



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación e
Institutos
A.N. M. A.T

DISPOSICIÓN N° 3925

BUENOS AIRES 113 ABR. 2016

VISTO, el expediente n° 1-47-3110-5439/15-0 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por las presentes actuaciones la firma TECNOLAB S.A. solicita modificación para el producto para diagnóstico de uso "in Vitro" denominado KIT DE CAPTURA HIBRIDA II GC DIGENE, autorizados por Certificado N° 2893.

Que a fojas 108 consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establecen la Ley N° 16.463, y Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición N° 2674/99.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 y por el Decreto N° 101/15 de fecha 16 de diciembre de 2015.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

DISPONE:

Handwritten signature/initials



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación e
Institutos
A.N. M. A.T

DISPOSICIÓN N° 3925

ARTÍCULO 1º.- Autorízase a la firma TECNOLAB S.A. las siguientes modificación
1) cambio de domicilio de la planta elaboradora: la planta de elaboración Gaithersburg (1201, Clopper Road Gaithersburg, Maryland, USA se trasladó a la planta Germatown (19300 Germatown Road, Germatown, Maryland, USA 20874 ; 2) cambio de nombre, el cual será Digene HC2 GC-ID DNA.test , versión 2 (Código 5140-1220) para el producto para diagnóstico de uso In Vitro denominado KIT DE CAPTURA HIBRIDA II GC DIGENE.

ARTÍCULO 2º.- Dése de baja a los productos autorizados mediante Certificado N° 2893 denominados MUESTREADORES CERVICALES y el PANEL DE CONTROL CT/GC DIGENE(código 5130-116 IVT), manteniéndose la vigencia del mismo.

ARTÍCULO 3º.- Acéptense los nuevos proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones a fojas 34 a 93. Desglosándose las fs. 74 a 93, donde deberán constar las modificaciones descriptas en el artículo 1º precedente.

ARTICULO 4º.- Practíquese la atestación correspondiente en el Certificado n° 2893 cuando el mismo se presente acompañado de la fotocopia autenticada de la presente Disposición.

ARTÍCULO 5º.- Regístrese; gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a sus efectos, por el Departamento de Mesa de Entradas notifíquese al interesado y hágasele entrega de la copia autenticada de la presente Disposición junto con la copia de los proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones.
Cumplido, archívese.-

Expediente n°: 1-47-3110-5439/15-0

DISPOSICIÓN N°: 3925


Dr. ROBERTO LEDESMA
Subadministrador Nacional
A.N.M.A.T.

3925.13 ABR. 2016



Página 1 de 4

PROYECTO DE RÓTULOS EXTERNOS

digene® HC2 GC-ID DNA Test, versión 2 (Código del Producto 5140-1220)



digene® HC2 GC-ID DNA Test, version 2.0

- 0.35 ml Indicator Dye
- 50 ml Denaturation Reagent
- 5 ml Probe Diluent
- 200 µl GC Probe
- 2 ml Negative Calibrator
- 1 ml GC Positive Calibrator
- 1 each Capture Microplate
- 12 ml Detection Reagent 1
- 12 ml Detection Reagent 2
- 100 ml Wash Buffer Concentrate
- 1 ml CT Quality Control
- 1 ml GC Quality Control

QIAGEN
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
USA

 www.QIAGEN.com
+1-800-426-8157

Product of United States

ECT REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
GERMANY
+49 2103 290



RX ONLY

1059749 Rev. 03

Patent 6,221,581

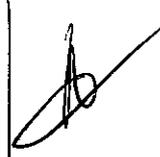
IMPORTADOR: TECNOLAB S.A. Estomba N° 964 -
c1427cco. C.A.B.A. Teléfono: 54-11- 4-555-0010.

DIRECTOR TECNICO: Bioq. Marisol Masino

ORIGEN DE ELABORACION: QIAGEN, 19300 Germantown
Rd, Germantown, MD 20874. USA.

AUTORIZADO POR EL MINISTERIO DE SALUD

CERTIFICADO N°: 002893


MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.

3925

PROYECTO DE RÓTULOS INTERNOS

digene® HC2 GC-ID DNA Test, versión 2 (Código del Producto 5140-1220)

contains sodium hydroxide

Denaturation Reagent
50 ml

REF 1058221 2°C → 30°C

LOT

Product of United States

1090967 Rev. 01

QIAGEN
Maryland, USA

Detection Reagent 1
12 ml

REF 1058224 2°C → 8°C

LOT

Product of United States

1090970 Rev. 01

QIAGEN
Maryland, USA

Detection Reagent 2
12 ml

REF 1058225 2°C → 8°C

LOT

Product of United States

1090971 Rev. 01

QIAGEN
Maryland, USA

Capture Microplate X 1

REF 1058243 2°C → 8°C

LOT

Product of United States

1090980 Rev. 01

QIAGEN • Maryland, USA

MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.

3925

Indicator Dye
2 ml

1090982 Rev. 01

REF 1058210

LOT

2°C 30°C

QIAGEN • Maryland, USA
Product of United States

Negative Calibrator
2 ml

1090966 Rev. 01

REF 1081189

LOT

2°C 8°C

QIAGEN • Maryland, USA
Product of United States

Quality Control GC
1 ml

1090994 Rev. 01

REF 1081198

LOT

2°C 8°C

QIAGEN • Maryland, USA
Product of United States

GC Probe
200 µl

1058275 Rev. 01

REF 1058237

LOT XXXXXXXXXXXX

2°C 8°C

QIAGEN Maryland, USA
Product of United States

2

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]
 MARISOL MASINO
 BIOQUIMICA M.N. 9483
 DT - TECNOLAB S.A.

3925

 contains acetic acid; polyacrylic acid

Probe Diluent
5 ml

REF 1058223 2°C → 8°C

LOT

Product of United States

1090969 Rev. 01

QIAGEN
Maryland, USA

 contains sodium azide

Wash Buffer Concentrate
100 ml

REF 1059688 2°C → 30°C

LOT

Product of United States

1090972 Rev. 01

QIAGEN
Maryland, USA

CT Positive Calibrator
1 ml

REF 1081195 2°C → 8°C

LOT

Product of United States

1090991 Rev. 01

QIAGEN • Maryland, USA

Quality Control CT
1 ml

REF 1081197 2°C → 8°C

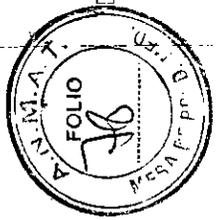
LOT

Product of United States

1090993 Rev. 01

QIAGEN • Maryland, USA


MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 9483
DT - TECNO LAB S.A.



3925

Esta página se dejó intencionalmente en blanco.

Prueba de ADN «digene® HC2 GC-ID DNA Test», versión 2.0

Un ensayo de microplacas de hibridación de ácido nucleico con amplificación de señales para la detección quimioluminiscente del ADN de *Neisseria gonorrhoeae* (GC) en especímenes cervicales

Para uso con:

Dispositivo de recolección de ADN «digene® HC2 DNA Collection Device»
Kit de recolección de especímenes con hisopo vaginal «digene® HC Female Swab Specimen Collection Kit»

CAMBIOS CLAVES DE LA REVISIÓN DEL PROSPECTO ANTERIOR

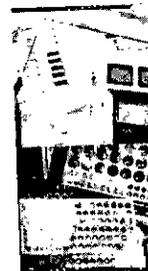
1. Información del fabricante y marca de producto actualizadas.

Para uso profesional solamente, por personal de laboratorio capacitado y validado.
Lea estas instrucciones cuidadosamente antes de usar la prueba.

REF 5140-1220

IVD  96

 **QIAGEN**
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
USA
1059753ES Rev. 01



 **tecnolab s.a.**
estomba 964 . c1427cov
capital federal . argentina
tel. 54 11 4555 0010
54 11 4859 5300
fax 54 11 4553 3331
info@tecnolab.com.ar
www.tecnolab.com.ar
ISO 9001:2008 certificada


MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A

Sample & Assay Technologies

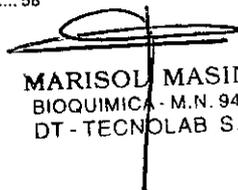
Esta página se dejó intencionalmente en blanco.

ÍNDICE

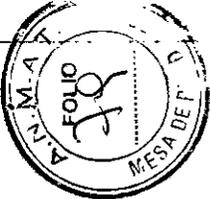
NOMBRE Y USO INDICADO.....	2
PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO.....	4
REACTIVOS Y MATERIALES PROPORCIONADOS	5
CONTIENE AZIDA DE SODIO AL 1.5% (W/W).....	5
GLOSARIO DE SÍMBOLOS.....	6
MATERIALES REQUERIDOS MAS NO SUMINISTRADOS.....	7
ALERTAS Y PRECAUCIONES.....	9
PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS.....	12
RECOLECCIÓN Y MANEJO DE ESPECÍMENES	15
PROCEDIMIENTO DE PRUEBAS.....	16
Pruebas de producción de muestras de alto volumen usando la aplicación RCS	16
Método manual.....	16
Desnaturalización.....	17
Método de Vortexer de tubos multiespecímenes.....	18
Método de vórtice de tubos manual/individual.....	18
Hibridación.....	19
Hybrid Capture	20
Detección híbrida	21
Lavado.....	21
Método del lavador automatizado de placas.....	22
Método de lavado manual.....	22
Amplificación de señales.....	23
CRITERIOS DE VERIFICACIÓN DE CALIBRACIÓN DEL ENSAYO	24
CÁLCULO DEL CORTE.....	26
CONTROL DE CALIDAD	27
INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS ESPECÍMENES	28
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.....	29
RESULTADOS ESPERADOS.....	31
CARACTERÍSTICAS DEL DESEMPEÑO	33
INFORMACIÓN HISTÓRICA	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
GUÍA DE IDENTIFICACIÓN Y RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS.....	50
Verificación de la contaminación.....	56
INFORMACIÓN DE CONTACTO.....	58



i



MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.



3925

NOMBRE Y USO INDICADO

La prueba de ADN «*digene*® Hybrid Capture® 2 (HC2) GC-ID DNA Test» es un ensayo de hibridación de ácido nucleico *in vitro* con amplificación de señales usando quimioluminiscencia de microplacas para la detección cualitativa del ADN de *Neisseria gonorrhoeae* en especímenes cervicales recolectados usando el dispositivo de recolección de ADN «*digene* HC2 DNA Collection Device» (cepillo cervical y el medio de transporte de especímenes «*digene* Specimen Transport Medium» [STM]) o el kit de recolección de especímenes con hisopo vaginal «*digene* Hybrid Capture (HC) Female Swab Specimen Collection Kit» (hisopo Dacron® y medio de transporte de especímenes *digene*). La prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID está indicada para su uso con mujeres sintomáticas o asintomáticas como evidencia de infección con *Neisseria gonorrhoeae*.

Puede usarse la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID como una prueba autónoma o puede usarse como una prueba suplementaria a la prueba de ADN «*digene* HC2 CT/GC DNA Test» para la diferenciación de *Neisseria gonorrhoeae* en especímenes que son positivos por la prueba de ADN *digene* HC2 CT/GC.

Para las pruebas de producción de muestras de alto volumen, puede realizarse la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID usando la aplicación de instrumentos del sistema «Rapid Capture® System» (RCS).

Para uso de diagnóstico *in vitro* IVD

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Neisseria gonorrhoeae es el agente causativo de gonorrea, una de las enfermedades transmisibles más frecuentemente reportadas en los Estados Unidos de Norteamérica. Los Centros para el Control de Enfermedades (CDC, por su sigla en inglés) registraron más de 300,000 casos de esta infección bacteriana durante 1996.¹ Sin embargo, se estima que la mayoría de los casos quedan sin reportarse debido a un gran número de infecciones inicialmente asintomáticas y que hay hasta un millón de nuevos casos anualmente.² Las infecciones gonorreicas asintomáticas son de particular preocupación no solamente a causa del potencial cada vez mayor de transmisión de *Neisseria gonorrhoeae*, sino también a causa de las consecuencias de salud serias enfrentadas por aquellos individuos que quedan sin tratamiento. Si bien la mayoría de las infecciones en los hombres evoluciona rápidamente para producir síntomas obvios que los llevan a buscar tratamiento, la incidencia de infecciones asintomáticas en las mujeres es mucho mayor, y las bacterias frecuentemente quedan sin detectarse hasta el desarrollo de complicaciones serias, tales como la enfermedad inflamatoria pélvica (PID).³ En respuesta a estos desarrollos, el CDC ha abogado por el tamizaje de individuos en alto riesgo de forma rutinaria como una medida primaria para controlar la gonorrea en los Estados Unidos de Norteamérica.⁴

Neisseria gonorrhoeae son diplococos Gram negativos e inmóviles que tienen requisitos de crecimiento bastante complejos. Son aerobios, produciendo un crecimiento óptimo a temperaturas de 35-37° C en presencia de 3-5% de CO₂ y ≥ 70% de humedad relativa. Se obtiene tradicionalmente el presunto diagnóstico para *Neisseria gonorrhoeae* aislando organismos de cultivos de especímenes clínicos y usando una cepa Gram para el examen morfológico. Puede obtenerse un diagnóstico definitivo con una prueba de oxidasa y/o catalasa positiva del cultivo. La confirmación adicional de los resultados incluye pruebas de degradación de carbohidratos, aglutinación y fermentación de azúcares. Pruebas más definitivas y directas para *Neisseria gonorrhoeae* incluyen pruebas de detección antigénica y de sonda de ácidos nucleicos. Se ha demostrado que un ensayo inmunosorbente con colorante enzimático es tan sensible y específico como la cepa Gram para detectar gonococos en especímenes uretrales masculinos y de orina de primera micción, pero tiene una sensibilidad reducida cuando se aplica a endoespecímenes cervicales.^{5, 6} Ya que la prueba de detección antigénica puede reaccionar de manera cruzada con las especies de *Neisseria* comensales y relacionadas⁷, solamente se puede usar esta prueba para el presunto diagnóstico.³

Más recientemente, se ha usado la detección directa de los ácidos nucleicos de *Neisseria gonorrhoeae* para evaluar los especímenes clínicos. Se ha encontrado que este abordaje es sensible y específico para la detección de *Neisseria gonorrhoeae* en poblaciones de alto riesgo usando tanto endoespecímenes uretrales masculinos como cervicales.

MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

La prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID que usa la tecnología Hybrid Capture 2 es un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos con amplificación de señales que utiliza la detección quimioluminiscente de microplacas. Los especímenes que contienen el ADN blanco se hibridan con un cóctel de sondas de ARN de GC específico. Se capturan los híbridos de ARN:ADN resultantes en la superficie de un micropozo cubierto con anticuerpos específicos para híbridos de ARN:ADN. Posteriormente se reaccionan los híbridos inmovilizados con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina específicos para los híbridos de ARN:ADN, y detectados con un sustrato quimioluminiscente. Se conjugan varias moléculas de fosfatasa alcalina a cada anticuerpo. Múltiples anticuerpos conjugados se unen a cada híbrido capturado dando como resultado una amplificación sustancial de señales. Conforme el sustrato es segmentado por la fosfatasa alcalina unida, se emite luz, la cual se mide como unidades relativas de luz (URL) en un luminómetro. La intensidad de la luz emitida denota la presencia o ausencia de ADN blanco en el espécimen. Una medición de URL igual o mayor a una razón especificada al valor de corte (CO) positivo indica la presencia de ADN de GC en el espécimen. Una medición de URL menor a una razón especificada al valor de corte positivo indica la ausencia de ADN de GC o niveles de ADN de GC por debajo del límite de detección del ensayo.

El cóctel de sondas de GC contiene una mezcla de sondas específicamente escogida para eliminar o minimizar la reactividad cruzada con las secuencias de ADN de células humanas, u otras especies bacterianas, o la especie *Neisseria* aparte de *Neisseria gonorrhoeae*. El cóctel de sondas de GC suministrado con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID es complementario a aproximadamente 9,700 bp ó 0.5% del AD genómico de *Neisseria gonorrhoeae* (1.9 x 10⁶ bp).^a Una sonda es complementaria al 100% del plásmido críptico de 4200 bp.

Pueden realizarse pruebas de producción de muestras de alto volumen con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID utilizando un sistema de pipeteado y dilución automatizado de uso general referido como el sistema «Rapid Capture System» (RCS). Este instrumento, que usa una aplicación específica a la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID, procesa hasta 352 especímenes en ocho horas. Para dar la posibilidad de pruebas de producción de muestras de alto volumen, todas las etapas del procedimiento del ensayo son realizadas por el RCS, con excepción de la desnaturalización de especímenes, detección de señales quimioluminiscente, y el reporte de resultados.

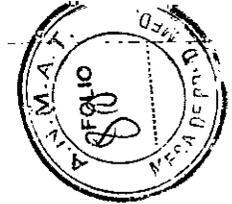
REACTIVOS Y MATERIALES PROPORCIONADOS

Hay 96 pruebas en un kit de pruebas de ADN *digene* HC2 GC-ID (REF 5140-1220). El número de resultados de pacientes variará dependiendo del número de usos por kit:

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

- 1 x 0.35 mL **Colorante indicador**
Contiene azida de sodio al 0.05% (w/v).
- 1 x 50 mL **Reactivo de desnaturalización***
Solución de hidróxido de sodio (NaOH) diluida.
- 1 x 5 mL **Diluyente de sonda***
Solución amortiguada con azida de sodio al 0.05% (w/v).
- 1 x 200 µL **Sonda de GC**
Cóctel de sondas de ARN de GC en solución amortiguada.
- 1 x 2 mL **Calibrador negativo***
ADN acarreador en STM con azida de sodio al 0.05% (w/v).
- 1 x 1 mL **Calibrador positivo (PC) de GC ***
1.0 pg/mL de ADN de GC clonado y ADN acarreador en STM con azida de sodio al 0.05% (w/v).
- 1 x 1 mL **CT de control de calidad (CT de QC)***
5.0 pg/mL de ADN de CT clonado y ADN acarreador en STM con azida de sodio al 0.05% (w/v).
- 1 x 1 mL **GC de control de calidad (GC de QC)***
5.0 pg/mL de ADN de GC clonado y ADN acarreador en STM con azida de sodio al 0.05% (w/v).
- 1 x 1 **Microplaca de captura**
Cubierta con anticuerpos híbridos de ARN:ADN policlonales cabrios.
- 1 x 12 mL **Reactivo de detección 1**
Anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina a híbridos de ARN:ADN en solución amortiguada con 0.05% (w/v) de azida de sodio.
- 1 x 12 mL **Reactivo de detección 2**
CDP-Star® con Emerald II (sustrato quimioluminiscente)
- 1 x 100 mL **Concentrado de la solución amortiguadora de lavado**
Contiene azida de sodio al 1.5% (w/v).

* Véase la sección *Alertas y precauciones* de este inserto para información de salud e inocuidad.



3925

GLOSARIO DE SÍMBOLOS

RX ONLY

«Bajo prescripción solamente»

Precaución: las leyes federales de EE.UU. restringen este dispositivo para su venta por o a nombre de un médico.

MATERIALES REQUERIDOS MAS NO SUMINISTRADOS

Equipo de diagnóstico *in vitro* y accesorios del sistema Hybrid Capture ^A

Sistema «*digene* Hybrid Capture 2 System» (en lo sucesivo, denominado como «sistema *digene* HC2»), consistente en un luminómetro aprobado por QIAGEN (en lo sucesivo, denominado como «luminómetro»), computadora personal y periféricos para computadora aprobados por QIAGEN (monitor, teclado, ratón, impresora y cable de impresora), el software del sistema «*digene* HC2 System Software» (en lo sucesivo, denominado como «software de análisis del ensayo *digene*»), los protocolos de ensayo para GC-ID del sistema «*digene* HC2 System Assay Protocols for GC-ID», el software de placas «LumiCheck Plate Software», y la guía de usuario del sistema «*digene* Hybrid Capture ² System User Guide»; o el equipo listado anteriormente y el software cualitativo «*digene* Qualitative Software» versión 1.3 ó anterior (en lo sucesivo, denominado como «software de análisis del ensayo *digene*») y el manual de usuario del software cualitativo «*digene* Qualitative Software User Manual»

Agitador giratorio I del sistema «Hybrid Capture System Rotary Shaker I»

Calentador de microplacas I del sistema «Hybrid Capture System Microplate Heater I»

Lavador – o aparato de lavado – de placas automatizado del sistema «Hybrid Capture System Automated Plate Washer –or Wash Apparatus»

Tubo multiespecímenes Vortexer 2 del sistema «Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube Vortexer 2»; gradilla para especímenes y tapa para gradilla «*digene* Specimen Rack and Rack Lid» (opcional)^E

Pipeta y soporte «EXPAND-4 Pipettor and Stand» (opcional)^C

Dispositivo de recolección de ADN «*digene* HC2 DNA Collection Device» (consiste en cepillo cervical y medio de transporte de especímenes «*digene* Specimen Transport Medium»)^D

Kit de recolección de especímenes con hisopo vaginal «*digene* HC Female Swab Specimen Collection Kit» (consiste en 2 hisopos Dacron y medio de transporte de especímenes *digene*)^D

Dispensador de sellador de tubos y dispositivo de corte (opcionales, usados con el tubo multiespecímenes Vortexer)

Sistema «Rapid Capture System» (opcional para pruebas de producción de muestras de alto volumen)^E

Tubos de recolección de especímenes

Gradilla para tubos de recolección de especímenes (para ajustar los tubos de recolección de especímenes)

Gradilla de tubos de especímenes

Microplaca de hibridación

Tapas para microplacas

Tiras para microplacas vacías (disponibles de Costar, modelo #2581); opcional para uso con el lavador de placas automatizado

Puntas para pipeta extralargas para remoción de espécimen

Tapa roscas de tubos de recolección de especímenes

Reservorios de reactivos desechables

Película selladora de tubos «DuraSeal[®] Tube Sealer Film»

Equipo y accesorios para uso general de laboratorio

Baño maría a 65 ± 2° C de suficiente tamaño para sujetar ya sea una gradilla para tubos de multiespecímenes Vortexer (36 x 21 x 9 cm) o dos gradillas para especímenes (cada uno 31.7 x 15.2 x 6.4 cm)

Microcentrífuga (opcional para centrifugar viales de sondas para obtener un volumen de sondas máximo)

Mezcladora de vórtice con accesorio de copa

Micropipeta de un solo canal; configuraciones variables para volúmenes de 20-200 µL y 200-1000 µL

Pipeta de desplazamiento positivo repetidora, como pipeta Eppendorf[®] Repeater[®]

Pipeta de ocho canales, con capacidad de suministro de 25-75 µL

Temporizador

MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.

Solución de hipoclorito de sodio, 5% v/v (o blanqueador de uso doméstico)
Parafilm® o equivalente
Puntas para pipeta con barrera de aerosol desechables para pipeta de un solo canal (20 a 200 µL y 200-1000 µL)
Puntas desechables para pipeta Eppendorf Repeater (25 y 500 µL)
Puntas desechables para pipeta de ocho canales (25 a 200 µL)
Toallas Kimtowels® o toallas de papel con poca pelusa equivalentes
Cubierta de mesa de trabajo desechable
Guantes libres de polvo
Tapa de ajuste a presión de 5 mL y/o 15 mL, tubos de polipropileno de fondo redondo (para la dilución de sondas)
Tubos de microcentrifuga de polipropileno de 2.0 mL con tapas

^A Solamente el equipo y los accesorios validados con pruebas de ADN «*digene* HC2 CT/GC DNA Tests» están disponibles de QIAGEN. Remítase a un representante de QIAGEN local.

^B También se requiere para su uso cuando realice la aplicación de RCS semiautomatizada.

^C Artículo personalizado. Pueden usarse otras pipetas multicanales expansibles personalizadas, un espacio para la punta proporcionado de 3.2 cm es logable cuando se expande. De forma alternativa, puede usarse una pipeta de un solo canal capaz de pipetear 75 µL.

^D Se establecieron las características de desempeño de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID solamente con los kits de recolección indicados.

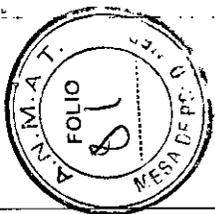
^E Remítase a la *Guía de usuario del sistema Rapid Capture* para instrucciones específicas para el uso de ese sistema para pruebas de producción de muestras de alto volumen con este ensayo.

ALERTAS Y PRECAUCIONES

LEA TODAS LAS INSTRUCCIONES CUIDADOSAMENTE ANTES DE USAR LA PRUEBA.
Remítase al Glosario de símbolos para explicaciones de los símbolos usados en el etiquetado.

Precauciones de seguridad

1. MANEJE TODOS LOS ESPECÍMENES DEL ENSAYO Y MATERIALES DESECHADOS COMO SI FUESEN CAPACES DE TRANSMITIR AGENTES INFECCIOSOS. Deberán manejarse los especímenes de los pacientes en el nivel 2 de BSL como es recomendado para cualquier especímenes sérico o sanguíneo humano potencialmente infeccioso en el manual de CDC-NIH, *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 3ª edición, 1993, pp. 10 – 13 y el lineamiento M29-A aprobado por Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue* [Protección de trabajadores de laboratorio de biopeligros del instrumental y enfermedades infecciosas transmitidas por sangre, líquidos corporales y tejido].
2. No pipetee por la boca.
3. No fume, coma o beba en áreas donde se manejen reactivos o especímenes.
4. Use guantes libres de polvo desechables mientras manipule reactivos o especímenes. Lávese las manos completamente después de realizar la prueba.
5. Todos los materiales usados en este ensayo, incluyendo los reactivos y especímenes, deberán desecharse de una manera que inactiven los agentes infecciosos de conformidad con la normatividad nacional y local.
Residuos sólidos: Autoclave.
Residuos líquidos: Agregue hipoclorito de sodio a una concentración final de 0.5% (dilución 1:10 de blanqueador de uso doméstico). Permita 30 minutos para una descontaminación antes de la disposición.^{34, 35}
6. DERRAMES: limpie y desinfecte todos los derrames de especímenes usando un desinfectante tuberculocidal, tal como el hipoclorito de sodio al 0.5%, u otro desinfectante idóneo. Deberán neutralizarse y secarse con trapo los derrames que contengan base y posteriormente deberán limpiarse las áreas con derrame con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%.
7. Deberá cubrirse el área limpiada con material absorbente, saturado con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% y dejarse reposar durante por lo menos 10 minutos. Puede usarse una cubierta o charola de vidrio o plástico para reducir la exposición a humos.
8. **Trate todos los materiales de limpieza como residuo nocivo y desecho de conformidad con la normatividad nacional y local.**



3925

[Handwritten mark]

PRUEBAS AUTOMATIZADAS CON RCS

Remítase al *Manual de usuario del sistema Rapid Capture* para Alertas y precauciones adicionales específicas para el uso de ese sistema para pruebas de producción de muestras de alto volumen.

DECLARACIONES DE SEGURIDAD Y RIESGOS PARA COMPONENTES

Se aplican las siguientes frases de riesgos y seguridad a los componentes del kit de prueba de ADN «*digene* HC2 GC-ID»:

Concentrado de la solución amortiguadora de lavado



Contiene: azida de sodio. ¡Alerta! Dañino si se traga. Dañino para la vida acuática con efectos de larga duración. Evite que se libere al medio ambiente. Deseche el contenido/contenedor a una planta de desechos residuales aprobada.

Reactivo de desnaturalización



Contiene: hidróxido de sodio. ¡Peligro! Causa quemaduras severas a la piel y daños a los ojos. Puede ser corrosivo a metales. Deseche el contenido/contenedor a una planta de desechos residuales aprobada. SI SE ENCUENTRA EN LOS OJOS: enjuague cuidadosamente con agua por varios minutos. Quitese las lentes de contacto, si están presentes y es fácil de hacer. Continúe enjuagando. SI SE ENCUENTRA EN LA PIEL (o el cabello): quítese inmediatamente toda la ropa contaminada. Enjuague la piel con agua/regadera. Llame inmediatamente a un CENTRO TOXICOLÓGICO o doctor/médico. Almacene con seguro. Use guantes protectores/ropa protectora/protección para los ojos/protección para el rostro.

Diluyente de sonda



Contiene: ácido acético; ácido poliacrílico. ¡Peligro! Causa quemaduras severas a la piel y daños a los ojos. Deseche el contenido/contenedor a una planta de desechos residuales aprobada. SI SE ENCUENTRA EN LOS OJOS: enjuague cuidadosamente con agua por varios minutos. Quitese las lentes de contacto, si están presentes y es fácil de hacer. Continúe enjuagando. SI SE ENCUENTRA EN LA PIEL (o el cabello): quítese inmediatamente toda la ropa contaminada. Enjuague la piel con agua/regadera. Llame inmediatamente a un CENTRO TOXICOLÓGICO o doctor/médico. Almacene con seguro. Use guantes protectores/ropa protectora/protección para los ojos/protección para el rostro.

Calibrador positivo de CGC

¡Alerta! Causa irritación leve a la piel. Si ocurre irritación en la piel: obtenga consulta/atención médica.

Control de calidad de CT

¡Alerta! Causa irritación leve a la piel. Si ocurre irritación en la piel: obtenga consulta/atención médica.

Control de calidad de GC

¡Alerta! Causa irritación leve a la piel. Si ocurre irritación en la piel: obtenga consulta/atención médica.

Calibrador negativo

¡Alerta! Causa irritación leve a la piel. Si ocurre irritación en la piel: obtenga consulta/atención médica.

MÁS INFORMACIÓN

Hojas de datos de seguridad: www.qiagen.com/safety

PRECAUCIONES DE MANEJO

1. Para uso de diagnóstico *in vitro* solamente.
2. Cepillo cervical para uso con mujeres no embarazadas solamente.
3. No use los reactivos más allá de la fecha de caducidad en el marbete de la caja externa.
4. Se han probado estos componentes como una unidad. No intercambie los componentes de otras fuentes o de distintos lotes.
5. Los ácidos nucleicos son muy sensibles a la degradación medioambiental de las nucleasas. Las nucleasas están presentes en la piel humana y en las superficies o materiales manejados por humanos. Limpie y cubra las superficies de trabajo con almohadillas desechables y use guantes libres de polvo cuando realice todas las etapas del ensayo.
6. Deberá tenerse cuidado en prevenir la contaminación de la microplaca de captura y el reactivo de detección 2 con fosfatasa alcalina exógena durante la realización del ensayo. Las sustancias que pueden contener fosfatasa alcalina incluyen el reactivo de detección 1, las bacterias, saliva, cabello y aceites de la piel. **Cubrir la microplaca de captura después de la etapa de lavado y durante la etapa de incubación del reactivo de detección 2 es especialmente importante porque la fosfatasa alcalina exógena puede reaccionar con el reactivo de detección 2, produciendo resultados falsos positivos.**
7. Proteja el reactivo de detección 2 de la exposición prolongada a la luz directa. Use el reactivo inmediatamente después de dividir en partes alicuotas y evitar la luz solar directa.
8. Deberá tenerse cuidado en suministrar los volúmenes correctos de reactivos a los tubos de reacción y microplacas en todas las etapas y mezclar bien después de cada adición de reactivo. Deberá iniciarse la pipeta repetidora por anticipado del suministro de reactivo y verificarse por burbujas de aire grandes de forma periódica. Cantidades excesivas de burbujas de aire grandes en la punta de la pipeta repetidora pueden causar un suministro inexacto y pueden evitarse llenando la pipeta, dispensando todo el líquido y rellenando. Véanse los manuales de instrucciones de las pipetas para indicaciones específicas de uso.
9. Deberá realizarse un pipeteado de multicanales usando la técnica de pipeteado reverso para dispensar los reactivos de detección 1 y 2. Verifique cada punta de pipeta en la pipeta de multicanales para un ajuste y llenado apropiados. Véanse las indicaciones de uso específicas.
10. Deberá tenerse cuidado durante el lavado para asegurar que cada micropozo se lave completamente. El lavado inadecuado dará como resultado un fondo incrementado y puede causar resultados falsos positivos. La solución amortiguadora de lavado residual en los pozos puede dar como resultado una señal reducida o una pobre reproducibilidad.
11. Permita 60 minutos para que el calentador de microplacas 1 se equilibre a temperatura desde un inicio frío. No permitir este periodo de calentamiento podría dar como resultado que se derrita la microplaca de hibridación. Consulte el *Manual del operador del calentador de microplacas 1* para detalles.

[Handwritten mark]

[Handwritten signature]
MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.

3

PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

- Al recibir, conserve el kit a 2-8° C.
- No se use después de la fecha de caducidad indicada junto al símbolo  en el marbete de la caja externa o la fecha de caducidad de los reactivos preparados (véase a continuación).
- Todos los reactivos proporcionados están listos para usarse, excepto el reactivo de desnaturalización, la mezcla de sondas de GC y la solución amortiguadora de lavado.

Remítase a la *Guía de usuario del sistema Rapid Capture* para la preparación de la mezcla de sondas de GC, la solución amortiguadora de lavado, el reactivo de detección 1 y el reactivo de detección 2, ya que esas instrucciones son específicas para el uso de ese sistema para pruebas de producción de muestras de alto volumen.

Método de preparación de reactivos

<p>Reactivo de desnaturalización</p>	<p>PREPARE PRIMERO: Agregue cinco gotas de colorante indicador a la botella de reactivo de desnaturalización y mezcle completamente. El reactivo de desnaturalización deberá ser de un color púrpura oscuro y uniforme.</p> <p>Una vez preparado, el reactivo de desnaturalización está estable por tres meses cuando se conserve a 2-8° C. Etiquételo con la nueva fecha de caducidad. Si se desvanece el color, agregue tres gotas adicionales de colorante indicador y mezcle completamente antes de usarse.</p> <p>Alerta: el reactivo de desnaturalización es corrosivo. Use ropa protectora, guantes y protección para los ojos/rostro idóneos. Tenga cuidado cuando se manipule.</p>
<p>Mezcla de sondas de GC (preparada de los reactivos de sondas de GC y diluyente de sondas)</p>	<p>PREPARE DURANTE LA INCUBACIÓN DE DESNATURALIZACIÓN DE ESPECÍMENES:</p> <p>IMPORTANTE: ALGUNAS VECES LA SONDA SE QUEDA ATRAPADA EN LA TAPA DEL VIAL.</p> <p>Nota: deberá tenerse mucho cuidado en esta etapa para prevenir una contaminación de RNasa de la sonda y la mezcla de sondas. Use puntas de pipeta con barrera de aerosol para pipetear la sonda. El diluyente de la sonda es viscoso. Deberá tenerse cuidado en asegurar una mezcla completa cuando se prepare la mezcla de sondas de GC. Un vórtice visible debe formarse en el líquido durante la etapa de mezcla. Una mezcla incompleta puede dar como resultado una señal reducida.</p> <ul style="list-style-type: none"> Centrifugue el vial de la sonda de GC brevemente para llevar el líquido al fondo del vial. Golpee suavemente el tubo para mezclar. Determine la cantidad de mezcla de la sonda requerida (25 µL/prueba). Se recomienda que la mezcla de la sonda extra se haga para justificar el volumen que puede perderse en las puntas de pipeta o en el costado del vial. Remítase a los volúmenes sugeridos listados a continuación. El número más pequeño de pozos recomendado para cada uso es de 24. Si se desean menos de 24 pozos por corrida, puede reducirse el número total de pruebas por kit debido a volúmenes limitados de sonda y de diluyente de sonda. Pase la cantidad requerida de diluyente de sonda a un contenedor desechable nuevo. Dependiendo del número de pruebas, se recomienda un tubo de polipropileno de fondo redondo con tapa a presión de 5 mL ó 15 mL. Haga una dilución 1:25 de la sonda de GC en el diluyente de

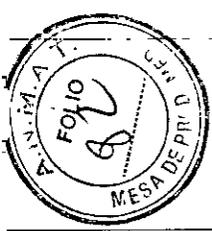
No. de pruebas/liras	Volumen del diluyente de sonda *	Volumen de la sonda *
96/12	4.0 mL	160.0 µL
72/9	3.0 mL	120.0 µL
48/6	2.0 mL	80.0 µL
24/3	1.0 mL	40.0 µL
Por pozo	0.045 mL	1.8 µL

* Estos valores incluyen el volumen extra recomendado.

- Pipetee la sonda en el diluyente de sonda colocando la punta de la pipeta contra la pared interna del tubo justo por encima del menisco y expulsando el contenido. **No sumerja la punta en el diluyente de sonda.**
- Coloque en vórtice durante por lo menos cinco segundos a velocidad máxima para mezclar completamente. **Debe producirse un vórtice visible.** Etiquete como mezcla de sondas de GC y manténgase en un contenedor sellado hasta que está lista para su uso. **Deberá desecharse la mezcla de la sonda no usada.**

<p>Solución amortiguadora de lavado</p>	<p>PREPARE DURANTE LA ETAPA DE CAPTURA: Para el lavador automatizado de placas del sistema Hybrid Capture, puede prepararse la solución amortiguadora de lavado como se describe a continuación y almacenarse en un contenedor limpio y cerrado o prepararse 1 L a la vez y colocarse en los reservorios del lavador automatizado de placas. Véase la tabla a continuación para los volúmenes de mezcla.</p> <p>Alerta: el concentrado de la solución amortiguadora de lavado es tóxico por ingesta. Use ropa protectora, guantes y protección para los ojos/rostro idóneos. Para minimizar la exposición, agregue agua al concentrado de la solución amortiguadora de lavado cuando se prepare.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Cantidad de concentrado de solución amortiguadora de lavado</th> <th>Cantidad de agua destilada o desionizada</th> <th>Volumen final de la solución amortiguadora de lavado</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>33.3 mL</td> <td>966.7 mL</td> <td>1 L</td> </tr> <tr> <td>66.6 mL</td> <td>1,933.4 mL</td> <td>2 L</td> </tr> <tr> <td>100.0 mL</td> <td>2,900.0 mL</td> <td>3 L</td> </tr> </tbody> </table> <p>Nota: es muy importante dejar prendido siempre el lavador automatizado de placas en todo momento. Esto permite que se realice el enjuague de mantenimiento después de ocho horas de inactividad.</p> <p>Antes de cada corrida del ensayo, asegúrese de que el reservorio residual del lavador automatizado de placas esté vacío y el reservorio de enjuague esté lleno con agua destilada o desionizada.</p> <p>Véase el <i>Manual del operador del lavador automatizado de placas</i> para instrucciones adicionales de cuidados y mantenimiento.</p> <p>De forma alternativa, para el lavado manual: • Diluya 100 mL del concentrado de la solución amortiguadora de lavado con 2.9 L de agua destilada o desionizada en el aparato de lavado y mezcle bien (el volumen final deberá ser de 3 L).</p>	Cantidad de concentrado de solución amortiguadora de lavado	Cantidad de agua destilada o desionizada	Volumen final de la solución amortiguadora de lavado	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
Cantidad de concentrado de solución amortiguadora de lavado	Cantidad de agua destilada o desionizada	Volumen final de la solución amortiguadora de lavado											
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											

MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S



3925

• Cierre el contenedor para prevenir una contaminación o evaporación.

Una vez preparada, la solución amortiguadora de lavado está estable por tres meses a 2-25° C. Etiquétela con la fecha de caducidad nueva. Si se ha refrigerado la solución amortiguadora de lavado, equilibre a 20-25° C antes de su uso.

Se recomienda que el aparato de lavado y la tubería se limpien con solución al 0.5% de hipoclorito de sodio y se enjuague completamente con agua destilada o desionizada una vez cada tres meses para prevenir una posible contaminación de fosfatasa alcalina presente en bacterias y mohos.

Volúmenes para reactivos listos para usarse

Reactivo de detección 1 y reactivo de detección 2	INMEDIATAMENTE ANTES DE SU USO:	
	No. de pruebas/tiras	Volumen del reactivo de detección 1 ó 2
	96/12	Contenido de la botella
	72/9	7.0 mL
	48/6	5.0 mL
	24/3	3.0 mL
	1 prueba	0.125 mL

RECOLECCIÓN Y MANEJO DE ESPECÍMENES

Los especímenes cervicales recolectados y transportados usando el dispositivo de recolección de ADN *digene* HC2 (cepillo cervical y medio de transporte de especímenes *digene*) o el kit de recolección de especímenes con hisopo vaginal *digene* HC (hisopo Dacron y medio de transporte de especímenes *digene*) son los únicos especímenes recomendados para su uso con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID. NO se han calificado para su uso los especímenes tomados con otros dispositivos de muestreo o transportados en otros medios de transporte con este ensayo. Deberán recolectarse los especímenes cervicales antes de la aplicación de ácido acético o yodo si se está realizando un examen colposcópico. **No debe** quitarse el dispositivo de recolección de especímenes del tubo que contiene el medio de transporte de especímenes *digene* antes de volver a poner la tapa y después de la recolección.

Pueden retenerse los especímenes por hasta dos semanas a temperatura ambiente y embarcarse sin refrigeración al laboratorio de análisis. Deberán embarcarse los especímenes en un contenedor aislado usando ya sea un proveedor de paquetería de un día para otro o de 2 días. En el laboratorio de análisis, deben conservarse los especímenes a 2-8° C si debe realizarse el ensayo dentro de una semana. Si se realiza el ensayo después de una semana, conserve los especímenes a -20° C por hasta tres meses. Se ha adicionado un conservador al medio de transporte de especímenes *digene* para retardar el crecimiento bacteriano y retener la integridad del ADN. No está indicado para conservar la viabilidad de organismos o células.

La estabilidad de los especímenes por dos semanas a temperatura ambiente, más una semana adicional a 2-8° C, se basa en pruebas internas de 90 especímenes clínicos simulados. Estos 90 especímenes incluyeron 40 que contenían bajas concentraciones de organismo de GC (en o casi el límite de detección [LOD, por su abreviatura en inglés] del ensayo), 35 que eran especímenes moderadamente positivos (aproximadamente 2-5 veces el LOD), y cinco especímenes positivos altos que excedieron 10 veces el LOD. Los 10 especímenes restantes fueron negativos para GC. No obstante, cinco contenían un alto nivel de organismo de CT. Se basan los estimados de desempeño para el ensayo en especímenes conservados a 2-8° C o congelados y probados dentro de 1-2 semanas de la recolección.

Notas:

- Para que se desprendan las tapas, los especímenes que se embarcan o conservan congelados:
 - Cubra las tapas con Parafilm antes de embarcar los especímenes previamente congelados. Pueden embarcarse los especímenes congelados o a 15-30° C.
 - Cuando quite los especímenes del congelador para pruebas, sustituya las tapas inmediatamente con tapa rosca de tubos de recolección de especímenes.
- No debe usarse el dispositivo de recolección de ADN *digene* HC2 para mujeres embarazadas. Recolecte los especímenes de mujeres embarazadas usando el kit de recolección de especímenes con hisopo vaginal *digene* HC solamente.


 MARISOL MASINO
 BIOQUIMICA - M.N. 9483
 DT - TECNOLAB S.A.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBAS

Los especímenes pueden contener agentes infecciosos y deberán manejarse como corresponda. Puede realizarse manualmente la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID como se instruyó en estas instrucciones de uso o usando el instrumento del sistema Rapid Capture para pruebas de producción de muestras de alto volumen.

Pruebas de producción de muestras de alto volumen usando la aplicación RCS

El sistema Rapid Capture es un sistema de pipeteado y dilución automatizado de uso general que puede usarse con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID para pruebas de producción de muestras de alto volumen. Este sistema maneja hasta 352 especímenes en ocho horas, incluyendo un período de 3.5 horas durante el cual no se requiere la intervención del usuario; pueden generarse hasta 704 resultados de especímenes en 13 horas. Se realiza la desnaturalización de los especímenes en la preparación para pruebas independientemente del RCS, en el tubo de recolección primario, como se hace para el método manual de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID descrita a continuación, antes de colocarse en la plataforma del RCS. Además, se realizan la detección de señales quimioluminiscentes y el reporte de resultados usando el sistema de luminómetros fuera de línea común tanto para el método manual como del RCS. Se realiza cada una de las etapas de procedimiento de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID en la secuencia exacta que el procedimiento de pruebas manuales. La aplicación del RCS permite el procesamiento escalonado de hasta cuatro microplacas, cada placa conteniendo especímenes y los calibradores y controles de calidad del ensayo requeridos. Ya que los accesorios requeridos para la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID y las etapas del procedimiento son iguales, también puede realizarse el ensayo manualmente como se describe en la siguiente sección.

Cuando use el sistema Rapid Capture, remítase a la *Guía de usuario del sistema Rapid Capture* proporcionada con el instrumento, además de estas instrucciones de uso, para la información de procedimientos y descriptiva necesaria.

Método manual

Preparación

- Deje que se equilibre 60 minutos el calentador de microplacas I a $65 \pm 2^\circ$ C desde un inicio frío. Consulte el *Manual del operador del calentador de microplacas I* para detalles.
- Quite los especímenes y todos los reactivos requeridos del refrigerador antes de comenzar el ensayo. Deje que alcancen $20-25^\circ$ C por 15-30 minutos.
- Use el software de análisis del ensayo *digene* con los protocolos de ensayo *digene* para GC-ID para crear el archivo de distribución de placas. Consulte la guía de usuario del software de análisis del ensayo *digene* aplicable para detalles.
- Deben prepararse frescos los calibradores y controles de calidad para cada corrida. Mezcle los calibradores y los controles de calidad bien. Si se usa el Vortexer de tubos multiespecímenes, quite 500 μ L de cada uno en los tubos de recolección de especímenes vacíos apropiadamente etiquetados. De forma alternativa, quite 200 μ L de cada uno en tubos de microcentrífuga de polipropileno de 2 mL apropiadamente etiquetados.
- Quite y deseche las tapas de los calibradores, controles de calidad y especímenes a probar. Deben probarse PRIMERO los calibradores negativos y positivos por triplicado para cada lote de especímenes probados. Deberán probarse uno por uno los controles de calidad y los especímenes. Deberán correrse los calibradores, controles de calidad y especímenes en una configuración de columna de 8 micropozos, de tal forma que se coloquen los duplicados del calibrador negativo (NC, por su abreviatura en inglés) en A1, B1, C1; el calibrador positivo (PC, por su abreviatura en inglés) en D1, E1, F1; CT de QC en G1; GC de QC en H1; luego los especímenes comenzando en A2. Véase la distribución de ejemplo a continuación. Consulte la

guía del usuario del software de análisis de ensayos *digene* aplicable para la instalación apropiada del calibrador/especímen en el software.

- Se consideran potencialmente infecciosas las tapas quitadas de los tubos de especímenes. Deseche de conformidad con la normatividad local, estatal y federal.

DISTRIBUCIÓN DE EJEMPLO PARA UNA CORRIDA DE 24 MICROPOZOS:

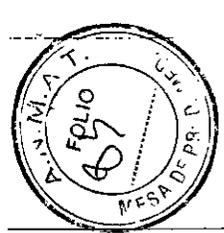
Fila	Columna		
	1	2	3
A	NC	Espec. 1	Espec. 9
B	NC	Espec. 2	Espec. 10
C	NC	Espec. 3	Espec. 11
D	PC	Espec. 4	Espec. 12
E	PC	Espec. 5	Espec. 13
F	PC	Espec. 6	Espec. 14
G	CT de QC	Espec. 7	Espec. 15
H	GC de QC	Espec. 8	Espec. 16

Nota: el software de análisis de ensayos *digene* evaluará tanto los resultados del calibrador como de control de calidad con base en su ubicación en la placa para verificar la corrida del ensayo. La colocación apropiada de los calibradores y controles de calidad y la selección del protocolo de software apropiado es esencial para resultados válidos.

Desnaturalización

Notas:

- Alerta:** el reactivo de desnaturalización es corrosivo. Use ropa protectora, guantes y protección para los ojos/rostro idóneos. Tenga cuidado y use guantes libres de polvo cuando manipule.
- Importante:** algunos especímenes pueden contener sangre u otro material biológico que puedan ocultar los virajes de color en la adición del reactivo de desnaturalización y la mezcla de la sonda. Los especímenes que muestren un color oscuro antes de la adición del reactivo de desnaturalización pueden no dar los virajes de color apropiados en estas etapas. En estos casos, no mostrar el viraje de color apropiado no afectará los resultados del ensayo.
- No quite el dispositivo de recolección de especímenes antes de la desnaturalización.
- Durante la etapa de desnaturalización, asegúrese de que el nivel de agua en el baño maría sea adecuado para sumergir todo el volumen de espécimen en el tubo.
- Pueden prepararse los especímenes hasta la etapa de desnaturalización y conservarse a $2-8^\circ$ C de un día para otro o conservarse a -20° C por hasta tres meses. Puede realizarse un máximo de tres ciclos de congelación-descongelación con un máximo de dos horas a temperatura ambiente durante cada ciclo de descongelación. Mezcle bien antes de usarse.
- Pueden prepararse los calibradores y controles de calidad hasta la etapa de desnaturalización y conservarse a $2-8^\circ$ C de un día para otro, **mas no pueden congelarse.**
- Para evitar resultados falsos positivos, es crítico que todo el material de calibradores, controles de calidad y especímenes se ponga en contacto con el reactivo de desnaturalización. La mezcla después de la adición del reactivo de desnaturalización es una etapa crítica: asegúrese de que el Vortexer de tubos multiespecímenes esté puesto a 100 (velocidad máxima) y que se observe un vórtice visible de líquido durante la mezcla de tal forma que el líquido lave toda la superficie interna del tubo. Si se realiza un vórtice manual, asegúrese de que cada calibrador, control de calidad y espécimen se mezcle individualmente poniendo en vórtice cada uno durante por lo menos cinco segundos a máxima velocidad de tal forma que el vórtice del líquido lave toda la superficie interna del tubo seguido de la inversión del tubo una vez.



3925

- Después de la desnaturalización e incubación, ya no se consideran infecciosos los especímenes ¹⁷. Sin embargo, el personal de laboratorio deberá aún acatar las precauciones universales prácticas.
1. Pipetee el reactivo de desnaturalización con colorante indicador en cada calibrador, control de calidad o espécimen usando una pipeta repetidora o ajustable. Tenga cuidado en no tocar los costados del tubo o podría ocurrir una contaminación cruzada de especímenes. El volumen de reactivo de desnaturalización necesario es equivalente a la mitad del volumen de espécimen. Se lista el volumen exacto para cada tipo de calibrador, control de calidad y espécimen en la tabla a continuación.
 - Diluya el reactivo de desnaturalización restante en la botella antes de su disposición. Deseche de conformidad con la normatividad local, estatal y federal.

Calibrador, control de calidad o espécimen	Volumen de reactivo de desnaturalización requerido
Control de calidad, 200 µL	100 µL
Control de calidad, 500 µL	250 µL
Calibrador negativo y positivo, 200 µL	100 µL
Calibrador negativo y positivo, 500 µL	250 µL
Especímen cervical, 1 mL	500 µL

2. Mezcle los especímenes usando uno de los dos métodos a continuación.

Método de Vortexer de tubos multiespecímenes

- a) Cubra los tubos de calibradores/controles/especímenes con la película selladora de tubos DuraSeal jalando la película sobre los tubos en la gradilla.
- b) Coloque la tapa de la gradilla sobre los tubos cubiertos con película y asegure en el lugar con los dos clips laterales. Corte la película con el dispositivo cortador.
- c) Coloque la gradilla en el Vortexer de tubos multiespecímenes y asegure la gradilla con la abrazadera. Verifique que la configuración de velocidad esté en 100 (velocidad máxima), y gire el interruptor de energía del vortexer a la posición de «on» (prendido). Coloque en el vórtice los tubos por 10 segundos.

Método de vórtice de tubos manual/individual

- a) Vuelva a poner la tapa a los tubos del calibrador, controles de calidad y espécimen con tapa roscas para tubos de recolección de especímenes limpias, y mezcle cada tubo completamente colocando en vórtice de forma individual, a alta velocidad, por cinco segundos.
 - b) Invierta cada tubo de espécimen una vez para lavar el interior del tubo, tapa o borde, luego regrese el tubo a la gradilla.
3. Independiente del método de colocación en vórtice utilizado, **debe haber un vórtice visible de líquido dentro de cada tubo durante la mezcla de tal forma que el líquido lave toda la superficie interna del tubo.** Deberán tornarse púrpuras los calibradores, controles de calidad y especímenes.
 4. Incube los tubos en la gradilla en un baño maría a $65 \pm 2^\circ \text{C}$ por 45 ± 5 minutos (pueden probarse los calibradores, controles de calidad y especímenes desnaturalizados inmediatamente o conservarse como se describe en las **Notas** anteriores). Prepare la mezcla de sondas de GC durante esta incubación. Véase la sección *Preparación y almacenamiento de reactivos*.

Hibridación

Notas:

- Es viscosa la mezcla de sondas de GC. Deberá tenerse cuidado en asegurar una mezcla completa y que la cantidad requerida se dispense completamente en cada micropozo de hibridación. Véase la sección *Preparación y almacenamiento de reactivos*.
- Si se ha conservado el espécimen desnaturalizado a -20°C , entonces permita que se descongele el espécimen a $20-25^\circ \text{C}$, y coloque en vórtice completamente el espécimen antes de proceder con la hibridación.
- Precaliente el calentador de microplacas *1* a $65 \pm 2^\circ \text{C}$ por 60 minutos antes de su uso. Véase el *Manual del operador del calentador de microplacas 1* para más instrucciones, como sea necesario.

1. Obtenga y etiquete una microplaca de hibridación.
2. Quite los calibradores, controles de calidad y especímenes del baño maría después de la incubación. Si se está usando el Vortexer de tubos multiespecímenes, coloque en vórtice toda la gradilla por un mínimo de cinco segundos en la configuración de velocidad máxima. De forma alternativa, coloque en vórtice cada tubo de forma individual durante por lo menos 5 segundos.
3. Pipetee 75 µL de cada calibrador, control de calidad o espécimen en el fondo del micropozo de hibridación después de que se haya creado la planilla bajo *Preparación*. Evite tocar los costados de los pozos y limite la formación de burbujas. Use una punta de pipeta extralarga y limpia para cada transferencia para evitar la contaminación cruzada de calibradores, controles de calidad o especímenes. No es necesario quitar el dispositivo de recolección de especímenes del tubo de transporte de especímenes. Puede ponerse la tapa a los especímenes desnaturalizado con las tapas roscas para tubos de recolección de especímenes y almacenarse con los dispositivos de recolección de especímenes que queden en los tubos.

Notas:

- Pueden ocurrir resultados falsos positivos si no se transfieren cuidadosamente las partes alicuotas de especímenes. Durante la transferencia del espécimen, no toque la punta de pipeta al interior del tubo cuando quite la parte alicuota de 75 µL.
 - **Importante:** algunos especímenes pueden contener sangre u otro material biológico que puedan ocultar los virajes de color en la adición de la mezcla de la sonda. Los especímenes que muestren un color oscuro antes de la adición del reactivo de desnaturalización pueden no dar los virajes de color apropiados en estas etapas. En estos casos, no mostrar el viraje de color apropiado no afectará los resultados del ensayo. Puede verificarse la mezcla apropiada observando los virajes de color de los calibradores y controles de calidad.
4. Después de pasar el último espécimen, cubra con Parafilm o la tapa de la placa, e **incube la microplaca de hibridación por 10 minutos a $20-25^\circ \text{C}$.**
 5. Divida en partes alicuotas la mezcla de la sonda preparada y completamente colocada en vórtice en un reservorio de reactivos desechable. Pipetee cuidadosamente 25 µL de la mezcla de la sonda en cada pozo que contenga los calibradores, controles de calidad y especímenes usando una pipeta de ocho canales y las puntas frescas para cada fila. Dispense el volumen de sonda en cada pozo de hibridación, previniendo una salpicadura de regreso. Evite tocar los costados de los pozos. Inspeccione la gradilla desde abajo para verificar que todos los pozos hayan recibido la cantidad de mezcla de la sonda apropiada.

Nota: para esta etapa, debe usarse una pipeta de ocho canales capaz de suministrar 25 µL – 75 µL y equipada con puntas de 25 µL – 200 µL.

MARISOL MASINO
BIOQUIMICA M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A

3

- Cubra la microplaca de hibridación con una tapa para placa. Agite la microplaca de hibridación en el agitador giratorio I del sistema Hybrid Capture puesto a 1100 ± 100 rpm por 3 \pm 2 minutos. **Los calibradores, controles de calidad y especímenes deberán tomarse amarillos después de la agitación.** Los pozos que permanezcan púrpuras pueden no haber recibido la cantidad apropiada de mezcla de la sonda. Adicione 25 μ L adicionales de mezcla de la sonda a los especímenes que queden púrpuras y agite otra vez. Si los pozos quedan púrpuras después de seguir este procedimiento, deberán volverse a probar los especímenes.
- Incube en un calentador de microplacas I precalentado y equilibrado a $65 \pm 2^\circ$ C por 60 \pm 5 minutos.

Nota: cuando coloque la microplaca de hibridación en el calentador de microplacas I, deberá tenerse cuidado en no causar una salpicadura.

Hybrid Capture

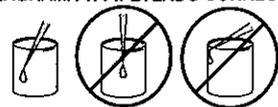
- Quite todos, excepto el número requerido de micropozos de captura del marco de placas. Regrese los micropozos no usados a la bolsa original y vuelva a sellar. Con un marcador, enumere cada columna 1, 2, 3... y etiquete la microplaca con un identificador apropiado. Se adicionarán los especímenes a los pozos de acuerdo con la distribución de ejemplo mostrada a continuación y/o la plantilla previamente preparada bajo *Preparación*:

DISTRIBUCIÓN DE EJEMPLO PARA UNA CORRIDA DE 24 MICROPOZOS:

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

- Quite cuidadosamente la microplaca de hibridación que contiene los calibradores, controles de calidad y especímenes del calentador de microplacas I. Quite inmediatamente la tapa para placas y colóque en una superficie limpia.
- Pase todo el contenido (aproximadamente 100 μ L) de los calibradores, controles de calidad y especímenes al fondo del micropozo de captura correspondiente usando una pipeta de ocho canales. Use **puntas de pipeta nuevas** para cada columna transferida y deje que se drene cada punta de pipeta bien para asegurar una transferencia completa del espécimen. Si se desea, puede afianzarse la pipeta descansando la mitad de las puntas de pipeta en el borde superior de los micropozos de captura (véase el *diagrama 1*).

DIAGRAMA 1: PIPETEADO CORRECTO



CORRECTO

No pipetee verticalmente. Evite una salpicadura de regreso.

No deje que la punta toque el costado del pozo.

- Cubra la microplaca con la tapa para placas y agite en el agitador giratorio I a 1100 ± 100 rpm, a $20-25^\circ$ C por 60 \pm 5 minutos.

- Prepare la solución amortiguadora de lavado y verifique los reservorios de enjuague y residuos del lavador automatizado de placas. Véase la sección *Preparación y almacenamiento de reactivos*.

- Cuando esté completa la etapa de captura, quite la microplaca de captura del agitador giratorio I y quite cuidadosamente la tapa para placas. Quite el líquido de los pozos desechando en un lavabo: invierta completamente la placa sobre el lavabo y agite fuertemente con un movimiento descendente siendo cuidadoso en no causar una salpicadura de regreso decantando demasiado cerca del fondo del lavabo. **No vuelva a invertir la placa;** seque golpeando firmemente 2-3 veces en toallas Kimtowels o toallas de papel con poca pelusa equivalentes. Asegúrese de que todo el líquido sea removido de los pozos y que la parte superior de la placa esté seca.

Detección híbrida

Notas:

- Haga adiciones a través de la placa en una dirección de izquierda a derecha usando una pipeta de ocho canales.
- Se recomienda que se utilice la técnica de pipeteado reverso para mejorar la consistencia de suministro de reactivo. Con esta técnica, se sobrelenan inicialmente las puntas de pipeta usando el segundo paro en el control de aspiración/dispensación de la pipeta (émbolo). Véase el procedimiento a continuación. Limpie las puntas en el reservorio de reactivo o en una almohadilla con poca pelusa limpia para quitar el exceso de reactivo antes del suministro a la placa.
- Si se desea, puede afianzarse la pipeta descansando la mitad de las puntas de pipeta en el borde superior de los micropozos. Tenga cuidado en no tocar los costados de los micropozos o podría ocurrir una contaminación cruzada de los especímenes. Remítase al *diagrama 1* mostrado anteriormente.

- Divida en partes alícuotas el volumen apropiado del reactivo de detección 1 en un reservorio de reactivo (véase la sección *Preparación y almacenamiento de reactivos* para instrucciones). Pipetee cuidadosamente 75 μ L del reactivo de detección 1 en cada micropozo de captura usando una pipeta de ocho canales y la técnica de pipeteado reverso, descrita a continuación.

Técnica de pipeteado reverso:

- Inserte las puntas en la pipeta de ocho canales; asegúrese de que todas las puntas estén firmemente asentadas.
- Empuje el émbolo de la pipeta pasado el primero paro al segundo paro.
- Sumerja las puntas en la solución del reactivo de detección 1.
- Libere el émbolo lentamente y deje que la solución llene las puntas.
- Dispense la solución en los micropozos (75 μ L) presionando el émbolo al primer paro. No libere el émbolo hasta que se hayan resurgido las puntas de pipeta en la solución del reactivo de detección 1.
- Vuelva a llenar las puntas y repita hasta que se llenen todos los pozos. Llene los pozos de la microplaca de izquierda a derecha. **Verifique que se hayan llenado todos los pozos exactamente observando la intensidad del color rosado. Todos los pozos deberán tener una intensidad similar.**

- Cubra la placa con la tapa para placas e incube a $20-25^\circ$ C por 30-45 minutos.

Lavado

Lave la placa de captura usando uno de los dos métodos a continuación.



3925

Método del lavador automatizado de placas

Nota: Siempre mantenga prendido el lavador automatizado de placas. Asegúrese de que esté lleno el reservorio de enjuague y que esté vacío el reservorio de residuos. El lavador automatizado de placas enjuagará de forma rutinaria el sistema para su limpieza.

ANTES DE CADA USO:

- Verifique que esté lleno el reservorio de lavado por lo menos hasta la marca de 1 L. Si no, prepare la solución amortiguadora de lavado. Véase la sección *Preparación y almacenamiento de reactivos*.
- Verifique que esté lleno el reservorio de enjuague con agua destilada o desionizada.
- Verifique que esté vacío el reservorio de residuos y que esté apretada de forma segura la tapa.
- El lavador automatizado de placas automáticamente se enjuagará antes de cada lavado y asegúrese que se lave y enjuague después de cada lavado.

1. Quite la tapa para placas y coloque la placa en la plataforma del lavador automatizado de placas.

2. Verifique que la energía esté prendida y que la pantalla lea «Digene Wash Ready» [Lavado *digene* listo] ó «P1».

Nota: si se está usando solamente una tira parcial de los pozos de captura, necesitarán colocarse los micropozos vacíos en una placa de captura para completar la columna antes del lavado.

3. Seleccione el número de tiras a lavar presionando la tecla «Rows» [filas] y posteriormente «+» o «-» para ajustar. Presione la tecla «Rows» [filas] para regresar a «Digene Wash Ready» [Lavado de *Digene* listo] ó «P1».

4. Presione «Start/Stop» [comenzar/detener] para comenzar.

5. El lavador automatizado de placas realizará seis ciclos de llenado y aspiración tomando aproximadamente 10 minutos. Habrá una breve pausa durante el programa, por lo tanto, asegúrese de no quitar la placa de forma prematura. Cuando termine de lavar el lavador automatizado de placas, leerá «Digene Wash Ready» [Lavado de *Digene* listo] ó «P1».

6. Quite la microplaca del lavador cuando se termine el programa. La placa deberá aparecer blanca y no deberá quedar líquido rosado residual en los micropozos.

Método de lavado manual

1. Quite el reactivo de detección 1 de los pozos colocando toallas Kimtowels o toallas de papel con poca pelusa equivalentes limpias en la parte superior de la placa y cuidadosamente invirtiendo. Antes de invertir, asegúrese de que el papel se encuentre en contacto con toda el área superficial de la placa. Deje que se drene la placa por 1-2 minutos. Seque bien en toallas Kimtowels o toallas de papel con poca pelusa equivalentes limpias. Deseche cuidadosamente las toallas de papel con poca pelusa usadas para evitar una contaminación con fosfatasa alcalina de las etapas posteriores.

2. Usando el aparato de lavado, lave manualmente la placa seis veces. Se lava cada pozo a sobreflujo para quitar el conjugado de las partes superiores de los pozos. El lavado comienza en el pozo A1 y continúa de un modo sinuoso hacia la derecha y hacia abajo. Después de que se hayan llenado todos los pozos, decante el líquido en el lavabo con un movimiento descendente fuerte. Se inicia el segundo lavado en el pozo H12 moviendo en un movimiento sinuoso a la

izquierda y hacia arriba. Se repite esta secuencia de dos lavados dos veces más para un total de seis lavados por pozo.

3. Después de lavar, seque la placa invirtiendo en toallas Kimtowels o toallas de papel con poca pelusa equivalentes limpias y golpeando firmemente 3-4 veces. Sustituya las toallas de papel con poca pelusa y seque otra vez. Deje invertida la placa y deje que se drene por cinco minutos. Seque la placa una vez más.

4. La placa deberá aparecer blanca, y no deberá quedar líquido residual rosado en los micropozos.

Amplificación de señales

Notas:

- Use un par nuevo de guantes libres de polvo para manejar el reactivo de detección 2.
- Divida en partes alicuotas solamente la cantidad de reactivo requerida para realizar el ensayo en el reservorio del reactivo con el fin de evitar una contaminación del reactivo de detección 2. Véase la sección *Preparación y almacenamiento de reactivos*. **NO** regrese el reactivo de detección 2 a la botella original. Deseche el material no usado después de su uso.
- Deberá hacerse sin interrupciones la adición del reactivo de detección 2. El tiempo de incubación de todos los pozos debe ser consistente.
- Tenga cuidado en no tocar los costados del micropozo ni salpicar el reactivo de regreso a las puntas porque podría ocurrir una contaminación cruzada de especímenes (véase el diagrama 1).

1. Pipeteo cuidadosamente 75 µL del reactivo de detección 2 en cada micropozo de captura usando una pipeta de ocho canales y la técnica de pipeteado reverso como se describió previamente. Todos los micropozos deberán tornarse de un color amarillo. Verifique que se hayan llenado exactamente todos los pozos observando la intensidad del color. Todos los pozos deberán tener una intensidad similar.

2. Cubra las microplacas con una tapa para placa e incube a 20-25° C por 15 minutos. Evite la luz solar directa.

3. Lea la microplaca en el luminómetro después de 15 minutos de incubación (y no después de 30 minutos de incubación). Consulte la guía de usuario del software de análisis de ensayo *digene* aplicable para la instrucciones de medición de placas y de análisis de datos.

4. El software de análisis de ensayos *digene* evaluará tanto los resultados del calibrador como del control de calidad con base en su ubicación en la placa para verificar la corrida del ensayo. La colocación apropiada de calibradores y controles de calidad y la selección del protocolo del software apropiado son esenciales para resultados válidos.

5. Si no se usó una microplaca completa, quite los micropozos usados del sujetador de microplaca, enjuague el sujetador completamente con agua destilada o desionizada, seque y reserve para el siguiente ensayo.

MARISOL MASINO
BIOQUIMICA · M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A

3

CRITERIOS DE VERIFICACIÓN DE CALIBRACIÓN DEL ENSAYO

Se realiza la verificación de calibración del ensayo para asegurarse de que los reactivos y el material del calibrador y de control de calidad suministrado estén funcionando apropiadamente, permitiendo una determinación exacta de valor de corte del ensayo. Los criterios de verificación son calculados y verificados automáticamente válidos o inválidos por el software de análisis de ensayos *digene*. La prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID requiere la calibración con cada corrida, por lo tanto, es necesario verificar cada corrida usando los siguientes criterios. Este procedimiento de verificación no está indicado como sustituto para pruebas de control de calidad internos.

1. Calibrador negativo
 Debe correrse el calibrador negativo por triplicado con cada corrida de la prueba. El valor de URL medio del calibrador negativo debe ser ≥ 10 y ≤ 150 URL con el fin de proceder. El coeficiente de variación (%CV) para los duplicados del calibrador negativo deberán ser $\leq 25\%$. Si el %CV es $> 25\%$, el software desechará el duplicado con el valor de URL más lejos de la media como un marginal y recalculará la media y el %CV usando los dos duplicados restantes. El %CV recalculado deberá ser $\leq 25\%$; de lo contrario, la verificación de la calibración del ensayo es inválida y debe repetirse la corrida de la prueba para todos los especímenes de la paciente. Por consiguiente, los resultados de los especímenes de la paciente no deberán reportarse.

2. Calibrador positivo
 Debe correrse el calibrador positivo por triplicado con cada corrida de la prueba. El %CV para los duplicados del calibrador positivo deberá ser $\leq 20\%$. Si el %CV es $> 20\%$, el software desechará el duplicado con el valor de URL más lejano de la media como marginal, y recalculará la media y el %CV usando los duplicados restantes. El %CV recalculado deberá ser $\leq 20\%$; de lo contrario, la verificación de calibración del ensayo es inválida y debe repetirse la corrida de la prueba para todos los especímenes de la paciente. Por consiguiente, no deberán reportarse los resultados de especímenes de la paciente.

3. Razón PC medio/NC medio
 La media de los duplicados del calibrador positivo (PC medio) y la media de los duplicados del calibrador negativo (NC medio) se usan para calcular la razón de PC medio/NC medio. El software calculará la razón de PC medio/NC medio. Esta razón debe cumplir los siguientes criterios para verificar la calibración del ensayo antes de que puedan interpretarse los resultados de los especímenes. Si la razón es ≥ 2.0 y ≤ 20 , el software procederá a la siguiente etapa. Si la razón es < 2.0 ó > 20 , la calibración del ensayo es inválida y debe repetirse. Deberán repetirse todos los especímenes de la paciente dentro de la corrida.

Nota: Para determinar la reproducibilidad del calibrador y control de calidad para la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID, se compilaron los resultados generados con el instrumento del luminómetro de microplacas 2000 *digene* (DML 2000) durante los estudios internos que involucraban 62 corridas de pruebas usando la aplicación del sistema Rapid Capture y 43 corridas de pruebas usando el método manual (véase la *tabla 1*). Los resultados mostraron que el %CV promedio para el calibrador positivo para estas 105 corridas fue igual o menor al 6.5%, y el %CV promedio para el calibrador negativo fue igual o menor al 14.6%. Como es indicado por el valor de URL medio del calibrador negativo medio de 43 obtenido para las corridas de prueba manuales, comparado con la media de la aplicación del RCS de 54, se ha demostrado que la aplicación del RCS produce valores de URL de NC que se cambian ligeramente hacia arriba relativo al método manual.

Se ha demostrado que este cambio no tiene ningún efecto en los resultados de prueba generados usando cualquier método opcional. Se ha definido el umbral de URL medio para el calibrador negativo como 250 URL con base en un cálculo estadístico de ± 3 Desv. Est. del valor de URL medio para el calibrador negativo observado para el sistema de la prueba de ADN *digene* HC2 CT/GC observado durante las pruebas extensas que tuvieron lugar durante el desarrollo de la

aplicación del RCS. El extremo superior de ese rango de ± 3 Desv. Est. se extendió un 20% adicional para asegurar que el umbral de URL de NC puede lograrse en la práctica clínica rutinaria.

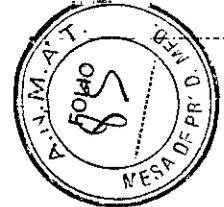
El valor de URL medio del NC deberá observarse rutinariamente a ≤ 150 y el CV $\leq 25\%$. Cada laboratorio deberá monitorear el desempeño del control de calidad y de la calibración de acuerdo con el documento CLSI/NCCLS C24-2A del Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. El URL medio que usa la aplicación del RCS puede exceder ocasionalmente 150, posiblemente con una reducción correspondiente en el PC/NC, la cual, de acuerdo con la *tabla 1*, se ha demostrado que produce un valor promedio en la calibración de 8.29. En este caso, son aceptables los resultados dado que el URL de NC permanece menor o igual a 250 y la razón PC/NC es mayor o igual a 2.0 y menor o igual a 20. Si el URL de NC excede 250 ó el PC/NC cae por debajo de 2.0 ó por encima de 20, el ensayo es inválido.

Tabla 1. Resumen estadístico de los valores del calibrador negativo y positivo para la aplicación del RCS y las corridas del método manual.

Método	No. de placas	Medias calculadas de PC/NC				Controles de calidad del kit de pruebas (URL/CO medios)	
		Media	Mediana	Mín.	Máx.	CT de QC	GC de QC
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	Medias calculadas de URL				Media del %CV calculado
		Media	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

MARISOL MASINO
 BIOQUIMICA - M.N. 9483
 DT - TECNOLAB S.A.



3925

CÁLCULO DEL CORTE

Una vez que se haya verificado un ensayo de acuerdo con los criterios establecidos anteriormente, se utilizarán los duplicados del calibrador positivo para establecer los valores de corte para determinar los especímenes positivos. Se calculan los valores de corte como sigue:

Valor positivo = calibrador positivo medio

Cálculo del corte de ejemplo:

	Valores de URL de NC	Valores de URL de PC
	97	312
	101	335
	91	307
Valor medio	96	318
%CV	4.9	4.7
PC medio/NC medio	N/A	3.31

Por lo tanto, el valor de corte es (PC medio) = 318

Se convertirán todos los valores de URL de especímenes en una razón al valor de corte apropiado por el software de análisis de ensayos *digene*. Por ejemplo, deberán expresarse todos los ensayos como el valor de URL/corte de especímenes.

Nota: Se reportan los valores de URL/CO y los resultados positivos/negativos para todos los especímenes probados en los informes de resultados de la prueba del software de análisis de ensayos *digene*.

CONTROL DE CALIDAD

Se suministran los especímenes de control de calidad con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID. Consulte la guía de usuario del software de análisis de ensayos *digene* aplicable para instrucciones sobre cómo capturar los números de lote y las fechas de caducidad de los controles de calidad. Deben incluirse estos controles en cada corrida de la prueba, y el URL/CO de cada control de calidad debe caer dentro de los siguientes rangos aceptables para que el ensayo sea válido. Si los controles de calidad no caen dentro de estos rangos, el ensayo es inválido y debe repetirse. No pueden reportarse los resultados de las pacientes.

	CT de QC	GC de QC	Calibrador negativo
URL/CO mínimo	0.0001	1.0	0
URL/CO máximo	0.9999	20.00	0.9999
%CV máximo	20.00	20.00	25.00

1. Los controles de calidad proporcionados en el kit son blancos de ADN de CT y GC donados compuestos de la misma construcción plasmídica para cada organismo individual (uno para CT y uno para GC), como es el calibrador positivo proporcionado con este kit de pruebas. Como es recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS (documento C24-A2 de CLSI/NCCLS), el calibrador positivo contiene una concentración distinta (cinco veces más baja) del ADN blanco para asegurar que el procedimiento de control de calidad proporciona una valoración independiente de desempeño.
2. Este material de control no es igual que el organismo de GC en la matriz de especímenes y no actuará como un control apropiado para el medio de transporte de especímenes *digene*.
3. Se usa el calibrador positivo para normalizar los resultados de los especímenes estableciendo el corte para cada corrida del ensayo. Deben usarse los especímenes proporcionados con este kit para control de calidad interno, o los usuarios pueden desarrollar su propio material de control de calidad interno, como es definido por CLSI/NCCLS C24-A2. Pueden probarse controles adicionales de acuerdo con los lineamientos o requerimientos de la normatividad local, estatal y/o federal u organizaciones acreditadoras. Favor de remitirse a CLSI/NCCLS C24-A2 para una guía adicional sobre las prácticas de pruebas de control de calidad interno apropiadas.
4. Para probar la efectividad de lisis y desnaturalización del espécimen, los laboratorios deberán, periódicamente, crear controles de preparación de especímenes agregando ≥ 5000 UFC/mL de *Neisseria gonorrhoeae* (auxotipo 1, 5 o tipo de cepa de ATCC) a un tubo fresco de STM. Incube el espécimen durante por lo menos una hora a temperatura ambiente antes de las pruebas de la misma forma que un espécimen clínico. Deberá obtenerse un URL/CO ≥ 2.50 si se procesa apropiadamente el espécimen. De forma alternativa, también pueden usarse paneles de prueba de especímenes comercialmente disponibles que contengan el organismo de GC para este fin.
5. Se han establecido rangos aceptables para los calibradores negativos solamente para los luminómetros aprobados por QIAGEN. Los calibradores monitorean por una falla del reactivo sustancial y no asegurarán la precisión del ensayo.

MARISOL MASINO
 BIOQUIMICA - M.N. 9483
 DT - TECNOLAB S.A.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS ESPECÍMENES

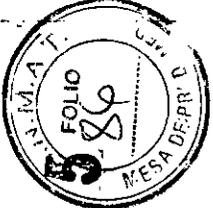
A través de los criterios de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID:

1. Los especímenes con razones de valor de URL/corte de ≥ 2.50 se consideran «positivos para el ADN de *Neisseria gonorrhoeae*». No pueden inferirse la viabilidad y/o infectividad del organismo porque el ADN blanco puede persistir en ausencia de organismos viables.
 2. Los especímenes con razones de valor de URL/corte < 1.00 no contienen ADN de *Neisseria gonorrhoeae* ni contienen ADN por debajo del límite de detección del ensayo. Estos deberán interpretarse como «No detectados por el ADN de *Neisseria gonorrhoeae*». Un resultado negativo no excluye la infección por *Neisseria gonorrhoeae* porque los resultados dependen de la recolección de especímenes adecuada y ADN suficiente a detectar.
 3. Los especímenes con razones de valor de URL/corte de ≥ 1.00 y < 2.50 se consideran ambiguos. Pueden considerarse los resultados presumiblemente positivos para el ADN de *Neisseria gonorrhoeae*. No obstante, se recomiendan las pruebas repetidas de un espécimen nuevo de la paciente o pruebas adicionales por un procedimiento de prueba alternativo debido al valor predictivo reducido de un resultado positivo con estos valores de URL/corte.*
 4. Se recomienda que los resultados positivos sean confirmados por otro método si la probabilidad de infección con *Neisseria gonorrhoeae* es incierta o cuestionada cuando se consideran hallazgos clínicos u otros de laboratorio. Los estudios analíticos con esta prueba han demostrado una reactividad cruzada limitada a ciertas otras secuencias de ADN que pueden causar un resultado falso positivo. Véase *Especificidad analítica* para información adicional.
 5. En el caso cuando la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID se usa como un seguimiento para identificar el(los) organismo(s) presente(s) en los especímenes prueba de ADN *digene* HC2 CT/GC positivos, si, después de las pruebas de seguimiento con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID el espécimen es negativo, reporte el resultado como «Ningún ADN de *Neisseria gonorrhoeae* detectado».
- * Durante la evaluación clínica de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID, 3/17 resultados en este rango ambiguo fueron confirmados positivos por pruebas de cultivo de GC; los 14 restantes fueron falsos positivos aparentes. En una evaluación subsecuente, se observaron cinco especímenes con un URL/CO inicial entre 1.00 y 2.50, tres de los cuales eran cultivo de GC positivos. Las pruebas duplicadas repetidas de estos tres especímenes con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID produjeron resultados ≥ 1.00 URL/CO. Los dos especímenes restantes fueron negativos por cultivo y ambos también fueron negativos cuando se repitieron dos veces con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Remítase a la *Guía de usuario del sistema Rapid Capture para Limitaciones del procedimiento adicionales específicas para el uso de ese sistema para pruebas de producción de muestras de alto volumen.*

1. Para uso de diagnóstico *in vitro* solamente.
2. Deben seguirse el *procedimiento, control de calidad* y la *interpretación de los resultados de especímenes* de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID de forma cercana para obtener resultados de prueba confiables.
3. Es importante pipetear el volumen exacto de reactivo indicado y mezclar bien después de cada adición de reactivo. No hacerlo daría como resultado resultados de prueba erróneos. Asegurar que los virajes de color notados ocurran ayudará a confirmar que estas condiciones se han cumplido.
4. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección con *Neisseria gonorrhoeae* porque niveles muy bajos de infecciones o un error de muestreo pueden causar un resultado falso-negativo.
5. Además de la sangre humana, solamente se probaron una ducha vagina comercial, crema antifúngica y jalea anticonceptiva para la interferencia del ensayo. Se probaron todas las sustancias en 5% v/v. No se han determinado los efectos de otros materiales exógenos. En general, deberá evitarse la presencia de sustancias exógenas ya que pueden interferir con resultados de prueba exactos.
6. Solamente puede usarse la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID con especímenes cervicales recolectados usando el dispositivo de recolección de ADN *digene* HC2 y colocados en STM, o con especímenes cervicales recolectados con el kit de recolección de especímenes con hisopo vaginal *digene* HC y colocados en STM.
7. No deberá usarse el dispositivo de recolección de ADN *digene* HC2 para la recolección de especímenes de mujeres embarazadas. Para las mujeres embarazadas, deberán recolectarse especímenes cervicales usando el kit de recolección de especímenes con hisopo vaginal *digene* HC (hisopo Dacron y STM).
8. Deberán interpretarse los resultados de esta prueba solamente en conjunción con información disponible de la evaluación clínica de la paciente y de otros procedimientos.
9. La prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID proporciona resultados cualitativos. No se ha demostrado que el valor numérico (razón) por encima del valor de corte determinado para el espécimen de la paciente se correlacione con la cantidad de ADN de GC presente en el espécimen de la paciente.
10. Los resultados confiables son dependientes de la recolección adecuada de especímenes. Ya que el sistema de transporte usado para este ensayo no permite la valoración microscópica de la adecuación del espécimen, es necesaria la capacitación de clínicos en las técnicas de recolección adecuada de especímenes. Para asegurar la recuperación óptima de las células epiteliales de columna que forran la endocérvix, deberá quitarse el exceso de moco antes de la recolección de especímenes, como se describe en los procedimientos del dispositivo de recolección de ADN *digene* HC2 y el kit de recolección de especímenes con hisopo vaginal *digene* HC.
11. La detección de *Neisseria gonorrhoeae* es dependiente del número de organismos presentes en el espécimen y pueden ser afectados por los métodos de recolección de especímenes, los factores de las pacientes, la etapa de infección y/o la cepa infecciosa de *Neisseria gonorrhoeae*.
12. La prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID no está indicada para la evaluación de abuso sexual sospechoso o para otras indicaciones médico-legales. Se recomiendan pruebas adicionales en



392

- cualquier circunstancia cuando resultados falsos positivos o falsos negativos pudiesen conducir a consecuencias médicas, sociales o psicológicas adversas.
- Deberá considerarse el cultivo para la confirmación y se requiere para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y la retención para fines médico-legales.
 - Como también se aplica para métodos sin cultivo, no puede interpretarse un espécimen positivo como indicador de la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* viable.
 - No se han establecido todavía parámetros necesarios para determinar el éxito o fracaso terapéuticos para la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID.
 - Solamente se ha validado la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID para su uso con el lavador automatizado de placas usando las configuraciones especificadas en las instrucciones del ensayo. Se condujo este estudio de validación internamente, y los datos para apoyar su uso se encuentran en archivo en QIAGEN. Otros lavadores automatizados de placas u otras configuraciones del lavador automatizado de placas no son aceptables para su uso con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID.
 - No se ha demostrado la habilidad de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID para verificar los especímenes prueba de ADN *digene* HC2 CT/GC positivos con un suficiente número de especímenes recolectados con un hisopo Dacron como se comparó con los especímenes recolectados con el dispositivo de recolección de ADN *digene* HC2. Ya que el uso del dispositivo de recolección de ADN *digene* HC2 está contraindicado en la recolección de especímenes cervicales de mujeres embarazadas, puede reducirse el valor predictivo en esta subpoblación de pacientes.
 - En poblaciones de baja prevalencia, la tasa falsa positiva de cualquier prueba de diagnóstico sencilla puede exceder la tasa verdadera positiva para que el valor predictivo de un resultado positivo con esa prueba sea muy baja. Ya que algunas pacientes que están verdaderamente infectadas no serán identificadas probando un solo espécimen, no puede necesariamente determinarse o asumirse la tasa verdadera de falsos positivos de los datos clínicos.
 - Se recomienda que los resultados positivos sean confirmados por otro método si la probabilidad de infección con *Neisseria gonorrhoeae* es incierta o cuestionada cuando se consideran los hallazgos clínicos u otros de laboratorio. Los estudios analíticos con esta prueba han demostrado una reactividad cruzada a ciertas secuencias de ADN que puedan causar un resultado falso positivo. Aunque no se ha valorado completamente la frecuencia con la cual pBR322 y otras secuencias de ADN se encuentran en especímenes genitales, no se observó ninguna reactividad cruzada de pBR322 en una población de 1825 pacientes entre las cuales 103 especímenes prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID positivos también fueron probados por la presencia de pBR322. Ésta es una población representativa y puede no reflejar la frecuencia de ocurrencia de pBR322 en todas las poblaciones probadas. Se observó una reactividad cruzada moderada que se interpretaría como supuesta con *Chlamydia psittaci* y *Neisseria lactamica*, así como también una reactividad cruzada con *Neisseria meningitidis* y *Neisseria mucosa*. No obstante, no es probable que la reactividad cruzada de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID observada con las tres cepas comensales de *Neisseria* y *Chlamydia psittaci* conduciría a una interpretación clínica falsa de un resultado positivo cuando se prueban especímenes anogenitales. Véase *Especificidad analítica* para información adicional.
 - Con el fin de minimizar la variabilidad de los resultados obtenidos con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID, es necesario que el personal de laboratorio que realiza el ensayo logre un nivel aceptable de competencia técnica. Cada laboratorio también debe monitorear la competencia técnica con el ensayo. Para lograr esto, se sugiere que los paneles de prueba de especímenes comercialmente disponibles que contengan organismo de GC o ADN de GC sean probados en una frecuencia consistente con los requisitos de CLIA.

MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 9483
DT. TECNO LAB S.A.

RESULTADOS ESPERADOS

Prevalencia

Varia la prevalencia de especímenes positivos para *Neisseria gonorrhoeae* dependiendo de las características de población, tales como la edad, sexo y factores de riesgo. La prevalencia de *Neisseria gonorrhoeae* observada en la población del estudio clínico usando la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID iba del 1.1% al 13.0%. Se calculó la prevalencia suponiendo que los 17 especímenes con resultados ambiguos en el estudio eran positivos para el ADN de GC (véase la tabla 2). Ocho de estos 17 especímenes fueron confirmados positivos por el cultivo de GC o la reacción en cadena de polimerasas (PCR).

Tabla 2. Prevalencia de los resultados prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID positivos por el lugar de prueba.

Lugar de prueba	No. Positivo/No. probado	% de prevalencia
1	60/460	13.0
2	34/302	11.3
3	23/324	7.1
4	10/390	2.6
5	4/349	1.1
Total	131/1825	7.2

Valores predictivos positivos y negativos

Se calcularon los valores predictivos positivos y negativos hipotéticos (VPP y VPN) para las distintas tasas de prevalencia usando la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID que usa la sensibilidad y especificidad generales determinadas individualmente para especímenes recolectados con el dispositivo de recolección de ADN *digene* HC2 (cepillo cervical) y para especímenes recolectados con el kit de recolección de especímenes con hisopo vaginal *digene* HC (hisopo Dacron). La tabla 3 representa los VPP y VPN hipotéticos para especímenes de cepillo (sensibilidad general del 92.6% y especificidad del 98.5%) y la tabla 4 representa los VPP y VPN hipotéticos para los especímenes de cepillo (sensibilidad general del 95.2% y especificidad del 98.9%).

Tabla 3. Valores predictivos hipotéticos de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID en las distintas tasas de prevalencia (cepillo).

Tasa de prevalencia (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
5	92.6	98.5	76.5	99.6
10	92.6	98.5	87.3	99.2
15	92.6	98.5	91.6	98.7
20	92.6	98.5	76.3	99.60

Tabla 4. Valores predictivos hipotéticos de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID en distintas tasas de prevalencia (hisopo).

Tasa de prevalencia (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
5	95.2	98.9	81.7	99.8
10	95.2	98.9	90.4	99.5
15	95.2	98.9	93.8	99.2
20	95.2	98.9	95.5	98.8

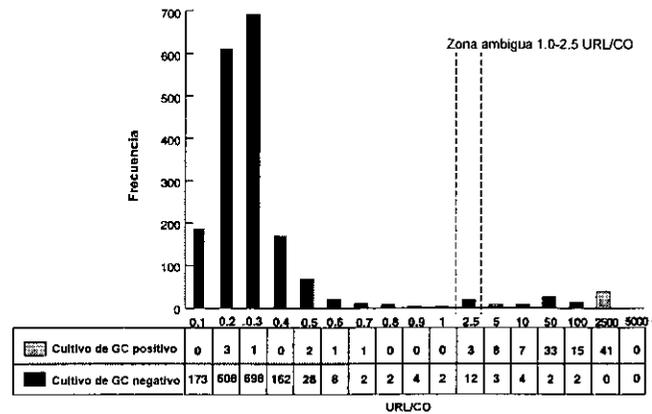
Distribución de la frecuencia: resultados de URL/CO de la prueba de ADN *digene* HC2 GT-ID
Se indica a continuación la distribución de las razones de URL/CO de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID observadas durante el estudio clínico multicéntrico (véase la ilustración 1). Estos datos incluyen todos los especímenes para los cuales se realizó la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID y estuvieron disponibles los resultados del cultivo de GC (n = 1826). Se realizó la interpretación de

3

los resultados de acuerdo con los siguientes criterios. Se consideraron negativos los especímenes con valores de URL/CO < 1.00. Se consideraron positivos los especímenes con valores de URL/CO \geq 2.50. Se consideraron ambiguos los especímenes con valores de URL/CO \geq 1.00 y < 2.50.

Se observa una separación distintiva de las razones de URL/CO entre los resultados prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID positivos y los resultados prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID negativos. El noventa y nueve por ciento (1676/1690) de los resultados prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID negativos tiene valores de URL/CO entre un valor de URL/CO de 0.0 y 0.5. Cinco (5/1690) de los resultados prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID negativos produjeron un URL/CO entre 0.6 y 0.8. En general, menos del uno por ciento (< 0.9%, 17/1825) de los resultados de especímenes caen en la zona ambigua del ensayo, 47% (8/17) de los cuales fue positivo por el cultivo de GC o PCR. El ochenta y nueve por ciento (93/104) de los resultados prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID positivos tiene valores de URL/CO entre un URL/CO de 10-2500.

Ilustración 1. Distribución de la frecuencia de los resultados de URL/CO de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID.



* Indica el extremo superior del rango, inclusive del valor establecido.

CARACTERÍSTICAS DEL DESEMPEÑO

Resultados de los estudios clínicos por espécimen

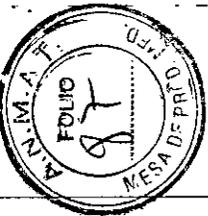
Se determinaron las características de desempeño de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID comparando los resultados del ensayo con los resultados del cultivo de gonorrea. De cinco lugares distintos (incluyendo STD, planificación familiar y clínicas gineco-obstétricas), se recolectaron 1825 especímenes de pacientes y se probaron más tarde. Se realizaron pruebas de PCR para especímenes que eran prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID positivos/cultivo negativos. Los resultados de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID NO fueron resueltos por los resultados de prueba de PCR y, por lo tanto, la PCR no tuvo ningún impacto en los cálculos de las características de desempeño de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID. Se muestran los resultados del estudio clínico para especímenes recolectados con el dispositivo de recolección de ADN *digene* HC2 (cepillo cervical) en la tabla 5 y se muestran los especímenes recolectados con el kit de recolección de especímenes con hisopo vaginal *digene* HC (hisopo Dacron) en la tabla 6.

Se calcularon las características del desempeño de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID aplicando tanto un corte de 1.0 como de 2.5 sin consideración de los supuestos especímenes positivos que caen en la zona ambigua descrita en la sección *Interpretación de resultados* de estas instrucciones de uso. Por lo tanto, puede variar el desempeño de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID en los laboratorios dependiendo de la distribución de valores que caen dentro de la zona ambigua y los resultados repetidos obtenidos cuando se realizan la pruebas de supuestos especímenes positivos (zona ambigua). Como punto de referencia, menos del 0.9% de los especímenes (17/1825) probados durante el estudio clínico multicéntrico usado para establecer el desempeño de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID cayó en este rango. Véase la *Distribución de la frecuencia* de los resultados de URL/CO en la sección *Resultados esperados* de este inserto para información adicional.

No se han generado datos suficientes para determinar de forma exacta si la sensibilidad y el valor predictivo positivo de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID usando el kit de recolección de especímenes con hisopo vaginal *digene* HC es equivalente a la sensibilidad y valor predictivo positivo observados con especímenes recolectados usando el dispositivo de recolección de ADN *digene* HC2. Ya que está contraindicado el uso del dispositivo de recolección *digene* HC2 DNA en la recolección de especímenes cervicales de mujeres embarazadas, puede reducirse la habilidad de la prueba para detectar la presencia de ADN de GC en esta población de pacientes o cuando se usa un hisopo Dacron para la recolección de especímenes. Se basan los estimados de desempeño para el ensayo en los especímenes conservados a 2-8° C o congelados y probados dentro de 1-2 semanas de recolección.

No se han determinado la sensibilidad y especificidad clínicas de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID para detectar a aquellas pacientes con infección clínicamente activa que pueda transmitirse a parejas o causar secuelas relacionadas con GC en comparación con todos los métodos de amplificación de ácidos nucleicos (NAA, por su abreviatura en inglés) comercialmente disponibles para la detección de ADN de GC. En estudios clínicos, las pruebas por un ensayo NAA comercial modificado mostró positividad en algunos especímenes prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID positivos obtenidos de pacientes cultivo negativos.]

MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.



3925

Tabla 5. Prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID versus resultados de cultivos de GC para especímenes de cepillo. Se presentan a continuación las características del desempeño calculadas utilizando los valores de corte de URL/CO de 1.0 y 2.5; los valores establecidos parentéticamente representan el desempeño considerando el corte de URL/CO de 2.5. Los intervalos de confianza del 95% son incluyentes de ambos rangos cuando los estimados de puntos diferían en cada uno de los valores de corte de URL/CO evaluados.

Lugar ²	<i>digene</i> HC2 GC-ID: Cultivo: n=	POS POS	POS NEG	NEG POS	NEG NEG	Sensibilidad	VPP	Especificidad	VPN	<i>digene</i> HC2 GC-ID+ PCR de cultivo ^{1,4}
Sintomática										
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	95.67 (99.35) 96.2-100	5/7 (2/3)
IC 95%	2	188	13	2	169	76.47 (50.1-93.2)	86.67 (58.5-98.3)	98.83 (95.8-99.9)	97.69 (94.2-99.4)	1/2
IC 95%	3	233	14	6 (3)	212 (215)	93.33 (82.35)	70.00 (56.6-96.2)	97.25 (98.62) 96.0-99.7	99.54 (97.4-100)	0 ² /5
IC 95%	4	163	4	0	159	100.00 (39.8-100)	100.00 (39.8-100)	100.00 (97.7-100)	100.00 (97.7-100)	N/A
IC 95%	Todos	835	70 (69)	15 (8)	6 (7) 844 (851)	92.11 (90.79) 83.6-97.1	82.35 (89.61) 80.1-95.4	98.25 (99.07) 98.2-99.6	99.29 (99.18) 96.5-99.7	6 ² /15
Asintomática										
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 (98.89) 92.3-99.7	100.00 (98.89) 95.9-100	2/2
IC 95%	2	12	2	0	10	100.00 (15.8-100)	100.00 (15.8-100)	100.00 (69.2-100)	100.00 (69.2-100)	N/A
IC 95%	3	84	1 (0)	0	0 (1) 83	100.00 (0.00) 2.5-100	100.00 (0.00) 2.5-100	100.00 (95.7-100)	100.00 (98.81) 95.7-100	N/A
IC 95%	4	226	4	2 (0)	1 219 (221)	80.00 (100.00) 28.4-89.5	86.67 (100.00) 98.3-100	89.10 (100.00) 98.3-100	89.55 (100.00) 97.5-100	1/2 (N/A)
IC 95%	5	1	0	0	1	N/A	N/A	100.00 (2.5-100)	100.00 (2.5-100)	N/A
IC 95%	Todos	424	17 (15)	4 (2)	1 (3) 402 (404)	94.44 (83.33) 72.7-99.9	80.95 (88.24) 63.6-98.5	99.01 (99.51) 98.2-99.9	99.75 (99.26) 98.6-100	3/4 (2/2)
TODAS										
1	452	49 (47)	9 (5)	1 (3)	393 (397)	88.00 (94.00) 89.4-100	84.48 (90.38) 79.0-96.8	97.76 (98.76) 97.1-99.6	89.75 (99.25) 98.6-100	7/9 (4/5)
IC 95%	2	200	15	2	4 179	78.95 (54.4-94.0)	88.24 (63.6-98.5)	88.90 (96.1-99.9)	97.81 (94.5-99.4)	1/2
IC 95%	3	317	15 (14)	6 (3)	1 (2) 295 (298)	93.75 (87.50) 69.8-99.8	71.43 (52.35) 56.6-96.2	98.01 (98.00) 97.1-99.8	89.86 (99.33) 98.1-100	0 ² /6
IC 95%	4	389	8	2 (0)	1 378 (380)	88.88 (100.00) 51.8-99.7	80.00 (100.00) 63.1-100	89.47 (100.00) 99.0-100	89.74 (98.5-100)	1/2 (N/A)
IC 95%	5	1	0	0	0 1	N/A	N/A	100.00 (2.5-100)	100.00 (2.5-100)	N/A

MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M/N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.

	Todos	1359	87 (84)	19 (10)	7 (10)	1246 (1255)	92.55 (89.36) 85.3-97.0	82.08 (89.36) 81.3-94.8	98.50 (99.21) 97.7-99.9	99.44 (99.21) 98.9-99.8	9 ² /19
IC 95%											

¹ Esta información es proporcionada para información adicional; no se resolvieron los resultados de especímenes usando la PCR.
² El número de lugar 5 no tuvo ningún espécimen de cepillo de pacientes sintomáticas.
³ En dos casos, no se hizo la PCR.
 N/A = No aplica

Tabla 6. Prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID versus resultados del cultivo de GC para especímenes de hisopos. Se presentan a continuación las características de desempeño calculadas utilizando los valores de corte de URL/CO de 1.0 y 2.5. Los valores establecidos parentéticamente representan el desempeño considerando el corte de URL/CO de 2.5. Los intervalos de confianza del 95% con incluyentes de ambos rangos cuando los estimados de puntos diferían en cada uno de los valores de corte de URL/CO evaluados.

Lugar ²	<i>digene</i> HC2 GC-ID: Cultivo: n=	POS POS	POS NEG	NEG POS	NEG NEG	Sensibilidad	VPP	Especificidad	VPN	<i>digene</i> HC2 GC-ID+ PCR de cultivo ^{1,4}
Sintomática										
1	7	2	0	0	5	100.00 (15.8-100)	100.00 (15.8-100)	100.00 (47.8-100)	100.00 (47.8-100)	N/A
IC 95%	2	92	13	2 (0)	1 76 (78)	92.86 (100.00) 66.1-99.8	86.67 (100.00) 75.3-100	97.44 (100.00) 95.4-100	88.70 (98.73) 93.2-100	0/2
IC 95%	3	5	2	0	0 3	100.00 (15.8-100)	100.00 (15.8-100)	100.00 (29.2-100)	100.00 (29.2-100)	N/A
IC 95%	5	162	0	3 (1)	0 159 (161)	N/A	0.00 (2.5-100)	98.15 (98.38) 96.8-100	100.00 (97.7-100)	1 ¹ /3
IC 95%	Todos	265	17	5 (1)	1 243 (247)	94.44 (72.7-99.9)	77.27 (94.44) 54.6-99.9	97.99 (99.60) 95.4-100	99.59 (99.60) 97.8-100	1 ¹ /5
Asintomática										
1	1	0	0	0	1	N/A	N/A	100.00 (2.5-100)	100.00 (2.5-100)	N/A
IC 95%	2	10	2	0	0 8	100.00 (15.8-100)	100.00 (15.8-100)	100.00 (63.1-100)	100.00 (63.1-100)	N/A
IC 95%	3	2	0	0	0 2	N/A	N/A	100.00 (15.8-100)	100.00 (15.8-100)	N/A
IC 95%	4	1	0	0	0 1	N/A	N/A	100.00 (2.5-100)	100.00 (2.5-100)	N/A
IC 95%	5	186	1	0	0 185	100.00 (2.5-100)	100.00 (2.5-100)	100.00 (98.0-100)	100.00 (98.0-100)	N/A
IC 95%	Todos	200	3	0	0 197	100.00 (29.2-100)	100.00 (29.2-100)	100.00 (98.1-100)	100.00 (98.1-100)	N/A
TODAS										
1	8	2	0	0	6	100.00 (15.8-100)	100.00 (15.8-100)	100.00 (54.1-100)	100.00 (54.1-100)	N/A
IC 95%	2	102	15	2 (0)	1 84 (86)	93.75 (100.00)	88.24 (100.00)	97.87 (100.00)	98.82 (98.85)	0/2

IC 95%							69.8-99.8	63.6-100	81.9-100	93.6-100	
	3	7	2	0	0	5	100.00	100.00	100.00	100.00	N/A
IC 95%							15.8-100	15.9-100	47.8-100	47.8-100	
	4	1	0	0	0	1	N/A	N/A	100.00	100.00	N/A
IC 95%							2.5-100	2.5-100	2.5-100	2.5-100	
	5	348	1	3 (1)	0	344 (348)	100.00	25.00 (50.00)	99.14 (99.71)	100.00	1 ^{1/3}
IC 95%							2.5-100	1.3-98.7	98.4-100	98.9-100	
Todos	466	20	5 (1)	1	440 (444)		95.24	80.00 (96.24)	98.88 (99.78)	99.77	1 ^{1/5}
IC 95%							76.2-99.9	59.3-99.9	97.4-100	98.0-100	

1 Se proporcionó esta información para información solamente; no se resolvieron los resultados de especímenes usando la PCR.
 2 El número de Lugar 4 no tuvo ningún espécimen de hisopo de pacientes sintomáticas.
 3 En dos casos, no se hizo la PCR.
 N/A = No aplica

Re-prueba de los especímenes prueba de ADN *digene* HC2 CT/GC positivos usando la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID

Se presenta a continuación un resumen del desempeño de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID cuando se usa para la re-prueba de especímenes inicialmente positivos con la prueba de ADN *digene* HC2 CT/GC. Los resultados han sido estratificados por el dispositivo de recolección usado para recolectar el espécimen, el dispositivo de recolección de ADN *digene* HC2 (designada en la tabla 7 como «cepillo») y el kit de recolección de especímenes con hisopo genital *digene* HC (designado en la tabla 7 como «hisopo»). Un total de nueve especímenes (todos usando el cepillo) que fueron positivos por cultivo y PCR combinados probó ser negativo con la prueba de ADN *digene* HC2 CT/GC (0.6%, 9/1560). Doce de los 144 especímenes prueba de ADN *digene* HC2 CT/GC positivos que probaron ser negativos con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID también probaron ser negativos con la prueba de ADN *digene* HC2 CT-ID. Solamente dos de esos 144 especímenes fueron cultivo de GC/PCR positivos, y se determinó que 118 eran cultivo de CT positivos. No se realizó ninguna prueba NAA adicional en estos especímenes.

Como se indicó en la tabla 7, cinco de los nueve especímenes prueba de ADN *digene* HC2 CT/GC positivos que cayeron en la zona ambigua en la re-prueba con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID confirmaron ser positivos por cultivo de GC y PCR combinados. Como se sugirió por estos cinco especímenes, la utilidad de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID para confirmar la presencia de ADN de GC en especímenes que prueban ser positivos por la prueba de ADN *digene* HC2 CT/GC no está comprometida interpretando los especímenes ambiguos de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID como supuestos positivos, como se instruyó en la sección Interpretación de resultados de estas instrucciones de uso.

Tabla 7. Resumen de los resultados de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID obtenidos para especímenes probados con la prueba de ADN *digene* HC2 CT/GC (n = 1825).

Resultados de la prueba de ADN <i>digene</i> HC2			Cultivo de GC y PCR combinados			
			Cepillo		Hisopo	
CT/GC	GC-ID	n	POS	NEG	POS	NEG
POS	POS	112	88	3	21	0
	EQUIV	9	5	2	0	2
	NEG	144	1	116	1	26
	TOTAL	265	94	121	22	28
NEG	POS	3	1	2	0	0
	EQUIV	7	2	3	0	2
	NEG	1550	6	1130	0	414
	TOTAL	1560	9	1135	0	416

De particular interés son los 32 especímenes positivos por la prueba de ADN *digene* HC2 CT/GC y determinados por cultivo de GC y cultivo de CT/DFA a coinfectar con estos organismos; todos, excepto dos (6.3%) de estos especímenes coinfectados confirmaron ser positivos por la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID. Con base en estos datos, la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID es efectiva para confirmar la presencia de ADN de GC en especímenes que producen un resultado positivo inicial con la prueba de ADN *digene* HC2 CT/GC.

Reproducibilidad

Como parte del estudio clínico multicéntrico, se realizó un estudio de reproducibilidad para determinar la reproducibilidad corrida por corrida, día por día, lugar por lugar y total de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID usando un panel compuesto de blancos de ADN de *Neisseria gonorrhoeae* y los especímenes clínicos prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID positivos y prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID negativos.

Un panel de 10 miembros de especímenes encubiertos, desnaturalizados, clínicos y no clínicos, consistente en ocho especímenes positivos y dos especímenes negativos, se probó por replicados de seis, dos veces por día, durante un período de tres días, en cada uno de cuatro lugares (tres lugares externos y QIAGEN). Cada lugar generó 36 puntos de datos para cada blanco probado. Se desnaturalizaron y conservaron congelados todos los especímenes antes de las pruebas. Se observó una concordancia del cien por ciento para los 1152 resultados positivos esperados (1152/1152) y se observó una concordancia del 100% para los 288 resultados negativos esperados (288/288). En general, la concordancia fue del 100% (1440/1440), con un intervalo de confianza del 95% de 99.7-100 y kappa = 1.00. No hubo una variabilidad significativa corrida por corrida, día por día, o lugar por lugar observada. Por lo tanto, se combinaron los datos de todas las corridas en cada lugar y se presentan a continuación (véase la tabla 8).

Tabla 8. Reproducibilidad de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID en un estudio multicéntrico.

Número blanco	Lugar 1		Lugar 2		Lugar 3		Lugar 4		Total		
	χURL /CO	% de concordancia	χURL /CO	Observado/ esperado	% de concordancia						
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

Se condujo un segundo estudio de competencia/reproducibilidad usando todo el organismo de *Neisseria gonorrhoeae* (GC) adicionado a una matriz de especímenes clínicos de simulación de células epiteliales en tres lugares externos. Los 25 especímenes probados contenían representantes de positivos bajos (en o casi el límite de detección) y medios con dos cepas de GC, infecciones mezcladas con *Chlamydia trachomatis* (CT) y especímenes que contenían sangre. Se esperó que doce especímenes fuesen positivos, y se esperó que 13 especímenes fuesen negativos. Se muestra la concordancia porcentual entre los resultados observados y esperados de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID en los tres lugares de pruebas individuales y para todos los lugares combinados en la tabla 9. Se incluyen los valores de sensibilidad, especificidad, concordancia y kappa para cada lugar en la tabla 10.

MARISOL MASINO
 BIOQUIMICA- M.N. 9483
 DT- TECNOLAB S.



3925

Tabla 9. Concordancia porcentual de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID por lugar.

Lugar	Observado vs. esperado	% de concordancia *
1	25/25	100% (86.28%-100%)
2	25/25	100% (86.28%-100%)
3	25/25	100% (86.28%-100%)
Lugares combinados	75/75	100% (95.20%-100%)

* Números en paréntesis indican intervalos de confianza del 95%.

Tabla 10. Resultados de la estadística en resumen de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID (corte de 1.0).

Medida estadística	Lugar 1	Lugar 2	Lugar 3	En general
Sensibilidad	100% (73.54%-100%)*	100% (73.54%-100%)	100% (73.54%-100%)	100% (90.26%-100%)
Especificidad	100% (75.29%-100%)	100% (75.29%-100%)	100% (75.29%-100%)	100% (90.97%-100%)
Concordancia	100% (86.28%-100%)	100% (86.28%-100%)	100% (86.28%-100%)	100% (95.20%-100%)
K	1.0	1.0	1.0	1.0

* Números en paréntesis indicaron intervalos de confianza del 95%.

En pruebas de competencia rutinarias, 12 de los 25 especímenes presentados en la *tabla 9* se encontraban en la zona ambigua, los cuales todos contenían bajas concentraciones del organismo de GC ($\sim 5 \times 10^4$ organismos/mL), esto sería interpretado de acuerdo con la sección *Interpretación de resultados* de estas instrucciones de uso como supuestamente positivo. Por lo tanto, el ensayo ha demostrado la habilidad de detectar ADN de GC en especímenes con concentraciones de organismo detectable en o casi el límite de detección del ensayo. Se observó una evidencia adicional de esto cuando se probaba un panel que contenía especímenes con bajos números de organismos en un rango indicado en ser detectado por ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. Las pruebas en tres lugares externos y en QIAGEN produjeron resultados 100% positivos (o supuestamente positivos) para el espécimen en el panel que contenía el organismo de GC.

Tabla 11. Resultados del panel de especímenes de CT y GC.

Resultado de la prueba de ADN <i>digene</i> HC2 GC-ID			
Lugar	URL/CO	Interpretación	Resultado esperado
1	0.12	NEG	NEG
	10.45	POS	POS
	10.26	POS	POS
	9.74	POS	POS
	0.14	NEG	NEG
2	0.09	NEG	NEG
	9.31	POS	POS
	9.93	POS	POS
	9.69	POS	POS
	0.09	NEG	NEG
3	0.11	NEG	NEG
	11.00	POS	POS
	12.08	POS	POS
	9.45	POS	POS
	0.10	NEG	NEG
4	0.07	NEG	NEG
	8.54	POS	POS
	7.27	POS	POS
	8.09	POS	POS
	0.08	NEG	NEG

Precisión

Se realizó un estudio de precisión en tres lugares para determinar la precisión dentro de la corrida y total de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID usando un panel de especímenes clínicos positivos y negativos ocultos y simulados. Además, se valoró la precisión intra e inter-instrumentos observada con dos luminómetros separados usando el mismo panel. Los dos modelos de luminómetros incluyeron el instrumento DML 2000, el cual es uno de los luminómetros aprobados por QIAGEN recomendado para su uso con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID, y el luminómetro MLX; el luminómetro MLX fue uno de los modelos de luminómetros usado durante la evaluación clínica que ya no está disponible. Uno de los tres lugares experimentaron dificultades con otras pruebas de ADN *digene* HC2 que se están realizando como parte de este estudio. Estas dificultades fueron atribuibles a la técnica de ensayo que más probablemente fue causada por una capacitación inapropiada o inadecuada. Aunque no tuvieron afectaciones las pruebas de precisión de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID, se volvió a capacitar al tecnólogo que realizaba las pruebas en la técnica de ensayo apropiada.

La *tabla 12* muestra el desempeño de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID para todos los lugares combinados (incluyendo el lugar que experimentó problemas técnicos antes de la recapacitación del tecnólogo en la técnica de ensayo apropiada). El ensayo demostró una precisión equivalente después de la recapacitación del tecnólogo. Sin embargo, para el miembro 3 del panel (el cual contenía bajas concentraciones del organismo de GC), los valores de URL/CO observados se encontraban dentro o casi en la zona ambigua del ensayo de 1.0-2.5. Para los fines de estos análisis de datos, todos esos valores de URL/CO que cayeron dentro de la zona ambigua o excedieron 2.5 fueron interpretados como positivos. Aunque no fue evidente de esta tabla, los resultados cualitativos estuvieron 100% (54/54) (93.4%-100% IC del 95%) en concordancia con los resultados esperados en los tres lugares.

Tabla 12. Estimados de precisión ininstrumento, interinstrumento, intracorida y total para URL/CO por prueba y blanco.

Miembro del panel	n	Media	Ininstrumento		Interinstrumento		Intracorida		Total	
			Desviación estándar (Desv. Est.)	(%CV)	(Desv. Est.)	(%CV)	(Desv. Est.)	(%CV)	(Desv. Est.)	(%CV)

MARISOL MASINO
 BIOQUIMICA - M.N. 9483
 DT - TECNO LAB S.A.

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 los fines de estos análisis de datos, todos esos valores de URL/CO que caían dentro de la zona ambigua o excedían 2.5 fueron interpretados como positivos. Se realizó un estudio de precisión adicional en QIAGEN para determinar la precisión total de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID usando el instrumento DML 2000. Se preparó un panel de precisión de seis miembros usando una matriz de especímenes clínicos simulados consistente en células epiteliales cultivadas suspendidas en el medio de transporte de especímenes *digene* (STM). El panel consistió en dos especímenes negativos, dos especímenes positivos bajos y dos especímenes positivos de nivel medio, todos conteniendo un dispositivo de recolección de cepillo. Se probó cada panel por triplicado, dos paneles por placa, por dos técnicos durante el curso de cinco días. Se usó un panel recientemente desnaturalizado por placa. Se presentan los resultados de la precisión total para la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID compilados por los cinco días de pruebas en la *tabla 13*. Aunque no es evidente de estas tablas, la interpretación cualitativa de los resultados fue del 100% en concordancia con el resultado esperado (120/120; 96.97%-100% IC del 95%) cuando se usa un URL/CO de 1.0.

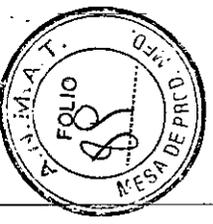
Tabla 13. Precisión total para la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID.

Miembro del panel	n	URL/CO media	Desv. Est.	CV%	-2 x	+2 x
					Desv. Est. media	Desv. Est. media
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

Sensibilidad analítica

Se determinó la sensibilidad analítica (límites de detección) de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID probando directamente una serie de diluciones de un panel de especímenes consistente en 114 aislados separados de *Neisseria gonorrhoeae*. Los 114 aislados representaron 13 auxotipos, cinco serovars, 10 cepas resistentes a antibióticos, seis aislados de cepas sin plásmido, y dos aislados no caracterizados encontrados discordantes en el estudio multicéntrico. Se probó una serie de diluciones de cuatro puntos de cada uno de los aislados una vez usando la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID para establecer los límites de detección para la prueba. Se resumen el límite de detección para cada auxotipo de *Neisseria* en la *tabla 14*. El rango de límites detectables declarado fue la dilución de cada auxotipo que se detectó dentro o muy cerca de la zona ambigua del ensayo de 1.0-2.5 URL/CO.

La sensibilidad analítica de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID varió de 25 a 50,000 UFC/ensayo para los 114 aislados de *Neisseria* probados, incluyendo auxotipos, serovars, y cepas sin plásmido y resistentes a antibióticos. Solamente una de las seis cepas sin plásmido y uno de cinco de los serovars IA-5 de *Neisseria gonorrhoeae* probados se detectaron en 50,000 UFC/ensayo; ninguno de los otros 112 aislados se detectó en concentraciones en exceso de 5000 UFC/ensayo. El límite detectable promedio para los 114 aislados iba de 974 a 2887 UFC/ensayo cuando se tomaban en consideración las diluciones de aislados que cayeron ambas dentro de la zona ambigua del ensayo y por encima de 2.5 URL/CO. El límite de detección promedio general fue de 1931 UFC/ensayo (3.8×10^4 UFC/mL). Los especímenes clínicos que contienen el organismo en o casi el límite de detección puede necesitar ser re-probado por un procedimiento de prueba alternativo o un espécimen nuevo del paciente, como fue definido en la sección *Interpretación de resultados* de estas instrucciones de uso.



3925

Tabla 14. Resumen de los límites detectables para auxotipos de GC, serovars, y cepas sin plásmido y resistentes de antibióticos.

Auxotipo	Concentración detectable	
	UFC/mL	UFC/ensayo
<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 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo 22	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo 5	500-5000	25 - 250
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo 9	5-10 ⁶	2500
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo AHU (5 aislados)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo Arg (5 aislados)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo AU (5 aislados)	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo PAU (5 aislados)	10 ³ -10 ³	50 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo Pro (5 aislados)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 500
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> auxotipo Proto (5 aislados)	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> intermediario de ciprofloxacina (CipI) (5 aislados)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente a ciprofloxacina (Cip R) (4 aislados)	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> CMRNG (5 aislados)	10 ⁴ -10 ⁵	50 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> otro-5423	10 ⁴ -10 ⁵	50 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> otro-5658	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> PenR (5 aislados)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> PenR (5 aislados)	10 ³ -10 ⁶	50 - 50,000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> cepas sin plásmido (6 aislados)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> PPNG 3.05 (5 aislados)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> PPNG 3.2	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> PPNG 4.4 (4 aislados)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> Serovar I A-1 ó IA-2 (5 aislados)	10 ⁴ -10 ⁶	500 - 50,000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> Serovar I A-5 (4 aislados)	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> Serovar I B-1 (5 aislados)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> Serovar I B-4 ó IB-15 (5 aislados)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente a espectinomocina (SpecR)	10 ⁵	5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> TetR (5 aislados)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> TRNG americano (5 aislados)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> TRNG holandés (5 aislados)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
Cepa de tipo <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	500-5000	25 - 250

Especificidad analítica

Se probó una batería de bacterias, virus, plásmidos y material celular humano o productos sanguíneos potencialmente encontrados en el tracto anogenital femenino para determinar si la reactividad cruzada ocurriese con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID. Se probaron todos los microorganismos en concentraciones de 10⁵ y 10⁷ organismos o UFC por mL, y cuando es posible con 10³ organismos o UFC por mL, al menos que se indique lo contrario a continuación. Se probó el ADN purificado de virus y plásmidos en una variedad de concentraciones, como es indicado más adelante.

A continuación se encuentra una lista de las bacterias probadas.

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Neisseria caviae</i> (2 aislados) ^e
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Neisseria cuniculi</i> (3 aislados) ^f
<i>Acinetobacter lawfi</i>	<i>Neisseria cinera</i> (6 aislados)
<i>Achromobacter xerosis</i>	<i>Neisseria flavescens</i> (4 aislados)
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Neisseria species</i> ^{g, h}

<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Neisseria lactamica</i> (6 aislados) ^d
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> (grupo A, B, C,
W135, Y)	
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Neisseria mucosa</i> (6 aislados) ^d
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Neisseria polysaccharea</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i> (6 aislados)	<i>Neisseria sicca</i> (6 aislados)
<i>Candida albicans</i>	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Neisseria subflava biovar flava</i> (5 aislados)
<i>Chlamydia pneumoniae</i> ^b	<i>Neisseria subflava biovar pertava</i> (4
aislados) ^a	
<i>Chlamydia psittaci</i> ^a (2 cepas)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> ^b (serovar B, Ba, E, J, L3) ^c	<i>Peptostreptococcus asaccharalyticus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Peptostreptococcus productus</i>
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Escherichia coli</i> (aislado clínico) [†]	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^a
<i>Escherichia coli</i> (HB101) [†]	<i>Salmonella minnesota</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Gemella haemolyans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ProtA +)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> (grupo B)
<i>Kingella denitrificans</i> ^d	<i>Streptococcus pyogenes</i> (grupo A)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptomyces griseus</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Mobiluncus curtisi</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i> ⁱ
<i>Mobiluncus mulieris</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Moraxella lacunata</i>	
<i>Mycoplasma hominis</i>	
<i>Mycoplasma hyarhinis</i>	

Concentraciones probadas (organismos/mL o UFC/mL para la especie *Neisseria*):

- ^a 5 x 10⁴, 5 x 10⁵, 5 x 10⁶, 8 x 10⁴, 8 x 10⁵, 8 x 10⁶, 9 x 10⁴, 9 x 10⁵, 9 x 10⁶
- ^b 2 x 10⁴, 2 x 10⁵ y 2 x 10⁶
- ^c 1 x 10⁴, 1 x 10⁵ y 1 x 10⁶
- ^d 5 x 10⁴, 5 x 10⁵, 5 x 10⁶
- ^e 1.1 x 10⁴, 1.1 x 10⁵, 1.1 x 10⁶
- ^f 9.7 x 10⁴, 9.7 x 10⁵, 9.7 x 10⁶
- ^g 2 x 10⁴, 2 x 10⁵ y 2 x 10⁶
- ^h 4.8 x 10⁴, 4.8 x 10⁵, 4.8 x 10⁶
- ⁱ 1 x 10⁴ y 1 x 10⁵

[†] Se probaron tanto la cepa de *E. coli* usada para cultivar plásmidos (HB101) y un aislado clínico de *E. coli*.
^h La cepa de ATCC *Neisseria* que tiene características tanto de *Neisseria gonorrhoeae* como *Neisseria meningitidis* (ATCC #43831).

MARISOL MASINO
 BIOQUIMICA - M.N. 9483
 DT - TECNOLAB S.A.

Todas las bacterias aparte de *Neisseria gonorrhoeae* potencialmente encontradas en el tracto urogenital, con excepción de las tres cepas comensales de *Neisseria* y *Chlamydia psittaci*, probaron ser negativas con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID. Se observó solamente la reactividad cruzada moderada que se interpretaría como supuestamente positiva con *Chlamydia psittaci* y *Neisseria lactamica*. Dicha reactividad cruzada no deberá impactar en la interpretación de los resultados de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID de especímenes urogenitales. Los organismos que demostraron algún grado de reactividad cruzada son:

	Interpretación	Concentración en la cual se observó una reactividad cruzada
<i>Chlamydia psittaci</i> (1 de 2 aislados)	Supuestamente positivo *	1 x 10 ⁷ organismos/mL
<i>Neisseria lactamica</i> (1 de 6 aislados)	Supuestamente positivo *	1 x 10 ⁹ UFC/mL
<i>Neisseria meningitidis</i> (grupo Y, 1 de 2 aislados)	Positivo	1 x 10 ⁷ UFC/mL
<i>Neisseria mucosa</i> (1 de 6 aislados)	Positivo	5 x 10 ⁵ UFC/mL

* URL/CC cayó dentro de la zona ambigua del ensayo de 1.00 a 2.50.

Las tres cepas comensales de *Neisseria*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis* y *Neisseria mucosa*, se encuentran todos principalmente en la nasofaringe y el sistema respiratorio superior. En raras ocasiones, si es que llega ocurrir, se aíslan del sistema urogenital.^{17, 18} Además, se determinó que el aislado de *Neisseria meningitidis* del grupo Y reactivo cruzado no es capaz de tipificarse como lipopolisacárido y, en raras ocasiones, se encuentra en la población general. *Chlamydia psittaci* puede detectarse de la piel de la gente que trabaja con o manejar especies avícolas, mas no se ha detectado en el tracto anogenital.¹⁹

Además, no todos los aislados de la cepa particular fueron reactivos cruzados con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID, reduciendo la probabilidad de que un resultado falso positivo se genere con un espécimen clínico si esa cepa está presente. Por ejemplo, cinco de los seis aislados de *Neisseria lactamica* o *Neisseria mucosa* probados negativos con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID, como fueron una de las dos cepas de *Chlamydia psittaci*. Así, no se espera que la reactividad cruzada de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID observada con las tres cepas comensales de *Neisseria* y *Chlamydia psittaci* condujesen a una interpretación clínica falsa de un resultado positivo cuando se prueban los especímenes anogenitales.

La siguiente es una lista del ADN viral, ADN plasmídico, y material celular humano o productos sanguíneos probados y las concentraciones que se probaron:

Citomegalovirus ^a	Virus del papiloma humano tipo 6 ¹
Virus Epstein Barr ^b	Virus del papiloma humano tipo 11 ¹
Suero positivo de antígeno de superficie de hepatitis B ^c	Virus del papiloma humano tipo 16 ¹
Herpes Simplex I ^d	Virus del papiloma humano tipo 18 ¹
Herpes Simplex II ^d	pBR322 ¹
Virus de inmunodeficiencia humana (VIH) ^{b, e}	SV40 ¹
ADN genómico humano ^a	pGEM [®] 3Z ¹
ADN placentario humano ^a	pGEM 3Zf(-) ¹
Sangre total humana ^h	Células epiteliales humanas ^m

Concentraciones probadas:

- ^a 1 x 10⁵, 1 x 10⁷, 1 x 10⁹ partículas virales/mL
- ^b 1 x 10⁵, 1 x 10⁷, 1 x 10⁹ partículas virales/mL
- ^c 2.9 x 10⁸, 1.1 x 10⁹ partículas virales/mL
- ^d 6.1 x 10⁶, 2.4 x 10⁷ partículas virales/mL
- ^e 2.7 x 10², 1.1 x 10³ copias/mL
- ^f 1.1 x 10⁸, 4.6 x 10⁸ partículas virales/mL
- ^g 2 x 10⁶, 2 x 10⁷, 2 x 10⁸ partículas virales/ mL
- ^h 5%, 10%, 50%
- ⁱ 2.1 x 10³, 8.3 x 10⁸ copias/mL
- ^j 1 ng/mL, 4 ng/mL
- ^k 3.4 x 10⁵, 1.4 x 10⁵ copias/mL
- ^l 2.9 x 10⁸, 1.1 x 10⁹ copias/mL
- ^m 1 x 10⁵, 1 x 10⁶, 1 x 10⁷ células/mL

Ninguno de los virus probados mostró una reactividad cruzada con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID. No obstante, se observó una reactividad cruzada con los plásmidos pBR322, pGEM 3Z y pGEM 3Zf(-). Todas las demás preparaciones de ADN probadas, incluyendo el ADN humano, fueron negativas. La sangre humana y las células epiteliales no reaccionaron de forma cruzada con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID. No se espera una reactividad cruzada entre pBR322 y la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID debido a la manera en que se crea la sonda de GC. Se ha reportado la presencia de secuencias homólogas de pBR322 en los especímenes genitales humanos, y podrían ocurrir resultados falsos positivos en presencia de altos niveles de plásmido bacteriano. Sin embargo, ningún espécimen de 103 probados de un estudio clínico multicéntrico de EE.UU. encontrado positivo por *Neisseria gonorrhoeae* con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID se identificó como falso positivo debido a secuencias pBR322 reactivas cruzadas. Así, parece que es baja la probabilidad de los resultados falsos positivos de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID con especímenes clínicos causados por reactividad cruzada con secuencias pBR322 homólogas. Aunque la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID tiene el potencial de reaccionar de forma cruzada con *Chlamydia psittaci*, pBR322, pGEM y varias especies comensales de *Neisseria*, es remota la probabilidad de estos organismos afectando la interpretación de la prueba, como es demostrado por los resultados del estudio clínico multicéntrico.

Homología de sondas al ADN plasmídico y genómico total

Las sondas genómicas son homólogas a aproximadamente el 0.5% del genoma de *Neisseria gonorrhoeae*. Se presenta a continuación una descomposición para cada sonda en la prueba *digene* HC2 GC-ID:

Sonda	Tipo	Tamaño aprox. del inserto (bp)	% de genoma
pGC1	Genómico	6,400	0.34%
pGC2		3,300	0.17%
		9,700 (total)	0.51%
pGC3	Plásmido criptico	4,200	N/A*

* Esto representa toda la secuencia de la sonda.

Efecto de la sangre y otras sustancias en los especímenes de STM

Se evaluó el efecto de la sangre y otras sustancias definidas potencialmente interferentes en la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID. Se agregaron sangre total y una marca comercial de ducha vaginal, crema antifúngica y jalea anticonceptiva (agentes que pueden encontrarse comúnmente en especímenes cervicales) a especímenes positivos (reuniones de especímenes clínicos) en concentraciones que pueden encontrarse en especímenes cervicales (véase la tabla 15). No se observaron resultados falsos positivos con ninguno de los cuatro agentes en ninguna

MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S

determinar la reproducibilidad de los calibradores positivos y negativos y se proporcionan a continuación como información histórica.

Tabla 17. Instrumentación usada para establecer las características de desempeño de la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID.

Estudio	Lugar	Luminómetro
Estudio clínico multicéntrico	1	ML 2200*
	2	ML 2200*
	3	MLX
	4	MLX
	5	MLX
Sensibilidad analítica	QIAGEN	DML 2000
Especificidad analítica	QIAGEN	DML 2000
Reproducibilidad	1er. protocolo (4 lugares)	MLX o ML 2200
	2º protocolo	DML 2000
Precisión	(3 lugares clínicos)	DML 2000 y MLX
Estabilidad del espécimen	QIAGEN	DML 2000
Sustancias interferentes	QIAGEN	DML 2000
Reproducibilidad dentro del 20% de corte	QIAGEN	MLX

* Los luminómetros ML2200 y MLX (Dynex, Chantilly VA) ya no están disponibles y han sido reemplazados por el instrumento DML 2000 equivalente.

Para determinar la reproducibilidad del calibrador y estimar la frecuencia en la cual pueden ser necesarios recálculos manuales, se compilaron los resultados de las evaluaciones clínicas que involucran 79 corridas de ensayo realizadas con la prueba de ADN *digene* HC2 GC-ID (véase la tabla 18). Los resultados mostraron que el %CV promedio para estas 79 corridas fue del 5.79%, y ninguna corrida de prueba tuvo valores medios negativos del calibrador en exceso de 150 URL. Consideran los tres duplicados del calibrador positivo por corrida de prueba, se observó la reproducibilidad del calibrador de más del 20% CV para una de las 79 corridas (1.3%) y se recalculó el %CV. Después del recálculo, el %CV de la corrida de la prueba permaneció por debajo del 15%, indicando que fueron válidas todas las corridas de la prueba.

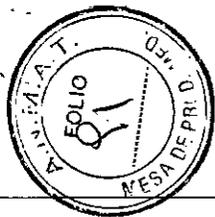
Tabla 18. Desempeño de los calibradores positivos y negativos. Datos combinados del estudio clínico multicéntrico y el estudio de precisión (n = 79 corridas)

Instrumento	No. de corridas	Media de razones S/N	Tipo de calibrador	Media de medias calculadas (URL)		Media de los %CV calculados	
				Tres duplicados	Ajustado para marginales	Tres duplicados	Ajustado para marginales
Instrumento	9	7.71	Negativo	40.30	34.47	18.96	12.24
DML 2000			Positivo	292.37	292.37	6.67	6.67
MLX*	72	4.52	Negativo	0.076	0.070	13.83	12.36
			Positivo	0.29	0.29	5.67	5.67

* Ya no está disponible para su uso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Centers for Disease Control and Prevention. Table II. Provisional cases of selected notifiable diseases, United States, weeks ending December 28, 1996, and December 30, 1995 (52nd week). *MMWR* 3 de enero de 1997;45(51&52):1138-9.
- Division of STD/HIV Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance, 1991. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA. Centers for Disease Control. Julio de 1992.
- Knapp JS, Rice RJ. *Neisseria* and Branhamella. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editores. *Manual of Clinical Microbiology*. 6ª ed. Washington, DC: ASM Press; 1995. p 324-40.
- Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. *MMWR* 24 de septiembre de 1993;42(RR-14):1-102.
- 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.
- 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.
- Knapp JS. Historical perspectives and identification of *Neisseria* and related species. *Clin Microbiol Rev* 1988;1(4):415-31.
- Kingsbury DT. Estimate of the genome size of various microorganisms. *J Bacteriol* junio de 1969;98(3):1400-1.
- US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. *Federal Register* 1991;56(235):64175-82.
- US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, HHS Publication No. (CDC) 93-8395. Washington, DC: US Government Printing Office, mayo de 1999.
- World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 1993.
- Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue: Approved Guideline*. Documento M29-A de CLSI/NCCLS. Wayne, PA: CLSI/NCCLS, 1997.
- CDC. Recommendations for Prevention of HIV Transmission in Health-Care Settings. *MMWR* 1987;36(2S):3S-18S.
- Sehulster LM, Hollinger FB, Dreesman GR, et al. Immunological and Biophysical Alteration of Hepatitis B Virus Antigens by Sodium Hypochlorite Disinfection. *Appl Envir Microbiol* 1981;42(5):762-7.
- Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline*. Documento GP5-A de CLSI/NCCLS. Villanova, PA: CLSI/NCCLS, 1993;13(22):1-18, 29-42.
- US Environmental Protection Agency. *EPA Guide for Infectious Waste Management*. Publicación No. EPA/530-SW-86-014. Washington, DC: US Environmental Protection Agency, 1986:1-1-5-5, R1-R3, A1-A24
- J.G. Holt, N.R. Krieg (editor en jefe; editor, volumen 1). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1. Williams & Wilkins; Baltimore/Londres, 1984
- C.R. Mahon, G. Manuselis (editors). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. W.B. Saunders Company; Filadelfia, 1995
- Manual of Clinical Microbiology*, quinta edición. Editor en jefe: Barlow. 1990. Schachter, Chlamydiae, sección VIII, capítulo 103, páginas 1045-1053.14. Ripa KT, Mardh P. Cultivation of *Chlamydia trachomatis* in cycloheximide-treated McCoy cells. *J Clin Microbiol* 1977;8(4):328-31.



3925

GUÍA DE IDENTIFICACIÓN Y RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PRUEBA DE ADN <i>digene</i> HC2 GC-ID		
OBSERVACIÓN	PROBABLES CAUSAS	SOLUCIONES
1. CT de QC y GC de QC dan un resultado incorrecto.	<p>Protocolo de software incorrecto escogido para la prueba (esto es, corrido el protocolo de CT en la corrida de GC).</p> <p>Colocación reversada de QC de CT y de GC en la placa.</p>	<p>Si el protocolo del software es incorrecto para la prueba que se está corriendo, deberá leerse otra vez la placa tan pronto como sea posible con el protocolo correcto.</p> <p>Vuelva a correr los especímenes.</p>
2. Viraje de color inapropiado o nulo observado durante la desnaturalización.	<p>Reactivo de desnaturalización no adicionado, o reactivo de desnaturalización no preparado apropiadamente.</p>	<p>1. Verifique que el reactivo de desnaturalización contenga el colorante indicador y que sea de un color púrpura oscuro.</p> <p>2. Verifique que se adicionó el reactivo de desnaturalización al espécimen midiendo el volumen de espécimen (se esperan 1.5 mL). Si el volumen indica que el reactivo de desnaturalización no se adicionó, haga la adición apropiada, mezcle y proceda con el ensayo si el viraje de color apropiado es posteriormente observado.</p>
	<p>El espécimen sanguíneo puede ocultar el viraje de color.</p>	<p>No se espera el viraje de color exacto descrito con estos tipos de especímenes; no deberán afectarse de forma adversa los resultados de la prueba del ensayo.</p>
	<p>El pH del espécimen puede ser inusualmente ácido.</p>	<p>El espécimen puede ser inusualmente ácido, de ese modo, no ocurrirá el viraje de color esperado. Recolecte un espécimen nuevo antes de la aplicación de ácido acético a la cervix porque el pH de espécimen inapropiado afectará de forma adversa los resultados de la prueba.</p>
3. Viraje de color inapropiado observado durante la hibridación.	<p>Mezcla inadecuada de la mezcla de la sonda con el calibrador, control de calidad y/o especímenes desnaturalizados.</p> <p>Mezcla de la sonda no adicionada.</p> <p>Volumen incorrecto del reactivo adicionado.</p>	<p>Agite la microplaca de hibridación por dos minutos adicionales. Si hay pozos que todavía quedan púrpuras o grises, agregue 25 µL adicionales de sonda y mezcle bien. Si en la adición de sonda y la remezcla no ocurre el viraje de color apropiado y el espécimen no contenía sangre u otros materiales, vuelva a probar el espécimen.</p>
	<p>El espécimen sanguíneo puede ocultar el viraje de color.</p>	<p>No se espera el viraje de color exacto descrito con estos tipos de especímenes; los resultados de prueba del ensayo no deberá afectarse de forma adversa.</p>
	<p>El espécimen tenía < 1000 µL del medio de transporte de especímenes <i>digene</i> (STM).</p>	<p>Chequee el volumen del espécimen original. El volumen deberá ser de 1425 µL ± 20 µL (después de quitar 75 µL). Si el volumen es < 1405 µL, el espécimen original contenía < 1000 µL de STM. Obtenga un espécimen nuevo.</p>
	<p>Ninguna sonda adicionada al diluyente de sonda.</p>	<p>Prepare la mezcla de sondas de GC, como se describe en la sección <i>Preparación y almacenamiento de reactivos</i> de estas instrucciones de uso. Mezcle completamente. Etiquete el tubo de forma apropiada. Repita el ensayo usando la mezcla de la sonda recientemente preparada.</p>
4. El ensayo falla los criterios de verificación de la calibración. No hay señal observada en el calibrador positivo, los controles de calidad o los	<p>Sonda contaminada con RNasa durante la preparación.</p>	<p>Use las puntas de pipeta con barrera de aerosol cuando pipetee la sonda y use guantes libres de polvo. Diluya la sonda en un contenedor estéril. Solamente use reservorios de reactivo desechables nuevos y limpios.</p>

MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.

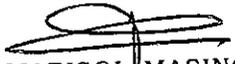
PRUEBA DE ADN <i>digene</i> HC2 GC-ID		
OBSERVACIÓN	PROBABLES CAUSAS	SOLUCIONES
especímenes.	<p>Mezcla inadecuada de la sonda y diluyente de sonda.</p>	<p>Después de adicionar la sonda al diluyente de sonda, mezcle completamente colocando en vórtice a alta velocidad durante por lo menos cinco segundos. Debe producirse un vórtice visible.</p>
	<p>Mezcla inadecuada de la sonda diluida y espécimen desnaturalizado.</p>	<p>Después de adicionar el espécimen desnaturalizado a la mezcla de la sonda, cubra la microplaca de hibridación y agite en el agitador giratorio I puesto a 1100 ± 100 rpm por 3 ± 2 minutos, como se describe en la sección <i>Procedimiento de la prueba, hibridación, etapa 3</i> de estas instrucciones de uso. Chequee por el viraje de color de púrpura a amarillo en cada pozo. Si no hay viraje de color, deberán volverse a probar los especímenes.</p>
	<p>Tiempo o temperatura incorrectos durante la etapa de hibridación.</p>	<p>Híbride por 60 ± 5 minutos a 65 ± 2° C, como se describe en la sección <i>Procedimiento de la prueba, hibridación, etapa 4</i> de estas instrucciones de uso. Chequee la temperatura del calentador de microplacas I. Asegúrese de que el calentador esté puesto para calentar los especímenes para corregir la temperatura y se precalentó por una hora antes de su uso.</p>
	<p>Mezcla inadecuada durante la etapa de captura.</p>	<p>Agite en el agitador giratorio I a 1100 ± 100 rpm por 60 ± 5 minutos a 20-25° C, como se describe en la sección <i>Procedimiento de la prueba, Hybrid Capture, etapa 4</i> de estas instrucciones de uso. Verifique la velocidad del agitador giratorio I por calibración como se resume en la sección <i>Calibración de la velocidad del agitador del Manual del operador del agitador giratorio I</i>.</p>
	<p>Falla en la adición de agregar la cantidad correcta del reactivo de detección 1.</p> <p>Falla en incubar por el tiempo especificado.</p>	<p>Pipetee 75 µL del reactivo de detección 1 en cada pozo usando una pipeta de ocho canales. Incube a 20-25° C por 30-45 minutos.</p>
	<p>Falla en la adición de agregar la cantidad correcta del reactivo de detección 2.</p> <p>Falla en incubar por el tiempo especificado.</p> <p>Mal funcionamiento o programación incorrecta del luminómetro.</p>	<p>Pipetee 75 µL del reactivo de detección 2 en cada pozo usando una pipeta de ocho canales. Incube a 20-25° C por 15 a 30 minutos.</p> <p>Remítase a las secciones de mantenimiento/servicio e identificación y resolución de problemas en la guía de usuario del software de análisis del ensayo <i>digene</i> aplicable para más instrucciones, o llame a su representante QIAGEN local.</p>
5. Valores de URL elevados en los controles manuales del ensayo y/o especímenes (≥ 150 URL en muchos o todos los pozos). El ensayo puede fallar los criterios de validación.	<p>Reactivo de desnaturalización no adicionado; o volumen incorrecto del reactivo adicionado; o mezcla inadecuada del reactivo de desnaturalización con calibradores, controles de calidad o especímenes.</p> <p>Temperatura y nivel de agua del baño maría inadecuados.</p>	<p>Verifique que la pipeta repetidora esté suministrando exactamente antes de adicionar el reactivo de desnaturalización. Las pipetas calibradas son esenciales. Agregue la mitad de volumen de reactivo de desnaturalización a cada tubo y mezcle bien. Para evitar resultados falsos positivos, asegúrese de que el líquido lave toda la superficie interna del tubo (invierta el tubo una vez si se mezcla manualmente). El calibrador, controles de calidad y especímenes deberán tomarse púrpuras después de la adición del reactivo de desnaturalización. Chequee la calibración de la velocidad del MST Vortexer.</p> <p>Chequee el nivel y temperatura del agua del baño maría.</p>

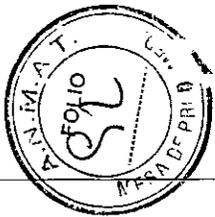
PRUEBA DE ADN <i>digene</i> HC2 GC-ID		
OBSERVACIÓN	PROBABLES CAUSAS	SOLUCIONES
Valores de URL elevados en los controles del ensayo de RCS y/o especímenes (≥ 250 URL en muchos o todos los pozos). El ensayo puede fallar los criterios de validación.	Filtración de luz en el luminómetro. El sello está roto. Puerta no sellada.	Realice una lectura de fondo (medición de los datos preliminares) del luminómetro leyendo los micropozos vacíos. Una lectura de más de 50 URL indica que puede existir una filtración de luz. Remítase a las secciones mantenimiento/servicio e identificación y resolución de problemas en la guía de usuario del software de análisis del ensayo <i>digene</i> aplicable para más instrucciones, o llame a su representante QIAGEN local.
	Contaminación del reactivo de detección 2 ó micropozos de captura por el reactivo de detección 1 o fosfatasa alcalina exógena.	Haga referencia de la <i>Verificación de la contaminación</i> en esta sección <i>Identificación y resolución de problemas</i> .
	Solución amortiguadora de lavado contaminada.	Haga referencia de la <i>Verificación de la contaminación</i> en esta sección <i>Identificación y resolución de problemas</i> .
	Lavador automatizado de placas contaminado.	Haga referencia de la <i>Verificación de la contaminación</i> en esta sección <i>Identificación y resolución de problemas</i> .
	Lavado inadecuado de micropozos de captura después de la incubación del reactivo de detección 1.	Lave los micropozos completamente con solución amortiguadora de lavado seis veces, llenando los pozos al sobreflujo cada vez o usando el lavador automatizado de placas. No deberá haber ningún líquido rosado residual visible en los pozos después del lavado. Véase la sección <i>Identificación y resolución de problemas del Manual del operador del lavador automatizado de placas</i> para instrucciones sobre pruebas para la contaminación o malos funcionamientos.
	Contaminación del reactivo de detección 1 de los micropozos.	Asegúrese de que todas las superficies de trabajo estén limpias y secas. Tenga cuidado cuando use el reactivo de detección 1. Evite aerosoles.
	Secado de la solución de hibridación en la misma área de toallas Kimtowels o toallas de papel con poca pelusa equivalentes. Uso de toallas de secado equivocadas.	No vuelva a secar en la misma área de las toallas Kimtowels o toallas de papel con poca pelusa equivalentes. Use toallas Kimtowels o toallas de papel con poca pelusa equivalentes para el secado.
6. Razones de PC/NC bajas o número alto de especímenes bajos positivos (> 20% de los especímenes totales) con una razón URL/CO < 2.0. El ensayo puede fallar los criterios de validación.	Preparación inadecuada de especímenes.	Adicione el volumen apropiado de reactivo de desnaturalización y mezcle completamente colocando en vórtice. Para evitar resultados falsos positivos, asegúrese de que el líquido lave toda la superficie interna del tubo colocando en vórtice con el método del Vortexer de tubos multiespecímenes durante por lo menos cinco segundos (para el método de vortexer manual, coloque en vórtice durante por lo menos cinco segundos e invierta el tubo una vez). Deberá verse un viraje de color distintivo de púrpura claro a oscuro. Incube por 45 ± 5 minutos a 65 ± 2° C.
	Sonda inadecuadamente mezclada o insuficiente sonda adicionada a los ensayos.	Prepare la mezcla de la sonda como se describe. Mezcle completamente colocando en vórtice, asegurándose de que se produzca un vórtice visible. Debe agregarse la mezcla de la sonda a los tubos con una pipeta multicanales o repetidora para asegurar un suministro exacto.

52

PRUEBA DE ADN <i>digene</i> HC2 GC-ID		
OBSERVACIÓN	PROBABLES CAUSAS	SOLUCIONES
	Volumen inadecuado de mezcla de la sonda adicionada a cada micropozo de hibridación.	Verifique que la pipeta de ocho canales esté suministrando exactamente antes de adicionar la mezcla de la sonda a la microplaca de hibridación. Agregue 25 µL de mezcla de la sonda a cada micropozo que contiene los calibradores, controles de calidad y especímenes clínicos desnaturalizados. El viraje de color deberá ser de púrpura oscuro a amarillo en la adición y una mezcla completa de la mezcla de la sonda.
	Pérdida de la actividad del reactivo de detección 1.	Conserve el reactivo de detección 1 a 2-8° C. Úsese antes de la fecha de caducidad en el marbete de la caja externa del kit.
	Captura insuficiente de híbridos de ARNADN.	Deberá realizarse la etapa de captura usando el agitador giratorio I puesto a 1100 ± 100 rpm. Verifique la velocidad del agitador, como se describe en la sección <i>Calibración de la velocidad del agitador del Manual del operador del agitador giratorio I</i> .
	Lavado inadecuado.	Lave los micropozos completamente con solución amortiguadora de lavado seis veces, llenando los pozos a sobreflujo cada vez o usando el lavador automatizado de placas.
	Solución amortiguadora de lavado contaminada.	Chequee la solución amortiguadora de lavado por contaminación. Pipetee 10 µL de solución amortiguadora de lavado en 75 µL del reactivo de detección 2 en un micropozo de captura blanco. Cubra e incube 15 minutos a 20-25° C. Lea el micropozo en el luminómetro. Las lecturas por encima de 150 URL indican contaminación de la solución amortiguadora de lavado. Véase la sección <i>Preparación y almacenamiento de reactivos de estas instrucciones de uso para instrucciones sobre la limpieza y mantenimiento del aparato de lavado</i> . Véase la sección <i>Identificación y resolución de problemas del Manual del operador del lavador automatizado de placas</i> para instrucciones sobre descontaminación o malos funcionamientos.
7. Series de especímenes positivos con los valores de URL aproximadamente iguales.	Contaminación de micropozos de captura durante la manipulación del ensayo.	Cubra los micropozos de captura durante todas las incubaciones. Evite exponer los micropozos a contaminación de aerosol mientras realice el ensayo. Use guantes libres de polvo durante las manipulaciones.
	Contaminación del reactivo de detección 2.	Sea cuidadoso en no contaminar el stock cuando pipetee el reactivo de detección 2 en los micropozos de captura. Evite la contaminación del reactivo de detección 2 por aerosoles del reactivo de detección 1 o del polvo de laboratorio, etc.
	Mal funcionamiento del lavador automatizado de placas.	Véase la sección <i>Identificación y resolución de problemas del Manual del operador del lavador automatizado de placas</i> para instrucciones sobre las pruebas por contaminación o malos funcionamientos.
8. CV porcentuales amplios entre duplicados.	Pipeteado inexacto (esto es, burbujas, pipeta no calibrada).	Chequee la pipeta para asegurarse de que se estén suministrando los volúmenes reproducibles. Calibre las pipetas de forma rutinaria.
	Mezcla insuficiente.	Mezcle completamente en todas las etapas. Coloque en el vórtice antes y después de la incubación de desnaturalización y después de adicionar la mezcla de la sonda. Asegúrese de que se produzca un vórtice visible.

53


 MARISOL MASINO
 BIOQUÍMICA - M.N. 9483
 DT - TECNÓLOGA .A.



3925

PRUEBA DE ADN <i>digene</i> HC2 GC-ID		
OBSERVACIÓN	PROBABLES CAUSAS	SOLUCIONES
	Transferencia incompleta de líquido de la microplaca de hibridación a los micropozos de captura.	Tenga cuidado durante la etapa de transferencia de la microplaca de hibridación a la microplaca de captura para asegurarse de que se pasan los volúmenes reproducibles.
	Condiciones de lavado inapropiadas.	Lave los micropozos completamente con solución amortiguadora de lavado seis veces, llenando los pozos a sobreflujo cada vez o usando el lavador automatizado de placas y los protocolos apropiados del lavador automatizado de placas.
	Contaminación con reactivo de detección 1 de los micropozos.	Asegúrese de que todas las superficies de trabajo estén limpias y secas. Tenga cuidado cuando use el reactivo de detección 1. Evite aerosoles.
	Secado en la misma área con toallas de Kimtowels sobre varias filas.	No vuelva a secar en la misma área de las toallas Kimtowels.
9. Resultados falsos positivos obtenidos de especímenes negativos conocidos.	Reactivo de detección 2 contaminado.	Sea cuidadoso en no contaminar de forma cruzada los especímenes cuando adicione el reactivo de detección 2 entre los especímenes. Si solamente se usa parte de un kit, divida en partes alícuotas en volumen necesario para ese ensayo en un reservorio limpio de reactivo antes de llenar la pipeta.
	Contaminación con reactivo de detección 1 de los micropozos.	Lave los micropozos completamente con solución amortiguadora de lavado seis veces, llenando a sobreflujo cada vez o usando el lavador automatizado de placas. No deberá haber líquido rosado residual visible en los micropozos después del lavado.
	Preparación inadecuada del espécimen.	Adicione el volumen apropiado del reactivo de desnaturalización y mezcle completamente colocando en vórtice. Para evitar resultados falsos positivos, asegúrese de que el líquido lave toda la superficie interna del tubo colocando en vórtice con el método de MST Vortexer durante por lo menos cinco segundos (para el método de vortexer manual, invierta el tubo una vez). Deberá verse un viraje de color distintivo de púrpura claro a oscuro. Incube por 45 ± 5 minutos a 65 ± 2° C.
	Condiciones inapropiadas de lavado.	Lave los micropozos completamente con solución amortiguadora de lavado seis veces, llenando los pozos a sobreflujo cada vez o usando el lavador automatizado de placas y los protocolos apropiados del lavador automatizado de placas.

10. Valores de URL del calibrador negativo del ensayo manual elevados (> 150 URL). El resto del ensayo se desempeña como lo esperado.	Se incubó el reactivo de detección 2 a una temperatura mayor a 20-25° C.	La prueba es inválida debido a valores del calibrador negativos altos. Vuelva a correr la prueba y asegúrese de que las etapas de captura y detección se incuben a 20-25° C.
	Se incubó el reactivo de detección 2 más de 30 minutos.	Lea la placa después de 15 minutos de incubación (y no más de 30 minutos de incubación) a 20-25° C.
	Se contaminaron el reactivo de detección 2 o la solución amortiguadora de lavado con fosfatasa alcalina o reactivo de detección 1.	Chequee el reactivo de detección 2 por contaminación pipeteando 75 µL en un pozo de microplaca de captura blanco. Incube a 20-25° C por 15 minutos y lea en el luminómetro. Las lecturas por encima de 150 URL indican contaminación del reactivo de detección 2. Tenga cuidado cuando pipetee el reactivo de detección 2. Use guantes libres de polvo y evite tocar las puntas en cualquier superficie de trabajo. Repita el procedimiento de identificación y resolución de problemas en el vial maestro del reactivo de detección 2, y si no está contaminado, repita el ensayo usando este material. Si está contaminado, obtenga una prueba de ADN <i>digene</i> HC2 GC-ID nueva y repita el ensayo. Si no está contaminado el reactivo de detección 2, verifique la solución amortiguadora de lavado por contaminación. Pipetee 10 µL de la solución amortiguadora de lavado en 75 µL del reactivo de detección 2 en un micropozo de captura blanco. Cuera e incube 15 minutos a 20-25° C. Lea el micropozo en el luminómetro. Las lecturas por encima de 150 URL indican contaminación de la solución amortiguadora de lavado. Véase la sección <i>Preparación y almacenamiento de reactivos</i> en estas instrucciones de uso para instrucciones sobre la limpieza y mantenimiento del aparato de lavado. Véase el <i>Manual del operador del lavador automatizado de placas</i> para las instrucciones sobre pruebas por contaminación o malos funcionamientos.
O Valores de URL del calibrador negativo del RCS elevados (> 250 URL). El resto del ensayo se desempeña como lo esperado.		

MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.

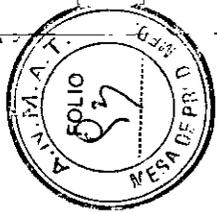
3

Verificación de la contaminación

Reactivo evaluado	Procedimiento de verificación de la contaminación	Interpretación de resultados
<p>Nota: tenga cuidado cuando pipetee el reactivo de detección 2 para evitar contaminación. Use guantes y evite tocar las puntas de pipeta sobre cualquier superficie de trabajo.</p>		
<p>Reactivo de detección 2</p>	<ul style="list-style-type: none"> Pipetee 75 µL del vial dividido en partes alícuotas, residual y/u original del reactivo de detección 2 en un micropozo de captura blanco. Incube 20-25° C por 15 minutos. Evite la luz solar directa. Lea los micropozos en el luminómetro. <p>Nota: las pruebas del reactivo de detección 2 en replicados de tres proporciona una valoración óptima del desempeño.</p>	<ul style="list-style-type: none"> El control del reactivo de detección 2 deberá ser < 50 URL. Si los valores del reactivo de detección 2 son < 50 URL, puede usarse el reactivo de detección 2 para repetir el ensayo. Si se contamina (> 50 URL), obtenga un kit nuevo y repita el ensayo.
<p>Aparato de la solución amortiguadora de lavado y/o fuente de agua</p>	<ul style="list-style-type: none"> Pipetee 75 µL del reactivo de detección 2 en tres micropozos de captura separados. Etiquete los pozos 1-4. El pozo 1 sirve como el control del reactivo de detección 2. Pipetee 10 µL de solución amortiguadora de lavado de la botella de lavado al pozo 2. Deje que fluya la solución amortiguadora de lavado a través del entubado del lavador. Pipetee 10 µL de la solución amortiguadora de lavado del entubado al pozo 3. Obtenga una parte alícuota del agua usada para preparar la solución amortiguadora de lavado. Pipetee 10 µL del agua al pozo 4. Incube 20-25° C por 15 minutos. Evite la luz solar directa. Lea los micropozos en el luminómetro. 	<ul style="list-style-type: none"> El control del reactivo de detección 2 (pozo 1) deberá ser < 50 URL. Compare el valor de URL de los pozos 2, 3 y 4 para el valor URL del control del reactivo de detección 2 (pozo 1). Los valores de URL individuales para los pozos 2, 3 y 4 no deberán exceder 50 URL del valor de URL de control del reactivo de detección 2 (pozo 1). Los valores que excedan 50 URL del control del reactivo de detección 2 indican contaminación. Véase la sección <i>Preparación y almacenamiento de reactivos</i> para instrucciones sobre la limpieza y mantenimiento del aparato de lavado.
<p>Lavador automatizado de placas</p>	<ul style="list-style-type: none"> Pipetee 75 µL del reactivo de detección 2 a cinco micropozos de captura separados. Etiquete los pozos 1-5. El pozo 1 sirve como el control del reactivo de detección 2. Pipetee 10 µL de la solución amortiguadora de lavado de la botella del lavador de placas etiquetada como <i>Wash</i> (lavado) al pozo 2. Pipetee 10 µL del líquido de enjuague de la botella del lavador de placas etiquetada como <i>Rinse</i> (enjuague) al pozo 3. Presione la tecla <i>Prime</i> (iniciar) en el teclado del lavador de placas, dejando que fluya la solución amortiguadora de lavado a través de las líneas. Pipetee 10 µL de la solución amortiguadora de lavado desde la fosa hasta el pozo 4. Presione la tecla <i>Rinse</i> (enjuagar) en el teclado del lavador de placas, dejando que fluya el líquido de enjuague a través de las líneas. Pipetee 10 µL de la solución amortiguadora de 	<ul style="list-style-type: none"> El control del reactivo de detección 2 (pozo 1) deberá ser < 50 URL. Compare el valor de URL de los pozos 2, 3, 4 y 5 con el valor URL del control del reactivo de detección 2 (pozo 1). Los valores URL individuales para los pozos 2, 3, 4 y 5 no deberán exceder 50 URL del valor URL de control del reactivo de detección 2 (pozo 1). Los valores que excedan 50 URL del control del reactivo de detección 2 indican contaminación del lavador de placas. Véase el <i>Manual del operador del lavador automatizado de placas, Procedimiento de descontaminación</i>.

	<p>lavado desde la fosa hasta el pozo 5.</p> <ul style="list-style-type: none"> Cubra e incube 15 minutos a 20-25° C. Evite la luz solar directa. Lea los micropozos en el luminómetro. 	
--	---	--

MARISOL MASINO
 BIOQUIMICA - M.N. 183
 DT - TECNOLAL A.



3925

INFORMACIÓN DE CONTACTO

Use la hoja de información de contacto de QIAGEN proporcionada con el producto para ponerse en contacto con QIAGEN Technical Services (servicios técnicos) o su representante QIAGEN local.

MARCAS REGISTRADAS Y PATENTES

QIAGEN®, *digene*®, Hybrid Capture®, Rapid Capture® (QIAGEN Group); Parafilm® (BEMIS Company, Inc.); DuraSeal® (Diversified Biotech); Eppendorf®, Repeater® (Eppendorf AG); Kimtowels® (Kimberly-Clark Corporation); CDP-Star® (Life Technologies Corporation); pGEM® (Promega Corp).

Los nombres registrados, marcas registradas, etc. usados en este documento, incluso cuando no se marquen como tales específicamente, deben considerarse protegidos por la ley.

Este producto y su método de uso están cubiertos por una o más de las siguientes patentes:

Patente de EE.UU. de Hybrid Capture
6.228.578

© 2012–2015 QIAGEN, todos los derechos reservados

MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.

Esta página se dejó intencionalmente en blanco.

Resumen de la prueba de ADN «digene® HC2 GC-ID DNA Test»

Importante: es importante estar familiarizado completamente con el procedimiento detallado antes de usar este resumen.

Procedimiento

Desnaturalización	<p>Método de vórtice manual</p> <ul style="list-style-type: none"> ▼ Cree el marbete de distribución de placas. Etiquete la placa de hibridación. Prepare el reactivo de desnaturalización. ▼ Pipetee el reactivo de desnaturalización (el volumen es equivalente a la mitad del volumen del espécimen) en calibradores, controles de calidad y especímenes. Coloque en vórtice cada calibrador, control de calidad y espécimen de forma individual por cinco segundos a alta velocidad e invierta (véase el prospecto para detalles). ▼ Verifique que todos los tubos muestren un color púrpura. ▼ Incube a 65 ± 2° C por 45 ± 5 minutos. ▼ Prepare la mezcla de sonda de GC. 	<p>Método vortexer de tubos multiespecímenes</p> <ul style="list-style-type: none"> ▼ Cree la distribución de placas. Etiquete la placa de hibridación. ▼ Prepare el reactivo de desnaturalización. ▼ Pipetee el reactivo de desnaturalización (el volumen es equivalente a la mitad del volumen de espécimen) en calibradores, controles de calidad y especímenes. ▼ Verifique que todos los tubos muestren un color púrpura. ▼ Cubra la gradilla con película y tapa. ▼ Coloque en vórtice por 10 segundos a máxima velocidad. ▼ Incube a 65 ± 2° C por 45 ± 5 minutos. ▼ Prepare la mezcla de sondas de GC.
Hibridación	<ul style="list-style-type: none"> ▼ Coloque en vórtice los calibradores, controles de calidad y especímenes desnaturalizados bien, luego pase 75 µL en la microplaca apropiada. ▼ Cubra la microplaca con una tapa para placas e incube por 10 minutos a 20-25° C. Quite la cubierta. ▼ Pipetee 25 µL de la mezcla de sondas de GC en los micropozos. ▼ Cubra la microplaca con una tapa para microplacas y agite en el agitador giratorio I a 1100 ± 100 rpm por 3 ± 2 minutos. Verifique que todos los pozos muestren un color amarillo. ▼ Incube a 65 ± 2° C por 60 ± 5 minutos. Prepare la microplaca de captura. 	
Hybrid Capture [captura híbrida]	<ul style="list-style-type: none"> ▼ Pase el contenido de cada pozo de placa de hibridación al pozo correspondiente en la microplaca de captura usando una pipeta de ocho canales. ▼ Cubra con una tapa para placas. Agite a 1100 ± 100 rpm a 20-25° C por 60 ± 5 minutos. Prepare la solución amortiguadora de lavado. ▼ Decante y seque la microplaca de captura (véase el prospecto para detalles). 	
Detección híbrida	<p>Pipetee 75 µL del reactivo de detección 1 en cada pozo de la microplaca de captura. Cubra la microplaca de captura con una tapa para placas. Incube a 20-25° C por 30-45 minutos. Lave la placa usando el método deseado.</p>	
Lavado	<p>Método manual de lavado</p> <ul style="list-style-type: none"> ▼ Decante y seque la microplaca de captura (véase el prospecto para detalles). ▼ Lave seis veces. ▼ Seque en toallas de papel de poca pelusa. 	<p>Método de lavador automatizado de placas</p> <ul style="list-style-type: none"> ▼ Coloque la placa en el lavador automatizado de placas y presione «START/STOP» (pare/inicie) para comenzar. ▼ Vaya a la siguiente etapa.
Amplificación de señales	<ul style="list-style-type: none"> ▼ Pipetee 75 µL del reactivo de detección 2 en cada pozo de la microplaca de captura. ▼ Cubra la microplaca con una tapa para placas. ▼ Incube a 20-25° C por 15-30 minutos. 	
Lectura	<ul style="list-style-type: none"> ▼ Lea la microplaca de captura en el luminómetro. ▼ Valide el ensayo e interprete los resultados del espécimen. 	

