

HC™

Hybrid Capture® 2

GC-ID DNA Test

*Instruções de Utilização*

# **digene® HC2 GC-ID DNA Test**

Um ensaio *in vitro* de hibridização em microplacas de ácido nucleico com amplificação do sinal e utilizando quimioluminescência de microplacas para a detecção qualitativa de ADN de *Neisseria gonorrhoeae* (GC) em amostras cervicais.

Utilizar em conjunto com:

digene® HC2 DNA Collection Device  
 digene® Female Swab Specimen Collection Kit  
 Hologic PreservCyt® Solution

## **PRINCIPAIS ALTERAÇÕES RELATIVAMENTE À REVISÃO DO FOLHETO INFORMATIVO**

1. Branding de produtos actualizado
2. Referências e dados de testes de reflexos eliminados.

**Destinado apenas à utilização profissional por pessoal de laboratório com experiência e formação adequadas. Ler cuidadosamente estas instruções antes de utilizar o teste.**



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

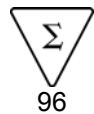
**EC REP**

QIAGEN GmbH  
 QIAGEN Str. 1  
 D-40724 Hilden  
 Germany

©2011 QIAGEN



IVD



REF 5140-1330

L2172PT Rev. 3



A marca CE indica que o *digene* HC2 GC-ID DNA Test está em conformidade com os requisitos da Directiva relativa aos dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro* 98/79/CE.

# ÍNDICE

<b>NOME E APLICAÇÕES .....</b>	<b>1</b>
<b>SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO .....</b>	<b>1</b>
<b>REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS .....</b>	<b>2</b>
<b>MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS .....</b>	<b>3</b>
<b>AVISOS E PRECAUÇÕES.....</b>	<b>4</b>
PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA .....	4
INFORMAÇÕES SOBRE A SEGURANÇA E RISCOS PARA A SAÚDE .....	5
PRECAUÇÕES DE MANUSEAMENTO .....	6
<b>PREPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS REAGENTES .....</b>	<b>7</b>
<b>COLHEITA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS .....</b>	<b>10</b>
AMOSTRAS CERVICAIS EM STM .....	10
AMOSTRAS CERVICAIS EM SOLUÇÃO HOLOGIC PRESERV CYT .....	10
<b>PROCEDIMENTO PARA O TESTE .....</b>	<b>11</b>
TESTE DE UM VOLUME ELEVADO DE AMOSTRAS UTILIZANDO O SISTEMA DE CAPTURA RÁPIDA.....	11
MÉTODO MANUAL .....	11
DESNATURAÇÃO .....	12
Calibradores, Controlos De Qualidade E Procedimento De Preparação De Amostras STM .....	13
Procedimento De Preparação Da Amostra Em Solução PreservCyt.....	14
Ponto De Paragem Opcional .....	17
HIBRIDIZAÇÃO .....	18
CAPTURA HÍBRIDA .....	19
DETECÇÃO HÍBRIDA.....	19
LAVAGEM .....	20
Método De Lavador De Placas Automático .....	20
Método De Lavagem Manual.....	21
AMPLIFICAÇÃO DO SINAL .....	21
<b>CRITÉRIOS DE VERIFICAÇÃO DA CALIBRAÇÃO DO ENSAIO.....</b>	<b>22</b>
<b>CÁLCULO DE CUTOFF .....</b>	<b>24</b>
<b>CONTROLO DE QUALIDADE .....</b>	<b>24</b>
<b>INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS DE AMOSTRAS .....</b>	<b>25</b>
<b>LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO .....</b>	<b>26</b>
<b>PREVISÃO DE RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
PREVALÊNCIA .....	27
VALORES DE PREVISÃO POSITIVO E NEGATIVO .....	27
DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS: RESULTADOS URL/VC DO <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA TEST .....	27
<b>CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO .....</b>	<b>28</b>
RESULTADOS DO ENSAIO CLÍNICO POR AMOSTRA .....	28
REPRODUTIBILIDADE.....	32
PRECISÃO.....	33
Precisão Com Amostras Em Solução PreservCyt.....	35
SENSIBILIDADE ANALÍTICA .....	36
Considerações Adicionais Sobre As Amostras Em PreservCyt.....	37
ESPECIFICIDADE ANALÍTICA .....	39
HOMOLOGIA DE SONDAS RELATIVAMENTE A ADN DE PLASMÍDEOS TOTAIS E A ADN GENÓMICO .....	41
EFEITO DO SANGUE E OUTRAS SUBSTÂNCIAS NAS AMOSTRAS STM .....	41
EFEITO DO SANGUE E OUTRAS SUBSTÂNCIAS NAS AMOSTRAS PRESERV CYT .....	42
PRECISÃO NO VALOR DE CORTE DO <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA TEST COM AMOSTRAS CLÍNICAS RECOLHIDAS EM STM .....	43
INFORMAÇÃO HISTÓRICA .....	44

EQUIVALÊNCIA ENTRE AMOSTRAS EM STM E EM SOLUÇÃO PRESERVCYT.....	44
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>
<b>GUIA PARA A RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS .....</b>	<b>46</b>
<b>VERIFICAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>CONTACTOS DA QIAGEN .....</b>	<b>52</b>
<b>RESUMO DO <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA TEST.....</b>	<b>53</b>

## NOME E APLICAÇÕES

O *digene*<sup>®</sup> Hybrid Capture<sup>®</sup> 2 (HC2) GC-ID DNA Test é um ensaio de hibridização de ácidos nucleicos *in vitro* com amplificação de sinal, utilizando quimioluminescência de microplacas para a detecção qualitativa combinada de ADN de *Neisseria gonorrhoeae* em amostras cervicais recolhidas com o *digene* HC2 DNA Collection Device [constituído por uma escova cervical e um *digene* Specimen Transport Medium (STM)] e em amostras cervicais recolhidas com o *digene* Female Swab Specimen Collection Kit<sup>™</sup> (cotonete e STM) ou em amostras recolhidas usando um dispositivo de recolha tipo vassoura e colocadas em solução Hologic PreservCyt<sup>®</sup>. O *digene* HC2 GC-ID DNA Test está indicado para utilização em mulheres sintomáticas ou assintomáticas como prova de infecção por *Neisseria gonorrhoeae*.

Se necessitar de realizar um elevado volume de amostras, o *digene* HC2 GC-ID DNA Test pode ser realizado utilizando a aplicação do instrumento do sistema Rapid Capture<sup>®</sup> (RCS).

Para utilização em diagnósticos *in vitro* IVD

## SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO

As *Neisseria gonorrhoeae* são diplococos imóveis Gram negativos com requisitos bastante complexos para a sua multiplicação. São microrganismos aeróbios, que se produzem de forma ideal a temperaturas entre 35-37 °C na presença de 3-7% de CO<sub>2</sub> e uma humidade relativa de ≥ 70%. O possível diagnóstico de infecção por *Neisseria gonorrhoeae* é, tradicionalmente, obtido isolando microrganismos a partir de culturas clínicas e utilizando um corante gram para o exame morfológico. O diagnóstico definitivo pode ser obtido com um teste positivo para a oxidase e/ou catalase da cultura. Os resultados podem ser, adicionalmente, confirmados com testes de degradação de carboidratos, de aglutinação e da fermentação de açúcares. Os testes de detecção de antigénios e de sondas de ácidos nucleicos são mais definitivos e directos para detecção de *Neisseria gonorrhoeae*. Um ensaio imunoabsorvente associado a enzimas demonstrou ser tão sensível e específico como o corante gram na detecção de gonococos em amostras uretrais e de primeira evacuação da urina masculinas, mas apresenta uma menor sensibilidade quando aplicado em amostras endocervicais.<sup>1,2</sup> Uma vez que o teste de detecção de antigénios pode apresentar uma reacção cruzada com *Neisseria comensal* e espécies relacionadas<sup>3</sup>, este teste só pode ser utilizado para possíveis diagnósticos.<sup>3</sup>

Mais recentemente, têm-se utilizado testes de hibridização de ácidos nucleicos na avaliação de amostras clínicas para a detecção de *Neisseria gonorrhoeae* em populações de alto risco, utilizando tanto amostras endocervicais como uretrais masculinas.

## PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O *digene* HC2 GC-ID DNA Test, que utiliza a tecnologia de captura híbrida (*digene* Hybrid Capture 2), é um ensaio de hibridização de ácidos nucleicos com amplificação do sinal que utiliza a detecção quimioluminescente de microplacas. As amostras que contêm o ADN alvo hibridizam com uma sonda específica de ARN de GC. Os híbridos ARN:ADN resultantes são capturados para a superfície do poço de uma microplaca revestida com anticorpos específicos para híbridos ARN:ADN. Os híbridos imobilizados reagem então com anticorpos específicos conjugados com fosfatase alcalina para híbridos ARN:ADN e são detectados com um substrato quimioluminescente. Por cada anticorpo, são conjugadas diversas moléculas de fosfatase alcalina. A cada híbrido capturado ligam-se vários anticorpos conjugados, o que resulta numa considerável amplificação do sinal. À medida que o substrato é clivado pela fosfatase alcalina associada, é emitida uma luz que é medida num luminómetro em unidades relativas de luz (URL). A intensidade da luz emitida indica a presença ou ausência de ADN alvo na amostra.

Uma medição de URL igual ou superior a um quociente especificado para o valor de corte (VC) positivo indica a presença de ADN de GC na amostra. Uma medição de URL inferior ao quociente especificado para o valor de corte positivo indica a ausência de ADN de GC ou níveis inferiores ao limite de detecção do ensaio.

A sonda GC contém uma mistura de sondas especificamente seleccionada para eliminar ou minimizar a reactividade cruzada com sequências de ADN de células humanas ou outras espécies bacterianas, espécies de clamídias diferentes da *Neisseria gonorrhoeae*. A sonda para GC fornecida com o *digene*

HC2 GC-ID DNA Test é complementar a aproximadamente 9.700 bp ou a 0,5% do ADN genómico de *Neisseria gonorrhoeae* (1,9 x 10<sup>6</sup> bp).<sup>4</sup> Uma sonda é complementar a 100% do plasmídeo críptico de 4200 bp.

O teste de um volume elevado de amostras com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test pode ser realizado utilizando um sistema de pipetagem e diluição automático de utilização geral designado de sistema de captura rápida (RCS). Este instrumento, que utiliza uma aplicação específica do *digene* HC2 GC-ID DNA Test, analisa um máximo de 352 amostras em oito horas. Para permitir o teste de um volume elevado de amostras, o sistema RCS realiza todas as fases do método analítico, excepto a desnaturação da amostra, a detecção do sinal de quimioluminescência e o relatório de resultados.

## REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS

Em cada conjunto de *digene* HC2 GC-ID DNA Test existem 96 testes (REF 5140-1330). O número de resultados de doente varia em função do número de utilizações por conjunto:

- 1 utilização = 88 resultados de doente
- 2 utilizações = 80 resultados de doente
- 3 utilizações = 72 resultados de doente
- 4 utilizações = 64 resultados de doente

<b>Corante indicador</b> INDIC	1 x 0,35 ml
Contém 0,05% p/v de azida de sódio.	
<b>Reagente de desnaturação*</b> REAG DENAT	1 x 50 ml
Solução de hidróxido de sódio (NaOH) diluído.	
<b>Diluyente da sonda*</b> DIL PROBE	1 x 5 ml
Solução tamponada com 0,05% p/v de azida de sódio.	
<b>Sonda GC</b> PROBE GC	1 x 200 µl
Sonda de ARN de GC em solução tamponada.	
<b>Calibrador negativo</b> CAL -	1 x 2 ml
ADN transportador em Meio de Transporte de Amostras (STM) com 0,05% p/v de azida de sódio.	
<b>Calibrador positivo GC (CP)</b> CAL GC +	1 x 1 ml
1,0 pg/ml de ADN de GC clonado e ADN portador no STM com 0,05% p/v de azida de sódio.	
<b>Controlo de qualidade CT (CQ CT)</b> QC CT	1 x 1 ml
5,0 pg/ml de ADN de CT clonado e ADN portador no STM com 0,05% p/v de azida de sódio.	
<b>Controlo de qualidade GC (CQ GC)</b> QC GC	1 x 1 ml
5,0 pg/ml de ADN de GC clonado e ADN portador no STM com 0,05% p/v de azida de sódio.	
<b>Microplaca de captura</b> PLATE CAPTURE	1 de cada
Revestida com anticorpos policlonais de cabra híbridos anti-ARN:ADN.	
<b>Reagente de detecção 1</b> REAG DET 1	1 x 12 ml
Anticorpos conjugados com fosfatase alcalina para híbridos ARN:ADN em solução tamponada com 0,05% p/v de azida de sódio.	
<b>Reagente de detecção 2</b> REAG DET 2	1 x 12 ml
CDP-Star® com Emerald II (substrato quimioluminescente).	
<b>Tampão de lavagem concentrado</b> BUF WASH X 30	1 x 100 ml
Contém 1,5% p/v de azida de sódio.	

\*Ver a secção *Avisos e Precauções* deste documento para obter informações sobre saúde e segurança.

## MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

### Equipamento e acessórios de diagnóstico *in vitro* para o sistema de captura híbrida<sup>A</sup>

Sistema de Captura Híbrida <i>digene</i> 2 ("sistema <i>digene</i> HC2"), consistindo num luminómetro aprovado pela QIAGEN ("luminómetro"), computador pessoal aprovado pela QIAGEN e periféricos de computador (monitor, teclado, cabo do rato, impressora e cabo de impressora), software do sistema <i>digene</i> HC2 ("software de análise de ensaios <i>digene</i> "), protocolos de ensaio do sistema <i>digene</i> HC2 para CT/GC, software da placa LumiCheck e <i>manual do utilizador do sistema digene HC2</i>	Sistema Rapid Capture (opcional para analisar um volume elevado de amostras) <sup>E</sup> Aparelho de lavagem Microplacas de hibridização Tampas para microplacas Tiras de Microplacas vazias (disponíveis da Costar, modelo nº 2581); opcional para utilização com o lavador de placas automático Pontas de pipeta extra-longas para colheita da amostra Microtubos de colheita de amostras Suporte de microtubos de colheita de amostras Tampas de rosca para microtubos de recolha de amostras Reservatórios de reagente descartáveis Parafilum DuraSeal <sup>®</sup>
Misturador rotativo I para Sistema de Captura Híbrida Aquecedor de microplacas I para Sistema de Captura Híbrida Lavador de Placas Automático para Sistema de Captura Híbrida Agitador tipo vortex 2 de Tubos Multi-Amostras (MST) para Captura Híbrida (opcional) Suporte e tampa de conversão (opcional para uso manual; necessária quando se utiliza o Sistema de Captura Rápida com o <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test e amostras PreservCyt) Suporte e tampa de conversão <i>digene</i> (opcional para uso manual; (necessária quando se utiliza o Sistema de Captura Rápida com o <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test e amostras <i>digene</i> HC2 recolhidas com o <i>digene</i> HC2 DNA Collection Device) Pipetador EXPAND-4 e suporte (opcional) <sup>C</sup> <i>digene</i> HC2 DNA Collection Device <sup>D</sup> <i>digene</i> Female Swab Specimen Collection Kit (constituída por 2 cotonetes e <i>digene</i> Specimen Transport Medium) <sup>D</sup> Distribuidor de Vedantes para Tubos e Dispositivo de Corte (opcional, utilizado com o agitador tipo vortex MST 2)	

#### Equipamento e acessórios para utilização geral em laboratório

Banho-maria a  $65 \pm 2$  °C de dimensão suficiente para conter 1 suporte de conversão (36 x 21 x 9 cm) ou dois suportes de amostra *digene* (cada com 31,7 x 15,2 x 6,4 cm)  
Microcentrífuga (opcional, para centrifugar os frascos das sondas para obter um volume máximo da sonda)  
Agitador tipo vortex com ligação para copo  
Micropipetador de canal único; com volumes variáveis entre 20 e 200 µl e 200-1000 µl  
Pipetador de repetição com deslocamento positivo, como a pipeta Eppendorf Repeater<sup>®</sup> ou equivalente  
Pipetador de 8 canais: com volumes variáveis entre 25-200 µl  
Cronómetro  
Solução de hipocloreto de sódio, 0,5% na concentração final (de lixívia doméstica)  
Parafilum<sup>®</sup> ou equivalente  
Pontas de pipeta descartáveis com protecção contra aerossóis para pipetador de canal único (20 a 200 µl e 200 a 1000 µl)  
Pontas descartáveis para pipeta Eppendorf Repeater<sup>®</sup> (25 e 500 µl)  
Pontas descartáveis para pipetador de 8 canais (25 a 200 µl)  
Papel absorvente Kimtowels<sup>®</sup> ou toalhas de papel de libertação reduzida de pêlo equivalentes  
Revestimento de bancada descartável  
Luvas sem pó de talco  
Tubo de polipropileno de fundo redondo e tampa ajustável de 5 ml e/ou 15 ml (para diluição das sondas)  
Tubos de polipropileno de 2,0 ml para microcentrífuga com tampa

#### Equipamento e acessórios adicionais para processamento de amostras em solução PreservCyt

Centrífuga de cuba oscilante capaz de atingir  $2900 \pm 150 \times g$  e com capacidade para tubos de polipropileno de centrifugação cónica de 10 ml ou de 15 ml, conforme especificado em baixo  
  
Pipetas serológicas ou de transferência de 5 ml  
Dispositivo de conversão de amostras *digene* HC2<sup>A</sup>  
Pontas descartáveis para pipeta Eppendorf Repeater<sup>®</sup> (50 e 100 µl)  
  
Para procedimento do agitador tipo vortex manual:  
  
Tubos para conversão de amostras *digene* HC2 (cónicos de 15 ml)<sup>F</sup>, tubos cónicos Sarstedt<sup>®</sup> de 10 ml com tampa ou VWR<sup>®</sup> ou tubos de propileno de fundo cónico de centrifugação da marca Corning<sup>®</sup> de 15 ml com tampas  
Suporte de tubos com capacidade para tubos cónicos de 10 ml ou de 15 ml  
  
Para procedimento de agitador tipo vortex 2 de tubos multi-amostras  
  
Tubos para conversão de amostras *digene* HC2 (cónicos de 15 ml)<sup>F</sup>  
Tubo multi-amostras (MST) para o agitador tipo vortex 2  
Suporte e tampa de conversão (específicos para tubos cónicos de 15 ml)  
Distribuidor de vedantes para tubos e dispositivo de corte Parafilum DuraSeal<sup>®</sup> (utilizado com o agitador tipo vortex MST 2)

<sup>A</sup> Somente o equipamento e acessórios aprovados para os *digene* HC2 CT/GC DNA Tests podem ser adquiridos na QIAGEN.

<sup>B</sup> Igualmente necessário quando utilizar a aplicação RCS semi-automática.

<sup>C</sup> Este é um artigo personalizado. Podem ser utilizadas outras pipetas multicanal expansíveis, desde que seja alcançado um intervalo entre pontas de 3,2 cm, quando expandidas. Alternativamente, poderá utilizar uma pipeta de canal único capaz de pipetar 75 µl.

<sup>D</sup> As características de desempenho do *digene* HC2 GC-ID DNA Test foram estabelecidas unicamente com os kits de colheita indicados.

<sup>E</sup> Consulte o *manual do utilizador do sistema de captura rápida* para obter instruções específicas sobre a utilização desse sistema para analisar um volume elevado de amostras.

<sup>F</sup> Os tubos para conversão de amostras *digene* HC2 (marca VWR ou Corning<sup>®</sup>) disponíveis através da QIAGEN têm de ser utilizados para garantir um desempenho adequado do ensaio quando utilizar o procedimento de agitador tipo vortex 2 de tubos multi-amostras.

## AVISOS E PRECAUÇÕES

LEIA CUIDADOSAMENTE TODAS AS INSTRUÇÕES ANTES DE UTILIZAR O TESTE.

### PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA

TODAS AS AMOSTRAS devem ser consideradas como potencialmente infecciosas. Nenhum método de análise conhecido pode assegurar completamente que as amostras não venham a transmitir infeções. Recomenda-se que as amostras humanas sejam manuseadas de acordo com as práticas de biossegurança nacionais/locais adequadas.<sup>5,6,7,8</sup> Utilize estas práticas de biossegurança quando manuseia materiais que contenham ou nos quais se suspeite a presença de agentes infecciosos. Estas precauções incluem, mas não se limitam às seguintes:

1. Não pipete com a boca.
2. Não fume, coma ou beba nas áreas onde se manuseiam reagentes ou amostras.
3. Use luvas descartáveis sem pó de talco durante o manuseamento de reagentes ou de amostras. Lave bem as mãos depois de realizar a análise.
4. Limpe e desinfete todos os vestígios de amostras com um desinfetante tuberculocida, tal como hipocloreto de sódio a 0,5% p/v ou outro desinfetante adequado.<sup>9,10</sup>
5. Descontamine e elimine todas as amostras, reagentes ou outros materiais potencialmente contaminados, em conformidade com os regulamentos nacionais e locais.<sup>11,12</sup>

Alguns reagentes contêm azida de sódio. Registou-se a formação de azida de chumbo ou de cobre nas canalizações do laboratório. Estas azidas podem explodir por percussão, como acontece ao martelar. Para evitar a formação de azida de chumbo ou de cobre, deixe correr bastante água no lavatório depois de eliminar soluções que contenham azida de sódio. Para remover contaminações em canalizações antigas, onde se suspeite a existência de acumulação de azida, o National Institute for Occupational Safety and Health Administration recomenda o seguinte: (1) escoe o líquido através dos sifões, utilizando um tubo de borracha ou de plástico, (2) encha com uma solução de 10% p/v de hidróxido de sódio, (3) deixe repousar durante 16 horas e (4) deixe correr água abundantemente.

## INFORMAÇÕES SOBRE A SEGURANÇA E RISCOS PARA A SAÚDE

OS MATERIAIS ABAIXO INDICADOS FORAM AVALIADOS DE ACORDO COM OS REQUISITOS DAS DIRECTIVAS COMUNITÁRIAS 2001/59/CE E 99/45/CE.



T

### **Tampão de lavagem concentrado. Contém azida de sódio: tóxico (T)**

R25: Tóxico por ingestão.

R52/53: Nocivo para os organismos aquáticos, podendo causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente aquático.

S36/37/39: Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento protector para os olhos/face adequados.

S45: Em caso de acidente ou indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).



C

### **Reagente de desnaturação. Contém hidróxido de sódio: corrosivo (C)**

R35: Provoca queimaduras graves.

S26: Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista.

S36/37/39: Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento protector para os olhos/face adequados.

S45: Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente um médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).



Xi

### **Diluyente de sonda. Contém BES e ácido acético: irritante (Xi)**

R36/38: Irritante para os olhos e pele.

S26: Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista.

S36/37/39: Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento protector para os olhos/face adequados.

INFORMAÇÃO DE EMERGÊNCIA 24 HORAS

INFORMAÇÕES DE EMERGÊNCIA MÉDICA EM INGLÊS, FRANCÊS E ALEMÃO PODEM SER OBTIDAS 24 HORAS/DIA JUNTO DO:


CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS DE MAINZ, ALEMANHA

TEL: +49-6131-19240


Consulte o *manual do utilizador do sistema de captura rápida* para obter instruções específicas sobre os avisos e precauções relativos à utilização desse sistema para analisar um volume elevado de amostras.



## PRECAUÇÕES DE MANUSEAMENTO

1. Apenas para utilização em diagnósticos *in vitro*.
2. A escova cervical só deve ser utilizada em mulheres que não estejam grávidas.
3. Não utilize os reagentes depois do prazo de validade indicado junto ao símbolo  no rótulo da embalagem exterior.
4. A realização do ensaio fora dos intervalos de tempo e de temperatura indicados pode dar origem a resultados inválidos. Os ensaios que não cumpram estes intervalos estabelecidos são considerados inválidos e têm de ser repetidos.
5. De forma a obter resultados fiáveis no teste, o procedimento para o teste, os critérios de verificação da calibração, o controlo de qualidade e a interpretação de resultados de amostras do *digene* HC2 GC-ID DNA Test têm de ser rigorosamente observados.
6. É importante pipetar exactamente o volume de reagente indicado e misturar bem após a adição de cada reagente. Caso contrário, poderá obter resultados errados. Assegure que as alterações de cor detectadas confirmam que estas condições foram satisfeitas.
7. Estes componentes foram testados como uma unidade. **Não** misture componentes de outras origens ou de lotes diferentes.
8. Os ácidos nucleicos são muito sensíveis à degradação da nuclease ambiental. As nucleases estão presentes na pele humana e nas superfícies ou materiais manuseados por seres humanos. Limpe e cubra as superfícies de trabalho com um revestimento de bancada descartável e **use luvas sem pó de talco durante a realização de todos os passos do ensaio.**
9. Tenha cuidado para evitar a contaminação da microplaca de captura e do reagente de detecção 2 por fosfatase alcalina exógena durante a realização do ensaio. As substâncias que podem conter fosfatase alcalina incluem o reagente de detecção 1, bactérias, saliva, cabelo e gordura da pele. **É especialmente importante cobrir a microplaca de captura depois do procedimento de lavagem e durante a fase de incubação do reagente de detecção 2, uma vez que a fosfatase alcalina exógena pode reagir com o reagente de detecção 2 e dar origem a resultados falsos-positivos.**
10. Proteja o reagente de detecção 2 da exposição prolongada à luz directa. Utilize o reagente dentro do período de tempo indicado imediatamente depois de retirar a alíquota e evite o contacto directo com a luz solar.
11. O pipetador de repetição deve ser regulado antes de começar a pipetar os reagentes e deve ser verificado, periodicamente, para que não contenha grandes bolhas de ar. Uma quantidade excessiva de bolhas de ar na ponta do pipetador de repetição pode provocar uma medição imprecisa que pode ser evitada se encher o pipetador, esvaziar todo o líquido e voltar a encher. Consulte os manuais de instruções do pipetador para obter indicações específicas de utilização.
12. A utilização da pipeta multicanal deve ser realizada recorrendo à técnica de pipetagem inversa (ver *Detecção híbrida*) para distribuir os reagentes de detecção 1 e 2. Verifique se a ponta de cada pipeta no pipetador multicanal se encontra correctamente encaixada e cheia.
13. Durante a lavagem tenha o cuidado de assegurar que todos os micropoços são correctamente lavados, conforme indicado nas instruções de lavagem manual. Uma lavagem inadequada provocará um sinal de fundo aumentado e pode dar origem a resultados falsos-positivos. A presença de tampão de lavagem residual nos poços pode provocar uma redução do sinal ou uma má reprodutibilidade.
14. Aguarde pelo menos 60 minutos até o aquecedor de microplacas I estabilizar a uma temperatura de  $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a partir de uma temperatura inicial fria. Se não respeitar este período de aquecimento, a microplaca de hibridização pode derreter. Consulte o manual do utilizador do aquecedor de microplacas I para obter mais informações.

## PREPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS REAGENTES

1. Depois de receber o dispositivo, armazene-o a uma temperatura de 2-8 °C. Se desejar, o tampão de lavagem concentrado, o reagente de desnaturação e o corante indicador podem ser armazenados a uma temperatura de 2-30 °C.
2. Não utilize o dispositivo depois da data de validade indicada junto ao símbolo  no rótulo da embalagem exterior ou da data de validade dos reagentes preparados (ver em baixo).
3. Todos os reagentes são fornecidos prontos a serem utilizados excepto o reagente de desnaturação, a mistura de sondas GC e o tampão de lavagem.

Consulte o *manual do utilizador do sistema de captura rápida* para mais informações sobre a preparação da mistura de sondas GC, do tampão de lavagem, do reagente de detecção 1 e do reagente de detecção 2, uma vez que estas instruções são específicas à utilização desse sistema para analisar um volume elevado de amostras.

### Método de preparação de reagentes

<b>Reagente de desnaturação</b>	<b>PREPARAR PRIMEIRO:</b> Adicione 5 gotas de corante indicador ao frasco do reagente de desnaturação e misture bem. O reagente de desnaturação deve apresentar uma cor púrpura escura uniforme.  Uma vez preparado, o reagente de desnaturação mantém-se estável durante três meses, quando armazenado a uma temperatura de 2-8 °C. Rotule-o com uma nova data de validade. Se a cor ficar mais clara, adicione 3 gotas adicionais de corante indicador e misture cuidadosamente antes de utilizar.  <b>Aviso:</b> O reagente de desnaturação é corrosivo. Use vestuário de protecção, luvas e equipamento protector para os olhos/face adequados. Tenha cuidado durante o manuseamento.
<b>Mistura de sondas GC (preparada com a sonda de GC e diluentes da sonda)</b>	<b>PREPARAR DURANTE A INCUBAÇÃO PARA A DESNATURAÇÃO DA AMOSTRA:</b>  <b>IMPORTANTE: POR VEZES, A SONDA FICA PRESA NA TAMPA DO FRASCO.</b>  <b>Nota:</b> Tenha muito cuidado neste passo para evitar a contaminação da sonda e da mistura de sondas por RNase. Utilize pontas de pipetas com protecção contra aerossóis para pipetar a sonda. O diluente da sonda é viscoso. <b>Ao preparar a mistura de sondas para GC, assegure uma mistura cuidadosa. Deve formar-se um vortex visível no líquido durante o processo de mistura. Uma mistura incompleta pode provocar um sinal reduzido.</b>  <ul style="list-style-type: none"><li>• Centrifugue brevemente o frasco da sonda de GC para fazer com que o líquido desça para o fundo do frasco. Bata levemente no tubo para misturar.</li><li>• Determine a quantidade de mistura de sondas necessária (25 µl/teste). Recomenda-se a preparação de uma porção extra de mistura de sondas para compensar o volume que se possa perder nas pontas das pipetas ou nas paredes do frasco. Consulte os volumes sugeridos, indicados em baixo. O número mínimo de poços recomendado para cada utilização é de 24. Se pretender utilizar menos de 24 poços por ensaio, o número total de testes por dispositivo pode ser reduzido devido a volumes limitados da sonda e de diluente da sonda.</li><li>• Transfira a quantidade necessária de diluente da sonda para um novo recipiente descartável. Dependendo do número de testes, recomendamos a utilização de tubos de polipropileno de 5 ml ou de 15 ml com tampa ajustável e fundo redondo. Prepare uma diluição de 1:25 de sonda de GC em diluente da sonda para preparar a mistura de sondas.</li></ul>

	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;"><u>Nº de testes/tiras</u></th> <th style="text-align: center;"><u>Volume de diluente da sonda*</u></th> <th style="text-align: center;"><u>Volume da sonda*</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">96/12</td> <td style="text-align: center;">4,0 ml</td> <td style="text-align: center;">160,0 µl</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">72/9</td> <td style="text-align: center;">3,0 ml</td> <td style="text-align: center;">120,0 µl</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">48/6</td> <td style="text-align: center;">2,0 ml</td> <td style="text-align: center;">80,0 µl</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">24/3</td> <td style="text-align: center;">1,0 ml</td> <td style="text-align: center;">40,0 µl</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">por poço</td> <td style="text-align: center;">0,045 ml</td> <td style="text-align: center;">1,8 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">*Estes valores incluem o volume extra recomendado.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipete a sonda no diluente da sonda, colocando a ponta da pipeta contra a parede interna do tubo, mesmo acima do menisco e expelindo o conteúdo. <b>Não mergulhe a ponta no diluente da sonda.</b></li> <li>• Agite no agitador durante pelo menos 5 segundos à velocidade máxima para misturar completamente. <b>Deve formar-se um vortex visível.</b> Rotule como “mistura da sonda GC” e conserve num recipiente fechado até utilizar. <b>A mistura de sondas não utilizada deve ser eliminada.</b></li> </ul>	<u>Nº de testes/tiras</u>	<u>Volume de diluente da sonda*</u>	<u>Volume da sonda*</u>	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 poço	0,045 ml	1,8 µl
<u>Nº de testes/tiras</u>	<u>Volume de diluente da sonda*</u>	<u>Volume da sonda*</u>																	
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 poço	0,045 ml	1,8 µl																	
<p><b>Tampão de lavagem</b></p>	<p><b>PREPARAR DURANTE O PROCESSO DE CAPTURA:</b> O tampão de lavagem <b>para o lavador de placas automático</b> pode ser preparado conforme descrito em baixo e armazenado num recipiente tapado ou pode preparar 1 l de cada vez e colocá-lo nos reservatórios do lavador de placas automático. Consulte os volumes de mistura na tabela que se segue.</p> <p><b>Consulte o manual do utilizador do lavador de placas automático para obter mais informações sobre as instruções de manuseamento e de manutenção.</b></p> <p><b>Aviso:</b> O tampão de lavagem concentrado é tóxico por ingestão. Use vestuário de protecção, luvas e equipamento protector para os olhos/face adequados. Para minimizar a exposição, adicione água ao tampão de lavagem concentrado durante a sua preparação.</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;"><u>Quantidade de tampão de lavagem concentrado</u></th> <th style="text-align: center;"><u>Quantidade de água destilada ou desionizada</u></th> <th style="text-align: center;"><u>Volume final de tampão de lavagem</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">33,3 ml</td> <td style="text-align: center;">966,7 ml</td> <td style="text-align: center;">1 L</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">66,6 ml</td> <td style="text-align: center;">1.933,4 ml</td> <td style="text-align: center;">2 L</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">100,0 ml</td> <td style="text-align: center;">2.900,0 ml</td> <td style="text-align: center;">3 L</td> </tr> </tbody> </table> <p><b>Nota: É muito importante deixar sempre o lavador de placas automático ligado para permitir que a lavagem de manutenção seja realizada após oito horas de não utilização.</b></p> <p><b>Antes de cada ensaio, assegure-se que o reservatório de resíduos do lavador de placas automático está vazio e que o reservatório de enxaguamento está cheio com água destilada ou desionizada.</b></p> <p>Consulte o manual do utilizador do lavador de placas automático para obter mais informações sobre as instruções de manuseamento e de manutenção.</p> <p><b>Para o método de lavagem manual de placas:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Misture bem o tampão de lavagem concentrado.</li> <li>• Dilua 100 ml de tampão de lavagem concentrado com 2,9 l de água destilada ou desionizada e misture bem (o volume final deve ser de 3 l).</li> <li>• Feche o recipiente para evitar a contaminação ou a evaporação.</li> </ul> <p>Uma vez preparado, o tampão de lavagem mantém-se estável durante três meses, quando armazenado a uma temperatura de 2-30 °C. Rotule-o com uma nova data de validade. Se o tampão de lavagem tiver sido refrigerado, deixe estabilizar a uma temperatura de 20-25 °C antes de o utilizar.</p> <p>Recomenda-se que o aparelho de lavagem e a tubagem sejam limpos com uma solução de hipocloreto de sódio a 0,5% e bem enxaguados com água destilada ou desionizada de três em três meses para evitar uma eventual contaminação por fosfatase alcalina, existente nas bactérias e nos bolores.</p>	<u>Quantidade de tampão de lavagem concentrado</u>	<u>Quantidade de água destilada ou desionizada</u>	<u>Volume final de tampão de lavagem</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>Quantidade de tampão de lavagem concentrado</u>	<u>Quantidade de água destilada ou desionizada</u>	<u>Volume final de tampão de lavagem</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																	

### Volumes dos reagentes prontos a usar

Reagente de deteccção 1 e reagente de deteccção 2	<b>IMEDIATAMENTE ANTES DE UTILIZAR:</b>	
	Misture bem o reagente, depois <u>meça</u> cuidadosamente o volume adequado de reagente de deteccção 1 ou de reagente de deteccção 2 para um reservatório de reagente limpo, observando as orientações abaixo indicadas. Para evitar contaminação, estes reagentes <b>NÃO PODEM</b> ser novamente colocados nos frascos originais: <b>Descarte todo o material que não tenha sido utilizado</b> . Se não estiver a utilizar um pipetador de 8 canais, pode ser utilizado um pipetador de repetição. Neste caso, as alíquotas do reagente devem ser recolhidas num tubo de polipropileno com dimensões adequadas para conter o volume necessário, conforme indicado em baixo.	
	Nº de <u>testes/tiras</u>	Volume de reagente de <u>deteccção 1 ou 2</u>
	96/12	Conteúdo do frasco
	72/9	7,0 ml
	48/6	5,0 ml
24/3	3,0 ml	
1 teste	0,125 ml	

## COLHEITA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

As amostras cervicais recolhidas e transportadas utilizando o *digene* HC2 DNA Collection Device (constituído por escova cervical e meio de transporte de amostras *digene*) e o *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (cotonete e meio de transporte de amostras *digene*) ou amostras recolhidas usando um dispositivo tipo escova e colocadas em solução Hologic PreservCyt são as únicas amostras recomendadas para utilizar com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test. As amostras recolhidas com outros dispositivos de amostragem ou transportadas noutros meios de transporte não foram consideradas para serem utilizadas com este ensaio. As características de desempenho deste kit foram estabelecidas unicamente com os kits de colheita indicados. As amostras cervicais têm de ser recolhidas antes da aplicação de ácido acético ou iodo, no caso de se realizar um exame de colposcopia. Consulte as instruções de utilização do *digene* HC2 DNA Collection Device para obter informações adicionais sobre os procedimentos de recolha de amostras e de manuseamento.

### AMOSTRAS CERVICAIS EM STM

As amostras STM podem ser mantidas até duas semanas à temperatura ambiente e enviadas sem refrigeração para o laboratório de análises. As amostras devem ser enviadas num recipiente isolado, quando o transporte se realiza de um dia para o outro ou quando a entrega é efectuada no prazo de 2 dias. No laboratório de análises, as amostras têm de ser armazenadas a uma temperatura de 2-8 °C, se os ensaios forem realizados no prazo de uma semana. Se o ensaio for realizado após 1 semana, armazene as amostras a uma temperatura de -20 °C até 3 meses. Foi adicionado um conservante ao meio de transporte de amostras *digene* para retardar o desenvolvimento de bactérias e para manter a integridade do ADN. Este conservante **não se destina** a preservar a viabilidade de microrganismos ou de células. As amostras recolhidas em meio de transporte de amostras *digene* não podem ser utilizadas para cultura em outros métodos de teste.

A estabilidade das amostras STM durante 2 semanas à temperatura ambiente, mais uma semana adicional a 2-8 °C baseia-se em testes internos com 90 amostras clínicas simuladas. Estas 90 amostras incluíam 40 que continham baixas concentrações de microrganismos de GC [no ou próximo do limite de detecção do ensaio (LOD)], 35 que apresentavam amostras moderadamente positivas (aproximadamente 2-5 vezes o LOD) e 5 amostras positivas altas que ultrapassavam 10 vezes o LOD. As restantes 10 amostras apresentaram um resultado negativo a infecção por GC. No entanto, 5 continham um elevado nível de microrganismos CT. As previsões de desempenho do ensaio baseiam-se em amostras conservadas a 2-8 °C ou congeladas e analisadas 1-2 semanas após a sua colheita.

### Notas:

1. Submeteu-se uma alíquota não desnaturada de cada uma das 90 amostras a temperaturas extremas, com vista a simular as condições de transporte (armazenamento a -20 °C durante 3 dias, e depois a 50 °C durante 5 dias e 2 semanas adicionais à temperatura ambiente). Embora se tenha observado uma perda de sinal (URL/VC) passados 8 dias nestas condições, a interpretação qualitativa dos resultados não foi afectada. Passadas as duas semanas adicionais de incubação à temperatura ambiente, não se observaram diferenças qualitativas com amostras que continham níveis baixos de microrganismos.
2. Para evitar que as tampas das amostras que são transportadas ou armazenadas congeladas saltem:
  - Cubra as tampas com Parafilm® antes de transportar as amostras previamente congeladas. As amostras podem ser transportadas congeladas ou a uma temperatura de 20-25 °C.
  - Quando retirar as amostras do congelador para realizar a análise, substitua imediatamente as tampas por tampas de rosca.
3. O *digene* HC2 DNA Collection Device não devem ser utilizados em mulheres grávidas. Recolha as amostras de mulheres grávidas utilizando apenas o *digene* Female Swab Specimen Collection Kit.

### AMOSTRAS CERVICAIS EM SOLUÇÃO HOLOGIC PRESERVCYT

As amostras recolhidas usando um dispositivo de recolha tipo vassoura e colocadas em solução Hologic PreservCyt para serem usadas na elaboração de lâminas Hologic ThinPrep® Pap Test podem ser usadas com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test. As amostras devem ser recolhidas da forma habitual e as lâminas ThinPrep® Pap Test devem ser preparadas de acordo com as instruções da Hologic.

As amostras em solução PreservCyt podem ser conservadas durante um mês à temperatura ambiente (20-25 °C), após a colheita e antes do processamento para o *digene* HC2 GC-ID DNA Test. As amostras de solução PreservCyt não podem ser congeladas. Para processar estas amostras, consulte o *Procedimento de preparação da amostra PreservCyt*.

## PROCEDIMENTO PARA O TESTE

**As amostras podem conter agentes infecciosos e devem ser manuseadas adequadamente.** O *digene* HC2 GC-ID DNA Test pode ser realizado manualmente, conforme indicado nas instruções de utilização ou utilizando o instrumento do sistema de captura rápida para o teste de um volume elevado de amostras.

### TESTE DE UM VOLUME ELEVADO DE AMOSTRAS UTILIZANDO O SISTEMA DE CAPTURA RÁPIDA

O sistema de captura rápida (RCS) é um sistema de pipetagem e diluição automático de utilização geral que se pode utilizar com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test para testar um volume elevado de amostras. Este sistema processa até 352 amostras em oito horas, incluindo um período de 3,5 horas durante o qual não é necessária qualquer intervenção do utilizador; podem obter-se até 704 resultados de amostras em 13 horas. A desnaturação das amostras em fase de preparação para o teste realiza-se independentemente do RCS, no tubo de colheita principal, conforme realizado no método manual do *digene* HC2 GC-ID DNA Test descrito em baixo, antes de o colocar na plataforma RCS. Além disso, a detecção do sinal por quimioluminescência e o relatório de resultados realizam-se utilizando o sistema do luminómetro autónomo aprovado pela QIAGEN, comum tanto ao método manual como ao do sistema RCS. Cada uma das fases do método analítico do *digene* HC2 GC-ID DNA Test realiza-se segundo a sequência exacta do procedimento da técnica manual. A aplicação RCS permite realizar, escalonadamente, o procedimento com até 4 microplacas, cada uma contendo amostras, bem como os calibradores e controlos de qualidade necessários ao ensaio.

**Quando utilizar o sistema de captura rápida, consulte o *manual do utilizador do sistema de captura rápida* fornecido com o instrumento, para além destas instruções de utilização, para obter as necessárias informações descritivas e sobre o procedimento.**

### MÉTODO MANUAL

#### Preparação

1. Aguarde pelo menos 60 minutos até o aquecedor de microplacas I estabilizar a uma temperatura de 65 °C ± 2 °C, a partir de uma temperatura inicial fria. Consulte o *manual do utilizador do aquecedor de microplacas I* para obter mais informações.
2. Certifique-se que o banho-maria está a 65 °C e que o nível de água é suficiente para mergulhar todo o volume dos tubos com as amostras.
3. Retire as amostras e **todos** os reagentes necessários do frigorífico **antes de iniciar o ensaio**. Deixe-os estabilizar durante 15 a 30 minutos até atingirem uma temperatura de 20-25 °C.
4. Crie um esquema de placas usando o software de análise de ensaios *digene* com protocolos de ensaio *digene* para GC. Consulte o manual do utilizador de software aplicável para obter mais detalhes.
5. O calibrador negativo, o calibrador positivo e os controlos de qualidade devem ser preparados **de novo** para cada ensaio. Misture bem os calibradores e os controlos de qualidade. Se utilizar o agitador tipo vortex MST 2, retire 500 µl de cada para tubos vazios destinados à colheita e correctamente rotulados. Alternativamente, retire 200 µl de cada para tubos de polipropileno de 2 ml para microcentrifuga correctamente rotulados.

6. **O calibrador negativo e o calibrador positivo devem ser analisados PRIMEIRO** em triplicado para cada lote de amostras a testar. Os controlos de qualidade e as amostras devem ser testados de uma só vez. Os calibradores, os controlos de qualidade e as amostras devem ser testados numa configuração em colunas de 8 micropoços, de modo a que as réplicas do calibrador negativo (CN) fiquem em A1, B1, C1; o calibrador positivo (CP) em D1, E1, F1; CQ CT em G1; CQ GC em H1; e depois as amostras começando em A2. Ver o exemplo de esquema em baixo. Consulte o manual do utilizador do luminómetro aprovado pela QIAGEN e o manual do utilizador do software de análise de ensaios *digene* aplicável para a preparação correcta no software do calibrador/controlo de qualidade/amostra.

**EXEMPLO DE UM ESQUEMA PARA UM TESTE DE 24 MICROPOÇOS:**

Linha	Coluna		
	1	2	3
A	CN	Am. 1	Am. 9
B	CN	Am. 2	Am. 10
C	CN	Am. 3	Am. 11
D	CP	Am. 4	Am. 12
E	CP	Am. 5	Am. 13
F	CP	Am. 6	Am. 14
G	CQ CT	Am. 7	Am. 15
H	CQ GC	Am. 8	Am. 16

## DESNATURAÇÃO

### Notas:

- **Cuidado:** O reagente de desnaturação é corrosivo. Use vestuário de protecção, luvas e equipamento protector para os olhos/face adequados. Tenha cuidado e use luvas sem pó de talco durante o seu manuseamento.
- **Importante:** Algumas amostras podem conter sangue ou outros materiais biológicos, que podem dissimular as alterações de cor após a adição do reagente de desnaturação. As amostras que apresentam uma cor escura antes da adição do reagente de desnaturação podem não produzir as alterações de cor adequadas nestas fases. Nestes casos, a não apresentação da alteração de cor apropriada não afecta os resultados do ensaio. A mistura correcta pode ser verificada, observando as alterações de cor dos calibradores e dos controlos de qualidade.
- Durante a fase de desnaturação, assegure-se que o nível de água no banho-maria é adequado para mergulhar todo o volume de amostra no tubo.
- As amostras podem ser preparadas durante a fase de desnaturação e armazenadas a uma temperatura de 2-8 °C de um dia para o outro, ou a uma temperatura de -20 °C durante até 3 meses. Pode realizar até um máximo de 3 ciclos de congelação/descongelação durante um período máximo de 2 horas à temperatura ambiente durante cada ciclo de descongelação. Misture bem antes de utilizar.
- Os calibradores e os controlos de qualidade podem ser preparados até à fase de desnaturação e armazenados a 2-8°C durante a noite, **mas não podem ser congelados**. Se forem congelados, terão de ser descartados.
- Após a desnaturação e a incubação, as amostras já não são consideradas como infecciosas.<sup>13</sup> No entanto, o pessoal do laboratório deve continuar a observar as precauções nacionais/locais.

## CALIBRADORES, CONTROLOS DE QUALIDADE E PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS STM

### Notas:

- Não retire o dispositivo de recolha das amostras antes da desnaturação.
- Para evitar resultados falsos-positivos, é fundamental que todos os calibradores, controlos de qualidade e amostras STM entrem em contacto com o reagente de desnaturação. A mistura após a adição de reagente de desnaturação é um passo muito importante: **assegure-se que o agitador tipo vortex de tubos multi-amostras 2 está regulado em 100 (velocidade máxima) e que observa um vortex visível de líquido durante a mistura, de forma a que o líquido cubra toda a superfície interna do tubo. Se realizar uma mistura manual, assegure-se que cada calibrador, controlo de qualidade e amostra é misturado individualmente, agitando no vortex durante, pelo menos, 5 segundos à velocidade máxima, de forma a que o vortex de líquido cubra toda a superfície interna do tubo, devendo depois inverter o tubo uma vez.**

1. Retire e descarte as tampas dos calibradores, dos controlos de qualidade e dos tubos de amostras STM.

**Nota:** As tampas retiradas dos tubos das amostras são consideradas como potencialmente infecciosas. Descarte-as de acordo com os regulamentos locais/nacionais aplicáveis.

2. Pipete o reagente de desnaturação com o corante indicador em cada calibrador, controlo de qualidade ou amostra STM, utilizando um pipetador de repetição ou ajustável. Tenha cuidado para não tocar nas partes laterais do tubo, pois pode ocorrer contaminação cruzada das amostras. O volume de reagente de desnaturação necessário é equivalente a metade do volume da amostra. Na tabela seguinte indica-se o volume exacto para cada tipo de calibrador, controlo de qualidade e amostra.

- **Dilua o restante reagente de desnaturação num frasco antes de descartar de acordo com os procedimentos laboratoriais nacionais/locais.**

Calibrador, controlo de qualidade ou amostra	Volume de reagente de desnaturação necessário
Calibrador negativo, calibrador positivo e controlo de qualidade, 200 µl	100 µl
Calibrador negativo, calibrador positivo e controlo de qualidade, 500 µl	250 µl
Amostra cervical, 1 ml	500 µl

3. Misture as amostras utilizando um dos dois métodos que se seguem.

#### Método de agitador tipo vortex de tubos multi-amostras 2

**Nota:** As amostras QIAGEN misturadas com o agitador tipo vortex MST 2 **têm de** ser hibridizadas usando a microplaca de hibridização e o método de aquecedor de microplacas I. Consulte o manual do utilizador do agitador tipo vortex MST 2 para obter instruções adicionais, caso seja necessário.

- a) Cubra os calibradores, controlos de qualidade e os tubos de amostras STM com parafilm DuraSeal<sup>®</sup>, puxando a película sobre os tubos no suporte.
- b) Coloque a tampa do suporte sobre os tubos cobertos com parafilm e bloqueie através dos dois clips laterais. Corte a película com o dispositivo de corte.
- c) Coloque o suporte no agitador tipo vortex de tubos multi-amostras 2 e fixe o suporte com o gancho. Verifique se a velocidade está regulada em 100 (velocidade máxima) e comute o vortex para a posição ON (ligado). Agite os tubos durante 10 segundos.

#### Método de agitação manual/individual de tubos

- a) Volte a tapar os calibradores, os controlos de qualidade e os tubos de amostras STM com tampas de rosca limpas.
- b) Misture bem cada tubo, agitando-o individualmente à velocidade máxima durante 5 segundos.
- c) Inverta cada tubo de amostra uma vez para cobrir todo o interior do tubo, a tampa e o rebordo.
- d) Volte a colocar o tubo no suporte.



4. Independentemente do método de agitador tipo vortex utilizado, **deve ser visível um vortex de líquido dentro de cada tubo durante a mistura, de forma a que o líquido cubra toda a superfície interna do tubo.** Os calibradores, controlos de qualidade e as amostras devem adquirir uma cor púrpura.
5. Incube os tubos no suporte num banho-maria a  $65 \pm 2$  °C durante  $45 \pm 5$  minutos (os calibradores, controlos de qualidade e as amostras desnaturados podem ser analisados imediatamente. Os calibradores e os controlos de qualidade podem ser armazenados a 2-8 °C de um dia para o outro de acordo com o descrito nas **Notas** em cima). Para mais informações sobre o armazenamento das amostras, consulte o *Ponto de paragem opcional*. Durante esta incubação, prepare a mistura de sondas GC. Consulte a secção de *Preparação e armazenamento dos reagentes*.

## PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO DA AMOSTRA EM SOLUÇÃO PRESERVCYT

### Notas:

- Consulte as instruções de utilização do dispositivo de conversão de amostras *digene* HC2 para obter pormenores mais completos.
- O processamento de uma alíquota de 4 ml de solução PreservCyt produz material suficiente para 2 testes, quando realizar o teste manualmente. O volume mínimo que pode ser processado é de 4 ml. Consulte a secção *Equivalência entre amostras em STM e em solução PreservCyt* para obter informações detalhadas sobre o volume residual mínimo.
- Prepare as amostras em solução PreservCyt em lotes de 36 ou menos; caso contrário, os *pellets* podem deslocar-se quando decantar o sobrenadante. Isto é importante para manter a integridade do *pellet* de células durante a fase de decantação. Se preparar frascos adicionais de solução PreservCyt, não inicie a sua preparação até ter terminado a preparação do primeiro lote.

Use ou o reagente de desnaturação (DNR) fornecido com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test (ver *Preparação e armazenamento de reagentes*) ou o DNR fornecido com o dispositivo de conversão de amostras *digene* HC2. Para preparar o DNR fornecido com o dispositivo de conversão de amostras *digene* HC2, adicione 3 gotas de corante indicador ao frasco de DNR e misture bem. A solução deve apresentar uma cor púrpura escura uniforme. Para determinar os requisitos do volume, utilize a Tabela 1.

**Tabela 1.** Requisitos de volume: Preparação do reagente.

Número de testes	Volume de solução PreservCyt	Volume do tampão para conversão
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

1. Rotule um tubo de conversão de amostras *digene* HC2, um tubo cónico Sarstedt de 10 ml ou um tubo cónico VWR ou Corning de 15 ml com o número correspondente de identificação da amostra.
2. Manuseie uma amostra de cada vez:
  - a. Agite o frasco de solução PreservCyt energicamente com a mão até as células parecerem estar homogeneamente dispersas.
  - b. Uma vez que as células se depositam muito rapidamente, pipete imediatamente o volume adequado de amostra em solução PreservCyt no tubo rotulado. Verta a solução PreservCyt no fundo do tubo cónico para minimizar a aderência do material celular na parte interior do tubo.
3. Adicione o volume adequado de tampão para conversão da amostra a cada tubo (ver a Tabela 1).
4. Volte a tapar e agite o conteúdo de cada tubo cuidadosamente usando um agitador tipo vortex com ligação para copo.

**Nota:** O procedimento com agitador tipo vortex MST 2 não foi validado para agitar amostras em solução PreservCyt com o tampão para conversão de amostras antes da centrifugação e não deve, por conseguinte, ser utilizado neste passo.

5. Centrifugue os tubos num centrífuga de cuba oscilante a  $2\ 900 \pm 150 \times g$  durante  $15 \pm 2$  minutos.
6. Durante a centrifugação, prepare a mistura de meio de transporte de amostras *digeneI*/reagente de desnaturação (STM/DNR) numa proporção de 2:1, de acordo com a Tabela 2.

**Nota: A mistura de STM/DNR tem de ser preparada de fresco todos os dias em que o teste é realizado.**

- a. Para determinar o volume total da mistura de STM/DNR necessário, utilize o volume inicial da amostra em solução PreservCyt como orientação e depois multiplique os volumes do STM e do DNR “por tubo” pelo número de amostras a processar (ver a Tabela 2).

**Tabela 2.** Requisitos de volume: STM/DNR.

Nº de testes	Volume de solução PreservCyt	Volume de STM por tubo para a mistura STM/DNR final*	Volume de DNR por tubo para a mistura STM/DNR final*	Mistura STM/DNR adicionada por 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

\* Os volumes indicados nestas colunas não devem ser directamente adicionados ao tubo da amostra.

- b. Agite cuidadosamente a solução no vortex.
7. Retire os tubos da centrífuga, um tubo de cada vez, e coloque-os num suporte ou no suporte de conversão. No fundo de cada tubo deve existir um *pellet* cor de rosa/laranja.  
**Nota:** As amostras que não apresentarem um *pellet* visível depois da centrifugação não são aceitáveis para o teste e devem ser descartadas.
  8. Manuseamento individual de cada tubo:
    - a. Retire a tampa e coloque-a de lado sobre uma toalha de papel com libertação reduzida de pêlo limpa.
    - b. Cuidadosamente, decante o sobrenadante.
    - c. Mantenha a posição invertida do tubo e seque suavemente (aproximadamente 6 vezes) sobre toalhas absorventes de papel com libertação reduzida de pêlo até que deixe de sair líquido pelo tubo. Use uma área limpa da toalha de cada uma das vezes. **Não deixe** o *pellet* de células deslizar pelo tubo durante a secagem.

**Notas:**

- Não seque na mesma área da toalha absorvente de papel com libertação reduzida de pêlo mais do que uma vez.
  - É importante retirar a quantidade máxima de solução PreservCyt durante a secagem. No entanto, é normal observar solução PreservCyt residual depois da secagem.
- d. Coloque o tubo num suporte ou no suporte de conversão.

## Agitação e desnaturação

### Procedimento do agitador tipo vortex manual

1. Adicione o volume adequado de STM/DNR a cada *pellet* (ver a Tabela 2). Volte a tapar cada tubo e ressuspenda os *pellets*, agitando cada tubo individualmente durante pelo menos 30 segundos à velocidade máxima. Se um *pellet* for difícil de ressuspender, agite durante mais 10-30 segundos ou até que o *pellet* flutue livremente no fundo do tubo. Se um *pellet* não se tiver dissolvido depois da agitação adicional (num total de 2 minutos no máximo), anote a identificação da amostra e prossiga para o passo seguinte.
2. Coloque os tubos num suporte.
3. Coloque o suporte num banho-maria a  $65 \pm 2$  °C durante  $15 \pm 2$  minutos. Assegure-se que o nível de água é suficiente para cobrir todo o líquido dentro dos tubos.
4. Retire o suporte com as amostras do banho-maria e agite as amostras, individualmente, durante 15-30 segundos.  
**Nota:** Assegure-se de que nesta fase todos os *pellets* estão completamente ressuspensos. As amostras que ainda apresentem *pellets* visíveis não são aceitáveis para o teste e devem ser descartadas.
5. Coloque novamente o suporte no banho-maria a  $65 \pm 2$  °C e prossiga a desnaturação durante mais  $30 \pm 3$  minutos.
6. Siga para a *Fase de hibridização*, conforme descrito em baixo ou consulte *Ponto de paragem opcional* para mais informações sobre o armazenamento e tratamento de amostras desnaturadas.

### Procedimento de agitador tipo vortex 2 de tubo multi-amostras (MST)

#### **Notas:**

- O procedimento de agitador tipo vortex 2 de tubos multi-amostras (MST) está validado para o processamento de amostras em solução PreservCyt depois da centrifugação e decantação do sobrenadante.
  - Somente o agitador tipo vortex 2 MST foi concebido para o processamento de amostras em solução PreservCyt.
  - O suporte e a tampa de conversão foram especificamente concebidos para receber tubos para conversão de amostras *digene* HC2 (tubos cónicos VWR ou Corning de 15 ml). O utilizador só deve utilizar um tipo de tubo de cada vez no suporte de conversão. Outras marcas não estão validadas para utilização.
  - É forçoso observar rigorosamente os tempos especificados de agitação do suporte e da tampa de conversão.
  - O suporte e a tampa de conversão não podem ser usados para agitar os calibradores ou controlos de qualidade do *digene* HC2 DNA Test. A altura dos tubos de STM impede a agitação adequada utilizando o suporte e a tampa de conversão.
1. Depois de secar cada tubo cónico de 15 ml rotulado, coloque cada um na sua posição correcta no suporte de conversão.
  2. Adicione o volume adequado de mistura de STM/DNR a cada *pellet* (Tabela 2).
  3. Cubra os tubos cónicos de 15 ml com parafilm DuraSeal colocando a película sobre os tubos do suporte.
  4. Coloque a tampa do suporte sobre os tubos cobertos com parafilm e bloqueie a tampa através dos dois clips laterais. Corte o parafilm com o dispositivo de corte depois de a tampa estar bem fixa.
  5. Desloque a alavanca de punho vermelho para cima de forma a ficar numa posição horizontal.

6. Posicione o suporte e a tampa de conversão no agitador tipo vortex 2 MST de forma a que o maior canto na diagonal do suporte de conversão fique localizado no canto direito da frente. Posicione o suporte e a tampa na plataforma do agitador tipo vortex 2 MST de forma a ficar firmemente encaixado nas guias. Prenda o suporte posicionado deslocando a alavanca de punho vermelho para baixo para a posição vertical. Isto bloqueará o suporte na posição correcta.
7. Verifique se a velocidade está regulada em 100 (velocidade máxima) e se o comutador Pulser está na posição OFF (desligado).
8. Rode o interruptor power do agitador tipo vortex para a posição ON (ligado). **Agite os tubos durante 30 segundos.**
9. Rode o interruptor power do agitador tipo vortex para a posição OFF.
10. Retire o suporte e a tampa do conversor do agitador tipo vortex 2 MST levantando a alavanca de punho vermelho.
11. Coloque o suporte num banho-maria a  $65 \pm 2$  °C durante  $15 \pm 2$  minutos. Assegure-se que o nível de água cobre completamente todo o líquido em todos os tubos.
12. Passados 15 minutos de incubação, retire o suporte com as amostras do banho-maria.
13. Para evitar salpicos, seque o excesso de água do suporte antes de o colocar no agitador tipo vortex 2 MST.
14. Fixe o suporte e a tampa de conversão no agitador tipo vortex 2 MST conforme descrito no *Passo 6*.
15. Verifique se a velocidade está regulada em 100 e comute o vortex para a posição ON. **Agite os tubos durante 1 minuto.**
16. Rode o interruptor power do agitador tipo vortex para a posição OFF.  
**Nota:** O procedimento do agitador tipo vortex 2 MST normaliza a velocidade, os tempos e o processo de agitação, eliminando a necessidade de verificar visualmente os *pellets* celulares, conforme é necessário quando utiliza o procedimento do agitador tipo vortex manual.
17. Coloque novamente o suporte no banho-maria a  $65 \pm 2$  °C e prossiga a desnaturação durante  $30 \pm 3$  minutos.
18. Retire o suporte do banho-maria, seque-o e fixe-o no agitador tipo vortex.
19. Rode o interruptor power do agitador tipo vortex para a posição ON. **Agite durante 10 segundos à velocidade máxima.**
20. Rode o interruptor power do agitador tipo vortex para a posição OFF. Retire o suporte.
21. Retire imediatamente a tampa do suporte e o parafilm DuraSeal das amostras.
22. Siga para a *Fase de hibridização*, conforme descrito em baixo ou consulte *Ponto de paragem opcional* para mais informações sobre o armazenamento e tratamento de amostras desnaturadas.

#### PONTO DE PARAGEM OPCIONAL

Depois da desnaturação, as amostras STM e amostras em solução PreservCyt convertidas podem ser armazenadas a uma temperatura de 2-8 °C de um dia para o outro ou a uma temperatura de -20 °C durante até 3 meses. No caso de refrigeração de um dia para o outro, as amostras podem ser deixadas no suporte de conversão, substituindo o parafilm DuraSeal e a tampa do suporte por novos. A tampa do suporte e o parafilm DuraSeal têm de ser retirados dos tubos e substituídos por tampas antes do armazenamento a -20 °C. Em qualquer dos casos, as amostras têm de ser estabilizadas a uma temperatura de 20 – 25 °C e cuidadosamente agitadas antes de passar à *fase de Hibridização*.

**Nota:** Não armazene nem transporte amostras desnaturadas em gelo seco.

Pode realizar até um máximo de 3 ciclos de congelação/descongelação durante um período máximo de 2 horas à temperatura ambiente durante cada ciclo de descongelação.

## HIBRIDIZAÇÃO

### Notas:

- A mistura de sondas GC é viscosa. Tenha o cuidado de garantir uma boa mistura e para que a quantidade necessária seja completamente distribuída em cada poço da microplaca de hibridização. Consulte a secção de *Preparação e armazenamento dos reagentes*.
- Se a amostra desnaturada teve sido armazenada a uma temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , então deixe a amostra descongelar a  $20\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$  e agite-a bem antes de realizar a hibridização.
- Antes da sua utilização, o aquecedor de microplacas I deve ser previamente aquecido a uma temperatura de  $65 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante pelo menos 60 minutos. Consulte o *manual do utilizador do aquecedor de microplacas I* para obter mais instruções à medida que forem necessárias.

1. Obtenha e rotule a microplaca de hibridização.
2. Retire os calibradores, controlos de qualidade e as amostras do banho-maria após a incubação. Se estiver a utilizar o agitador tipo vortex de tubos multi-amostras 2, agite todo o suporte de amostras STM durante, pelo menos, 5 segundos à velocidade máxima. No caso de amostras em solução PreservCyt, agite todo o suporte de conversão durante um mínimo de 10 segundos à velocidade máxima. Alternativamente, agite cada tubo individualmente durante, pelo menos, 5 segundos.
3. Pipete  $75\text{ }\mu\text{l}$  de cada calibrador, controlo de qualidade ou amostra para o **fundo** do poço da microplaca de hibridização vazia, de acordo com o esquema de placas criado na secção Preparação. Evite tocar nas paredes dos poços e limite a formação de bolhas de ar. Utilize uma ponta de pipeta extra longa limpa para cada transferência, de forma a evitar a contaminação cruzada dos calibradores, controlos de qualidade ou das amostras. Para amostras STM, não retire o dispositivo de recolha de amostras do tubo de transporte de amostras. As amostras desnaturadas podem ser tapadas com tampas de rosca e armazenadas com os dispositivos de colheita de amostras que se encontram nos tubos. As amostras PreservCyt desnaturadas podem ser tapadas novamente com as suas tampas originais.

### Notas:

- **Podem verificar-se resultados falsos-positivos se as alíquotas das amostras não forem cuidadosamente transferidas. Durante a transferência da amostra, não toque com a ponta da pipeta na parte interior do tubo quando remover  $75\text{ }\mu\text{l}$  de alíquota.**

4. Depois de transferir a última amostra, cubra a placa com a tampa e **incube a microplaca de hibridização durante 10 minutos a uma temperatura de  $20\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .**
5. Deite as alíquotas da mistura de sondas preparada e cuidadosamente agitada num reservatório de reagente descartável. Com cuidado, pipete  $25\text{ }\mu\text{l}$  da mistura de sondas para cada poço contendo os calibradores, controlos de qualidade e amostras, utilizando um pipetador de 8 canais e pontas novas para cada linha. Adicione o volume da mistura de sondas a cada poço de hibridização, evitando que salpique. Evite tocar nas paredes dos poços.  
**Nota:** Para o passo em cima, utilize um pipetador de 8 canais equipado com pontas de  $25\text{-}200\text{ }\mu\text{l}$  e capaz de administrar  $25\text{-}75\text{ }\mu\text{l}$ . Para um pequeno número de poços, utilize um pipetador de canal único (equipado com pontas  $25\text{-}200\text{ }\mu\text{l}$ ) em vez do pipetador de 8 canais.
6. Cubra a microplaca de hibridização com uma tampa de placas. Agite a microplaca de hibridização no misturador rotativo I regulado em  $1100 \pm 100\text{ rpm}$  durante  $3 \pm 2$  minutos. *Os calibradores, controlos de qualidade e as amostras devem adquirir uma cor amarela depois de agitados.* Os poços que permanecem púrpura podem não ter recebido a quantidade adequada de mistura de sondas. Adicione mais  $25\text{ }\mu\text{l}$  de mistura de sondas às amostras que permaneceram púrpura e volte a agitar. Se os poços se mantiverem púrpura depois deste procedimento deverá testar novamente as amostras.
7. Incube num aquecedor de microplacas I previamente aquecido e estabilizado a uma temperatura de  $65 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $60 \pm 5$  minutos.

### Notas:

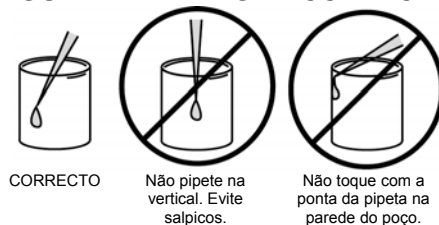
- Quando colocar a microplaca de hibridização no aquecedor de microplacas I, tenha o cuidado de não salpicar.

- Depois de agitar, as amostras em solução PreservCyt devem apresentar uma cor rosa em vez de amarela.

## CAPTURA HÍBRIDA

1. Retire todos os poços da microplaca de captura que não são necessários da estrutura da placa. Volte a colocar os micropoços não utilizados na embalagem original e volte a selar. Com um marcador, numere cada coluna 1, 2, 3. . . e rotule a microplaca com um identificador adequado. As amostras serão adicionadas aos poços de acordo com o esquema de exemplo anteriormente preparado na secção *Preparação*.
2. Cuidadosamente, retire a microplaca de hibridização que contém os calibradores, os controlos de qualidade e as amostras do aquecedor de microplacas I. Remova imediatamente a tampa da placa e coloque-a sobre uma superfície limpa.
3. Transfira todo o conteúdo (aproximadamente 100 µl) dos calibradores, dos controlos de qualidade e das amostras dos poços da microplaca de hibridização para o fundo do micropoço correspondente de captura, utilizando um pipetador de 8 canais. Utilize pontas de pipeta novas no pipetador de 8 canais para cada coluna transferida e esvazie bem cada ponta para assegurar a transferência completa da amostra. Se desejado, o pipetador pode ser apoiado, colocando o **centro** das pontas das pipetas no rebordo superior dos micropoços de captura (ver a *figura 1*).

**FIGURA 1: PIPETAGEM CORRECTA**



4. Cubra a microplaca com a tampa e agite no misturador rotativo I a  $1100 \pm 100$  rpm, a uma temperatura de  $20-25$  °C durante  $60 \pm 5$  minutos.
5. Durante esta incubação, prepare o tampão de lavagem e, se aplicável, verifique os reservatórios de enxaguamento e de resíduos do lavador de placas automático. Consulte a secção de *Preparação e armazenamento dos reagentes*.
6. Quando o procedimento de captura estiver concluído, retire a microplaca de captura do misturador rotativo I e, cuidadosamente, remova a tampa. Retire o líquido dos poços, deitando-o para um lavatório: inverta completamente a placa sobre o lavatório e agite com força para baixo, tendo cuidado para não salpicar, o que acontece quando realiza esta operação demasiado perto do fundo do lavatório. **Não volte a virar a placa para cima**; seque batendo firmemente 2-3 vezes sobre papel absorvente Kimtowels® ou toalhas de papel com libertação reduzida de pêlo equivalentes. Assegure-se que todo o líquido é removido dos poços e que a parte superior da placa está seca.

## DETECÇÃO HÍBRIDA

### Notas:

- Faça adições ao longo da placa, da esquerda para a direita, utilizando um pipetador de 8 canais.
- Recomenda-se a utilização da técnica de pipetagem inversa para melhorar a uniformidade da distribuição de reagente. Com esta técnica, as pontas das pipetas são inicialmente enchidas ao máximo, usando a segunda paragem do êmbolo de aspiração/esvaziamento do pipetador. Consulte o procedimento em baixo. Limpe as pontas no reservatório de reagente ou numa toalha absorvente de papel limpa com libertação reduzida de pêlo para remover o excesso de líquido antes de o transferir para a placa.
- Se desejado, o pipetador pode ser apoiado, colocando o centro das pontas das pipetas no rebordo superior dos micropoços. Tenha cuidado para não tocar nas partes laterais dos micropoços, pois pode ocorrer contaminação cruzada das amostras. Consulte a figura 1 em cima.

1. Transfira uma alíquota com o volume adequado de reagente de detecção 1 para um reservatório de reagente (consulte a secção *Preparação e armazenamento dos reagentes* para mais instruções). Cuidadosamente, pipete 75 µl de reagente de detecção 1 para cada poço da microplaca de captura, utilizando um pipetador de 8 canais e a técnica de pipetagem inversa descrita em baixo.

Técnica de pipetagem inversa:

- a) Ligue as pontas ao pipetador de 8 canais e assegure-se que todas as pontas estão firmemente colocadas.
  - b) Empurre o êmbolo do pipetador para além da primeira paragem e até à segunda.
  - c) Introduza as pontas na solução de reagente de detecção 1.
  - d) Solte o êmbolo lentamente e deixe que a solução encha as pontas.
  - e) Distribua a solução pelos micropoços (75 µl), pressionando o êmbolo até à primeira paragem. Não solte o êmbolo até que as pontas das pipetas tenham voltado a ser introduzidas na solução de reagente de detecção 1.
  - f) Volte a encher as pontas e repita até todos os poços estarem cheios. Encha os poços da microplaca da esquerda para a direita. *Verifique se encheu correctamente todos os poços observando a intensidade da cor rosa. Todos os poços devem apresentar uma intensidade idêntica.*
2. Cubra a placa com a tampa e incube a uma temperatura de 20-25 °C durante 30-45 minutos.

## LAVAGEM

Lave a placa de captura utilizando um dos dois métodos que se seguem.

### MÉTODO DE LAVADOR DE PLACAS AUTOMÁTICO

**Nota:** Mantenha sempre o lavador de placas automático ligado. Assegure-se que o reservatório de enxaguamento está cheio e que o reservatório de resíduos está vazio. O lavador de placas automático irá enxaguar, regularmente, o sistema para sua limpeza. Consulte o manual do utilizador do lavador de placas automático para obter mais instruções, se necessário.

### ANTES DE CADA UTILIZAÇÃO:

- Verifique se o reservatório de lavagem está cheio, pelo menos, até à marca de 1 l com solução de tampão de lavagem. Caso contrário, prepare a solução de tampão de lavagem. Consulte a secção de *Preparação e armazenamento dos reagentes*.
  - Verifique se o reservatório de enxaguamento está cheio com água destilada ou desionizada.
  - Verifique se o reservatório de resíduos está vazio e se a tampa está bem enroscada.
  - O lavador de placas automático prepara-se automaticamente antes de cada lavagem e enxagua-se depois de cada lavagem.
1. Retire a tampa da placa e coloque a placa na plataforma do lavador de placas automático.
  2. Verifique se está ligado e se o mostrador apresenta a indicação “Digene Wash Ready” ou “P1.”.  
**Nota:** Se apenas utilizar uma tira parcial dos poços de captura, os poços vazios das microplacas terão de ser colocados na placa de captura para completar a coluna antes da lavagem. Consulte a secção *Acessórios* para obter informações sobre encomendas.
  3. Seleccione o número de tiras a lavar, pressionando a tecla “Rows” e depois “+” ou “-” para regular. Pressione a tecla “Rows” para regressar a “Digene Wash Ready” ou “P1.”.
  4. Pressione “Start/Stop” para iniciar a lavagem.
  5. O lavador de placas automático necessita de seis ciclos de enchimento e aspiração, o que demora aproximadamente 10 minutos. Durante o programa, verifica-se uma breve pausa, portanto assegure-se que não retira a placa prematuramente. Quando o lavador de placas automático terminar a lavagem, surgirá a indicação “Digene Wash Ready” ou “P1.” no mostrador.
  6. Retire a microplaca do lavador quando o programa terminar. A placa deve estar branca, não devendo existir qualquer líquido residual cor de rosa nos micropoços.

## MÉTODO DE LAVAGEM MANUAL

**Nota:** Uma lavagem inadequada provocará um sinal de fundo aumentado e pode dar origem a resultados falsos-positivos (devido a fosfatase alcalina residual). Para garantir uma lavagem eficaz com o aparelho de lavagem, este deve ser colocado a, pelo menos, 61 cm e não mais de 91 cm acima da área de lavagem, de forma a que a placa fique entre 61 cm e 91 cm abaixo do aparelho de lavagem durante esta operação. A torneira do aparelho de lavagem deve ser rodada para a posição “aberta” quando estiver a ser utilizado e para a posição “fechada” quando não estiver a ser utilizado. Durante a utilização, o aparelho de lavagem tem de conter, no mínimo, 1,0 l de tampão de lavagem para garantir uma pressão adequada.

1. Retire o reagente de detecção 1 dos poços, colocando papel absorvente Kimtowels ou toalhas de papel com libertação reduzida de pêlo equivalentes sobre a placa e invertendo cuidadosamente. Antes de inverter, assegure-se que o papel está em contacto com toda a superfície da placa. Deixe a placa escorrer durante 1-2 minutos. Seque bem com papel absorvente Kimtowels ou toalhas de papel com libertação reduzida de pêlo equivalentes. Cuidadosamente, descarte as toalhas de papel com libertação reduzida de pêlo usadas para evitar a contaminação dos últimos procedimentos por fosfatase alcalina.
2. Quando utilizar o aparelho de lavagem, lave a placa manualmente 6 vezes. Cada poço é lavado até transbordar para remover o líquido capturado da parte superior dos poços. A lavagem inicia-se no poço A1 e prossegue em ziguezague para a direita e para baixo. Depois do enchimento de todos os poços, escorra o líquido para o lavatório com um forte movimento descendente. A segunda lavagem inicia-se no poço H12 com um movimento de ziguezague para a esquerda e para cima. Esta sequência de 2 lavagens repete-se mais 2 vezes, num total de 6 lavagens por poço.
3. Depois da lavagem, seque a placa invertendo-a sobre papel absorvente Kimtowels ou toalhas de papel com libertação reduzida de pêlo equivalentes e batendo-lhe firmemente 3-4 vezes. Substitua as toalhas de papel de libertação reduzida de pêlo e seque novamente. Deixe a placa invertida a escorrer durante 5 minutos. Seque a placa mais uma vez.
4. A placa deve estar branca, não devendo existir qualquer líquido residual cor de rosa nos micropoços.

## AMPLIFICAÇÃO DO SINAL

### Notas:

- Use um novo par de luvas sem pó de talco para manusear o reagente de detecção 2.
  - Transfira uma alíquota com **apenas** a quantidade de reagente necessária à realização do ensaio para o reservatório de reagente, de forma a evitar a contaminação do reagente de detecção 2. Consulte a secção de *Preparação e armazenamento dos reagentes*. **NÃO VOLTE a colocar o reagente de detecção 2 no frasco original. Descarte todo o material que não tenha sido utilizado.**
  - A adição do reagente de detecção 2 deve ser realizada sem interrupções. O tempo de incubação de todos os poços deve ser tão uniforme quanto possível.
  - Tenha cuidado para não tocar nas paredes dos micropoços nem salpicar as pontas com reagente, uma vez que pode ocorrer contaminação cruzada das amostras (ver a Figura 1).
1. Cuidadosamente, pipete 75 µl de reagente de detecção 2 para cada poço da microplaca de captura, utilizando um pipetador de 8 canais e a técnica de pipetagem inversa anteriormente descrita. *Todos os micropoços devem adquirir uma cor amarela.* Verifique se encheu correctamente todos os poços observando a intensidade da cor. Todos os poços devem apresentar uma intensidade idêntica.
  2. Cubra as microplacas com a respectiva tampa ou parafilm limpo (ou equivalente) e incube a uma temperatura de 20-25 °C durante 15 minutos. Evite a exposição a luz solar directa.
  3. Faça a leitura da microplaca no luminómetro aprovado pela QIAGEN após 15 minutos de incubação (e nunca passados mais de 30 minutos de incubação).
  4. O software de análise de ensaios *digene* permite a introdução da informação relevante do ensaio directamente no software.



5. Se não tiver sido utilizada uma microplaca completa, retire os micropoços usados do suporte da microplaca, enxágue bem o suporte com água desionizada, seque e guarde para o ensaio seguinte.

## **CRITÉRIOS DE VERIFICAÇÃO DA CALIBRAÇÃO DO ENSAIO**

A verificação da calibração do ensaio é realizada para garantir que os reagentes e os materiais do calibrador e do controlo de qualidade fornecidos estão a funcionar adequadamente, permitindo a determinação rigorosa do valor de corte do ensaio. Os critérios de verificação são automaticamente calculados e verificados como válidos ou inválidos pelo software de análise de ensaios *digene*. O *digene* HC2 GC-ID DNA Test requer a calibração com cada ensaio. Por conseguinte, é necessário verificar cada ensaio utilizando os seguintes critérios. Este procedimento de verificação não se destina a substituir o controlo de qualidade interno do teste.

### 1. Calibrador negativo

O calibrador negativo tem de ser testado em triplicado para cada ensaio. O valor médio de URL do calibrador negativo tem de ser  $\geq 10$  e  $\leq 150$  URL para poder continuar. O coeficiente de variação (%CV) das réplicas do calibrador negativo tem de ser  $\leq 25\%$ . Se o %CV for  $> 25\%$ , o software descartará a réplica com o valor de URL mais afastado da média como valor atípico e voltará a calcular a média e o %CV utilizando as duas réplicas restantes. O %CV novamente calculado deve ser  $\leq 25\%$ ; caso contrário, **a verificação de calibração do ensaio é inválida e o ensaio do teste tem de ser repetido para todas as amostras das doentes. Da mesma forma, os resultados das amostras das doentes não devem ser registados.**

### 2. Calibrador positivo

O calibrador positivo tem de ser testado em triplicado para cada ensaio. O %CV das réplicas do calibrador positivo deve ser  $\leq 20\%$ . Se o %CV for  $> 20\%$ , o software descartará a réplica com o valor de URL mais afastado da média como valor atípico e voltará a calcular a média e o %CV utilizando as duas réplicas restantes. O %CV novamente calculado deve ser  $\leq 20\%$ ; caso contrário, **a verificação de calibração do ensaio é inválida e o ensaio do teste tem de ser repetido para todas as amostras das doentes. Da mesma forma, os resultados das amostras das doentes não devem ser registados.**

### 3. Quociente da média CP/média CN

A média das réplicas do calibrador positivo (média CP) e a média das réplicas do calibrador negativo (média CN) são usadas para calcular o quociente da média CP/média CN. O software calculará o quociente da média CP/média CN. Este quociente tem de cumprir os seguintes critérios para verificar a calibração dos ensaios **antes de se poder interpretar os resultados das amostras**. Se o quociente for  $\geq 2,0$  e  $\leq 20$ , o software calculará o valor de corte. Se o quociente for  $< 2,0$  ou  $> 20$ , **a calibração do ensaio é inválida e o ensaio tem de ser repetido para todas as amostras das doentes. Da mesma forma, os resultados das amostras das doentes não devem ser registados.**

**Nota:** Para determinar a reprodutibilidade dos calibradores do *digene* HC2 GC-ID DNA Test, foram compilados os resultados gerados com o luminómetro de microplacas *digene* 2000 (DML 2000) durante estudos internos envolvendo 62 ensaios realizados utilizando a aplicação do sistema de captura rápida e 43 ensaios utilizando o método manual (Tabela 3). Os resultados mostraram que o %CV médio do calibrador positivo destes 105 ensaios foi igual ou inferior a 6,5% e que o %CV médio do calibrador negativo foi igual ou inferior a 14,6%. Conforme indicado pelo valor médio de URL de 43 do calibrador negativo médio, obtido nos ensaios manuais do teste, comparativamente à média de 54 da aplicação RCS, a aplicação RCS demonstrou valores de URL do calibrador negativo ligeiramente deslocados para cima relativamente ao método manual. Este deslocamento demonstrou não ter qualquer influência nos resultados do teste gerados usando qualquer um dos métodos opcionais. A média do limite de URL do calibrador negativo foi definida como 250 URL, com base num cálculo estatístico com um desvio padrão (DP) de  $\pm 3$  do valor médio de URL do calibrador negativo observado no sistema do *digene* HC2 CT/GC DNA Test durante os extensivos testes realizados durante o desenvolvimento da aplicação de RCS. O limite superior deste desvio padrão de  $\pm 3$  foi aumentado em mais 20% para garantir que se alcança um limite URL do calibrador negativo (URL CN) na prática clínica habitual.

O valor médio de URL do calibrador negativo deve observar-se habitualmente em  $\leq 150$  e o CV  $\leq 25\%$ . Cada laboratório deve verificar o desempenho do controlo de qualidade e da calibração de acordo com o documento C24-2A do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). A média de URL com a aplicação de RCS pode, ocasionalmente, ultrapassar 150, possivelmente com a diminuição correspondente do quociente CP/CN, que demonstrou produzir, de acordo com a tabela 3, um valor médio da calibração de 8,29. Neste caso, os resultados são aceitáveis sempre que o URL do calibrador negativo se mantenha  $\leq 250$  e o quociente CP/CN seja  $\geq 2,0$ . Se o valor de URL do calibrador negativo (URL CN) ultrapassar 250 ou o quociente CP/CN for inferior a 2,0 ou superior a 20, o ensaio é inválido.

**Tabela 3.** Resumo estatístico dos valores do calibrador negativo e do calibrador positivo dos ensaios tratados com a aplicação RCS e com o método manual.

Método	Nº de placas	Médias CP/CN calculadas				Controlos de qualidade do kit de teste (média URL/VC)	
		Média	Mediana	Mín.	Máx.	CQ CT	CQ 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	Médias URL calculadas				Média de %CV calculado
		Média	Mediana	Mín.	Máx.	
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 DE CUTOFF

Uma vez verificado um ensaio de acordo com os critérios acima indicados, as réplicas válidas do calibrador positivo serão utilizadas para estabelecer os valores URL/de corte e determinar as amostras que são positivas. Os os valores URL/de corte são calculados da seguinte forma:

Valor de corte URL = média do calibrador positivo URL

Exemplo do cálculo de cutoff:

	Valores de URL de CN	Valores de URL de CP
	97	312
	101	335
	91	307
Valor médio	96	318
%CV	4,9	4,7
Média CP/média CN	N/A	3,31

Por conseguinte, o valor de corte URL é (CP médio) = 318

Os valores de URL para todas as amostras serão convertidos num quociente para o valor de corte URL (VC) adequado pelo software de análise de ensaios *digene*. Por exemplo, todos os ensaios devem ser representados sob a forma de URL/VC amostra.

**Nota:** Os valores de URL/VC e os resultados positivos/negativos de todas as amostras analisadas serão incluídos no relatório de análise dos dados do software de análise de ensaios *digene*.

### CONTROLO DE QUALIDADE

As amostras de controlo de qualidade são fornecidas com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Consulte o manual do utilizador do software de análise de ensaios *digene* para obter instruções para introduzir os números de lote dos controlos de qualidade e sobre as datas de validade dos controlos de qualidade. Estes controlos têm de ser incluídos em cada ensaio e os valores de URL/VC de cada controlo de qualidade têm de cumprir os seguintes intervalos aceitáveis para que o ensaio possa ser considerado válido. **Se os controlos de qualidade não se inserirem nestes intervalos, o ensaio é inválido e tem de ser repetido.** Da mesma forma, nenhum resultado de doente deve ser registado no caso de ensaios inválidos.

	CQ CT	CQ GC
URL/VC mínimo	0	1,0
URL/VC máximo	0,9999	20,00
%CV máximo	20,00	20,00

1. Os controlos de qualidade fornecidos com o kit são alvos de ADN de CT e de GC clonados, constituídos pela mesma estrutura de plasmídeos para cada microrganismo individual (um de CT e outro de GC), da mesma forma que o calibrador positivo fornecido com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test.
2. Este material de controlo de qualidade não é o mesmo que o microrganismo de GC na matriz da amostra e não constitui um controlo adequado para o meio de transporte de amostras *digene* ou solução PreservCyt.
3. O calibrador positivo é utilizado para normalizar os resultados das amostras, estabelecendo o valor de corte URL. Os controlos de qualidade fornecidos com este dispositivo têm de ser utilizados para controlo de qualidade interno. Os controlos de qualidade adicionais podem ser testados em conformidade com as orientações ou regulamentos locais e/ou nacionais ou de organizações reconhecidas.
4. Para testar a eficácia da lise e desnaturação da amostra, os laboratórios deverão criar, periodicamente, controlos da preparação das amostras adicionando  $\geq 5000$  CFU/ml de *Neisseria gonorrhoeae* (auxotipo 1, 5 ou estirpe Tipo de ATCC) a um novo tubo de STM. Incube a amostra durante, pelo menos, 1 hora à temperatura ambiente antes de testar da mesma forma que uma amostra clínica. Deve obter-se um URL/VC  $\geq 2,50$  se a amostra for correctamente processada. Alternativamente, para o efeito pode também utilizar painéis de teste de amostras disponíveis no mercado que contenham microrganismo GC.
5. Os intervalos aceitáveis para os calibradores e controlos de qualidade foram estabelecidos apenas para os luminómetros aprovados pela QIAGEN. O calibrador negativo e os controlos de qualidade detectam uma ineficácia considerável dos reagentes e não garantem a precisão do ensaio.

## INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS DE AMOSTRAS

Segundo os critérios do *digene* HC2 GC-ID DNA Test:

1. As amostras com quocientes URL/VC  $\geq 2,50$  são consideradas como “Positivas para o ADN de *Neisseria gonorrhoeae*.” A viabilidade e/ou capacidade de infecção do microrganismo não pode ser apurada, uma vez que o ADN alvo pode persistir na ausência de microrganismos viáveis.
  2. As amostras com quocientes de URL/VC  $< 1,00$  não contêm ADN de *Neisseria gonorrhoeae* nem contêm níveis de ADN inferiores ao limite de detecção do ensaio. Estas devem ser interpretadas como “Sem ADN de *Neisseria gonorrhoeae* detectado.” Um resultado negativo não exclui uma infecção por *Neisseria gonorrhoeae*, uma vez que os resultados dependem da colheita adequada da amostra e ADN suficiente para a sua detecção.
  3. As amostras com quocientes URL/VC  $\geq 1,00$  e de  $< 2,50$  são consideradas como equívocas. Os resultados podem ser considerados como, presumivelmente, positivos relativamente a ADN de *Neisseria gonorrhoeae*. No entanto, recomenda-se a repetição do teste de uma nova amostra da doente ou a realização do teste segundo um procedimento alternativo, devido ao reduzido valor de previsão de um resultado positivo com estes valores de URL/VC.\*
  4. Recomenda-se a confirmação dos resultados positivos através de outro método se duvidar ou questionar a possibilidade de infecção por *Neisseria gonorrhoeae* quando considerar os resultados clínicos ou laboratoriais. Estudos analíticos com este teste demonstraram uma reactividade cruzada limitada a determinadas sequências de ADN que poderiam produzir um resultado positivo falso. Para mais informações, consulte a secção Especificidade analítica.
- \* Durante a avaliação clínica do *digene* HC2 GC-ID DNA Test, 3/17 resultados nesta gama equívoca foram confirmados como positivos por teste em cultura; as restantes 14 verificaram-se serem aparentemente falsos positivos. Numa avaliação posterior, 5 amostras apresentaram um URL/VC inicial entre 1,00 e 2,50, três das quais positivas por cultura de GC. A repetição dos testes com estas três amostras com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test apresentou resultados com URL/VC  $\geq 1,00$ . As restantes 2 demonstraram ser negativas em cultura e igualmente negativas quando repetido o teste duas vezes com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test.

## LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Consulte o *manual do utilizador do sistema de captura rápida* as limitações adicionais ao procedimento específicas e relativas à utilização desse sistema para analisar um volume elevado de amostras.

- Para utilização em diagnósticos *in vitro*.
- De forma a obter resultados fiáveis no teste, o procedimento para o teste, o controlo de qualidade e a interpretação de resultados de amostras do *digene* HC2 GC-ID DNA Test têm de ser rigorosamente observados.
- O *digene* HC2 GC-ID DNA Test só pode ser utilizado com amostras cervicais recolhidas utilizando o *digene* HC2 DNA Collection Device e colocadas em STM, com amostras cervicais recolhidas com a *digene* Female Swab Specimen Collection Kit e colocadas em STM ou com amostras recolhidas por um dispositivo tipo vassoura e colocadas em solução Hologic PreservCyt.
- Os resultados deste teste devem ser interpretados apenas em conjunto com a informação obtida a partir de outras avaliações clínicas da doente e de outros procedimentos.
- O *digene* HC2 GC-ID DNA Test fornece resultados qualitativos. Não se demonstrou que o valor numérico (quociente) acima do valor de corte determinado para a amostra da doente esteja correlacionado com a quantidade de ADN de GC presente na amostra da doente.
- Um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção por *Neisseria gonorrhoeae*, uma vez que a detecção depende do número de microrganismos presentes na amostra e pode ser afectada pelos métodos de colheita da amostra, pelo estado da infecção e/ou a estirpe de *Neisseria gonorrhoeae* infectada.
- O *digene* HC2 GC-ID DNA Test não se destina a determinar o sucesso terapêutico.
- O *digene* HC2 GC-ID DNA Test só foi validado utilizando o lavador de placas automático com os valores especificados nas instruções do ensaio. Este estudo de validação foi realizado internamente e os dados que apoiam a sua utilização encontram-se nos arquivos da QIAGEN. A utilização de outros lavadores de placas ou com outros valores não é aceitável com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test.
- Para minimizar a variabilidade dos resultados obtidos com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test, é necessário que o pessoal do laboratório que realiza o ensaio disponha de um nível aceitável de competência técnica. Cada laboratório deve também verificar a competência técnica com o ensaio. Para o efeito, sugere-se a análise periódica de painéis de teste de amostras disponíveis no mercado que contenham microrganismo de GC e de ou o ADN de GC, em conformidade com os procedimentos de qualidade do laboratório.

## PREVISÃO DE RESULTADOS

### PREVALÊNCIA

A prevalência de amostras positivas de *Neisseria gonorrhoeae* varia em função das características da população, tal como idade, sexo e factores de risco. A prevalência de *Neisseria gonorrhoeae* observada na população do estudo clínico com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test variou entre 1,1% e 13,0%. A prevalência foi calculada assumindo que as 17 amostras com resultados equívocos no estudo eram positivas relativamente a ADN de GC (tabela 4). Oito dessas 17 amostras foram consideradas como positivas por cultura de GC ou reacção em cadeia de polimerase (PCR).

**Tabela 4.** Prevalência de resultados positivos do *digene* HC2 GC-ID DNA Test por centro de análise.

Centro de análise	Nº de positivas/testadas	Prevalência (%)
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 DE PREVISÃO POSITIVO E NEGATIVO

Os hipotéticos valores positivos e negativos de previsão (PPV e NPV) para diferentes taxas de prevalência com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test foram calculados utilizando a sensibilidade e especificidade global, determinadas individualmente para as amostras recolhidas com o *digene* HC2 DNA Collection Device (escova cervical) e para as amostras recolhidas com o *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (cotonete). A tabela 5 representa os PPV e NPV hipotéticos para amostras recolhidas com escova (sensibilidade global de 92,6% e especificidade global de 98,5%) e a tabela 6 representa os PPV e NPV hipotéticos para amostras recolhidas com o cotonete (sensibilidade global de 93,0% e especificidade global de 98,8%).

**Tabela 5.** Valores hipotéticos de previsão do *digene* HC2 GC-ID DNA Test com diferentes taxas de prevalência (escova).

Taxa de prevalência (%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	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	99,6

**Tabela 6.** Valores hipotéticos de previsão do *digene* HC2 GC-ID Test com diferentes taxas de prevalência (cotonete).

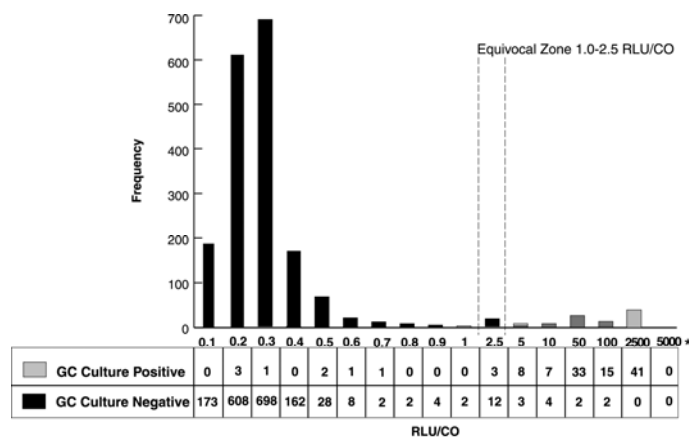
Taxa de prevalência (%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	93,0	98,8	79,8	99,7
10	93,0	98,8	88,3	99,4
15	93,0	98,8	91,6	99,1
20	93,0	98,8	93,3	98,7

### DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS: RESULTADOS URL/VC DO *digene* HC2 GC-ID DNA TEST

A distribuição dos quocientes URL/VC com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test observados durante o estudo clínico em vários centros é a seguir indicada (figura 1). Estes dados incluem amostras nas quais foi realizado o *digene* HC2 GC-ID DNA Test e para as quais existem resultados da cultura de GC (n=1826). A interpretação dos resultados foi realizada com os seguintes critérios: As amostras com valores de URL/VC < 1,00 foram consideradas como negativas. As amostras com valores de URL/VC ≥ 2,50 foram consideradas como positivas. As amostras com URL/VC ≥ 1,00 e de < 2,50 são consideradas como equívocas.

Observa-se uma separação clara dos quocientes de URL/VC entre os resultados positivos e os resultados negativos obtidos com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Noventa e nove por cento (1676/1690) dos resultados negativos obtidos com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test apresentam valores de URL/VC entre 0,0 e 0,5. Cinco (5/1690) dos resultados considerados como negativos com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test apresentaram um URL/VC entre 0,6 e 0,8. Globalmente, menos de um por cento < 0,9%, 17/1825) dos resultados das amostras recaíram na zona equívoca do ensaio, 47% (8/17) dos quais considerados como positivos por cultura de GC ou PCR. Oitenta e nove por cento (93/104) dos resultados positivos obtidos com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test apresentam valores de URL/VC entre 10 -2500.

**Figura 1.** Distribuição de frequências dos resultados de URL/VC com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test.



\*Indica a gama superior e inferior, incluindo o valor apurado.

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

### RESULTADOS DO ENSAIO CLÍNICO POR AMOSTRA

As características de desempenho do *digene* HC2 GC-ID DNA Test foram determinadas por comparação com os resultados do ensaio com os resultados de culturas de gonorreia. Testaram-se mil e oitocentas e vinte e cinco (1825) amostras de doentes em 5 centros diferentes incluindo clínicas de DST, planeamento familiar e de obstetria e ginecologia. O teste de PCR foi depois realizado com amostras positivas e negativas em cultura e negativas por DFA com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Os resultados do *digene* HC2 GC-ID DNA Test NÃO foram clarificados pelos resultados do teste PCR e, por conseguinte, o PCR não influencia os cálculos das características de desempenho do *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Os resultados do ensaio clínico de amostras recolhidas com o *digene* HC2 DNA Collection Device (escova cervical) são apresentados na tabela 7 e as amostras recolhidas com o *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (cotonete) são apresentados na tabela 8.

As características de desempenho do *digene* HC2 GC-ID DNA Test foram calculadas aplicando um valor de corte de 1,0 e de 2,5 sem ter em conta as presumíveis amostras positivas que se inseriam na zona equívoca descrita na secção *Interpretação de resultados* destas instruções de utilização. Por conseguinte, o desempenho do *digene* HC2 GC-ID DNA Test pode variar no seu laboratório dependendo da distribuição dos valores que se encontram na zona equívoca e dos resultados da repetição obtidos quando volta a testar as amostras presumivelmente positivas (zona equívoca). Como ponto de referência, menos de 0,9% das amostras (17/1825) testadas durante o estudo clínico em vários centros, utilizadas para determinar o desempenho do *digene* HC2 GC-ID DNA Test inseriram-se nesta gama. Para obter informações adicionais, consulte a distribuição de frequências dos resultados URL/VC na secção *Resultados previstos* destas instruções de utilização.

Não foram gerados dados suficientes para calcular rigorosamente se a sensibilidade equivalente e o valor previsto positivo do *digene* HC2 CT-ID DNA Test utilizando o *digene* Female Swab Specimen Collection Kit é equivalente à sensibilidade e ao valor positivo de previsão observado com amostras recolhidas com o *digene* HC2 DNA Collection Device. Uma vez que a utilização do *digene* HC2 DNA

Collection Device está contra-indicada para a colheita de amostras cervicais em mulheres grávidas, a capacidade do teste para detectar a presença de ADN de GC pode ser reduzida nesta população de doentes ou sempre que um cotonete for utilizado para a colheita da amostra. As previsões de desempenho do ensaio baseiam-se em amostras conservadas a 2-8 °C ou congeladas e analisadas 1-2 semanas após a sua colheita.

A sensibilidade clínica e especificidade do *digene* HC2 GC-ID DNA Test para detectar doentes com infecção clinicamente activa que pode ser transmitida aos parceiros ou provocar sequelas relacionadas com GC não foram determinadas em comparação com os métodos, comercialmente disponíveis, de ensaios por ácidos nucleicos com amplificação do sinal (NAA) para a detecção de ADN de GC. Nos estudos clínicos, o teste com um ensaio NAA comercialmente disponível não alterado apresentou resultados positivos nalgumas amostras consideradas como positivas com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test obtidas em doentes com culturas negativas. A sensibilidade prevista baseia-se no número de resultados positivos do *digene* HC2 GC-ID DNA Test em doentes para as quais se realizou cultura positiva de *Neisseria gonorrhoeae*. Por conseguinte, a sensibilidade do *digene* HC2 GC-ID DNA Test só pode ser deduzida relativamente à taxa de resultados positivos com cultura que pode apresentar uma sensibilidade de 60-85%.



**Tabela 7.** *digene* HC2 GC-ID DNA Test Versus resultados de cultura de GC em amostras recolhidas com escova cervical. Características de desempenho calculadas utilizando os valores de corte de URL/VC de 1,0 e 2,5 são seguidamente apresentados; os valores apresentados entre parêntesis representam o desempenho considerando um valor de corte de 2,5 URL/VC. Os intervalos de confiança de 95% incluem as duas gamas quando as previsões diferem entre si em cada um dos valores de URL/VC avaliado.

	Centro <sup>2</sup>	<i>digene</i> HC2 GC-ID: Cultura: n=	POS POS	POS NEG	NEG POS	NEG NEG	Sensibilidade	PPV	Especificidade	NPV	<i>digene</i> HC2 GC-ID+ Cultura- PCR <sup>1+</sup>
<b>Com sintomas</b>											
IC de 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 de 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 de 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 de 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 de 95% Sem sintomas</b>											
IC de 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 de 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 de 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 de 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 de 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 de 95% TODOS</b>											
IC de 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 de 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 de 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 de 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 de 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 informação serve apenas para efeitos informativos; os resultados das amostras não se clarificaram utilizando o teste PCR.

<sup>2</sup> O centro número 5 não dispunha de nenhuma amostra recolhida com escova cervical em doentes com sintomas.

<sup>3</sup> Em dois casos, o PCR não foi realizado.

N/A = Não aplicável

**Tabela 8.** *digene* HC2 GC-ID DNA Test Versus resultados de cultura de GC em amostras recolhidas com cotonete. Características de desempenho calculadas utilizando os valores de corte de URL/VC de 1,0 e 2,5 são seguidamente apresentados. Os valores apresentados entre parêntesis representam o desempenho considerando um valor de corte de 2,5 URL/VC. Os intervalos de confiança de 95% incluem as duas gamas quando as previsões diferem entre si em cada um dos valores de URL/VC avaliado.

	Centro <sup>2</sup>	<i>digene</i> HC2 GC-ID: Cultura: n=	POS POS	POS NEG	NEG POS	NEG NEG	Sensibilidade	PPV	Especificidade	NPV	<i>digene</i> HC2 GC-ID+ Cultura- PCR <sup>1+</sup>
<b>Com sintomas</b>											
IC de 95%	1	354	34 (31)	2 (3)	2 (5)	316 (315)	94,44 (87,18) 81,34-99,32	94,44 (91,18) 81,34-99,32	99,37 (99,06) 97,75-99,92	99,37 (98,44) 97,75-99,92	N/A
IC de 95%	2	92	13	2 (0)	1	76 (78)	92,86 66,1-99,8	86,67 (100) 75,3-100	97,44 (100) 95,4-100	98,70 (98,73) 93,2-100	0/2
IC de 95%	3	5	2	0	0	3	100 15,8-100	100 15,8-100	100 29,2-100	100 29,2-100	N/A
IC de 95%	5	162	0	3 (1)	0	159 (161)	N/A 2,5-100	0,00 2,5-100	98,15 (99,38) 96,6-100	100 97,7-100	1 <sup>3</sup> /3
	<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>84,05-98,79</b>	<b>87,50 (92,00)</b> <b>75,93-94,82</b>	<b>98,75 (99,29)</b> <b>97,45-99,50</b>	<b>99,46 (98,93)</b> <b>98,43-99,89</b>	<b>1<sup>3</sup>/5</b>
<b>IC de 95% Sem sintomas</b>											
IC de 95%	1	61	1	0	1	59	50,00 1,26-98,74	100 2,50-100	100 93,94-100	98,33 91,06-99,96	N/A
IC de 95%	2	10	2	0	0	8	100 15,8-100	100 15,8-100	100 63,1-100	100 63,1-100	N/A
IC de 95%	3	2	0	0	0	2	N/A N/A	N/A N/A	100 15,8-100	100 15,8-100	N/A
IC de 95%	4	1	0	0	0	1	N/A N/A	N/A N/A	100 2,5-100	100 2,5-100	N/A
IC de 95%	5	186	1	0	0	185	100 2,5-100	100 2,5-100	100 98,0-100	100 98,0-100	N/A
	<b>Todos</b>	<b>260</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>255</b>	<b>80,00</b> <b>28,36-99,49</b>	<b>100</b> <b>39,76-100</b>	<b>100</b> <b>98,56-100</b>	<b>99,61</b> <b>97,84-99,99</b>	<b>N/A</b>
<b>IC de 95% TODOS</b>											
IC de 95%	1	415	35 (32)	5 (3)	3 (6)	372 (374)	92,11 (84,21) 78,62-98,34	87,50 (91,43) 73,20-95,81	98,67 (99,20) 96,93-99,57	99,20 (98,42) 97,68-99,83	N/A
IC de 95%	2	102	15	2 (0)	1	84 (86)	93,75 69,8-99,8	88,24 (100) 63,6-100	97,67 (100) 91,9-100	98,82 (98,85) 93,6-100	0/2
IC de 95%	3	7	2	0	0	5	100 15,8-100	100 15,8-100	100 47,8-100	100 47,8-100	N/A
IC de 95%	4	1	0	0	0	1	N/A N/A	N/A N/A	100 2,5-100	100 2,5-100	N/A
IC de 95%	5	348	1	3 (1)	0	344 (346)	100 2,5-100	25,00 (50,00) 1,3-98,7	99,14 (99,71) 98,4-100	100 98,9-100	1 <sup>3</sup> /3
	<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>83,00-98,05</b>	<b>84,13 (92,59)</b> <b>72,74-92,12</b>	<b>98,77 (99,51)</b> <b>97,76-99,41</b>	<b>99,51 (92,59)</b> <b>98,74-99,87</b>	<b>1<sup>3</sup>/5</b>

<sup>1</sup> Esta informação serve apenas para efeitos informativos; os resultados das amostras não se clarificaram utilizando o teste PCR.

<sup>2</sup> O centro número 4 não dispunha de nenhuma amostras recolhida com cotonete em doentes com sintomas.

<sup>3</sup> Em dois casos, o PCR não foi realizado.

N/A = Não aplicável

## REPRODUTIBILIDADE

Como parte do ensaio clínico em vários centros, realizou-se um estudo de reprodutibilidade entre ensaios, entre dias, entre centros e a reprodutibilidade total do *digene* HC2 GC-ID DNA Test, utilizando um painel composto por alvos de ADN de *Neisseria gonorrhoeae* e amostras clínicas positivas e negativas com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test.

Analisou-se um painel com 10 tipos de amostras clínicas e não clínicas desnaturadas e dissimuladas, constituídas por 8 amostras positivas e 2 amostras negativas. As análises realizaram-se em réplicas de seis, duas por dia, durante um período de três dias em cada um dos 4 centros (3 centros externos e na QIAGEN). Cada centro gerou 36 pontos de referência para cada alvo testado. Todas as amostras eram desnaturadas e foram conservadas congeladas antes dos testes. Observou-se uma concordância de 100% nos 1152 resultados positivos previstos (1152/1152) e uma concordância de 100% nos 288 resultados negativos previstos (288/288). A concordância global foi de 100% (1440/1440), com um intervalo de confiança de 95% de 99,7-100 e kappa = 1,00. Não se verificou uma variabilidade entre ensaios, entre dias ou entre centros; por conseguinte, os dados de todos os ensaios em cada centro foram combinados e são apresentados em baixo (tabela 9).

**Tabela 9.** Reprodutibilidade do *digene* HC2 GC-ID DNA Test num ensaio em vários centros.

Número de alvo	Centro 1		Centro 2		Centro 3		Centro 4		Total		
	$\bar{X}$ URL /VC	% Conc.	$\bar{X}$ URL /VC	% Conc.	$\bar{X}$ URL /VC	% Conc.	$\bar{X}$ URL /VC	% Conc.	$\bar{X}$ URL /VC	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
TOTAL										1440/1440	100

Realizou-se um segundo estudo de competência/reprodutibilidade utilizando o microrganismo completo de *Neisseria gonorrhoeae* (GC) acrescentado a uma matriz de amostras clínicas dissimuladas de células epiteliais em três centros externos. As 25 amostras testadas continham representantes de negativos, positivos baixos (no ou próximo do limite de detecção) e médios com 2 serotipos de GC, infecções mistas com *Chlamydia trachomatis* (CT) e amostras que continham sangue. Doze amostras deviam dar resultados positivos e treze deviam dar resultados negativos. Na tabela 10 apresenta-se a percentagem de concordância entre os resultados observados e previstos do *digene* HC2 GC-ID DNA Test em cada um dos três centros de análise e em todos os centros combinados. A sensibilidade, especificidade, concordância e valores kappa de cada centro encontram-se na tabela 11.

**Tabela 10.** % de concordância do *digene* HC2 GC-ID DNA Test por centro.

Centro	Observado vs. previsto	% de concordância*
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%)

\*Os números entre parêntesis indicam os intervalos de confiança de 95%.

**Tabela 11.** Resultados do resumo de estatísticas do *digene* HC2 GC-ID DNA Test (valor de corte de 1,0).

Medida estatística	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Global
Sensibilidade	100% (73,54%-100%)*	100% (73,54%-100%)	100% (73,54%-100%)	100% (90,26%-100%)
Especificidade	100% (75,29%-100%)	100% (75,29%-100%)	100% (75,29%-100%)	100% (90,97%-100%)
Concordância	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

\*Os números entre parêntesis indicam os intervalos de confiança de 95%.

Em testes de competência de rotina, identificaram-se 12 amostras equívocas, apresentadas na tabela 10, todas elas contendo baixas concentrações do microrganismo de GC ( $\sim 5 \times 10^4$  microrganismos/ml), que seriam interpretadas como presumíveis positivas, de acordo com a secção *Interpretação de resultados* destas instruções de utilização. Por conseguinte, o ensaio demonstrou a capacidade de detectar ADN de GC em amostras com concentrações de microrganismos detectáveis no ou próximo do limite de detecção. Foram observados dados adicionais a esta constatação ao analisar um painel disponível que continha amostras com uma concentração baixa de microrganismos numa gama que podia ser detectada por ensaio de ácidos nucleicos com amplificação do sinal. Os testes nos três centros externos e na QIAGEN produziram 100% de resultados positivos (ou presumíveis positivos) para a amostra do painel que continha microrganismos de GC. Em dois casos, os valores de URL/VC verificaram-se na zona equívoca do ensaio (consultar a tabela 12 em baixo).

**Tabela 12.** Resultados do painel de amostras com CT e GC.

Resultado do <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test			
Centro	URL/VC	Interpretação	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

## PRECISÃO

Realizou-se um estudo de precisão em três centros para determinar a precisão entre ensaios e a precisão total do *digene* HC2 GC-ID DNA Test utilizando um painel de amostras clínicas positivas e negativas simuladas e dissimuladas. Adicionalmente, avaliou-se a precisão intra e inter-instrumento, observada com dois luminómetros independentes e utilizando o mesmo painel. Entre os dois modelos de luminómetros incluía-se o DML 2000, recomendado para ser utilizado com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test, e o luminómetro MLX; o MLX foi um dos modelos de luminómetro utilizado durante a avaliação clínica e que já não está disponível. Um dos três centros verificaram dificuldades com outros *digene* HC2 DNA Test que foram realizados como parte deste estudo que foram atribuídas à técnica do ensaio, mais provavelmente, a erro técnico provocado por formação incorrecta ou inadequada. Embora a precisão dos resultados do *digene* HC2 GC-ID DNA Test não tenha sido afectada, o técnico recebeu nova formação relativamente à técnica de ensaio correcta.

A tabela 13 apresenta o desempenho do *digene* HC2 GC-ID DNA Test em todos os centros combinados (incluindo o centro que verificou o problema técnico antes de o técnico ter recebido formação adequada relativa à técnica correcta do ensaio). O ensaio demonstrou uma precisão equivalente depois da formação do técnico. No entanto, nos membros do painel 3, (que apresentavam baixas concentrações do microrganismo de GC), os valores de URL/VC observados encontravam-se na ou próximo da zona equívoca do ensaio de 1,0-2,5. Para efeitos destas análises de dados, todos os valores de URL/VC que se encontravam na zona equívoca ou ultrapassaram os 2,5 foram considerados como positivos. Embora não seja evidente a partir desta tabela, os resultados qualitativos apresentaram uma concordância de 100% (54/54) (93,4%-100% IC 95%) com os resultados previstos nos três centros.

**Tabela 13.** Previsões da previsão intra e inter-instrumentos, entre ensaios e total de URL/VC por teste e alvo.

Membro painel	n	Média URL/VC	Intra-instrumento		Inter-instrumento		No ensaio		Total	
			Desvio padrão (DP)	(%CV)	(DP)	(%CV)	(DP)	(%CV)	(DP)	(%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

Para efeitos destas análises de dados, todos os valores de URL/VC que se encontravam na zona equívoca ou ultrapassaram os 2,5 foram considerados como positivos. Um estudo adicional de precisão foi realizado na QIAGEN para determinar a precisão total do *digene* HC2 GC-ID DNA Test utilizando o DML 2000. Preparou-se um painel de precisão de seis membros utilizando uma matriz de amostras clínicas simuladas constituídas por células epiteliais de cultura suspensas em meio de transporte de amostras (STM) *digene* e que incluía duas amostras negativas, duas amostras positivas baixas e duas amostras positivas de nível médio, todas contendo um dispositivo de colheita de escova. Cada painel foi testado em triplicado, dois painéis por placa, por dois técnicos ao longo de 5 dias. Utilizou-se um painel desnaturado novo por placa. Os resultados de precisão total do *digene* HC2 GC-ID DNA Test compilados durante os cinco dias de testes são apresentados na tabela 14. Embora não seja evidente a partir destas tabelas, a interpretação qualitativa dos resultados teve uma concordância de 100% com o resultado previsto (120/120; 96,97%-100% IC de 95% ), utilizando um URL/VC de 1,0.

**Tabela 14.** Precisão total do *digene* HC2 GC-ID DNA Test.

Membro painel	n	Média URL/VC	DP	CV%	Média -2xSD	Média +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

**PRECISÃO COM AMOSTRAS EM SOLUÇÃO PRESERVCYT**

Realizou-se um estudo em vários centros para caracterizar a precisão do ensaio entre laboratórios e entre dias nos ensaios com amostras em solução PreservCyt. Dois centros externos à QIAGEN testaram um painel de doze membros de amostras de doentes recolhidas em solução PreservCyt. Cada laboratório procedeu depois ao ensaio do painel em triplicado, duas vezes por dia ao longo de três dias usando o mesmo lote de reagentes. O painel de doze membros das amostras simuladas em solução PreservCyt foi preparado com quantidades diferentes de GC (auxotipo 22; ATCC 27631) para criar um painel conforme indicado na Tabela 15.

**Tabela 15.** Painel de precisão de amostras simuladas em solução PreservCyt para o *digene* HC2 GC-ID DNA Test.

Lote da amostra	Membros painel*	Resultado esperado do <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test	URL/VC aproximado
A	1P, 2P, 7P, 8P	GC baixo positivo	~5
B	3P, 4P, 9P, 10P	GC médio positivo	~10
C	5N, 11N	Negativo	~0,20
D	6N, 12N	Negativo	~0,20

\*O identificador da amostra indica estado conhecido de *Neisseria gonorrhoeae* [positivo (P) ou negativo (N)].

Para efeitos de análise de dados, os membros do painel derivados do mesmo lote de amostras foram combinados.

**Tabela 16.** Resultados qualitativos por lote de amostras – Procedimento do *digene* HC2 GC-ID DNA Test

Conjunto do lote de amostras	GC Positivo n (%)	Equívoco n (%)	Negativo n (%)	Total
Negativo (5N, 11N)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
Negativo (6N, 12N)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
<b>Total de negativos</b>	0 (0,0)	0 (0,0)	216 (100)	216
Positivo baixo (1P, 2P, 7P, 8P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
Positivo médio (3P, 4P, 9P, 10P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
<b>Total de positivos</b>	432 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	432

**Tabela 17.** Desvios-padrão (DP) e coeficientes de variação (CV) relativos à precisão por laboratório e por dia: *digene* HC2 GC-ID DNA Test em solução PreservCyt

Amostra	N	Média URL/VC	No ensaio DP	Entre ensaios DP	Entre dias DP	Entre local DP	Total DP	%CV
Negativo (5N, 11N)	108	0,201	0,037	0,019	0*	0,032	0,052	25,9
Negativo (6N, 12N)	108	0,198	0,055	0,016	0,019	0,021	0,064	32,3
Positivo médio GC (3P, 4P, 9P, 10P)	216	7,981	0,906	1,203	0	0,243	1,526	19,1
Positivo baixo GC (1P, 2P 7P, 8P)	216	4,648	0,675	0,478	0,308	0	0,883	19,0

\*Os componentes de variação negativa foram definidos em zero.

### SENSIBILIDADE ANALÍTICA

A sensibilidade analítica (limites de detecção) do *digene* HC2 GC-ID DNA Test foi determinada analisando directamente diluições de um painel não clínico constituído por 114 isolados separados de *Neisseria gonorrhoeae*. Os 114 isolados representavam 13 auxotipos, 5 serotipos, 10 estirpes resistentes a antibióticos, 6 isolados de estirpes sem plasmídeos e 2 isolados não caracterizados considerados discordantes no ensaio nos vários centros. Analisaram-se quatro séries de diluições para cada isolado com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test para estabelecer os limites de detecção do teste. O limite de detecção para cada *auxotipo Neisserria* é apresentado na tabela 18. O limite de detecção estabelecido foi a diluição de cada auxotipo detectado na ou acima da zona equívoca do ensaio de 1,0-2,5 URL/VC.

A sensibilidade analítica do *digene* HC2 GC-ID DNA Test foi entre 25 a 50.000 CFU/ensaio para os 114 isolados de *Neisserria* testados, incluindo auxotipos, serotipos e estirpes sem plasmídeos e resistentes a antibióticos. Apenas uma das seis extirpes sem plasmídeos e um dos cinco serotipos de *Neisserria gonorrhoeae* IA-5 testados foram detectados a 50.000 CFU/ensaio; nenhum dos outros 112 isolados foram detectados a concentrações superiores a 5000 CFU/ensaio. O limite de detecção médio de todos os 114 isolados variou entre 974 e 2887 CFU/ensaio quando se consideraram as diluições dos isolados que recaíram na zona equívoca do ensaio e acima das 2,5 URL/VC. O limite global de detecção foi de 1931 CFU/ensaio ( $3,8 \times 10^4$  CFU/ml). As amostras clínicas que contêm microrganismos no ou próximo do limite de detecção podem ter de ser novamente testadas por um procedimento de teste alternativo ou numa nova amostra da doente, conforme definido na secção *Interpretação de resultados* destas instruções de utilização.

**Tabela 18.** Resumo dos limites de detecção da sensibilidade dos auxotipos, serotipos e estirpes sem plasmídeos e resistentes a antibióticos de GC.

Auxotipo	Concentração detectável	
	CFU/ml	CFU/ensaio
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo 1	1000	50
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo 12	500-5000	25 - 250
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo 16	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	50 - 500
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo 22	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	500 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo 5	500-5000	25 - 250
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo 9	5 x10 <sup>4</sup>	2500
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo AHU (5 isolados)	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	500 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo Arg (5 isolados)	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	500 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo AU (5 isolados)	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	50 - 500
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo PAU (5 isolados)	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>	50 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo Pro (5 isolados)	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	500 - 500
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo Proto (5 isolados)	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	50 - 500
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> intermédia à ciprofloxacina (Cipl) (5 isolados)	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>	50 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente à ciprofloxacina (Cip R) (4 isolados)	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	50 - 500
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> CMRNG (5 isolados)	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	50 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> Outro-5423	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	50 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> Outro-5658	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	50 - 500
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> PenR (5 isolados)	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	500 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> PenR (5 isolados)	10 <sup>3</sup> -10 <sup>6</sup>	50 - 50,000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> estirpes sem plasmídeos (6 isolados)	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	500 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> PenR 3.05 (5 isolados)	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	500 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> PPNG 3.2	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>	50 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> PPNG 4.4 (4 isolados)	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	500 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> serotipo I A-1 ou IA-2 (5 isolados)	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup>	500 - 50,000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> serotipo I A-5 (4 isolados)	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	50 - 500
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> serotipo I B-1 (5 isolados)	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>	50 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> serotipo I B-4 ou IB-15 (5 isolados)	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>	50 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente à espectinomicina (SpecR)	10 <sup>5</sup>	5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> TetR (5 isolados)	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>	50 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> TRNG American (5 isolados)	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	500 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> TRNG Dutch (5 isolados)	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	500 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> estirpe tipo	500-5000	25 - 250

#### CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS SOBRE AS AMOSTRAS EM PRESERVCYT

O limite dos estudos de detecção descritos na secção anterior para STM não foram repetidos usando amostras em solução PreservCyt uma vez que se espera que a sensibilidade analítica do ensaio seja independente do tipo de amostra STM ou em solução PreservCyt, especificamente porque as amostras em solução PreservCyt são sujeitas a um procedimento de conversão (para mais pormenores, consulte as instruções de utilização do dispositivo de conversão de amostras *digene* HC2) que torna as amostras em solução PreservCyt semelhantes, em composição, às amostras em STM antes da utilização do *digene* HC2 GC-ID DNA Test.

No entanto, uma vez que a amostra em solução PreservCyt é sujeita a uma fase de centrifugação durante o procedimento de conversão, foi necessário avaliar qualquer potencial impacto da centrifugação na sensibilidade analítica do *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Para avaliar o potencial impacto da centrifugação na sensibilidade analítica, prepararam-se oitenta e oito (88) pares de amostras *Neisseria gonorrhoeae* DNA negativas STM e em solução PreservCyt com as quantidades correspondentes de microrganismos *Neisseria gonorrhoeae* (estirpe sem plasmídeos NRL 33151). As amostras combinadas foram testadas e a sensibilidade analítica calculada comparando os valores médios de URL/VC obtidos [(PreservCyt:STM) x 100].



**Tabela 19.** Comparação da sensibilidade analítica - *digene* HC2 GC-ID DNA Test – Amostras combinadas em solução PreservCyt e STM.

	<i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test		PC:STM URL/VC
	STM	PreservCyt	
<b>Número de amostras</b>	88	88	-
<b>Média URL/VC</b>	3,97	4,91	1,24
<b>URL/VC mediana</b>	4,01	4,93	1,23
<b>Desvio padrão</b>	0,34	1,00	-
<b>URL/VC mínimo</b>	3,06	2,30	-
<b>URL/VC máximo</b>	4,77	7,10	-

Um estudo adicional forneceu uma comparação semelhante com amostras de doentes combinadas e simuladas. As amostras dos doentes recolhidas em solução PreservCyt foram obtidas a partir de um centro externo à QIAGEN e monitorizadas pelo *digene* HC2 GC-ID DNA Test para identificar amostras positivas. Estas amostras positivas dos doentes foram depois combinadas para gerar um total de 10 conjuntos de amostras concentradas em solução PreservCyt. Destes conjuntos, duas alíquotas foram preparadas e processadas para formar *pellets* de células. Os *pellets* de células foram ressuspensos numa solução salina de fosfato tamponada (PBS). A alíquota A foi preparada adicionando o *pellet* ressuspense ao STM e a alíquota B foi preparada adicionando o *pellet* ressuspense à PreservCyt. As duas alíquotas foram testadas com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test apresentando os seguintes resultados:

**Tabela 20.** Comparação da sensibilidade analítica - *digene* HC2 GC-ID DNA Test – Amostras de doentes simuladas (conjunto) em solução PreservCyt combinadas com STM.

	<i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test		PC: STM URL/VC
	STM	PreservCyt	
<b>Número de amostras</b>	10	10	-
<b>Média URL/VC</b>	4,80	4,32	0,90
<b>URL/VC mediana</b>	2,66	2,47	0,93
<b>Desvio padrão</b>	5,44	5,08	-
<b>URL/VC mínimo</b>	1,16	1,02	-
<b>URL/VC máximo</b>	18,97	17,26	-

## ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Analisou-se um conjunto de bactérias, vírus, plasmídeos e material celular humano ou produtos sanguíneos que se podem encontrar no aparelho anogenital feminino para determinar se se verificava reactividade cruzada com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Todos os microrganismos foram testados a concentrações de  $10^5$  e de  $10^7$  microrganismos ou CFU por ml, e sempre que possível com  $10^9$  microrganismos ou CFU por ml, excepto quando indicado o contrário a seguir. O ADN purificado de vírus e plasmídeos foi testado com uma variedade de concentrações, conforme a seguir indicado. Segue-se uma listagem das bactérias analisadas.

---

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Neisseria caviae</i> (2 isolados) <sup>e</sup>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Neisseria cuniculi</i> (3 isolados) <sup>f</sup>
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	<i>Neisseria cinera</i> (6 isolados)
<i>Achromobacter xerosis</i>	<i>Neisseria flavescens</i> (4 isolados)
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Neisseria species</i> <sup>g</sup> *
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Neisseria lactamica</i> (6 isolados) <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 isolados) <sup>d</sup>
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Neisseria polysaccharea</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i> (6 isolados)	<i>Neisseria sicca</i> (6 isolados)
<i>Candida albicans</i>	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Neisseria subflava</i> biovar <i>flava</i> (5 isolados)
<i>Chlamydia pneumoniae</i> <sup>b</sup>	<i>Neisseria subflava</i> biovar <i>perflava</i> (4 isolados) <sup>h</sup>
<i>Chlamydia psittaci</i> <sup>a</sup> (2 estirpes)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> <sup>b</sup> (serotipo B, Ba, E, J, L3) <sup>c</sup>	<i>Peptostreptococcus asaccharalyicus</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> (isolado 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>	

---

### Concentrações testadas (microrganismos/ml ou CFU/ml para espécies de *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>  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^7$  e  $2 \times 10^9$

<sup>c</sup>  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^7$  e  $1 \times 10^9$

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

<sup>e</sup>  $1,1 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^7$ ,  $1,1 \times 10^9$

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

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

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

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

<sup>†</sup> Analisou-se tanto a estirpe de *E. coli* utilizada para cultivar os plasmídeos (HB101) como um isolado clínico de *E. coli*.

\* Estirpe de *Neisseria* de ATCC que apresenta características tanto de *Neisseria gonorrhoeae* como de *Neisseria meningitidis* (nº de ATCC 43831).

Todas as outras bactérias, excepto *Neisseria gonorrhoeae* potencialmente encontradas no tracto urogenital, à excepção das três estirpes de *Neisseria comensal* e de *Chlamydia psittaci*, verificaram-se negativas com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Com *Chlamydia psittaci* e *Neisseria lactamica* apenas se observou uma reactividade cruzada moderada que pode ser interpretada como presumivelmente positiva. Essa reactividade cruzada não tem qualquer influência na interpretação dos resultados do *digene* HC2 GC-ID DNA Test de amostras urogenitais. Os microrganismos que demonstraram algum grau de reactividade cruzada são:

	Interpretação	Concentração à qual foi observada reactividade cruzada
<i>Chlamydia psittaci</i> (1 de 2 isolados)	Presumível positivo*	1 x 10 <sup>7</sup> microrganismos/ml
<i>Neisseria lactamica</i> (1 de 6 isolados)	Presumível positivo*	1 x 10 <sup>9</sup> CFU/ml
<i>Neisseria meningitidis</i> (grupo Y, 1 de 2 isolados)	Positivo	1 x 10 <sup>7</sup> CFU/ml
<i>Neisseria mucosa</i> (1 de 6 isolados)	Positivo	5 x 10 <sup>5</sup> CFU/ml

\* URL/VC verificadas na zona equívoca do ensaio de 1,00 a 2,50.

As três estirpes de *Neisseria comensal*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis* e *Neisseria mucosa* encontram-se principalmente na nasofaringe e nas vias respiratórias superiores. Raramente, ou até mesmo nunca, estão isoladas do sistema urogenital.<sup>13,14</sup> Além disso, a reactividade cruzada do isolado do grupo Y *Neisseria meningitidis* foi determinada como sendo um lipopolissacarídeo sem tipificação raramente encontrado na população em geral. *Chlamydia psittaci* pode ser detectada na pele de algumas pessoas que trabalham ou manuseiam espécies de aves, mas não foi detectada no tracto anogenital.<sup>15</sup>

Nem todos os isolados de uma estirpe em particular produziram reactividade cruzada com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test, diminuindo a probabilidade de obter um resultado positivo falso com uma amostra clínica no caso da presença dessa estirpe. Por exemplo, cinco de seis isolados de *Neisseria lactamica* ou *Neisseria mucosa* analisados provaram-se negativos no *digene* HC2 GC-ID DNA Test, assim como uma das duas estirpes de *Chlamydia psittaci* testadas. Assim, não se espera que a reactividade cruzada do *digene* HC2 GC-ID DNA Test observada com as três estirpes de *Neisseria comensal* e *Chlamydia psittaci* venham a conduzir a uma interpretação clínica falsa de um resultado positivo através do teste de amostras anogenitais.

Segue-se uma listagem de ADN viral, plasmídeo de ADN e material celular humano ou produtos sanguíneos testados e as concentrações a que foram testados:

Citomegalovírus <sup>a</sup>	Papilomavírus Humano de tipo 6 <sup>f</sup>
Vírus de Epstein-Barr <sup>b</sup>	Papilomavírus humano tipo 11 <sup>f</sup>
Soro antiogénio de superfície da hepatite B <sup>c</sup>	Papilomavírus humano tipo 16 <sup>f</sup>
Herpes simples I <sup>d</sup>	Papilomavírus humano tipo 18 <sup>f</sup>
Herpes simples II <sup>d</sup>	pBR322 <sup>i</sup>
Vírus da imunodeficiência humana (HIV) <sup>b,g</sup>	SV40 <sup>j</sup>
ADN genómico humano <sup>e</sup>	PGEM <sup>®</sup> 3Z <sup>i</sup>
ADN placentário humano <sup>e</sup>	PGEM <sup>®</sup> 3Zf(-) <sup>j</sup>
Sangue total humano <sup>h</sup>	Células epiteliais humanas <sup>k</sup>

Concentrações testadas:

- <sup>a</sup> 1 x 10<sup>5</sup>, 1 x 10<sup>7</sup>, 1 x 10<sup>9</sup> partículas virais/ml  
<sup>b</sup> 1 x 10<sup>5</sup>, 1 x 10<sup>7</sup>, 1 x 10<sup>8</sup> partículas virais/ml  
<sup>c</sup> 2,9 x 10<sup>8</sup>, 1,1 x 10<sup>9</sup> partículas virais/ml  
<sup>d</sup> 6,1 x 10<sup>6</sup>, 2,4 x 10<sup>7</sup> partículas virais/ml  
<sup>e</sup> 2,7 x 10<sup>2</sup>, 1,1 x 10<sup>3</sup> cópias/ml  
<sup>f</sup> 1,1 x 10<sup>8</sup>, 4,6 x 10<sup>8</sup> partículas virais/ml  
<sup>g</sup> 2 x 10<sup>6</sup>, 2 x 10<sup>7</sup>, 2 x 10<sup>8</sup> partículas virais/ml  
<sup>h</sup> 5%, 10%, 50%  
<sup>i</sup> 2,1 x 10<sup>8</sup>, 8,3 x 10<sup>8</sup> cópias/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

Nenhum dos vírus testados apresentou reactividade cruzada no *digene* HC2 GC-ID DNA Test; no entanto, a reactividade cruzada foi observada com os plasmídeos pBR322, pGEM<sup>®</sup> 3Z e pGEM<sup>®</sup> 3Zf(-). Todas as restantes preparações de ADN, incluindo ADN humano, foram negativas. O sangue e as células epiteliais não apresentaram reactividade cruzada com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test. A reactividade cruzada entre o pBR322 e o *digene* HC2 GC-ID DNA Test não é inesperada devido à forma como a sonda GC é criada. Registou-se a presença de sequências homólogas de pBR322 em amostras genitais humanas, podendo ocorrer resultados falsos-positivos na presença de elevados níveis de plasmídeo bacteriano. No entanto, nenhuma amostras das 103 testadas num estudo em vários centros nos Estados Unidos consideradas como positivas para *Neisseria gonorrhoeae* com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test foram identificadas como positivas falsas devido a reactividade cruzada das sequências de pBR322. Assim, a probabilidade de se verificarem resultados falsos-positivos com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test em amostras clínicas provocados por reactividade cruzada com sequências homólogas de pBR322 parece ser reduzida. Embora o *digene* HC2 GC-ID DNA Test possa apresentar, potencialmente, reactividade cruzada com *Chlamydia psittaci*, pBR322, pGEM e várias espécies de *Neisseria comensal*, a probabilidade de estes microrganismos afectarem a interpretação do teste é remota, conforme demonstrado pelos resultados do estudo clínico realizado em vários centros.

### HOMOLOGIA DE SONDAS RELATIVAMENTE A ADN DE PLASMÍDEOS TOTAIS E A ADN GENÓMICO

As sondas genómicas são homólogas a aproximadamente 0,5% dos genomas de *Neisseria gonorrhoeae*. Seguidamente apresentam-se os dados para cada sonda no *digene* HC2 GC-ID DNA Test:

Sonda	Tipo	Dimensão aprox. de introdução (bp)	% do genoma
pGC1	Genómico	6 400	0,34%
pGC2		3 300	0,17%
		9 700 (Total)	0,51%
pGC3	Plasmídeo críptico	4 200	N/A*

\*Representa toda a sequência da sonda.

### EFEITO DO SANGUE E OUTRAS SUBSTÂNCIAS NAS AMOSTRAS STM

O efeito do sangue e de outras substâncias, definidas, que possam potencialmente interferir, foi avaliado no *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Adicionou-se sangue total, um produto de marca para higiene vaginal, creme anti-fúngico e gel contraceptivo (agentes que podem ser, normalmente, encontrados nas amostras cervicais) a conjuntos de amostras negativas e positivas a concentrações que podem ser encontradas nas amostras cervicais (consultar a tabela 21). Não se observaram resultados falsos-positivos com qualquer um dos quatro agentes a qualquer concentração. Um estudo de substâncias não definidas presentes numa população de 100 amostras clínicas negativas mostrou que as substâncias não definidas não inibem a geração de um sinal positivo no *digene* HC2 GC-ID DNA Test, comparativamente ao sinal gerado quando testadas em relação a microrganismos de GC em STM.

**Tabela 21.** Efeito de substâncias que provocam interferências nos resultados do teste.

Resultado do <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test							
Substância que provoca interferência	Conc.	Conjunto de amostras clínicas				Meio de transporte de amostras (STM)	
		Negativo		Positivo*		Positivo*	
		URL/VC	Observado	URL/VC	Observado	URL/VC	Observado
Nenhuma (controle)		0,15	NA	3,41	NA	2,70	NA
Sangue	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%
Creme anti-fúngico	1%	0,19	+20%	3,60	+5%	2,95	+9%
	5%	0,20	+30%	3,52	+3%	3,09	+14%
Gel contraceptivo	1%	0,08	-54%	3,18	-7%	2,98	+10%
	5%	0,08	-54%	3,24	+5%	3,10	+15%

\*Acréscimado com  $10^8$  CFU/ml do auxotipo 1 do microrganismo *Neisseria gonorrhoeae*.

### EFEITO DO SANGUE E OUTRAS SUBSTÂNCIAS NAS AMOSTRAS PRESERVCYT

As avaliações de substâncias específicas de interferência, conforme descrito na secção anterior para as amostras STM, não foram realizadas com amostras em solução PreservCyt. No entanto, não se espera que as amostras em solução PreservCyt apresentem perfis de interferência diferentes dos das amostras STM, porque o local anatómico da colheita de amostras endocervicais é idêntico para amostras em solução PreservCyt e STM, e ainda porque uma amostra em solução PreservCyt é sujeita a um procedimento de conversão (conforme especificado nas instruções de utilização do dispositivo de conversão de amostras *digene* HC2), que a torna comparável, em termos de composição, a uma amostra STM.

Pode existir um tampão residual para conversão de amostras (SCB)<sup>1</sup> em pequenas quantidades nas amostras em solução PreservCyt totalmente convertidas. Por conseguinte, um estudo analítico foi realizado para verificar o desempenho analítico do *digene* HC2 GC-ID DNA na presença de várias quantidades de SCB. As diferentes concentrações de ADN de GC de plasmídeos foram preparadas em STM. Os volumes excessivos de SCB foram depois adicionados às amostras e testaram-se três alíquotas de cada amostra para obter a URL/VC médio de cada uma na presença de solução PreservCyt ou de SCB. A comparação destes valores médios de URL/VC de cada amostra relativamente aos valores médios de URL/VC para cada amostra de controlo STM não demonstrou qualquer resultado positivo ou negativo falso.

<sup>1</sup> O tampão para conversão de amostras é uma solução tamponada com eosina Y e 0,05% (w/v) de azida de sódio, necessários para a conversão de uma amostra de PreservCyt. Para mais pormenores, consulte as instruções de utilização do dispositivo de conversão de amostras *digene* HC2 da QIAGEN.

## PRECISÃO NO VALOR DE CORTE DO *digene* HC2 GC-ID DNA TEST COM AMOSTRAS CLÍNICAS RECOLHIDAS EM STM

A reprodutibilidade do *digene* HC2 GC-ID DNA Test com amostras clínicas recolhidas em STM foi determinada num estudo com 30 conjuntos clínicos (15 positivos e 15 negativos), preparados através da combinação de amostras recolhidas com uma escova cervical para STM, previamente desnaturadas e testadas. Analisaram-se quatro réplicas por amostra em cada um dos cinco dias, num total de 20 réplicas por amostra. O teste foi realizado usando o *digene* HC2 GC-ID DNA Test. A tabela 22 apresenta o valor médio de URL/VC, os intervalos de confiança próximos da média (IC de 95%) e a percentagem de resultados positivos calculados para cada amostra ao longo de cinco dias.

**Tabela 22.** Valores de URL/VC médios com intervalos de confiança e percentagem de resultados positivos com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test (por ordem descendente em função dos valores médios de URL/VC).

Nº	URL/VC	IC de 95%	% 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)

As amostras com um valor médio de URL/VC de 20% ou mais acima do valor de corte foram consideradas como positivas ou presumivelmente positivas em 97% das vezes, enquanto que as amostras com um valor médio de URL/VC de 20% ou mais abaixo do valor de corte foram consideradas como negativas em 100% das vezes. Estes resultados indicam que é de esperar que as amostras com URL/VC médios de 20% ou mais afastados do valor de corte apresentem resultados consistentes com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test.

As amostras com valores próximos do valor de corte do ensaio apresentaram-se largamente positivas ou negativas; as que tinham valores acima do valor de ensaio do corte, mas dentro dos 20% continuaram a ser consideradas como positivas ou presumivelmente positivas 69,4% das vezes. As amostras abaixo do valor de corte, mas dentro da gama dos 20% continuaram a ser consideradas como negativas 91,4% das vezes.

Estes dados demonstram que o *digene* HC2 GC-ID DNA Test produzem resultados reprodutíveis com amostras clínicas recolhidas em STM, cujos valores de URL/VC se encontrem dentro de uma gama de 20% do valor de corte do ensaio.

## INFORMAÇÃO HISTÓRICA

Anteriormente, utilizava-se o luminómetro Dynex modelo MLX, para além do DML 2000 para gerar dados e determinar as características de desempenho do *digene* HC2 GC-ID DNA Test. O luminómetro MLX já não está disponível, utilizando-se apenas o DML 2000 para gerar resultados. Os seguintes dados foram gerados a partir do ensaio em vários centros para determinar a reprodutibilidade do calibrador positivo e do calibrador negativo, indicados a seguir como informação histórica.

Para determinar a reprodutibilidade do calibrador positivo e do calibrador negativo e calcular a frequência com que pode ser necessário efectuar novos cálculos manualmente, foram compilados os resultados das avaliações clínicas que envolveram 79 ensaios com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test (tabela 23). Os resultados demonstraram que o %CV médio desses 79 ensaios foi de 5,79% e que nenhum ensaio apresentou valores médios do calibrador negativo superiores a 150 URL. Tendo em conta todas as três réplicas do calibrador por ensaio, foi observada uma reprodutibilidade do calibrador superior a 20% CV em apenas 1 dos 79 ensaios (1,3%), tendo o %CV sido novamente calculado. Depois do novo cálculo, a %CV dos ensaios mantiveram-se inferiores a 15%, o que indica que todos os ensaios foram válidos.

**Tabela 23.** Desempenho do calibrador positivo e do calibrador negativo. Dados combinados do ensaio clínico em vários centros e do estudo de precisão. (n = 79 ensaios)

Instrumento	Nº de ensaios	Média de quocientes S/N	Tipo de calibrador	Média das médias calculadas (URL)		Média do %CV calculado	
				Três réplicas	Ajustado para valores atípicos	Três réplicas	Ajustado para valores atípicos
DML2000	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

\*Já não disponível.

## EQUIVALÊNCIA ENTRE AMOSTRAS EM STM E EM SOLUÇÃO PRESERVCYT

A equivalência entre amostras STM e em solução PreservCyt foi analisada numa avaliação clínica de 1252 amostras cervicais combinadas. Uma amostra em solução PreservCyt foi processada de acordo com as instruções de utilização do dispositivo de conversão de amostras *digene* HC2 e testada em conjunto com uma amostra STM combinada com o *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Os resultados desta avaliação são apresentados na Tabela 24. O desempenho clínico foi estabelecido utilizando amostras de solução PreservCyt Solution com um volume residual superior a 6,5 ml. A análise de amostras com volumes residuais entre 4,0 e 6,5 ml deverá ser validada pelo laboratório.

**Tabela 24.** Resumo dos dados estatísticos da concordância do *digene* HC2 GC-ID DNA entre amostras cervicais combinadas recolhidas em STM e em solução PreservCyt.

Grupo	Kappa IC de 95%	Concordância positiva (n/A) IC de 95%	Concordância negativa (n/A) IC de 95%	Concordância geral (n/A) IC de 95%
Exclusão de dados da zona equívoca	0,96 0,92, 0,99	98,00 (49/50) 89,35, 99,95	99,75 (1181/1184) 99,26, 99,95	99,68 (1230/1234) 99,17, 99,91
Algoritmo de novo teste da zona equívoca*	0,93 0,88, 0,98	91,80 (56/61) 81,90, 97,28	99,75 (1188/1191) 99,27, 99,95	99,36 (1244/1252) 98,74, 99,72

\*As amostras numa gama de 1,0 a 2,5 URL/VC foram novamente testadas em duplicado. A classificação das amostras foi depois determinada usando uma regra de dois para três.

A reprodutibilidade do *digene* HC2 GC-ID DNA Test foi avaliada como parte da avaliação clínica para demonstrar que se obtêm resultados equivalentes de *digene* HC2 GC-ID DNA Test quando se testa um painel de 20 amostras em solução PreservCyt ao longo de 3 dias em três laboratórios. Os resultados deste estudo de reprodutibilidade são apresentados na Tabela 25 que se segue.

**Tabela 25.** Concordância da percentagem do *digene* HC2 GC-ID DNA Test – Por centro.

Centro	Observado vs. previsto	% de concordância (IC de 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 os centros combinados</b>	179/180	99,44 (96,94, 99,99)

\*20 membros x 3 dias x 3 centros.

## REFERÊNCIAS

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 gonorrhea. *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.



## GUIA PARA A RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

<i>digene</i> HC2 GC-ID DNA TEST		
OBSERVAÇÃO	CAUSAS PROVÁVEIS	SOLUÇÕES
<b>Alteração de cor incorrecta ou não observada durante a desnaturação</b>	Reagente de desnaturação não adicionado ou reagente de desnaturação incorrectamente preparado.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Verifique se o reagente de desnaturação contém o corante indicador e apresenta uma cor púrpura escura.</li> <li>2. Verifique se o reagente de desnaturação foi adicionado à amostra, medindo o volume de amostra (em princípio, 1,5 ml). Se o volume indicar que o reagente de desnaturação não foi adicionado, proceda à sua adição, misture e prossiga com o ensaio se observar a alteração correcta de cor.</li> </ol>
	A amostra de sangue pode dissimular a alteração de cor.	Não é de esperar que ocorra exactamente a alteração de cor descrita com estes tipos de amostras; os resultados do ensaio testado não deverão ser negativamente afectados.
	O pH da amostra pode ser invulgarmente ácido.	A amostra pode ser invulgarmente ácida, não se verificando a alteração de cor prevista. Recolha uma nova amostra <u>antes da</u> aplicação de ácido acético no colo do útero, uma vez que um pH da amostra incorrecto irá afectar negativamente os resultados do teste.
<b>Os controlos de qualidade dão resultados incorrectos</b>	Protocolo de software incorrecto seleccionado para o teste	Se o protocolo de software for incorrecto para o teste a realizar, deverá proceder a uma nova leitura da placa no prazo de 30 minutos depois da adição do reagente de detecção com o protocolo correcto.
	Posicionamento invertido do CQ CT e do CQ GC	Volte a testar as amostras.
<b>Alteração de cor incorrecta observada durante a hibridização</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mistura inadequada da mistura de sondas com o calibrador, controlo de qualidade e/ou as amostras desnaturados.</li> <li>• Mistura de sondas não adicionada.</li> <li>• Volume incorrecto de reagente adicionado.</li> </ul>	Agite a microplaca de hibridização durante mais 2 minutos. Se alguns poços se mantiverem púrpura ou cinzentos, adicione mais 25 µl de mistura de sonda e misture bem. Se depois da adição da sonda e de voltar a agitar não ocorrer a alteração de cor prevista e a amostra não contiver sangue ou outros materiais, volte a testar a amostra.
	A amostra de sangue pode dissimular a alteração de cor.	Não é de esperar que ocorra exactamente a alteração de cor descrita com estes tipos de amostras; os resultados do ensaio testado não deverão ser negativamente afectados.
	A amostra apresenta < 1000 µl de meio de transporte de amostras (STM) <i>digene</i> .	Verifique o volume da amostra original. O volume deve ser 1425 µl ± 20 µl (depois de retirar 75 µl). Se o volume for < 1405 µl, a amostra original continha < 1000 µl STM. Obtenha uma nova amostra.
<b>O ensaio não cumpre os critérios de verificação da calibração. Não se observa qualquer sinal nos calibradores positivos, no controlo de qualidade ou nas amostras.</b>	Nenhuma sonda adicionada ao diluente da sonda.	Prepare a mistura da sonda GC, conforme descrito na secção de Preparação e armazenamento de reagentes destas instruções de utilização. Misture bem. Rotule o tubo adequadamente. Repita o ensaio com uma mistura de sondas recém preparada.
	Sonda contaminada com RNase durante a preparação.	Utilize pontas de pipetas com protecção contra aerossóis para pipetar a amostra e use luvas sem pó de talco. Dilua a sonda num recipiente estéril. Utilize apenas reservatórios de reagente descartáveis limpos e novos.
	Mistura inadequada mistura da sonda com o diluente da sonda.	Depois de adicionar a sonda ao diluente da sonda, misture bem com o vortex à velocidade máxima durante, pelo menos, 5 segundos. Deve formar-se um vortex visível.
	Mistura inadequada da sonda diluída com a amostra desnaturada.	Depois de adicionar a mistura de sondas à amostra desnaturada, cubra a microplaca de hibridização e agite no misturador rotativo I a 1100 ± 100 rpm durante 3 ± 2 minutos, conforme descrito no Procedimento do teste, secção Hibridização, passo 6 destas instruções de utilização. Verifique se ocorreu alteração da cor de púrpura para amarelo em todos os poços.

**digene HC2 GC-ID DNA TEST**

OBSERVAÇÃO	CAUSAS PROVÁVEIS	SOLUÇÕES
	Tempo ou temperatura incorrectos durante a fase de hibridização.	Hibridize durante 60 ± 5 minutos a uma temperatura de 65 ± 2 °C, conforme descrito no Procedimento do teste, secção Hibridização, passo 7 destas instruções de utilização. Verifique a temperatura do aquecedor de microplacas I. Assegure-se que o aquecedor está regulado para aquecer as amostras à temperatura correcta e que foi previamente aquecido durante 1 hora antes da utilização.
	Mistura inadequada durante a fase de captura.	Agite no misturador rotativo I a 1100 ±100 rpm durante 60 ± 5 minutos a uma temperatura de 20-25 °C, conforme descrito no Procedimento do teste, secção Captura híbrida, passo 7 destas instruções de utilização. Verifique a velocidade do misturador rotativo I calibrando-o, conforme descrito na secção de Calibração da velocidade do agitador do Manual do utilizador do misturador rotativo I.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não adicionou a quantidade correcta de reagente de detecção 1.</li> <li>• Não incubou durante o tempo especificado.</li> </ul>	<p>Pipete 75 µl de reagente de detecção 1 em cada poço, utilizando um pipetador de 8 canais.</p> <p>Incube a uma temperatura de 20-25 °C durante 30 -45 minutos.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não adicionou a quantidade correcta de reagente de detecção 2.</li> <li>• Não incubou durante o tempo especificado.</li> </ul>	<p>Pipete 75 µl de reagente de detecção 2 em cada poço, utilizando um pipetador de 8 canais.</p> <p>Incube a uma temperatura de 20-25 °C durante 15 a 30 minutos.</p>
	Funcionamento ou programação incorrectos do luminómetro.	Para mais informações, consulte as secções referentes à manutenção/assistência e resolução de problemas no manual do utilizador do software de análise de ensaios <i>digene</i> aplicável ou contacte os serviços técnicos da QIAGEN.
<b>Valores elevados de URL nos calibradores, controlos de qualidade e/ou nas amostras (≥ 150 URL em muitos ou todos os poços). O ensaio pode não cumprir os critérios de validação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reagente de desnaturação não adicionado; ou volume incorrecto de reagente adicionado; ou mistura inadequada do reagente de desnaturação com os calibradores, controlos de qualidade e/ou as amostras.</li> <li>• Temperatura do banho de água e nível de água inadequados.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verifique se o pipetador de repetição está a distribuir com precisão antes de adicionar o reagente de desnaturação. É essencial utilizar pipetadores calibrados. Adicione metade do volume de reagente de desnaturação a cada tubo e agite bem. Para evitar resultados falsos-positivos, assegure-se que o líquido cobre toda a superfície interna do tubo (inverta o tubo uma vez se estiver a misturar manualmente). Os calibradores, controlos de qualidade e as amostras devem adquirir uma cor púrpura após a adição do reagente de desnaturação. Verifique a calibração da velocidade do agitador tipo vortex de tubos multi-amostras 2.</li> <li>• Verifique o nível da água e a temperatura do banho.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ligeira fuga no luminómetro.</li> <li>• A vedação está partida.</li> <li>• Porta não selada.</li> </ul>	Faça uma leitura do sinal de fundo (medição dos dados brutos) do luminómetro, lendo uma microplaca vazia. Uma leitura superior a 50 URL indicia a possível existência de uma fuga de luz. Para mais informações, consulte as secções referentes à manutenção/assistência e resolução de problemas no manual do utilizador do software de análise de ensaios <i>digene</i> aplicável ou contacte os serviços técnicos da QIAGEN.
	Contaminação do reagente de detecção 2 ou dos micropoços de captura pelo reagente de detecção 1 ou por fosfatase alcalina exógena.	Consulte o tópico Verificação da Contaminação nesta secção de Resolução de Problemas.
	Tampão de lavagem contaminado.	Consulte o tópico Verificação da Contaminação nesta secção de Resolução de Problemas.

**digene HC2 GC-ID DNA TEST**

OBSERVAÇÃO	CAUSAS PROVÁVEIS	SOLUÇÕES
	Lavador de placas automático contaminado.	Consulte o tópico Verificação da Contaminação nesta secção de Resolução de Problemas.
	Lavagem inadequada dos micropoços de captura depois da incubação com o reagente de detecção 1.	Lave cuidadosamente os micropoços com tampão de lavagem, 6 vezes, enchendo os poços até transbordar cada uma das vezes ou utilizando o lavador de placas automático. Não devem existir qualquer líquido residual cor de rosa nos poços depois da lavagem. Consulte o Guia para a resolução de problemas do <i>manual do utilizador do lavador de placas automático</i> para obter instruções sobre os testes de contaminação e falhas do aparelho.
	Contaminação dos micropoços com o reagente de detecção 1.	Assegure-se que todas as superfícies de trabalho estão limpas e secas. Tenha cuidado quando utilizar o reagente de detecção 1. Evite os aerossóis.
	Manchas de solução de hibridização na mesma área do papel absorvente Kimtowels ou das toalhas de papel com libertação reduzida de pêlo equivalentes.  Uso incorrecto do papel.	Não volte a secar na mesma área do papel absorvente Kimtowels ou das toalhas de papel com libertação reduzida de pêlo equivalentes.  Para a secagem, utilize papel absorvente Kimtowels ou toalhas de papel com libertação reduzida de pêlo equivalentes.
	Material de controlo de qualidade GC utilizado como calibrador positivo. O ensaio falha a validação	Confirme o posicionamento correcto dos calibradores e dos controlos de qualidade.
<b>Quocientes CP/NC baixos ou número elevado de amostras positivas baixas (&gt; 20% do total das amostras) com um quociente URL/VC &lt; 2,0. O ensaio pode não cumprir os critérios de validação</b>	Preparação inadequada das amostras.	Adicione o volume adequado de reagente de desnaturação e agite bem com o vortex. Para evitar resultados falsos-positivos, assegure-se que o líquido cobre toda a superfície interna do tubo, utilizando o método de agitador tipo vortex de tubos multi-amostras 2 durante, pelo menos, 5 segundos (para o método de agitador tipo vortex manual, agite durante pelos menos 5 segundos e inverta o tubo uma vez). Deve observar-se uma alteração clara da cor de incolor para púrpura escuro. Incube durante $45 \pm 5$ minutos a uma temperatura de $65 \pm 2$ °C. Quando usar amostras em solução PreservCyt, é provável que estes híbridos existam nas paredes internas do tubo de conversão da amostra. Para evitar uma possível transferência deste material celular não desnaturado, a ponta da pipeta não pode tocar nos lados do tubo de conversão da amostra durante a transferência da amostra desnaturada para o poço da microplaca utilizado para a hibridização da sonda GC. Consulte as instruções de utilização do dispositivo de conversão de amostras <i>digene</i> HC2 para mais informações sobre o procedimento.
	Sonda inadequadamente misturada ou quantidade insuficiente de sonda adicionada aos ensaios.	Prepare a mistura de sonda conforme descrito. Misture bem com o agitador tipo vortex MST I, assegurando que se forma um vortex visível. A mistura de sondas tem de ser adicionada aos poços com um pipetador multicanal ou de repetição, de forma a assegurar uma distribuição rigorosa.
	Volume inadequado de mistura de sondas adicionada a cada poço da microplaca de hibridização.	Verifique se o pipetador de 8 canais está a distribuir com precisão antes de adicionar a mistura de sondas à microplaca de hibridização. 25 µl de mistura de sonda deve ser adicionada à amostra desnaturada no fundo de cada micropoço. Verifique se o pipetador de 8 canais está a distribuir com precisão antes de adicionar a mistura de sondas aos poços de hibridização. Deve verificar-se uma alteração de cor de púrpura escuro para amarelo depois da adição e da agitação da mistura de sondas.

**digene HC2 GC-ID DNA TEST**

OBSERVAÇÃO	CAUSAS PROVÁVEIS	SOLUÇÕES
	Perda de actividade do reagente de detecção 1.	Armazene o reagente de detecção 1 a uma temperatura de 2-8 °C. Utilize-o antes do final do prazo de validade indicado no rótulo da embalagem exterior.
	Captura insuficiente de híbridos de ARN: ADN.	O procedimento de captura deve ser realizado utilizando o misturador rotativo I regulado para 1100 ±100 rpm. Verifique a velocidade do agitador, conforme descrito na secção de Calibração da velocidade do agitador do manual do utilizador do misturador rotativo I.
	Lavagem inadequada.	Lave cuidadosamente os poços da microplaca com tampão de lavagem, 6 vezes, enchendo os poços até transbordar cada uma das vezes ou utilizando o lavador de placas automático.
	Tampão de lavagem contaminado.	Consulte o tópico Verificação da Contaminação nesta secção de Resolução de Problemas.
<b>Séries de amostras positivas com valores de URL aproximadamente iguais</b>	Contaminação dos poços da microplaca de captura durante a manipulação do ensaio.	Cubra os poços da microplaca de captura durante todas as incubações. Evite expor os poços da microplaca a contaminação por aerossóis durante a realização do ensaio. Use luvas sem pó de talco durante a manipulação.
	Contaminação do reagente de detecção 2.	Tenha cuidado para não contaminar o lote quando pipeta reagente de detecção 2 para os poços da microplaca de captura. Evite a contaminação do reagente de detecção 2 por aerossóis do reagente de detecção 1 ou de poeiras do laboratório, etc.
	Falha do lavador de placas automático.	Consulte o tópico Verificação da Contaminação nesta secção de Resolução de Problemas ou consulte o Guia para a resolução de problemas do <i>manual do utilizador do lavador de placas automático</i> para obter instruções sobre os testes de contaminação ou a identificação de falhas do aparelho.
<b>Grande %CV entre as réplicas</b>	Pipetagem pouco precisa (i.e., bolhas de ar, pipete sem calibrar).	Verifique o pipetador para assegurar que estão a ser transferidos volumes reprodutíveis. Calibre os pipetadores periodicamente.
	Agitação insuficiente.	Misture cuidadosamente em todos os passos. Misture no agitador antes e depois da incubação para a desnaturação. Assegure-se que se forma um vortex visível.
	Transferência incompleta do líquido da microplaca de hibridização para os poços da microplaca de captura.	Tenha cuidado durante a fase de transferência da microplaca de hibridização para a microplaca de captura, de forma a assegurar a transferência de volumes reprodutíveis.
	Condições de lavagem inadequadas.	Lave bem os poços da microplaca com tampão de lavagem, 6 vezes, enchendo os poços até transbordar cada uma das vezes ou utilizando o lavador de placas e protocolos adequados ao lavador de placas.
	Contaminação dos micropoços com o reagente de detecção 1.	Assegure-se que todas as superfícies de trabalho estão limpas e secas. Tenha cuidado quando utilizar o reagente de detecção 1. Evite os aerossóis.
	Contaminação da ponta da pipeta com material não desnaturado durante a transferência de amostras desnaturadas para o poço da microplaca utilizado para a hibridização da sonda GC.	A fase de desnaturação do procedimento de processamento da amostra tem de ser realizado de acordo com estas instruções de utilização. Uma mistura incorrecta da amostra, a inversão do tubo e agitação podem fazer com que a desnaturação fique incompleta de híbridos endógenos de ARN:ADN não específicos das amostras cervicais. Quando usar amostras em solução PreservCyt, em particular, é provável que estes híbridos existam nas paredes internas do tubo de conversão da amostra. Para evitar uma possível transferência deste material celular não desnaturado, a ponta da pipeta não pode tocar nos lados do tubo de conversão da amostra durante a transferência da amostra desnaturada para o microtubo ou o poço da microplaca utilizado para a hibridização da sonda GC.
	Manchas na mesma área do papel absorvente Kimtowels em várias linhas.	Não volte a secar na mesma área do papel absorvente Kimtowels.

**digene HC2 GC-ID DNA TEST**

OBSERVAÇÃO	CAUSAS PROVÁVEIS	SOLUÇÕES
<b>Resultados falsos-positivos obtidos em amostras negativas conhecidas.</b>	Reagente de detecção 2 contaminado.	Tenha cuidado para não se verificar contaminação cruzada das amostras quando adicionar o reagente de detecção 2 entre amostras. Se utilizar apenas uma parte do dispositivo, retire uma alíquota com o volume de que necessita para esse ensaio para um reservatório de reagente antes de encher o pipetador.
	Contaminação dos poços da microplaca com o reagente de detecção 1.	Lave cuidadosamente os micropoços com tampão de lavagem, 6 vezes, enchendo os poços até transbordar cada uma das vezes ou utilizando o lavador de placas automático. Não devem existir qualquer líquido residual nos poços da microplaca depois da lavagem.
	Contaminação da ponta da pipeta com material não desnaturado durante a transferência de amostras desnaturadas para o poço da microplaca utilizado para a hibridização da Sonda GC.	A fase de desnaturação do procedimento de processamento da amostra tem de ser realizado de acordo com estas instruções. Uma mistura incorrecta da amostra, a inversão do tubo e agitação podem fazer com que a desnaturação fique incompleta de híbridos endógenos de ARN:ADN não específicos das amostras cervicais. Quando usar amostras em solução PreservCyt, em particular, é provável que estes híbridos existam nas paredes internas do tubo de conversão da amostra. Para evitar uma possível transferência deste material celular não desnaturado, a ponta da pipeta não pode tocar nos lados do tubo de conversão da amostra durante a transferência da amostra desnaturada para o microtubo ou o poço da microplaca utilizado para a hibridização da Sonda GC.
	Preparação inadequada das amostras.	Adicione o volume adequado de reagente de desnaturação e agite bem com o vortex. Para evitar resultados falsos-positivos, assegure-se que o líquido cobre toda a superfície interna do tubo, utilizando o método de agitador tipo vortex de tubos multi-amostras 2 durante, pelo menos, 5 segundos (para o método de agitador tipo vortex manual, inverta o tubo uma vez). Deve observar-se uma alteração visível da cor de incolor para púrpura escuro. Incube durante $45 \pm 5$ minutos a uma temperatura de $65 \pm 2$ °C. Quando usar amostras em solução PreservCyt, é provável que estes híbridos existam nas paredes internas do tubo de conversão da amostra. Para evitar uma possível transferência deste material celular não desnaturado, a ponta da pipeta não pode tocar nos lados do tubo de conversão da amostra durante a transferência da amostra desnaturada para o poço da microplaca utilizado para a hibridização da Sonda GC. Consulte as instruções de utilização do dispositivo de conversão de amostras <i>digene</i> HC2 para mais informações sobre o procedimento.
	Condições de lavagem inadequadas.	Lave bem os poços da microplaca com tampão de lavagem, 6 vezes, enchendo os poços até transbordar cada uma das vezes ou utilizando o lavador de placas e protocolos adequados ao lavador de placas.
<b>Valores de URL para o calibrador negativo elevados (&gt; 150 URL). O resto do ensaio apresenta o desempenho previsto.</b>	O reagente de detecção 2 foi incubado a uma temperatura superior a 20-25 °C.	O teste é inválido devido a valores elevados do calibrador negativo. Volte a testar e assegure que a fase de Captura e Detecção incuba a 20-25 °C.
	O reagente de detecção 2 foi incubado durante mais de 30 minutos.	Leia a placa aos 15 minutos de incubação (e nunca passados mais de 30 minutos de incubação) a uma temperatura de 20-25 °C.
	O reagente de detecção 2 ou o tampão de lavagem foi contaminado com fosfatase alcalina ou reagente de detecção 1.	Consulte o tópico Verificação da Contaminação nesta secção de Resolução de Problemas

## VERIFICAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO

Reagente avaliado	Procedimento de verificação da contaminação	Interpretação dos resultados
<p><b>Nota:</b> Tenha cuidado quando pipetar o Reagente de detecção 2 para evitar a contaminação. Use luvas e evite tocar com as pontas da pipeta em nenhuma superfície de trabalho.</p>		
<p><b>Reagente de detecção 2</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipete 75 µl de alíquotas, volume residual ou frasco original de Reagente de detecção 2 para um poço de microplaca vazio.</li> <li>• Incube a 20-25°C durante 15 minutos. Evite a luz directa do sol.</li> <li>• Faça a leitura nos poços da microplaca no luminómetro.</li> </ul> <p><b>Nota:</b> A análise do Reagente de detecção 2 em replicados de 3 fornece uma avaliação óptima do desempenho.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O controlo de Reagente de detecção 2 deverá ser &lt; 50 URL.</li> <li>• Se os valores do Reagente de detecção forem &lt; 50 URL, o Reagente de detecção pode ser utilizado para repetir o ensaio.</li> <li>• Em caso de contaminação (&gt;50 URL), obtenha um novo dispositivo e repita o ensaio.</li> </ul>
<p><b>Aparelho de lavagem e/ou Fonte de água</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipete 75 µl de Reagente de detecção 2 para 4 poços separados da microplaca de captura.</li> <li>• Rotule os poços 1-4.</li> <li>• O poço 1 serve como controlo do Reagente de detecção 2.</li> <li>• Pipete 10 µl de tampão de lavagem do frasco de lavagem para o poço 2.</li> <li>• Deixe o tampão de lavagem correr através da tubagem do lavador.</li> <li>• Pipete 10 µl de tampão de lavagem da tubagem para o poço 3.</li> <li>• Obtenha uma alíquota da água utilizada para preparar o tampão de lavagem. Pipete 10 µl de água no poço 4.</li> <li>• Incube a 20-25°C durante 15 minutos. Evite a luz directa do sol.</li> <li>• Faça a leitura nos poços da microplaca no luminómetro.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O controlo de Reagente de detecção 2 (poço 1) deverá ser &lt; 50 URL.</li> <li>• Compare o valor de URL dos poços 2, 3 e 4 com o valor URL de controlo do Reagente de detecção 2 (poço 1). Os valores URL individuais dos poços 2, 3 e 4 não devem exceder 50 URL do valor de URL de controlo do Reagente de detecção 2 (poço 1).</li> <li>• Os valores que excedam 50 URL do controlo de Reagente de detecção 2 indicam a existência de contaminação. Consulte a secção <i>Preparação e armazenamento dos reagentes</i> para obter instruções sobre a limpeza e manutenção do aparelho de lavagem.</li> </ul>
<p><b>Lavador de placas automático</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipete 75 µl de Reagente de detecção 2 para 5 poços separados da microplaca de captura.</li> <li>• Rotule os poços 1-5.</li> <li>• O poço 1 serve como controlo do Reagente de detecção 2.</li> <li>• Pipete 10 µl de tampão de lavagem do frasco do lavador de placas rotulado <i>Lavagem</i> para o poço 2.</li> <li>• Pipete 10 µl do líquido de enxaguamento do frasco lavador de placas rotulado <i>Enxaguamento</i> para o poço 3.</li> <li>• Prima a tecla Prime no teclado do Lavador de placas, permitindo o fluxo de tampão de lavagem pelos tubos.</li> <li>• Pipete 10 µl de tampão de lavagem da cuba para o poço 4.</li> <li>• Prima a tecla Rinse no teclado do Lavador de placas, permitindo o fluxo do líquido de enxaguamento pelos tubos.</li> <li>• Pipete 10 µl de tampão de lavagem da cuba para o poço 5.</li> <li>• Cubra e incube durante 15 minutos a 20-25°C. Evite a luz directa do sol.</li> <li>• Faça a leitura nos poços da microplaca no luminómetro.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O controlo de Reagente de detecção 2 (poço 1) deverá ser &lt; 50 URL.</li> <li>• Compare o valor de URL dos poços 2, 3, 4 e 5 com o valor URL de controlo do Reagente de detecção 2 (poço 1). Os valores URL individuais dos poços 2, 3, 4 e 5 não devem exceder 50 URL do valor de URL de controlo do Reagente de detecção 2 (poço 1).</li> <li>• Os valores que excedam 50 URL do controlo de Reagente de detecção 2 indicam a existência de contaminação do lavador de placas.</li> <li>• Consulte o <i>Procedimento de descontaminação no Manual do utilizador do lavador de placas automático</i>.</li> </ul>

## CONTACTOS DA QIAGEN

Utilize a lista de contactos fornecida com este produto para contactar o seu representante local da QIAGEN.

QIAGEN<sup>®</sup>, *digene*<sup>®</sup>, Hybrid Capture<sup>®</sup> e Rapid Capture<sup>®</sup> são marcas registadas da QIAGEN.

A tecnologia Hybrid Capture está protegida pela patente europeia nº 0 667 918 registada na Áustria, Bélgica, Suíça, Liechtenstein, Alemanha, Dinamarca, Espanha, França, Reino Unido, Grécia, Irlanda, Itália, Luxemburgo, Países Baixos e Suécia.

Números das patentes para o sistema de captura híbrida nos EUA: 6,228,578B1

Reconhecimentos de marcas comerciais:

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

## RESUMO DO *digene* HC2 GC-ID DNA TEST

**Importante:** É importante estar já bem familiarizado com o procedimento pormenorizado antes de utilizar este resumo.

	PROCEDIMENTO	
<b>Desnaturação</b> (Sobre as amostras em solução PreservCyt, consultar o Procedimento de preparação de amostras em solução PreservCyt)	<b>Método de agitador tipo vortex manual</b>  Crie o esquema da placa Rotule a placa de hibridização. Prepare o reagente de desnaturação. ↓ Pipete o reagente de desnaturação (o volume é equivalente a metade do volume da amostra) para os calibradores, controlos de qualidade e as amostras. Agite cada amostra, calibradores e controlo de qualidade individualmente no vortex durante 5 segundos a alta velocidade e inverta (consulte as instruções de utilização para mais informações). ↓ Verifique se todos os tubos apresentam uma cor púrpura. ↓ Incube a uma temperatura de 65 ± 2 °C durante 45 ± 5 minutos. ↓ Prepare a mistura de sondas GC. ↓ ↓ ↓ ↓	<b>Método de agitador tipo vortex de tubos multi-amostras 2</b>  Crie o esquema da placa. Rotule a placa de hibridização. Prepare o reagente de desnaturação. ↓ Pipete o reagente de desnaturação (o volume é equivalente a metade do volume da amostra) para os calibradores, controlos de qualidade e as amostras. ↓ Verifique se todos os tubos apresentam uma cor púrpura. ↓ Cubra o suporte com película e tampa. ↓ Agite durante 10 segundos à velocidade máxima. ↓ Incube a uma temperatura de 65 ± 2 °C durante 45 ± 5 minutos. ↓ Prepare a mistura de sondas GC. ↓ ↓
<b>Hibridização</b>	Agite bem as amostras desnaturadas e pipete 75 µl de amostra desnaturada, calibrador ou controlo de qualidade para os poços da microplaca. ↓ Incube durante 10 minutos a uma temperatura de 20-25 °C. ↓ Pipete 25 µl da mistura de sondas de GC para os poços da microplaca. ↓ Cubra a microplaca com a respectiva tampa e agite no misturador rotativo I a 1100 ±100 rpm durante 3 ±2 minutos. Verifique se todos os poços apresentam uma cor amarela. (As amostras em solução PreservCyt ficam cor-de-rosa.) ↓ Incube a uma temperatura de 65 ± 2 °C durante 60 ± 5 minutos. ↓ Prepare a microplaca de captura. ↓	
<b>Captura híbrida</b>	Transfira o conteúdo de cada poço da placa de hibridização para o poço correspondente na microplaca de captura usando um pipetador de 8 canais. ↓ Cubra com a respectiva tampa ou vedante. ↓ Agite a 110 ±100 rpm a uma temperatura de 20-25 °C durante 60 ±5 minutos. Prepare o tampão de lavagem. ↓ Escorra e seque a microplaca de captura (consulte as instruções de utilização para mais informações). ↓	
<b>Deteção híbrida</b>	Pipete 75 µl de reagente de deteção 1 para cada poço da microplaca de captura. Cubra a microplaca de captura com a respectiva tampa, Parafilm ou equivalente. Incube a uma temperatura de 20-25 °C durante 30 - 45 minutos. Lave a placa utilizando o método desejado. ↓	
<b>Lavagem</b>	<b>Método de lavagem manual</b>  Escorra e seque a microplaca de captura (consulte o folheto informativo para mais informações). ↓ Lave 6 vezes. ↓ Seque sobre toalhas de papel com libertação reduzida de pêlo. ↓	<b>Método de lavador de placas automático</b>  Coloque a placa no lavador e pressione START/STOP para começar. ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
<b>Amplificação do sinal</b>	Pipete 75 µl de reagente de deteção 2 para cada poço da microplaca de captura. <b>Cubra com a respectiva tampa. Incube a uma temperatura de 20-25 °C durante 15 -30 minutos.</b> ↓	
<b>Leitura</b>	Leia a microplaca de captura no luminómetro aprovado pela QIAGEN. ↓ <b>Valide o ensaio e interprete os resultados da amostra.</b>	