórica.

Para determinar la reproducibilidad del calibrador positivo y del calibrador negativo, y calcular la frecuencia con la que será necesario repetir manualmente los cálculos, se recopiló los resultados de evaluaciones clínicas en las que se analizaron 79 ensayos con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test (Tabla 23). Los resultados mostraron que el %CV medio de estos 79 ensayos fue del 5,79%, no teniendo ningún ensayo valores promedio del calibrador negativo superiores a 150 RLU. Considerando las 3 réplicas del calibrador positivo por cada ensayo, se observó una reproducibilidad del calibrador superior al 20% CV solo en 1 de los 79 ensayos (1,3%) y se recalculó el %CV. Tras el recálculo, el %CV de los ensayos siguió siendo inferior al 15%, lo que indica que todos los ensayos fueron válidos.

**Tabla 23.** Eficacia del calibrador positivo y el calibrador negativo. Datos combinados del ensayo clínico multicéntrico y del estudio de precisión. (n = 79 ensayos)

Instrumento	Nº de ensayos	Promedio de cocientes S/N	Tipo de calibrador	Promedio de los promedios calculados (RLU)		Promedio de los %CV calculados	
				Tres réplicas	Ajustado para valores atípicos	Tres réplicas	Ajustado para valores atípicos
DML 2000	9	7,71	Negativo	40,300	34,470	18,960	12,240
			Positivo	292,370	292,370	6,670	6,670
MLX*	70	4,52	Negativo	0,076	0,070	13,830	12,360
			Positivo	0,292	0,292	5,674	5,674

\* Ha dejado de estar disponible.

## EQUIVALENCIA ENTRE LAS MUESTRAS EN STM Y EN SOLUCIÓN PRESERVCYT

La equivalencia entre las muestras en STM y en solución PreservCyt se investigó en una evaluación clínica de 1252 muestras cervicouterinas pareadas. Se procesó una muestra en solución PreservCyt conforme a las instrucciones de uso del Kit de conversión de muestras *digene* HC2 y se analizó con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test junto con una muestra pareada en STM. Los resultados de esta evaluación se muestran en la tabla 24. El rendimiento clínico fue determinado con muestras de PreservCyt Solution con un volumen residual superior a los 6,5 ml. Las pruebas realizadas con muestras cuyos volúmenes residuales estén entre los 4,0 y los 6,5 ml deben ser validadas por un laboratorio.

**Tabla 24.** Resumen de los datos estadísticos para la concordancia de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test entre las muestras cervicouterinas pareadas recogidas en STM y en solución PreservCyt.

Cohorte	Kappa IC 95%	Concordancia positiva (n/N) IC 95%	Concordancia negativa (n/N) IC 95%	Concordancia total (n/N) IC 95%
Exclusión de datos en zona ambigua	0,96	98,00 (49/50)	99,75 (1181/1184)	99,68 (1230/1234)
	0,92; 0,99	89,35; 99,95	99,26; 99,95	99,17; 99,91
Algoritmo de repetición de la prueba en zona ambigua*	0,93	91,80 (56/61)	99,75 (1188/1191)	99,36 (1244/1252)
	0,88; 0,98	81,90; 97,28	99,27; 99,95	98,74; 99,72

\*Las muestras en el intervalo de 1,0 a 2,5 RLU/CO se analizaron de nuevo por duplicado. Después, se determinó la clasificación de las muestras utilizando una regla de dos de tres.

La reproducibilidad de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test se determinó como parte de una evaluación clínica para demostrar que se obtienen resultados equivalentes con la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test cuando se analiza un panel de 20 muestras en solución PreservCyt durante 3 días en 3 laboratorios distintos. Los resultados de este estudio de reproducibilidad se muestran en la tabla 25 a continuación.

**Tabla 25.** Porcentaje de concordancia de la prueba *digene* HC2 GC-ID DNA Test (por centro).

Centro	Observado frente a previsto*	% de concordancia (IC 95%)
1	60/60	100 (94,04; 100)
2	60/60	100 (94,04; 100)
3	59/60	98,33 (91,06; 99,96)
<b>Todos los centros combinados</b>	179/180	99,44 (96,94; 99,99)

\*20 miembros x 3 días x 3 centros.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Roongpisuthipong A, Lewis JS, Kraus SJ, Morse SA. Gonococcal urethritis diagnosed from enzyme immunoassay of urine sediment. *Sex Transm Dis* 1988;15(4):192-5.
2. Schachter J, McCormack WM, Smith RF, Parks RM, Bailey R, Ohlin AC. Enzyme immunoassay for diagnosis of gonorrhoea. *J Clin Microbiol* 1984;19(1):57-9.
3. Knapp JS, Rice RJ. *Neisseria* and *Branhamella*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 6 ed. Washington,DC: ASM Press; 1995. p 324-40.
4. Kingsbury DT. Estimate of the genome size of various microorganisms. *J Bacteriol* 1969 Jun;98(3):1400-1.
5. U.S.Department of Labor OSHA. Occupational exposure to bloodborne pathogens; final rule. *Federal Register* 1991;56(235):64175-82.
6. Centers for Disease Control, National Institutes of Health. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 3rd ed. Washington: U.S. Government Printing Office; 1993.
7. World Health Organization. *Laboratory biosafety manual*. Geneva: World Health Organization; 1993.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Protection of laboratory workers from instrument biohazards and infectious disease transmitted by blood, body fluids, and tissue; approved guideline*. Wayne,PA: NCCLS; 1997.
9. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987 Aug;36(suppl. 2S):3S-17S.
10. Sehulster LM, Hollinger FB, Dreesman GR, Melnick JL. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1981 Nov;42(5):762-7.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clinical laboratory waste management: approved guideline*. Villanova,PA: NCCLS; 1993. 1;-29-42 p.
12. U.S.Environmental Protection Agency. *EPA guide for infectious waste management*. Washington,DC: U.S. Environmental Protection Agency; 1986. 1-5-5, R1-R3, A1-A24 p.
13. [Anonymous]. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
14. [Anonymous]. *Textbook of diagnostic microbiology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1995.
15. Schachter J. Chlamydiae. in: Balows A, Hausler WJ, Jr., Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington,D.C.: American Society for Microbiology; 1991. p 1045-53.

## GUÍA PARA LA RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

<i>digene</i> HC2 GC-ID DNA TEST		
OBSERVACIÓN	CAUSAS PROBABLES	SOLUCIONES
<b>Cambio de color incorrecto o no se observa ningún cambio de color durante la desnaturalización.</b>	No se añadió el reactivo de desnaturalización o no se preparó correctamente.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Asegúrese de que el reactivo de desnaturalización contenga el indicador y tenga un color púrpura oscuro.</li> <li>2. Verifique que se haya añadido el reactivo de desnaturalización a la muestra, midiendo el volumen de la muestra (previsiblemente 1,5 ml). Si el volumen indica que no se añadió el reactivo de desnaturalización, añádale según corresponda, mezcle y continúe con el ensayo si ahora ya se observa el cambio de color apropiado.</li> </ol>
	La muestra con sangre puede enmascarar el cambio de color.	No espere que se produzca exactamente el cambio de color indicado en este tipo de muestras; esto no debe influir negativamente en los resultados de la prueba del ensayo.
	El pH de la muestra puede ser inusualmente ácido.	La muestra puede ser inusualmente ácida, por lo que no se producirá el cambio de color previsto. Recoja una muestra nueva <u>antes</u> de aplicar ácido acético al cuello uterino, ya que un pH de la muestra inadecuado influirá negativamente en los resultados de la prueba.
<b>Los controles de calidad producen un resultado incorrecto.</b>	Se ha elegido un protocolo incorrecto en el software para la prueba.	Si el protocolo del software es incorrecto para la prueba que se va a realizar, debe volverse a leer la placa con el protocolo correcto antes de que hayan transcurrido 30 minutos de la adición del reactivo de detección 2.
	Colocación invertida de los controles de calidad de CT y GC en la placa.	Vuelva a analizar las muestras.
<b>Se observó un cambio de color incorrecto durante la hibridación.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No se mezcló correctamente la mezcla de la sonda con el calibrador, el control de calidad y/o las muestras desnaturalizadas.</li> <li>No se añadió mezcla de la sonda.</li> <li>Se añadió un volumen incorrecto de reactivo.</li> </ul>	Agite la microplaca de hibridación durante 2 minutos más. Si aún quedan pocillos de color púrpura o gris, añada 25 µl más de mezcla de la sonda y mezcle bien. Si después de añadir las sondas y volver a mezclar no se produce el cambio de color adecuado y la muestra no contiene sangre ni otros materiales, vuelva a analizar la muestra.
	La muestra con sangre puede enmascarar el cambio de color.	No espere que se produzca exactamente el cambio de color indicado en este tipo de muestras; esto no debe influir negativamente en los resultados de la prueba del ensayo.
	La muestra tenía < 1000 µl de <i>digene</i> Specimen Transport Medium (STM).	Compruebe el volumen de la muestra original. El volumen debe ser de 1425 µl ± 20 µl (después de quitar 75 µl). Si el volumen es < 1405 µl, la muestra original contenía < 1000 µl de STM. Obtenga una nueva muestra.
<b>El ensayo no cumple los criterios de verificación de la calibración. No se observa ninguna señal en el calibrador positivo, los controles de calidad ni en las muestras.</b>	No se añadió la sonda al diluyente de sonda.	Prepare la mezcla de la sonda para GC según se describe en el apartado <i>Preparación y conservación de reactivos</i> de estas instrucciones de uso. Mezcle perfectamente. Etiquete el tubo adecuadamente. Repita el ensayo con mezcla de la sonda recién preparada.
	La sonda se contaminó con RNasa durante la preparación.	Utilice puntas de pipeta con filtro para pipetear la sonda y póngase guantes sin talco. Diluya la sonda en un recipiente estéril. Use únicamente depósitos de reactivo desechables nuevos.
	No se mezcló correctamente la mezcla de la sonda con el diluyente de sonda.	Después de añadir la sonda al diluyente de sonda, mezcle perfectamente, agitando en el Vortex a alta velocidad durante al menos 5 segundos. Se debe formar un remolino visible.

**digene HC2 GC-ID DNA TEST**

OBSERVACIÓN	CAUSAS PROBABLES	SOLUCIONES
	No se mezcló correctamente la sonda con la muestra desnaturalizada.	Después de añadir la mezcla de la sonda a la muestra desnaturalizada, cubra la microplaca de hibridación y agítela en el agitador rotatorio I a $1100 \pm 100$ rpm durante $3 \pm 2$ minutos, según se describe en el paso 6 del apartado Hibridación en Procedimiento de la técnica de estas instrucciones de uso. Compruebe que el color cambia de púrpura a amarillo en todos los pocillos.
	Tiempo o temperatura incorrectos durante el paso de hibridación.	Hibride durante $60 \pm 5$ minutos a $65 \pm 2$ °C según se describe en el paso 7 del apartado Hibridación en Procedimiento de la técnica de estas instrucciones de uso. Asegúrese de que el incubador de placas I esté a la temperatura correcta para calentar las muestras y de que se haya precalentado durante 1 hora antes de utilizarlo.
	No se mezcló correctamente durante el paso de captura.	Agite en el agitador rotatorio I a $1100 \pm 100$ rpm durante $60 \pm 5$ minutos a una temperatura entre 20 y 25 °C según se describe en el paso 7 del apartado Captura de los híbridos en Procedimiento de la técnica de estas instrucciones de uso. Verifique la velocidad del agitador rotatorio I mediante su calibración, tal como se describe en el apartado de calibración de la velocidad del agitador del Manual de usuario del agitador rotatorio I.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>No se añadió la cantidad correcta del reactivo de detección 1.</li> <li>No se incubó durante el tiempo especificado.</li> </ul>	Con una pipeta de 8 canales, añada 75 µl del reactivo de detección 1 a cada pocillo. Incube a una temperatura entre 20 y 25 °C durante 30 a 45 minutos.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>No se añadió la cantidad correcta del reactivo de detección 2.</li> <li>No se incubó durante el tiempo especificado.</li> </ul>	Con una pipeta de 8 canales, añada 75 µl del reactivo de detección 2 a cada pocillo. Incube a una temperatura entre 20 y 25 °C durante 15 a 30 minutos.
	El luminómetro no funciona bien o no está programado correctamente.	Consulte las instrucciones detalladas en los apartados de mantenimiento/servicio técnico y de resolución de problemas de la Guía de usuario correspondiente del software de análisis de ensayos <i>digene</i> o llame al Servicio Técnico de QIAGEN.
<b>Valores de RLU elevados en los calibradores, en los controles y/o en las muestras (<math>\geq 150</math> RLU en muchos o en todos los pocillos). Es posible que el ensayo no cumpla los criterios de validación.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No se añadió el reactivo de desnaturalización, se añadió un volumen de reactivo incorrecto o no se mezcló correctamente el reactivo de desnaturalización con los calibradores, los controles de calidad o las muestras.</li> <li>Temperatura del baño de agua y nivel del agua inadecuados.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Compruebe que la pipeta de repetición está dispensando la cantidad correcta antes de añadir el reactivo de desnaturalización. Es fundamental que se utilicen pipetas calibradas. Añada a cada tubo la mitad del volumen del reactivo de desnaturalización y mezcle bien. Para evitar obtener resultados positivos falsos, asegúrese de que el líquido lava toda la superficie interior del tubo (invierta el tubo una vez si se está mezclando manualmente). El calibrador, los controles de calidad y las muestras deben adquirir un color púrpura después de añadir el reactivo de desnaturalización. Compruebe la calibración de la velocidad del agitador de tubos para múltiples muestras Vortexer 2.</li> <li>Compruebe el nivel del agua y la temperatura del baño.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hay una fuga de luz en el luminómetro.</li> <li>La junta está rota.</li> <li>La puerta no está herméticamente cerrada.</li> </ul>	Realice una lectura de fondo (medición de datos sin procesar) del luminómetro leyendo una microplaca vacía. Una lectura superior a 50 RLU indica una posible fuga de luz. Consulte las instrucciones detalladas en los apartados de mantenimiento/servicio técnico y de resolución de problemas de la Guía de usuario correspondiente del software de análisis de ensayos <i>digene</i> o llame al Servicio Técnico de QIAGEN.
	Contaminación del reactivo de detección 2 o de los pocillos de la microplaca de captura con el reactivo de detección 1 o con fosfatasa alcalina exógena.	Consulte el apartado "Control de la contaminación" en esta sección de resolución de problemas.

**digene HC2 GC-ID DNA TEST**

OBSERVACIÓN	CAUSAS PROBABLES	SOLUCIONES
	El tampón de lavado está contaminado.	Consulte el apartado "Control de la contaminación" en esta sección de resolución de problemas.
	El lavador automático de placas está contaminado.	Consulte el apartado "Control de la contaminación" en esta sección de resolución de problemas.
	Los pocillos de la microplaca de captura no se lavaron correctamente después de la incubación con el reactivo de detección 1.	Lave a fondo los pocillos de la microplaca 6 veces con el tampón de lavado, llenándolos cada vez hasta que se desborden o utilizando el lavador automático de placas. No deben quedar restos visibles de líquido rosa en los pocillos después del lavado. Consulte las instrucciones sobre cómo comprobar la existencia de contaminación o detectar un funcionamiento incorrecto en la sección de resolución de problemas del <i>Manual de usuario del lavador automático de placas</i> .
	Los pocillos de la microplaca están contaminados con el reactivo de detección 1.	Asegúrese de que todas las superficies de trabajo estén limpias y secas. Tenga cuidado al utilizar el reactivo de detección 1. Evite la formación de aerosoles.
	Se ha secado la solución de hibridación en la misma zona de las toallitas Kimtowels o servilletas de papel equivalentes con bajo contenido en pelusa.	No vuelva a secar en la misma zona de las toallitas Kimtowels o servilletas de papel equivalentes con bajo contenido en pelusa.
	Se han utilizado toallitas incorrectas para secar.	Utilice toallitas Kimtowels o servilletas de papel equivalentes con bajo contenido en pelusa para secar.
	Se utilizó el control de calidad de GC como calibrador positivo. Falló la validación del ensayo.	Compruebe la colocación correcta de los calibradores y los controles de calidad.
<b>Cocientes PC/NC bajos o número elevado de muestras positivas bajas (&gt;20% de las muestras totales) con un cociente RLU/CO &lt; 2,0. Es posible que el ensayo no cumpla los criterios de validación.</b>	Las muestras no se prepararon correctamente.	Añada el volumen apropiado de reactivo de desnaturalización y mezcle perfectamente agitando en un Vortex. Para evitar obtener resultados positivos falsos, asegúrese de que el líquido lava toda la superficie interior del tubo agitándolo con el método del agitador de tubos para múltiples muestras Vortexer 2 durante 5 segundos (si utiliza el método de agitación manual, agite durante 5 segundos como mínimo e invierta el tubo una vez). Se debe observar un cambio de color evidente de púrpura claro a púrpura oscuro. Incube durante 45 ± 5 minutos a 65 ± 2 °C. Cuando se utilicen muestras en solución PreservCyt, es probable que estos híbridos estén presentes en las paredes interiores del tubo de desnaturalización de muestras. Con el fin de evitar traspasar este material celular no desnaturalizado, la punta de la micropipeta no debe tocar las paredes del tubo de desnaturalización de muestras durante la transferencia de la muestra desnaturalizada al microtubo o pocillo de la microplaca utilizado para la hibridación de la sonda de VPH. Véase la información detallada sobre el procedimiento en las instrucciones de uso del Kit de conversión de muestras <i>digene</i> HC2.
	La sonda no se mezcló adecuadamente o no se añadió la cantidad suficiente de sonda a los ensayos.	Prepare la mezcla de la sonda según las indicaciones. Mezcle perfectamente agitando en un Vortex y asegúrese de que se forma un remolino visible. La mezcla de la sonda debe añadirse a los pocillos con una pipeta multicanal o de repetición para garantizar la dispensación del volumen exacto.
	Se añadió un volumen inadecuado de mezcla de la sonda a cada pocillo de la microplaca de hibridación.	Compruebe que la pipeta de 8 canales dispensa el volumen correcto antes de añadir la mezcla de la sonda a la microplaca de hibridación. Se deben añadir 25 µl de mezcla de la sonda a la muestra desnaturalizada en el fondo de cada micropocillo. Compruebe que la micropipeta de 8 canales dispensa un volumen exacto antes de añadir la mezcla de la sonda a los pocillos de hibridación. El color debe cambiar de púrpura oscuro a amarillo al añadir y mezclar perfectamente la mezcla de la sonda.

**digene HC2 GC-ID DNA TEST**

OBSERVACIÓN	CAUSAS PROBABLES	SOLUCIONES
	Pérdida de actividad del reactivo de detección 1.	Conserve el reactivo de detección 1 a una temperatura de 2 a 8 °C. Úselo antes de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja exterior del kit.
	Captura insuficiente de híbridos de ARN-ADN.	El paso de captura debe llevarse a cabo con el agitador rotatorio I a 1100 ± 100 rpm. Verifique la velocidad de agitación tal como se describe en el apartado de calibración de la velocidad del agitador del Manual de usuario del agitador rotatorio I.
	Lavado inadecuado.	Lave exhaustivamente los pocillos de la microplaca 6 veces con el tampón de lavado, llenándolos cada vez hasta que se desborden o utilizando el lavador automático de placas.
	El tampón de lavado está contaminado.	Consulte el apartado "Control de la contaminación" en esta sección de resolución de problemas.
<b>Series de muestras positivas con valores de RLU aproximadamente iguales.</b>	Contaminación de los pocillos de la microplaca de captura durante la manipulación del ensayo.	Tape los pocillos de la microplaca de captura durante todas las incubaciones. Durante el ensayo, procure que los pocillos de la microplaca no estén expuestos a contaminación por aerosoles. Utilice guantes sin talco durante la manipulación.
	Contaminación del reactivo de detección 2.	Tenga cuidado de no contaminar la solución madre al pipetear el reactivo de detección 2 en los pocillos de la microplaca de captura. Evite la contaminación del reactivo de detección 2 con aerosoles del reactivo de detección 1, con polvo del laboratorio, etc.
	Funcionamiento incorrecto del lavador automático de placas.	Consulte el apartado "Control de la contaminación" en esta sección de resolución de problemas o consulte las instrucciones sobre cómo comprobar la existencia de contaminación o identificar un funcionamiento incorrecto en la sección de resolución de problemas del <i>Manual de usuario del lavador automático de placas</i> .
<b>Amplio %CV entre réplicas.</b>	Pipeteo inexacto (i.e., burbujas de aire, pipeta sin calibrar).	Revise la pipeta para asegurarse de que dispensa volúmenes reproducibles. Calibre las pipetas de forma rutinaria.
	Mezclado insuficiente.	Mezcle perfectamente en todos los pasos. Agite antes y después de la incubación de desnaturalización. Asegúrese de que se forma un remolino visible.
	Traspaso incompleto de líquido de los pocillos de la microplaca de hibridación a los de la microplaca de captura.	Tenga cuidado durante el traspaso de la microplaca de hibridación a la microplaca de captura para asegurarse de que se traspasan volúmenes reproducibles.
	Condiciones de lavado incorrectas.	Lave exhaustivamente los pocillos de la microplaca 6 veces con el tampón de lavado, llenándolos cada vez hasta que se desborden, o utilizando el lavador automático de placas y los protocolos adecuados para el lavador automático de placas.
	Los pocillos de la microplaca están contaminados con el reactivo de detección 1.	Asegúrese de que todas las superficies de trabajo estén limpias y secas. Tenga cuidado al utilizar el reactivo de detección 1. Evite la formación de aerosoles.
	Contaminación de la punta de la pipeta con material no desnaturalizado durante la transferencia de la muestra desnaturalizada al pocillo de la microplaca utilizado para la hibridación de la sonda de GC.	El paso de desnaturalización del procedimiento de procesamiento de las muestras debe llevarse a cabo como se indica en estas instrucciones. Una técnica incorrecta en la agitación de las muestras, o la inversión y agitación de los tubos puede ocasionar la desnaturalización incompleta de los híbridos no específicos de ARN:ADN endógenos de las muestras endocervicales. Cuando se utilicen muestras en solución PreservCyt, es probable que estos híbridos estén presentes en las paredes interiores del tubo de conversión de muestras. Con el fin de evitar traspasar este material celular no desnaturalizado, la punta de la pipeta no debe tocar las paredes del tubo de conversión de muestras durante la transferencia de la muestra desnaturalizada al pocillo de la microplaca utilizado para la hibridación de la sonda de GC.

**digene HC2 GC-ID DNA TEST**

OBSERVACIÓN	CAUSAS PROBABLES	SOLUCIONES
	Se han secado varias filas en la misma zona de las toallitas Kimtowels.	No vuelva a secar en la misma zona de las toallitas Kimtowels.
<b>Se obtienen resultados positivos falsos con muestras negativas conocidas.</b>	El reactivo de detección 2 está contaminado.	Tenga cuidado de no causar contaminación cruzada en las muestras al añadir reactivo de detección 2 entre muestras. Si sólo necesita utilizar parte de un kit, añada el volumen necesario para el ensayo a un depósito de reactivo limpio antes de llenar la pipeta.
	Los pocillos de la microplaca están contaminados con el reactivo de detección 1.	Lave perfectamente los pocillos de la microplaca 6 veces con el tampón de lavado, llenándolos cada vez hasta que se desborden o utilizando el lavador automático de placas. No deben quedar restos de líquido rosa visibles en los pocillos de la microplaca después del lavado.
	Contaminación de la punta de la pipeta con material no desnaturalizado durante la transferencia de la muestra desnaturalizada al pocillo de la microplaca utilizado para la hibridación de la sonda de GC.	El paso de desnaturalización del procedimiento de procesamiento de las muestras debe llevarse a cabo como se indica en estas instrucciones. Una técnica incorrecta en la agitación de las muestras, o la inversión y agitación de los tubos puede ocasionar la desnaturalización incompleta de los híbridos no específicos de ARN:ADN endógenos de las muestras endocervicales. Cuando se utilicen muestras en solución PreservCyt, es probable que estos híbridos estén presentes en las paredes interiores del tubo de conversión de muestras. Con el fin de evitar traspasar este material celular no desnaturalizado, la punta de la pipeta no debe tocar las paredes del tubo de conversión de muestras durante la transferencia de la muestra desnaturalizada al pocillo de la microplaca utilizado para la hibridación de la sonda de GC.
	Las muestras no se prepararon correctamente.	Añada el volumen apropiado de reactivo de desnaturalización y mezcle perfectamente agitando en un Vortex. Para evitar obtener resultados falsos positivos, asegúrese de que el líquido lava toda la superficie interior del tubo agitándolo con el método del agitador de tubos para múltiples muestras Vortexer 2 durante 5 segundos como mínimo (si utiliza el método de agitación manual, invierta el tubo una vez). Se debe observar un cambio de color evidente de púrpura claro a púrpura oscuro. Incube durante $45 \pm 5$ minutos a $65 \pm 2$ °C. Cuando se utilicen muestras en solución PreservCyt, es probable que estos híbridos estén presentes en las paredes interiores del tubo de desnaturalización de muestras. Con el fin de evitar traspasar este material celular no desnaturalizado, la punta de la micropipeta no debe tocar las paredes del tubo de desnaturalización de muestras durante la transferencia de la muestra desnaturalizada al microtubo o pocillo de la microplaca utilizado para la hibridación de la sonda de VPH. Véase la información detallada sobre el procedimiento en las instrucciones de uso del Kit de conversión de muestras <i>digene</i> HC2 .
	Condiciones de lavado incorrectas.	Lave exhaustivamente los pocillos de la microplaca 6 veces con el tampón de lavado, llenándolos cada vez hasta que se desborden, o utilizando el lavador automático de placas y los protocolos adecuados para el lavador automático de placas.
<b>Valores de RLU elevados (&gt; 150 RLU) para el calibrador negativo. El resto de los resultados son tal como se esperaban.</b>	El reactivo de detección 2 se incubó a una temperatura superior a una temperatura entre 20 y 25 °C.	La prueba no es válida debido a valores elevados del control negativo. Vuelva a realizar la prueba, asegurándose de que en los pasos de captura y detección la incubación se realice a una temperatura entre 20 y 25 °C.
	El reactivo de detección 2 se incubó durante más de 30 minutos.	Lea la placa después de 15 minutos de incubación (en ningún caso después de 30 minutos de incubación) a una temperatura entre 20 y 25 °C.
	El reactivo de detección 2 o el tampón de lavado estaban contaminados con fosfatasa alcalina o con el reactivo de detección 1.	Consulte el apartado "Control de la contaminación" en esta sección de resolución de problemas.

## CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN

Reactivo evaluado	Procedimiento de control de contaminación	Interpretación de los resultados
<p><b>Nota:</b> Para evitar que se produzca contaminación, tenga cuidado al pipetear el reactivo de detección 2. Use guantes y evite tocar con las puntas de las pipetas cualquiera de las superficies de trabajo.</p>		
<b>Reactivo de detección 2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Añada 75 µl del reactivo de detección 2 alicuotado, residual u original a un pocillo vacío de la microplaca de captura.</li> <li>• Incube a una temperatura entre 20 y 25 °C durante 15 minutos. Evite la exposición a la luz solar directa.</li> <li>• Lea los pocillos de la microplaca en el luminómetro.</li> </ul> <p><b>Nota:</b> El análisis del reactivo de detección 2 en réplicas de 3 proporciona una valoración óptima de la eficacia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El control del reactivo de detección 2 debe ser &lt; 50 RLU.</li> <li>• Si los valores del reactivo de detección 2 son &lt; 50 RLU el reactivo de detección 2 puede usarse para repetir el ensayo.</li> <li>• Si está contaminado (&gt;50 RLU), obtenga un kit nuevo y repita el ensayo.</li> </ul>
<b>Aparato de lavado y/o fuente de agua</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Añada 75 µl de reactivo de detección 2 a 4 pocillos de la microplaca de captura.</li> <li>• Etiquete los pocillos del 1 al 4.</li> <li>• El pocillo 1 funciona como el control del reactivo de detección 2.</li> <li>• Añada 10 µl de tampón de lavado del frasco de lavado al pocillo 2.</li> <li>• Deje correr el tampón de lavado por los tubos del lavador.</li> <li>• Añada 10 µl de tampón de lavado de los tubos al pocillo 3.</li> <li>• Obtenga la alícuota del agua usada para preparar el tapón de lavado. Añada 10 µl de agua en el pocillo 4.</li> <li>• Incube a una temperatura entre 20 y 25 °C durante 15 minutos. Evite la exposición a la luz solar directa.</li> <li>• Lea los pocillos de la microplaca en el luminómetro.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El control del reactivo de detección 2 (pocillo 1) debe ser &lt; 50 RLU.</li> <li>• Compare el valor RLU de los pocillos 2, 3 y 4 con el valor RLU del control del reactivo de detección 2 (pocillo 1). Los valores RLU individuales para los pocillos 2, 3 y 4 no deben ser superiores a 50 RLU del valor RLU del control del reactivo de detección 2 (pocillo 1).</li> <li>• Los valores superiores a 50 RLU del control del reactivo de detección 2 indican la presencia de contaminación. Para obtener instrucciones sobre lavado y mantenimiento del aparato de lavado, consulte el apartado <i>Preparación y conservación de reactivos</i>.</li> </ul>
<b>Lavador automático de placas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Añada 75 µl de reactivo de detección 2 a 5 pocillos de la microplaca de captura.</li> <li>• Etiquete los pocillos del 1 al 5.</li> <li>• El pocillo 1 funciona como el control del reactivo de detección 2.</li> <li>• Añada 10 µl de tampón de lavado del frasco del lavador de placas etiquetado como <i>Lavar</i> al pocillo 2.</li> <li>• Añada 10 µl de líquido de lavado del frasco del lavador de placas etiquetado como <i>Aclarar</i> al pocillo 3.</li> <li>• Presione la tecla "Prime" (Cebado) en el teclado numérico del lavador de placas para que el tapón de lavado fluya por las líneas.</li> <li>• Añada 10 µl de tampón de lavado desde el punto mínimo al pocillo 4.</li> <li>• Presione la tecla "Prime" (Cebado) en el teclado numérico del lavador de placas para que el tapón de lavado fluya por las líneas.</li> <li>• Añada 10 µl de tampón de lavado desde el punto mínimo al pocillo 5.</li> <li>• Cubra e incube durante 15 minutos a una temperatura entre 20 y 25 °C. Evite la exposición a la luz solar directa.</li> <li>• Lea los pocillos de la microplaca en el luminómetro.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El control del reactivo de detección 2 (pocillo 2) debe ser &lt; 50 RLU.</li> <li>• Compare el valor RLU de los pocillos 2, 3, 4 y 5 con el valor RLU del control del reactivo de detección 2 (pocillo 1). Los valores RLU individuales para los pocillos 2, 3, 4 y 5 no deben superar los 50 RLU del valor RLU del control del reactivo de detección 2 (pocillo 1).</li> <li>• Los valores que superan los 50 RLU del control del DR2 indican la presencia de contaminación en la lavadora de placas.</li> <li>• Consulte el procedimiento de descontaminación en el <b>Manual de usuario del lavador automático de placas</b>.</li> </ul>

## INFORMACIÓN DE CONTACTO DE QIAGEN

Si desea contactar con su representante local de QIAGEN , consulte la hoja con la información de contacto facilitada con este producto.

QIAGEN®, *digene*®, Hybrid Capture® y Rapid Capture® son marcas registradas de QIAGEN.

La tecnología Hybrid Capture está protegida por la patente europea nº 0 667 918 registrada en Austria, Bélgica, Suiza, Liechtenstein, Alemania, Dinamarca, España, Francia, Reino Unido, Grecia, Irlanda, Italia, Luxemburgo, Países Bajos y Suecia.

Patentes de Hybrid Capture en EE.UU. nº: 6,228,578B1

Reconocimientos de marcas comerciales:

ThinPrep® y PreservCyt®: Hologic Corporation  
Kimtowels®: Kimberly-Clark Corporation  
Eppendorf® y Repeater®: Eppendorf-Netheler-Hinz  
CDP-Star®: Tropix, Inc.  
Parafilm®: American Can Co.  
DuraSeal®: Diversified Biotech, Inc.  
Sarstedt®: SARSTEDT AG & Co.  
pGEM®: Promega Corporation  
VWR®: VWR International, Inc.  
Corning®: Corning, Inc.



## RESUMEN DE LA PRUEBA *digene* HC2 GC-ID DNA TEST

**Importante:** es importante que esté plenamente familiarizado con el procedimiento detallado antes de utilizar este resumen.

PROCEDIMIENTO			
<b>Desnaturalización</b> (para muestras en solución PreservCyt, véase Procedimiento de preparación de muestras en solución PreservCyt)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border-right: 1px solid black;"> <p style="text-align: center;"><b>Método de agitación manual</b></p> <p style="text-align: center;">Cree el diseño de la placa Etiquete la placa de hibridación. Prepare el reactivo de desnaturalización.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Pipetee el reactivo de desnaturalización (volumen equivalente a la mitad del volumen de la muestra) a los calibradores, los controles de calidad y las muestras.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Agite cada muestra, calibrador y control de calidad individualmente durante 5 segundos a alta velocidad e inviértalos (consulte los detalles en estas instrucciones de uso).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Compruebe que todos los tubos presentan un color púrpura.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incube a 65 ± 2 °C durante 45 ± 5 minutos.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Prepare la mezcla de la sonda de GC.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;"><b>Método del agitador de tubos para múltiples muestras (MST) Vortexer 2</b></p> <p style="text-align: center;">Cree el diseño de la placa Etiquete la placa de hibridación. Prepare el reactivo de desnaturalización.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Pipetee el reactivo de desnaturalización (volumen equivalente a la mitad del volumen de la muestra) a los calibradores, los controles de calidad y muestras.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Compruebe que todos los tubos presentan un color púrpura.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Cubra la placa con la película selladora y la tapa.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Agite durante 10 segundos a la velocidad máxima.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incube a 65 ± 2 °C durante 45 ± 5 minutos.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Prepare la mezcla de la sonda de GC.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> </td> </tr> </table>	<p style="text-align: center;"><b>Método de agitación manual</b></p> <p style="text-align: center;">Cree el diseño de la placa Etiquete la placa de hibridación. Prepare el reactivo de desnaturalización.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Pipetee el reactivo de desnaturalización (volumen equivalente a la mitad del volumen de la muestra) a los calibradores, los controles de calidad y las muestras.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Agite cada muestra, calibrador y control de calidad individualmente durante 5 segundos a alta velocidad e inviértalos (consulte los detalles en estas instrucciones de uso).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Compruebe que todos los tubos presentan un color púrpura.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incube a 65 ± 2 °C durante 45 ± 5 minutos.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Prepare la mezcla de la sonda de GC.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p style="text-align: center;"><b>Método del agitador de tubos para múltiples muestras (MST) Vortexer 2</b></p> <p style="text-align: center;">Cree el diseño de la placa Etiquete la placa de hibridación. Prepare el reactivo de desnaturalización.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Pipetee el reactivo de desnaturalización (volumen equivalente a la mitad del volumen de la muestra) a los calibradores, los controles de calidad y muestras.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Compruebe que todos los tubos presentan un color púrpura.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Cubra la placa con la película selladora y la tapa.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Agite durante 10 segundos a la velocidad máxima.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incube a 65 ± 2 °C durante 45 ± 5 minutos.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Prepare la mezcla de la sonda de GC.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p>
<p style="text-align: center;"><b>Método de agitación manual</b></p> <p style="text-align: center;">Cree el diseño de la placa Etiquete la placa de hibridación. Prepare el reactivo de desnaturalización.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Pipetee el reactivo de desnaturalización (volumen equivalente a la mitad del volumen de la muestra) a los calibradores, los controles de calidad y las muestras.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Agite cada muestra, calibrador y control de calidad individualmente durante 5 segundos a alta velocidad e inviértalos (consulte los detalles en estas instrucciones de uso).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Compruebe que todos los tubos presentan un color púrpura.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incube a 65 ± 2 °C durante 45 ± 5 minutos.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Prepare la mezcla de la sonda de GC.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p style="text-align: center;"><b>Método del agitador de tubos para múltiples muestras (MST) Vortexer 2</b></p> <p style="text-align: center;">Cree el diseño de la placa Etiquete la placa de hibridación. Prepare el reactivo de desnaturalización.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Pipetee el reactivo de desnaturalización (volumen equivalente a la mitad del volumen de la muestra) a los calibradores, los controles de calidad y muestras.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Compruebe que todos los tubos presentan un color púrpura.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Cubra la placa con la película selladora y la tapa.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Agite durante 10 segundos a la velocidad máxima.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incube a 65 ± 2 °C durante 45 ± 5 minutos.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Prepare la mezcla de la sonda de GC.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p>		
<b>Hibridación</b>	<p>Mezcle el pocillo de la muestra desnaturalizada y pipetee 75 µl de muestra desnaturalizada, calibrador o control de calidad en los pocillos de la microplaca.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incube durante 10 minutos a una temperatura entre 20 y 25 °C.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Añada 25 µl de la mezcla de la sonda de GC a los pocillos de la microplaca.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Cubra la microplaca con una tapa y agítela en el agitador rotatorio I a 1100 ± 100 rpm durante 3 ± 2 minutos. <i>Compruebe que todos los pocillos presentan un color amarillo. (Las muestras en solución PreservCyt cambiarán a un color rosa.)</i></p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incube a 65 ± 2 °C durante 60 ± 5 minutos.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Prepare la microplaca de captura.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>		
<b>Captura de los híbridos</b>	<p>Con una pipeta de 8 canales, transfiera el contenido de cada pocillo de la placa de hibridación al pocillo correspondiente de la microplaca de captura.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Cubra con una tapa o película selladora.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Agite a 1100 ± 100 rpm, a una temperatura entre 20 y 25 °C, durante 60 ± 5 minutos. Prepare el tampón de lavado.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Decante y seque la microplaca de captura (consulte los detalles en estas instrucciones de uso).</p> <p style="text-align: center;">↓</p>		
<b>Detección de los híbridos</b>	<p style="text-align: center;">Pipetee 75 µl del reactivo de detección 1 a cada pocillo de la microplaca de captura.</p> <p style="text-align: center;">Cubra la microplaca de captura con una tapa, con Parafilm o con una película selladora equivalente.</p> <p style="text-align: center;">Incube a una temperatura entr 20 y 25 °C durante 30 a 45 minutos. Lave la placa con el método que desee.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>		
<b>Lavado</b>	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border-right: 1px solid black;"> <p style="text-align: center;"><b>Método de lavado manual</b></p> <p>Decante y seque la microplaca de captura (consulte los detalles en las instrucciones de uso).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Lave 6 veces.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Seque con toallitas de papel con bajo contenido en pelusa.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;"><b>Método del lavador automático de placas</b></p> <p>Coloque la placa en el lavador y pulse "START/STOP" para comenzar.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> </td> </tr> </table>	<p style="text-align: center;"><b>Método de lavado manual</b></p> <p>Decante y seque la microplaca de captura (consulte los detalles en las instrucciones de uso).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Lave 6 veces.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Seque con toallitas de papel con bajo contenido en pelusa.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p style="text-align: center;"><b>Método del lavador automático de placas</b></p> <p>Coloque la placa en el lavador y pulse "START/STOP" para comenzar.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p>
<p style="text-align: center;"><b>Método de lavado manual</b></p> <p>Decante y seque la microplaca de captura (consulte los detalles en las instrucciones de uso).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Lave 6 veces.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Seque con toallitas de papel con bajo contenido en pelusa.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p style="text-align: center;"><b>Método del lavador automático de placas</b></p> <p>Coloque la placa en el lavador y pulse "START/STOP" para comenzar.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p>		
<b>Amplificación de la señal</b>	<p style="text-align: center;">Pipetee 75 µl del reactivo de detección 2 a cada pocillo de la microplaca de captura.</p> <p style="text-align: center;"><b>Cubra la microplaca con una tapa. Incube a una temperatura entre 20 y 25 °C durante 15 a 30 minutos.</b></p> <p style="text-align: center;">↓</p>		
<b>Lectura</b>	<p style="text-align: center;">Lea la microplaca de captura en un luminómetro aprobado por QIAGEN.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;"><b>Valide el ensayo e interprete los resultados de las muestras.</b></p>		