



Hybrid Capture[®] 2

GC-ID DNA Test

Istruzioni per l'uso

Test *digene*[®] HC2 GC-ID DNA

Test di ibridazione dell'acido nucleico *in vitro* in micropiastra con amplificazione del segnale, basata sulla chemiluminescenza della micropiastra, per la rilevazione qualitativa del DNA della *Neisseria gonorrhoeae* (GC) in campioni cervicali

Da utilizzare con:

Dispositivo per il prelievo *digene*[®] HC2 DNA
Kit *digene*[®] Female Swab Specimen Collection
Soluzione PreservCyt[®] Hologic

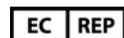
MODIFICHE CHIAVE DALLA PRECEDENTE REVISIONE DELLE ISTRUZIONI PER L'USO

1. Aggiornamento della marcatura del prodotto.
2. Eliminazione dei riferimenti e dei dati relativi alla prova di riflessione

Esclusivamente per uso professionale da parte di personale di laboratorio addestrato e riconosciuto. Leggere queste istruzioni con attenzione prima di utilizzare il test.



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



QIAGEN GmbH
QIAGEN Str. 1
D-40724 Hilden
Germany

IVD



96

REF 5140-1330

L2172IT Rev. 3

©2011 QIAGEN



Il marchio CE indica che il test *digene* HC2 GC-ID DNA è conforme ai requisiti della Direttiva 98/79/EC relativa ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*.

INDICE

NOME ED USO PREVISTO	1
SOMMARIO E SPIEGAZIONI.....	1
PRINCIPIO DELLA METODICA.....	1
REAGENTI E MATERIALI FORNITI	2
MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI.....	3
PRECAUZIONI E AVVERTENZE	4
PRECAUZIONI DI SICUREZZA	4
INFORMAZIONI SULLA SICUREZZA E I RISCHI PER LA SALUTE	5
PRECAUZIONI D'USO	5
PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI.....	6
PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE.....	9
CAMPIONI CERVICALI IN STM.....	9
CAMPIONI CERVICALI IN SOLUZIONE PRESERVCYT HOLOGIC	9
METODICA DEL TEST.....	10
ANALISI DI GROSSI VOLUMI DI CAMPIONI CON IL SISTEMA RAPID CAPTURE	10
METODICA MANUALE.....	10
DENATURAZIONE	11
Procedura Per La Preparazione Di Calibratori, Controlli Di Qualità E Campioni STM	11
Procedura Per La Preparazione Dei Campioni In Soluzione PreservCyt.....	13
Interruzione Facoltativa.....	16
IBRIDAZIONE.....	16
CATTURA DEGLI IBRIDI.....	17
RILEVAZIONE DEGLI IBRIDI.....	18
LAVAGGIO	18
Metodica Del Lavatore Automatico Di Micropiastre	18
Metodica Di Lavaggio Manuale.....	19
AMPLIFICAZIONE DEL SEGNALE	20
CRITERI DI VERIFICA DELLA CALIBRAZIONE DEL TEST	20
CALCOLO DEL VALORE SOGLIA.....	22
CONTROLLO DI QUALITÀ.....	22
INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEI CAMPIONI.....	23
LIMITI DELLA METODICA.....	23
RISULTATI PREVISTI	24
PREVALENZA	24
VALORI PREDITTIVI POSITIVO E NEGATIVO	24
DISTRIBUZIONE DELLA FREQUENZA: RISULTATI RLU/CO DEL TEST <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA.....	25
CARATTERISTICHE	25
RISULTATI DELLO STUDIO CLINICO PER CAMPIONE	25
RIPRODUCIBILITÀ.....	29
PRECISIONE.....	30
Precisione Con Campioni PreservCyt.....	31
SENSIBILITÀ ANALITICA.....	33
Considerazioni Aggiuntive Per I Campioni In Soluzione PreservCyt.....	34
SPECIFICITÀ ANALITICA	36
OMOLOGIA DELLE SONDE AL PLASMIDE TOTALE E IL DNA GENOMICO	38
EFFETTO DEL SANGUE E DI ALTRE SOSTANZE SUI CAMPIONI IN STM	39
EFFETTO DEL SANGUE E DI ALTRE SOSTANZE SUI CAMPIONI IN PRESERVCYT	39
PRECISIONE AL VALORE SOGLIA DEL TEST <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA CON CAMPIONI CLINICI PRELEVATI IN STM	40
CENNI STORICI	41
EQUIVALENZA TRA CAMPIONI IN STM E SOLUZIONE PRESERVCYT	41
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	42
GUIDA ALLA INDIVIDUAZIONE E CORREZIONE DEGLI ERRORI.....	43

CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE.....	48
INFORMAZIONI PER COMUNICARE CON QIAGEN	49
RIEPILOGO DEL TEST <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA	50

NOME ED USO PREVISTO

Il test *digene*[®] Hybrid Capture[®] 2 (HC2) GC-ID DNA è un'analisi d'ibridazione *in vitro* dell'acido nucleico ad amplificazione del segnale in micropiastra, che sfrutta la chemiluminescenza per il rilevamento qualitativo del DNA della *Neisseria gonorrhoeae* nei campioni cervicali prelevati con il dispositivo per il prelievo *digene* HC2 DNA [formato da spazzolino per tampone cervicale e dal *digene* Specimen Transport Medium (STM, ovvero mezzo di trasporto del campione)] e nei campioni cervicali prelevati con il kit *digene* Female Swab Specimen Collection (tampone e STM) o nei campioni prelevati usando un dispositivo di prelievo del tipo a spazzolino e inseriti nella soluzione PreservCyt[®] Hologic. Il test *digene* HC2 GC-ID DNA è indicato come procedura diagnostica per l'infezione da *Neisseria gonorrhoeae* nelle pazienti sintomatiche o asintomatiche.

Per l'analisi di grossi volumi di campioni, è possibile effettuare il test *digene* HC2 GC-ID DNA con il RCS (Rapid Capture[®] System).

Per uso diagnostico *in vitro* IVD

SOMMARIO E SPIEGAZIONI

Quelli della *Neisseria gonorrhoeae* sono diplococchi Gram negativi non mobili con esigenze di crescita piuttosto complesse. Si tratta di batteri aerobici con una crescita ottimale a temperature comprese tra i 35 e i 37 °C in presenza di CO₂ al 3-7% e di umidità relativa al ≥70%. La diagnosi presunta di *Neisseria gonorrhoeae* si ottiene tradizionalmente isolando gli organismi da colture di campioni clinici ed impiegando una colorazione di Gram per l'analisi morfologica. La diagnosi definitiva si può ottenere con la positività al test dell'ossidasi e/o catalasi della coltura. Per l'ulteriore conferma dei risultati è possibile eseguire le analisi della degradazione dei carboidrati, dell'agglutinazione e della fermentazione degli zuccheri. Analisi dirette e più definitive per la *Neisseria gonorrhoeae* comprendono il test di rilevamento degli antigeni e della sonda di acido nucleico. La tecnica di dosaggio immunoenzimatico ELISA si è dimostrata altrettanto sensibile e specifica quanto la colorazione di Gram nel rilevamento dei gonococchi nei campioni uretrali ed urinari di primo getto nei maschi ma ha dimostrato una ridotta sensibilità se applicata ai campioni endocervicali.^{1,2} Poiché è possibile che il test di rilevamento dell'antigene interagisca con la *Neisseria* commensale e specie analoghe³, impiegare questo test esclusivamente per la diagnosi presunta.³

Più di recente, i test d'ibridazione dell'acido nucleico sono stati impiegati per l'analisi dei campioni clinici per il rilevamento della *Neisseria gonorrhoeae* nelle popolazioni ad alto rischio usando sia campioni uretrali dei maschi che endocervicali.

PRINCIPIO DELLA METODICA

Il test *digene* HC2 GC-ID DNA basato sulla tecnologia *digene* Hybrid Capture 2 è un test d'ibridazione dell'acido nucleico ad amplificazione del segnale in micropiastra che impiega la rilevazione chemiluminescente. I campioni contenenti il DNA bersaglio si ibridano con una sonda specifica dell'RNA del GC. Gli ibridi RNA/DNA risultanti vengono catturati sulla superficie di una micropiastra rivestita di anticorpi specifici per tali ibridi. Gli ibridi immobilizzati vengono quindi fatti reagire con anticorpi coniugati con fosfatasi alcalina specifici per gli ibridi RNA/DNA, successivamente rilevati mediante un substrato chemiluminescente. Ad ogni anticorpo sono coniugate varie molecole di fosfatasi alcalina. Più anticorpi coniugati si legano ad ogni ibrido catturato, dando luogo ad una sostanziale amplificazione del segnale. Poiché il substrato viene scisso dalla fosfatasi alcalina legata, si verifica l'emissione di luce, misurata da un luminometro e quantificata in unità relative di luce (RLU). L'intensità della luce emessa denota la presenza o l'assenza di DNA bersaglio nel campione.

Una misurazione di unità relative di luce equivalente o superiore ad un rapporto specifico con il valore soglia positivo indica la presenza di DNA di GC nel campione. Una misurazione di unità relative di luce inferiore ad un rapporto specifico con il valore soglia positivo indica l'assenza di DNA di GC o concentrazioni di DNA di GC inferiori al limite di rilevamento del test.

La sonda per GC contiene una miscela di sonde scelte appositamente per eliminare o minimizzare la reattività crociata con le sequenze di DNA di cellule umane, altre specie batteriche, oppure specie di *Neisseria* diverse dalla *Neisseria gonorrhoeae*. La sonda per GC fornita con il test *digene* HC2 GC-ID DNA è complementare a circa 9.700 bp o 0,5% del DNA genomico della *Neisseria gonorrhoeae* (1,9 x 10⁶ bp).⁴ Una sonda è complementare al 100% del plasmide criptico di 4.200 bp.

Le analisi di grossi volumi di campioni con il test *digene* HC2 GC-ID DNA possono essere effettuate usando un sistema di pipettamento e diluizione automatica denominato sistema Rapid Capture (RCS). Questo strumento, con l'impiego di un'applicazione specifica per il test *digene* HC2 GC-ID DNA, è in grado di analizzare fino a 352 campioni in otto ore. Per consentire l'analisi di grossi volumi di campioni, tutte le fasi procedurali del test vengono effettuate dal sistema Rapid Capture, ad eccezione della denaturazione del campione, del rilevamento del segnale di chemiluminescenza e della refertazione dei risultati.

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

Un singolo kit per test *digene* HC2 GC-ID DNA (REF 5140-1330) contiene 96 test. Il numero di risultati pazienti varia a seconda del numero di utilizzi per kit:

1 utilizzo = 88 risultati pazienti

2 utilizzi = 80 risultati pazienti

3 utilizzi = 72 risultati pazienti

4 utilizzi = 64 risultati pazienti

Colorante indicatore [INDIC] Contiene 0,05% p/v di sodio azide.	1 x 0,35 ml
Reagente di denaturazione* [REAG] [DENAT] Soluzione diluita con idrossido di sodio (NaOH).	1 x 50 ml
Diluente per sonda* [DIL] [PROBE] Soluzione tamponata con 0,05% p/v di sodio azide.	1 x 5 ml
Sonda per GC [PROBE] [GC] Sonda GC-RNA in soluzione tamponata.	1 x 200 µl
Calibratore negativo [CAL] [-] DNA vettore in Specimen Transport Medium (STM) con 0,05% p/v di sodio azide.	1 x 2 ml
Calibratore positivo GC (PC) [CAL] [GC] [+] 1,0 pg/ml di GC-DNA clonato e DNA vettore in STM con 0,05% p/v di sodio azide.	1 x 1 ml
Controllo di qualità CT (QC CT) [QC] [CT] 5,0 pg/ml di CT-DNA clonato e DNA vettore in STM con 0,05% p/v di sodio azide.	1 x 1 ml
Controllo di qualità GC (QC GC) [QC] [GC] 5,0 pg/ml di GC-DNA clonato e DNA vettore in STM con 0,05% p/v di sodio azide.	1 x 1 ml
Micropiastra di cattura [PLATE] [CAPTURE] Rivestita con anticorpi anti-ibridi RNA/DNA policlonali di capra.	1 ciascuna
Reagente di rilevazione 1 [REAG] [DET] [1] Anticorpi anti-ibridi RNA/DNA coniugati con fosfatasi alcalina in soluzione tamponata con 0,05% p/v di sodio azide.	1 x 12 ml
Reagente di rilevazione 2 [REAG] [DET] [2] CDP-Star [®] con Emerald II (substrato chemiluminescente).	1 x 12 ml
Tampone di lavaggio concentrato* [BUF] [WASH] [X 30] Contiene 1,5% p/v di sodio azide.	1 x 100 ml

*Consultare la sezione *Precauzioni e avvertenze* delle presenti istruzioni per l'uso per informazioni sulla salute e sulla sicurezza.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Attrezzatura diagnostica *in vitro* con sistema Hybrid Capture (HC) e accessori^A

Sistema <i>digene</i> Hybrid Capture 2 ("sistema <i>digene</i> HC2"), costituito da un luminometro approvato da QIAGEN- ("luminometro"), da un PC e relative periferiche approvati da QIAGEN (monitor, tastiera, mouse, stampante e cavo stampante), dal software del sistema <i>digene</i> HC2 ("software di analisi del test <i>digene</i> "), dai protocolli del test del sistema <i>digene</i> HC2 per CT/GC, dal software per piastre LumiCheck e dal <i>Manuale d'Uso del Software del Sistema digene HC2</i>	Sistema Rapid Capture (facoltativo per analisi di grossi volumi di campioni) ^E
Agitatore rotante I per sistema Hybrid Capture	Apparato di lavaggio
Riscaldatore di micropiastre I per sistema Hybrid Capture	Micropiastre di ibridazione
Lavatore automatico di micropiastre per sistema Hybrid Capture	Coperchi per micropiastra
Vortexer per provette multicampione (MST) per sistema Hybrid Capture 2 (facoltativo) ^B	Strisce per micropiastra vuote (reperibili da Costar, modello n. 2581); facoltative, da utilizzare con il Lavatore automatico di micropiastre
Portaprovette di conversione e coperchio (facoltativo per l'uso manuale; necessario quando si utilizza il sistema Rapid Capture con il test <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA e campioni di PreservCyt)	Puntali extra lunghi per pipette per la rimozione del campione
Portaprovette per campioni e coperchio per portaprovette <i>digene</i> (facoltativo per l'uso manuale; necessario quando si utilizza il sistema Rapid Capture con il test <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA e campioni <i>digene</i> HC2 prelevati con il dispositivo per il prelievo <i>digene</i> HC2 DNA)	Provette per il prelievo dei campioni
Pipettatore EXPAND-4 e supporto (facoltativo) ^C	Portaprovette di prelievo campioni
Dispositivo per il prelievo <i>digene</i> HC2 DNA ^D	Tappi a vite per le provette di prelievo dei campioni
Kit <i>digene</i> Female Swab Specimen Collection (costituito da 2 tamponi e dal <i>digene</i> Specimen Transport Medium) ^D	Contenitori monouso per reagenti
Dispenser di pellicola per sigillare e taglierina (facoltativi, utilizzati con il Vortexer MST 2)	Pellicola per sigillare DuraSeal [®]

Attrezzature ed accessori per uso generico di laboratorio

Bagno d'acqua a 65 ± 2 °C di dimensioni sufficienti per contenere un portaprovette di conversione (36 x 21 x 9 cm) o due portaprovette per campioni *digene* (ciascuno di 31,7 x 15,2 x 6,4 cm)

Microcentrifuga (facoltativa, per la centrifugazione dei flaconi della sonda in modo da ottenere il volume massimo)

Miscelatore Vortex con coppetta

Micropipettatore a canale singolo; impostazioni variabili per volumi di 20–200 µl e 200-1000 µl

Pipettatore a ripetizione a dispensazione positiva, ad esempio Eppendorf Repeater[®] o pipettatore equivalente

Pipettatore a 8 canali: impostazioni variabili per volumi 25-200 µl

Contaminuti

Soluzione di ipoclorito di sodio, concentrazione finale 0,5% (di normale candeggina)

Pellicola Parafilm[®] o equivalente

Puntali monouso con barriera di contenimento dell'aerosol per pipettatore a canale singolo (da 20 a 200 µl e da 200 a 1000 µl)

Puntali monouso per pipettatore Eppendorf Repeater[®] (25 e 500 µl)

Puntali monouso per pipettatore a 8 canali (da 25 a 200 µl)

Salviettine Kimtowels[®] o equivalenti salviettine di carta a basso rilascio di fibre

Copertura monouso per il banco

Guanti privi di polveri

Provette in polipropilene con il fondo tondo e tappi a pressione da 5 ml e/o 15 ml (per la diluizione delle sonde)

Provette per microcentrifuga in polipropilene da 2,0 ml con tappi

Attrezzature e accessori aggiuntive per l'elaborazione dei campioni nella soluzione PreservCyt

Centrifuga con secchio oscillante, in grado di raggiungere 2900 ± 150 x g e di contenere provette per centrifuga in polipropilene a fondo conico da 10 ml o da 15 ml

Pipette sierologiche o pipette per il trasferimento da 5 ml Kit *digene* HC2 di conversione del campione^A

Puntali monouso per pipettatore Eppendorf Repeater (50 e 100 µl)

Per la procedura per l'agitazione manuale:

Provette *digene* HC2 di conversione del campione (15 ml a fondo conico)^F, provette a fondo conico Sarstedt[®] da 10 ml con tappi o provette da centrifuga in polipropilene a fondo conico da 15 ml di marca VWR[®] o Corning[®] con tappi

Portaprovette per provette a fondo conico da 10 ml o 15 ml

Per la procedura per Vortexer per provette multicampione 2

Provette *digene* HC2 di conversione del campione (15 ml a fondo conico)^F

Vortexer per provette multicampione (MST) 2

Portaprovette di conversione e coperchio (specifico per provette a fondo conico da 15 ml)

Dispenser di pellicola per sigillare e taglierina

Pellicola per sigillare DuraSeal (utilizzata con Vortexer MST 2)

^A QIAGEN fornisce solo attrezzature ed accessori approvati per l'uso con i test *digene* HC2CT/GC DNA.

^B Necessario anche per eseguire l'applicazione semiautomatica del sistema Rapid Capture.

^C Elemento personalizzato. È possibile utilizzare altre pipette multicanale espandibili, purché sia possibile ottenere uno spazio di 3,2 cm fra i puntali dopo l'espansione. In alternativa si può utilizzare una pipetta a canale singolo in grado di aspirare 75 µl.

^D Le caratteristiche del test *digene* HC2 GC-ID DNA sono state stabilite solo con i due kit da prelievo indicati.

^E Consultare il *Manuale d'uso del sistema Rapid Capture*, per istruzioni specifiche sull'impiego di quel sistema per analisi di grossi volumi di campioni con questo test.

^F Le provette *digene* HC2 di conversione del campione (marca VWR o Corning[®]) disponibili dalla QIAGEN devono essere utilizzate per assicurare prestazioni dei dosaggi corrette, quando si utilizza la procedura per Vortexer per provette multicampione 2.

PRECAUZIONI E AVVERTENZE

LEGGERE TUTTE LE ISTRUZIONI CON ATTENZIONE PRIMA DI UTILIZZARE IL TEST.

PRECAUZIONI DI SICUREZZA

TUTTI I CAMPIONI devono essere considerati come potenzialmente infettivi. Nessuna metodica di test nota è in grado di garantire con certezza che i campioni non possano trasmettere l'infezione. Si raccomanda di manipolare i campioni umani in conformità alle pratiche di biosicurezza nazionali e/locali.^{5,6,7,8} Impiegare queste pratiche di biosicurezza con i materiali che contengono o potrebbero contenere agenti infettivi. Fra le precauzioni da adottare, figurano le seguenti.

1. Non pipettare con la bocca.
2. Non fumare, mangiare o bere in aree in cui si utilizzano campioni o reagenti.
3. Indossare guanti monouso privi di polveri quando si utilizzano i campioni o reagenti. Lavarsi bene le mani dopo avere eseguito il test.
4. Pulire e disinfettare le superfici venute a contatto diretto con i campioni, utilizzando un disinfettante tubercolicida, ad esempio ipoclorito di sodio allo 0,5% o altro disinfettante adatto.^{9,10}
5. Decontaminare ed eliminare tutti i campioni, reagenti ed altro materiale potenzialmente contaminato in conformità alle normative nazionali e locali.^{11,12}

Alcuni reagenti contengono sodio azide. È stato segnalato che la sodio azide si combina con il piombo o il rame delle tubature dei laboratori. Queste azidi potrebbero esplodere con la percussione, ad esempio colpi di martello. Per evitare la formazione di azidi di rame o piombo, sciacquare gli scarichi abbondantemente con acqua, dopo avere versato soluzioni contenenti sodio azide. Per decontaminare vecchi scarichi in cui si sospetta l'accumulo di azidi, il National Institute for Occupational Safety and Health consiglia quanto segue: (1) travasare i liquidi dal sifone, utilizzando un tubo di gomma o di plastica, (2) riempirlo con una soluzione di idrossido di sodio al 10%, (3) lasciare riposare per 16 ore, quindi (4) risciacquare bene con acqua.

INFORMAZIONI SULLA SICUREZZA E I RISCHI PER LA SALUTE

I materiali sotto indicati sono stati esaminati in conformità con i requisiti delle direttive 2001/59/CE e 99/45/CE.



T

Tampone di lavaggio concentrato. Contiene sodio azide: tossico (T)

R25: Tossico in caso d'ingestione.

R52/53: Nocivo per gli organismi acquatici, può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico.

S36/37/39: Usare indumenti protettivi, guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S45: In caso di incidente o di malessere, consultare immediatamente un medico (se possibile, mostrare l'etichetta).



C

Reagente di denaturazione. Contiene idrossido di sodio: corrosivo (C)

R35: Provoca gravi ustioni.

S26: In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare uno specialista.

S36/37/39: Usare indumenti protettivi, guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S45: In caso di incidente o di malessere, consultare immediatamente un medico (se possibile, mostrare l'etichetta).



Xi

Diluyente per sonda. Contiene BES e acido acetico: irritante (Xi)

R36/38: Irritante per gli occhi e la pelle.

S26: In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare uno specialista.

S36/37/39: Usare indumenti protettivi, guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

INFORMAZIONI D'EMERGENZA 24 ORE SU 24

INFORMAZIONI MEDICHE D'EMERGENZA IN LINGUA INGLESE, FRANCESE E TEDESCA SONO DISPONIBILI 24 ORE SU 24 CONTATTANDO:

CENTRO VELENI DI MAGONZA, GERMANIA

TEL: +49-6131-19240

Consultare il *Manuale d'uso del sistema Rapid Capture* per ulteriori Avvertenze e Precauzioni specifiche, per l'impiego del sistema per analisi di grossi volumi di campioni con questo test.

PRECAUZIONI D'USO

1. Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.
2. Usare lo spazzolino per tampone cervicale solo su donne che non siano in gravidanza.
3. Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza, indicata accanto al simbolo  sull'etichetta della confezione esterna.
4. L'esecuzione del test al di fuori degli intervalli di tempo e temperatura indicati può dare luogo a risultati non validi. I test che non rientrano negli intervalli di tempo e temperatura stabiliti non sono validi ed è necessario ripeterli.

5. Per ottenere risultati affidabili, attenersi scrupolosamente alla procedura del test *digene* HC2 GC-ID DNA, ai criteri di verifica della calibrazione del test, al controllo di qualità e ai criteri di interpretazione dei risultati dei campioni.
6. È importante pipettare esattamente il volume di reagente indicato e miscelare bene dopo l'aggiunta di ogni reagente. In caso contrario, il risultato del test potrebbe non essere corretto. Verificando se avvengono i cambiamenti di colore descritti, si avrà la conferma che le condizioni sopra indicate sono state soddisfatte.
7. Questi componenti sono stati sottoposti a test come insieme. **Non** sostituirli con componenti provenienti da fonti o lotti diversi.
8. Gli acidi nucleici sono molto sensibili alla degradazione ambientale delle nucleasi. Le nucleasi sono presenti sulla pelle umana e su superfici o materiali utilizzati dalle persone. Pulire e coprire le superfici di lavoro con un copribanco monouso **ed indossare guanti privi di polveri durante tutte le fasi del test.**
9. Durante l'esecuzione del test, prestare attenzione per evitare la contaminazione della micropiastra di cattura e del reagente di rilevazione 2 da parte di fosfatasi alcalina esogena. Fra le sostanze che potrebbero contenere fosfatasi alcalina ci sono il reagente di rilevazione 1, batteri, saliva, capelli e sostanze oleose della pelle. **È particolarmente importante coprire la micropiastra di cattura dopo la fase di lavaggio e durante l'incubazione con il reagente di rilevazione 2, in quanto la fosfatasi alcalina esogena potrebbe reagire con il reagente di rilevazione 2, dando luogo a falsi positivi.**
10. Proteggere il reagente di rilevazione 2 da lunghe esposizioni alla luce diretta. Impiegare il reagente entro il lasso di tempo indicato immediatamente dopo la preparazione dei dosaggi ed evitare la luce solare diretta.
11. Il pipettatore a ripetizione deve essere riempito prima di procedere all'erogazione del reagente; è inoltre opportuno eseguire periodicamente un controllo della presenza di grosse bolle d'aria. Quantità eccessive di grosse bolle d'aria contenute nel puntale del pipettatore a ripetizione possono causare un'erogazione imprecisa e devono essere evitate riempiendo il pipettatore, dispensando tutto il liquido e riempiendolo nuovamente. Consultare il manuale di istruzioni del pipettatore per istruzioni d'uso specifiche.
12. I pipettatori multicanale devono essere utilizzati con una tecnica di aspirazione inversa (*vedere Rilevazione degli ibridi*) per l'erogazione dei reagenti di rilevazione 1 e 2. Controllare il puntale di ogni pipetta del pipettatore multicanale per verificare che sia fissato e riempito correttamente.
13. Prestare attenzione, durante il lavaggio per assicurare che ciascun micropozzetto sia lavato accuratamente, come indicato nelle istruzioni per il lavaggio manuale. Un lavaggio inadeguato provoca un aumento del rumore di fondo e può dare luogo a falsi positivi. La presenza di residui di tampone di lavaggio nei pozzetti può provocare una riduzione del segnale o una scarsa riproducibilità.
14. Dopo l'avvio, attendere almeno 60 minuti perché il riscaldatore di micropiastre I si equilibri a $65\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Se non si rispetta il periodo di riscaldamento la micropiastra di ibridazione potrebbe fondersi. Per ulteriori informazioni, vedere il Manuale d'uso del riscaldatore di micropiastre I.

PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

1. Al ricevimento, conservare il kit a $2-8\text{ °C}$. Il tampone di lavaggio concentrato, il reagente di denaturazione e l'indicatore possono essere conservati a $2-30\text{ °C}$.
2. Non utilizzare dopo la data di scadenza, indicata accanto al simbolo  sull'etichetta della confezione esterna, o la data di scadenza dei reagenti preparati (vedere di seguito).
3. Tutti i reagenti forniti sono pronti per l'uso, ad eccezione del reagente di denaturazione, della miscela per la sonda GC e del tampone di lavaggio.

Consultare il *Manuale d'uso del sistema Rapid Capture*, per la preparazione della miscela della sonda per GC, del tampone di lavaggio, dei reagenti di rilevazione 1 e 2, perché queste istruzioni sono specifiche per l'impiego di quel sistema per l'analisi di grossi volumi di campioni.

Metodica di preparazione del reagente

<p>Reagente di denaturazione</p>	<p>PREPARARLO PRIMA Aggiungere 5 gocce di indicatore nel flacone del reagente di denaturazione e miscelare bene. Il reagente di denaturazione deve presentarsi di un colore viola scuro uniforme.</p> <p>Una volta preparato, il reagente di denaturazione resta stabile per tre mesi se conservato a 2–8 °C. Apporvi un'etichetta con la nuova data di scadenza. Se il colore si attenua, aggiungere altre 3 gocce di indicatore e miscelare bene prima dell'uso.</p> <p>Avvertenza: il reagente di denaturazione è corrosivo. Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia. Manipolare con cautela.</p>																				
<p>Miscela sonde del GC (preparata con sonda GC e reagenti del diluente della sonda)</p>	<p>PREPARARLA DURANTE L'INCUBAZIONE PER LA DENATURAZIONE DEL CAMPIONE:</p> <p>IMPORTANTE: A VOLTE RIMANE DELLA SONDA NEL TAPPO DEL FLACONE.</p> <p>Nota: prestare estrema attenzione, in questa fase, per evitare la contaminazione della sonda e della miscela da parte delle ribonucleasi. Per pipettare la sonda, servirsi di pipette con puntali dotati di barriera di contenimento dell'aerosol. Il diluente della sonda è denso. Prestare estrema attenzione per ottenere una miscelazione completa quando si preparano le sonde per GC. Durante la fase di miscelazione deve formarsi un vortice nel liquido. Una miscelazione incompleta può dare luogo a una riduzione del segnale.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrifugare brevemente il flacone di sonda per GC per portare il liquido sul fondo del flacone. Picchiare delicatamente la provetta per miscelare. • Determinare la quantità di miscela della sonda necessaria (25 µl/test). Si raccomanda di preparare le miscele delle sonde in quantità eccedente, in modo da tenere conto del volume che potrebbe andare perso nei puntali delle pipette o sui lati del flacone. Vedere i volumi consigliati elencati di seguito. Il numero minimo di pozzetti raccomandato per ogni utilizzo è 24. Se si desidera utilizzare meno di 24 pozzetti per ogni test, il numero totale dei test per ogni kit potrebbe ridursi a causa di volumi limitati della sonda e del diluente della sonda. • Trasferire la quantità necessaria di diluente della sonda in un nuovo contenitore monouso. A seconda del numero di test, è consigliabile utilizzare una provetta in polipropilene a fondo tondo da 5 ml o 15 ml con tappo a pressione. Per preparare la miscela effettuare una diluizione di 1:25 della sonda per GC utilizzando l'apposito diluente. <table border="1" data-bbox="552 1176 1266 1396"> <thead> <tr> <th rowspan="2">N° di test/strisce</th> <th colspan="2">Volume del diluente</th> </tr> <tr> <th>della sonda*</th> <th>Volume sonda*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>96/12</td> <td>4,0 ml</td> <td>160,0 µl</td> </tr> <tr> <td>72/9</td> <td>3,0 ml</td> <td>120,0 µl</td> </tr> <tr> <td>48/6</td> <td>2,0 ml</td> <td>80,0 µl</td> </tr> <tr> <td>24/3</td> <td>1,0 ml</td> <td>40,0 µl</td> </tr> <tr> <td>Per pozzetto</td> <td>0,045 ml</td> <td>1,8 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Questi valori comprendono il volume eccedente consigliato.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pipettare la sonda nello specifico diluente posizionando il puntale della pipetta contro la parete interna della provetta esattamente al di sopra del menisco ed espellendone il contenuto. Non immergere il puntale nel diluente della sonda. • Agitare per almeno 5 secondi alla velocità massima, per ottenere una miscelazione completa. Deve formarsi un vortice visibile. Etichettare come "Miscela della sonda GC" e conservare in un contenitore ben sigillato finché non si è pronti all'uso. La miscela di sonde non utilizzata deve essere gettata. 	N° di test/strisce	Volume del diluente		della sonda*	Volume 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	Per pozzetto	0,045 ml	1,8 µl
N° di test/strisce	Volume del diluente																				
	della sonda*	Volume 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																			
Per pozzetto	0,045 ml	1,8 µl																			

Tampone di lavaggio	<p>PREPARARLO DURANTE LA FASE DI CATTURA: Per il Lavatore automatico di micropiastre, il tampone di lavaggio può essere preparato come descritto di seguito e conservato in un contenitore chiuso oppure è possibile prepararne un litro per volta e riporlo negli appositi contenitori. Per i volumi di miscelazione consultare la tabella seguente.</p> <p>Vedere il manuale di funzionamento e manutenzione del Lavatore automatico di micropiastre per ulteriori istruzioni relative alla cura e alla manutenzione.</p> <p>Avvertenza: il tampone di lavaggio concentrato è tossico per ingestione. Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/il viso. Per minimizzare l'esposizione, in fase di preparazione, aggiungere dell'acqua al tampone di lavaggio concentrato.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Quantità di tampone di lavaggio concentrato</th> <th>Quantità di acqua distillata o deionizzata</th> <th>Volume finale di tampone di lavaggio</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: è molto importante lasciare sempre acceso il Lavatore automatico di micropiastre. Ciò consente di effettuare il lavaggio di manutenzione dopo otto ore di inutilizzo.</p> <p>Prima di ogni test, verificare che il contenitore di scarico del Lavatore automatico di micropiastre sia vuoto e che quello per l'acqua sia pieno di acqua distillata o deionizzata.</p> <p>Vedere il manuale d'uso del Lavatore automatico di micropiastre per ulteriori istruzioni relative alla cura e alla manutenzione.</p> <p>Per la metodica di lavaggio manuale della piastra</p> <ul style="list-style-type: none"> Miscelare bene il tampone di lavaggio concentrato. Diluire 100 ml di tampone di lavaggio concentrato con 2,9 l di acqua distillata o deionizzata e miscelare bene (il volume finale deve essere di 3 l). Chiudere il contenitore per evitare la contaminazione o l'evaporazione. <p>Dopo la preparazione, il tampone di lavaggio è stabile per 3 mesi se conservato a 2–30 °C. Apporvi un'etichetta con la nuova data di scadenza. Se il tampone di lavaggio è stato refrigerato, riequilibrarlo a 20 - 25 °C prima di utilizzarlo.</p> <p>Si consiglia di pulire ogni tre mesi il sistema di lavaggio e le tubature con ipoclorito di sodio allo 0,5%, risciacquando bene con acqua distillata o deionizzata, per evitare la possibile contaminazione da parte della fosfatasi alcalina presente nei batteri e nelle muffe.</p>	Quantità di tampone di lavaggio concentrato	Quantità di acqua distillata o deionizzata	Volume finale di tampone di lavaggio	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
	Quantità di tampone di lavaggio concentrato	Quantità di acqua distillata o deionizzata	Volume finale di tampone di lavaggio										
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											

Volumi dei reagenti pronti all'uso

Reagenti di rilevazione 1 e 2	<p>IMMEDIATAMENTE PRIMA DELL'USO</p> <p>Miscelare bene i reagenti, quindi <u>misurare</u> con precisione il volume corretto di reagente di rilevazione 1 o 2 in un contenitore pulito seguendo le linee guida riportate di seguito. Per evitare la contaminazione, questi reagenti NON DEVONO essere nuovamente versati nei flaconi originali: gettare il materiale non utilizzato dopo l'uso. Se non si utilizza un pipettatore a 8 canali, sostituirlo con un pipettatore a ripetizione adatto. In questo caso, è opportuno effettuare i dosaggi del reagente in una provetta di polipropilene di dimensioni sufficienti a contenere il volume necessario, secondo quanto indicato di seguito.</p>											
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>N° di test/strisce</th> <th>Volume Reagente di rilevazione 1 o 2 contenuto del flacone</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>96/12</td> <td>7,0 ml</td> </tr> <tr> <td>72/9</td> <td>5,0 ml</td> </tr> <tr> <td>48/6</td> <td>3,0 ml</td> </tr> <tr> <td>24/3</td> <td>0,125 ml</td> </tr> <tr> <td>1 test</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	N° di test/strisce	Volume Reagente di rilevazione 1 o 2 contenuto del flacone	96/12	7,0 ml	72/9	5,0 ml	48/6	3,0 ml	24/3	0,125 ml	1 test
N° di test/strisce	Volume Reagente di rilevazione 1 o 2 contenuto del flacone											
96/12	7,0 ml											
72/9	5,0 ml											
48/6	3,0 ml											
24/3	0,125 ml											
1 test												

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

I campioni cervicali prelevati e trasportati con il dispositivo per il prelievo *digene* HC2 DNA (formato da spazzolino per tampone cervicale e dal *digene* Specimen Transport Medium) e con il kit *digene* Female Swab Specimen Collection (tampone e *digene* Specimen Transport Medium) o campioni prelevati usando un dispositivo di prelievo del tipo a spazzolino e inseriti nella soluzione PreservCyt® Hologic sono gli unici campioni raccomandati per l'impiego con il test *digene* HC2 GC-ID DNA. Campioni prelevati con dispositivi di campionamento o trasportati con mezzi diversi da quelli citati non sono adatti all'uso con questo test. Le caratteristiche di questo kit sono state accertate solo con i kit di prelievo indicati. I campioni cervicali devono essere prelevati prima dell'applicazione di acido acetico o iodio, se dovrà essere effettuato un esame colposcopico. Vedere le istruzioni per l'uso del dispositivo per il prelievo *digene* HC2 DNA per le procedure aggiuntive di prelievo e gestione dei campioni.

CAMPIONI CERVICALI IN STM

È possibile conservare i campioni STM a temperatura ambiente per un massimo di due settimane e spedirli al laboratorio di analisi senza eseguirne la refrigerazione. I campioni devono essere spediti in un contenitore isolato con un servizio di consegna entro 24 o 48 ore. Una volta giunti presso il laboratorio di analisi, se si prevede che il test venga effettuato entro una settimana, conservare i campioni a 2–8 °C. Se non si prevede di effettuare il test entro una settimana, conservare i campioni a -20 °C per un massimo di 3 mesi. Il *digene* Specimen Transport Medium contiene un conservante che ritarda la crescita batterica e contribuisce a preservare l'integrità del DNA. La sua funzione **non** è quella di preservare la vitalità di organismi o cellule. I campioni prelevati nel *digene* Specimen Transport Medium non possono essere impiegati per la coltura o per altre metodiche di analisi.

La stabilità dei campioni STM per 2 settimane a temperatura ambiente, più un'altra settimana a 2-8 °C, si basa sull'analisi in sede di 90 campioni clinici simulati. Di questi 90 campioni, 40 contenevano basse concentrazioni dell'organismo GC (in corrispondenza o in prossimità del limite di rilevamento del test), 35 mostravano una positività moderata (circa 2-5 volte il limite di rilevamento), e 5 rivelavano invece una positività elevata superando di 10 volte il limite di rilevamento. I restanti 10 campioni risultavano negativi per il GC anche se 5 di questi contenevano un'alta concentrazione dell'organismo CT. Le valutazioni di prestazione per il test si basano sui campioni conservati a 2-8 °C o congelati e analizzati entro 1-2 settimane dal prelievo.

Note:

1. Un dosaggio non denaturato di ciascuno dei 90 campioni è stato sottoposto a temperature estreme per simulare le condizioni di spedizione (conservazione a -20 °C per 3 giorni, poi a 50 °C per 5 giorni ed altre 2 settimane a temperatura ambiente). Anche se, dopo 8 giorni in queste condizioni, si è osservata una perdita del segnale (RLU/CO), questo non ha influito sull'interpretazione qualitativa dei risultati. Dopo un'ulteriore incubazione di altre due settimane a temperatura ambiente, sono state osservate differenze qualitative nei campioni contenenti un basso livello di organismi.
2. Per evitare che i campioni si stappino se vengono spediti o conservati congelati:
 - Coprire i tappi con la pellicola Parafilm® prima di spedire i campioni congelati. I campioni possono essere spediti congelati o a 20 - 25 °C.
 - Quando si estraggono i campioni dal freezer per analizzarli, sostituire immediatamente i tappi delle provette di prelievo dei campioni con tappi a vite.
3. Non usare il dispositivo per il prelievo *digene* HC2 DNA per le donne in gravidanza. Prelevare i campioni delle donne in gravidanza solo con il kit *digene* Female Swab Specimen Collection.

CAMPIONI CERVICALI IN SOLUZIONE PRESERVCYT HOLOGIC

I campioni prelevati usando un dispositivo di prelievo del tipo a spazzolino e inseriti nella soluzione PreservCyt Hologic, da utilizzare per preparare i vetrini ThinPrep® Pap Test Hologic possono essere utilizzati per il test *digene* HC2 GC-ID DNA. I campioni devono essere prelevati con la metodica di routine e i vetrini ThinPrep Pap Test devono essere preparati seguendo le istruzioni Hologic.

I campioni per la soluzione PreservCyt possono essere conservati fino a un mese a temperatura ambiente (20 - 25 °C), dopo il prelievo e prima dell'elaborazione per il test *digene* HC2 GC-ID DNA. I campioni in soluzione PreservCyt non possono essere congelati. Per elaborare questi campioni, fare riferimento alla *Procedura di preparazione dei campioni PreservCyt*.

METODICA DEL TEST

I campioni possono contenere agenti infettivi e devono essere trattati di conseguenza. Il test *digene* HC2 GC-ID DNA può essere effettuato manualmente, secondo le presenti istruzioni per l'uso, o usando il sistema Rapid Capture per l'analisi di grossi volumi di campioni.

ANALISI DI GROSSI VOLUMI DI CAMPIONI CON IL SISTEMA RAPID CAPTURE

Il sistema Rapid Capture è un sistema di pipettamento e diluizione automatica d'impiego generico, che può essere usato con il test *digene* HC2 GC-ID DNA per l'analisi di grossi volumi di campioni. Il sistema è in grado di gestire fino a 352 campioni in otto ore, compreso un periodo di 3,5 ore durante il quale non è richiesto l'intervento dell'operatore; il sistema è in grado di generare fino a 704 risultati di campioni in 13 ore. La denaturazione dei campioni nella preparazione per l'analisi viene effettuata indipendentemente dal sistema Rapid Capture, nella provetta da prelievo principale come con la metodica manuale del test *digene* HC2 GC-ID DNA descritta di seguito, prima di posizionare i campioni sulla piattaforma del sistema Rapid Capture. Inoltre, la rilevazione del segnale chemiluminescente e la refertazione dei risultati vengono effettuate con l'impiego del sistema del luminometro non in linea approvato da QIAGEN, comune sia alla metodica manuale sia a quella con il sistema Rapid Capture. Ogni fase procedurale del test *digene* HC2 GC-ID DNA viene svolta nella stessa sequenza prevista dalla procedura manuale. L'applicazione del sistema Rapid Capture consente l'analisi scaglionata di un massimo di 4 micropiastre, ciascuna contenente i campioni, i calibratori necessari per il test e i controlli di qualità.

Se si fa uso del sistema Rapid Capture, per informazioni e descrizioni della procedura, oltre alle presenti istruzioni per l'uso, consultare il *Manuale d'uso del sistema Rapid Capture* in dotazione con lo strumento.

METODICA MANUALE

Preparazione

1. Dopo l'avvio, attendere almeno 60 minuti perché il riscaldatore di micropiastre 1 si stabilizzi a 65 °C ± 2 °C. Per ulteriori informazioni vedere il *Manuale d'uso riscaldatore di micropiastre 1*.
2. Verificare che il bagno d'acqua sia a 65 °C e che il livello dell'acqua sia sufficientemente alto da poter immergere l'intero volume contenuto nelle provette dei campioni.
3. Togliere i campioni e **tutti** i reagenti necessari dal frigorifero **prima di iniziare il test**. Lasciarli riposare per 15–30 minuti in modo che raggiungano i 20 - 25 °C.
4. Creare il layout delle piastre utilizzando il software di analisi del test *digene* con protocolli del test *digene* per GC. Per i dettagli consultare il rispettivo manuale d'uso del software.
5. Il Calibratore Negativo, il Calibratore Positivo e i Controlli di qualità devono essere preparati **freschi** per ciascun test. Miscelare bene il calibratore e i controlli di qualità. Se si fa uso del Vortexer MST 2, togliere 500 µl di ogni campione in provette da prelievo vuote e opportunamente etichettate. In alternativa, togliere 200 µl di ogni campione in provette per microcentrifugazione in polipropilene da 2 ml opportunamente etichettate.
6. **Analizzare il calibratore negativo e il calibratore positivo PRIMA** in tre replicati per ciascun lotto di campioni analizzati. I controlli di qualità e i campioni vanno analizzati singolarmente. I calibratori, i controlli di qualità e i campioni devono essere testati in una configurazione a colonna da 8 micropozzetti, in modo tale che i replicati del calibratore negativo (NC) vengano posizionati in A1, B1, C1; il calibratore positivo in D1, E1, F1; QC CT in G1; QC GC in H1; e poi i campioni a partire da A2. Vedere l'esempio di layout riportato di seguito. Per impostare correttamente nel software il calibratore/controllo di qualità/campione, consultare il rispettivo manuale d'uso del luminometro approvato da QIAGEN e del software di analisi del test *digene*.

ESEMPIO DI LAYOUT PER UN TEST DI 24 MICROPOZZETTI:

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

DENATURAZIONE

Note:

- **Attenzione:** il reagente di denaturazione è corrosivo. Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/il viso. Prestare attenzione e indossare guanti privi di polveri durante l'utilizzo.
- **Importante:** alcuni campioni cervicali possono contenere sangue o altro materiale biologico, che può nascondere i cambiamenti di colore conseguenti all'aggiunta del reagente di denaturazione. Con campioni che presentano un colore scuro prima dell'aggiunta del reagente di denaturazione, in queste fasi si potrebbe non ottenere il corretto cambiamento di colore. In questi casi, il cambiamento di colore non corretto non influisce sui risultati del test. È possibile verificare la corretta miscelazione osservando il cambiamento di colore dei controlli di qualità e dei calibratori.
- Durante la fase di denaturazione, verificare che il livello del bagno d'acqua sia sufficiente, per poter immergere l'intero volume del campione contenuto nella provetta.
- La preparazione dei campioni può essere eseguita fino alla fase di denaturazione, quindi questi materiali possono essere conservati a 2–8 °C fino al giorno dopo o a -20 °C per un massimo di 3 mesi. È possibile effettuare un massimo di 3 cicli di congelamento/scongelo, lasciando i materiali a temperatura ambiente per 2 ore durante ogni ciclo di scongelamento. Miscelare bene prima dell'uso.
- La preparazione di calibratori e dei controlli di qualità può essere eseguita fino alla fase di denaturazione, quindi questi possono essere conservati a 2-8 °C fino al giorno dopo, **ma non possono essere congelati**. Se i calibratori e i controlli di qualità vengono congelati, sarà necessario eliminarli.
- Dopo la denaturazione e l'incubazione, i campioni non si considerano più infettivi¹³; tuttavia il personale di laboratorio dovrà continuare ad uniformarsi alle precauzioni nazionali/locali.

PROCEDURA PER LA PREPARAZIONE DI CALBRATORI, CONTROLLI DI QUALITÀ E CAMPIONI STM

Note:

- Non rimuovere il dispositivo di prelievo dei campioni prima della denaturazione.
- Per evitare risultati falsi positivi è di vitale importanza che tutti i calibratori, i controlli di qualità e i campioni STM entrino a contatto con il reagente di denaturazione. La miscelazione conseguente all'aggiunta del reagente di denaturazione è una fase cruciale: **assicurarsi che il Vortexer per provette multicampione 2 sia impostato a 100 (velocità massima) e che durante la miscelazione sia visibile un vortice, in maniera tale che il liquido bagni tutta la superficie interna della provetta. Se si procede alla miscelazione manuale, accertarsi che tutti i calibratori, i controlli di qualità e i campioni vengano miscelati singolarmente, agitando ciascuno di essi per almeno 5 secondi alla velocità massima, in modo che il vortice che si forma nel liquido bagni tutta la superficie interna della provetta, quindi capovolgere una volta la provetta.**

1. Rimuovere e gettare i tappi delle provette di calibratori, controlli di qualità e campioni STM.

Nota: i tappi tolti dalle provette dei campioni sono considerati come potenzialmente infettivi e devono essere eliminati in conformità alle normative nazionali/locali.

2. Pipettare il reagente di denaturazione con l'indicatore in ogni calibratore, controllo di qualità o campione STM, utilizzando un pipettatore a ripetizione o regolabile. Prestare attenzione a non toccare i lati della provetta, in caso contrario potrebbe verificarsi una contaminazione crociata dei campioni. Il volume di reagente di denaturazione necessario equivale alla metà del volume del campione. La tabella che segue elenca il volume esatto per ciascun tipo di calibratore, controllo di qualità e campione.

- **Diluire il reagente di denaturazione restante nel flacone, prima di smaltirlo nel rispetto delle procedure di laboratorio nazionali e locali.**

Calibratore, controllo di qualità o campione	Volume del reagente di denaturazione necessario
Calibratore negativo, calibratore positivo e controllo di qualità, 200 µl	100 µl
Calibratore negativo, calibratore positivo e controllo di qualità, 500 µl	250 µl
Campione cervicale, 1 ml	500 µl

3. Miscelare i campioni seguendo una delle due metodiche descritte di seguito.

Metodica per il Vortexer per provette multicampione 2

Nota: I campioni QIAGEN miscelati con il Vortexer MST 2 **devono** essere ibridati con la micropietra di ibridazione e il riscaldatore di micropiastre I. Per maggiori informazioni consultare il manuale d'uso del Vortexer MST 2.

- a) Coprire le provette di calibratori, controlli di qualità e campioni STM con pellicola per sigillare DuraSeal[®], stendendola sopra le provette contenute nel portaprovette.
- b) Posizionare il coperchio del portaprovette sopra le provette ricoperte di pellicola e bloccarlo in posizione con le due clip laterali. Tagliare la pellicola con l'apposita taglierina.
- c) Posizionare il portaprovette nel Vortexer per provette multicampione 2 e fissarlo con il morsetto. Verificare che la velocità sia impostata a 100 (velocità massima) e ruotare l'interruttore di alimentazione del Vortexer in posizione ON. Agitare le provette per 10 secondi.

Metodica di agitazione manuale delle singole provette

- a) Ritappare le provette di calibratori, controlli di qualità e campioni STM con tappi a vite puliti.
 - b) Miscelare correttamente ogni provetta, agitandola in singolo ad alta velocità per almeno 5 secondi.
 - c) Capovolgere ogni provetta una volta per far sì che il liquido bagni i lati interni, il tappo e il bordo.
 - d) Riporre la provetta nel portaprovette.
4. Indipendentemente dalla metodica di agitazione utilizzata, **durante la miscelazione nel liquido contenuto in ogni provetta dovrebbe essere visibile un vortice, in modo che il liquido bagni tutta la superficie interna della provetta.** I calibratori, i controlli di qualità e i campioni dovrebbero assumere una colorazione viola.
 5. Incubare le provette contenute nel portaprovette in un bagno d'acqua a 65 ± 2 °C per 45 ± 5 minuti (i calibratori, i controlli di qualità e i campioni denaturati possono essere analizzati subito. I calibratori e i controlli di qualità possono essere conservati a 2-8 °C per una notte come descritto nelle **Note** riportate in precedenza). Per la conservazione dei campioni, fare riferimento a *Interruzione facoltativa*. Preparare la miscela di sonde per GC durante questo periodo di incubazione. Vedere la sezione relativa alla preparazione e alla conservazione dei reagenti.

PROCEDURA PER LA PREPARAZIONE DEI CAMPIONI IN SOLUZIONE PRESERVCYT

Note:

- Consultare le istruzioni per l'uso del kit *digene* HC2 di conversione del campione per i dettagli completi.
- L'elaborazione di un dosaggio di 4 ml di soluzione PreservCyt è sufficiente per 2 test, quando elaborati manualmente. Il volume minimo che può essere elaborato è 4 ml. Fare riferimento alla sezione "Equivalenza tra i campioni in STM e soluzione PreservCyt" per dettagli sul volume residuo minimo.
- Preparare la soluzione PreservCyt in batch di 36 o meno; altrimenti, quando si decanta il sovranatante possono staccarsi dei residui. Ciò è importante per mantenere l'integrità delle cellule durante la decantazione. Se si preparano fiale aggiuntive per la soluzione PreservCyt, non iniziare a prepararle fino al completamento della preparazione del primo batch.

Utilizzare il reagente di denaturazione (DNR) fornito con il test *digene* HC2 GC-ID DNA (vedere *Preparazione e conservazione del reagente*) oppure il DNR fornito con il kit *digene* HC2 di conversione del campione. Per preparare il DNR fornito con il kit *digene* HC2 di conversione del campione, aggiungere 3 gocce di indicatore nel flacone del DNR e miscelare bene. La soluzione deve presentarsi di un colore viola scuro uniforme. Per stabilire i requisiti di volume utilizzare la Tabella 1.

Tabella 1. Requisiti di volume: preparazione del reagente.

Numero di test	Volume della soluzione PreservCyt	Volume del tampone di conversione
1-2	4 ml	0,4 ml
3	6 ml	0,6 ml
4	8 ml	0,8 ml
5	10 ml	1,0 ml
6	12 ml	1,2 ml

1. Etichettare una provetta *digene* HC2 di conversione del campione, una provetta a fondo conico da 10 ml Sarstedt o una provetta a fondo conico da 15 ml di marca VWR o Corning con il numero di identificazione del campione appropriato.
2. Gestione di un campione alla volta:
 - a. Scuotere vigorosamente la fiala di PreservCyt a mano, fino a quando tutte le cellule non vengono disperse in modo omogeneo.
 - b. Immediatamente, poiché le cellule si sedimentano molto velocemente, pipettare il volume appropriato di campione PreservCyt nella provetta etichettata. Erogare la soluzione PreservCyt nel fondo conico della provetta ,per ridurre al minimo il materiale cellulare che aderisce all'interno della provetta.
3. Aggiungere il volume appropriato di tampone per la conversione del campione in ogni provetta (vedere la Tabella 1).
4. Rimettere il tappo e miscelare il contenuto di ogni provetta accuratamente, utilizzando un miscelatore vortex con coppetta.

Nota: la procedura Vortexer MST 2 non è stata convalidata per agitare i campioni della soluzione PreservCyt con il tampone per la conversione dei campioni prima della centrifuga e quindi non deve essere utilizzata in questa fase.
5. Centrifugare le provette in un rotore con cestello oscillante a $2.900 \pm 150 \times g$ per 15 ± 2 minuti.
6. Durante la centrifuga, preparare la miscela di *digene* Specimen Transport Medium/reagente di denaturazione (STM/DNR) in un rapporto 2:1, in base alla Tabella 2.

Nota: la miscela STM/DNR deve essere preparata fresca ogni giorno che viene eseguito il test.

- a. Per determinare il volume totale di miscela STM/DNR richiesta, utilizzare il volume iniziale di campione di soluzione PreservCyt come guida, quindi moltiplicare i volumi STM e DNR "per provetta" per il numero di campioni da elaborare (vedere Tabella 2).

Tabella 2. Requisiti di volume: STM/DNR.

N. di test	Volume della soluzione PreservCyt	Volume di STM per provetta per la miscela finale di STM/DNR*	Volume di DNR per provetta per la miscela finale di STM/DNR*	Miscela STM/DNR aggiunta alla provetta
1-2	4 ml	120 µl	60 µl	150 µl
3	6 ml	170 µl	85 µl	225 µl
4	8 ml	220 µl	110 µl	300 µl
5	10 ml	270 µl	135 µl	375 µl
6	12 ml	320 µl	160 µl	450 µl

* I volumi elencati in queste colonne non devono essere aggiunti direttamente alla provetta di campione.

- b. Miscelare la soluzione accuratamente nel Vortexer.
7. Rimuovere le provette dalla centrifuga, una provetta alla volta, e inserirle in un portacampioni o in un portaprovette di conversione. Sul fondo di ogni provetta deve essere presente un residuo ora/arancio.
- Nota:** i campioni che non hanno un residuo visibile dopo la centrifuga non sono accettabili per il test e devono essere scartati.
8. Gestione di ogni provetta singolarmente:
- Rimuovere il tappo e sistemarlo da parte su una salvietta di carta a basso rilascio di fibre.
 - Decantare con cura il sovrantante.
 - Mantenere la posizione invertita della provetta e asciugare delicatamente (circa 6 volte) su salviette di carta assorbenti a basso rilascio di fibre, fino a quando dalla provetta non fuoriescono più gocce. Utilizzare ogni volta un'area pulita della salvietta. **Non** fare scivolare i residui nella provetta durante l'asciugatura.
- Note:**
- Non asciugare nella stessa area della salvietta di carta assorbente a basso rilascio di fibre più di una volta.
 - È importante rimuovere la quantità massima di soluzione PreservCyt asciugando. Tuttavia, è normale vedere residui della soluzione PreservCyt dopo l'asciugatura.
- d. Inserire la provetta in un portacampioni o nel portaprovette di conversione.

Agitazione e denaturazione

Procedura per l'agitazione manuale

- Aggiungere il volume appropriato di STM/DNR in ogni residuo (vedere la Tabella 2). Rimettere il tappo in ogni provetta e sospendere di nuovo i residui, agitando ogni provetta singolarmente per almeno 30 secondi alla velocità impostata più elevata. Se è difficile risospendere un residuo, agitare per altri 10-30 secondi o fino a quando il residuo non si stacca dal fondo della provetta. Se un residuo non si scioglie dopo l'agitazione aggiuntiva (un totale di 2 minuti al massimo), annotare l'identificazione del campione e passare alla fase successiva.
- Riporre le provette in un portaprovette.
- Inserire il portacampioni in un bagno d'acqua a 65 ± 2 °C per 15 ± 2 minuti. Assicurarsi che il livello di acqua sia sufficiente a ricoprire tutto il liquido nelle provette.
- Rimuovere il portacampioni con i campioni dal bagno d'acqua e agitare i campioni singolarmente per 15-30 secondi.

Nota: a questo punto, assicurarsi che tutti i residui vengono risospesi completamente. I campioni che presentano ancora residui visibili non sono accettabili per il test e devono essere scartati.

5. Riportare il portacampioni in un bagno d'acqua a 65 ± 2 °C e continuare la denaturazione per altri 30 ± 3 minuti.
6. Procedere alla fase di *Ibridazione* o vedere *Interruzione facoltativa* per la conservazione e il trattamento dei campioni denaturati.

Procedura per Vortexer per provetta multicampione (MST) 2

Note:

- La procedura per Vortexer per provetta multicampione (MST) 2 è convalidata per l'elaborazione dei campioni in soluzione PreservCyt dopo la centrifugazione e la decantazione del sovrantante.
 - Solo il Vortexer MST 2 è progettato per l'elaborazione dei campioni in soluzione PreservCyt.
 - Il portaprovette di conversione e il coperchio sono specificamente progettati per sistemare provette *digene* HC2 di conversione del campione (provette a fondo conico da 15 ml di marca VWR o Corning). L'utente deve utilizzare solo un tipo di provetta sul portaprovette di conversione alla volta. Altre marche non sono convalidate per l'uso.
 - È necessario aderire strettamente ai tempi di agitazione specificati del portaprovette di conversione e del coperchio.
 - Il portaprovette di conversione e il coperchio non possono essere utilizzati per agitare i calibratori o i controlli di qualità del kit del test *digene* HC2 DNA. L'altezza delle provette STM impedisce un'agitazione adeguata con l'utilizzo del portaprovette di conversione e del coperchio.
1. Dopo aver asciugato ogni provetta a fondo conico etichettata da 15 ml, inserire ciascuna provetta nella posizione corretta del portaprovette di conversione.
 2. Aggiungere il volume appropriato di miscela STM/DNR in ogni residuo (Tabella 2).
 3. Coprire le provette a fondo conico da 15 ml con pellicola per sigillare DuraSeal, stendendola sopra le provette contenute nel portaprovette.
 4. Posizionare il coperchio del portaprovette sopra le provette ricoperte di pellicola e bloccarlo in posizione con i due morsetti laterali. Tagliare la pellicola con l'apposita taglierina, dopo aver bloccato saldamente il coperchio.
 5. Spostare la leva con impugnatura rossa in modo che si trovi in posizione orizzontale.
 6. Posizionare il portaprovette di conversione e il coperchio sul Vortexer MST 2, in modo che l'angolo diagonale più grande del portaprovette di conversione si trovi nell'angolo destro anteriore. Posizionare il portacampioni e il coperchio sulla piattaforma del Vortexer MST 2, in modo che si blocchi saldamente all'interno delle guide. Fissare il portacampioni in posizione, spostando la leva con impugnatura rossa in basso nella posizione verticale. In tal modo, il portacampioni viene bloccato in posizione.
 7. Verificare che l'impostazione della velocità sia a 100 (velocità massima) e l'interruttore Pulser sia in posizione OFF.
 8. Accendere l'interruttore d'alimentazione del Vortexer. **Agitare le provette per 30 secondi.**
 9. Spegnerne l'interruttore d'alimentazione del Vortexer.
 10. Rimuovere il portaprovette di conversione e il coperchio dal Vortexer MST 2, sollevando la leva con impugnatura rossa.
 11. Inserire il portacampioni in un bagno d'acqua a 65 ± 2 °C per 15 ± 2 minuti. Assicurarsi che il livello di acqua ricopra completamente tutto il liquido in tutte le provette.
 12. Dopo un'incubazione di 15 minuti, rimuovere il portacampioni con i campioni dal bagno d'acqua.
 13. Per impedire gli spruzzi, asciugare il portacampioni dall'acqua in eccesso, posizionandolo dal Vortexer MST 2.
 14. Fissare il portaprovette di conversione e il coperchio sul Vortexer MST 2, come descritto al *Punto 6*.
 15. Verificare che la velocità sia impostata a 100 e ruotare l'interruttore di alimentazione del Vortexer in posizione "ON". **Agitare le provette per 1 minuto.**
 16. Spegnerne l'interruttore d'alimentazione del Vortexer.

Nota: la procedura per il Vortexer MST 2 rende standard la velocità di miscelazione, i tempi e l'elaborazione, eliminando la necessità di controllare visivamente i residui di cellule, come necessario quando si utilizza la Procedura di agitazione manuale.

17. Riportare il portacampioni in un bagno d'acqua a 65 ± 2 °C e continuare la denaturazione per 30 ± 3 minuti.
18. Rimuovere il portacampioni dal bagno d'acqua, asciugare il portacampioni e fissarlo sul Vortexer.
19. Accendere l'interruttore d'alimentazione del Vortexer. **Agitare per 10 secondi alla massima impostazione.**
20. Spegnerne l'interruttore d'alimentazione del Vortexer. Rimuovere il portacampioni.
21. Rimuovere immediatamente il coperchio del portacampioni e la pellicola per sigillare DuraSeal dai campioni.
22. Procedere alla fase di *Ibridazione* o vedere *Interruzione facoltativa* per la conservazione e il trattamento dei campioni denaturati.

INTERRUZIONE FACOLTATIVA

Dopo la denaturazione, i campioni STM e i campioni PreservCyt convertiti possono essere conservati a 2–8 °C fino al giorno dopo o a -20 °C per un massimo di 3 mesi. Per la refrigerazione notturna, i campioni possono essere lasciati nel portaprovette di conversione con la pellicola DuraSeal e con il coperchio del portacampioni reinstallato. Prima della conservazione -20 °C, il coperchio del portacampioni e la pellicola DuraSeal devono essere rimosse e i tappi rimessi sulle provette. In ogni caso, i campioni devono essere equilibrati a 20 - 25 °C e agitati accuratamente prima di procedere alla fase di Ibridazione.

Nota: non conservare o spedire i campioni denaturati con ghiaccio secco.

È possibile effettuare un massimo di 3 cicli di congelamento/scongelamento, lasciando i materiali a temperatura ambiente per 2 ore durante ogni ciclo di scongelamento.

IBRIDAZIONE

Note:

- La miscela della sonda per GC è viscosa. Prestare attenzione che la miscelazione sia corretta e che la quantità necessaria venga dispensata interamente in ogni pozzetto della micropiastra d'ibridazione. Vedere la sezione relativa alla preparazione e alla conservazione dei reagenti.
- Se il campione denaturato è stato conservato a -20 °C, lasciarlo scongelare a 20 - 25 °C, quindi agitarlo bene prima di procedere all'ibridazione.
- Preriscaldare il riscaldatore di micropiastre I a 65 ± 2 °C per almeno 60 minuti prima dell'uso. Per ulteriori istruzioni consultare il *manuale d'uso del riscaldatore di micropiastre I*.

1. Procurarsi ed etichettare una micropiastra di ibridazione.
2. Estrarre i calibratori, i controlli di qualità e i campioni dal bagno d'acqua dopo l'incubazione. Se si utilizza il Vortexer per provette multicampione 2, agitare l'intero portaprovette di campioni STM per un minimo di 5 secondi alla massima impostazione della velocità. Per i campioni in soluzione PreservCyt, agitare l'intero portaprovette di conversione per un minimo di 10 secondi alla massima impostazione della velocità. In alternativa, agitare ogni provetta in singolo per almeno 5 secondi
3. Pipettare 75 µl di ogni calibratore, controllo di qualità o campione nel **fondo** del pozzetto vuoto delle microprovette di ibridazione, seguendo lo schema della piastra creato nella fase preparatoria. Evitare di toccare i lati dei pozzetti e limitare la formazione di bolle d'aria. Utilizzare per la pipetta un puntale extra lungo pulito per ogni trasferimento, al fine di evitare la contaminazione crociata di calibratori, controlli di qualità e campioni. Per i campioni STM, non rimuovere il dispositivo di prelievo del campione dalla provetta di trasporto. Le provette dei campioni denaturati possono essere chiuse con gli appositi tappi a vite e conservate con i dispositivi di prelievo inseriti. I campioni PreservCyt denaturati possono essere richiusi con il tappo originale.

Note:

- se i dosaggi dei campioni non vengono trasferiti correttamente, possono verificarsi falsi positivi. Durante il trasferimento del campione fare in modo che il puntale della pipetta non venga a contatto con l'interno della provetta durante la rimozione del dosaggio di 75 µl.

4. Una volta trasferito l'ultimo campione, coprire la piastra con un coperchio e **incubare la micropiastra di ibridazione per 10 minuti a 20 - 25 °C.**
5. Dosare la miscela della sonda preparata e ben agitata in un contenitore monouso per reagenti. Pipettare con attenzione 25 µl della miscela della sonda in ogni pozzetto contenente calibratori, controlli di qualità e campioni, utilizzando un pipettatore a 8 canali e puntali nuovi per ogni fila. Dispensare il volume di miscela della sonda in ogni pozzetto di ibridazione, evitando gli spruzzi. Evitare di toccare i lati del pozzetto.

Nota: per il punto indicato in precedenza, utilizzare il pipettatore a 8 canali dotato di puntali da 25-200 µl e che può erogare 25-75 µl. Per un numero inferiore di pozzetti, utilizzare un pipettatore a canale singolo (dotato di puntali da 25-200 µl) al posto del pipettatore a 8 canali.

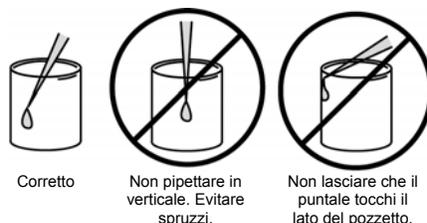
6. Coprire la micropiastra d'ibridazione con un copripiastra. Agitare la micropiastra d'ibridazione sull'agitatore rotante I impostato a 1100 ± 100 giri/minuto per 3 ± 2 minuti. *I calibratori, i controlli di qualità e i campioni dovrebbero assumere una colorazione gialla dopo l'agitazione.* I pozzetti che rimangono viola potrebbero non avere ricevuto la quantità corretta di miscela della sonda. Aggiungere altri 25 µl di miscela della sonda ai campioni rimasti viola e agitare di nuovo. Se dopo questa procedura vi sono ancora pozzetti viola testare nuovamente i campioni.
7. Incubare nel riscaldatore di micropiastre I preriscaldato ed equilibrato a 65 ± 2 °C per 60 ± 5 minuti.

Note:

- Quando si posiziona la micropiastra di ibridazione nel riscaldatore di micropiastre I, prestare attenzione a non causare spruzzi.
- Dopo l'agitazione, i campioni della soluzione PreservCyt diventano rosa invece di gialli.

CATTURA DEGLI IBRIDI

1. Rimuovere dalla struttura della micropiastra di cattura tutti i pozzetti non utilizzati per il ciclo di analisi. Riporre i micropozzetti non utilizzati nella busta originale e risigillarla. Numerare con un pennarello le colonne 1, 2, 3... ed etichettare la micropiastra utilizzando un identificatore adatto. I campioni verranno aggiunti ai pozzetti in base al layout di esempio, predisposto in fase di preparazione.
2. Estrarre con cautela dal riscaldatore la micropiastra di ibridazione contenente calibratori, controlli di qualità e campioni. Rimuovere subito il coperchio della micropiastra e posizionarla su una superficie pulita.
3. Trasferire tutto il contenuto (circa 100 µl) di calibratori, controlli di qualità e campioni dai pozzetti della micropiastra di ibridazione sul fondo dei corrispondenti pozzetti di cattura, utilizzando un pipettatore a 8 canali. Utilizzare puntali nuovi per le pipette del pipettatore a 8 canali per ogni colonna trasferita e svuotare bene tutti i puntali per garantire un trasferimento completo del campione. Se si desidera, è possibile stabilizzare il pipettatore appoggiando la **parte mediana** dei puntali delle pipette sul bordo superiore dei micropozzetti di cattura (vedere il diagramma 1).

DIAGRAMMA 1: CORRETTA MODALITÀ DI PIPETTAMENTO

4. Coprire la micropiastra con il coperchio e agitarla sull'agitatore rotante I impostato a 1100 ± 100 giri/minuto per 60 ± 5 minuti.

5. Durante questo periodo di incubazione, preparare il tampone di lavaggio e, se è il caso, controllare il contenitore di lavaggio e quello di scarico del Lavatore automatico di micropiastre. Vedere la sezione relativa alla preparazione e alla conservazione dei reagenti.
6. Una volta completata la fase di cattura, estrarre la micropiastra di cattura dall'agitatore rotante I e rimuovere con cautela il coperchio. Togliere il liquido dai pozzetti e gettarlo in un lavandino: rovesciare completamente la piastra sopra il lavandino e agitare vigorosamente con un movimento verso il basso, facendo attenzione a non provocare schizzi decantando troppo vicino al fondo del lavandino. **Non capovolgere nuovamente la piastra**; asciugare picchiando con decisione per due o tre volte su salviettine Kimtowels® o equivalenti salviettine di carta a basso rilascio di fibre. Verificare che tutto il liquido sia stato rimosso dai pozzetti e che la parte superiore della piastra sia asciutta.

RILEVAZIONE DEGLI IBRIDI

Note:

- Effettuare le aggiunte sulla piastra, procedendo da sinistra a destra e utilizzando un pipettatore a 8 canali.
 - Si consiglia di impiegare la tecnica di aspirazione inversa, per erogare il reagente in modo più uniforme. Con questa tecnica i puntali delle pipette vengono inizialmente riempiti in eccesso, utilizzando il secondo arresto del pulsante di aspirazione/dispensazione del pipettatore. Vedere la procedura descritta di seguito. Asciugare i puntali sul contenitore dei reagenti o su una salvietta di carta pulita a basso rilascio di fibre, per rimuovere il reagente in eccesso prima di erogarlo sulla piastra.
 - Se lo si desidera, il pipettatore può essere stabilizzato appoggiando la parte mediana dei puntali sul bordo superiore dei pozzetti. Prestare attenzione a non toccare i lati dei micropozzetti, in caso contrario potrebbe verificarsi una contaminazione crociata dei campioni. Vedere il diagramma 1 illustrato in precedenza.
1. Dosare il volume corretto di reagente di rilevazione 1 in un contenitore per reagenti (per istruzioni vedere la sezione relativa alla *preparazione e conservazione dei reagenti*). Pipettare con attenzione 75 µl di reagente di rilevazione 1 in ogni pozzetto della micropiastra di cattura, utilizzando un pipettatore a 8 canali, secondo la tecnica di aspirazione inversa descritta di seguito.

Tecnica di aspirazione inversa:

- a) Attaccare i puntali a un pipettatore a 8 canali; verificare che siano alloggiati correttamente.
 - b) Spingere lo stantuffo del pipettatore oltre il primo arresto e in giù, fino al secondo arresto.
 - c) Immergere i puntali nella soluzione del reagente di rilevazione 1.
 - d) Rilasciare lentamente lo stantuffo e lasciare che la soluzione riempia i puntali.
 - e) Dispensare la soluzione nei micropozzetti (75 µl), abbassando lo stantuffo fino al primo arresto. Non rilasciare lo stantuffo finché i puntali delle pipette non sono stati reimmersi nella soluzione del reagente di rilevazione 1.
 - f) Riempire i puntali e ripetere la procedura finché tutti i pozzetti non sono stati riempiti. Riempire i pozzetti della micropiastra, procedendo da sinistra a destra. *Assicurarsi di aver riempito accuratamente tutti i pozzetti, osservando l'intensità della colorazione rosa. Tutti i pozzetti dovrebbero presentare più o meno la stessa intensità.*
2. Coprire la piastra col coperchio ed incubare a 20 - 25 °C per 30-45 minuti.

LAVAGGIO

Lavare la piastra di cattura seguendo una delle due metodiche descritte di seguito.

METODICA DEL LAVATORE AUTOMATICO DI MICROPIASTRE

Nota: tenere sempre acceso il Lavatore automatico di micropiastre. Verificare che il contenitore dell'acqua sia pieno e che quello di scarico sia vuoto. Di routine il Lavatore automatico di micropiastre effettua un lavaggio di pulizia. Per ulteriori istruzioni, consultare il *manuale d'uso del Lavatore automatico di micropiastre*.

PRIMA DI OGNI USO:

- Verificare che il contenitore per il liquido di lavaggio sia pieno almeno fino alla tacca di 1 l di soluzione di tampone di lavaggio. In caso contrario, preparare la soluzione del tampone di lavaggio. Vedere la sezione relativa alla preparazione e alla conservazione dei reagenti.
 - Verificare che il contenitore per l'acqua sia riempito con acqua distillata o deionizzata.
 - Verificare che il contenitore di scarico sia vuoto e che il tappo sia chiuso bene.
 - Il Lavatore automatico di micropiastre si riempirà automaticamente prima di ogni lavaggio e dopo ogni lavaggio effettuerà un ciclo di pulizia.
1. Togliere il copripiastra e posizionare la piastra sulla piattaforma del lavatore automatico di micropiastre.
 2. Verificare che il sistema sia acceso e che sul display si legga "Digene Wash Ready" o "P1".
Nota: se si utilizza solo in parte la fila di pozzetti di cattura, prima del lavaggio, sulla micropiastra devono essere posizionati pozzetti vuoti, in modo da completare la colonna. Vedere la sezione Accessori per informazioni per gli ordini.
 3. Selezionare il numero di file di cui eseguire il lavaggio premendo il tasto "Rows" e "+" o "-" per effettuare la regolazione. Premere il tasto "Rows" per tornare a "Digene Wash Ready" o "P1".
 4. Premere "Start/Stop" per avviare il sistema.
 5. Il lavatore automatico di micropiastre esegue sei cicli di riempimento ed aspirazione, per i quali occorrono circa 10 minuti. Durante il programma vi sarà una breve pausa, quindi non rimuovere la piastra in anticipo. Quando il lavaggio è terminato, sul display del sistema verrà visualizzato "Digene Wash Ready" o "P1".
 6. Estrarre la micropiastra dal sistema di lavaggio una volta terminato il programma. La piastra dovrà presentarsi bianca e nei micropozzetti non devono essere rimaste tracce di liquido rosa residuo.

METODICA DI LAVAGGIO MANUALE

Nota: un lavaggio inadeguato può provocare un aumento del rumore di fondo e dare luogo a falsi positivi (a causa della fosfatasi alcalina residua). Per assicurare un lavaggio efficiente con l'impiego del sistema di lavaggio, è necessario che questo venga posizionato ad almeno 61 cm e non più di 91 cm sopra l'area di lavaggio in modo che, durante il lavaggio, la piastra si trovi tra 61 cm e 91 cm sotto il sistema di lavaggio. Il tappo del dispositivo di lavaggio deve essere completamente aperto quando viene usato e completamente chiuso quando non viene usato. Durante l'impiego, per assicurare una pressione adeguata, il sistema di lavaggio deve contenere almeno 1,0 l di tampone di lavaggio.

1. Rimuovere il reagente di rilevazione 1 dai micropozzetti ponendo delle salviettine Kimtowels pulite, o altre salviettine pulite equivalenti a basso rilascio di fibre, sopra la piastra e capovolgerla prestando attenzione. Prima di capovolgere la piastra, accertarsi che la carta sia a contatto con tutta la sua superficie. Lasciare asciugare la piastra per 1-2 minuti. Asciugare bene su salviettine Kimtowels o equivalenti salviettine di carta a basso rilascio di fibre. Gettare le salviettine di carta a basso rilascio di fibre usate, per evitare la contaminazione da fosfatasi alcalina nel corso delle fasi successive.
2. Lavare a mano le piastre per 6 volte utilizzando il sistema di lavaggio. Lavare i singoli pozzetti facendovi fluire acqua finché non trabocca, per rimuovere il coniugato dalle parti superiori. Il lavaggio inizia dal pozzetto A1 e continua a serpentina, procedendo verso destra e verso il basso. Dopo che tutti i pozzetti sono stati riempiti, rovesciare il liquido nel lavandino con un movimento deciso verso il basso. Il secondo lavaggio parte dal pozzetto H12 e procede a serpentina verso sinistra e verso l'alto. Questa sequenza di 2 lavaggi viene ripetuta altre 2 volte, per un totale di 6 lavaggi per pozzetto.
3. Dopo il lavaggio, asciugare la piastra capovolgendola su salviettine Kimtowels o equivalenti salviettine di carta a basso rilascio di fibre e picchiettando con decisione per 3-4 volte. Cambiare le salviettine di carta a basso rilascio di fibre e asciugare nuovamente. Lasciare la piastra capovolta e farla asciugare per 5 minuti. Asciugarla ancora una volta.
4. La piastra deve presentarsi bianca e nei micropozzetti non devono essere rimaste tracce di liquido rosa residuo.

AMPLIFICAZIONE DEL SEGNALE

Note:

- Utilizzare un nuovo paio di guanti privi di polveri per il trattamento del reagente di rilevazione 2.
 - Dosare **solo** la quantità di reagente necessaria per l'esecuzione del test in un apposito contenitore, al fine di evitare la contaminazione del reagente di rilevazione 2. Vedere la sezione relativa alla preparazione e alla conservazione dei reagenti. **NON riversare il reagente di rilevazione 2 nel flacone originale. Gettare il materiale non utilizzato dopo l'uso.**
 - L'aggiunta di reagente di rilevazione 2 deve essere effettuata senza interruzione. I tempi di incubazione di tutti i pozzetti devono essere il più possibile identici.
 - Prestare attenzione a non toccare i lati del micropozzetto e ad evitare gli spruzzi di reagente sui puntali, per evitare la contaminazione crociata dei campioni (vedere il diagramma 1).
1. Pipettare con attenzione 75 µl di reagente di rilevazione 2 in ogni pozzetto della micropiastra di cattura, utilizzando un pipettatore a 8 canali, secondo la tecnica di aspirazione inversa descritta prima. *Tutti i micropozzetti dovrebbero assumere una colorazione gialla.* Verificare che tutti i pozzetti siano stati riempiti bene, osservando l'intensità della colorazione. Tutti i pozzetti dovrebbero presentare più o meno la stessa intensità.
 2. Coprire la micropiastra con il coperchio o la pellicola Parafilm puliti (o materiale equivalente) e incubare a 20 – 25 °C per 15 minuti. Evitare la luce solare diretta.
 3. Leggere la micropiastra sul luminometro approvato da QIAGEN dopo 15 minuti esatti di incubazione (e non oltre i 30 minuti di incubazione).
 4. Il software di analisi del test *digene* consente l'immissione diretta nel software dei dati relativi al test.
 5. Se non è stata utilizzata una micropiastra completa, rimuovere i micropozzetti utilizzati dal supporto della micropiastra, lavare il supporto bene con acqua deionizzata, asciugarlo e tenerlo da parte per il test successivo.

CRITERI DI VERIFICA DELLA CALIBRAZIONE DEL TEST

La verifica della calibrazione del test si esegue per garantire che i reagenti, oltre al materiale del calibratore e del controllo di qualità forniti, funzionino correttamente, consentendo una determinazione precisa del valore soglia del test. I criteri di verifica vengono calcolati automaticamente e giudicati validi o non validi dal software di analisi del test *digene*. Per il test *digene* HC2 GC-ID DNA è necessario eseguire la calibrazione ad ogni test e quindi occorre procedere alla verifica di ciascun test, in base ai criteri di seguito descritti. Questa procedura di verifica non sostituisce i test di controllo di qualità interni.

1. Calibratore negativo

Il calibratore negativo deve essere analizzato in tre replicati ad ogni test. Per poter procedere, il valore RLU medio del Calibratore negativo deve essere ≥ 10 e ≤ 150 RLU. Il coefficiente di variazione (%CV) dei replicati di Calibratore Negativo deve essere $\leq 25\%$. Se il %CV è $> 25\%$, il software elimina ed esclude il replicato con il valore RLU più lontano dalla media e ricalcola la media e il %CV usando i due replicati rimanenti. Il %CV ricalcolato deve essere $\leq 25\%$; altrimenti, **la verifica di calibrazione del test non sarà considerata valida e sarà necessario ripetere il ciclo di analisi per tutti i campioni dei pazienti. Pertanto, i risultati ottenuti non devono essere messi a referto.**

2. Calibratore positivo

Il Calibratore Positivo deve essere analizzato in tre replicati ad ogni test. Il %CV per i replicati del Calibratore Positivo deve essere $\leq 20\%$. Se il %CV è $> 20\%$, il software elimina ed esclude il replicato con il valore RLU più lontano dalla media e ricalcola la media e il %CV usando i due replicati rimanenti. Il %CV ricalcolato deve essere $\leq 20\%$; altrimenti, **la verifica di calibrazione del test non sarà considerata valida e sarà necessario ripetere il ciclo di analisi per tutti i campioni dei pazienti. Pertanto, i risultati ottenuti non devono essere messi a referto.**

3. Rapporto media PC/media NC

La media dei replicati del Calibratore Positivo (media PC) e la media dei replicati del Calibratore Negativo (media NC) vengono impiegate per calcolare il rapporto media PC/media NC. Il software calcola il rapporto media PC/media NC. Questo rapporto deve soddisfare i criteri seguenti per la verifica della calibrazione del test **prima di poter procedere all'interpretazione dei risultati dei campioni.** Se il rapporto è $\geq 2,0$ e ≤ 20 , il software procede al calcolo del valore soglia. Se il rapporto

è < 2,0 o > 20, la verifica della calibrazione del test non è valida ed è necessario ripetere il test per tutti i campioni delle pazienti. Allo stesso modo, i risultati dei campioni delle pazienti non devono essere refertati.

Nota: per stabilire la riproducibilità dei calibratori per il test *digene* HC2 GC-ID DNA, sono stati compilati i risultati generati con il luminometro per micropiastre 2000 *digene* (DML 2009) durante gli studi interni con l'impiego di 62 test eseguiti usando l'applicazione del sistema Rapid Capture e 43 test eseguiti usando la metodica manuale (Tabella 3). I risultati hanno mostrato che il %CV medio per il Calibratore Positivo per questi 105 cicli era equivalente o inferiore al 6,5% e il %CV medio per il Calibratore Negativo era equivalente o inferiore al 14,6%. Come indicato dal valore medio RLU del Calibratore Negativo medio di 43 ottenuto per i cicli di test manuali, a confronto con la media di 54 dell'applicazione del sistema Rapid Capture, l'applicazione del sistema Rapid Capture ha prodotto valori RLU NC leggermente più alti rispetto alla metodica manuale. Questa variazione non ha dimostrato alcuna influenza sui risultati delle analisi generati con le due metodiche. Il valore soglia RLU medio per il Calibratore Negativo è stato definito pari a 250 RLU sulla base del calcolo statistico di $\pm 3DS$ del valore medio RLU per il Calibratore Negativo osservato per il sistema del test *digene* HC2 CT/GC DNA nel corso di ampie analisi che hanno avuto luogo durante lo sviluppo dell'applicazione del sistema Rapid Capture. L'estremità superiore di quell'intervallo $\pm 3DS$ è stata estesa di un ulteriore 20% per assicurare che il valore soglia RLU per l'NC possa essere raggiunto nella pratica clinica abituale.

Il valore RLU medio dell'NC deve essere abitualmente osservato a ≤ 150 e il CV a $\leq 25\%$. I singoli laboratori devono monitorare le pratiche di controllo qualità e calibrazione in base al documento C24-2A del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). L'RLU medio con l'impiego dell'applicazione del sistema Rapid Capture può talvolta superare 150, con un'eventuale riduzione corrispondente del PC/NC che, secondo la Tabella 3, produce un valore medio in fase di calibrazione di 8,29. In questo caso, i risultati sono accettabili purché l'RLU dell'NC resti ≤ 250 e il rapporto PC/NC sia $\geq 2,0$. Se l'RLU dell'NC dovesse superare 250 o il PC/NC essere inferiore a 2,0 o essere superiore a 20, il test non sarà considerato valido.

Tabella 3. Riepilogo statistico dei valori di Calibratore Negativo e Calibratore Positivo per i test con applicazione del sistema Rapid Capture e della metodica manuale.

Metodica	N. di piastre	Medie calcolate PC/NC				Controlli di qualità del kit per il test (Media RLU/CO)	
		Media	Mediana	Min	Max	QC CT	QC GC
RCS	62	8,29	8,99	3,95	12,72	0,22	4,73
Manuale	43	8,22	8,83	2,59	12,88	0,23	4,07

Metodica	Calibratore	Medie calcolate di RLU				Media dei %CV calcolati
		Media	Mediana	Min	Max	
RCS	Negativo	54	46	24	127	14,4
	Positivo	399	405	179	606	6,5
Manuale	Negativo	43	36	16	120	14,6
	Positivo	295	309	167	415	4,7

CALCOLO DEL VALORE SOGLIA

Una volta convalidato un test secondo i criteri sopra stabiliti, i replicati validi del Calibratore Positivo verranno impiegati per stabilire i valori soglia RLU per determinare i campioni positivi. I valori soglia RLU si calcolano come segue:

Valore soglia RLU = media Calibratore Positivo RLU

Esempio di calcolo del valore soglia RLU:

	Valori RLU di NC	Valori RLU di PC
	97	312
	101	335
	91	307
Valore medio	96	318
%CV	4,9	4,7
Media PC/media NC	N/D	3,31

Pertanto, il valore soglia RLU è (media PC) = 318.

I valori RLU di tutti i campioni vengono convertiti dal software di analisi del test *digene* in un rapporto a confronto con il valore soglia (CO) RLU corretto. Ad esempio, tutti i test devono essere espressi come RLU del campione/CO.

Nota: i valori RLU/CO e i risultati positivi/negativi per tutti i campioni analizzati sono riportati nel referto di analisi dati del software di analisi del test *digene*.

CONTROLLO DI QUALITÀ

I campioni per il controllo di qualità sono forniti con il test *digene* HC2 GC-ID DNA. Per istruzioni su come inserire i numeri di lotto e le date di scadenza dei controlli di qualità, consultare il manuale d'uso del software di analisi del test *digene*. I controlli devono essere inclusi in ogni test e i valori RLU/CO di ogni controllo di qualità devono rientrare nei seguenti intervalli accettabili perché il test possa essere considerato valido. **Se i controlli di qualità non rientrano in questi intervalli, il test non è valido ed è necessario ripeterlo.** Pertanto, i risultati ottenuti in test non validi non devono essere messi a referto.

	QC CT	QC GC
RLU/CO minimo	0	1,0
RLU/CO massimo	0,9999	20,00
%CV massimo	20,00	20,00

1. I Controlli di Qualità forniti nel kit sono bersagli di DNA del CT e GC clonati, composti dello stesso costruito plasmidico per ciascun singolo organismo (uno per il CT e uno per il GC), come anche il Calibratore Positivo fornito con il test *digene* HC2 GC-ID DNA.
2. Questo materiale di controllo di qualità non è lo stesso dell'organismo GC nella matrice del campione e non sarà un controllo di qualità adeguato per il *digene* Specimen Transport Medium o per la soluzione PreservCyt.
3. Il Calibratore Positivo viene usato per normalizzare i risultati dei campioni stabilendo il valore soglia RLU. I controlli di qualità forniti con questo kit devono essere utilizzati per il controllo di qualità interno. È possibile analizzare altri controlli di qualità in base alle linee guida o ai requisiti normativi locali, statali e/o nazionali o di enti di certificazione.
4. Per valutare l'efficacia della lisi e della denaturazione dei campioni, i laboratori dovrebbero, periodicamente, creare controlli per la preparazione dei campioni aggiungendo ≥ 5000 CFU/ml di *Neisseria gonorrhoeae* (auxotipo 1, 5 o Type strain da ATCC) a una provetta nuova di STM. Incubare il campione per almeno 1 ora a temperatura ambiente prima di analizzarlo usando la stessa metodica impiegata per i campioni clinici. Se il campione viene esaminato correttamente, si dovrebbe ottenere un valore RLU/CO di $\geq 2,50$. In alternativa, è possibile usare anche pannelli di analisi dei campioni disponibili in commercio contenenti l'organismo GC.

5. Sono stati stabiliti intervalli accettabili per i calibratori e i controlli di qualità solo per i luminometri approvati da QIAGEN. Il calibratore negativo e i controlli di qualità controllano gli eventuali problemi del reagente e non assicurano la precisione del test.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEI CAMPIONI

Secondo i criteri del test *digene* HC2 GC-ID DNA:

1. I campioni con valori RLU/CO $\geq 2,50$ vanno considerati "Positivi per il DNA della *Neisseria gonorrhoeae*." Non è possibile stabilire la vitalità e/o l'infettività dell'organismo, perché il DNA bersaglio potrebbe resistere in assenza di organismi vitali.
2. I campioni con rapporto RLU/CO di $< 1,00$ non contengono DNA di *Neisseria gonorrhoeae* oppure contengono un DNA al di sotto del limite di rilevamento del test. Questi vanno interpretati come "Nessun DNA di *Neisseria gonorrhoeae* DNA rilevato." Un risultato negativo non preclude l'eventualità di un'infezione da *Neisseria gonorrhoeae*, perché i risultati dipendono dall'adeguatezza del prelievo del campione e da un DNA sufficiente per il rilevamento.
3. I campioni con rapporto RLU/CO di $\geq 1,00$ e $< 2,50$ vengono considerati equivoci. Si può presumere che i risultati siano positivi per il DNA della *Neisseria gonorrhoeae*. Tuttavia, si raccomanda di ripetere l'analisi di un nuovo campione del paziente o di effettuare un'ulteriore analisi con una procedura alternativa, a causa del ridotto valore predittivo dei risultati positivi con questi valori di RLU/soglia.*
4. Se, in considerazione dei risultati clinici o di altre analisi di laboratorio, la probabilità di infezione da *Neisseria gonorrhoeae* è incerta o dubbia, si raccomanda di confermare la positività dei risultati con un'altra metodica. Studi analitici con questo test hanno mostrato una reattività crociata limitata a certe altre sequenze di DNA, che possono dar luogo a risultati falsi positivi. Per ulteriori informazioni, vedere Specificità analitica.

*Nel corso della valutazione clinica del test *digene* HC2 GC-ID DNA, 3 risultati su 17 in questo intervallo di valori equivoci si sono confermati positivi con il test in coltura di GC; i restanti 14 erano falsi positivi evidenti. In una valutazione successiva, sono stati esaminati 5 campioni con un RLU/CO iniziale tra 1,00 e 2,50, tre dei quali erano positivi alla coltura di GC. L'analisi ripetuta in duplicato di questi tre campioni con il test *digene* HC2 GC-ID DNA ha prodotto risultati equivalenti a $\geq 1,00$ RLU/CO. I restanti 2 campioni erano negativi ed entrambi si rivelavano ugualmente negativi se ripetuti due volte con il test *digene* HC2 GC-ID DNA.

LIMITI DELLA METODICA

Consultare il *Manuale d'uso del sistema Rapid Capture*, per ulteriori Limiti della metodica specifici per l'impiego del sistema per analisi di grossi volumi di campioni.

- Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.
- Per ottenere risultati affidabili, attenersi scrupolosamente alla procedura del test *digene* HC2 GC-ID DNA, al controllo di qualità e ai criteri di interpretazione dei risultati dei campioni.
- Il test *digene* HC2 GC-ID DNA può essere usato solo con campioni cervicali prelevati con il dispositivo per il prelievo *digene* HC2 DNA e messi in STM, con campioni cervicali prelevati con il kit *digene* Female Swab Specimen Collection e messi in STM o con campioni prelevati usando un dispositivo di prelievo del tipo a spazzolino e messi in soluzione PreservCyt Hologic.
- I risultati di questo test vanno interpretati esclusivamente insieme con le informazioni risultanti dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure.
- Il test *digene* HC2 GC-ID DNA fornisce risultati qualitativi. Non è stato dimostrato che il valore numerico (rapporto) sopra il valore soglia stabilito per il campione del paziente sia in relazione alla quantità di DNA di GC presente nel campione del paziente.
- Un risultato negativo non esclude la possibilità di un'infezione da *Neisseria gonorrhoeae*, perché il rilevamento dipende dal numero di organismi presenti nel campione e può essere influenzato dalle metodiche di prelievo del campione, dai fattori relativi al paziente, dallo stadio dell'infezione e/o dal ceppo di *Neisseria gonorrhoeae* infettivo.

- Il test *digene* HC2 GC-ID DNA non è previsto per stabilire il successo terapeutico.
- Il test *digene* HC2 GC-ID DNA è stato solo convalidato per l'impiego con il Lavatore automatico di micropiastre, con l'impiego delle impostazioni specificate nelle istruzioni del test. Questo studio di convalida è stato condotto in sede e i dati a sostegno del suo impiego sono archiviati presso QIAGEN. Altri lavatori di micropiastre o altre impostazioni per lavatori di micropiastre non sono accettabili per l'impiego con il test *digene* HC2 GC-ID DNA.
- Per minimizzare la variabilità dei risultati ottenuti con il test *digene* HC2 GC-ID DNA, è necessario che il personale di laboratorio che esegue il test raggiunga un livello accettabile di padronanza tecnica. I singoli laboratori devono, inoltre, monitorare la competenza tecnica con il test. Si suggerisce, pertanto, di analizzare periodicamente i pannelli di analisi di campioni disponibili in commercio, contenenti organismo GC o DNA di GC, in conformità con le procedure di qualità dell'istituto.

RISULTATI PREVISTI

PREVALENZA

La prevalenza dei campioni positivi al test della *Neisseria gonorrhoeae* varia a seconda delle caratteristiche della popolazione quali età, sesso e fattori di rischio. La prevalenza della *Neisseria gonorrhoeae* osservata nella popolazione dello studio clinico che impiegava il test *digene* HC2 GC-ID DNA variava dall'1,1% al 13,0%. La prevalenza veniva calcolata presumendo che i 17 campioni con risultati equivoci nello studio fossero positivi al DNA del GC (Tabella 4). Otto di questi 17 campioni si confermarono positivi con la coltura di GC o la reazione a catena della polimerasi (PCR).

Tabella 4. Prevalenza di risultati positivi al test *digene* HC2 GC-ID DNA per centro di analisi.

Centro di analisi	N° positivi/N° analizzati	% prevalenza
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
Totale	131/1825	7,2

VALORI PREDITTIVI POSITIVO E NEGATIVO

Gli ipotetici valori predittivi positivo e negativo (PPV e NPV) per i diversi tassi di prevalenza con l'impiego del test *digene* HC2 GC-ID DNA sono stati calcolati con l'impiego della sensibilità e specificità generale, stabilita singolarmente per i campioni prelevati con il dispositivo per il prelievo *digene* HC2 DNA (spazzolino per tampone cervicale) e per i campioni prelevati con il kit *digene* Female Swab Specimen Collection (tampone). La Tabella 5 rappresenta i PPV e NPV ipotetici per i campioni prelevati con spazzolino (sensibilità generale 92,6% e specificità 98,5%) e la Tabella 6 rappresenta i PPV e NPV ipotetici per i campioni prelevati con tampone (sensibilità generale 93,0% e specificità 98,8%).

Tabella 5. Valori predittivi ipotetici del test *digene* HC2 GC-ID DNA a diversi tassi di prevalenza (Spazzolino).

Tasso di prevalenza (%)	Sensibilità (%)	Specificità (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	92,6	98,5	76,5	99,6
10	92,6	98,5	87,3	99,2
15	92,6	98,5	91,6	98,7
20	92,6	98,5	76,3	99,6

Tabella 6. Valori predittivi ipotetici del test *digene* HC2 GC-ID DNA a diversi tassi di prevalenza (Tampone).

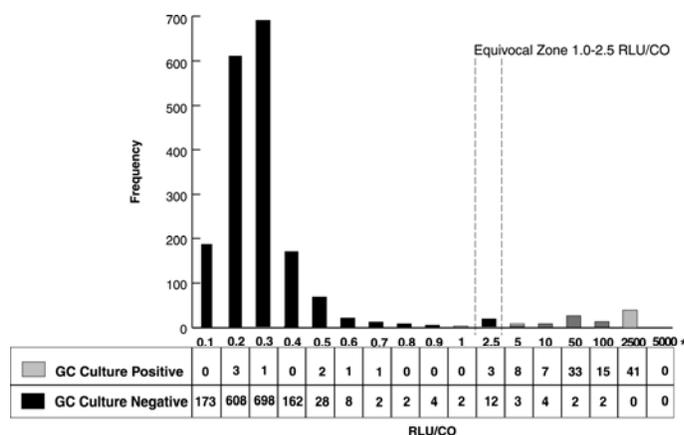
Tasso di prevalenza (%)	Sensibilità (%)	Specificità (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	93,0	98,8	79,8	99,7
10	93,0	98,8	88,3	99,4
15	93,0	98,8	91,6	99,1
20	93,0	98,8	93,3	98,7

DISTRIBUZIONE DELLA FREQUENZA: RISULTATI RLU/CO DEL TEST *digene* HC2 GC-ID DNA

La distribuzione dei rapporti RLU/CO del test *digene* HC2 GC-ID DNA, osservati durante lo studio clinico multicentrico, viene indicata di seguito (Figura 1). Questi dati comprendono tutti i campioni per cui è stato effettuato il test *digene* HC2 GC-ID DNA e per i quali erano disponibili risultati della coltura GC (n=1826). L'interpretazione dei risultati è stata eseguita in base ai criteri seguenti. I campioni con valori RLU/CO < 1,00 venivano considerati negativi. I campioni con valori RLU/CO \geq 2,50 venivano considerati positivi. I campioni con valori RLU/CO \geq 1,00 e < 2,50 venivano considerati equivoci.

La separazione distinta dei rapporti RLU/CO viene osservata tra i risultati positivi al test *digene* HC2 GC-ID DNA e i risultati negativi al test *digene* HC2 GC-ID DNA. Il novantanove per cento (1676/1690) dei risultati negativi al test *digene* HC2 GC-ID DNA hanno valori RLU/CO tra 0,0 e 0,5. Cinque (5/1690) dei risultati negativi al test *digene* HC2 GC-ID DNA producevano un RLU/CO tra 0,6 e 0,8. In generale, meno dell'uno per cento (< 0,9%, 17/1825) dei risultati dei campioni rientrava nella zona equivoca del test, il 47% (8/17) dei quali erano positivi per coltura GC o PCR. L'ottantanove per cento (93/104) dei risultati positivi al test *digene* HC2 GC-ID DNA hanno valori RLU/CO tra 10 e 2500.

Figura 1. Distribuzione della frequenza dei risultati RLU/CO del test *digene* HC2 GC-ID DNA.



*Indica l'estremità superiore dell'intervallo di valori, comprensiva del valore indicato.

CARATTERISTICHE

RISULTATI DELLO STUDIO CLINICO PER CAMPIONE

Le caratteristiche del test *digene* HC2 GC-ID DNA sono state stabilite confrontando i risultati del test con quelli della coltura di Gonococco. Sono stati analizzati 1825 campioni di pazienti presso 5 diversi istituti, tra cui cliniche per le malattie sessualmente trasmissibili, di pianificazione familiare ed ostetrico-ginecologiche. Per i campioni positivi al test *digene* HC2 GC-ID DNA/negativi alla coltura, è stata eseguita l'analisi PCR. I risultati del test *digene* HC2 GC-ID DNA NON venivano risolti dai risultati del test PCR e quindi la PCR non influiva sui calcoli delle caratteristiche del test *digene* HC2 GC-ID DNA. I risultati dello studio clinico per i campioni prelevati con il dispositivo per il prelievo *digene* HC2 DNA (spazzolino per tampone cervicale) sono illustrati alla Tabella 7 e i campioni prelevati con il kit *digene* Female Swab Specimen Collection (tampone) alla Tabella 8.

Le caratteristiche del test *digene* HC2 GC-ID DNA sono state calcolate applicando un valore soglia di 1,0 e 2,5 senza considerare i campioni presunti positivi che rientrano nella zona equivoca descritta nella sezione Interpretazione dei risultati delle presenti istruzioni per l'uso. Pertanto, le prestazioni del test *digene* HC2 GC-ID DNA possono variare nel proprio laboratorio a seconda della distribuzione dei valori che rientrano nella zona equivoca e a seconda dei risultati ottenuti quando si ripete l'analisi dei campioni presunti positivi (zona equivoca). Come punto di riferimento, meno dello 0,9% dei campioni (17/1825) analizzati durante lo studio clinico multicentrico impiegati per stabilire le prestazioni del test *digene* HC2

GC-ID DNA rientrava in questo intervallo di valori. Per ulteriori informazioni, consultare Distribuzione della frequenza dei risultati RLU/CO nella sezione Risultati previsti delle presenti istruzioni per l'uso.

Non sono stati generati dati sufficienti a stabilire con precisione se la sensibilità e il valore predittivo positivo del test *digene* HC2 GC-ID DNA con l'impiego del kit *digene* Female Swab Specimen Collection sia equivalente alla sensibilità e valore predittivo positivo osservato con campioni prelevati con dispositivo per il prelievo *digene* HC2 DNA. Poiché l'impiego del dispositivo per il prelievo *digene* HC2 DNA è controindicato per il prelievo dei campioni cervicali da donne in gravidanza, la capacità del test di rilevare la presenza del DNA del GC può essere ridotta in questa popolazione di pazienti o ogni qualvolta si impieghi un tampone per il prelievo dei campioni. Le valutazioni di prestazione per il test si basano sui campioni conservati a 2-8 °C o congelati e analizzati entro 1-2 settimane dal prelievo.

La sensibilità e specificità clinica del test *digene* HC2 GC-ID DNA, per rilevare quei pazienti con infezioni clinicamente attive che possono essere trasmesse ai partner o provocare sequele di eventi correlati a GC, non è stata determinata in confronto a tutte le metodiche commercialmente disponibili di amplificazione degli acidi nucleici (NAA) per la rilevazione del DNA di GC. In studi clinici, i test con dosaggi NAA disponibili commercialmente hanno indicato positività in alcuni campioni risultati positivi con il test *digene* HC2 GC-ID DNA da colture di pazienti. La sensibilità stimata si basa sul numero di risultati positivi dei test *digene* HC2 GC-ID DNA riscontrato in pazienti le cui colture erano positive per *Neisseria gonorrhoeae*. Quindi sensibilità del test *digene* HC2 GC-ID DNA può essere dedotta solo alla positività di colture che possono avere una sensibilità del 60-85%.

Tabella 7. Test *digene* HC2 GC-ID DNA a confronto con i risultati della coltura di GC per campioni prelevati con spazzolino. Di seguito vengono presentate le caratteristiche calcolate con l'impiego di valori soglia RLU/CO di 1,0 e 2,5; i valori indicati in parentesi rappresentano le prestazioni in considerazione del valore soglia RLU/CO di 2,5. Gli intervalli di confidenza al 95% includono entrambi gli intervalli quando le stime dei punti differiscono ciascuno dei valori soglia RLU/CO stimati.

	Centro ²	<i>digene</i> HC2 GC-ID: coltura: n=	POS POS	POS NEG	NEG POS	NEG NEG	Sensibilità	PPV	Specificità	NPV	<i>digene</i> HC2 GC-ID+ Coltura- PCR ¹⁺
Sintomatiche											
95% CI	1	351	39 (38)	7 (3)	1 (2)	304 (308)	97,50 (95,00) 83,1-99,9	84,78 (92,68) 80,1-98,5	97,75 (99,04) 97,2-99,8	99,67 (99,35) 98,2-100	5/7 (2/3)
95% CI	2	188	13	2	4	169	76,47 50,1-93,2	86,67 59,5-98,3	98,83 95,8-99,9	97,69 94,2-99,4	1/2
95% CI	3	233	14	6 (3)	1	212 (215)	93,33 68,1-99,8	70,00 (82,35) 56,6-96,2	97,25 (98,62) 96,0-99,7	99,54 97,4-100	0 ³ /6
95% CI	4	163	4	0	0	159	100,00 39,8-100	100,00 39,8-100	100,00 97,7-100	100,00 97,7-100	N/D
95% CI	Tutte	935	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) 98,5-99,7	6³/15
Asintomatiche											
95% CI	1	101	10 (9)	2	0 (1)	89	100,00 (90,00) 69,2-100	83,33 (81,82) 51,6-97,9	97,80 92,3-99,7	100,00 (98,89) 95,9-100	2/2
95% CI	2	12	2	0	0	10	100,00 15,8-100	100,00 15,8-100	100,00 69,2-100	100,00 69,2-100	N/D
95% CI	3	84	1 (0)	0	0 (1)	83	100,00 (0,00) 2,5-100	100,00 2,5-100	100,00 95,7-100	100,00 (98,81) 95,7-100	N/D
95% CI	4	226	4	2 (0)	1	219 (221)	80,00 28,4-99,5	66,67 (100,00) 39,8-100	99,10 (100,00) 98,3-100	99,55 97,5-100	1/2 (N/D)
95% CI	5	1	0	0	0	1	N/D N/D	N/D N/D	100,00 100,00	100,0 2,5-100	N/D
95% CI	Tutte	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)
TUTTE											
95% CI	1	452	49 (47)	9 (5)	1 (3)	393 (397)	98,00 (94,00) 89,4-100	84,48 (90,38) 79,0-96,8	97,76 (98,76) 97,1-99,6	99,75 (99,25) 98,6-100	7/9 (4/5)
95% CI	2	200	15	2	4	179	78,95 54,4-94,0	88,24 63,6-98,5	98,90 96,1-99,9	97,81 94,5-99,4	1/2
95% CI	3	317	15 (14)	6 (3)	1 (2)	295 (298)	93,75 (87,50) 69,8-99,8	71,43 (82,35) 56,6-96,2	98,01 (99,00) 97,1-99,8	99,66 (99,33) 98,1-100	0 ³ /6
95% CI	4	389	8	2 (0)	1	378 (380)	88,89 51,8-99,7	80,00 (100,00) 63,1-100	99,47 (100,00) 99,0-100	99,74 98,5-100	1/2 (N/D)
95% CI	5	1	0	0	0	1	N/D N/D	N/D N/D	100,00 100,00	100,00 2,5-100	N/D
95% CI	Tutte	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) 98,6-99,6	99,44 (99,21) 98,9-99,8	9³/19

¹ Questi dati vengono forniti esclusivamente a titolo informativo; i risultati dei campioni non venivano risolti con l'impiego della PCR.

² Il centro numero 5 non disponeva di campioni prelevati con spazzolino di pazienti sintomatiche.

³ In due casi la PCR non veniva eseguita.

N/D = Non disponibile

Tabella 8. Test *digene* HC2 GC-ID DNA a confronto con i risultati della coltura di GC per campioni prelevati con tampone. Di seguito vengono presentate le caratteristiche calcolate con l'impiego di valori soglia RLU/CO di 1,0 e 2,5. I valori indicati in parentesi rappresentano le prestazioni in considerazione del valore soglia RLU/CO di 2,5. Gli intervalli di confidenza al 95% includono entrambi gli intervalli quando le stime dei punti differiscono ciascuno dei valori soglia RLU/CO stimati.

	Centro ²	<i>digene</i> HC2 GC-ID: coltura: n=	POS POS	POS NEG	NEG POS	NEG NEG	Sensibilità	PPV	Specificità	NPV	<i>digene</i> HC2 GC-ID+ Coltura- PCR ¹⁺
Sintomatiche											
	1	354	34 (31)	2 (3)	2 (5)	316 (315)	94,44 (87,18) 81,34-99,32	94,44 (91,18) 81,34-99,32	99,37 (99,06) 97,75-99,92	99,37 (98,44) 97,75-99,92	N/D
95% CI	2	92	13	2 (0)	1	76 (78)	92,86 66,1-99,8	86,67 (100) 75,3-100	97,44 (100) 95,4-100	98,70 (98,73) 93,2-100	0/2
95% CI	3	5	2	0	0	3	100 15,8-100	100 15,8-100	100 29,2-100	100 29,2-100	N/D
95% CI	5	162	0	3 (1)	0	159 (161)	N/D 2,5-100	0,00 2,5-100	98,15 (99,38) 96,6-100	100 97,7-100	1 ³ /3
	Tutte	613	49 (46)	7 (4)	3 (6)	554 (557)	94,23 (88,46) 84,05-98,79	87,50 (92,00) 75,93-94,82	98,75 (99,29) 97,45-99,50	99,46 (98,93) 98,43-99,89	1³/5
95% CI											
Asintomatiche											
	1	61	1	0	1	59	50,00 1,26-98,74	100 2,50-100	100 93,94-100	98,33 91,06-99,96	N/D
95% CI	2	10	2	0	0	8	100 15,8-100	100 15,8-100	100 63,1-100	100 63,1-100	N/D
95% CI	3	2	0	0	0	2	N/D N/D	N/D N/D	100 15,8-100	100 15,8-100	N/D
95% CI	4	1	0	0	0	1	N/D N/D	N/D N/D	100 2,5-100	100 2,5-100	N/D
95% CI	5	186	1	0	0	185	100 2,5-100	100 2,5-100	100 98,0-100	100 98,0-100	N/D
95% CI	Tutte	260	4	0	1	255	80,00 28,36-99,49	100 39,76-100	100 98,56-100	99,61 97,84-99,99	N/D
95% CI											
TUTTE											
	1	415	35 (32)	5 (3)	3 (6)	372 (374)	92,11 (84,21) 78,62-98,34	87,50 (91,43) 73,20-95,81	98,67 (99,20) 96,93-99,57	99,20 (98,42) 97,68-99,83	N/D
95% CI	2	102	15	2 (0)	1	84 (86)	93,75 69,8-99,8	88,24 (100) 63,6-100	97,67 (100) 91,9-100	98,82 (98,85) 93,6-100	0/2
95% CI	3	7	2	0	0	5	100 15,8-100	100 15,8-100	100 47,8-100	100 47,8-100	N/D
95% CI	4	1	0	0	0	1	N/D N/D	N/D N/D	100 2,5-100	100 2,5-100	N/D
95% CI	5	348	1	3 (1)	0	344 (346)	100,00 2,5-100	25,00 (50,00) 1,3-98,7	99,14 (99,71) 98,4-100	100,00 98,9-100	1 ³ /3
95% CI	Tutte	873	53 (50)	10 (4)	4 (7)	806 (812)	92,98 (87,72) 83,00-98,05	84,13 (92,59) 72,74-92,12	98,77 (99,51) 97,76-99,41	99,51 (92,59) 98,74-99,87	1³/5

¹ Questi dati vengono forniti esclusivamente a titolo informativo; i risultati dei campioni non venivano risolti con l'impiego della PCR.

² Il centro numero 4 non disponeva di campioni prelevati con tampone di pazienti sintomatiche.

³ In due casi la PCR non veniva eseguita.

N/D = Non disponibile

RIPRODUCIBILITÀ

Nell'ambito dello studio clinico multicentrico, è stato condotto uno studio di riproducibilità per stabilire la riproducibilità tra i vari test, giorni, centri e totale del test *digene* HC2 GC-ID DNA con l'impiego di un pannello composto da bersagli DNA di *Neisseria gonorrhoeae* e da campioni clinici positivi e negativi al test *digene* HC2 GC-ID DNA.

Un pannello composto da 10 elementi di campioni clinici e non clinici denaturati in cieco, 8 campioni positivi e 2 campioni negativi, è stato analizzato in replicati di sei, due volte al giorno per un periodo di tre giorni in ciascuno dei quattro centri (3 centri esterni e QIAGEN). Ciascun centro ha generato 36 punti di dati per ogni bersaglio analizzato. Prima dell'analisi, tutti i campioni erano stati denaturati e conservati congelati. Si è osservata una concordanza del 100% per i 1152 risultati positivi previsti (1152/1152) e una concordanza del 100% per i 288 risultati negativi previsti (288/288). La concordanza era del 100% (1440/1440), con un intervallo di confidenza del 95% di 99,7-100 e kappa = 1,00. Non si osservava alcuna variabilità significativa tra i test, i giorni o i centri; pertanto, sono stati messi insieme i dati di tutti i test di ciascun centro che vengono presentati di seguito (Tabella 9).

Tabella 9. Riproducibilità del test *digene* HC2 GC-ID DNA in uno studio multicentrico.

Numero bersaglio	Centro 1		Centro 2		Centro 3		Centro 4		Totale		
	RLU/CO	% concordanza	RLU/CO	Osservato/Pre visto	% concordanza						
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
TOTALE									1440/1440	100	

Tre centri esterni hanno condotto un secondo studio di competenza/riproducibilità con l'impiego dell'organismo di *Neisseria gonorrhoeae* (GC) contenuto in una matrice di campione clinico simulato di cellule epiteliali. I 25 campioni analizzati contenevano rappresentanti di risultati negativi, bassi positivi (in corrispondenza o prossimità del limite di rilevamento) e medi positivi con 2 ceppi di GC, infezioni miste a *Chlamydia trachomatis* (CT) e campioni contenenti sangue. Si prevedevano dodici campioni positivi e tredici campioni negativi. La Tabella 10 illustra la percentuale di concordanza tra i risultati osservati e quelli previsti del test *digene* HC2 GC-ID DNA presso i tre singoli centri di sperimentazione e per tutti i centri messi insieme. La Tabella 11 invece indica i valori di sensibilità, specificità, concordanza e kappa per ciascun centro.

Tabella 10. % di concordanza del test *digene* HC2 GC-ID DNA in base al centro.

Centro	Osservati/Previsti	% concordanza*
1	25/25	100% (86,28%-100%)
2	25/25	100% (86,28%-100%)
3	25/25	100% (86,28%-100%)
Centri messi insieme	75/75	100% (95,20%-100%)

*I numeri fra parentesi indicano intervalli di confidenza al 95%.

Tabella 11. Risultati delle statistiche riepilogative del test *digene* HC2 GC-ID DNA (valore soglia di 1,0).

Misura statistica	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Tutti i centri
Sensibilità	100% (73,54%-100%)*	100% (73,54%-100%)	100% (73,54%-100%)	100% (90,26%-100%)
Specificità	100% (75,29%-100%)	100% (75,29%-100%)	100% (75,29%-100%)	100% (90,97%-100%)
Concordanza	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

*I numeri fra parentesi indicano intervalli di confidenza al 95%.

In base alla sezione delle presenti istruzioni per l'uso relativa all'interpretazione dei risultati, nell'ambito dell'analisi della competenza di routine, i 12 campioni equivoci presentati alla Tabella 10, tutti contenenti basse concentrazioni di organismo GC ($\sim 5 \times 10^4$ organismi/ml), sarebbero interpretati come presunti positivi. Pertanto, il test ha dimostrato la capacità di individuare il DNA del GC in campioni con concentrazioni di organismo rilevabile in corrispondenza o in prossimità del limite di rilevamento del test. Ulteriori prove sono state osservate in fase di analisi di un pannello contenente campioni con bassi numeri di organismi, in un intervallo che poteva essere rilevato da analisi di amplificazione dell'acido nucleico. I test condotti in tre centri esterni e in sede QIAGEN hanno prodotto risultati positivi (o presunti positivi) al 100% per i campioni del pannello contenente organismo GC. In due occasioni, i valori RLU/CO rientravano nella zona equivoca del test (vedere Tabella 12 di seguito).

Tabella 12. Risultati del pannello di campioni CT e GC.

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

PRECISIONE

Uno studio di precisione è stato condotto presso tre centri, per stabilire la precisione intra-test e totale del test *digene* HC2 GC-ID DNA, usando un pannello di campioni clinici simulati in cieco positivi e negativi. Inoltre, è stata valutata con lo stesso pannello la precisione intra- ed inter-strumenti con due luminometri separati. I due modelli di luminometro impiegati erano il DML 2000, uno dei luminometri raccomandati per l'uso con il test *digene* HC2 GC-ID DNA e il luminometro MLX; il luminometro MLX era uno dei modelli usati durante la valutazione clinica che ora non è più disponibile. Uno dei tre centri ha avuto difficoltà con altri test hc2 del DNA effettuati come parte di questo studio attribuibili alla tecnica del test e molto probabilmente provocati da una formazione impropria o inadeguata del tecnico di laboratorio. Anche se

questo non ha compromesso i risultati del test *digene* HC2 GC-ID DNA, il tecnico di laboratorio che eseguì l'analisi fu sottoposto a nuova formazione per la tecnica del test.

La Tabella 13 mostra le prestazioni del test *digene* HC2 GC-ID DNA per tutti i centri messi insieme (compreso il centro che ha avuto problemi tecnici prima della riformazione del tecnico di laboratorio nella giusta tecnica del test). Il test ha dimostrato una precisione equivalente dopo la formazione del tecnico anche se, per il membro 3 del pannello (contenente basse concentrazioni dell'organismo GC), i valori RLU/CO osservati rientravano o erano vicini alla zona equivoca del test di 1,0-2,5. Per gli scopi di queste analisi dei dati, tutti quei valori RLU/CO che rientravano nella zona equivoca o superavano i 2,5 venivano interpretati come positivi. Anche se non è evidente da questa tabella, i risultati qualitativi erano concordanti al 100% (54/54) (93,4%-100% 95% CI) con i risultati previsti presso i tre centri.

Tabella 13. Calcoli di precisione intra-strumenti, tra strumenti, intra-serie e stime di precisione totale per RLU/CO in base al test e al bersaglio.

Membro pannello	n	Media RLU/CO	Intra-strumenti		Tra strumenti		Intra-test		Totale	
			Deviazione standard (DS)	(%CV)	(DS)	(%CV)	(DS)	(%CV)	(DS)	(%CV)
1	54	0,0974	0,0104	10,6818	0,0017	1,7328	0,0275	28,2556	0,0275	28,1978
2	54	0,0967	0,0111	11,5031	0,0015	1,5618	0,0338	34,9362	0,0342	35,4230
3	54	3,2335	0,1502	4,6462	0,0356	1,0997	0,3520	10,8869	0,3866	11,9551
4	54	3,8407	0,2078	5,4092	0,0525	1,3671	0,3401	8,8541	0,3487	9,0802
5	54	16,1676	1,0507	6,4986	0,1122	0,6940	2,1788	13,4766	2,1437	13,2589
6	54	18,0704	1,0539	5,8321	0,3456	1,9124	2,3701	13,1158	2,3316	12,9027

Per gli scopi di queste analisi dei dati, tutti quei valori RLU/CO che rientravano nella zona equivoca o superavano i 2,5 venivano interpretati come positivi. Un altro studio di precisione è stato condotto in sede QIAGEN, per stabilire la precisione totale del test *digene* HC2 GC-ID DNA usando il DML 2000. Un pannello di precisione composto da sei elementi è stato preparato usando una matrice di campione clinico simulato, composta da cellule epiteliali in coltura sospese in STM e contenenti due campioni negativi, due campioni bassi positivi e due campioni medi positivi, tutti contenenti un dispositivo di prelievo a spazzolino. Ciascun pannello è stato analizzato in tre replicati, due pannelli per ogni piastra, da due tecnici nel giro di 5 giorni. Per ogni piastra è stato usato un pannello appena denaturato. I risultati di precisione totale per il test *digene* HC2 GC-ID DNA, compilati per tutti e cinque i giorni di test, sono presentati alla Tabella 14. Anche se non appare evidente da queste tabelle, l'interpretazione qualitativa dei risultati era concorde al 100% con il risultato previsto (120/120; 96,97%-100% 95% CI) se si impiegava un RLU/CO di 1,0.

Tabella 14. Precisione totale per test *digene* HC2 GC-ID DNA.

Membro pannello	n	Media RLU/CO	DS	CV%	Media -2xDS	Media +2xDS
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

PRECISIONE CON CAMPIONI PRESERV CYT

È stato condotto uno studio multicentro per caratterizzare la precisione intra-laboratorio e giorno per giorno del test, quando si eseguono i test sui campioni in soluzione PreservCyt. Due siti esterni al QIAGEN hanno testato un pannello di 12 membri di campioni di pazienti simulati, prelevati in soluzione PreservCyt. Ogni laboratorio quindi ha testato il pannello tre volte, due volte al giorno per tre giorni usando lo stesso lotto di reagenti. Il pannello da 12 membri di campioni simulati in soluzione PreservCyt è stato preparato con quantità variabili di GC (Auxotipo 22; ATCC 27631) variabili per creare un pannello come riportato nella Tabella 15.

Tabella 15. Pannello della precisione totale dei campioni in soluzione PreservCyt simulata per test *digene* HC2 GC-ID DNA.

Campione Bulk	Membri pannello*	Risultato previsto del test <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA	RLU/CO approssimativo
A	1P, 2P, 7P, 8P	Bassi positivi GC	ca. 5
B	3P, 4P, 9P, 10P	Medi positivi GC	ca. 10
C	5N, 11N	Negativo	ca. 0,20
D	6N, 12N	Negativo	ca. 0,20

*L'identificativo dei campioni indica lo stato noto della *Neisseria gonorrhoeae* positivo [positivo (P) o negativo (N)].

Per analizzare i dati, i membri del pannello derivato dallo stesso campione bulk sono stati combinati.

Tabella 16. Risultati qualitativi per campione bulk – Procedura del test *digene* HC2 GC-ID DNA

Pool di campioni Bulk	Positivi GC n (%)	Equivoci n (%)	Negativo n (%)	Totale
Negativo (5N, 11N)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
Negativo (6N, 12N)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
Negativi totali	0 (0,0)	0 (0,0)	216 (100)	216
Basso positivo (1P, 2P, 7P, 8P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
Medio positivo (3P, 4P, 9P, 10P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
Positivi totali	432 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	432

Tabella 17. Deviazioni standard (DS) e coefficienti di variazione (CV) per precisione per laboratorio e giorno: test *digene* HC2 GC-ID DNA in PreservCyt

Campione	N	Media RLU/CO	DS intra test	DS tra test	DS tra giorni	DS tra centri	DS totale	%CV
Negativo (5N, 11N)	108	0,201	0,037	0,019	0*	0,032	0,052	25,9
Negativo (6N, 12N)	108	0,198	0,055	0,016	0,019	0,021	0,064	32,3
Medi positivi GC (3P, 4P, 9P, 10P)	216	7,981	0,906	1,203	0	0,243	1,526	19,1
Bassi positivi GC (1P, 2P 7P, 8P)	216	4,648	0,675	0,478	0,308	0	0,883	19,0

*I componenti della varianza negativa sono stati impostati su zero.

SENSIBILITÀ ANALITICA

La sensibilità analitica (limiti di rilevamento) del test *digene* HC2 GC-ID DNA è stata determinata analizzando direttamente una serie di diluizione di un pannello di campioni comprendente 114 isolati separati di *Neisseria gonorrhoeae*. I 114 isolati rappresentavano 13 auxotipi, 5 serovar, 10 ceppi resistenti agli antibiotici, 6 isolati di ceppi senza plasmidi, e 2 isolati non caratterizzati risultati discordi nello studio multicentrico. Le serie di diluizione a quattro punti di ciascuno degli isolati sono state analizzate una volta usando il test *digene* HC2 GC-ID DNA per stabilire i limiti di rilevamento del test. La Tabella 18 riepiloga il limite di rilevamento per ciascun auxotipo di *Neisseria*. Il range del limite rilevabile indicato era la diluizione di ciascun auxotipo rilevato all'interno o in prossimità della zona equivoca del test di RLU/CO 1,0-2,5.

La sensibilità analitica del test *digene* HC2 GC-ID DNA variava da 25 a 50.000 CFU/test per i 114 isolati di *Neisseria* analizzati, tra cui auxotipi, serovar, ceppi senza plasmidi e resistenti agli antibiotici. Solo uno dei sei ceppi senza plasmidi ed uno dei cinque serovar IA-5 della *Neisseria gonorrhoeae* analizzati sono stati rilevati a 50.000 CFU/test; nessuno degli altri 112 isolati è stato rilevato a concentrazioni superiori a 5.000 CFU/test. Il limite medio rilevabile per tutti i 114 isolati variava da 974 a 2887 CFU/test se si prendeva in considerazione diluizioni di isolati che rientravano sia all'interno della zona equivoca del test che al di sopra dei 2,5 RLU/CO. Il limite medio generale di rilevamento era 1931 CFU/test ($3,8 \times 10^4$ CFU/ml). I campioni clinici che contengono un organismo in corrispondenza o in prossimità del limite di rilevamento potrebbero richiedere una ripetizione dell'analisi con una procedura alternativa o un nuovo campione del paziente, come stabilito dalla sezione Interpretazione dei risultati delle presenti istruzioni per l'uso.

Tabella 18. Riepilogo dei limiti rilevabili di sensibilità per auxotipi GC, serovar, ceppi senza plasmidi e resistenti agli antibiotici.

Auxotipo	Concentrazione rilevabile	
	CFU/ml	CFU/test
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo 1	1000	50
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo 12	500-5000	25-250
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo 16	10 ³ -10 ⁴	50-500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo 22	10 ⁴ -10 ⁵	500-5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo 5	500-5000	25-250
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo 9	5 x10 ⁴	2500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo AHU (5 isolati)	10 ⁴ -10 ⁵	500-5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo Arg (5 isolati)	10 ⁴ -10 ⁵	500-5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo AU (5 isolati)	10 ³ -10 ⁴	50-500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo PAU (5 isolati)	10 ³ -10 ⁵	50-5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo Pro (5 isolati)	10 ⁴ -10 ⁵	500-500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotipo Proto (5 isolati)	10 ³ -10 ⁴	50-500
<i>N. gonorrhoeae</i> Ciprofloxacina Intermedate (Cipl) (5 isolati)	10 ³ -10 ⁵	50-5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Ciprofloxacina Resistente (Cip R) (4 isolati)	10 ³ -10 ⁴	50-500
<i>N. gonorrhoeae</i> CMRNG (5 isolati)	10 ⁴ -10 ⁵	50-5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Altro-5423	10 ⁴ -10 ⁵	50-5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Altro-5658	10 ³ -10 ⁴	50-500
<i>N. gonorrhoeae</i> PenR (5 isolati)	10 ⁴ -10 ⁵	500-5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PenR (5 isolati)	10 ³ -10 ⁶	50-50.000
<i>N. gonorrhoeae</i> Ceppi senza plasmidi (6 isolati)	10 ⁴ -10 ⁵	500-5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 3.05 (5 isolati)	10 ⁴ -10 ⁵	500-5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 3.2	10 ³ -10 ⁵	50-5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 4.4 (4 isolati)	10 ⁴ -10 ⁵	500-5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Serovar I A-1 o IA-2 (5 isolati)	10 ⁴ -10 ⁶	500-50.000
<i>N. gonorrhoeae</i> Serovar I A-5 (4 isolati)	10 ³ -10 ⁴	50-500
<i>N. gonorrhoeae</i> Serovar I B-1 (5 isolati)	10 ³ -10 ⁵	50-5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Serovar I B-4 or IB-15 (5 isolati)	10 ³ -10 ⁵	50-5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Spectinomina Resistente (SpecR)	10 ⁵	5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TetR (5 isolati)	10 ³ -10 ⁵	50-5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TRNG American (5 isolati)	10 ⁴ -10 ⁵	500-5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TRNG Olandese (5 isolati)	10 ⁴ -10 ⁵	500-5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Type Strain	500-5000	25-250

CONSIDERAZIONI AGGIUNTIVE PER I CAMPIONI IN SOLUZIONE PRESERVCYT

Il limite degli studi di rilevazione descritti nella sezione precedente per STM non sono stati ripetuti usando i campioni in soluzione PreservCyt, poiché la sensibilità analitica del dosaggio è prevista essere indipendente dal tipo di campione STM o soluzione PreservCyt, specificamente dal momento che i campioni in soluzione PreservCyt sono soggetti alla procedura di conversione (per i dettagli, fare riferimento alle istruzioni per l'uso del del kit *digene* HC2 di conversione del campione) che rende i campioni in soluzione PreservCyt simili nella composizione ai campioni STM prima di usarli con il test *digene* HC2 GC-ID DNA.

Tuttavia, poiché il campione in soluzione PreservCyt è soggetto a una fase di centrifuga durante la procedura di conversione, non è stato necessario valutare il potenziale impatto della centrifuga sulla sensibilità analitica del test *digene* HC2 GC-ID DNA. Per valutare il potenziale impatto della centrifuga sulla sensibilità analitica, sono state preparate ottantotto (88) coppie di campioni *Neisseria gonorrhoeae* DNA-negativi in STM e soluzione PreservCyt con quantità corrispondenti di organismi di *Neisseria gonorrhoeae* (senza plasmidi NRL 33151). I campioni in coppia sono stati testati e la sensibilità analitica è stata stimata confrontando i valori medi RLU/CO ottenuti [(PreservCyt:STM) x 100].

Tabella 19. Confronto della sensibilità analitica – Test *digene* HC2 GC-ID DNA – Campioni accoppiati in soluzione PreservCyt e STM.

	Test <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA		PC:STM RLU/CO
	STM	PreservCyt	
Numero di campioni	88	88	-
Media RLU/CO	3,97	4,91	1,24
RLU/CO mediana	4,01	4,93	1,23
Deviazione standard	0,34	1,00	-
RLU/CO minimo	3,06	2,30	-
RLU/CO massimo	4,77	7,10	-

Uno studio aggiuntivo ha fornito un confronto simile con campioni accoppiati, di pazienti simulati. I campioni dei pazienti prelevati in soluzione PreservCyt sono stati ottenuti da un sito esterno alla QIAGEN e analizzati con il test *digene* HC2 GC-ID DNA per identificare i campioni positivi. Questi campioni di pazienti positivi sono stati quindi combinati per generare un totale di 10 pool PreservCyt di campioni concentrati. Da questi pool, sono stati preparati e elaborati due dosaggi per formare residui di cellule. I residui di cellule sono stati nuovamente sospesi in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS). Il dosaggio A è stato preparato aggiungendo il residuo risospeso all'STM e il dosaggio B è stato preparato aggiungendo il residuo risospeso alla soluzione PreservCyt. Entrambi i dosaggi sono stati testati con il test *digene* HC2 GC-ID DNA con i seguenti risultati:

Tabella 21. Confronto della sensibilità analitica – Test *digene* HC2 GC-ID DNA – Campioni simulati (in pool) di pazienti in soluzione PreservCyt accoppiati con STM.

	Test <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA		PC: STM RLU/CO
	STM	PreservCyt	
Numero di campioni	10	10	-
Media RLU/CO	4,80	4,32	0,90
RLU/CO mediana	2,66	2,47	0,93
Deviazione standard	5,44	5,08	-
RLU/CO minimo	1,16	1,02	-
RLU/CO massimo	18,97	17,26	-

SPECIFICITÀ ANALITICA

Una gamma di batteri, virus, plasmidi, materiale cellulare umano e prodotti ematici potenzialmente trovati nel tratto anogenitale femminile è stata sottoposta ad analisi per rilevare un'eventuale reattività crociata con il test *digene* HC2 GC-ID DNA. Tutti i microrganismi sono stati analizzati a concentrazioni di 10^5 e 10^7 organismi o CFU per ml e, laddove possibile con 10^9 organismi o CFU per ml, a meno che diversamente indicato di seguito. Il DNA purificato di virus e plasmidi è stato analizzato ad una varietà di concentrazioni come di seguito indicato.

Segue un elenco dei batteri analizzati.

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Neisseria caviae</i> (2 isolati) ^e
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Neisseria cuniculi</i> (3 isolati) ^f
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Neisseria cinera</i> (6 isolati)
<i>Achromobacter xerosis</i>	<i>Neisseria flavescens</i> (4 isolati)
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Neisseria specie g</i> *
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Neisseria lactamica</i> (6 isolati) ^d
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> (Gruppo A, B, C, W135, Y)
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Neisseria mucosa</i> (6 isolati) ^d
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Neisseria polysaccharea</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i> (6 isolati)	<i>Neisseria sicca</i> (6 isolati)
<i>Candida albicans</i>	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Neisseria subflava biovar flava</i> (5 isolati)
<i>Chlamydia pneumoniae</i> ^b	<i>Neisseria subflava biovar perflava</i> (4 isolati) ^h
<i>Chlamydia psittaci</i> ^a (2 ceppi)	<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> (Isolato clinico) [†]	<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 heamolysans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ProtA +)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> (Grp B)
<i>Kingella denitrificans</i> ^d	<i>Streptococcus pyogenes</i> (Grp A)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptomyces griseus</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Mobiluncus curtisii</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i> ⁱ
<i>Mobiluncus mulieris</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Moraxella lacunata</i>	
<i>Mycoplasma hominis</i>	
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	

Concentrazioni analizzate (organismi/ml o CFU/ml per specie di *Neisseria*):

^a 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8 , 8×10^4 , 8×10^6 , 8×10^8 , 9×10^4 , 9×10^6 , 9×10^8

^b 2×10^5 , 2×10^7 and 2×10^8

^c 1×10^5 , 1×10^7 and 1×10^8

^d 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8

^e $1,1 \times 10^5$, $1,1 \times 10^7$, $1,1 \times 10^8$

^f $9,7 \times 10^5$, $9,7 \times 10^6$, $9,7 \times 10^8$

^g 2×10^7 , 2×10^8 and 2×10^9

^h $4,8 \times 10^4$, $4,8 \times 10^6$, $4,8 \times 10^8$

ⁱ 1×10^5 and 1×10^6

[†] Sono stati analizzati sia la catena dell'*E. coli* utilizzata per la coltura di plasmidi (HB101) sia un isolato clinico dell'*E. coli*.

* Il ceppo *Neisseria* ATCC che ha caratteristiche sia della *Neisseria gonorrhoeae* che della *Neisseria meningitidis* (ATCC #43831).

Tutti i batteri diversi dalla *Neisseria gonorrhoeae* rilevati potenzialmente nel tratto urogenitale, ad eccezione dei tre ceppi di *Neisseria commensale* e *Chlamydia psittaci*, sono risultati negativi al test *digene* HC2 GC-ID DNA. Con *Chlamydia psittaci* e *Neisseria lactamica* è stata osservata solo una moderata reattività crociata che andrebbe interpretata come presunta positiva. Tale reattività crociata non dovrebbe influire sull'interpretazione dei risultati del test *digene* HC2 GC-ID DNA dei campioni urogenitali. Gli organismi che hanno dimostrato un certo grado di reattività crociata sono:

	Interpretazione	Concentrazione alla quale si osserva la reattività crociata
<i>Chlamydia psittaci</i> (1 di 2 isolati)	Presunta Positiva*	1 x 10 ⁷ organismi/ml
<i>Neisseria lactamica</i> (1 di 6 isolati)	Presunta Positiva*	1 x 10 ⁹ CFU/ml
<i>Neisseria meningitidis</i> (Gruppo Y, 1 di 2 isolati)	Positivo	1 x 10 ⁷ CFU/ml
<i>Neisseria mucosa</i> (1 di 6 isolati)	Positivo	5 x 10 ⁵ CFU/ml

* Il valore RLU/CO rientrava nella zona equivoca del test di 1,00 – 2,50.

I tre ceppi di *Neisseria commensale*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis*, e *Neisseria mucosa*, si trovano tutti principalmente nel nasofaringe e nell'apparato respiratorio superiore. Non vengono mai, o solo raramente, isolati dall'apparato urogenitale.^{13,14} Inoltre, l'isolato con reattività crociata della *Neisseria meningitidis* del Gruppo Y è stato determinato come non tipizzabile per i lipopolisaccaridi e si trova raramente nella popolazione generale. La *Chlamydia psittaci* può essere rilevata nella cute delle persone che operano a contatto con o manipolano specie aviarie, ma non è stata individuata nel tratto anogenitale.¹⁵

Inoltre, non tutti gli isolati del ceppo particolare avevano una reattività crociata con il test *digene* HC2 GC-ID DNA, riducendo la possibilità di generare un risultato falso positivo con un campione clinico se quel ceppo è presente. Ad esempio, cinque dei sei isolati di *Neisseria lactamica* o *Neisseria mucosa* si sono rivelati negativi con il test *digene* HC2 GC-ID DNA, come anche uno dei due ceppi di *Chlamydia psittaci*. Pertanto, non si prevede che la reattività crociata del test *digene* HC2 GC-ID DNA osservata con i tre ceppi di *Neisseria commensale* e *Chlamydia psittaci* possa portare ad una falsa interpretazione clinica di un risultato positivo quando si analizzano campioni anogenitali.

Segue un elenco del DNA virale, DNA plasmidico, e materiale cellulare umano o prodotti ematici analizzati e le concentrazioni che sono state testate:

Cytomegalovirus ^a	Papillomavirus umano del tipo 6 ^f
Virus di Epstein-Barr ^b	Papillomavirus umano del tipo 11 ^f
Antigene di superficie del virus dell'epatite B-siero positivo ^c	Papillomavirus umano del tipo 16 ^f
Herpes Simplex I ^d	Papillomavirus umano del tipo 18 ^f
Herpes Simplex II ^d	pBR322 ⁱ
Virus dell'immunodeficienza umana (HIV) ^{b,g}	SV40 ^j
DNA genomico umano ^e	PGEM [®] 3Z ⁱ
DNA placentare umano ^e	PGEM [®] 3Zf(-) ^j
Sangue intero umano ^h	Cellule epiteliali umane ^k

Concentrazioni analizzate:

- ^a 1×10^5 , 1×10^7 , 1×10^9 particelle virali/ml
^b 1×10^5 , 1×10^7 , 1×10^8 particelle virali/ml
^c $2,9 \times 10^8$, $1,1 \times 10^9$ particelle virali/ml
^d $6,1 \times 10^6$, $2,4 \times 10^7$ particelle virali/ml
^e $2,7 \times 10^2$, $1,1 \times 10^3$ copie/ml
^f $1,1 \times 10^8$, $4,6 \times 10^8$ particelle virali/ml
^g 2×10^6 , 2×10^7 , 2×10^8 particelle virali/ml
^h 5%, 10%, 50%
ⁱ $2,1 \times 10^8$, $8,3 \times 10^8$ copie/ml
^j 1 ng/ml, 4 ng/ml
^k 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 cellule/ml

Nessuno dei virus analizzati ha mostrato reattività crociata con il test *digene* HC2 GC-ID DNA; si è però osservata reattività crociata con i plasmidi pBR322, pGEM[®] 3Z, e pGEM[®] 3Zf(-). Tutti gli altri preparati di DNA sottoposti al test, compreso il DNA umano, erano negativi. Il sangue umano e le cellule epiteliali non presentavano reattività crociata con il test *digene* HC2 GC-ID DNA. La reattività crociata tra il pBR322 e il test *digene* HC2 GC-ID DNA non è inaspettata considerato il modo in cui viene creata la sonda per GC. È stata rilevata la presenza di sequenze omologhe di pBR322 in campioni genitali umani e potrebbero verificarsi falsi positivi in presenza di livelli elevati di plasmide batterico. Tuttavia, nessuno dei 103 campioni esaminati da uno studio clinico multicentrico negli Stati Uniti e risultati positivi per la *Neisseria gonorrhoeae* con il test *digene* HC2 GC-ID DNA è stato identificato come falso positivo a causa di sequenze di pBR322 con reattività crociata. Pertanto, la probabilità di risultati falsi positivi del test *digene* HC2 GC-ID DNA con i campioni clinici provocata dalla reattività crociata con sequenze omologhe di pBR322 sembra essere bassa. Anche se il test *digene* HC2 GC-ID DNA ha il potenziale di interagire con la *Chlamydia psittaci*, il pBR322, il pGEM e diverse specie di *Neisseria commensale*, esiste solo una remota probabilità che questi organismi possano influire sull'interpretazione dei risultati, come dimostrano i risultati dello studio clinico multicentrico.

OMOLOGIA DELLE SONDE AL PLASMIDE TOTALE E IL DNA GENOMICO

Le sonde genomiche sono omologhe con circa lo 0,5% del genoma della *Neisseria gonorrhoeae*. Segue una suddivisione per le singole sonde nel test *digene* HC2 GC-ID DNA:

Sonda	Tipo	Dimensioni approx. inserto (bp)	% di genoma
pGC1	Genomico	6.400	0,34%
pGC2		3.300	0,17%
		9.700 (Totale)	0,51%
pGC3	Plasmide criptico	4.200	N/D*

*Questo rappresenta l'intera sequenza della sonda.

EFFETTO DEL SANGUE E DI ALTRE SOSTANZE SUI CAMPIONI IN STM

È stato valutato l'effetto del sangue e di altre sostanze potenzialmente interferenti definite sul test *digene* HC2 GC-ID DNA. Sangue intero, ed una marca commerciale di lavanda vaginale, pomate antifungine e spermicidi (agenti che sovente vengono riscontrati nei campioni cervicali) sono stati aggiunti a campioni positivi (pool di campioni clinici) a concentrazioni che si possono riscontrare nei campioni cervicali (vedere Tabella 21). Non sono stati osservati falsi positivi con nessuno dei quattro agenti a qualunque concentrazione. Uno studio delle sostanze indefinite presenti in una popolazione di 100 campioni clinici negativi ha dimostrato che le sostanze indefinite non sembrano inibire la generazione di un segnale positivo nell'ambito del test *digene* HC2 GC-ID DNA, se messe a confronto con il segnale generato in fase di analisi dell'organismo GC in STM.

Tabella 21. Effetto delle sostanze interferenti sui risultati del test.

		Risultato del test <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA				Specimen Transport Medium (STM)	
Sostanza Interfaccia	Conc.	Campioni clinici raggruppati		Campioni clinici raggruppati		Positivo*	
		Negativo	Positivo*	Negativo	Positivo*	RLU/CO	Osservato
		RLI/CO	Osservato	RLU/CO	Osservato	RLU/CO	Osservato
Nessuna (Controllo)		0,15	ND	3,41	ND	2,70	ND
Sangue	1%	0,21	+37%	3,17	-7%	3,21	+19%
	5%	0,19	+22%	3,11	-9%	3,05	+13%
Lavanda vaginale	1%	0,21	+37%	3,48	+2%	2,80	+4%
	5%	0,18	+20%	3,47	+2%	3,20	+18%
Pomata antifungina	1%	0,19	+20%	3,60	+5%	2,95	+9%
	5%	0,20	+30%	3,52	+3%	3,09	+14%
Spermicida	1%	0,08	-54%	3,18	-7%	2,98	+10%
	5%	0,08	-54%	3,24	+5%	3,10	+15%

* con aggiunta di 10^3 CFU/ml di organismo di *Neisseria gonorrhoeae* auxotipo 1.

EFFETTO DEL SANGUE E DI ALTRE SOSTANZE SUI CAMPIONI IN PRESERVCYT

La valutazione delle sostanze interferenti specifiche, come descritto nella sezione precedente per i campioni STM, non è stata condotta usando i campioni in soluzione PreservCyt. Tuttavia, i campioni in soluzione PreservCyt non si prevede esibiscano profili di interferenza diversi dai campioni STM poiché il sito anatomico per il prelievo dei campioni endocervicali è uguale per sia per la soluzione PreservCyt che per i campioni STM e poiché il campione in soluzione PreservCyt è soggetto a una procedura di conversione (illustrata nel kit *digene* HC2 di conversione del campione) che lo rende confrontabile nella composizione con un campione STM.

Tampone di conversione del campione residuo (SCB)¹ può essere presente in tracce nei campioni in soluzione PreservCyt completamente convertiti. Quindi, è stato completato uno studio analitico per verificare le prestazioni analitiche del test *digene* HC2 GC-ID DNA in presenza di importi variabili di SCB. Le concentrazioni variabili di plasmidi GC DNA sono state preparate in STM. Volumi in eccesso di SCB sono stati quindi aggiunti ai campioni e sono stati testati tre dosaggi per ogni campione per derivare una media di RLU/CO per ogni campione in presenza della soluzione PreservCyt o SCB. Confrontando questi valori medi di RLU/CO per ogni campione con i valori medi RLU/CO per ogni campione di controllo STM, sono risultati dei falsi positivi o dei falsi negativi.

¹ Il tampone per la conversione del campione è una soluzione con Eosina Y e lo 0,05% di sodio azide, necessaria per la conversione di un campione PreservCyt. Fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit *digene* HC2 di conversione del campione di QIAGEN per gli specifici dettagli.

PRECISIONE AL VALORE SOGLIA DEL TEST *digene* HC2 GC-ID DNA CON CAMPIONI CLINICI PRELEVATO IN STM

Uno studio ha stabilito la riproducibilità del test *digene* HC2 GC-ID DNA su campioni clinici prelevati in STM con l'impiego di 30 pool clinici (15 positivi e 15 negativi) preparati mettendo insieme campioni prelevati con lo spazzolino e precedentemente denaturati, prelevati in STM. I campioni sono stati analizzati in quattro replicati nell'arco di cinque giorni, per un totale di 20 replicati per ogni campione. L'analisi è stata effettuata con l'impiego del test *digene* HC2 GC-ID DNA. La Tabella 22 illustra il valore RLU/CO medio, gli intervalli di confidenza al 95% relativi ai risultati positivi medi e percentuali calcolati per ciascun campione nel giro di cinque giorni.

Tabella 22. RLU/CO medio con intervalli di confidenza e percentuali dei risultati positivi al test *digene* HC2 GC-ID DNA (ordine decrescente in base a RLU/CO medio).

N.	RLU/CO	95% CI	% di positivi
1	1,92	1,31-2,00	100 (20/20)
2	1,22	1,16-1,29	100 (20/20)
3	1,21	1,16-1,25	100 (20/20)
4	1,21	1,16-1,25	90 (18/20)
5	1,17	1,03-1,28	100 (20/20)
6	1,14	1,09-1,18	90 (18/20)
7	1,08	1,04-1,12	80 (16/20)
8	1,05	1,00-1,09	70 (14/20)
9	1,05	1,01-1,09	70 (14/20)
10	1,02	0,98-1,06	65 (13/20)
11	1,00	0,96-1,03	65 (13/20)
12	1,00	0,97-1,03	45 (9/20)
13	1,00	0,96-1,03	40 (8/20)
14	0,98	0,95-1,02	45 (9/20)
15	0,91	0,89-0,94	10 (2/20)
16	0,90	0,87-0,92	0 (0/20)
17	0,87	0,84-0,91	5 (1/20)
18	0,86	0,83-0,89	0 (0/20)
19	0,84	0,82-0,85	0 (0/20)
20	0,82	0,79-0,85	0 (0/20)
21	0,79	0,75-0,82	0 (0/20)
22	0,77	0,78-0,80	0 (0/20)
23	0,76	0,74-0,79	0 (0/20)
24	0,75	0,78-0,79	0 (0/20)
25	0,73	0,70-0,75	0 (0/20)
26	0,56	0,54-0,59	0 (0/20)
27	0,56	0,54-0,59	0 (0/20)
28	0,56	0,53-0,59	0 (0/20)
29	0,54	0,52-0,56	0 (0/20)
30	0,12	0,11-0,13	0 (0/20)

I campioni con un RLU/CO medio superiore al 20% o più rispetto al valore soglia risultavano positivi o presunti positivi il 97% delle volte, mentre i campioni con un RLU/CO medio inferiore del 20% o più rispetto al valore soglia risultavano negativi il 100% delle volte. Questi risultati indicano che i campioni discordi del 20% o più dal valore soglia possono produrre risultati coerenti con il test *digene* HC2 GC-ID DNA.

I campioni con valori vicini al valore soglia rimanevano ampiamente positivi o negativi; quelli che erano al di sopra del valore soglia ma entro il 20% discorde restavano positivi o presunti positivi il 69,4% delle volte. I campioni al di sotto del valore soglia ma entro il 20% discorde restavano negativi il 91,4% delle volte.

Questi risultati dimostrano che il test *digene* HC2 GC-ID DNA dà luogo a risultati riproducibili con i campioni clinici prelevati in STM i cui valori RLU/CO rientrano nel 20% di distanza dal valore soglia.

CENNI STORICI

In passato, si usava il luminometro modello MLX Dynex, in aggiunta al DML 2000, per generare i dati e stabilire le caratteristiche del test *digene* HC2 GC-ID DNA. Il luminometro MLX non è più disponibile ed ora si usa ancora solo il DML 2000 per generare i risultati. I dati seguenti provengono da uno studio clinico multicentrico condotto per stabilire la riproducibilità del calibratore positivo e del calibratore negativo e vengono forniti di seguito come cenni storici.

Per determinare la riproducibilità del calibratore positivo e del calibratore negativo e calcolare la frequenza alla quale potrebbe essere necessario procedere a un ricalcolo manuale, sono stati compilati i risultati delle valutazioni cliniche comprendenti 79 test eseguiti con il test *digene* HC2 GC-ID DNA (Tabella 23). I risultati mostravano che il %CV medio per questi 79 test era del 5,79% e che nessun ciclo aveva valori medi di calibratore negativo superiori a 150 RLU. Considerati tutti e 3 i replicati del calibratore positivo per ogni ciclo di test, la riproducibilità del calibratore superiore al 20% CV veniva osservata solo per 1 su 79 test (1,3%) e la %CV veniva ricalcolata. Dopo il ricalcolo, il %CV del test restava sotto il 15%, il che indica che tutti i test erano validi.

Tabella 23. Prestazioni del calibratore positivo e del calibratore negativo. Dati combinati dello studio clinico multicentrico e dello studio di precisione. (n = 79 test)

Strumento	N. di test	Media dei rapporti S/N	Tipo di Calibratore	Media delle medie calcolate (RLU)		Media dei %CV calcolati	
				Tre replicati	Aggiustata per valori esclusi	Tre replicati	Aggiustata per valori esclusi
DML2000	9	7,71	Negativo	40,300	34,470	18,960	12,240
			Positivo	292,370	292,370	6,670	6,670
MLX*	70	4,52	Negativo	0,076	0,070	13,830	12,360
			Positivo	0,292	0,292	5,674	5,674

*Non più disponibile.

EQUIVALENZA TRA CAMPIONI IN STM E SOLUZIONE PRESERVCYT

L'equivalenza tra i campioni in STM e soluzione PreservCyt è stata esaminata in una valutazione clinica di 1252 campioni cervicali accoppiati. Un campione in soluzione PreservCyt è stato elaborato secondo le istruzioni per l'uso del kit *digene* HC2 di conversione del campione e testato insieme a un campione STM accoppiato STM con il test *digene* HC2 GC-ID DNA. I risultati di questo studio di valutazione sono presentati nella Tabella 24. La prestazione clinica è stata determinata usando campioni di soluzione PreservCyt con un volume residuo maggiore di 6,5 ml. Il test di campioni con volumi residui da 4,0 a 6,5 ml dovrà essere convalidato dal laboratorio.

Tabella 24. Riepilogo dei dati statistici per Concordanza del test *digene* HC2 GC-ID DNA tra i campioni cervicali accoppiati prelevati in STM e soluzione PreservCyt.

Moltitudine	Kappa 95% CI	Concordanza positiva (n/N) 95% CI	Concordanza negativa (n/N) 95% CI	Concordanza totale (n/N) 95% CI
Dati zona equivoca Esclusione	0,96 0,92, 0,99	98,00 (49/50) 89,35, 99,95	99,75 (1181/1184) 99,26, 99,95	99,68 (1230/1234) 99,17, 99,91
Algoritmo nuovo test zona equivoca	0,93 0,88, 0,98	91,80 (56/61) 81,90, 97,28	99,75 (1188/1191) 99,27, 99,95	99,36 (1244/1252) 98,74, 99,72

*I campioni nell'intervallo RLU/CO 1,0 a 2,5 sono stati nuovamente testati in duplicato. La classificazione dei campioni è stata quindi determinata usando due regole su tre.

La riproducibilità del test *digene* HC2 GC-ID DNA è stata valutata come parte di una valutazione clinica, per dimostrare che sono stati ottenuti risultati del test hc2 DNA del GC-ID equivalenti quando è stato testato un pannello di 20 campioni in soluzione PreservCyt per 3 giorni in tre laboratori. I risultati di questo studio di riproducibilità sono presentati nella Tabella 26, riportata di seguito.

Tabella 25. Percentuale di concordanza del test *digene* HC2 GC-ID DNA in base al centro.

Centro	Osservati/Previsti*	% concordanza (95% CI)
1	60/60	100 (94,04, 100)
2	60/60	100 (94,04, 100)
3	59/60	98,33 (91,06, 99,96)
Tutti i centri messi insieme	179/180	99,44 (96,94, 99,99)

20 membri x 3 giorni x 3 centri.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

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

GUIDA ALLA INDIVIDUAZIONE E CORREZIONE DEGLI ERRORI

TEST <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA		
PROBLEMA OSSERVATO	CAUSE PROBABILI	SOLUZIONI
Cambiamento di colore non corretto o non osservato durante la denaturazione.	Reagente di denaturazione non aggiunto o non preparato correttamente.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Verificare che il reagente di denaturazione contenga l'indicatore e sia di colore viola scuro. 2. Verificare che al campione sia stato aggiunto il reagente di denaturazione, misurando il volume del campione (deve essere 1,5 ml). Se dal volume si evince che non è stato aggiunto il reagente di denaturazione, aggiungerlo correttamente, miscelare e procedere con il test, se viene osservato il cambiamento di colore corretto.
	Il campione contenente sangue può mascherare il cambiamento di colore.	Con questi tipi di campioni non è previsto il preciso cambiamento di colore descritto; ciò non influisce negativamente sui risultati del test.
	Il pH del campione potrebbe essere insolitamente acido.	Il campione può essere insolitamente acido, pertanto il cambiamento di colore previsto non si verifica. Prelevare un nuovo campione <u>prima</u> di applicare acido acetico sulla cervice, poiché un pH non corretto del campione influisce negativamente sui risultati del test.
I controlli di qualità forniscono risultati errati.	È stato scelto un protocollo software non corretto per il test	Se il protocollo software non è quello previsto per il test specifico, la piastra deve essere riletta entro 30 minuti dopo l'aggiunta del Reagente di rilevazione 2 e con il protocollo corretto.
	È stata invertita la posizione di QC CT e QC GC.	Rianalizzare i campioni.
Cambiamento di colore non corretto osservato durante l'ibridazione.	<ul style="list-style-type: none"> • Miscelazione inadeguata della miscela delle sonde con i calibratori denaturati, i controlli di qualità e/o i campioni. • Miscela della sonda non aggiunta. • Aggiunta del volume scorretto di reagente. 	Agitare la micropiastra d'ibridazione per altri 2 minuti. Se ci sono pozzetti che rimangono ancora di colore viola o grigio, aggiungere altri 25 µl di miscela della sonda e miscelare bene. Se, dopo l'aggiunta della sonda e la miscelazione, non si ottiene il cambiamento di colore corretto e il campione non conteneva sangue o altri materiali, occorrerà rianalizzarlo.
	Il campione contenente sangue può mascherare il cambiamento di colore.	Con questi tipi di campioni non è previsto il preciso cambiamento di colore descritto; ciò non influisce negativamente sui risultati del test.
	Il campione aveva < 1000 µl di <i>digene</i> Specimen Transport Medium (STM).	Controllare il volume del campione originale. Il volume deve essere 1425 µl ± 20 µl (dopo aver tolto 75 µl). Se il volume è <1405 µl, il campione originale conteneva <1000 µl di STM. Procurarsi un nuovo campione.
Il test non risponde ai criteri di verifica della calibrazione. Nessun segnale osservato nel calibratore positivo, nei controlli di qualità o nei campioni.	Sonda non aggiunta al relativo diluente.	Preparare la miscela delle sonde GC come descritto nella sezione Preparazione e conservazione dei reagenti delle presenti istruzioni per l'uso. Miscelare accuratamente. Apporre la giusta etichetta sulla provetta. Ripetere il test, usando una miscela di sonde appena preparata.
	Sonda contaminata da ribonucleasi durante la preparazione.	Per pipettare la sonda utilizzare pipette con puntali dotati di barriera di contenimento dell'aerosol e indossare guanti privi di polveri. Diluire la sonda in un contenitore sterile. Utilizzare solo contenitori per reagenti monouso, nuovi, puliti.
	Miscelazione inadeguata della miscela della sonda e del relativo diluente.	Dopo avere aggiunto la sonda all'apposito diluente, miscelare bene, agitando ad alta velocità per almeno 5 secondi. Deve formarsi un vortice visibile.
	Miscelazione inadeguata della sonda diluita e del campione denaturato.	Dopo aver aggiunto miscela della sonda al campione denaturato, coprire la micropiastra d'ibridazione e agitare sull'Agitatore rotante I impostato a 1100 ± 100 giri/minuto per 3 ± 2 minuti, come descritto nella Metodica del test, sezione Ibridazione, punto 6 delle presenti istruzioni per l'uso. Controllare che la colorazione di ogni pozzetto sia passata da viola a giallo.

TEST *digene* HC2 GC-ID DNA

PROBLEMA OSSERVATO	CAUSE PROBABILI	SOLUZIONI
	Tempo o temperatura non corretti durante la fase di ibridazione.	Ibridare per 60 ± 5 minuti a 65 ± 2 °C, come descritto nella Metodica del test, sezione Ibridazione, punto 7 delle presenti istruzioni per l'uso. Controllare la temperatura del riscaldatore di micropiastre I. Assicurarsi che l'apparecchio sia impostato per riscaldare i campioni alla temperatura corretta e che, prima dell'uso, sia stato sottoposto ad un periodo di pre-riscaldamento di 1 ora.
	Miscelazione inadeguata durante la fase di cattura.	Agitare sull'agitatore rotante I a 1100 ±100 giri/minuto per 60 ± 5 minuti a 20-25 °C, come descritto nella Metodica del test, sezione Cattura dell'ibrido, punto 7 delle presenti istruzioni per l'uso. Verificare la velocità dell'agitatore rotante I mediante calibrazione, come descritto nella sezione relativa alla calibrazione della velocità agitatore nel manuale d'uso dell'agitatore rotante I.
	<ul style="list-style-type: none"> Quantità corretta di Reagente di rilevazione 1 non aggiunta. Mancata incubazione per il tempo specificato. 	<p>Pipettare 75 µl di reagente di rilevazione 1 in ogni pozzetto utilizzando un pipettatore a 8 canali.</p> <p>Incubare a 20–25 °C per 30-45 minuti.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> Quantità corretta di Reagente di rilevazione 2 non aggiunta. Mancata incubazione per il tempo specificato. 	<p>Pipettare 75 µl di reagente di rilevazione 2 in ogni pozzetto utilizzando un pipettatore a 8 canali. Incubare a 20–25 °C per 15-30 minuti.</p>
	Malfunzionamento o programmazione scorretta del luminometro.	Per ulteriori istruzioni consultare le sezioni Manutenzione e Individuazione e correzione degli errori nella rispettiva guida del software di analisi del test <i>digene</i> oppure rivolgersi all'assistenza tecnica QIAGEN.
Valori RLU elevati nei calibratori, controlli di qualità e/o nei campioni (≥150 RLU in molti o tutti i pozzetti). Il test potrebbe non essere conforme ai criteri di convalida.	<ul style="list-style-type: none"> Reagente di denaturazione non aggiunto o aggiunta del volume scorretto di reagente; oppure miscelazione inadeguata del reagente di denaturazione con i calibratori, i controlli di qualità e i campioni. Temperatura del bagno d'acqua e livello dell'acqua inadeguati. 	<ul style="list-style-type: none"> Verificare che il pipettatore a ripetizione eroghi le quantità corrette, prima di aggiungere il reagente di denaturazione. È essenziale utilizzare pipettatori calibrati. Aggiungere metà volume di reagente di denaturazione e miscelare bene. Per evitare risultati falsi positivi, assicurarsi che il liquido bagni l'intera superficie interna della provetta (capovolgere una volta la provetta se si esegue la miscelazione manuale). Calibratori, controlli di qualità e campioni dovrebbero assumere una colorazione viola dopo l'aggiunta del reagente di denaturazione. Controllare la calibrazione della velocità del Vortexer per provette multicampione 2. Controllare il livello dell'acqua e la temperatura del bagno d'acqua.
	<ul style="list-style-type: none"> Lieve perdita del luminometro. Guarnizione rotta. Sportello non sigillato. 	Controllare la lettura del rumore di fondo (misurazione dei dati grezzi) del luminometro, leggendo una micropiastro vuota. Una lettura superiore a 50 RLU indica l'esistenza di una lieve perdita. Per ulteriori istruzioni consultare le sezioni Manutenzione e Individuazione e correzione degli errori nella rispettiva guida del software di analisi del test <i>digene</i> oppure rivolgersi all'assistenza tecnica QIAGEN.
	Contaminazione del reagente di rilevazione 2 o dei pozzetti della micropiastro di cattura da parte del reagente di rilevazione 1 o fosfatasi alcalina esogena.	Fare riferimento al controllo della contaminazione riportato in questa sezione relativa all'individuazione e correzione degli errori.
	Tampone di lavaggio contaminato.	Fare riferimento al controllo della contaminazione riportato in questa sezione relativa all'individuazione e correzione degli errori.
	Lavatore automatico di micropiastre contaminato.	Fare riferimento al controllo della contaminazione riportato in questa sezione relativa all'individuazione e correzione degli errori.

TEST *digene* HC2 GC-ID DNA

PROBLEMA OSSERVATO	CAUSE PROBABILI	SOLUZIONI
	Lavaggio inadeguato dei pozzetti della micropiastra di cattura dopo l'incubazione del reagente di rilevazione 1.	Lavare bene i pozzetti della micropiastra con il tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare o utilizzando il Lavatore automatico di micropiastre. Dopo il lavaggio, nei pozzetti non devono essere presenti tracce visibili di liquido rosa residuo. Vedere la sezione relativa all'individuazione e correzione degli errori del <i>manuale d'uso del Lavatore automatico di micropiastre</i> , per istruzioni relative alla verifica della contaminazione o di guasti.
	Contaminazione dei pozzetti della micropiastra da parte del reagente di rilevazione 1.	Verificare che tutte le superfici di lavoro siano pulite e asciutte. Prestare attenzione quando si utilizza il reagente di denaturazione 1. Evitare gli aerosol.
	Asciugatura della soluzione di ibridazione nello stesso punto delle salviette Kimtowels o equivalenti salviette di carta a basso rilascio di fibre. Impiego di salviette non corrette per asciugare.	Non asciugare sulla stessa area delle salviette Kimtowels o equivalenti salviette di carta a basso rilascio di fibre. Utilizzare per l'asciugatura salviette Kimtowels o equivalenti salviette di carta a basso rilascio di fibre.
	Materiale per il controllo di qualità GC utilizzato come calibratore positivo. Il test non supera la convalida.	Assicurarsi che i calibratori e i controlli siano inseriti correttamente.
Rapporti PC/NC bassi o elevato numero di campioni bassi positivi (>20% dei campioni totali) con un rapporto RLU/CO di <2,0. Il test potrebbe non essere conforme ai criteri di convalida.	Preparazione inadeguata del campione.	Aggiungere il volume corretto di reagente di denaturazione e miscelare bene, agitando. Per evitare risultati falsi positivi, assicurarsi che il liquido bagni l'intera superficie interna della provetta agitando con il Vortexer per provette multicampione 2 per almeno 5 secondi (per la metodica di agitazione manuale, agitare per almeno 5 secondi e capovolgere la provetta una volta). Si dovrebbe osservare un netto cambiamento di colore da trasparente a viola scuro. Incubare per 45 ± 5 minuti a 65 ± 2 °C. Quando si utilizzano i campioni della soluzione PreservCyt, è probabile che questi ibridi siano presenti sulle pareti interne della provetta di conversione del campione. Per impedire possibili residui di questo materiale cellulare non denaturato, il puntale della pipetta non deve toccare i lati della provetta di conversione del campione durante il trasferimento del campione denaturato nel pozzetto della micropiastra utilizzato per l'ibridazione della sonda CT/GC. Fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit <i>digene</i> HC2 di conversione del campione per dettagli procedurali.
	Sonda non miscelata adeguatamente o quantità di sonda insufficiente aggiunta ai test.	Preparare la miscela delle sonde come descritto. Miscelare bene, agitando e verificando che venga prodotto un vortice visibile. La miscela della sonda deve essere aggiunta nei pozzetti con un pipettatore multicanale o a ripetizione, per garantirne la corretta dispensazione.
	Aggiunta di un volume inadeguato di miscela della sonda in ogni pozzetto di micropiastra di ibridazione.	Verificare che il pipettatore a 8 canali eroghi le quantità corrette, prima di aggiungere la miscela della sonda nella micropiastra d'ibridazione. 25 µl di miscela della sonda devono essere aggiunti al campione denaturato sul fondo di ogni micropozzetto. Verificare che il pipettatore a 8 canali eroghi in modo accurato, prima di aggiungere miscela della sonda ai pozzetti di ibridazione. Dopo l'aggiunta e la completa miscelazione della miscela della sonda, dovrebbe avvenire il cambiamento di colore da viola scuro a giallo.
	Perdita di attività da parte del reagente di rilevazione 1.	Conservare il reagente di rilevazione 1 a 2–8 °C. Utilizzarlo prima della data di scadenza, indicata sull'etichetta della confezione esterna del kit.
	Cattura insufficiente di RNA: Ibridi DNA.	La fase di cattura dovrebbe essere eseguita utilizzando l'agitatore rotante I impostato a 1100 ± 100 giri/minuto. Verificare la velocità dell'agitatore come descritto nella sezione relativa alla calibrazione della velocità agitatore nel manuale d'uso dell'agitatore rotante I.

TEST *digene* HC2 GC-ID DNA

PROBLEMA OSSERVATO	CAUSE PROBABILI	SOLUZIONI
	Lavaggio inadeguato.	Lavare bene i pozzetti della micropiastra con tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare oppure utilizzare il Lavatore automatico di micropiastre.
	Tampone di lavaggio contaminato.	Fare riferimento al controllo della contaminazione riportato in questa sezione relativa all'individuazione e correzione degli errori.
Serie di campioni positivi con valori RLU pressoché identici.	Contaminazione dei pozzetti della micropiastra di cattura durante la manipolazione del test.	Coprire i pozzetti della micropiastra di cattura durante tutte le incubazioni. Evitare di esporre i pozzetti della micropiastra alla contaminazione di aerosol mentre si esegue il test. Indossare guanti privi di polveri durante la manipolazione.
	Contaminazione del reagente di rilevazione 2	Prestare attenzione a non contaminare lo stock quando si pipetta il reagente di rilevazione 2 nei pozzetti della micropiastra di cattura. Evitare la contaminazione del reagente di rilevazione 2 da parte di aerosol provenienti dal reagente di rilevazione 1 o da polvere presente in laboratorio, ecc.
	Guasto del Lavatore automatico di micropiastre.	Fare riferimento al controllo della contaminazione riportato in questa sezione relativa all'individuazione e correzione degli errori oppure vedere la sezione relativa all'individuazione e correzione degli errori del <i>manuale d'uso del Lavatore automatico di micropiastre</i> per istruzioni relative alla verifica della contaminazione o all'identificazione di guasti.
%CV ampi fra i replicati.	Pipettamento scorretto (ad es. bolle d'aria, pipetta non calibrata).	Controllare il pipettatore per verificare che continui ad erogare volumi riproducibili. Calibrare i pipettatori di routine.
	Miscelazione insufficiente	Miscelare bene in tutte le fasi. Agitare prima e dopo l'incubazione per la denaturazione. Verificare che venga prodotto un vortice visibile.
	Trasferimento incompleto del liquido dalla micropiastra di ibridazione ai pozzetti della micropiastra di cattura.	Prestare attenzione durante la fase di trasferimento dalla micropiastra d'ibridazione alla micropiastra di cattura, in modo da assicurare che vengano trasferiti volumi riproducibili.
	Condizioni di lavaggio improprie.	Lavare bene i pozzetti della micropiastra con tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare oppure utilizzare il Lavatore automatico di micropiastre seguendo i relativi protocolli.
	Contaminazione dei pozzetti della micropiastra da parte del reagente di rilevazione 1.	Verificare che tutte le superfici di lavoro siano pulite e asciutte. Prestare attenzione quando si utilizza il reagente di denaturazione 1. Evitare gli aerosol.
	Contaminazione della punta della pipetta con materiale non denaturato durante il trasferimento del campione denaturato nel pozzetto della micropiastra utilizzato per l'ibridazione della sonda GC.	La fase di denaturazione della procedura di elaborazione del campione deve essere eseguita come indicato in queste istruzioni. L'agitazione non corretta del campione, l'inversione della provetta e l'agitazione possono provocare una denaturazione incompleta degli ibridi RNA:DNA non specifici endogeni in campioni cervicali. Quando si utilizzano campioni di soluzione PreservCyt in particolare, questi ibridi possono essere presenti nelle pareti interne della provetta di conversione del campione. Per impedire possibili residui di questo materiale cellulare non denaturato, la punta della pipetta non deve toccare i lati della provetta di conversione del campione durante il trasferimento dei campioni denaturati nella microprovetta o nella micropiastra verranno utilizzati per l'ibridazione della sonda GC.
	Asciugatura sulla stessa area delle salviette Kimtowels per diverse file.	Non asciugare sulla stessa area delle salviette Kimtowels.
Falsi positivi ottenuti su campioni la cui negatività è nota.	Reagente di rilevazione 2 contaminato.	Prestare attenzione a non causare la contaminazione crociata di campioni quando si aggiunge il reagente di rilevazione 2 da un campione all'altro. Se si utilizza il kit solo in parte, dosare il volume necessario per il test in un contenitore per reagenti pulito, prima di riempire il pipettatore.

TEST *digene* HC2 GC-ID DNA

PROBLEMA OSSERVATO	CAUSE PROBABILI	SOLUZIONI
	Contaminazione dei pozzetti della micropiastra da parte del reagente di rilevazione 1.	Lavare bene i pozzetti della micropiastra con il tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare o utilizzando il Lavatore automatico di micropiastre. Dopo il lavaggio, nei pozzetti non devono essere presenti tracce visibili di liquido rosa residuo.
	Contaminazione della punta della pipetta con materiale non denaturato durante il trasferimento del campione denaturato nel pozzetto della micropiastra utilizzato per l'ibridazione della sonda GC.	La fase di denaturazione della procedura di elaborazione del campione deve essere eseguita come indicato in queste istruzioni. L'agitazione non corretta del campione, l'inversione della provetta e l'agitazione possono provocare una denaturazione incompleta degli ibridi RNA:DNA non specifici endogeni in campioni cervicali. Quando si utilizzano campioni di soluzione PreservCyt in particolare, questi ibridi possono essere presenti nelle pareti interne della provetta di conversione del campione. Per impedire possibili residui di questo materiale cellulare non denaturato, la punta della pipetta non deve toccare i lati della provetta di conversione del campione durante il trasferimento dei campioni denaturati nella microprovetta o nella micropiastra verranno utilizzati per l'ibridazione della sonda GC.
	Preparazione inadeguata del campione.	Aggiungere il volume corretto di reagente di denaturazione e miscelare bene agitando. Per evitare risultati falsi positivi, assicurarsi che il liquido vada a lavare l'intera superficie interna della provetta agitando con il Vortexer per provette multicampione 2 per almeno 5 secondi (per la metodica di agitazione manuale, capovolgere la provetta una volta). Si dovrebbe osservare un netto cambiamento di colore da trasparente a viola scuro. Incubare per 45 ± 5 minuti a 65 ± 2 °C. Quando si utilizzano i campioni della soluzione PreservCyt, è probabile che questi ibridi siano presenti sulle pareti interne della provetta di conversione del campione. Per impedire possibili residui di questo materiale cellulare non denaturato, il puntale della pipetta non deve toccare i lati della provetta di conversione del campione durante il trasferimento del campione denaturato nel pozzetto della micropiastra utilizzato per l'ibridazione della sonda CT/GC. Fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit <i>digene</i> HC2 di conversione del campione per dettagli procedurali.
	Condizioni di lavaggio improprie.	Lavare bene i pozzetti della micropiastra con tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare oppure utilizzare il Lavatore automatico di micropiastre seguendo i relativi protocolli.
Elevati valori RLU del calibratore negativo (>150 RLU). Il resto del test viene eseguito come previsto.	Il reagente di rilevazione 2 è stato incubato a una temperatura maggiore di 20–25 °C.	Il test non è valido a causa di valori negativi alti del calibratore. Rieseguire il test e fare in modo che durante le fasi di cattura e rilevazione l'incubazione avvenga a 20–25 °C.
	Il reagente di rilevazione 2 è stato incubato per un periodo superiore ai 30 minuti.	Leggere la piastra dopo 15 minuti di incubazione (e non oltre 30 minuti) a 20–25 °C.
	Il reagente di rilevazione 2 o il tampone di lavaggio sono stati contaminati da fosfatasi alcalina o reagente di rilevazione 1.	Fare riferimento al controllo della contaminazione riportato in questa sezione relativa all'individuazione e correzione degli errori.

CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE

Reagente valutato	Procedura di controllo della contaminazione	Interpretazione dei risultati
<p>Nota: prestare attenzione quando si pipetta il reagente di rilevazione 2 per evitare la contaminazione. Indossare guanti ed evitare di far toccare i puntali della pipetta con qualsiasi superficie di lavoro.</p>		
Reagente di rilevazione 2	<ul style="list-style-type: none"> Pipettare 75 µl della fiala dosata, residua e/o originale del reagente di rilevazione 2 in un pozzetto vuoto per micropiastra di cattura. Incubare a 20-25 °C per 15 minuti. Evitare la luce solare diretta. Leggere i pozzetti per micropiastra nel luminometro. <p>Nota: il test del reagente di rilevazione 2 in replicati di 3 fornisce un'ottima valutazione delle prestazioni.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Il controllo del reagente di rilevazione 2 deve essere < 50 RLU. Se i valori del reagente di rilevazione 2 sono < 50 RLU, il reagente di rilevazione 2 può essere utilizzato per ripetere il dosaggio. Se contaminato (>50 RLU), richiedere un nuovo kit e ripetere il dosaggio.
Sistema di lavaggio e/o sorgente d'acqua	<ul style="list-style-type: none"> Pipettare 75 µl di reagente di rilevazione 2 in 4 pozzetti per micropiastra di cattura separati. Etichettare i pozzetti 1-4. Il pozzetto 1 serve per il controllo del reagente di rilevazione 2. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dal flacone di lavaggio nel pozzetto 2. Lasciare scorrere il tampone di lavaggio attraverso la tubazione del lavatore. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dalla tubazione nel pozzetto 3. Ottenere un dosaggio di acqua utilizzato per preparare il tampone di lavaggio. Pipettare 10 µl di acqua nel pozzetto 4. Incubare a 20-25 °C per 15 minuti. Evitare la luce diretta del sole. Leggere i pozzetti per micropiastra nel luminometro. 	<ul style="list-style-type: none"> Il controllo del reagente di rilevazione 2 (pozzetto 1) deve essere < 50 RLU. Confrontare il valore RLU derivato dai pozzetti 2, 3 e 4 con il valore RLU del controllo del reagente di rilevazione 2 (pozzetto 1). I singoli valori RLU per i pozzetti 2, 3 e 4 non devono superare di 50 RLU il valore RLU del controllo del reagente di rilevazione 2 (pozzetto 1). I valori che superano di 50 RLU il controllo del reagente di rilevazione 2 indicano contaminazione. Vedere la Preparazione e conservazione dei reagenti per le istruzioni sulla pulizia e la manutenzione del sistema di lavaggio.
Lavatore automatico di micropiastre	<ul style="list-style-type: none"> Pipettare 75 µl di reagente di rilevazione 2 in 5 pozzetti per micropiastra di cattura separati. Etichettare i pozzetti 1-5. Il pozzetto 1 serve per il controllo del reagente di rilevazione 2. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dal flacone del lavatore di micropiastre con l'etichetta <i>Wash</i> nel pozzetto 2. Pipettare 10 µl del liquido di risciacquo dal flacone del lavatore di micropiastre con l'etichetta <i>Rinse</i> nel pozzetto 3. Premere il tasto Prime sulla tastiera del lavatore di micropiastre, lasciando scorrere il tampone di lavaggio attraverso i tubi. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dal canale nel pozzetto 4. Premere il tasto Rinse sulla tastiera del lavatore di micropiastre, lasciando scorrere il liquido di risciacquo attraverso i tubi. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dal canale nel pozzetto 5. Coprire e incubare per 15 minuti a 20-25 °C. Evitare la luce diretta del sole. Leggere i pozzetti per micropiastra nel luminometro. 	<ul style="list-style-type: none"> Il controllo del reagente di rilevazione 2 (pozzetto 1) deve essere < 50 RLU. Confrontare il valore RLU derivato dai pozzetti 2, 3, 4 e 5 con il valore RLU del controllo del reagente di rilevazione 2 (pozzetto 1). I singoli valori RLU per i pozzetti 2, 3, 4 e 5 non devono superare di 50 RLU il valore RLU del controllo del reagente di rilevazione 2 (pozzetto 1). I valori che superano di 50 RLU il controllo del reagente di rilevazione 2 indicano la contaminazione del lavatore di micropiastre. Vedere la procedura di decontaminazione nel <i>manuale d'uso del Lavatore automatico di micropiastre</i>.

INFORMAZIONI PER COMUNICARE CON QIAGEN

Per contattare il rappresentante locale QIAGEN, utilizzare il foglio con le informazioni per le comunicazioni fornito con il prodotto.

QIAGEN[®], *digene*[®], Hybrid Capture[®] e Rapid Capture[®] sono marchi registrati di QIAGEN.

La tecnologia Hybrid Capture è coperta dal brevetto europeo n° 0 667 918 registrato in Austria, Belgio, Svizzera, Liechtenstein, Germania, Danimarca, Spagna, Francia, Regno Unito, Grecia, Irlanda, Italia, Lussemburgo, Paesi Bassi e Svezia.

Brevetti USA Hybrid Capture N.: 6,228,578B1

Riconoscimenti di marchi:

ThinPrep[®] e PreservCyt[®]: Hologic Corporation

Kimtowels[®]: Kimberly-Clark Corporation

Eppendorf[®] e Repeater[®]: Eppendorf-Netheler-Hinz

CDP-Star[®]: Tropix, Inc.

Parafilm[®]: American Can Co.

DuraSeal[®]: Diversified Biotech, Inc.

Sarstedt[®]: SARSTEDT AG & Co.

pGEM[®]: Promega Corporation

VWR[®]: VWR International, Inc.

Corning[®]: Corning, Inc.

RIEPILOGO DEL TEST *digene* HC2 GC-ID DNA

Importante: prima di utilizzare questo riepilogo è necessario avere acquisito piena familiarità con tutti i dettagli della procedura.

PROCEDURA					
Denaturazione (Per i campioni in soluzione PreservCyt, vedere la procedura di preparazione dei campioni in soluzione PreservCyt)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 50%; text-align: center;">Metodica di agitazione manuale</th> <th style="width: 50%; text-align: center;">Metodica per Vortexer per provette multicampione 2</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;"> Creare un layout di piastre Etichettare la piastra di ibridazione. Preparare il reagente di denaturazione. ↓ Pipettare il reagente di denaturazione (volume equivalente a metà del volume del campione) nei calibratori, controlli di qualità e nei campioni. Agitare ciascun campione, calibratore e controllo di qualità singolarmente per 5 secondi ad alta velocità e capovolgere (per ulteriori informazioni consultare le presenti istruzioni per l'uso). ↓ Controllare che tutte le provette siano di colore viola. ↓ Incubare a 65 ± 2 °C per 45 ± 5 minuti. ↓ Preparare la miscela della sonda per GC. ↓ ↓ ↓ ↓ </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;"> Creare un layout di piastre. Etichettare la piastra di ibridazione. Preparare il reagente di denaturazione. ↓ Pipettare il reagente di denaturazione (volume equivalente a metà del volume del campione) nei calibratori, controlli di qualità e nei campioni. ↓ Controllare che tutte le provette siano di colore viola. ↓ Coprire il portaprovette con la pellicola e il coperchio. ↓ Agitare per 10 secondi alla massima velocità. ↓ Incubare a 65 ± 2 °C per 45 ± 5 minuti. ↓ Preparare la miscela della sonda per GC. ↓ ↓ </td> </tr> </table>	Metodica di agitazione manuale	Metodica per Vortexer per provette multicampione 2	Creare un layout di piastre Etichettare la piastra di ibridazione. Preparare il reagente di denaturazione. ↓ Pipettare il reagente di denaturazione (volume equivalente a metà del volume del campione) nei calibratori, controlli di qualità e nei campioni. Agitare ciascun campione, calibratore e controllo di qualità singolarmente per 5 secondi ad alta velocità e capovolgere (per ulteriori informazioni consultare le presenti istruzioni per l'uso). ↓ Controllare che tutte le provette siano di colore viola. ↓ Incubare a 65 ± 2 °C per 45 ± 5 minuti. ↓ Preparare la miscela della sonda per GC. ↓ ↓ ↓ ↓	Creare un layout di piastre. Etichettare la piastra di ibridazione. Preparare il reagente di denaturazione. ↓ Pipettare il reagente di denaturazione (volume equivalente a metà del volume del campione) nei calibratori, controlli di qualità e nei campioni. ↓ Controllare che tutte le provette siano di colore viola. ↓ Coprire il portaprovette con la pellicola e il coperchio. ↓ Agitare per 10 secondi alla massima velocità. ↓ Incubare a 65 ± 2 °C per 45 ± 5 minuti. ↓ Preparare la miscela della sonda per GC. ↓ ↓
Metodica di agitazione manuale	Metodica per Vortexer per provette multicampione 2				
Creare un layout di piastre Etichettare la piastra di ibridazione. Preparare il reagente di denaturazione. ↓ Pipettare il reagente di denaturazione (volume equivalente a metà del volume del campione) nei calibratori, controlli di qualità e nei campioni. Agitare ciascun campione, calibratore e controllo di qualità singolarmente per 5 secondi ad alta velocità e capovolgere (per ulteriori informazioni consultare le presenti istruzioni per l'uso). ↓ Controllare che tutte le provette siano di colore viola. ↓ Incubare a 65 ± 2 °C per 45 ± 5 minuti. ↓ Preparare la miscela della sonda per GC. ↓ ↓ ↓ ↓	Creare un layout di piastre. Etichettare la piastra di ibridazione. Preparare il reagente di denaturazione. ↓ Pipettare il reagente di denaturazione (volume equivalente a metà del volume del campione) nei calibratori, controlli di qualità e nei campioni. ↓ Controllare che tutte le provette siano di colore viola. ↓ Coprire il portaprovette con la pellicola e il coperchio. ↓ Agitare per 10 secondi alla massima velocità. ↓ Incubare a 65 ± 2 °C per 45 ± 5 minuti. ↓ Preparare la miscela della sonda per GC. ↓ ↓				
Ibridazione	Miscelare bene i campioni denaturati, e pipettare 75 µl di campione, calibratore o controllo di qualità denaturati nei pozzetti della micropiastra. ↓ Coprire la micropiastra ed incubare per 10 ± 2 minuti a 20-25 °C. ↓ Pipettare 25 µl di miscela della sonda per GC nei pozzetti della micropiastra. ↓ Coprire la micropiastra con il coperchio e agitare sull'agitatore rotante I a 1100 ± 100 giri/minuto per 3 ± 2 minuti. <i>Controllare che tutti i pozzetti siano di colore giallo. (I campioni nella soluzione PreservCyt diventano rosa).</i> ↓ Incubare a 65 ± 2 °C per 60 ± 5 minuti. ↓ Preparare la micropiastra di cattura. ↓				
Cattura degli ibridi	Trasferire il contenuto di ciascun pozzetto di piastra d'ibridazione nel pozzetto corrispondente della micropiastra di cattura usando un pipettatore ad 8 canali. ↓ Coprire con un copripiastra o della pellicola. ↓ Agitare a 1100 ± 100 giri/minuto a 20-25 °C per 60 ± 5 minuti. Preparare il tampone di lavaggio ↓ Rovesciare e asciugare la micropiastra di cattura (per ulteriori informazioni consultare le presenti istruzioni per l'uso). ↓				
Rilevazione degli ibridi	Pipettare 75 µl di reagente di rilevazione 1 in ogni pozzetto della micropiastra di cattura. Coprire la micropiastra di cattura con il coperchio, pellicola Parafilm o materiale equivalente. Incubare a 20-25 °C per 30-45 minuti. Lavare la piastra con la metodica desiderata. ↓				
Lavaggio	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 50%; text-align: center;">Metodica di lavaggio manuale</th> <th style="width: 50%; text-align: center;">Metodica del Lavatore automatico di micropiastre</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;"> Rovesciare e asciugare la micropiastra di cattura (per ulteriori informazioni consultare le presenti istruzioni per l'uso). ↓ Lavare 6 volte. ↓ Asciugare su salviettine di carta a basso rilascio di fibre. ↓ </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;"> Porre la piastra nel lavatore e premere "START/STOP" per avviarlo. ↓ ↓ ↓ ↓ </td> </tr> </table>	Metodica di lavaggio manuale	Metodica del Lavatore automatico di micropiastre	Rovesciare e asciugare la micropiastra di cattura (per ulteriori informazioni consultare le presenti istruzioni per l'uso). ↓ Lavare 6 volte. ↓ Asciugare su salviettine di carta a basso rilascio di fibre. ↓	Porre la piastra nel lavatore e premere "START/STOP" per avviarlo. ↓ ↓ ↓ ↓
Metodica di lavaggio manuale	Metodica del Lavatore automatico di micropiastre				
Rovesciare e asciugare la micropiastra di cattura (per ulteriori informazioni consultare le presenti istruzioni per l'uso). ↓ Lavare 6 volte. ↓ Asciugare su salviettine di carta a basso rilascio di fibre. ↓	Porre la piastra nel lavatore e premere "START/STOP" per avviarlo. ↓ ↓ ↓ ↓				
Amplificazione del segnale	Pipettare 75 µl di reagente di rilevazione 2 in ogni pozzetto della micropiastra di cattura. Coprire con il copripiastra. Incubare a 20-25 °C per 15-30 minuti. ↓				
Letture	Leggere la micropiastra di cattura sul luminometro approvato da QIAGEN. ↓ Convalidare il test e interpretare i risultati dei campioni.				