

Allplex™

Vaginitis Screening Assay

(Núm. Cat. SD9750X)

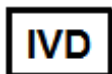
Un ensayo múltiple de PCR en tiempo real para la detección de *Lactobacillus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus* spp., *Candida albicans*, otros *Candida* y *Trichomonas vaginalis* a partir de muestras genitales y citología a base de líquidos.

Para usar con el

1. Microlab NIMBUS IVD y Microlab STARlet IVD
2. Seegene NIMBUS y Seegene STARlet

Para usar con el

1. CFX96™ Real-time PCR Detection System (CFX96 Manager™ Software-IVD v1.6)
2. CFX96™ Dx System (CFX96 Manager™ Dx Software v3.1)



Solo para diagnóstico in vitro



Seegene Inc.,

Taewon Bldg., 91 Ogeum-ro, Songpa-gu, Seoul, Republic of Korea 05548



Medical Technology Promedt Consulting GmbH

Altenhofstrasse 80, D-66386 St.Ingbert, Alemania

No está disponible en Estados Unidos

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

ÍNDICE

AVISOS	3
USO PREVISTO	5
PRINCIPIOS E INFORMACIÓN SOBRE LOS PROCEDIMIENTOS	5
INFORMACIÓN GENERAL	7
REACTIVOS	8
ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN	9
MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS	9
PROTOCOLO	10
CONFIGURACIÓN DE INSTRUMENTOS DE PCR EN TIEMPO REAL Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	15
RESULTADOS	39
SOLUCIÓN DE PROBLEMAS	44
RENDIMIENTO	46
REFERENCIAS	53
SÍMBOLOS	54
INFORMACIÓN DE PEDIDO	55

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

AVISOS

- Solo para diagnóstico in vitro
- La fiabilidad de los resultados depende de que las muestras sean adecuadamente recogidas, almacenadas, transportadas y procesadas.
- **Este producto está pensado solo para usarse con Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS y Seegene STARlet se debe hacer un máximo de 5 pruebas separadas.**
- **Esta prueba ha sido aprobada para los siguientes tipos de muestras: hisopos genitales y Citología de base líquida.** Este test no ha sido aprobado para ningún otro tipo de muestra.
- **Almacene las muestras de DNA a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ hasta que se vayan a usar y consérvelas en baño de hielo durante su uso.**
- La sensibilidad del ensayo puede disminuir si las muestras se congelan y descongelan repetidas veces o si se almacenan durante mucho tiempo.
- El flujo de trabajo en el laboratorio debería desarrollarse de manera unidireccional.
- Deben llevarse siempre guantes desechables en cada zona y cambiarlos antes de entrar en las diferentes zonas. En caso de que se contaminen, se deben cambiar inmediatamente o tratar con un reactivo descontaminante de DNA.
- Destine materiales y equipamiento a estaciones de trabajo separadas y no los mueva de una zona a otra.
- No se debe pipetear con la boca.
- No se debe comer, beber ni fumar en las zonas de trabajo del laboratorio. Al manipular las muestras y reactivos, han de llevarse guantes sin talco desechables, bata de laboratorio y protección en los ojos. Deben lavarse bien las manos después de manipular las muestras y los reactivos del test.
- Evite contaminar los reactivos al quitar las partes alícuotas de los tubos de reactivos. Se recomienda usar puntas de pipeta desechables estériles, resistentes a los aerosoles.
- No mezcle reactivos de diferentes lotes o de diferentes tubos del mismo lote.
- No use el producto después de su fecha de caducidad.
- No reúse los elementos desechables.
- Use tubos con tapa de rosca y evite cualquier posible salpicadura o contaminación cruzada de las muestras durante la preparación.
- Por favor, tenga cuidado de no contaminar los reactivos con ácidos nucleicos extraídos, productos de PCR y control positivo. Para evitar la contaminación de los reactivos, se recomienda utilizar puntas con filtro.
- Use zonas de trabajo separadas y segreadas para cada experimento.
- Abra tiras o tubos de reacción de PCR después de la amplificación solo en las zonas destinadas para ello, de modo que se evite la contaminación de la zona con los amplicones.

Fern. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

- Los materiales positivos se han de almacenar separados de los reactivos del kit.
- Deben adoptarse los procedimientos de seguridad de laboratorio (consulte los documentos de Bioseguridad en los laboratorios microbiológicos y biomédicos y CLSI) al manipular las muestras. Limpie y desinfecte exhaustivamente todas las superficies de trabajo con hipoclorito de sodio al 0,5 % (en agua desionizada o destilada). Los componentes del producto (sus residuos, envoltorio) pueden considerarse residuos de laboratorio. Deseche los reactivos sin utilizar y los residuos conforme a las normativas nacionales, regionales y locales de aplicación.
- La fecha de caducidad es 12 meses a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ desde la fecha de fabricación. Consulte la etiqueta para comprobar la fecha de caducidad.
- El Seegene NIMBUS y el Seegene STARlet son los mismos equipos que el Microlab NIMBUS IVD y el Microlab STARlet IVD, solo que el fabricante es distinto. Ya que no existen cambios en el hardware del dispositivo, los resultados de las pruebas son iguales.
- El nombre de la marca “CFX96™ Real-time PCR Detection System-IVD” pasó a ser “CFX96™ Dx System”. Ya que no se hicieron cambios al hardware del sistema, se espera que se obtengan los mismos resultados con ambos sistemas.
- El “CFX Manager™ Dx Software v3.1” es la versión actualizada del “CFX Manager™ Software-IVD v1.6”. El software actualizado incluye mejoras al menú “Run” (Ejecutar). Estas mejoras no afectan los resultados del análisis de datos; por lo que los resultados serán los mismos.

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

USO PREVISTO

Allplex™ Vaginitis Screening Assay es una prueba cualitativa y cuantitativa in vitro para la detección simple o múltiple de los patógenos de *Lactobacillus* spp. (Lacto; *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus jensenii*), *Gardnerella vaginalis* (GV), *Atopobium vaginae* (AV), *Mobiluncus* spp. (Mob; *Mobiluncus mulieris* y *Mobiluncus curtisii*), *Candida albicans* (CA), otros *Candida* (CO; *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida lusitanae*) y *Trichomonas vaginalis* (TV).

- Detección cuantitativa de *Lactobacillus* spp. (Lacto), *Gardnerella vaginalis* (GV) y *Atopobium vaginae* (AV)
- Detección cualitativa de *Mobiluncus* spp. (Mob), *Candida albicans* (CA), otros *Candida* (CO) y *Trichomonas vaginalis* (TV)

El Allplex™ Vaginitis Screening Assay está diseñado para ayudar a diagnosticar una infección vaginal en mujeres con un síntoma clínico compatible con la vaginosis bacteriana. El Allplex™ Vaginitis Screening Assay debe interpretarse en conjunto con otros datos clínicos de laboratorio de los médicos.

PRINCIPIOS E INFORMACIÓN SOBRE LOS PROCEDIMIENTOS

1. Principios

Allplex™ Vaginitis Screening Assay presenta tecnología MuDT™ propiedad de Seegene, que permite proporcionar valores multi-C_t (ciclo umbral) en un único canal de fluorescencia sin análisis de curva de Melting en instrumentos de PCR en tiempo real.

Allplex™ Vaginitis Screening Assay es un ensayo múltiplex de PCR en tiempo real que permite la amplificación y detección simultánea de los ácidos nucleicos diana de *Lactobacillus* spp. (Lacto), *Gardnerella vaginalis* (GV), *Atopobium vaginae* (AV), *Mobiluncus* spp. (Mob), *Candida albicans* (CA), otros *Candida* (CO), *Trichomonas vaginalis* (TV) y Control Interno. La presencia de una secuencia de genes específicos en la reacción se notifica como un valor C_t y Q_t a través del software de análisis Seegene Viewer.

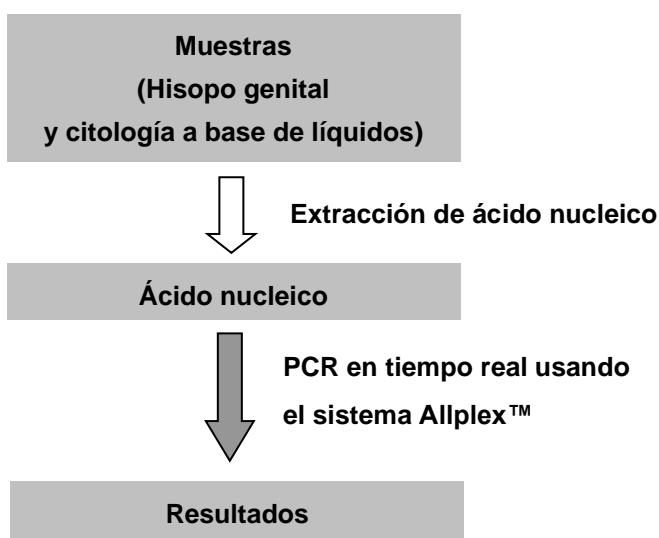
Se utiliza un gen humano endógeno como Control Interno (IC) para supervisar todo el proceso de recogida de muestras, extracción de ácido nucleico y constatar cualquier posible inhibición de la PCR.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.M. 17503

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Para evitar que el producto de amplificación actúe como potencial contaminante, en el Allplex™ Vaginitis Screening Assay se utiliza un sistema Uracil-DNA glicosilasa (UDG)-dUTP. El sistema UDG-dUTP se usa comúnmente cuando se realiza una PCR para eliminar los amplicones sobrantes usando escisiones por UDG de residuos de uracilo desde el DNA mediante la escisión del enlace N-glicosídicos.

2. Información sobre el procedimiento



Farm. Eduardo Omar Míguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

INFORMACIÓN GENERAL

La mayoría de las mujeres tendrán una infección vaginal, caracterizada por secreción, picazón u olor, durante su vida. Se ha demostrado que la obtención de un historial médico por sí solo es insuficiente para un diagnóstico preciso de vaginitis y puede conducir a la administración inadecuada de medicamentos. Por lo tanto, se justifica un historial cuidadoso, un examen y pruebas de laboratorio para determinar la etiología de los síntomas vaginales. Las tres afecciones más comunes, diagnosticadas entre las mujeres con síntomas vaginales que se presentan en el entorno de atención primaria, fueron: la vaginosis bacteriana (22% a 50%), la candidiasis vulvovaginal (17% a 39%) y la tricomoniasis (4% a 35%). En algunos casos la etiología puede ser mixta y puede haber más de una enfermedad presente; en aproximadamente el 30% de las mujeres sintomáticas no se identifica ningún agente etiológico.

La vaginosis bacteriana (BV) es un síndrome clínico polimicrobiano resultante del reemplazo del peróxido de hidrógeno normal que produce *Lactobacillus* sp. En la vagina con altas concentraciones de bacterias anaerobias (por ejemplo, *Prevotella* sp. y *Mobiluncus* sp.), *G. vaginalis*, Ureaplasma, Mycoplasma y numerosos anaerobios fastidiosos o no cultivados. La BV se puede diagnosticar mediante el uso de criterios clínicos (es decir, el criterio diagnóstico de Amsel) o la tinción de Gram (que se considera el método de laboratorio estándar de oro para diagnosticar la BV). La PCR se ha utilizado en entornos de investigación para la detección de una variedad de organismos asociados con la BV. La detección de organismos específicos podría ser predictiva de BV por PCR. Se necesita una validación adicional antes de poder recomendar estas pruebas para diagnosticar la BV.

La candidiasis vulvovaginal (VVC) es causada por *C. albicans*, pero ocasionalmente puede ser causada por otras *Candidia* sp. o levadura. Se estima que el 75% de las mujeres tendrá al menos un episodio de VVC, y del 40% al 45% tendrá dos o más episodios. Sobre la base de la presentación clínica, la microbiología, los factores del huésped y la respuesta al tratamiento, la VVC se puede clasificar como no complicada o complicada. Aproximadamente del 10% al 20% de las mujeres tendrán una VVC complicada, lo que requerirá consideraciones diagnósticas y terapéuticas especiales. Las terapias antimicóticas convencionales no son tan eficaces contra estas especies no álbicas como contra *C. albicans*.

La tricomoniasis es una enfermedad de transmisión sexual (STD) muy común. Es causada por una infección con un parásito protozoario llamado *Trichomonas vaginalis*. Alrededor del 70% de las personas infectadas no tienen signos ni síntomas. La microscopía de montura húmeda de un hisopo vaginal a menudo revela glóbulos blancos y tricomonas rápidamente móviles. Sin embargo, la detección de tricomonas por microscopía tiene una sensibilidad de solo 60% a 75%, mientras que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede detectar *T. vaginalis* con una sensibilidad de 85% a 100%.


Farm. Eduardo Omar Míguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

REACTIVOS

Los reactivos contenidos en un kit son suficientes para 100 reacciones.

Información de pedido (**REF** SD9750X)

Allplex™ Vaginitis Screening Assay			
Símbolo	Contenidos	Volumen	Descripción
PRIMER	VS MOM	500 µL	Mezcla de oligos de MuDT (MOM): - Reactivos de amplificación y detección
PREMIX	EM1	500 µL	- Polimerasa de DNA - Uracil-DNA glicosilasa (UDG) - Tampón que contiene dNTPs
CONTROL +	VS PC	80 µL	Control Positivo (PC): - Mezcla de patógenos y clones IC
SD	VS SD1	80 µL	DNA estándar para cuantificación (1X10 ⁷ copias/rxn) - Mezcla de 3 patógeno clones (Lacto, GV, AV)
SD	VS SD2	80 µL	DNA estándar para la cuantificación (1X10 ⁵ copias/rxn) - Mezcla de 3 patógeno clones (Lacto, GV, AV)
SD	VS SD3	80 µL	DNA estándar para la cuantificación (1X10 ³ copias/rxn) - Mezcla de 3 patógeno clones (Lacto, GV, AV)
WATER	RNase-free Water	1.000 µL	Calidad ultrapura, grado PCR
	Manual do usuário		

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

Todos los componentes de Allplex™ Vaginitis Screening Assay deben almacenarse a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Todos los componentes son estables en las condiciones de almacenamiento recomendadas hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Este producto se puede usar por 94 días después de la apertura inicial del kit y el rendimiento no se ve afectado por hasta 5 ciclos de congelación y descongelación. Si se van a utilizar los reactivos solo de forma intermitente, deben almacenarse en partes alícuotas.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS

- Guantes desechables sin talco (látex o nitrilo)
- Pipetas (ajustables) y puntas de pipeta estériles
- Tubo de microcentrifugación de 1,5 mL
- Productor de hielo
- Centrífuga de sobremesa
- Mezclador vórtex
- CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- Tiras de 8 tubos de perfil bajo de 0,2 mL sin tapas (color blanco, Núm. Cat. TLS0851, Bio-Rad)
- Tiras de 8 tapas planas ópticas (Núm. Cat. TCS0803, Bio-Rad)
- Placas de PCR Hard-Shell® de 96 pocillos, perfil bajo, pared delgada, faldón, blanco / blanco (Núm. Cat. HSP9655, Bio-Rad)
- Placas de PCR Hard-Shell® de 96 pocillos, perfil bajo, pared delgada, faldón, blanco / blanco, código de barras (Núm. Cat. HSP9955, Bio-Rad)
- Sellador térmico transparente permanente (Núm. Cat. 1814035, Bio-Rad)*
- Sellador de placa del PCR PX1 (auto-sellador, Núm. Cat. 181-4000, Bio-Rad)*
- Solución salina
- Mesa de trabajo limpia

* Asegúrese de usar el sello térmico y el sellador de placas listados arriba juntos.

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

PROTOCOLO**1. Recogida de muestras, almacenamiento y transporte**

Nota: Todas las muestras se deben tratar como material potencialmente infeccioso. Solo se permiten los materiales de las muestras que se recojan, almacenen y transporten de acuerdo con las siguientes normas e instrucciones.

Hisopos genitales**Citología en base líquida**

Nota: Para garantizar la alta calidad de las muestras, estas se han de transportar lo más rápido posible, y según las condiciones de temperatura indicadas.

A. Recogida de muestras**Muestras de hisopos genitales**

Para recoger los hisopos genitales, use los siguientes materiales:

- Los hisopos genitales se pueden recoger y transportar en 1-3 mL de los siguientes medios:
 - ENAT PM 2ML REGULAR APPLICATOR (APLICADOR REGULAR ENAT PM 2ML) (Copan)
 - UTM with Flocked Swabs (UTM con hisopos flocados) (Copan)
 - Swab Specimen Collection Kit (Kit para recoger muestras de hisopos) (Qiagen Corporation)
- Deje el hisopo en el medio de transporte del cultivo. Cierre y etiquete el recipiente de la muestra. Siga estrictamente las instrucciones para el almacenamiento y transporte.
- Siga un protocolo recomendado para recoger las células de epitelio escamoso y columnar después de retirar la mucosa cervical.

Muestras de citología en base líquida

- Use el medio citológico en base líquida ThinPrep® de HOLOGIC® Inc. y SurePath™ de BD.
- Siga las instrucciones del fabricante para recoger las muestras de células cervicales en los medios ThinPrep® y SurePath™.

B. Almacenamiento y transporte de muestras

Muestras	Almacenamiento y transporte		Nota
	Temp.	Duración*	
Hisopo genital	2-8°C	1 semana	- El rendimiento puede verse afectado por el almacenamiento a largo plazo de la muestra. - Las muestras también deben adherirse a las instrucciones locales y nacionales para el transporte de material patógeno.
Medio ThinPrep®	2-8°C	90 días	
Medio SurePath™	2-8°C	2 semanas	

*Duración: El período de tiempo desde la recolección de la muestra hasta la prueba final (incluye el transporte y almacenamiento de las muestras antes de la prueba).

2. Extracción de ácido nucleico
A. Tratamiento previo de las muestras
Hisopos genitales

- Las muestras de hisopos genitales se usan sin tratamiento previo.

Citología cervical en base líquida

- Equilibre las muestras a temperatura ambiente (19-25°C).
- Centrifugue 1 mL de muestra de citología cervical en base líquida durante 15 minutos a 15.000 x g (13.000 rpm).
- Debe desecharse el sobrenadante. A continuación, hay que suspender de nuevo el sedimento en el volumen recomendado de solución salina (véase volumen recomendado de 2-B) agitándolo bien en un mezclador de vórtice.

Nota: Proceda al paso de pretratamiento usando el tampón de lisis en la solución no salina del kit de extracción si las muestras se recogen en el medio SurePath™, y se deben analizar con Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS o Seegene STARlet.

- Siga el protocolo del fabricante.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

B. Sistema de extracción de ácido nucleico automatizado

Nota: Use la muestra recomendada y los volúmenes de la elución tal y como se indica a continuación. Para el resto, consulte el protocolo del fabricante.

B-1. Microlab NIMBUS IVD

Nota: Véase el manual de funcionamiento de Microlab NIMBUS IVD.

Sistema de extracción automatizado	Fabricante	Núm. Cat.	Volumen Recomendado
Microlab Nimbus IVD	Hamilton	65415-02*	-
STARMag 96 X 4 Universal Cartridge kit	Seegene	744300.4.UC384	Muestra: 300 µL Elución: 100 µL

* Si quiere comprar este producto de Seegene Inc., use este número de catálogo.

B-2. Microlab STARlet IVD

Nota: Véase el manual de funcionamiento de Microlab STARlet IVD.

Sistema de extracción automatizado	Fabricante	Núm. Cat.	Volumen Recomendado
Microlab STARlet IVD	Hamilton	173000-075*	-
STARMag 96 X 4 Universal Cartridge kit	Seegene	744300.4.UC384	Muestra: 300 µL Elución: 100 µL

* Si quiere comprar este producto de Seegene Inc., use este número de catálogo.

B-3. Seegene NIMBUS

Nota: Véase el manual de funcionamiento de Seegene NIMBUS.

Sistema de extracción automatizado	Fabricante	Núm. Cat.	Volumen Recomendado
Seegene NIMBUS	Seegene	65415-03	-
STARMag 96 X 4 Universal Cartridge kit	Seegene	744300.4.UC384	Muestra: 300 µL Elución: 100 µL

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

B-4. Seegene STARlet

Nota: Véase el manual de funcionamiento de Seegene STARlet.

Sistema de extracción automatizado	Fabricante	Núm. Cat.	Volumen Recomendado
Seegene STARlet	Seegene	67930-03	-
STARMag 96 X 4 Universal Cartridge kit	Seegene	744300.4.UC384	Muestra: 300 µL Elución: 100 µL

3. Preparación de PCR en tiempo real

Nota: Deben usarse tubos, tapas y sellos térmicos correctos (consulte los MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS).

Nota: Deben usarse filtros resistentes a los aerosoles y guantes ajustados al preparar las reacciones de PCR de un solo paso. Tenga especial cuidado para evitar la contaminación cruzada.

Nota: Descongele totalmente todos los reactivos en baño de hielo.

Nota: Centrifugue brevemente los tubos de reactivos para recoger las gotas residuales de dentro de la tapa.

Nota: Los pasos A a D se procesan automáticamente en Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS y Seegene STARlet. Consulte cada manual de funcionamiento.

A. Prepare la Mastermix de PCR.

5 µL	VS MOM
5 µL	EM1
5 µL	RNase-free Water
15 µL	Volume Total da Mastermix de PCR

Nota: Calcule la cantidad que se necesita de cada reactivo necesario en función del número de reactivos (muestras + controles + DNA estándar).

B. Mezcle rápido en un mezclador de vórtice y centrifugue brevemente.

C. Utilice una parte proporcional de 15 µL de Mastermix de PCR en los tubos de PCR.

D. Añada 5 µL de los ácidos nucleicos de cada muestra en el tubo que contiene la Mastermix de PCR.

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17583

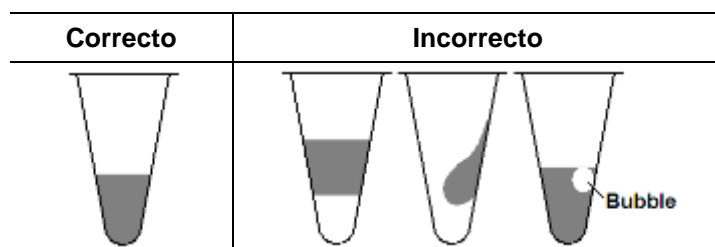
Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

15 µL	Mastermix de PCR
5 µL	Ácido nucleico de la muestra
20 µL	Volumen total de la reacción

E. Cierre la tapa o selle la película, y centrifugue brevemente los tubos de PCR.

F. Verifique que el líquido que contienen todos los componentes de PCR se encuentre en el fondo de cada tubo de PCR. Si no es así, centrifugue de nuevo a mayores rpm durante más tiempo.

Nota: Se recomienda centrifugar los tubos de PCR antes de la PCR para eliminar las burbujas de aire y recoger todos los líquidos residuales en el fondo de los tubos.



Nota: Con cada muestra, use una nueva punta de pipeta estéril.

Nota: Para el **Control Negativo (NC)** use 5 µL de agua exenta de RNase-free Water en lugar del ácido nucleico de la muestra.

Nota: Para el **Control Positivo (PC)**, use 5 µL de VS PC en lugar del ácido nucleico de la muestra.

Nota: Para el **DNA estándar (SD)**, use 5 µL de VS SD1, VS SD2 y VS SD3 en lugar del ácido nucleico de la muestra.

Nota: Las localizaciones del Control Negativo, del Control Positivo y del DNA estándar se establecen en el Microlab NIMBUS IVD Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS y Seegene STARlet de acuerdo con el número de muestra.

Nota: Tenga cuidado de que no se produzca una contaminación cruzada del Mastermix de PCR y de las muestras con el Control Positivo y el DNA estándar.

Nota: No etiquete el tubo de reacción en su tapa. La fluorescencia se detecta desde la parte superior de cada tubo de reacción..

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

CONFIGURACIÓN DE INSTRUMENTOS DE PCR EN TIEMPO REAL Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

1. CFX96™ Real-time PCR Detection System (CFX Manager™ Software-IVD v1.6)

1.1. Configuración de los instrumentos de PCR en tiempo real

Nota: La configuración del experimento en el sistema de CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio- Rad) puede dividirse en tres pasos: Protocol Setup (Configuración del protocolo), Plate Setup (Configuración de la placa) e Start run (Inicio del ciclo).

A. Protocol Setup (Configuración del protocolo)

1) En el menú principal, seleccione **File (Archivo) → New (Nuevo) → Protocol (Protocolo)** para abrir el **Protocol Editor (Editor de protocolo)**.



Fig. 1. Protocol Setup (Configuración del protocolo).

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

2) En **Protocol Editor (Editor de protocolo)**, defina el perfil térmico como sigue:

Paso	Núm. de ciclos	Temperatura	Duración
1	1	50°C	4 min
2		95°C	15 min
3	5	95°C	30 seg
4		60°C	1 min
5		72°C	30 seg
6	GOTO (VAYA AL) Paso 3, 4 veces más		
7	40	95°C	10 seg
8*		60°C	1 min
9*		72°C	10 seg
10	GOTO (VAYA AL) Paso 7, 39 veces más		

Nota*: Lectura de placa en el paso 8 y 9. La fluorescencia se detecta a 60°C y 72°C.

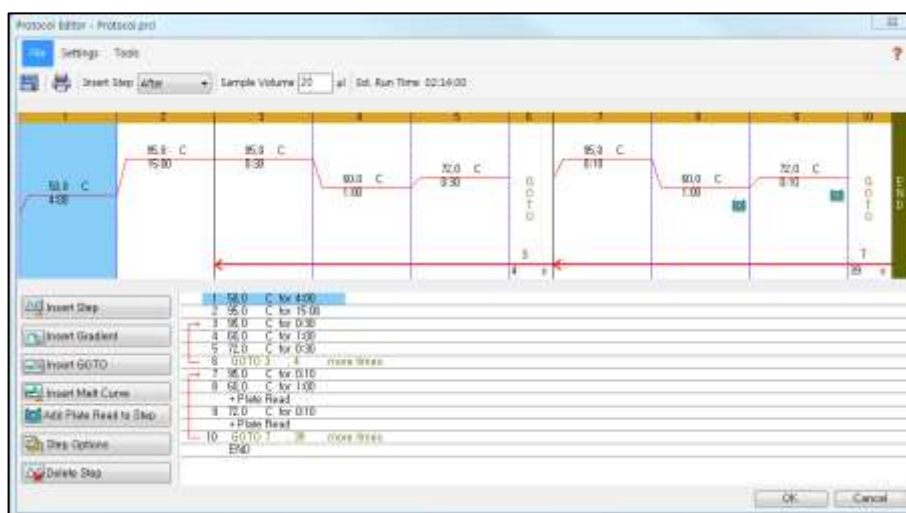


Fig. 2. Protocol Editor (Editor de protocolo)

3) Haga clic en el cuadro al lado de **Sample Volume (Volumen de la muestra)** para añadir directamente 20 µL.

4) Haga clic en **OK (Aceptar)** y guarde el protocolo para abrir la ventana **Experiment Setup (Configuración del experimento)**.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

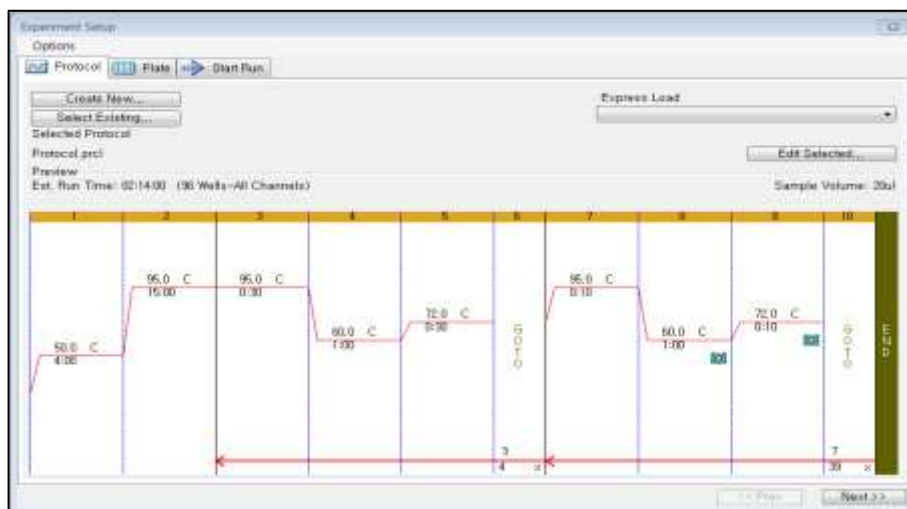


Fig. 3. **Experiment Setup (Configuración del experimento): Protocol (Protocolo)**

B. Plate Setup (Configuración de la placa)

1) En la pestaña **Plate (Placa)** en **Experiment Setup (Configuración del experimento)**, haga clic en **Create New (Crear nuevo)** para abrir la ventana **Plate Editor (Editor de placa)**.

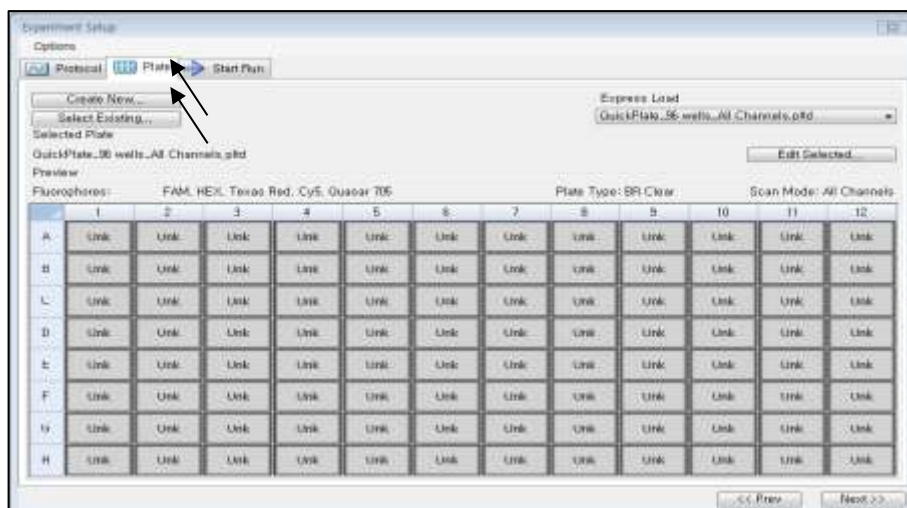


Fig. 4. **Plate Editor (Editor de placa).**

2) Haga clic en **Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos)** para indicar los fluoróforos (**FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670**) que se van a usar y haga clic en **OK (Aceptar)**.

Frm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

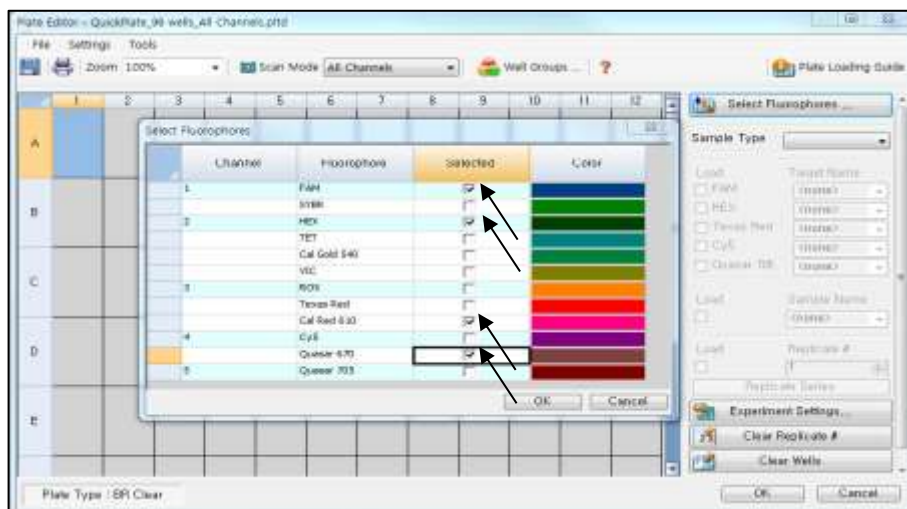


Fig. 5. **Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos) (FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670)**

3) Crear una curva estándar

- Seleccione los pocillos cargados con Sample Type/Standard (Tipo de muestra/Estándar), determine los fluoróforos específicos (FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670) y luego haga clic en la casilla de verificación Cargar (Fig. 6).
- Seleccione los pocillos en el diagrama de la placa y haga clic en Replicate Series (Replicar series). Se abrirá la venta de edición de Replicate Series (Replicar series) (Fig. 7).
- Seleccione los pocillos a los que se han sido asignados números duplicados consecutivos y haga clic en Dilution Series (Serie de dilución). Luego introduzca información en la venta de Dilution Series (Serie de dilución) como se indica en la Fig. 8.

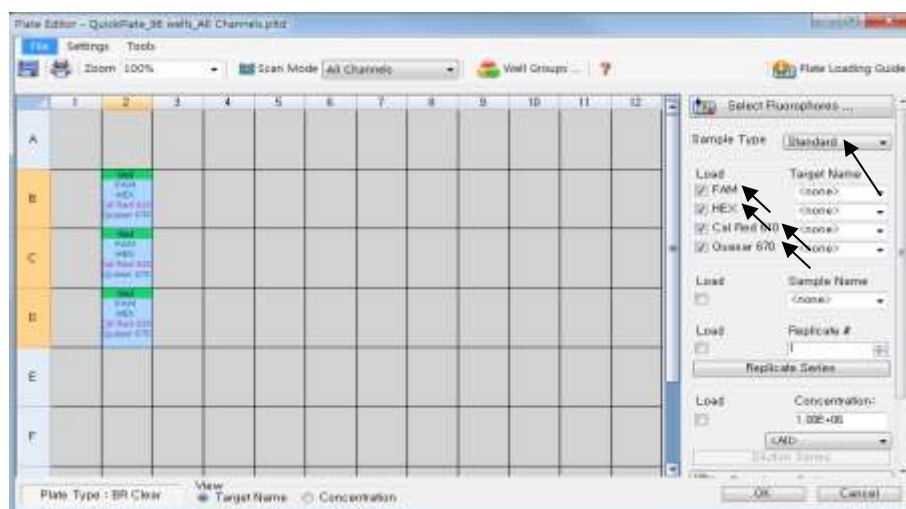


Fig. 6. **Creating a Standard Curve (Crear una curva estándar) (1)**

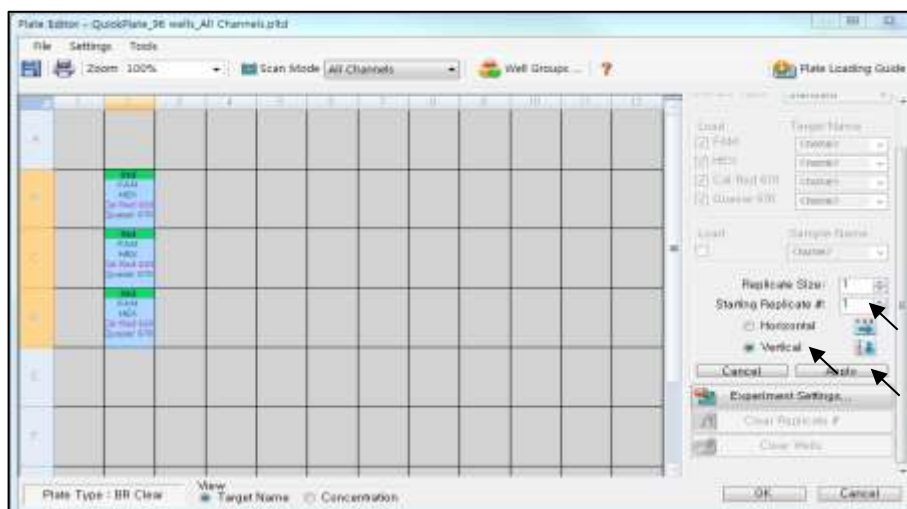
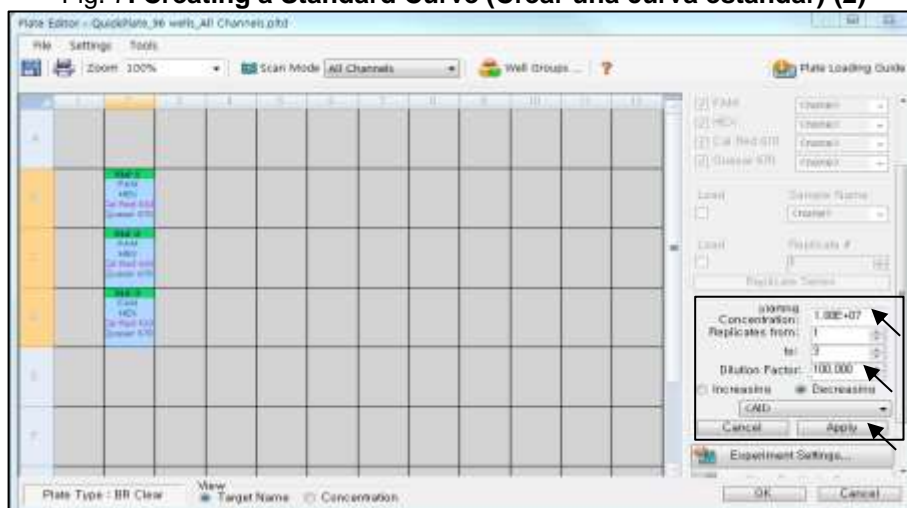


Fig. 7. Creating a Standard Curve (Crear una curva estándar) (2)



Starting Concentration:	1.00E+07
Replicates from:	1
to:	3
Dilution Factor:	100,000
<input type="radio"/> Increasing <input checked="" type="radio"/> Decreasing	
<input type="button" value="Cancel"/> <input type="button" value="Apply"/>	

Fig. 8. Creating a Standard Curve (Crear una curva estándar) (3)

4) Seleccione los pocillos deseados y luego el tipo de muestra en el menú desplegable **Sample Type (Tipo de muestra)**.

- **Unknown (Desconocidos):** Muestras clínicas
- **Negative Control (Control negativo)**
- **Positive Control (Control positivo)**
- **Standard DNA (DNA estándar)**

- 5) Haga clic en las casillas de verificación adecuadas (**FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670**) para especificar los fluoróforos que se van a detectar en los pocillos seleccionados.
- 6) Escriba el **Sample Name (Nombre de la muestra)** y presione la tecla Intro.
- 7) En **Settings (Configuración)** del menú principal de **Plate Editor (Editor de placa)**, escoja **Plate Size (96 wells) (Tamaño de la placa (96 pocillos))** y **Plate Type (BR White) (Tipo placa (Blanco BR))**.

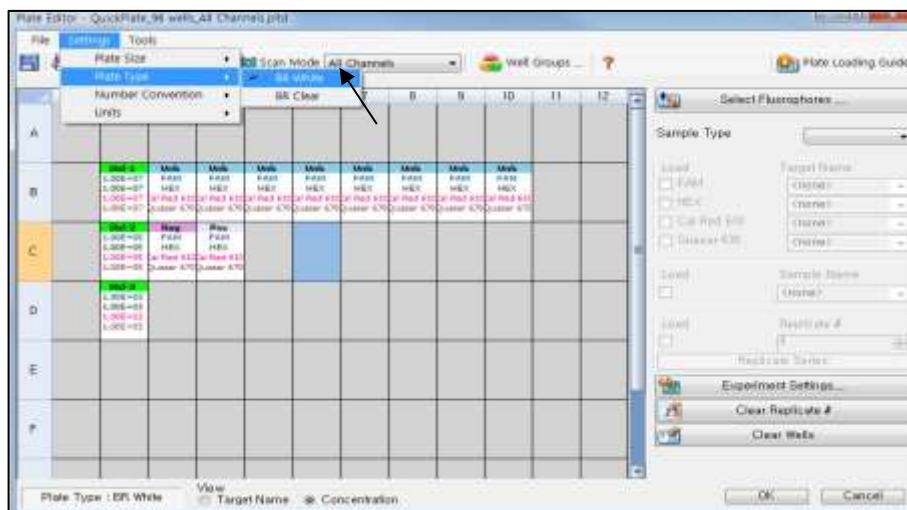


Fig. 9. **Plate Setup (Configuración de la placa)**

- 8) Haga clic en **OK (Aceptar)** para guardar la nueva placa.
- 9) Regresará a la ventana **Experiment Setup (Configuración del experimento)**.



Fig. 10. **Experiment Setup (Configuración del experimento): Plate (Placa)**

- 10) Haga clic en **Next (Siguiete)** para ejecutar Start Run (Inicio del ciclo).

C. Start Run (Inicio del ciclo)

1) En la pestaña **Start Run (Inicio del ciclo)** en **Experiment Setup (Configuración del experimento)**, haga clic en **Close Lid (Cerrar tapa)** para cerrar la tapa del instrumento.

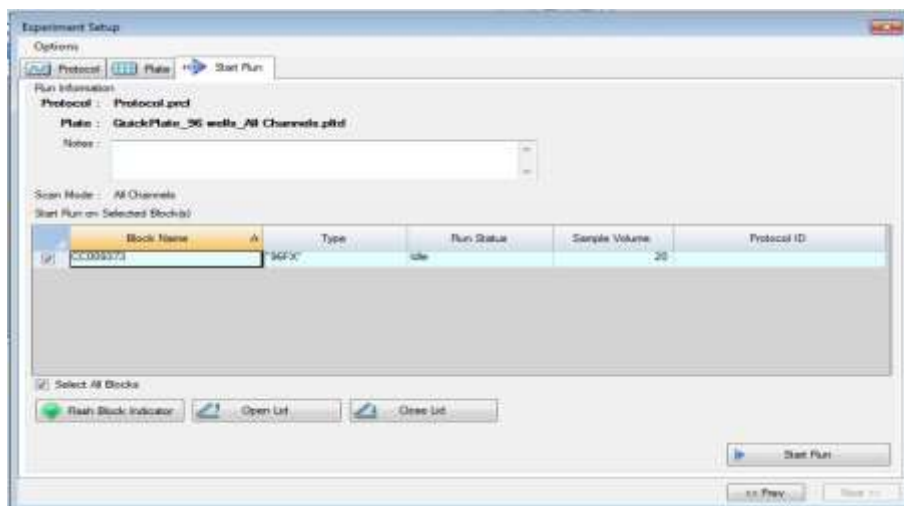


Fig. 11. Close Lid (Cerrar tapa)

2) Haga clic en **Start Run (Inicio del ciclo)**.

3) Almacene el archivo del ensayo en Mis documentos o en una carpeta que especifique. Introduzca el nombre del archivo, haga clic en **SAVE (GUARDAR)** y se iniciará el ciclo.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

1.2. Análisis de datos

A. Crear carpetas para exportar datos

- 1) Para guardar los datos de todos los pasos de detección de la curva de amplificación del archivo de resultados, cree una carpeta.
- 2) El nombre de la carpeta puede ser la que desee el usuario (para la función ‘Seegene Export (Exportación de Seegene)’, se crearán automáticamente las carpetas “QuantStep8” y “QuantStep9” para guardar los datos de cada curva de amplificación dentro de la carpeta que creó el usuario).

B. Configuración previa para el análisis de datos en CFX Manager™

- 1) Después del test, haga clic en la pestaña Quantitation (Cuantificación) para confirmar los resultados de la curva de amplificación.

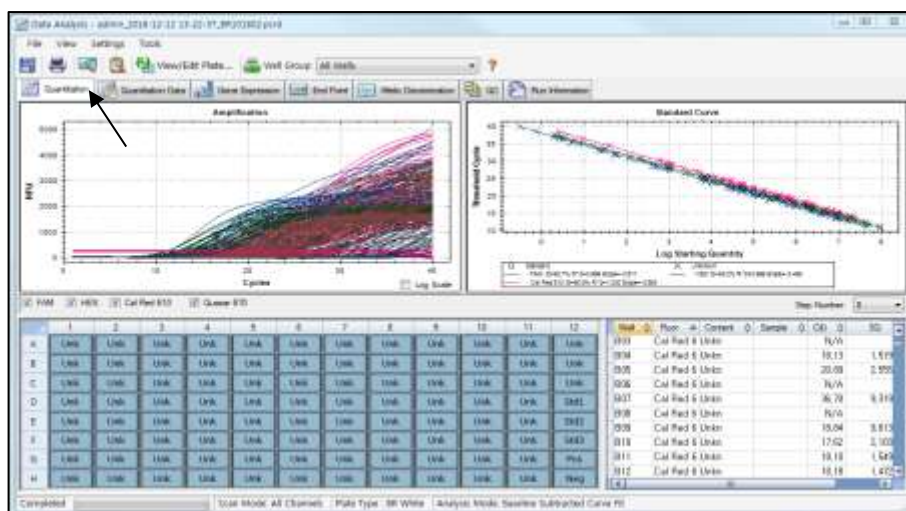


Fig. 12. Resultados de la curva de amplificación

- 2) Seleccione **No Baseline Subtraction (No sustraer línea base)** en el modo Analysis (Análisis) del menú Settings (Configuración).

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Org. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

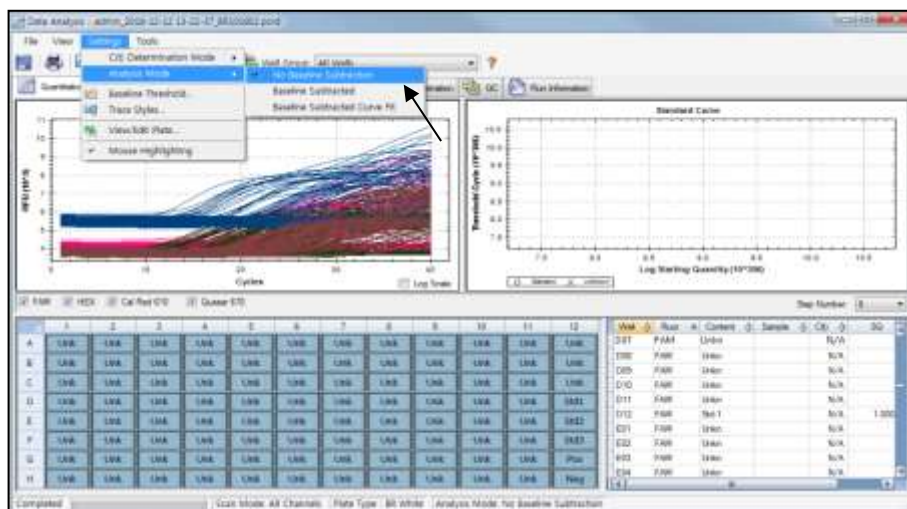


Fig. 13. No Baseline Subtraction (No sustraer línea base)

3) Seleccione **Seegene Export (Exportación de Seegene)** en el menú Tools (Herramientas).

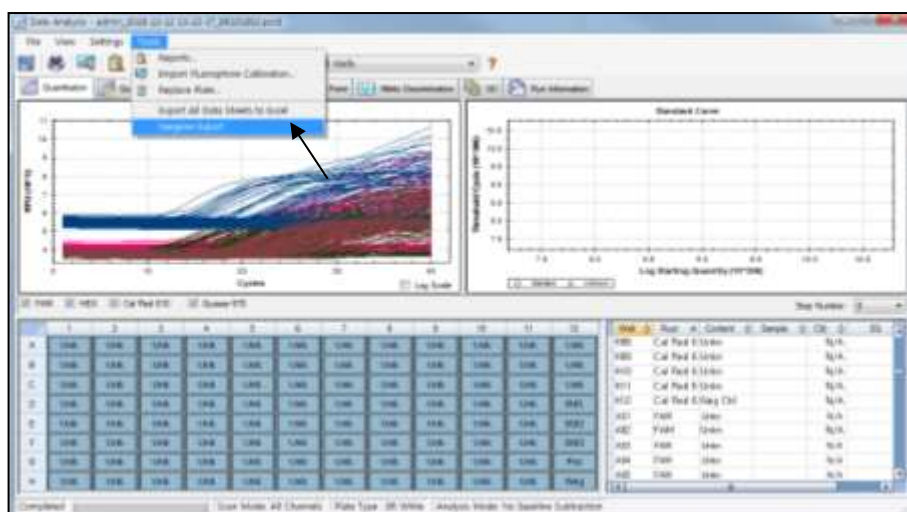


Fig. 14. Seegene Export (Exportación de Seegene)

4) Escoja una localización para guardar los datos y haga clic en **OK (Aceptar)**.

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.



Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dña. MARINA VILA PEREZ
APDORADA
BioSystems S.A.

C. Configuración del análisis de datos en Seegene Viewer

1) Abra el programa Seegene Viewer y haga clic en **Option (Opción)** para seleccionar **CFX96** en el **Instrument (Instrumento)**.

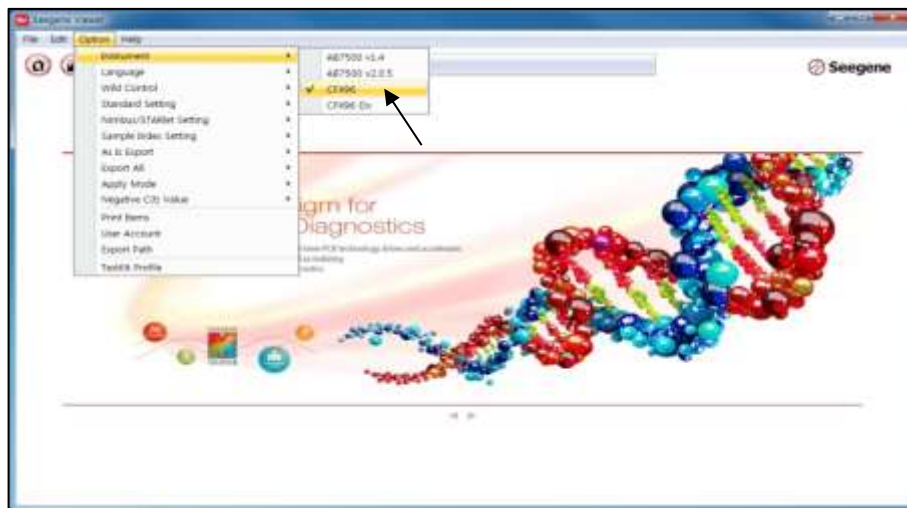


Fig. 16. Seegene Viewer

2) Haga clic en **Open (Abrir)** para encontrar el archivo guardado en la carpeta "QuantStep8", abra el archivo de resultados y seleccione el kit de prueba en el menú **PRODUCT (PRODUCTO)**.

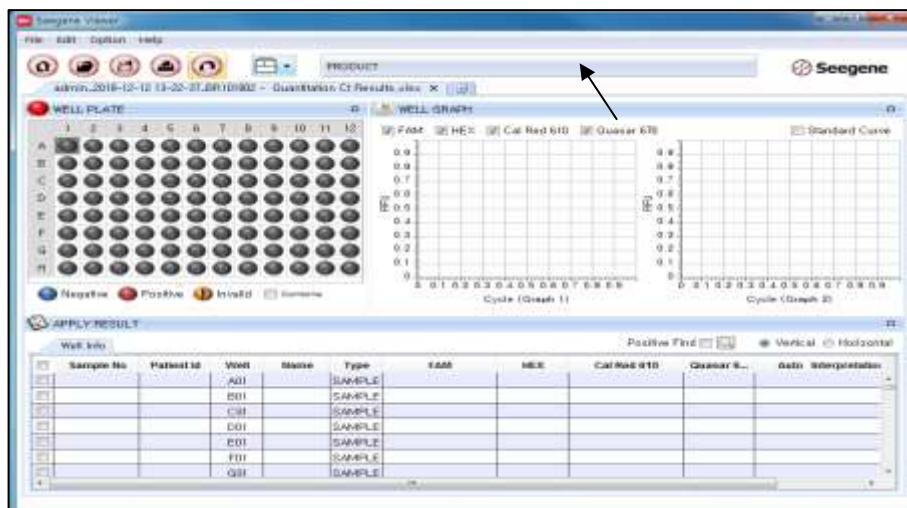


Fig. 17. Configuración del análisis de datos en Seegene Viewer

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

3) Compruebe el resultado de cada pocillo.



Fig. 18. Resultado de la prueba en Seegene Viewer

4) Criterios de validación de los resultados del control

a. Inicio del ensayo válido

Para confirmar la validez del experimento, la reacción de PCR incluye Control Positivo (PC) y Control Negativo (NC). Se determina que el ciclo de ensayo es válido cuando se cumplen los siguientes criterios:

Control	Resultado de Seegene Viewer								Interpretación automática
	FAM		HEX		Cal Red 610		Quasar670		
	CA	Lacto	CO	GV	TV	AV	Mob	IC	
	C _t	Q _t	C _t	Q _t	C _t	Q _t	C _t	C _t	
Control Positivo	≤ 40	> 0	≤ 40	> 0	≤ 40	> 0	≤ 40	≤ 40	Control Positivo (+)
Control Negativo	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Control Negativo (-)

b. Inicio de ensayo no válido

En los casos de falla en la validación, los resultados no se deben interpretar ni notificar. Y se debe repetir la reacción del PCR.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

2. CFX96™ Dx System (CFX Manager™ Dx Software-IVD v3.1)

2.1. Configuración de los instrumentos de PCR en tiempo real

Nota: La configuración del experimento en el sistema de CFX96™ Dx System (Bio-Rad) puede dividirse en tres pasos: Protocol Setup (Configuración del protocolo), Plate Setup (Configuración de la placa) e Start run (Inicio del ciclo).

A. Protocol Setup (Configuración del protocolo)

1) En el menú principal, seleccione **File (Archivo) → New (Nuevo) → Protocol (Protocolo)** para abrir el **Protocol Editor (Editor de protocolo)**.



Fig. 1. Protocol Setup (Configuración del protocolo).

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

2) En **Protocol Editor (Editor de protocolo)**, defina el perfil térmico como sigue:

Paso	Núm. de ciclos	Temperatura	Duración
1	1	50°C	4 min
2		95°C	15 min
3	5	95°C	30 seg
4		60°C	1 min
5		72°C	30 seg
6	GOTO (VAYA AL) Paso 3, 4 veces más		
7	40	95°C	10 seg
8*		60°C	1 min
9*		72°C	10 seg
10	GOTO (VAYA AL) Paso 7, 39 veces más		

Nota*: Lectura de placa en el paso 8 y 9. La fluorescencia se detecta a 60°C y 72°C.

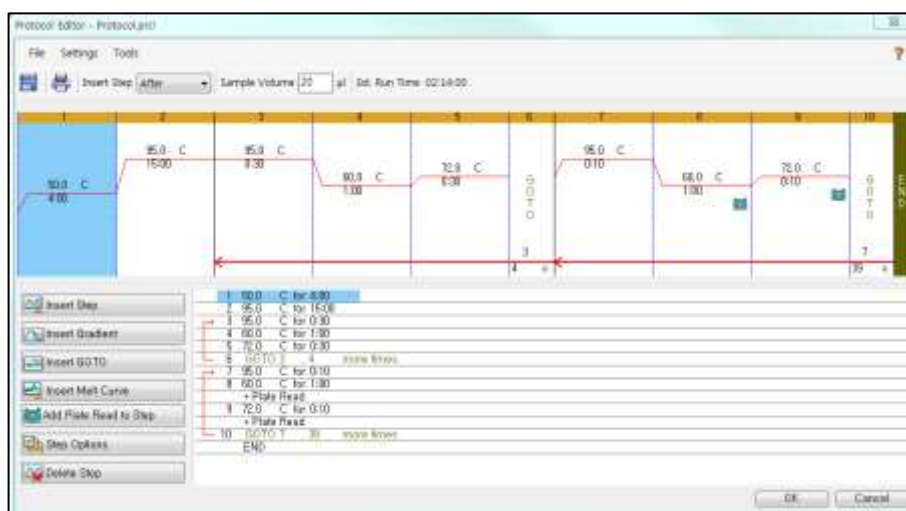


Fig. 2. Protocol Editor (Editor de protocolo)

3) Haga clic en el cuadro al lado de **Sample Volume (Volumen de la muestra)** para añadir directamente 20 µL.

4) Haga clic en **OK (Aceptar)** y guarde el protocolo para abrir la ventana **Run Setup (Configuración de Ejecutar)**.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

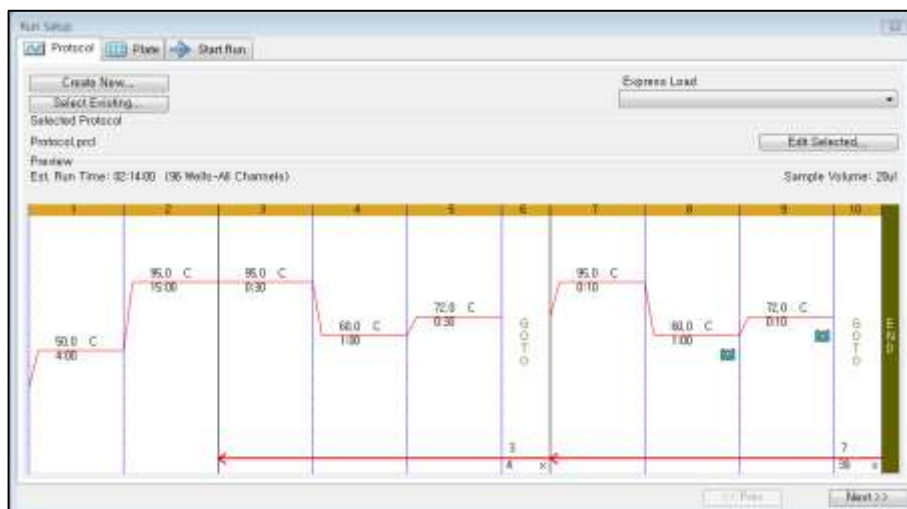


Fig. 3. Run Setup (Configuración de Ejecutar): Protocol (Protocolo)

B. Plate Setup (Configuración de la placa)

1) En la pestaña **Plate (Placa)** en **Run Setup (Configuración de Ejecutar)**, haga clic en **Create New (Crear nuevo)** para abrir la ventana **Plate Editor (Editor de placa)**.

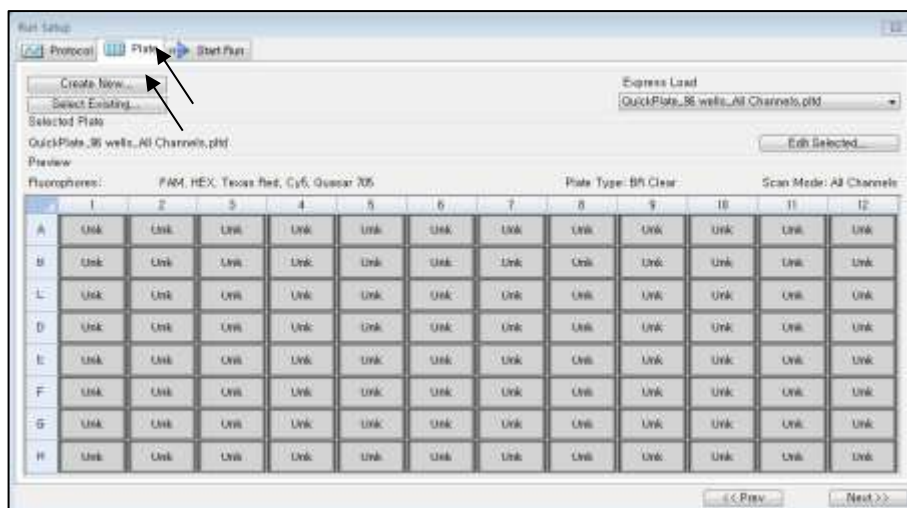


Fig. 4. Plate Editor (Editor de placa).

2) Haga clic en **Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos)** para indicar los fluoróforos (FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670) que se van a usar y haga clic en **OK (Aceptar)**.

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

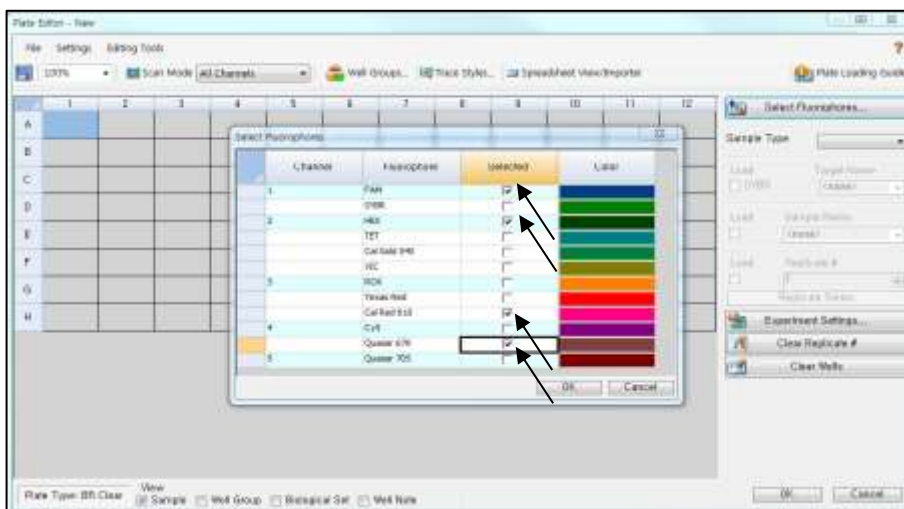


Fig. 5. **Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos) (FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670)**

3) Crear una curva estándar

- Seleccione los pocillos cargados con Sample Type/Standard (Tipo de muestra/Estándar), determine los fluoróforos específicos (FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670) y luego haga clic en la casilla de verificación Cargar (Fig. 6).
- Seleccione los pocillos en el diagrama de la placa y haga clic en Replicate Series (Replicar series). Se abrirá la venta de edición de Replicate Series (Replicar series) (Fig. 7).
- Seleccione los pocillos a los que se han sido asignados números duplicados consecutivos y haga clic en Dilution Series (Serie de dilución). Luego introduzca información en la venta de Dilution Series (Serie de dilución) como se indica en la Fig. 8.

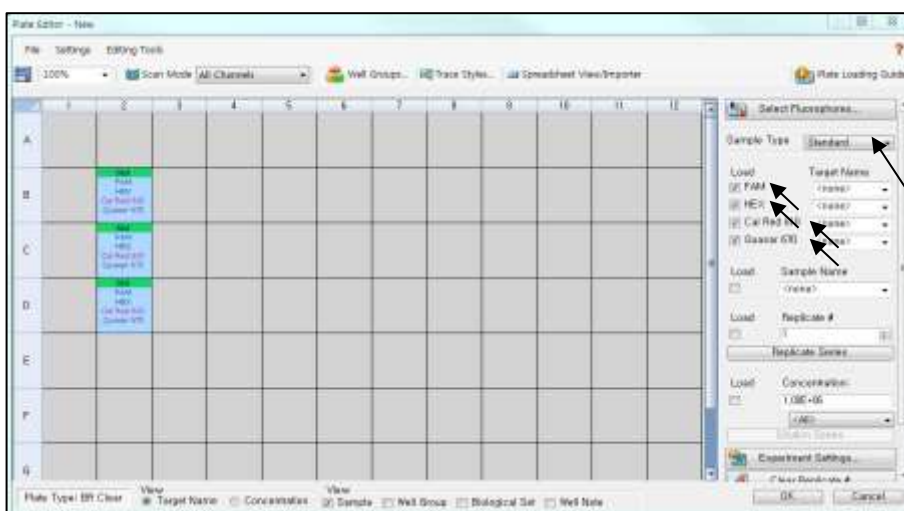


Fig. 6. **Creating a Standard Curve (Crear una curva estándar) (1)**

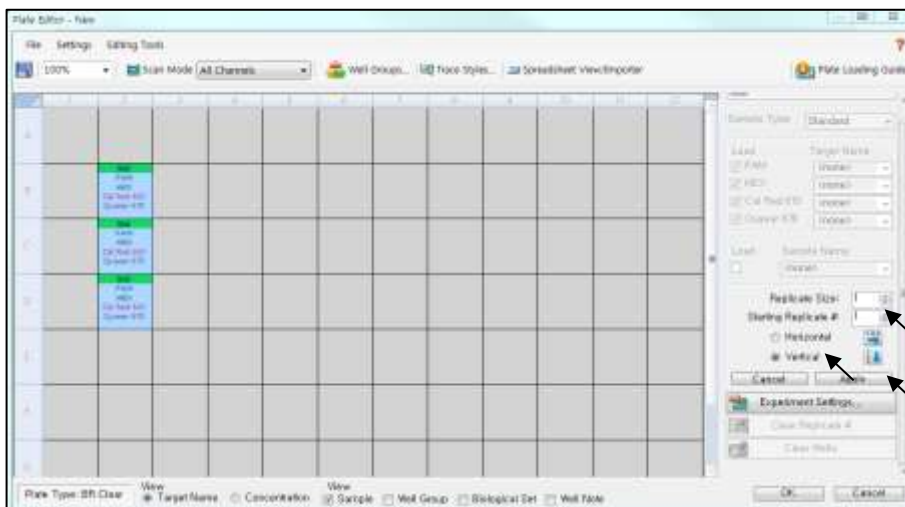
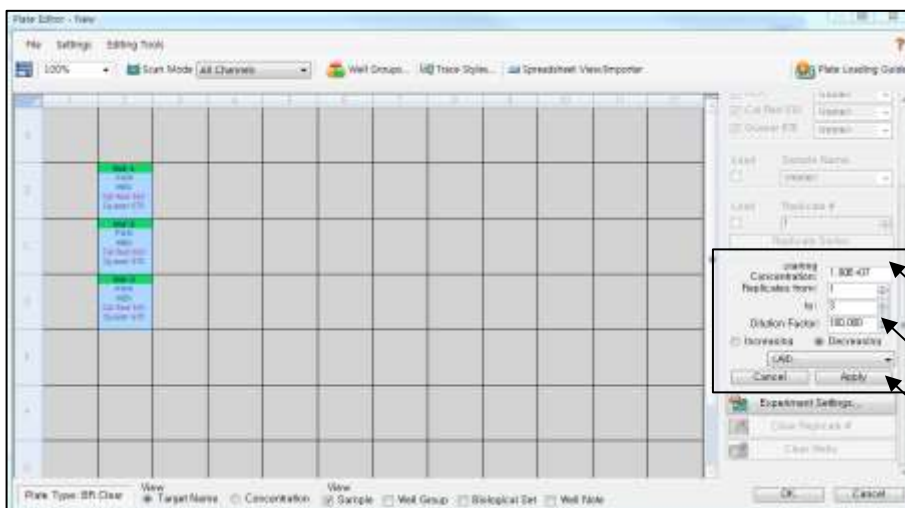


Fig. 7. Creating a Standard Curve (Crear una curva estándar) (2)



Starting Concentration:	1,00E+07
Replicates from:	1
to:	3
Dilution Factor:	100,000
<input type="radio"/> Increasing <input checked="" type="radio"/> Decreasing	
<All>	
Cancel Apply	

Fig. 8. Creating a Standard Curve (Crear una curva estándar) (3)

4) Seleccione los pocillos deseados y luego el tipo de muestra en el menú desplegable **Sample Type** (Tipo de muestra).

- **Unknown (Desconocidos):** Muestras clínicas
- **Negative Control (Control negativo)**
- **Positive Control (Control positivo)**
- **Standard DNA (DNA estándar)**

- 5) Haga clic en las casillas de verificación adecuadas (**FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670**) para especificar los fluoróforos que se van a detectar en los pocillos seleccionados.
- 6) Escriba el **Sample Name (Nombre de la muestra)** y presione la tecla Intro.
- 7) En **Settings (Configuración)** del menú principal de **Plate Editor (Editor de placa)**, escoja **Plate Size (96 wells) (Tamaño de la placa (96 pocillos))** y **Plate Type (BR White) (Tipo placa (Blanco BR))**.

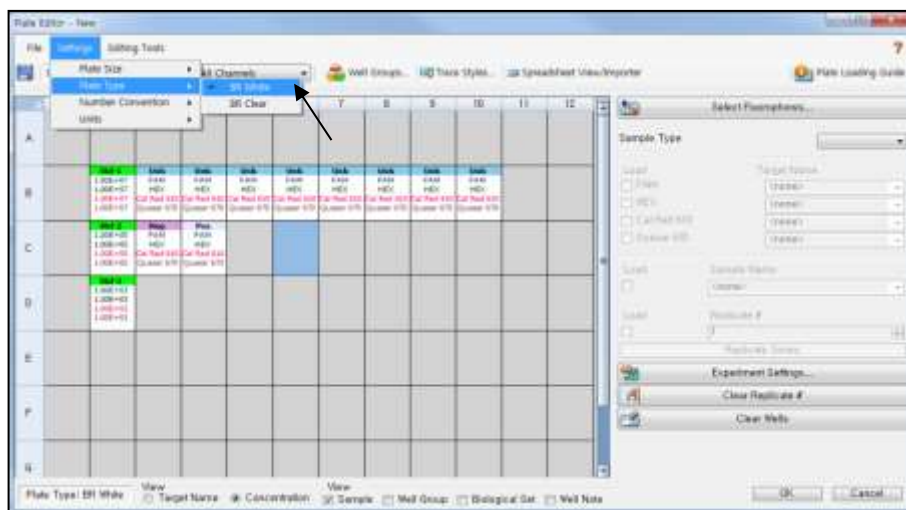


Fig. 9. Plate Setup (Configuración de la placa)

- 8) Haga clic en **OK (Aceptar)** para guardar la nueva placa.
- 9) Regresará a la ventana **Run Setup (Configuración de Ejecutar)**.

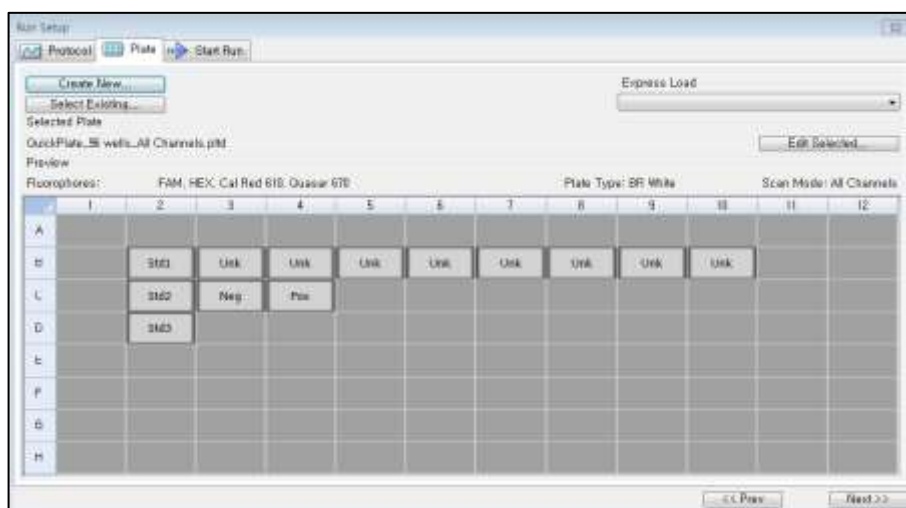


Fig. 10. Run Setup (Configuración de Ejecutar): Plate (Placa)

- 10) Haga clic en **Next (Siguiente)** para ejecutar Start Run (Inicio del ciclo).

C. Start Run (Inicio del ciclo)

1) En la pestaña **Start Run (Inicio del ciclo)** en **Run Setup (Configuración de Ejecutar)**, haga clic en **Close Lid (Cerrar tapa)** para cerrar la tapa del instrumento.

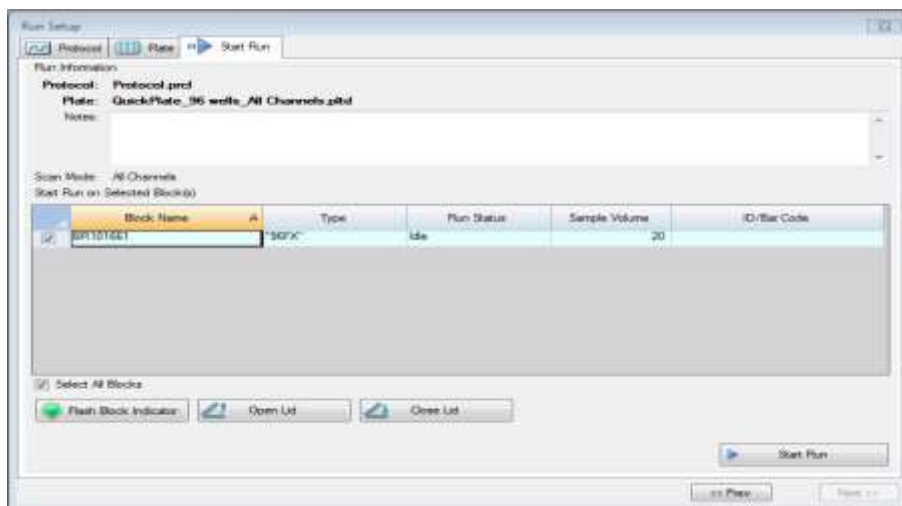


Fig. 11. Close Lid (Cerrar tapa)

2) Haga clic en **Start Run (Inicio del ciclo)**.

3) Almacene el archivo del ensayo en Mis documentos o en una carpeta que especifique. Introduzca el nombre del archivo, haga clic en **SAVE (GUARDAR)** y se iniciará el ciclo.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

1.2. Análisis de datos

A. Crear carpetas para exportar datos

- 1) Para guardar los datos de todos los pasos de detección de la curva de amplificación del archivo de resultados, cree una carpeta.
- 2) El nombre de la carpeta puede ser la que desee el usuario (para la función 'Seegene Export (Exportación de Seegene)', se crearán automáticamente las carpetas "QuantStep8" y "QuantStep9" para guardar los datos de cada curva de amplificación dentro de la carpeta que creó el usuario).

B. Configuración previa para el análisis de datos en CFX Manager™

- 1) Después del test, haga clic en la pestaña Quantitation (Cuantificación) para confirmar los resultados de la curva de amplificación.

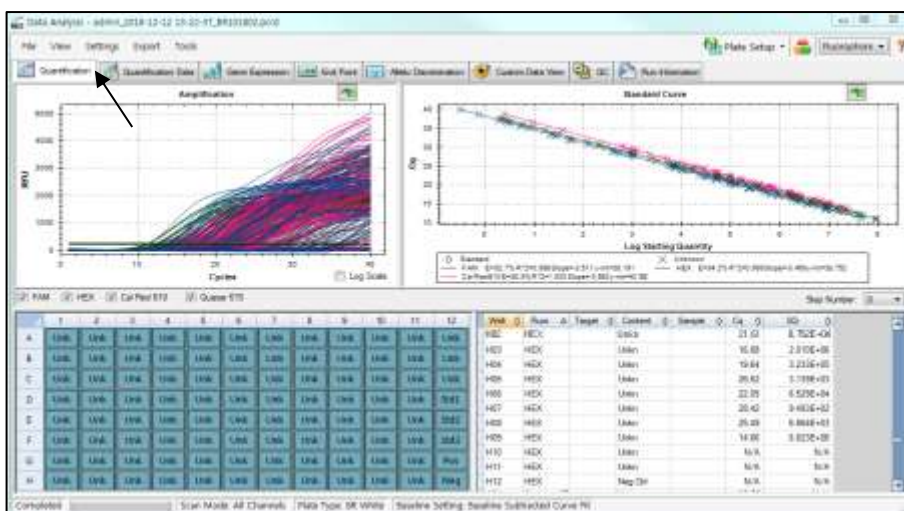


Fig. 12. Resultados de la curva de amplificación

- 2) Seleccione **No Baseline Subtraction (No sustraer línea base)** de Configuración de la línea de base del Menú de Configuración.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

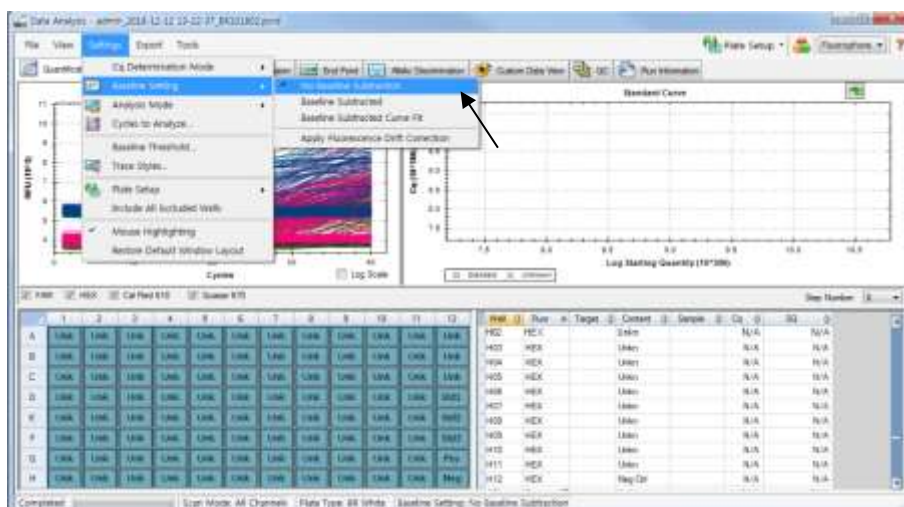


Fig. 13. No Baseline Subtraction (No sustraer línea base)

3) Seleccione **Seegene Export (Exportación de Seegene)** en el menú Export (Exportación).

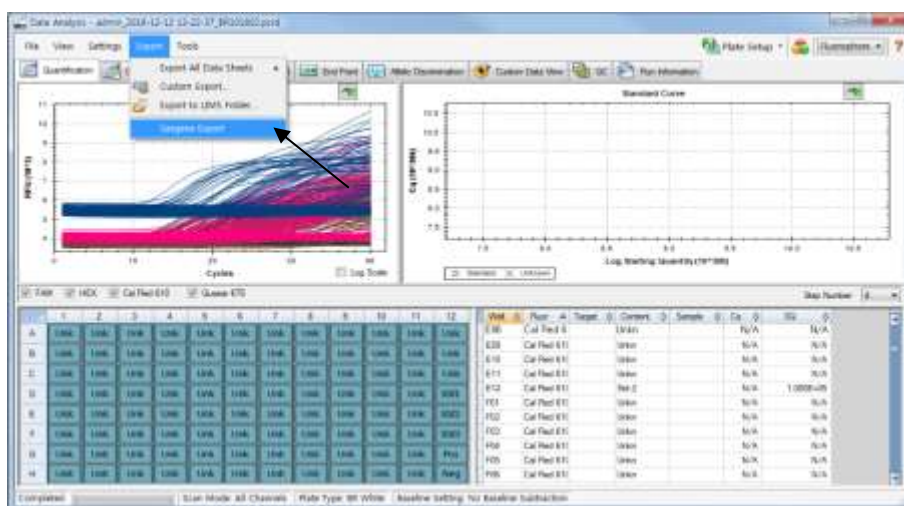


Fig. 14. Seegene Export (Exportación de Seegene)

4) Escoja una localización para guardar los datos y haga clic en **OK (Aceptar)**.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

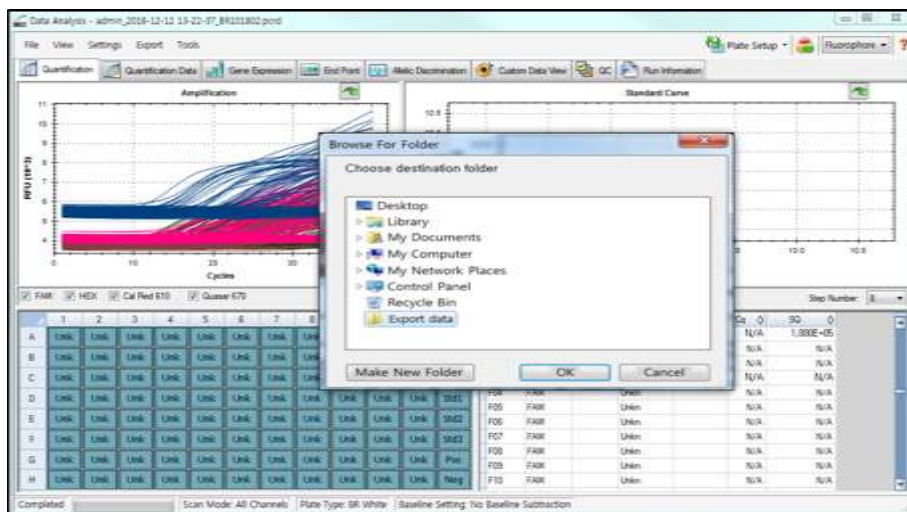


Fig. 15. Seegene Export (Exportación de Seegene) a la carpeta indicada

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

C. Configuración del análisis de datos en Seegene Viewer

1) Abra el programa Seegene Viewer y haga clic en **Option (Opción)** para seleccionar **CFX96 Dx** en el **Instrument (Instrumento)**.

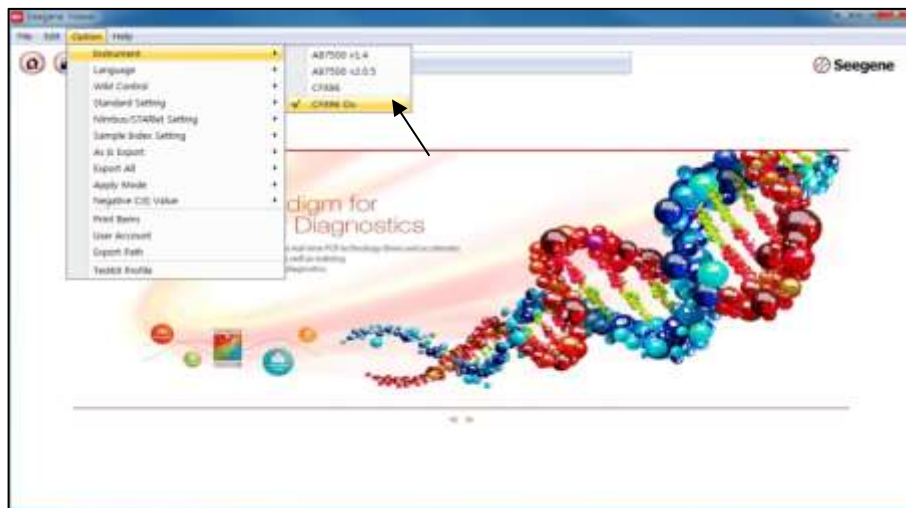


Fig. 16. Seegene Viewer

2) Haga clic en **Open (Abrir)** para encontrar el archivo guardado en la carpeta "QuantStep8", abra el archivo de resultados y seleccione el kit de prueba en el menú **PRODUCT (PRODUCTO)**.

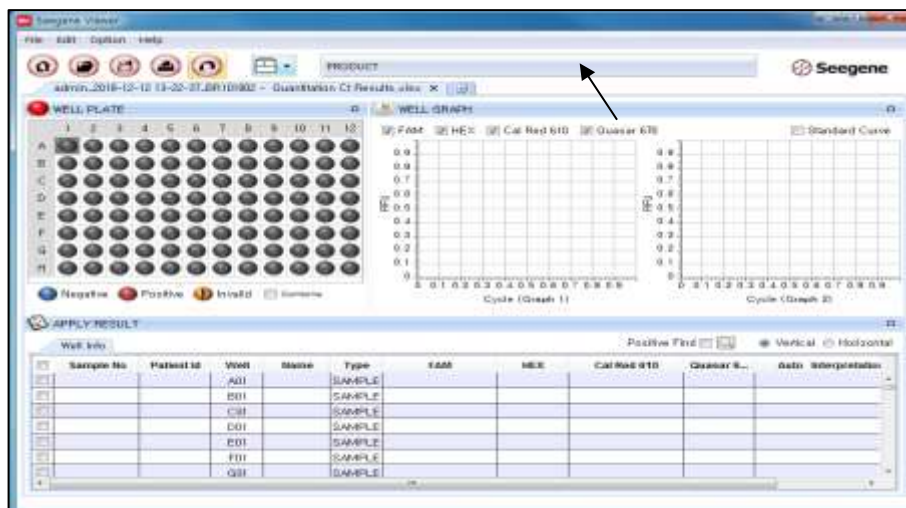


Fig. 17. Configuración del análisis de datos en Seegene Viewer

Firm. Eduardo Omar Míguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

3) Compruebe el resultado de cada pocillo.



Fig. 18. Resultado de la prueba en Seegene Viewer

4) Criterios de validación de los resultados del control

a. Inicio del ensayo válido

Para confirmar la validez del experimento, la reacción de PCR incluye Control Positivo (PC) y Control Negativo (NC). Se determina que el ciclo de ensayo es válido cuando se cumplen los siguientes criterios:

Control	Resultado de Seegene Viewer								Interpretación automática
	FAM		HEX		Cal Red 610		Quasar670		
	CA	Lacto	CO	GV	TV	AV	Mob	IC	
	C _t	Q _t	C _t	Q _t	C _t	Q _t	C _t	C _t	
Control Positivo	≤ 40	> 0	≤ 40	> 0	≤ 40	> 0	≤ 40	≤ 40	Control Positivo (+)
Control Negativo	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Control Negativo (-)

b. Inicio de ensayo no válido

En los casos de falla en la validación, los resultados no se deben interpretar ni notificar. Y se debe repetir la reacción del PCR

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

RESULTADOS
1. Información de los analitos

Fluoróforo	Analito	
	Gráfico 1	Gráfico 2
FAM	<i>Candida albicans</i> (CA)	<i>Lactobacillus</i> spp.* (Lacto)
HEX	otros <i>Candida</i> ** (CO)	<i>Gardnerella vaginalis</i> (GV)
Cal Red 610	<i>Trichomonas vaginalis</i> (TV)	<i>Atopobium vaginae</i> (AV)
Quasar 670	Control Interno (IC)	<i>Mobiluncus</i> spp.*** (Mob)

* *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus jensenii*

** *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida lusitanae*

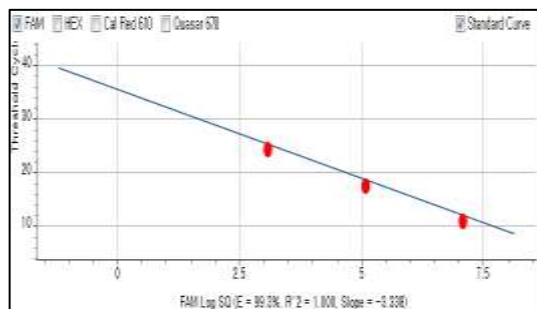
*** *Mobiluncus mulieris* y *Mobiluncus curtisii*

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

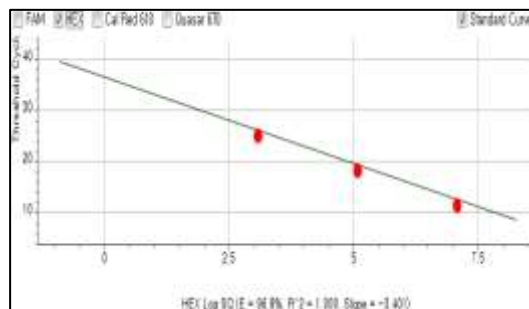
Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

2. Información de la curva estándar

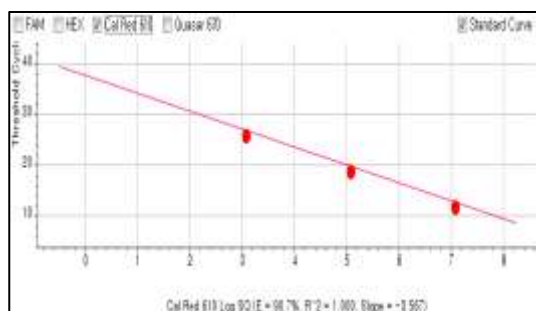
Lactobacillus spp.



Gardnerella vaginalis



Atopobium vaginae



Analito	R ²
<i>Lactobacillus</i> spp.	0,980 ~ 1,000
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0,980 ~ 1,000
<i>Atopobium vaginae</i>	0,980 ~ 1,000

3. Interpretação de Resultados

3.1. Interpretación Automática

Analito	Valor C _t ¹⁾	Valor Q _t ²⁾	Resultado
CA, CO, TV, Mob	≤ 40	-	Detetado (+)
	N/A	-	Não detetado (-)
Lacto, GV, AV	-	> 0	Detetado (+)
	-	N/A	Não detetado (-)
IC	≤ 40	-	Detetado (+)
	N/A	-	Não detetado (-)

1) C_t: umbral del ciclo

2) Q_t: umbral cuantitativo (Log10)

Resultado do alvo = 10^{Q_t} cópias/rxn

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Resultado diana		Resultado IC	Interpretación
Gráfico 1	Gráfico 2		
+	-	+	Ácido nucleico diana, Detectado
-	+		
+	+		
+	-	-	Ácido nucleico diana, Detectado* - Puede(n) estar presente(s) analito(s) adicionales que no se detectaron.
-	+		
+	+		
-	-	+	Ácido nucleico diana, no detectado
-	-	-	No válido** - Los resultados sugieren una recolección de muestras inadecuada, procesos o presencia de inhibidores. - Repita la prueba desde la extracción de ácido nucleico usando otra parte alícuota de la muestra original. - Si se muestra el mismo resultado en el ácido nucleico diluido, recoja las muestras nuevamente.

* El alto nivel de ácidos nucleicos diana puede causar interferencia en la detección y lectura del control interno. La señal IC no válida no indica que los resultados positivos para los objetivos son inválidos.

** Consulte la sección de resolución de problemas para obtener instrucciones detalladas.

3.2. Interpretación de la BV

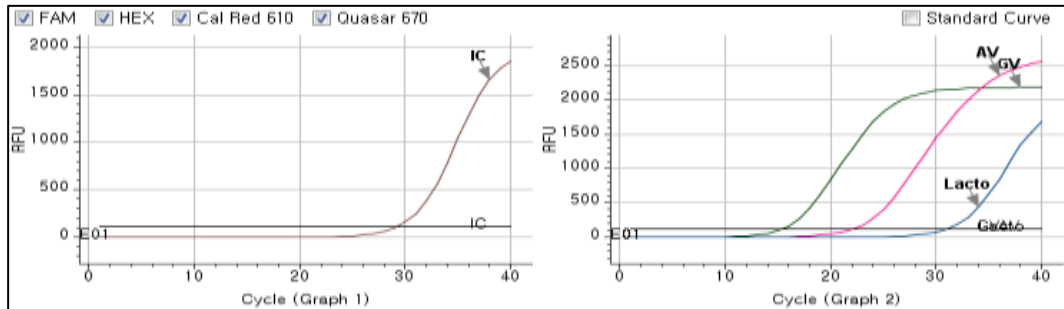
El software Seegene Viewer interpreta automáticamente los resultados de la prueba como Normal, Intermedio y Positivo del estado de BV, con base en el estado de amplificación de la(s) diana(s).

Determinación del corte para la interpretación de la Vaginosis bacteriana (BV)

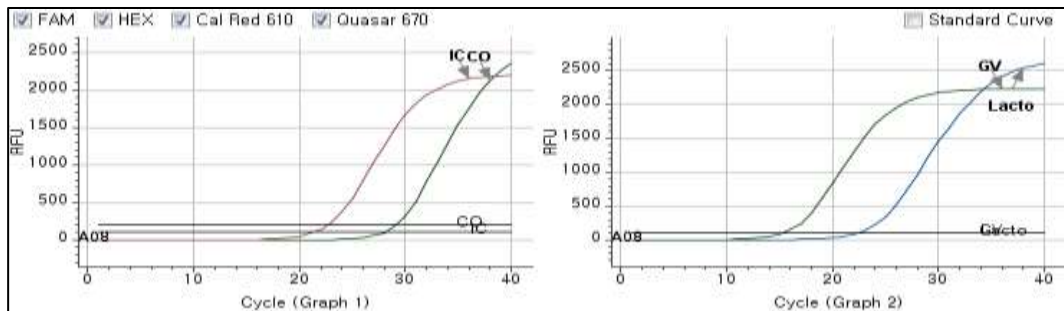
Con el fin de validar los valores de corte de BV para el Allplex™ Vaginitis Screening Assay se utilizaron los resultados del estudio clínico retrospectivo. Para esta validación se analizaron estadísticamente las métricas de PCR de los analitos diana de vaginosis y los resultados generados por el algoritmo de llamada BV, en comparación con los resultados del método de referencia aplicable. Se realizó un análisis de la curva de ROC para confirmar los cortes óptimos para cada analito diana, así como para los cortes utilizados para determinar el estado de vaginosis bacteriana.

4. Aplicación a muestras clínicas

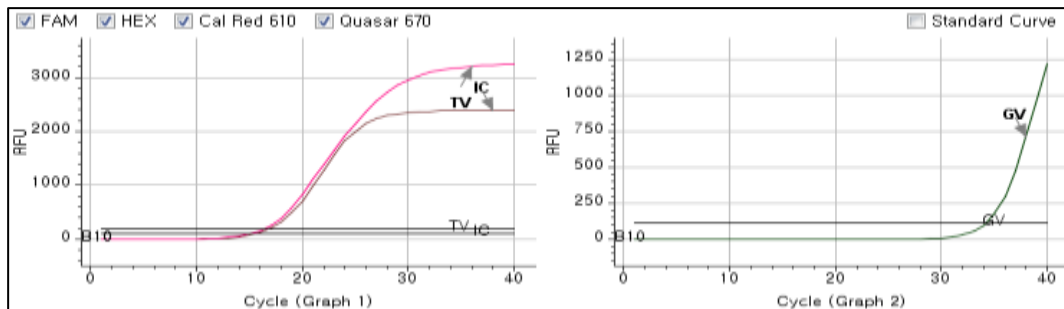
Muestra 1



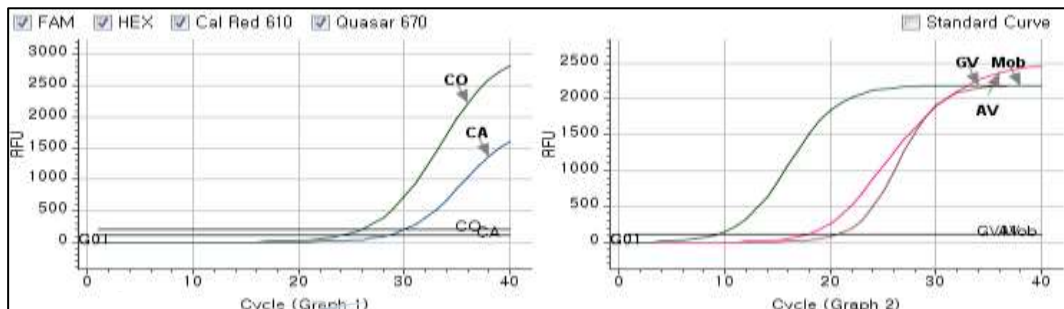
Muestra 2



Muestra 3



Muestra 4



Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Sample	Seegene Viewer Result																	
	FAM				HEX				Cal Red 610				Quasar 670				Auto Interpretation	BV Interpretation
	CA	C(t)	Lacto	Qt	CO	C(t)	GV	Qt	TV	C(t)	AV	Qt	Mob	C(t)	IC	C(t)		
1	-	N/A	+	1.43	-	N/A	+	6.27	-	N/A	+	4.48	-	N/A	+	29.31	"Lacto,GV,AV"	Bacterial Vaginosis
2	-	N/A	+	3.94	+	29.20	+	6.22	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	21.50	"Lacto,CO,GV"	Bacterial Vaginosis
3	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	0.73	+	16.50	-	N/A	-	N/A	+	16.57	"GV,TV"	Normal*
4	+	28.42	-	N/A	+	25.88	+	8.07	-	N/A	+	5.63	+	20.81	-	N/A	"CA,CO,GV,AV,Mob"	Bacterial Vaginosis

*: La falta de *Lactobacillus* puede deberse a que la paciente sea posmenopáusica.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Allplex™ Vaginitis Screening Assay		
OBSERVACIONES	POSIBLES CAUSAS	SOLUCIÓN
No se observa señal	Los fluoróforos del análisis de datos no cumplen con el protocolo	Seleccionar los fluoróforos correctos para el análisis de datos.
	Configuración incorrecta del termociclador en tiempo real	Compruebe las condiciones del ciclo térmico y repita el test con la configuración adecuada.
	Almacenamiento incorrecto o expiración de la fecha de caducidad del kit del test	Compruebe las condiciones de almacenamiento (véase página 9) y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta) del kit del test y use un nuevo kit si fuese necesario.
	Fallo en la extracción de ácido nucleico	Asegúrese de utilizar el método de extracción recomendado.
	Error en la recogida de muestras	Si no se observa señal de la diana ni de IC, significa que la muestra se recogió de manera inadecuada. Recoger la muestra.
No se observa señal de Control Interno	Error de muestreo o alta carga de ácido nucleico del patógeno	Si no se observan la señal de patógeno diana y la señal de IC, entonces vuelva a recolectar las muestras. Si se observa la señal del patógeno diana, pero no la del IC, entonces la amplificación del IC pudo haberse inhibido por una alta carga del patógeno diana. Para confirmar la señal del IC, diluya la muestra (1/10~1/100) en una solución salina y repita el test desde el paso de extracción.
	Presencia de inhibidor PCR	Diluya la muestra (1/10~1/100) en una solución salina y repita el test desde el paso de la extracción.
Picos en los ciclos de la curva de amplificación	Burbujas en el tubo de PCR	Centrifugue el tubo de PCR antes del inicio.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Allplex™ Vaginitis Screening Assay		
OBSERVACIONES	POSIBLES CAUSAS	SOLUCIÓN
Se observan supuestos falsos positivos o señales diana en el Control Negativo	Contaminación	Descontamine todas las superficies e instrumentos con hipoclorito de sodio y etanol. Use solo puntas de filtro durante el procedimiento y cámbielas entre cada tubo. Repita el procedimiento entero desde la extracción de ácido nucleico con el nuevo conjunto de reactivos.
No se observó señal en la muestra positiva o no se observó señal en control positivo	Error en la recogida de muestras	Verificar o método de colheita de amostras e colher novamente.
	Almacenamiento incorrecto de la muestra	Colher novamente a amostra e repetir o procedimento todo. Certificar-se de que a amostra esteja armazenada conforme recomendado.
	Error en la extracción de ácido nucleico	Verificar o processo de extração de ácido nucleico e sua concentração e o extrair novamente.
	Error al añadir ácido nucleico a los tubos de PCR correspondientes	Verificar os números de amostra de tubos que contenham ácido nucleico e certificar-se de adicionar ácido nucleico para os tubos de PCR corretos e repetir o teste cuidadosamente, se necessário.
	Presencia de inhibidor	Diluir o ácido nucleico modelo (1/10~1/100) em solução salina e repetir o teste a partir da fase de extração.
	Mezcla de PCR incorrecta	Confirmar se todos os componentes são adicionados à mistura de PCR (a sensibilidade é comprometida com a pré-mistura pré-composta). Todos os reagentes devem ser homogeneizados e centrifugados antes de serem utilizados.
Señales de supuesto falso DNA estándar	Almacenamiento inadecuado del DNA estándar	Comproue las condiciones de almacenamiento (véase página 9) y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta) del kit del test y use un nuevo kit si fuese necesario.
	$R^2 < 0,980$	Asegúrese de que SD1, SD2 y SD3 se han definido correctamente y, en caso necesario, corríjalos. Si eso no ayuda, repita la PCR para todas las muestras, SD1, SD2 y SD3.

Farm. Eduardo Omar Míguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARILINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

RENDIMIENTO
1. Especificidade

Se probó la reactividad cruzada de Allplex™ Vaginitis Screening Assay utilizando 167 materiales y organismos estándar, como se indica a continuación. Las dianas específicas que se diseñaron para la detección se identificaron mediante Allplex™ Vaginitis Screening Assay.

Núm	Organismo	Fuente	Aislado núm.	Resultado†
1	<i>Atopobium vaginae</i>	KCTC	15240	AV Detectado
2	<i>Candida albicans</i>	Geomebiotics	18G-7	CA Detectado
3	<i>Candida dubliniensis</i>	KCTC	17427	CO Detectado
4	<i>Candida glabrata</i>	KCCM	50044	CO Detectado
5	<i>Candida krusei</i>	KCCM	50633	CO Detectado
6	<i>Candida lusitanae</i>	KCCM	50541	CO Detectado
7	<i>Candida parapsilosis</i>	KCTC	7653	CO Detectado
8	<i>Candida tropicalis</i>	KCCM	32008	CO Detectado
9	<i>Gardnerella vaginalis</i>	KCTC	5096	GV Detectado
10	<i>Lactobacillus crispatus</i>	KCTC	5054	Lacto Detectado
11	<i>Lactobacillus gasseri</i>	KCTC	3163	Lacto Detectado
12	<i>Lactobacillus jensenii</i>	KCTC	5194	Lacto Detectado
13	<i>Mobiluncus curtisii</i>	ATCC	35241	Mob Detectado
14	<i>Mobiluncus mulieris</i>	ATCC	35240D-5	Mob Detectado
15	<i>Trichomonas vaginalis</i>	ATCC	30001	TV Detectado
16	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KCCM	35401	No detectado
17	<i>Acinetobacter calcoeticus</i>	KCTC	2357	No detectado
18	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	KCTC	12407	No detectado
19	<i>Acinetobacter schindleri</i>	KCTC	12409	No detectado
20	<i>Acinetobacter ursingii</i>	KCTC	12410	No detectado
21	<i>Actinomyces israelii</i>	KCTC	9054	No detectado
22	<i>Aerococcus viridans</i>	ATCC	11563	No detectado
23	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	KCTC	2358	No detectado
24	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	KCCM	12137	No detectado
25	<i>Alcaligenes faecalis</i>	KCTC	2678	No detectado
26	<i>Atopobium minutum</i>	KCTC	5038	No detectado

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Núm	Organismo	Fuente	Aislado núm.	Resultado†
27	<i>Atopobium parvulum</i>	KCTC	3663	No detectado
28	<i>Bacillus subtilis</i>	KCTC	1021	No detectado
29	<i>Bacteroides caccae</i>	ATCC	43185	No detectado
30	<i>Bacteroides fragilis</i>	KCTC	5013	No detectado
31	<i>Bacteroides ovatus</i>	KCTC	5827	No detectado
32	<i>Bacteroides vulgatus</i>	ATCC	8480	No detectado
33	<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	KCTC	15192	No detectado
34	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	KCCM	11206	No detectado
35	<i>Bifidobacterium longum</i>	KCCM	11953	No detectado
36	<i>Bifidobacterium minimum</i>	KCTC	3273	No detectado
37	<i>Blautia producta</i> (prevot) Liu et al.	ATCC	27340	No detectado
38	<i>Brevibacterium linens</i>	KCTC	9099	No detectado
39	<i>Candida orthopsilosis</i>	ATCC	96139	No detectado
40	<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV I)	ATCC	VR-901BD	No detectado
41	<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV II)	ATCC	VR-902BD	No detectado
42	<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV III)	ATCC	VR-903D	No detectado
43	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar A)	ATCC	VR-571B	No detectado
44	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar B)	ATCC	VR-573	No detectado
45	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar Ba)	ATCC	VR-347	No detectado
46	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar C)	ATCC	VR-1500	No detectado
47	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar D)	ATCC	VR-885	No detectado
48	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar E)	ATCC	VR-348B	No detectado
49	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar F)	ATCC	VR-346	No detectado
50	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar G)	ATCC	VR-878	No detectado
51	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar H)	ATCC	VR-879D	No detectado
52	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar I)	ATCC	VR-880	No detectado
53	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar J)	ATCC	VR-886	No detectado
54	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar K)	ATCC	VR-887	No detectado
55	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	ATCC	VR-1360	No detectado
56	<i>Chromobacterium violaceum</i>	KCTC	2897	No detectado
57	<i>Citrobacter freundii</i>	KCTC	2509	No detectado
58	<i>Clostridium difficile</i> (Toxin A+ / B+)	ATCC	9689D-5	No detectado
59	<i>Clostridium perfringens</i>	KCTC	3269	No detectado

Fern. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Núm	Organismo	Fuente	Aislado núm.	Resultado†
60	<i>Corynebacterium genitalium</i>	ATCC	33031	No detectado
61	<i>Corynebacterium xerosis</i>	KCTC	3435	No detectado
62	<i>Cryptococcus neoformans</i>	KCCM	50564	No detectado
63	<i>Cytomegalovirus</i>	ATCC	VR-807	No detectado
64	<i>Deinococcus radiopugnans</i>	ATCC	19172	No detectado
65	<i>Derxia gummosa</i>	KCTC	12784	No detectado
66	<i>Enterobacter aerogenes</i>	KCTC	2190	No detectado
67	<i>Enterobacter cloacae</i>	KCCM	12178	No detectado
68	<i>Enterococcus avium</i>	ATCC	14025	No detectado
69	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC	11700	No detectado
70	<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC	5155951559	No detectado
71	<i>Epstein Barr Virus</i>	ATCC	VR-1492	No detectado
72	<i>Escherichia coli</i>	KCCM	11591	No detectado
73	<i>Gemella haemolysans</i>	ATCC	10379	No detectado
74	<i>Haemophilus ducreyi</i>	KCTC	2745	No detectado
75	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC	51907D	No detectado
76	<i>Hepatitis A virus</i>	ATCC	VR-1541	No detectado
77	<i>Hepatitis B virus</i>	ATCC	VR-3232SD	No detectado
78	<i>Human Herpesvirus 1</i>	KBPV	VR-52	No detectado
79	<i>Human Herpesvirus 2</i>	KBPV	VR-53	No detectado
80	<i>Varicella-zoster virus</i>	ATCC	VR-1367	No detectado
81	<i>Human papillomavirus strain 18</i>	KCLB	10002	No detectado
82	<i>Kingella denitrificans</i>	ATCC	33394	No detectado
83	<i>Kingella kingae</i>	ATCC	23330	No detectado
84	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Rhinoscleromatis</i>	ATCC	6908	No detectado
85	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	KCCM	32820	No detectado
86	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	KCCM	40431	No detectado
87	<i>Lactobacillus brevis</i>	KCTC	3498	No detectado
88	<i>Lactobacillus casei</i>	KCCM	12452	No detectado
89	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Lactis</i>	KCTC	3035	No detectado
90	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Delbrueckii</i>	KCTC	13730	No detectado

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Núm	Organismo	Fuente	Aislado núm.	Resultado†
91	<i>Lactobacillus fermentum</i>	KCCM	40401	No detectado
92	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	KCCM	40987	No detectado
93	<i>Lactobacillus helveticus</i>	KCTC	15060	No detectado
94	<i>Lactobacillus hominis</i> DSM 23910	KCTC	21045	No detectado
95	<i>Lactobacillus iners</i>	CCARM	123	No detectado
96	<i>Lactobacillus intestinalis</i>	KCCM	40990	No detectado
97	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	KCCM	32825	No detectado
98	<i>Lactobacillus kalixensis</i>	KCTC	5856	No detectado
99	<i>Lactobacillus oris</i>	KCCM	40993	No detectado
100	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	KCTC	3503	No detectado
101	<i>Lactobacillus pentosus</i>	KCCM	40997	No detectado
102	<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC	700934	No detectado
103	<i>Lactobacillus reuteri</i>	KCCM	40717	No detectado
104	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	KCCM	32405	No detectado
105	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>Salicinius</i>	KCCM	40998	No detectado
106	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	ATCC	27651	No detectado
107	<i>Lactobacillus ultunensis</i>	KCTC	5857	No detectado
108	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	KCTC	41001	No detectado
109	<i>Legionella pneumophila</i>	KCCM	41781	No detectado
110	<i>Micrococcus luteus</i>	KCTC	3063	No detectado
111	<i>Moraxella catarrhalis</i>	KCCM	42707	No detectado
112	<i>Moraxella osloensis</i>	ATCC	19976	No detectado
113	<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>morganii</i>	KCCM	11497	No detectado
114	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	KCTC	9108	No detectado
115	<i>Mycoplasma arginini</i>	ATCC	23838D	No detectado
116	<i>Mycoplasma felis</i> Cole et al.	ATCC	23391	No detectado
117	<i>Mycoplasma genitalium</i>	ATCC	33530	No detectado
118	<i>Mycoplasma hominis</i>	ATCC	27545-TTR	No detectado
119	<i>Mycoplasma iowae</i> Jordan et al.	ATCC	33552	No detectado
120	<i>Mycoplasma leonicaptivi</i> Hill	ATCC	49890	No detectado
121	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC	15531	No detectado

Núm	Organismo	Fuente	Aislado núm.	Resultado†
122	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	ATCC	19612	No detectado
123	<i>Mycoplasma spumans</i>	ATCC	19526	No detectado
124	<i>Neisseria cinerea</i>	ATCC	14685	No detectado
125	<i>Neisseria elongate</i>	KCTC	23361	No detectado
126	<i>Neisseria flavescens</i>	ATCC	13120	No detectado
127	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC	700825	No detectado
128	<i>Neisseria lactamica</i>	ATCC	23970	No detectado
129	<i>Neisseria meningitidis</i>	KCCM	41562	No detectado
130	<i>Neisseria mucosa</i>	ATCC	19696	No detectado
131	<i>Neisseria perflava</i>	ATCC	10555	No detectado
132	<i>Neisseria polysaccharea</i>	ATCC	43768	No detectado
133	<i>Neisseria sicca</i>	ATCC	29256	No detectado
134	<i>Neisseria subflava</i>	ATCC	19243	No detectado
135	<i>Paracoccus denitrificans</i>	KCTC	2530	No detectado
136	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC	49031D-5	No detectado
137	<i>Prevotella bivia</i>	KCTC	5454	No detectado
138	<i>Prevotella buccalis</i>	KCTC	5496	No detectado
139	<i>Prevotella disiens</i>	KCTC	5499	No detectado
140	<i>Prevotella intermedia</i>	KCTC	5692	No detectado
141	<i>Prevotella melaninogenica</i>	KCTC	5457	No detectado
142	<i>Propionibacterium acnes</i>	KCTC	3314	No detectado
143	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC	12453	No detectado
144	<i>Providencia stuartii</i>	KCTC	2568	No detectado
145	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KCCM	11328	No detectado
146	<i>Pseudomonas putida</i>	KCTC	1643	No detectado
147	<i>Rahnella aquatilis</i>	KCTC	2863	No detectado
148	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	KCTC	1372	No detectado
149	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KCCM	50511	No detectado
150	<i>Salmonella enteritidis</i>	KCCM	12021	No detectado
151	<i>Salmonella typhimurium</i>	KCCM	40253	No detectado
152	<i>Staphylococcus aureus</i>	KCTC	1621	No detectado
153	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC	12228	No detectado
154	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KCCM	40417	No detectado

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Núm	Organismo	Fuente	Aislado núm.	Resultado†
155	<i>Streptococcus bovis</i>	KCCM	40409	No detectado
156	<i>Streptococcus mitis</i>	KCTC	5650	No detectado
157	<i>Streptococcus mutans</i>	KCTC	3065	No detectado
158	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC	BAA-255D	No detectado
159	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC	19615	No detectado
160	<i>Streptococcus salivarius</i>	KCCM	11926	No detectado
161	<i>Streptococcus sanguinis</i>	KCTC	3299	No detectado
162	<i>Treponema pallidum</i>	ATCC	BAA-2642SD	No detectado
163	<i>Trichomonas tenax</i>	ATCC	30207	No detectado
164	<i>Ureaplasma parvum</i>	ATCC	27818	No detectado
165	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	ATCC	27816	No detectado
166	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCTC	2471	No detectado
167	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC	23715	No detectado

† Las pruebas de especificidad se repitieron 3 veces.

※ ATCC: American Type Culture Collection

ZMC : ZeptoMetrix Corporation

KCTC : Korean Collection for Type Culture

KCCM : Korean Culture Center of Microorganisms

KCLB: Korean Cell Line Bank

2. Sensibilidad

La sensibilidad se define como la concentración más baja de organismo que se puede detectar consistentemente ($\geq 95\%$ de los resultados positivos entre todas las muestras analizadas). Se confirmó cuando se obtuvieron los resultados correctos de organismo/ensayo de al menos 30 de las 30 muestras ($30/30 = 100\%$) evaluadas.

La sensibilidad de Allplex™ Vaginitis Screening Assay se determinó utilizando muestras adulteradas de DNA plasmídico diana. El límite de detección para el Allplex™ Vaginitis Screening Assay fue de 100 copias/reacción.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

3. Reproducibilidad

Se preparó el panel de reproducibilidad de 21 analitos simulados que incluía muestras muy negativas (0,1X LoD), poco positivas (1X LoD) y ligeramente positivas (3X LoD). En cada centro de pruebas se analizó el panel durante cinco días, dos operadores diferentes llevaron a cabo dos ciclos cada día y triplicaron el ciclo de cada panel a partir de una extracción. Se analizó con un único lote de Allplex™ Vaginitis Screening Assay en tres centros diferentes y con tres lotes en un centro interno. Se observaron tasas positivas de cada analito para el estudio de reproducibilidad: 100,00% de muestras ligeramente positivas, $\geq 100,00\%$ de muestras poco positivas y $\geq 79,33\%$ de muestras muy negativas.

La reproducibilidad del Allplex™ Vaginitis Screening Assay se evaluó entre corridas, sitios y lotes de productos. Los resultados cumplieron con los criterios establecidos anteriormente, confirmando así los rendimientos reproducibles del Allplex™ Vaginitis Screening Assay.

4. Sustancias interferentes

Esta prueba se llevó a cabo usando sustancias interferentes compuestas por 4 sustancias para confirmar el rendimiento de Allplex™ Vaginitis Screening Assay en la presencia de potenciales sustancias interferentes. El resultado no se vio afectado al añadir las sustancias: ni detección no específica ni inhibición en la amplificación objetiva. Teniendo en cuenta los resultados, las 4 sustancias interferentes no afectaron los resultados de Allplex™ Vaginitis Screening Assay.

Núm.	Sustancias interferentes	Concentración
1	Human whole blood	2,5 % (v/v)
2	Albumin (BSA)	60g/L
3	Bilirubin	342 $\mu\text{mol/L}$
4	Mucus	-

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

REFERENCIAS



















1. Bai G, Gajer P, Nandy M, Ma B, Yang H, Melissa N, Bing M, Hongqiu Y and Joyce So [Comparison of Storage Conditions for Human Vaginal Microbiome Studies]. PLoS ONE. (2012) 7(5): e36934
2. J.Y. Chun, K.J. Kim, I. T. Hwang, Y. J. Kim, D. H. Lee, I. K. Lee, and J. K. Kim [Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene.] Nucleic Acids Res. (2007) 35(6): e40
3. D. H. Lee. [TOCE: Innovative Technology for High Multiplex Real-time PCR.] Seegene Bulletin. (2012) 1: 5-10
4. David N. Fredricks, Tina L. Fiedler, and Jeanne M. Marrazzo, M.P.H. [Molecular Identification of Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis.] N Engl J Med. (2005) 353(18): 1899-911
5. Jane Mashburn, CNM, MN and FACNM [Etiology, Diagnosis, and Management of Vaginitis] Journal of Midwifery & Women's Health. (2006) 51: 423-430
6. Jason D. Mintz and Mark G. Martens [Prevalence of Non-Albicans Candida Infections in Women with Recurrent Vulvovaginal Symptomatology] Advances in Infectious Diseases. (2013) 3: 238-242
7. J. Y. Chun. [High Multiplex Molecular Diagnostics.] Seegene Bulletin. (2012) 1: 1-4.
8. K.M.G.R. Branco, R.M.D. Nardi, J.L.S. Moreira, A.C. Nunes, L.M. Farias, J.R. Nicoli and M.A.R. Carvalho. [Identification and in vitro production of Lactobacillus antagonists from women with or without bacterial vaginosis] Braz J Med Biol Res. (2010) 43(4): 338-344.
9. Lori Newman, Jane Rowley, Stephen Vander Hoorn, Nalinka Saman Wijesooriya, Magnus Unemo, Nicola Low, Gretchen Stevens, Sami Gottlieb, James Kiarie and Marleen Temmerman [Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting] PLoS ONE. (2015) 10(12): e0143304
10. Sujatha Srinivasan, Congzhou Liu, Caroline M. Mitchell, Tina L. Fiedler, Katherine K. Thomas, Kathy J. Agnew, Jeanne M. Marrazzo and David N. Fredricks [Temporal Variability of Human Vaginal Bacteria and Relationship with Bacterial Vaginosis.] PLoS ONE. (2010) 5(4): e10197.
11. Y. J. Lee, D. Kim, K. Lee, and J. Y. Chun. [Single-channel multiplexing without melting curve analysis in real-time PCR] Scientific Reports. (2014) 4:7439.
12. Yarbrough ML and Burnham CA [The ABCs of STIs: An Update on Sexually Transmitted Infection] Clin Chem. (2016) 62(6): 811-23
13. Anderson MR, Klink K and Cochrane A [Evaluation of vaginal complaints] JAMA. (2004) 291(11): 1368-79
14. Hainer BL and Gibson MV [Vaginitis] Am Fam Physician. (2011) 83(7): 807-15

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

SÍMBOLOS

Clave sobre los símbolos que se han usado en el manual y las etiquetas.

Símbolo	Explicación
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Código do lote
	Número de catálogo
	Utilizar por fecha
	Limite superior de temperatura
	Mistura de oligonucleótidos para amplificação e deteção
	Mastermix de PCR ou Mix de Deteção
	RNase-free Water
	Controlo Positivo (PC)
	DNA Padrão
	Consultar instruções de uso
	Fabricante
	Data de fabricação
	Representante autorizado na Comunidade Europeia
	Cuidado
	Contém o suficiente para <n> testes
	Identificador único del dispositivo
	Código de barras de reacción para sistema de extracción automatizada

Farm. Eduardo Omar Miguel
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

INFORMACIÓN DE PEDIDO

Núm. Cat.	Producto	Tamaño
-----------	----------	--------

Allplex™ series

SD9750Y	Allplex™ Vaginitis Screening Assay	50 rxns
SD9750X	Allplex™ Vaginitis Screening Assay	100 rxns*

* Para usar solo con Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS y Seegene STARlet.

Productos accesorios

SG1701	Ribo_spin vRD (Viral RNA/DNA Extraction Kit)	50 preps
--------	--	----------

Sistemas de Extração Automatizada

65415-02	Microlab NIMBUS IVD	EA
173000-075	Microlab STARlet IVD	EA
65415-03	Seegene NIMBUS	EA
67930-03	Seegene STARlet	EA
744300.4.UC384	STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	384T / 1box

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Allplex™

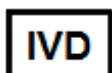
Vaginitis Screening Assay

(Núm. Cat. SD9750Y)

Un ensayo múltiplex de PCR en tiempo real para la detección de *Lactobacillus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus* spp., *Candida albicans*, otros *Candida* y *Trichomonas vaginalis* a partir de muestras genitales y citología a base de líquidos.

Para usar con el

1. CFX96™ Real-time PCR Detection System (CFX96 Manager™ Software-IVD v1.6)
2. CFX96™ Dx System (CFX96 Manager™ Dx Software v3.1)



Solo para diagnóstico in vitro



Seegene Inc.,

Taewon Bldg., 91 Ogeum-ro, Songpa-gu, Seoul, Republic of Korea 05548



Medical Technology Promedt Consulting GmbH

Altenhofstrasse 80, D-66386 St.Ingbert, Alemania

No está disponible en Estados Unidos

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

ÍNDICE

AVISOS	3
USO PREVISTO	5
PRINCIPIOS E INFORMACIÓN SOBRE LOS PROCEDIMIENTOS	5
INFORMACIÓN GENERAL	7
REACTIVOS	8
ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN	9
MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS	9
PROTOCOLO	10
CONFIGURACIÓN DE INSTRUMENTOS DE PCR EN TIEMPO REAL Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	15
RESULTADOS	39
SOLUCIÓN DE PROBLEMAS	44
RENDIMIENTO	46
REFERENCIAS	53
SÍMBOLOS	54
INFORMACIÓN DE PEDIDO	55

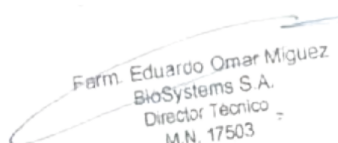
Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

AVISOS

- Solo para diagnóstico in vitro
- La fiabilidad de los resultados depende de que las muestras sean adecuadamente recogidas, almacenadas, transportadas y procesadas.
- **Esta prueba ha sido aprobada para los siguientes tipos de muestras: hisopos genitales y Citología de base líquida.** Este test no ha sido aprobado para ningún otro tipo de muestra.
- **Almacene las muestras de DNA a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ hasta que se vayan a usar y consérvelas en baño de hielo durante su uso.**
- La sensibilidad del ensayo puede disminuir si las muestras se congelan y descongelan repetidas veces o si se almacenan durante mucho tiempo.
- El flujo de trabajo en el laboratorio debería desarrollarse de manera unidireccional.
- Deben llevarse siempre guantes desechables en cada zona y cambiarlos antes de entrar en las diferentes zonas. En caso de que se contaminen, se deben cambiar inmediatamente o tratar con un reactivo descontaminante de DNA.
- Destine materiales y equipamiento a estaciones de trabajo separadas y no los mueva de una zona a otra.
- No se debe pipetear con la boca.
- No se debe comer, beber ni fumar en las zonas de trabajo del laboratorio. Al manipular las muestras y reactivos, han de llevarse guantes sin talco desechables, bata de laboratorio y protección en los ojos. Deben lavarse bien las manos después de manipular las muestras y los reactivos del test.
- Evite contaminar los reactivos al quitar las partes alícuotas de los tubos de reactivos. Se recomienda usar puntas de pipeta desechables estériles, resistentes a los aerosoles.
- No mezcle reactivos de diferentes lotes o de diferentes tubos del mismo lote.
- No use el producto después de su fecha de caducidad.
- No reúse los elementos desechables.
- Use tubos con tapa de rosca y evite cualquier posible salpicadura o contaminación cruzada de las muestras durante la preparación.
- Por favor, tenga cuidado de no contaminar los reactivos con ácidos nucleicos extraídos, productos de PCR y control positivo. Para evitar la contaminación de los reactivos, se recomienda utilizar puntas con filtro.
- Use zonas de trabajo separadas y segreadas para cada experimento.
- Abra tiras o tubos de reacción de PCR después de la amplificación solo en las zonas destinadas para ello, de modo que se evite la contaminación de la zona con los amplicones.

- Los materiales positivos se han de almacenar separados de los reactivos del kit.
- Deben adoptarse los procedimientos de seguridad de laboratorio (consulte los documentos de Bioseguridad en los laboratorios microbiológicos y biomédicos y CLSI) al manipular las muestras. Limpie y desinfecte exhaustivamente todas las superficies de trabajo con hipoclorito de sodio al 0,5% (en agua desionizada o destilada). Los componentes del producto (sus residuos, envoltorio) pueden considerarse residuos de laboratorio. Deseche los reactivos sin utilizar y los residuos conforme a las normativas nacionales, regionales y locales de aplicación.
- La fecha de caducidad es 12 meses a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ desde la fecha de fabricación. Consulte la etiqueta para comprobar la fecha de caducidad.
- El nombre de marca del Sistema de detección de PCR en tiempo real-IVD CFX96™ “CFX96™ Real-time PCR Detection System-IVD” se cambia a Sistema CFX96™ Dx “CFX96™ Dx System”. Como no hay cambios de hardware en los sistemas, se espera obtener los mismos resultados de ambos sistemas.
- El software “CFX Manager™ Dx v3.1” es una versión de actualización del software-IVD “CFX Manager™ v1.6”. El software actualizado incluye mejoras al menú “Run” (Ejecutar). Estas mejoras no afectan los resultados del análisis de datos; por lo tanto, los resultados serán los mismos.



Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503



Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

USO PREVISTO

Allplex™ Vaginitis Screening Assay es una prueba cualitativa y cuantitativa in vitro para la detección simple o múltiple de los patógenos de *Lactobacillus* spp. (Lacto; *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus jensenii*), *Gardnerella vaginalis* (GV), *Atopobium vaginae* (AV), *Mobiluncus* spp. (Mob; *Mobiluncus mulieris* y *Mobiluncus curtisii*), *Candida albicans* (CA), otros *Candida* (CO; *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida lusitanae*) y *Trichomonas vaginalis* (TV).

- Detección cuantitativa de *Lactobacillus* spp. (Lacto), *Gardnerella vaginalis* (GV) y *Atopobium vaginae* (AV)
- Detección cualitativa de *Mobiluncus* spp. (Mob), *Candida albicans* (CA), otros *Candida* (CO) y *Trichomonas vaginalis* (TV)

El Allplex™ Vaginitis Screening Assay está diseñado para ayudar a diagnosticar una infección vaginal en mujeres con un síntoma clínico compatible con la vaginosis bacteriana. El Allplex™ Vaginitis Screening Assay debe interpretarse en conjunto con otros datos clínicos de laboratorio de los médicos.

PRINCIPIOS E INFORMACIÓN SOBRE LOS PROCEDIMIENTOS

1. Principios

Allplex™ Vaginitis Screening Assay presenta tecnología MuDT™ propiedad de Seegene, que permite proporcionar valores multi-C_t (ciclo umbral) en un único canal de fluorescencia sin análisis de curva de Melting en instrumentos de PCR en tiempo real.

Allplex™ Vaginitis Screening Assay es un ensayo múltiplex de PCR en tiempo real que permite la amplificación y detección simultánea de los ácidos nucleicos diana de *Lactobacillus* spp. (Lacto), *Gardnerella vaginalis* (GV), *Atopobium vaginae* (AV), *Mobiluncus* spp. (Mob), *Candida albicans* (CA), otros *Candida* (CO), *Trichomonas vaginalis* (TV) y Control Interno. La presencia de una secuencia de genes específicos en la reacción se notifica como un valor C_t y Q_t a través del software de análisis Seegene Viewer.

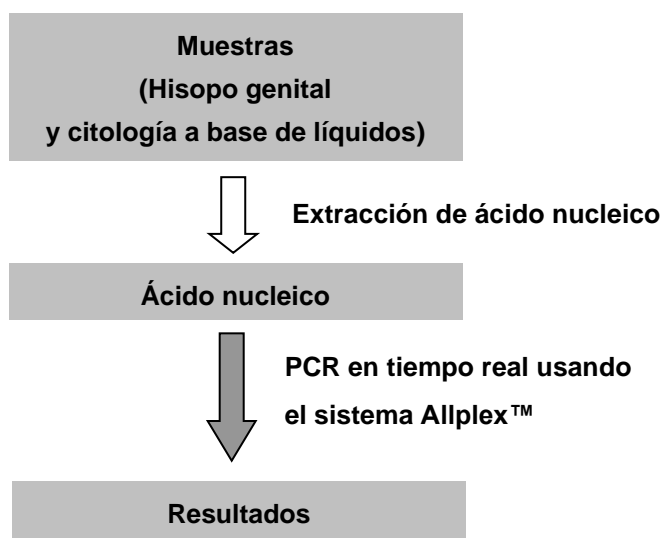
Se utiliza un gen humano endógeno como Control Interno (IC) para supervisar todo el proceso de recogida de muestras, extracción de ácido nucleico y constatar cualquier posible inhibición de la PCR.

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Para evitar que el producto de amplificación actúe como potencial contaminante, en el Allplex™ Vaginitis Screening Assay se utiliza un sistema Uracil-DNA glicosilasa (UDG)-dUTP. El sistema UDG-dUTP se usa comúnmente cuando se realiza una PCR para eliminar los amplicones sobrantes usando escisiones por UDG de residuos de uracilo desde el DNA mediante la escisión del enlace N-glicosílicos.

2. Información sobre el procedimiento



Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

INFORMACIÓN GENERAL

La mayoría de las mujeres tendrán una infección vaginal, caracterizada por secreción, picazón u olor, durante su vida. Se ha demostrado que la obtención de un historial médico por sí solo es insuficiente para un diagnóstico preciso de vaginitis y puede conducir a la administración inadecuada de medicamentos. Por lo tanto, se justifica un historial cuidadoso, un examen y pruebas de laboratorio para determinar la etiología de los síntomas vaginales. Las tres afecciones más comunes, diagnosticadas entre las mujeres con síntomas vaginales que se presentan en el entorno de atención primaria, fueron: la vaginosis bacteriana (22% a 50%), la candidiasis vulvovaginal (17% a 39%) y la tricomoniasis (4% a 35%). En algunos casos la etiología puede ser mixta y puede haber más de una enfermedad presente; en aproximadamente el 30% de las mujeres sintomáticas no se identifica ningún agente etiológico.

La vaginosis bacteriana (BV) es un síndrome clínico polimicrobiano resultante del reemplazo del peróxido de hidrógeno normal que produce *Lactobacillus* sp. En la vagina con altas concentraciones de bacterias anaerobias (por ejemplo, *Prevotella* sp. y *Mobiluncus* sp.), *G. vaginalis*, Ureaplasma, Mycoplasma y numerosos anaerobios fastidiosos o no cultivados. La BV se puede diagnosticar mediante el uso de criterios clínicos (es decir, el criterio diagnóstico de Amsel) o la tinción de Gram (que se considera el método de laboratorio estándar de oro para diagnosticar la BV). La PCR se ha utilizado en entornos de investigación para la detección de una variedad de organismos asociados con la BV. La detección de organismos específicos podría ser predictiva de BV por PCR. Se necesita una validación adicional antes de poder recomendar estas pruebas para diagnosticar la BV.

La candidiasis vulvovaginal (VVC) es causada por *C. albicans*, pero ocasionalmente puede ser causada por otras *Candidia* sp. o levadura. Se estima que el 75% de las mujeres tendrá al menos un episodio de VVC, y del 40% al 45% tendrá dos o más episodios. Sobre la base de la presentación clínica, la microbiología, los factores del huésped y la respuesta al tratamiento, la VVC se puede clasificar como no complicada o complicada. Aproximadamente del 10% al 20% de las mujeres tendrán una VVC complicada, lo que requerirá consideraciones diagnósticas y terapéuticas especiales. Las terapias antimicóticas convencionales no son tan eficaces contra estas especies no álbicas como contra *C. albicans*.

La tricomoniasis es una enfermedad de transmisión sexual (STD) muy común. Es causada por una infección con un parásito protozoario llamado *Trichomonas vaginalis*. Alrededor del 70% de las personas infectadas no tienen signos ni síntomas. La microscopía de montura húmeda de un hisopo vaginal a menudo revela glóbulos blancos y tricomonas rápidamente móviles. Sin embargo, la detección de tricomonas por microscopía tiene una sensibilidad de solo 60% a 75%, mientras que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede detectar *T. vaginalis* con una sensibilidad de 85% a 100%.


Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

REACTIVOS

Los reactivos contenidos en un kit son suficientes para 50 reacciones.

Información de pedido (**REF** SD9750Y)

Allplex™ Vaginitis Screening Assay			
Símbolo	Contenidos	Volumen	Descripción
PRIMER	VS MOM	250 µL	Mezcla de oligos de MuDT (MOM): - Reactivos de amplificación y detección
PREMIX	EM1	250 µL	- Polimerasa de DNA - Uracil-DNA glicosilasa (UDG) - Tampón que contiene dNTPs
CONTROL +	VS PC	40 µL	Control Positivo (PC): - Mezcla de patógenos y clones IC
SD	VS SD1	40 µL	DNA estándar para cuantificación (1X10 ⁷ copias/rxn) - Mezcla de 3 patógeno clones (Lacto, GV, AV)
SD	VS SD2	40 µL	DNA estándar para la cuantificación (1X10 ⁵ copias/rxn) - Mezcla de 3 patógeno clones (Lacto, GV, AV)
SD	VS SD3	40 µL	DNA estándar para la cuantificación (1X10 ³ copias/rxn) - Mezcla de 3 patógeno clones (Lacto, GV, AV)
WATER	RNase-free Water	1.000 µL	Calidad ultrapura, grado PCR
	Manual do usuário		

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

Todos los componentes de Allplex™ Vaginitis Screening Assay deben almacenarse a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Todos los componentes son estables en las condiciones de almacenamiento recomendadas hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Este producto se puede usar por 94 días después de la apertura inicial del kit y el rendimiento no se ve afectado por hasta 5 ciclos de congelación y descongelación. Si se van a utilizar los reactivos solo de forma intermitente, deben almacenarse en partes alícuotas.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS

- Guantes desechables sin talco (látex o nitrilo)
- Pipetas (ajustables) y puntas de pipeta estériles
- Tubo de microcentrifugación de 1,5 mL
- Productor de hielo
- Centrífuga de sobremesa
- Mezclador vórtex
- CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- Tiras de 8 tubos de perfil bajo de 0,2 mL sin tapas (color blanco, Núm. Cat. TLS0851, Bio-Rad)
- Tiras de 8 tapas planas ópticas (Núm. Cat. TCS0803, Bio-Rad)
- Placas de PCR Hard-Shell® de 96 pocillos, perfil bajo, pared delgada, faldón, blanco / blanco (Núm. Cat. HSP9655, Bio-Rad)
- Placas de PCR Hard-Shell® de 96 pocillos, perfil bajo, pared delgada, faldón, blanco / blanco, código de barras (Núm. Cat. HSP9955, Bio-Rad)
- Sellador térmico transparente permanente (Núm. Cat. 1814035, Bio-Rad)*
- Sellador de placa del PCR PX1 (auto-sellador, Núm. Cat. 181-4000, Bio-Rad)*
- Solución salina
- Mesa de trabajo limpia

* Asegúrese de usar el sello térmico y el sellador de placas listados arriba juntos.

Ferm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

PROTOCOLO**1. Recogida de muestras, almacenamiento y transporte**

Nota: Todas las muestras se deben tratar como material potencialmente infeccioso. Solo se permiten los materiales de las muestras que se recojan, almacenen y transporten de acuerdo con las siguientes normas e instrucciones.

Hisopos genitales**Citología en base líquida**

Nota: Para garantizar la alta calidad de las muestras, estas se han de transportar lo más rápido posible, y según las condiciones de temperatura indicadas.

A. Recogida de muestras**Muestras de hisopos genitales**

Para recoger los hisopos genitales, use los siguientes materiales:

- Los hisopos genitales se pueden recoger y transportar en 1-3 mL de los siguientes medios:
 - ENAT PM 2ML REGULAR APPLICATOR (APLICADOR REGULAR ENAT PM 2ML) (Copan)
 - UTM with Flocked Swabs (UTM con hisopos flocados) (Copan)
 - Swab Specimen Collection Kit (Kit para recoger muestras de hisopos) (Qiagen Corporation)
- Deje el hisopo en el medio de transporte del cultivo. Cierre y etiquete el recipiente de la muestra. Siga estrictamente las instrucciones para el almacenamiento y transporte.
- Siga un protocolo recomendado para recoger las células de epitelio escamoso y columnar después de retirar la mucosa cervical.

Muestras de citología en base líquida

- Use el medio citológico en base líquida ThinPrep® de HOLOGIC® Inc. y SurePath™ de BD.
- Siga las instrucciones del fabricante para recoger las muestras de células cervicales en los medios ThinPrep® y SurePath™.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

B. Almacenamiento y transporte de muestras

Muestras	Almacenamiento y transporte		Nota
	Temp.	Duración*	
Hisopo genital	2-8°C	1 semana	- El rendimiento puede verse afectado por el almacenamiento a largo plazo de la muestra. - Las muestras también deben adherirse a las instrucciones locales y nacionales para el transporte de material patógeno.
Medio ThinPrep®	2-8°C	90 días	
Medio SurePath™	2-8°C	2 semanas	

*Duración: El período de tiempo desde la recolección de la muestra hasta la prueba final (incluye el transporte y almacenamiento de las muestras antes de la prueba).

2. Extracción de ácido nucleico

A. Tratamiento previo de las muestras

Nota: El proceso del tratamiento previo para extraer el ácido nucleico es el mismo entre los kits manuales y los sistemas de extracción automatizados (NucliSENS® easyMAG®).

Hisopos genitales

- Las muestras de hisopos genitales se usan sin tratamiento previo.

Citología cervical en base líquida

- Equilibre las muestras a temperatura ambiente (19-25°C).
- Centrifugue 1 mL de muestra de citología cervical en base líquida durante 15 minutos a 15.000 x g (13.000 rpm).
- Debe desecharse el sobrenadante. A continuación, hay que suspender de nuevo el sedimento en el volumen recomendado de solución salina (véase volumen recomendado de 2-B, 2-C) agitándolo bien en un mezclador de vórtice.
- Siga el protocolo del fabricante.

Firm. Eduardo Omar Míguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Org. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

B. Kits de extracción de ácido nucleico manual

Nota: Use la muestra recomendada y los volúmenes de la elución tal y como se indica a continuación. Para el resto, consulte el protocolo del fabricante.

Kit de extracción	Fabricante	Núm. Cat.	Volumen recomendado
QIAamp® DSP DNA Mini Kit*	QIAGEN	61304	Muestra: 200 µL Elución: 50 µL
QIAamp® DNA Mini Kit*	QIAGEN	51304	Muestra: 200 µL Elución: 50 µL
Ribo_spin vRD** (Viral RNA/DNA Extraction Kit)	GeneAll	302-150 SG1701***	Muestra: 200 µL Elución: 50 µL

* Paso de lisis del proceso utilizando 180 µL del ATL Buffer en lugar del tampón AL en el caso de los medios SurePath™.

** Ribo_spin vRD kit no es compatible con el medio SurePath™.

*** Por favor, utilice los números de catálogo mostrados anteriormente para la compra de productos de Seegene Inc.

C. Sistema de extracción de ácido nucleico automatizado

Nota: Use la muestra recomendada y los volúmenes de la elución tal y como se indica a continuación. Para el resto, consulte el protocolo del fabricante.

Sistema de extracción automatizado	Fabricante	REF	Volumen recomendado
NucliSENS® easyMAG®	bioMérieux	200111	Muestra: 200 µL Elución: 100 µL

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

3. Preparación de PCR en tiempo real

Nota: Deben usarse tubos, tapas y sellos térmicos correctos (consulte los MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS).

Nota: Deben usarse filtros resistentes a los aerosoles y guantes ajustados al preparar las reacciones de PCR de un solo paso. Tenga especial cuidado para evitar la contaminación cruzada.

Nota: Descongele totalmente todos los reactivos en baño de hielo.

Nota: Centrifugue brevemente los tubos de reactivos para recoger las gotas residuales de dentro de la tapa.

A. Prepare la Mastermix de PCR.

5 µL	VS MOM
5 µL	EM1
5 µL	RNase-free Water
15 µL	Volume Total da Mastermix de PCR

Nota: Calcule la cantidad que se necesita de cada reactivo necesario en función del número de reactivos (muestras + controles + DNA estándar).

B. Mezcle rápido en un mezclador de vórtice y centrifugue brevemente.

C. Utilice una parte proporcional de 15 µL de Mastermix de PCR en los tubos de PCR.

D. Añada 5 µL de los ácidos nucleicos de cada muestra en el tubo que contiene la Mastermix de PCR.

15 µL	Mastermix de PCR
5 µL	Ácido nucleico de la muestra
20 µL	Volumen total de la reacción

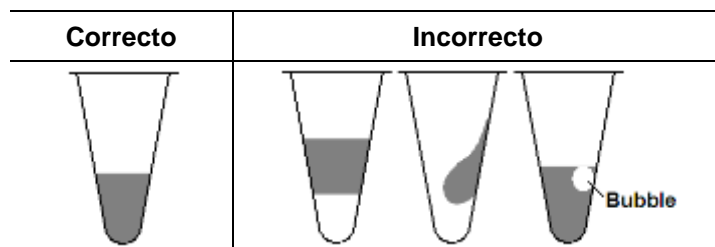
E. Cierre la tapa o selle la película, y centrifugue brevemente los tubos de PCR.

F. Verifique que el líquido que contienen todos los componentes de PCR se encuentre en el fondo de cada tubo de PCR. Si no es así, centrifugue de nuevo a mayores rpm durante más tiempo.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Nota: Se recomienda centrifugar los tubos de PCR antes de la PCR para eliminar las burbujas de aire y recoger todos los líquidos residuales en el fondo de los tubos.



Nota: Con cada muestra, use una nueva punta de pipeta estéril.

Nota: Para el **Control Negativo (NC)** use 5 µL de agua exenta de RNase-free Water en lugar del ácido nucleico de la muestra.

Nota: Para el **Control Positivo (PC)**, use 5 µL de VS PC en lugar del ácido nucleico de la muestra.

Nota: Para el **DNA estándar (SD)**, use 5 µL de VS SD1, VS SD2 y VS SD3 en lugar del ácido nucleico de la muestra.

Nota: Tenga cuidado de que no se produzca una contaminación cruzada del Mastermix de PCR y de las muestras con el Control Positivo y el DNA estándar.

Nota: No etiquete el tubo de reacción en su tapa. La fluorescencia se detecta desde la parte superior de cada tubo de reacción..

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

CONFIGURACIÓN DE INSTRUMENTOS DE PCR EN TIEMPO REAL Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

1. CFX96™ Real-time PCR Detection System (CFX Manager™ Software-IVD v1.6)

1.1. Configuración de los instrumentos de PCR en tiempo real

Nota: La configuración del experimento en el sistema de CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio- Rad) puede dividirse en tres pasos: Protocol Setup (Configuración del protocolo), Plate Setup (Configuración de la placa) e Start run (Inicio del ciclo).

A. Protocol Setup (Configuración del protocolo)

1) En el menú principal, seleccione **File (Archivo) → New (Nuevo) → Protocol (Protocolo)** para abrir el **Protocol Editor (Editor de protocolo)**.

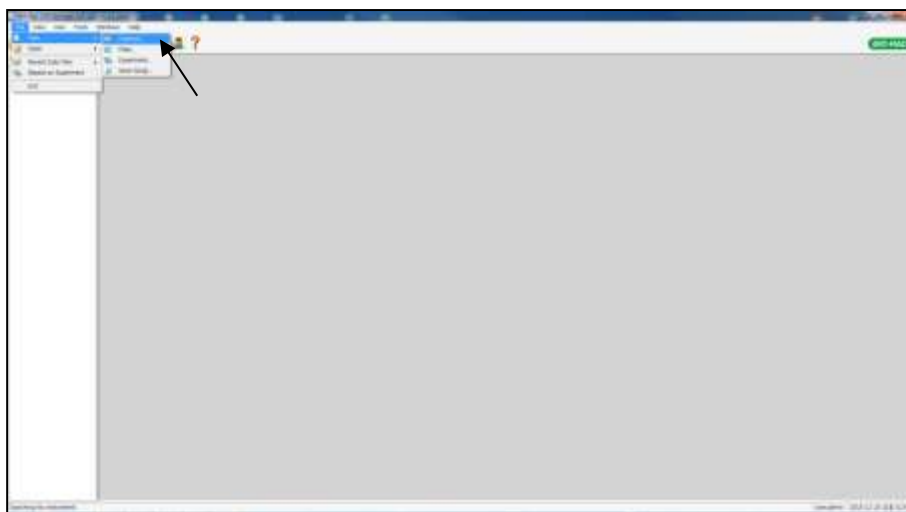


Fig. 1. Protocol Setup (Configuración del protocolo).

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

2) En **Protocol Editor (Editor de protocolo)**, defina el perfil térmico como sigue:

Paso	Núm. de ciclos	Temperatura	Duración
1	1	50°C	4 min
2		95°C	15 min
3	5	95°C	30 seg
4		60°C	1 min
5		72°C	30 seg
6	GOTO (VAYA AL) Paso 3, 4 veces más		
7	40	95°C	10 seg
8*		60°C	1 min
9*		72°C	10 seg
10	GOTO (VAYA AL) Paso 7, 39 veces más		

Nota*: Lectura de placa en el paso 8 y 9. La fluorescencia se detecta a 60°C y 72°C.

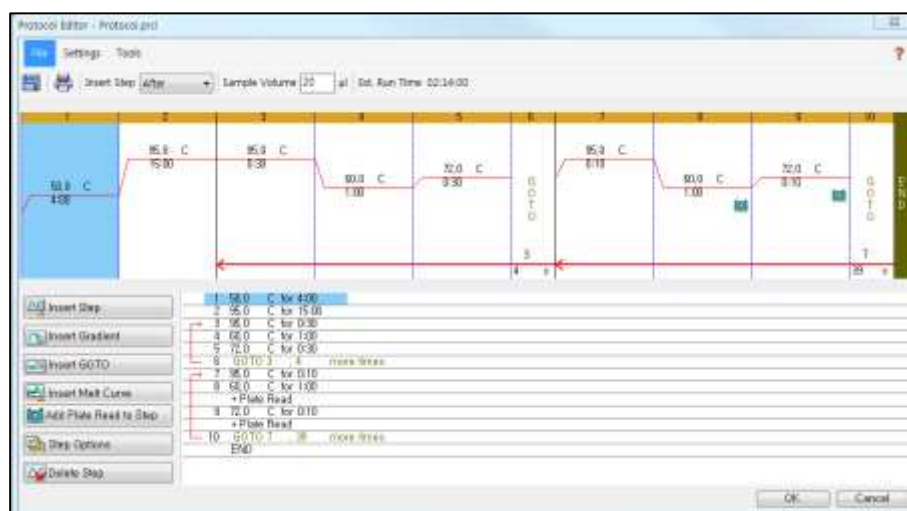


Fig. 2. **Protocol Editor (Editor de protocolo)**

3) Haga clic en el cuadro al lado de **Sample Volume (Volumen de la muestra)** para añadir directamente 20 µL.

4) Haga clic en **OK (Aceptar)** y guarde el protocolo para abrir la ventana **Experiment Setup (Configuración del experimento)**.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

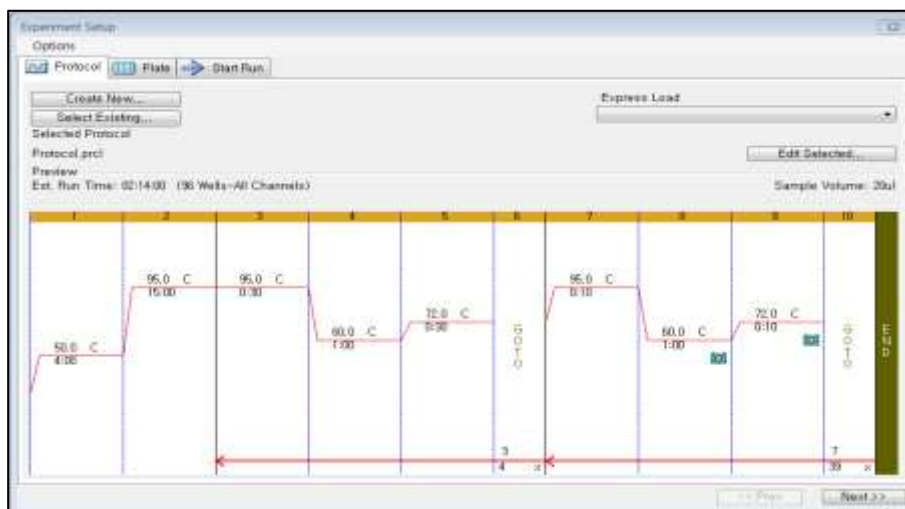


Fig. 3. **Experiment Setup (Configuración del experimento): Protocol (Protocolo)**

B. Plate Setup (Configuración de la placa)

1) En la pestaña **Plate (Placa)** en **Experiment Setup (Configuración del experimento)**, haga clic en **Create New (Crear nuevo)** para abrir la ventana **Plate Editor (Editor de placa)**.

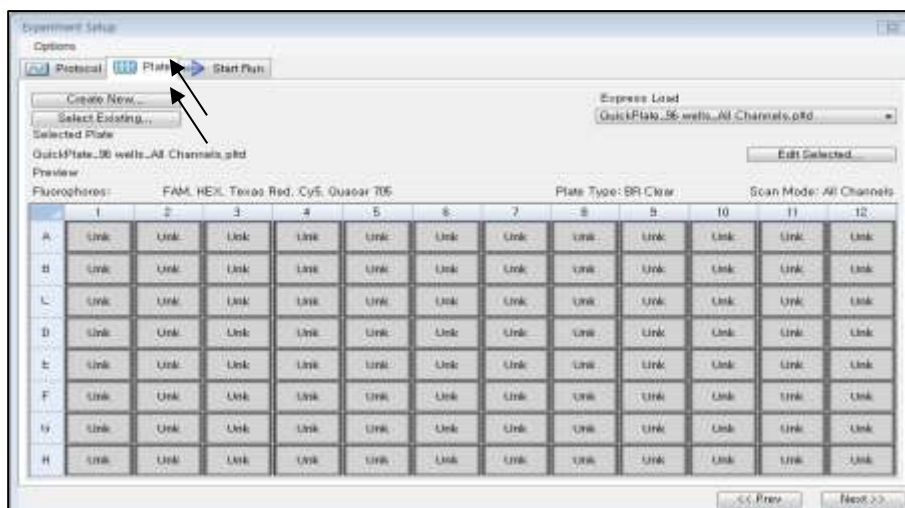


Fig. 4. **Plate Editor (Editor de placa).**

2) Haga clic en **Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos)** para indicar los fluoróforos (**FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670**) que se van a usar y haga clic en **OK (Aceptar)**.

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

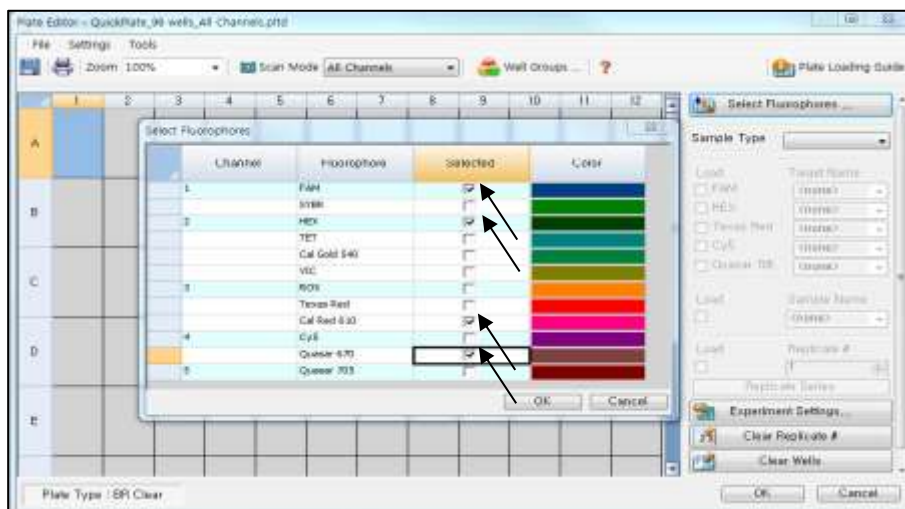


Fig. 5. **Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos) (FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670)**

3) Crear una curva estándar

- Seleccione los pocillos cargados con Sample Type/Standard (Tipo de muestra/Estándar), determine los fluoróforos específicos (FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670) y luego haga clic en la casilla de verificación Cargar (Fig. 6).
- Seleccione los pocillos en el diagrama de la placa y haga clic en Replicate Series (Replicar series). Se abrirá la venta de edición de Replicate Series (Replicar series) (Fig. 7).
- Seleccione los pocillos a los que se han sido asignados números duplicados consecutivos y haga clic en Dilution Series (Serie de dilución). Luego introduzca información en la venta de Dilution Series (Serie de dilución) como se indica en la Fig. 8.

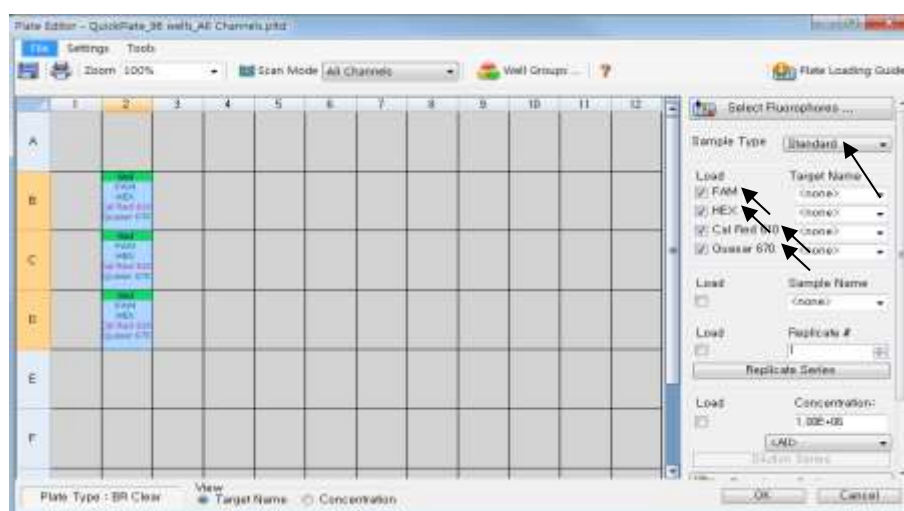


Fig. 6. **Creating a Standard Curve (Crear una curva estándar) (1)**

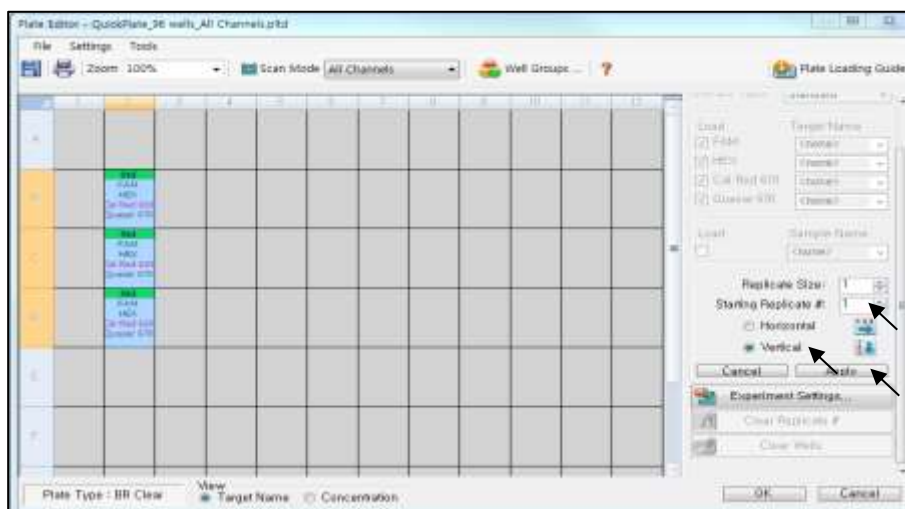
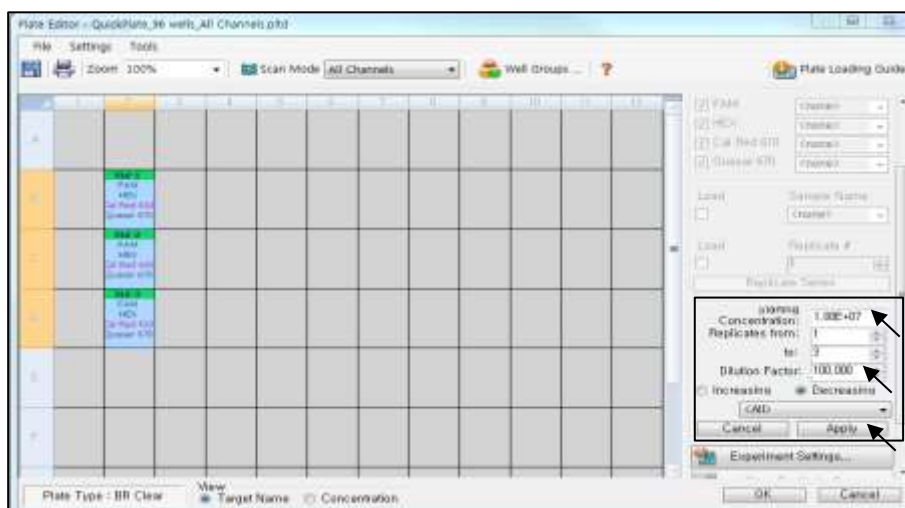


Fig. 7. Creating a Standard Curve (Crear una curva estándar) (2)



Starting Concentration:	1,00E+07
Replicates from:	1
to:	3
Dilution Factor:	100,000
<input type="radio"/> Increasing <input checked="" type="radio"/> Decreasing	
<input type="button" value="Cancel"/> <input type="button" value="Apply"/>	

Fig. 8. Creating a Standard Curve (Crear una curva estándar) (3)

4) Seleccione los pocillos deseados y luego el tipo de muestra en el menú desplegable **Sample Type (Tipo de muestra)**.

- **Unknown (Desconocidos):** Muestras clínicas
- **Negative Control (Control negativo)**
- **Positive Control (Control positivo)**
- **Standard DNA (DNA estándar)**

- 5) Haga clic en las casillas de verificación adecuadas (**FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670**) para especificar los fluoróforos que se van a detectar en los pocillos seleccionados.
- 6) Escriba el **Sample Name (Nombre de la muestra)** y presione la tecla Intro.
- 7) En **Settings (Configuración)** del menú principal de **Plate Editor (Editor de placa)**, escoja **Plate Size (96 wells) (Tamaño de la placa (96 pocillos))** y **Plate Type (BR White) (Tipo placa (Blanco BR))**.

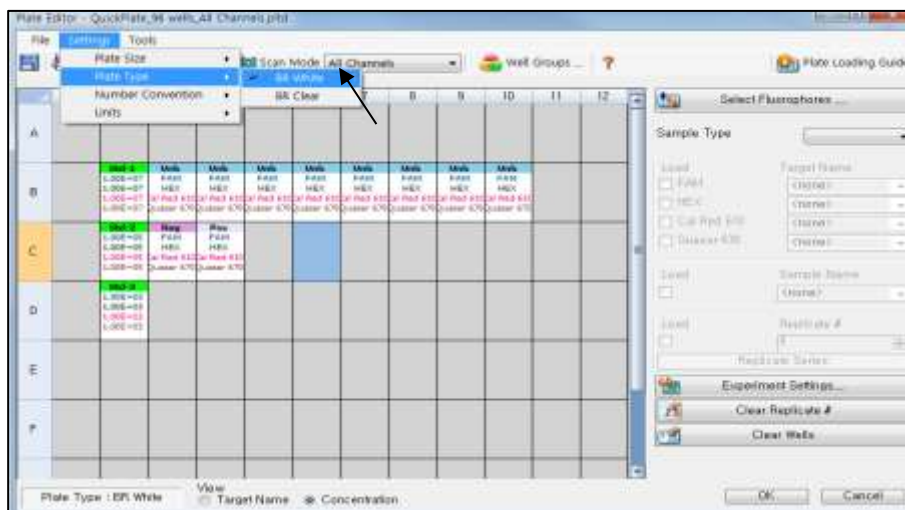


Fig. 9. Plate Setup (Configuración de la placa)

- 8) Haga clic en **OK (Aceptar)** para guardar la nueva placa.
- 9) Regresará a la ventana **Experiment Setup (Configuración del experimento)**.

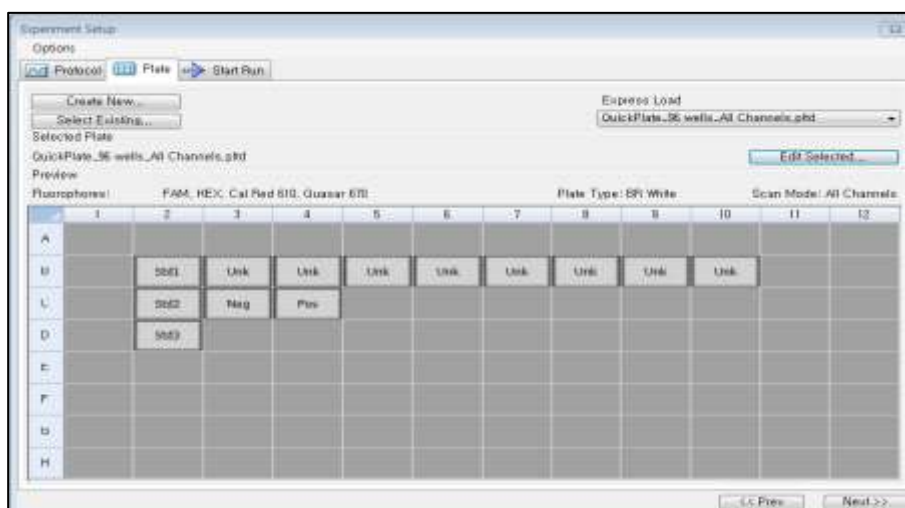


Fig. 10. Experiment Setup (Configuración del experimento): Plate (Placa)

- 10) Haga clic en **Next (Siguiente)** para ejecutar Start Run (Inicio del ciclo).

C. Start Run (Inicio del ciclo)

1) En la pestaña **Start Run (Inicio del ciclo)** en **Experiment Setup (Configuración del experimento)**, haga clic en **Close Lid (Cerrar tapa)** para cerrar la tapa del instrumento.

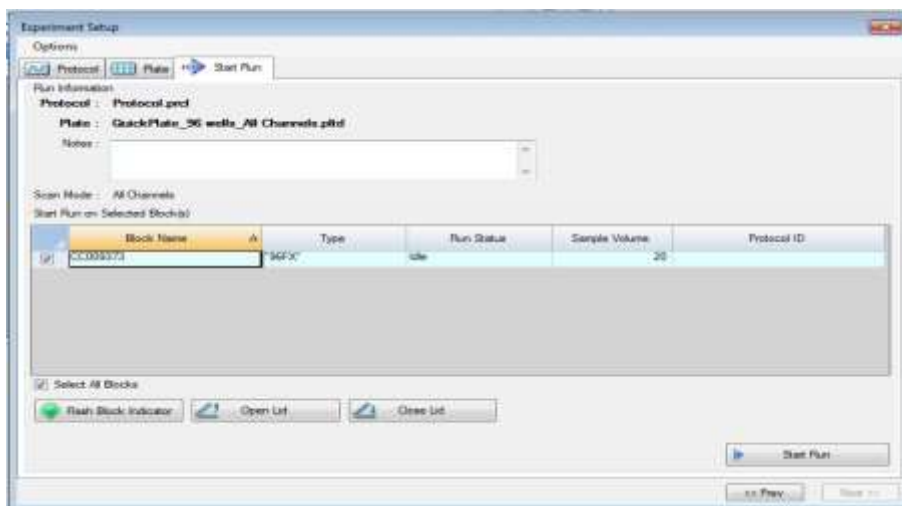


Fig. 11. **Close Lid (Cerrar tapa)**

2) Haga clic en **Start Run (Inicio del ciclo)**.

3) Almacene el archivo del ensayo en Mis documentos o en una carpeta que especifique. Introduzca el nombre del archivo, haga clic en **SAVE (GUARDAR)** y se iniciará el ciclo.

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

1.2. Análisis de datos

A. Crear carpetas para exportar datos

- 1) Para guardar los datos de todos los pasos de detección de la curva de amplificación del archivo de resultados, cree una carpeta.
- 2) El nombre de la carpeta puede ser la que desee el usuario (para la función ‘Seegene Export (Exportación de Seegene)’, se crearán automáticamente las carpetas “QuantStep8” y “QuantStep9” para guardar los datos de cada curva de amplificación dentro de la carpeta que creó el usuario).

B. Configuración previa para el análisis de datos en CFX Manager™

- 1) Después del test, haga clic en la pestaña Quantitation (Cuantificación) para confirmar los resultados de la curva de amplificación.

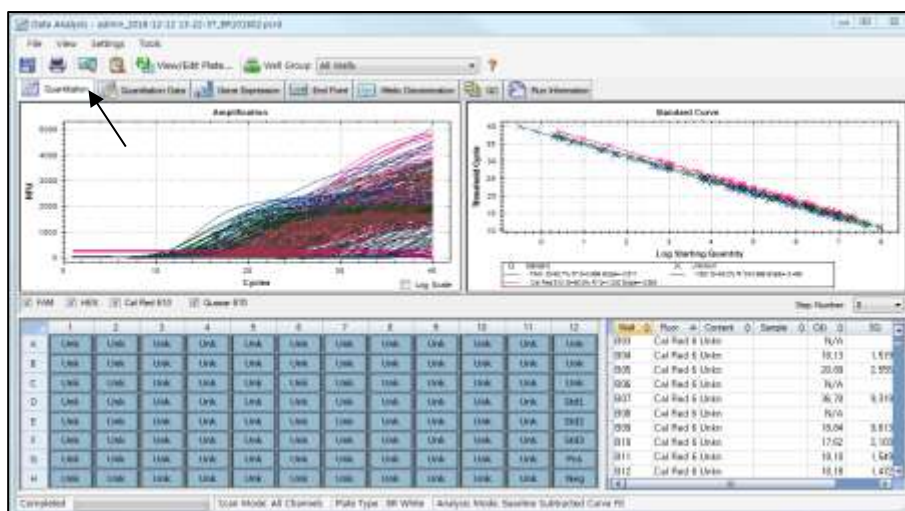


Fig. 12. Resultados de la curva de amplificación

- 2) Seleccione **No Baseline Subtraction (No sustraer línea base)** en el modo Analysis (Análisis) del menú Settings (Configuración).

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.



Fig. 14. Seegene Export (Exportación de Seegene)

4) Escoja una localización para guardar los datos y haga clic en **OK (Aceptar)**.


Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.



Fig. 15. Seegene Export (Exportación de Seegene) a la carpeta indicada

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

C. Configuración del análisis de datos en Seegene Viewer

1) Abra el programa Seegene Viewer y haga clic en **Option (Opción)** para seleccionar **CFX96** en el **Instrument (Instrumento)**.

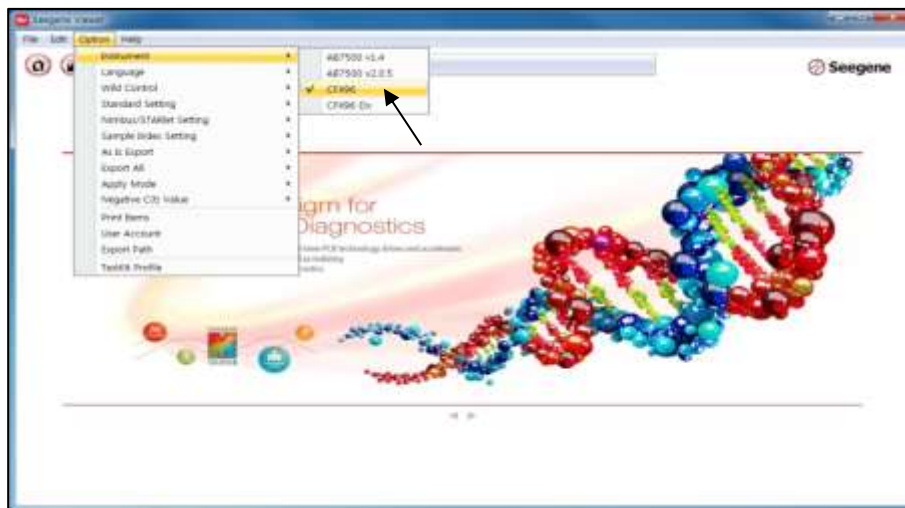


Fig. 16. Seegene Viewer

2) Haga clic en **Open (Abrir)** para encontrar el archivo guardado en la carpeta "QuantStep8", abra el archivo de resultados y seleccione el kit de prueba en el menú **PRODUCT (PRODUCTO)**.

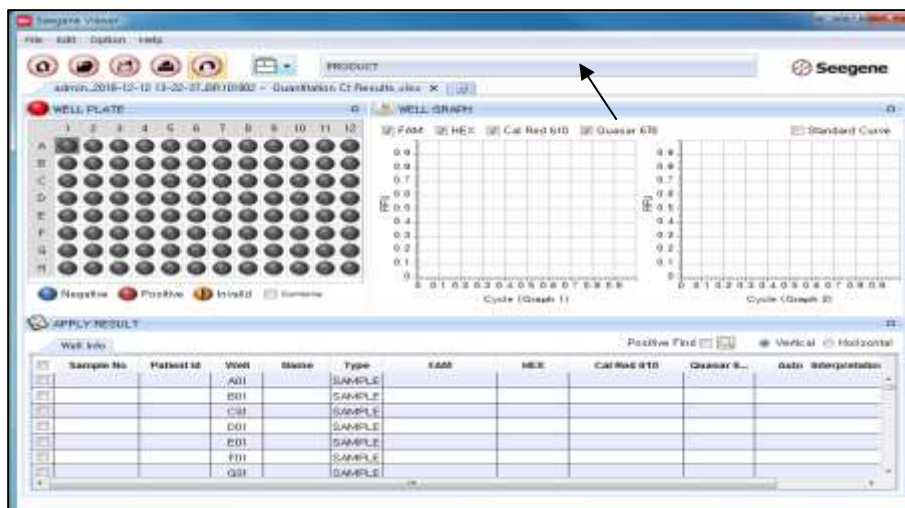


Fig. 17. Configuración del análisis de datos en Seegene Viewer

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

3) Compruebe el resultado de cada pocillo.



Fig. 18. Resultado de la prueba en Seegene Viewer

4) Criterios de validación de los resultados del control

a. Inicio del ensayo válido

Para confirmar la validez del experimento, la reacción de PCR incluye Control Positivo (PC) y Control Negativo (NC). Se determina que el ciclo de ensayo es válido cuando se cumplen los siguientes criterios:

Control	Resultado de Seegene Viewer								Interpretación automática
	FAM		HEX		Cal Red 610		Quasar670		
	CA	Lacto	CO	GV	TV	AV	Mob	IC	
	C _t	Q _t	C _t	Q _t	C _t	Q _t	C _t	C _t	
Control Positivo	≤ 40	> 0	≤ 40	> 0	≤ 40	> 0	≤ 40	≤ 40	Control Positivo (+)
Control Negativo	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Control Negativo (-)

b. Inicio de ensayo no válido

En los casos de falla en la validación, los resultados no se deben interpretar ni notificar. Y se debe repetir la reacción del PCR.

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

2. CFX96™ Dx System (CFX Manager™ Dx Software-IVD v3.1)

2.1. Configuración de los instrumentos de PCR en tiempo real

Nota: La configuración del experimento en el sistema de CFX96™ Dx System (Bio-Rad) puede dividirse en tres pasos: Protocol Setup (Configuración del protocolo), Plate Setup (Configuración de la placa) e Start run (Inicio del ciclo).

A. Protocol Setup (Configuración del protocolo)

1) En el menú principal, seleccione **File (Archivo) → New (Nuevo) → Protocol (Protocolo)** para abrir el **Protocol Editor (Editor de protocolo)**.



Fig. 1. Protocol Setup (Configuración del protocolo).

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

2) En **Protocol Editor (Editor de protocolo)**, defina el perfil térmico como sigue:

Paso	Núm. de ciclos	Temperatura	Duración
1	1	50°C	4 min
2		95°C	15 min
3	5	95°C	30 seg
4		60°C	1 min
5		72°C	30 seg
6	GOTO (VAYA AL) Paso 3, 4 veces más		
7	40	95°C	10 seg
8*		60°C	1 min
9*		72°C	10 seg
10	GOTO (VAYA AL) Paso 7, 39 veces más		

Nota*: Lectura de placa en el paso 8 y 9. La fluorescencia se detecta a 60°C y 72°C.

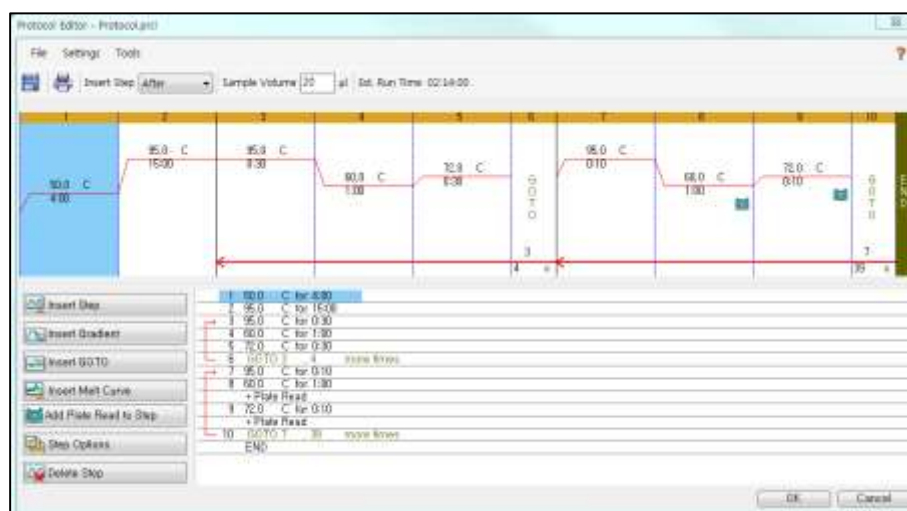


Fig. 2. **Protocol Editor (Editor de protocolo)**

3) Haga clic en el cuadro al lado de **Sample Volume (Volumen de la muestra)** para añadir directamente 20 µL.

4) Haga clic en **OK (Aceptar)** y guarde el protocolo para abrir la ventana **Run Setup (Configuración de Ejecutar)**.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

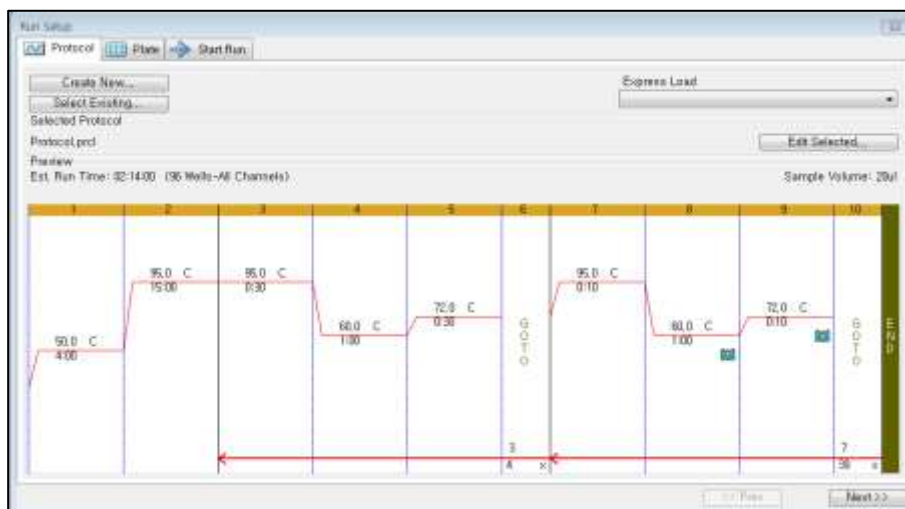


Fig. 3. Run Setup (Configuración de Ejecutar): Protocol (Protocolo)

B. Plate Setup (Configuración de la placa)

- 1) En la pestaña **Plate (Placa)** en **Run Setup (Configuración de Ejecutar)**, haga clic en **Create New (Crear nuevo)** para abrir la ventana **Plate Editor (Editor de placa)**.

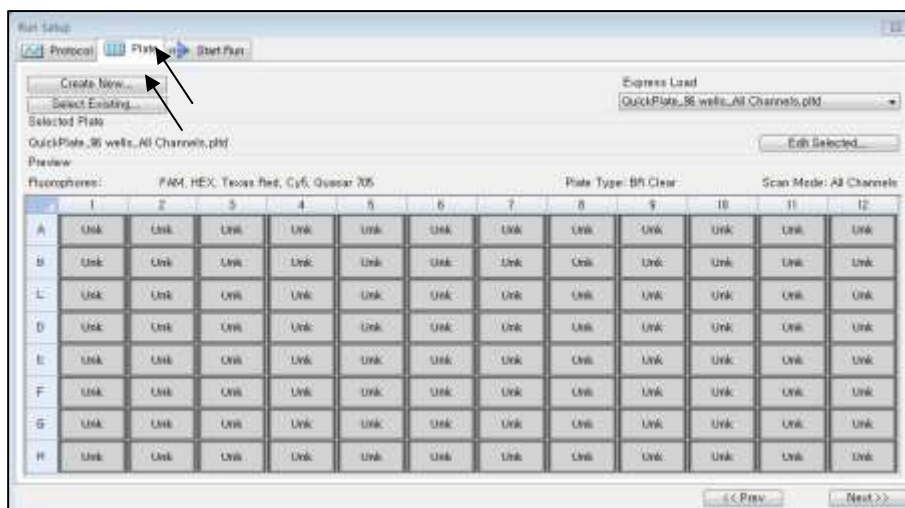


Fig. 4. Plate Editor (Editor de placa).

- 2) Haga clic en **Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos)** para indicar los fluoróforos (**FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670**) que se van a usar y haga clic en **OK (Aceptar)**.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

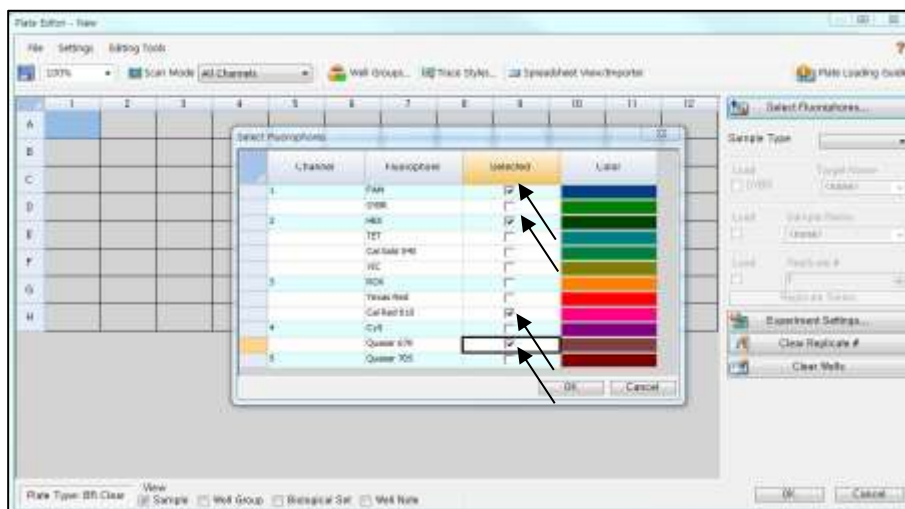


Fig. 5. **Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos) (FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670)**

3) Crear una curva estándar

- Seleccione los pocillos cargados con Sample Type/Standard (Tipo de muestra/Estándar), determine los fluoróforos específicos (FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670) y luego haga clic en la casilla de verificación Cargar (Fig. 6).
- Seleccione los pocillos en el diagrama de la placa y haga clic en Replicate Series (Replicar series). Se abrirá la venta de edición de Replicate Series (Replicar series) (Fig. 7).
- Seleccione los pocillos a los que se han sido asignados números duplicados consecutivos y haga clic en Dilution Series (Serie de dilución). Luego introduzca información en la venta de Dilution Series (Serie de dilución) como se indica en la Fig. 8.

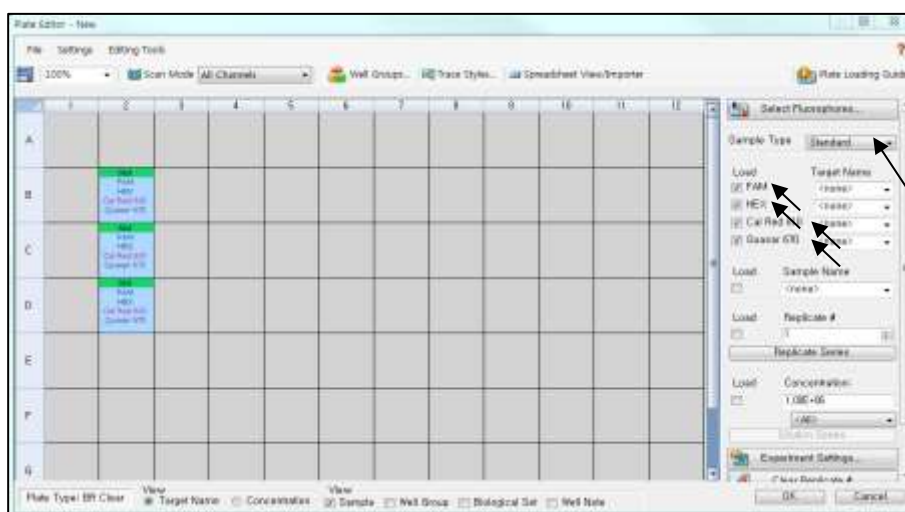


Fig. 6. **Creating a Standard Curve (Crear una curva estándar) (1)**

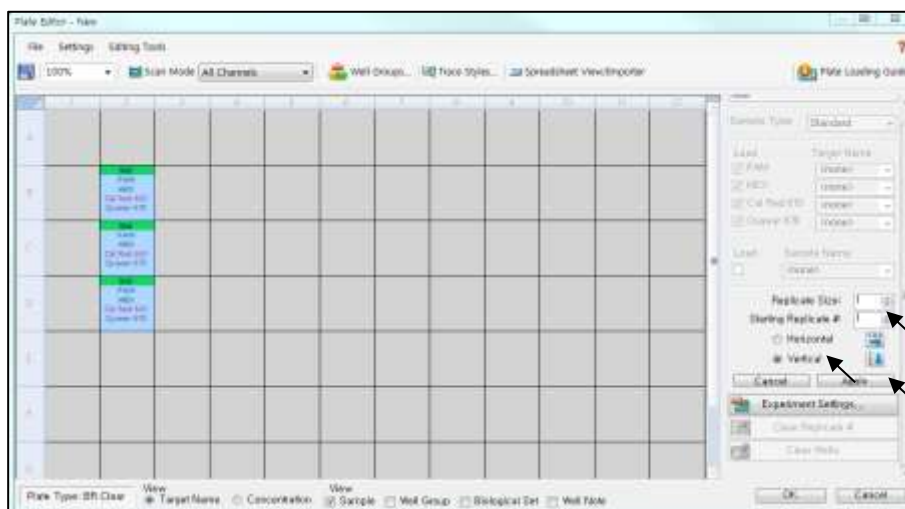
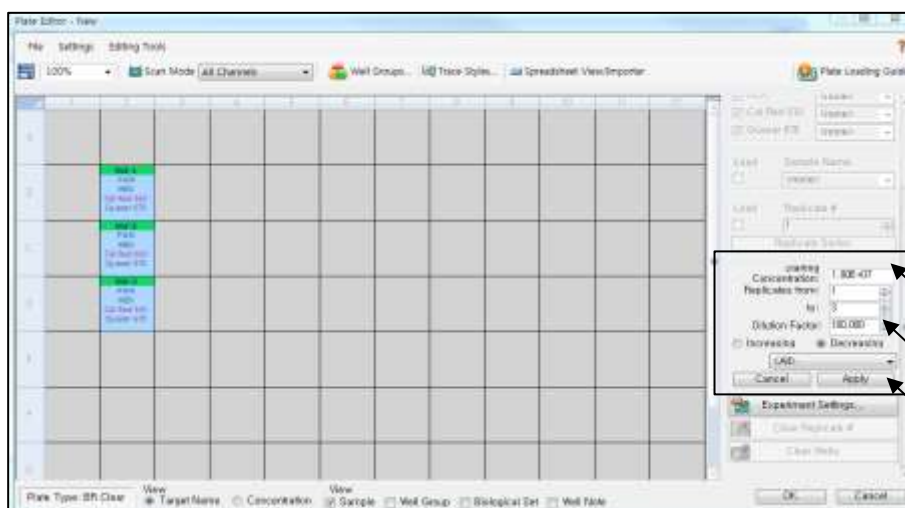


Fig. 7. Creating a Standard Curve (Crear una curva estándar) (2)



Starting Concentration: 1.00E+07
 Replicates from: 1
 to: 3
 Dilution Factor: 100,000
☐ Increasing ☒ Decreasing
 <All>
 Cancel Apply

Fig. 8. Creating a Standard Curve (Crear una curva estándar) (3)

4) Seleccione los pocillos deseados y luego el tipo de muestra en el menú desplegable **Sample Type (Tipo de muestra)**.

- **Unknown (Desconocidos):** Muestras clínicas
- **Negative Control (Control negativo)**
- **Positive Control (Control positivo)**
- **Standard DNA (DNA estándar)**

- 5) Haga clic en las casillas de verificación adecuadas (**FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670**) para especificar los fluoróforos que se van a detectar en los pocillos seleccionados.
- 6) Escriba el **Sample Name (Nombre de la muestra)** y presione la tecla Intro.
- 7) En **Settings (Configuración)** del menú principal de **Plate Editor (Editor de placa)**, escoja **Plate Size (96 wells) (Tamaño de la placa (96 pocillos))** y **Plate Type (BR White) (Tipo placa (Blanco BR))**.

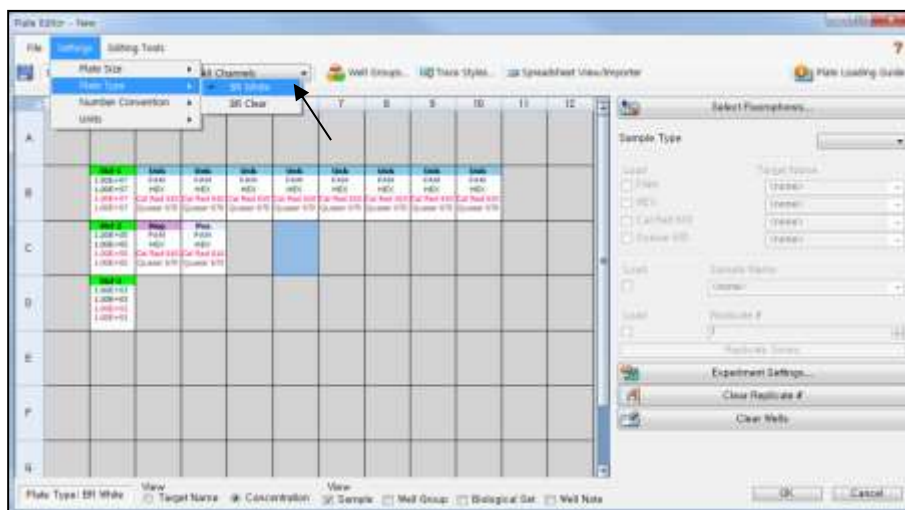


Fig. 9. Plate Setup (Configuración de la placa)

- 8) Haga clic en **OK (Aceptar)** para guardar la nueva placa.
- 9) Regresará a la ventana **Run Setup (Configuración de Ejecutar)**.

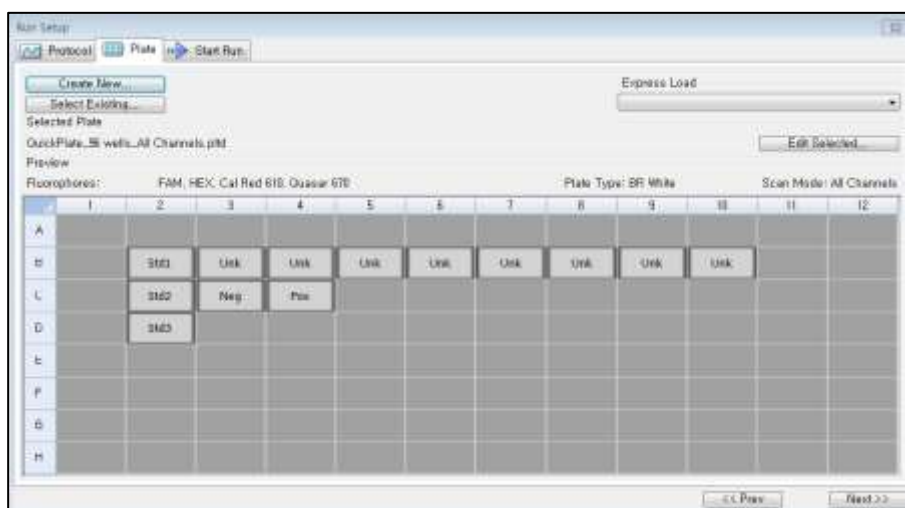


Fig. 10. Run Setup (Configuración de Ejecutar): Plate (Placa)

- 10) Haga clic en **Next (Siguiete)** para ejecutar Start Run (Inicio del ciclo).

C. Start Run (Inicio del ciclo)

1) En la pestaña **Start Run (Inicio del ciclo)** en **Run Setup (Configuración de Ejecutar)**, haga clic en **Close Lid (Cerrar tapa)** para cerrar la tapa del instrumento.

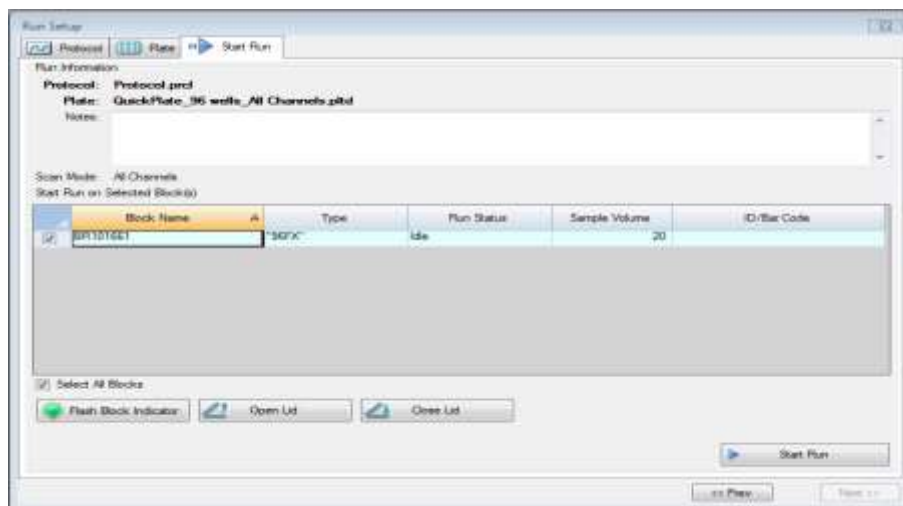


Fig. 11. Close Lid (Cerrar tapa)

2) Haga clic en **Start Run (Inicio del ciclo)**.

3) Almacene el archivo del ensayo en Mis documentos o en una carpeta que especifique. Introduzca el nombre del archivo, haga clic en **SAVE (GUARDAR)** y se iniciará el ciclo.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Org. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

1.2. Análisis de datos

A. Crear carpetas para exportar datos

- 1) Para guardar los datos de todos los pasos de detección de la curva de amplificación del archivo de resultados, cree una carpeta.
- 2) El nombre de la carpeta puede ser la que desee el usuario (para la función 'Seegene Export (Exportación de Seegene)', se crearán automáticamente las carpetas "QuantStep8" y "QuantStep9" para guardar los datos de cada curva de amplificación dentro de la carpeta que creó el usuario).

B. Configuración previa para el análisis de datos en CFX Manager™

- 1) Después del test, haga clic en la pestaña Quantitation (Cuantificación) para confirmar los resultados de la curva de amplificación.

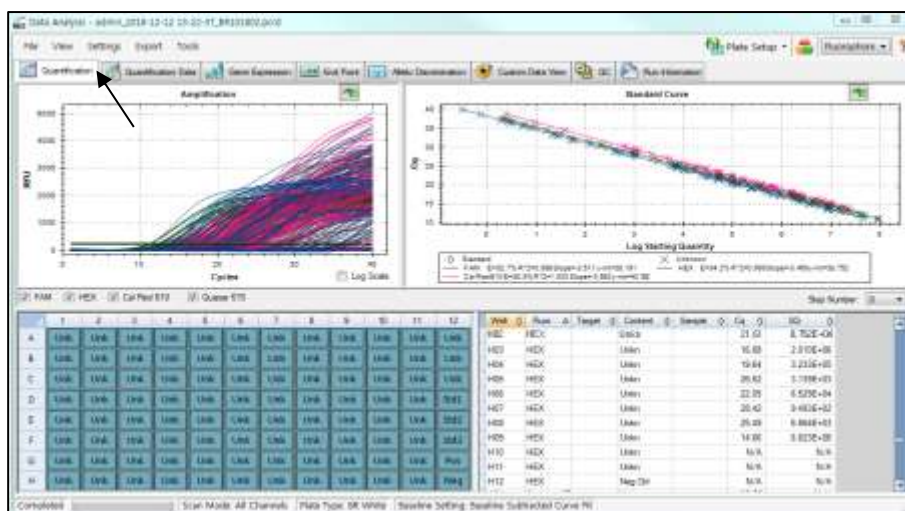


Fig. 12. Resultados de la curva de amplificación

- 2) Seleccione **No Baseline Subtraction (No sustraer línea base)** de Configuración de la línea de base del Menú de Configuración.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

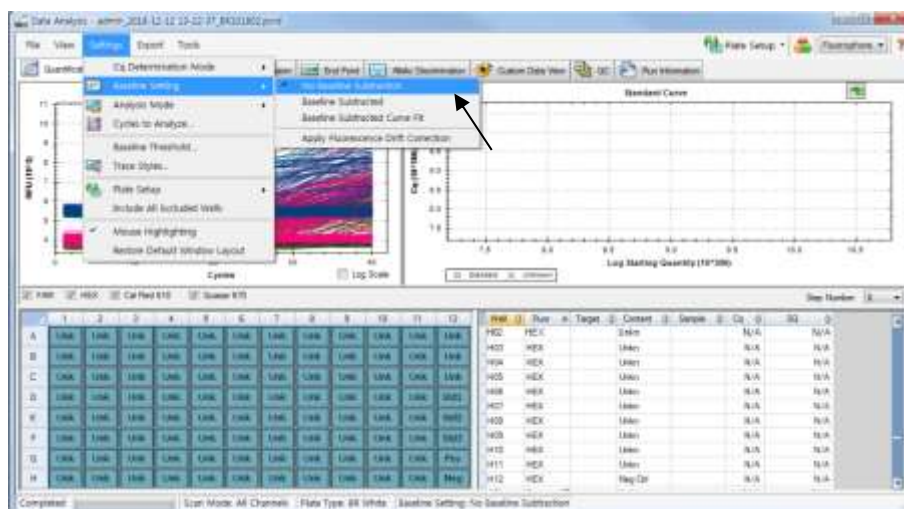


Fig. 13. No Baseline Subtraction (No sustraer línea base)

- 3) Seleccione **Seegene Export (Exportación de Seegene)** en el menú Export (Exportación).

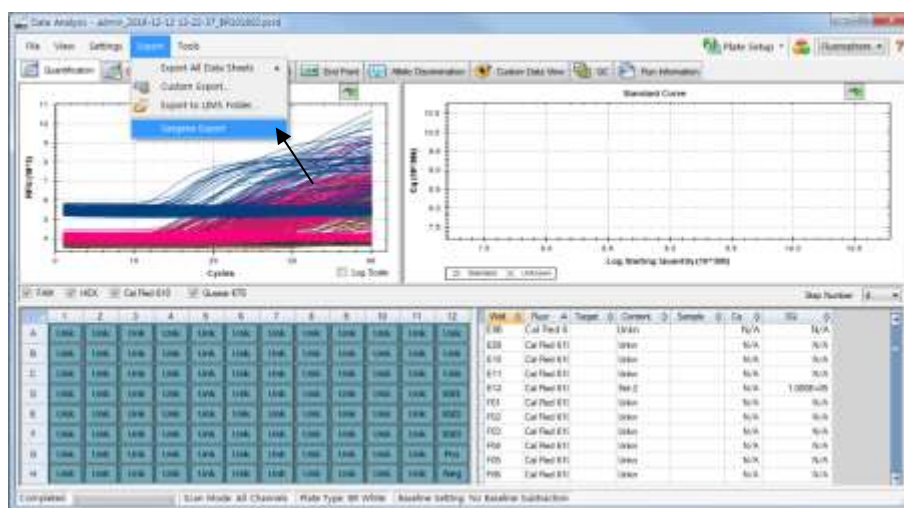


Fig. 14. Seegene Export (Exportación de Seegene)

- 4) Escoja una localización para guardar los datos y haga clic en **OK (Aceptar)**.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

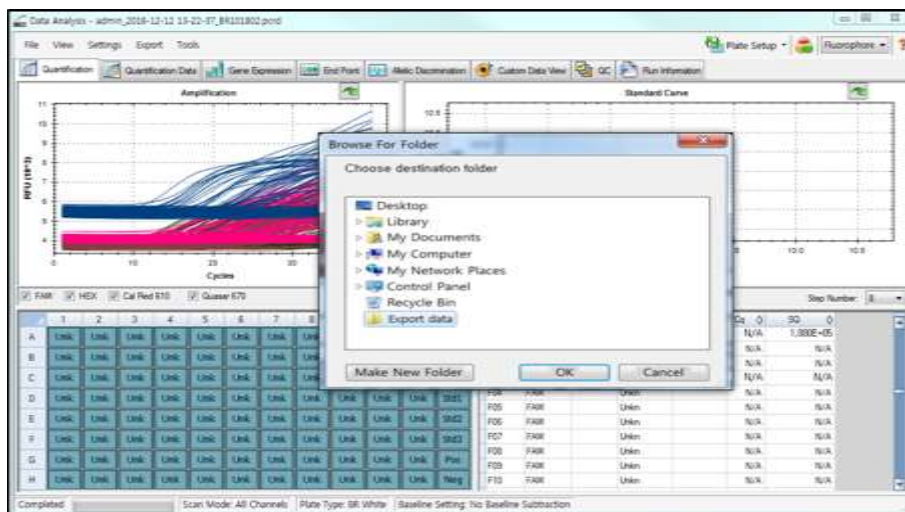


Fig. 15. Seegene Export (Exportación de Seegene) a la carpeta indicada

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

C. Configuración del análisis de datos en Seegene Viewer

1) Abra el programa Seegene Viewer y haga clic en **Option (Opción)** para seleccionar **CFX96 Dx** en el **Instrument (Instrumento)**.

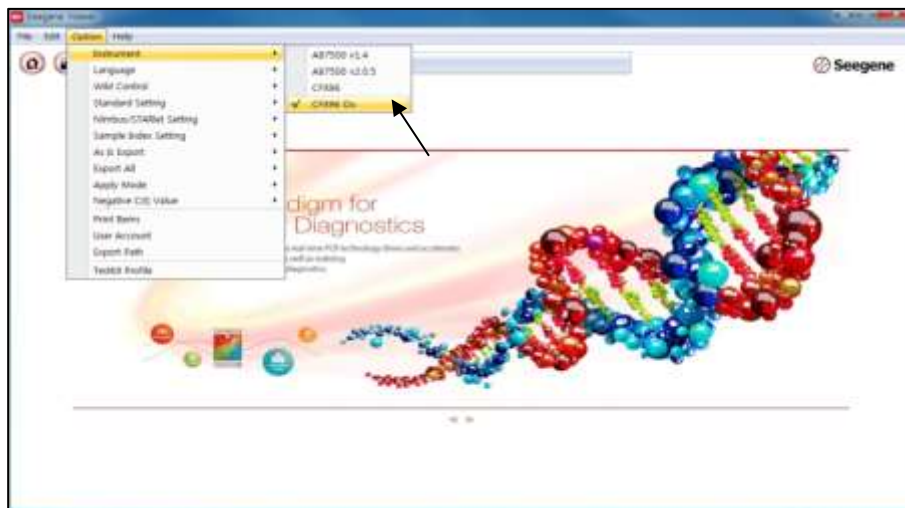


Fig. 16. Seegene Viewer

2) Haga clic en **Open (Abrir)** para encontrar el archivo guardado en la carpeta "QuantStep8", abra el archivo de resultados y seleccione el kit de prueba en el menú **PRODUCT (PRODUCTO)**.

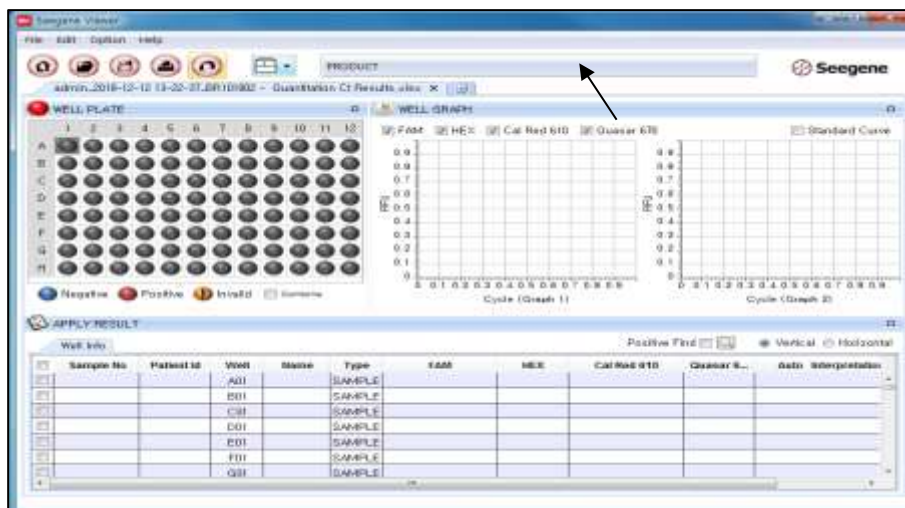


Fig. 17. Configuración del análisis de datos en Seegene Viewer

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

3) Compruebe el resultado de cada pocillo.



Fig. 18. Resultado de la prueba en Seegene Viewer

4) Criterios de validación de los resultados del control

a. Inicio del ensayo válido

Para confirmar la validez del experimento, la reacción de PCR incluye Control Positivo (PC) y Control Negativo (NC). Se determina que el ciclo de ensayo es válido cuando se cumplen los siguientes criterios:

Control	Resultado de Seegene Viewer								Interpretación automática
	FAM		HEX		Cal Red 610		Quasar670		
	CA	Lacto	CO	GV	TV	AV	Mob	IC	
	C _t	Q _t	C _t	Q _t	C _t	Q _t	C _t	C _t	
Control Positivo	≤ 40	> 0	≤ 40	> 0	≤ 40	> 0	≤ 40	≤ 40	Control Positivo (+)
Control Negativo	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Control Negativo (-)

b. Inicio de ensayo no válido

En los casos de falla en la validación, los resultados no se deben interpretar ni notificar. Y se debe repetir la reacción del PCR.

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

RESULTADOS

1. Información de los analitos

Fluoróforo	Analito	
	Gráfico 1	Gráfico 2
FAM	<i>Candida albicans</i> (CA)	<i>Lactobacillus</i> spp.* (Lacto)
HEX	<i>otros Candida</i> ** (CO)	<i>Gardnerella vaginalis</i> (GV)
Cal Red 610	<i>Trichomonas vaginalis</i> (TV)	<i>Atopobium vaginae</i> (AV)
Quasar 670	Control Interno (IC)	<i>Mobiluncus</i> spp.*** (Mob)

* *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus jensenii*

** *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida lusitanae*

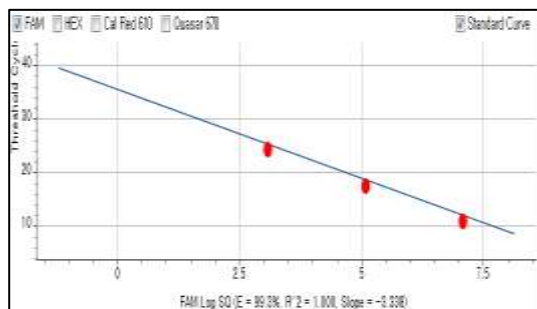
*** *Mobiluncus mulieris* y *Mobiluncus curtisii*

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

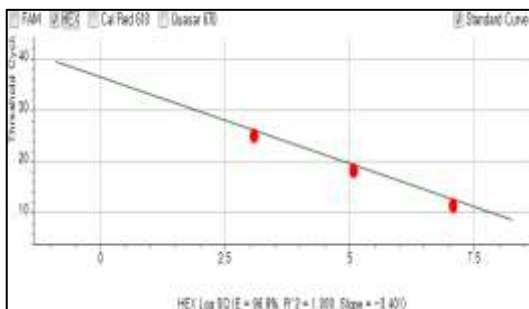
Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

2. Información de la curva estándar

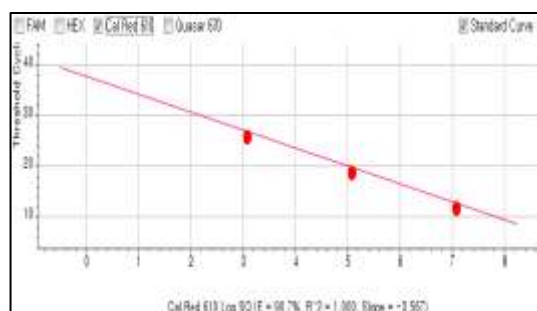
Lactobacillus spp.



Gardnerella vaginalis



Atopobium vaginae



Analito	R ²
<i>Lactobacillus</i> spp.	0,980 ~ 1,000
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0,980 ~ 1,000
<i>Atopobium vaginae</i>	0,980 ~ 1,000

3. Interpretação de Resultados

3.1. Interpretación Automática

Analito	Valor C _t ¹⁾	Valor Q _t ²⁾	Resultado
CA, CO, TV, Mob	≤ 40	-	Detetado (+)
	N/A	-	Não detetado (-)
Lacto, GV, AV	-	> 0	Detetado (+)
	-	N/A	Não detetado (-)
IC	≤ 40	-	Detetado (+)
	N/A	-	Não detetado (-)

1) C_t: umbral del ciclo

2) Q_t: umbral cuantitativo (Log10)

Resultado do alvo = 10^{Q_t} cópias/rxn

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17505

Dra. MARILINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Resultado diana		Resultado IC	Interpretación
Gráfico 1	Gráfico 2		
+	-	+	Ácido nucleico diana, Detectado
-	+		
+	+		
+	-	-	Ácido nucleico diana, Detectado* - Puede(n) estar presente(s) analito(s) adicionales que no se detectaron.
-	+		
+	+		
-	-	+	Ácido nucleico diana, no detectado
-	-	-	No válido** - Los resultados sugieren una recolección de muestras inadecuada, procesos o presencia de inhibidores. - Repita la prueba desde la extracción de ácido nucleico usando otra parte alícuota de la muestra original. - Si se muestra el mismo resultado en el ácido nucleico diluido, recoja las muestras nuevamente.

* El alto nivel de ácidos nucleicos diana puede causar interferencia en la detección y lectura del control interno. La señal IC no válida no indica que los resultados positivos para los objetivos son inválidos.

** Consulte la sección de resolución de problemas para obtener instrucciones detalladas.

3.2. Interpretación de la BV

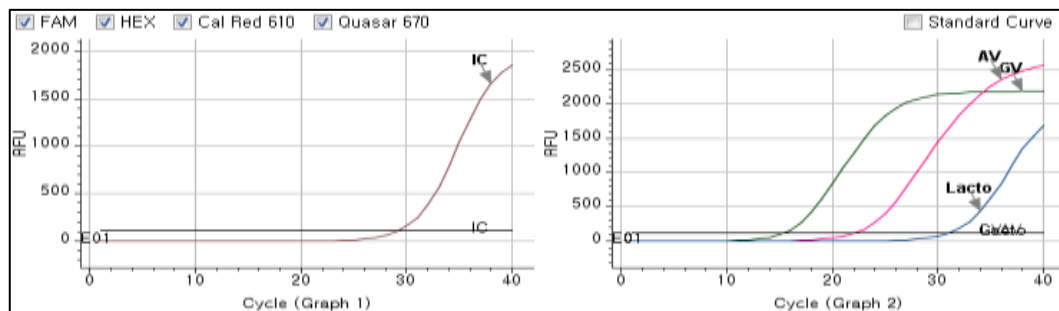
El software Seegene Viewer interpreta automáticamente los resultados de la prueba como Normal, Intermedio y Positivo del estado de BV, con base en el estado de amplificación de la(s) diana(s).

Determinación del corte para la interpretación de la Vaginosis bacteriana (BV)

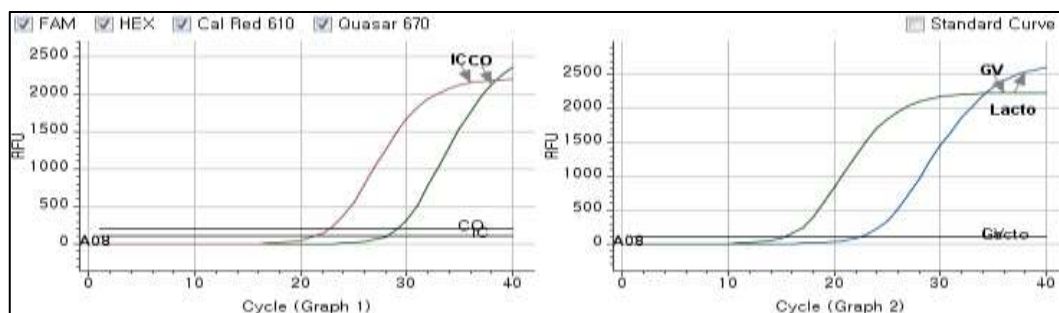
Con el fin de validar los valores de corte para el Allplex™ Vaginitis Screening Assay se utilizaron los resultados del estudio clínico retrospectivo. Para esta validación se analizaron estadísticamente las métricas de PCR de los analitos diana de vaginosis y los resultados generados por el algoritmo de llamada BV, en comparación con los resultados del método de referencia aplicable. Se realizó un análisis de la curva de ROC para confirmar los cortes óptimos para cada analito diana, así como para los cortes utilizados para determinar el estado de vaginosis bacteriana.

4. Aplicación a muestras clínicas

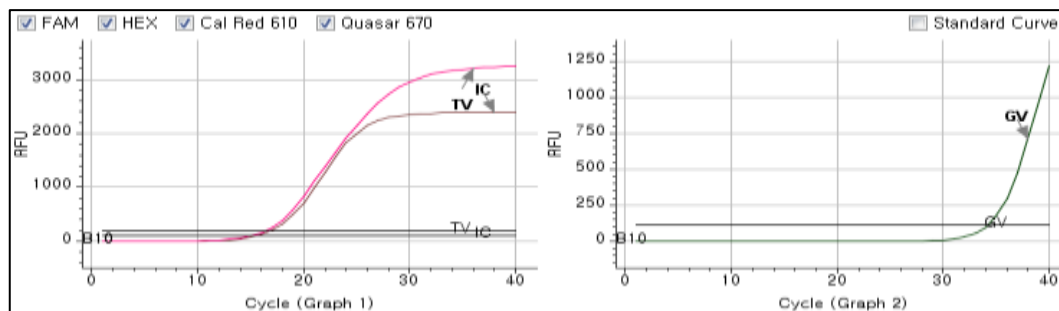
Muestra 1



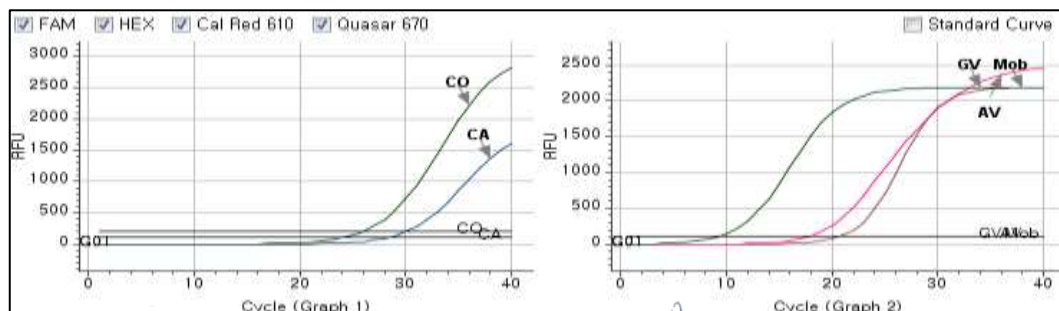
Muestra 2



Muestra 3



Muestra 4



Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Sample	Seegene Viewer Result																	
	FAM				HEX				Cal Red 610				Quasar 670				Auto Interpretation	BV Interpretation
	CA	C(t)	Lacto	Qt	CO	C(t)	GV	Qt	TV	C(t)	AV	Qt	Mob	C(t)	IC	C(t)		
1	-	N/A	+	1.43	-	N/A	+	6.27	-	N/A	+	4.48	-	N/A	+	29.31	"Lacto,GV,AV"	Bacterial Vaginosis
2	-	N/A	+	3.94	+	29.20	+	6.22	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	21.50	"Lacto,CO,GV"	Bacterial Vaginosis
3	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	0.73	+	16.50	-	N/A	-	N/A	+	16.57	"GV,TV"	Normal*
4	+	28.42	-	N/A	+	25.88	+	8.07	-	N/A	+	5.63	+	20.81	-	N/A	"CA,CO,GV,AV,Mob"	Bacterial Vaginosis

*: La falta de *Lactobacillus* puede deberse a que la paciente sea posmenopáusica.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Allplex™ Vaginitis Screening Assay		
OBSERVACIONES	POSIBLES CAUSAS	SOLUCIÓN
No se observa señal	Los fluoróforos del análisis de datos no cumplen con el protocolo	Seleccionar los fluoróforos correctos para el análisis de datos.
	Configuración incorrecta del termociclador en tiempo real	Compruebe las condiciones del ciclo térmico y repita el test con la configuración adecuada.
	Almacenamiento incorrecto o expiración de la fecha de caducidad del kit del test	Compruebe las condiciones de almacenamiento (véase página 9) y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta) del kit del test y use un nuevo kit si fuese necesario.
	Fallo en la extracción de ácido nucleico	Asegúrese de utilizar el método de extracción recomendado.
	Error en la recogida de muestras	Si no se observa señal de la diana ni de IC, significa que la muestra se recogió de manera inadecuada. Recoger la muestra.
No se observa señal de Control Interno	Error de muestreo o alta carga de ácido nucleico del patógeno	Si no se observan la señal de patógeno diana y la señal de IC, entonces vuelva a recolectar las muestras. Si se observa la señal del patógeno diana, pero no la del IC, entonces la amplificación del IC pudo haberse inhibido por una alta carga del patógeno diana. Para confirmar la señal del IC, diluya la muestra (1/10~1/100) en una solución salina y repita el test desde el paso de extracción.
	Presencia de inhibidor PCR	Diluya la muestra (1/10~1/100) en una solución salina y repita el test desde el paso de la extracción.
Picos en los ciclos de la curva de amplificación	Burbujas en el tubo de PCR	Centrifugue el tubo de PCR antes del inicio.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Allplex™ Vaginitis Screening Assay		
OBSERVACIONES	POSIBLES CAUSAS	SOLUCIÓN
Se observan supuestos falsos positivos o señales diana en el Control Negativo	Contaminación	Descontamine todas las superficies e instrumentos con hipoclorito de sodio y etanol. Use solo puntas de filtro durante el procedimiento y cámbielas entre cada tubo. Repita el procedimiento entero desde la extracción de ácido nucleico con el nuevo conjunto de reactivos.
No se observó señal en la muestra positiva o no se observó señal en control positivo	Error en la recogida de muestras	Verificar o método de colheita de amostras e colher novamente.
	Almacenamiento incorrecto de la muestra	Colher novamente a amostra e repetir o procedimento todo. Certificar-se de que a amostra esteja armazenada conforme recomendado.
	Error en la extracción de ácido nucleico	Verificar o processo de extração de ácido nucleico e sua concentração e o extrair novamente.
	Error al añadir ácido nucleico a los tubos de PCR correspondientes	Verificar os números de amostra de tubos que contenham ácido nucleico e certificar-se de adicionar ácido nucleico para os tubos de PCR corretos e repetir o teste cuidadosamente, se necessário.
	Presencia de inhibidor	Diluir o ácido nucleico modelo (1/10~1/100) em solução salina e repetir o teste a partir da fase de extração.
Señales de supuesto falso DNA estándar	Mezcla de PCR incorrecta	Confirmar se todos os componentes são adicionados à mistura de PCR (a sensibilidade é comprometida com a pré-mistura pré-composta). Todos os reagentes devem ser homogeneizados e centrifugados antes de serem utilizados.
	Almacenamiento inadecuado del DNA estándar	Compruebe las condiciones de almacenamiento (véase página 9) y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta) del kit del test y use un nuevo kit si fuese necesario.
	$R^2 < 0,980$	Asegúrese de que SD1, SD2 y SD3 se han definido correctamente y, en caso necesario, corrijalos. Si eso no ayuda, repita la PCR para todas las muestras, SD1, SD2 y SD3.

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

RENDIMIENTO
1. Especificidade

Se probó la reactividad cruzada de Allplex™ Vaginitis Screening Assay utilizando 167 materiales y organismos estándar, como se indica a continuación. Las dianas específicas que se diseñaron para la detección se identificaron mediante Allplex™ Vaginitis Screening Assay.

Núm	Organismo	Fuente	Aislado núm.	Resultado†
1	<i>Atopobium vaginae</i>	KCTC	15240	AV Detectado
2	<i>Candida albicans</i>	Geomebiotics	18G-7	CA Detectado
3	<i>Candida dubliniensis</i>	KCTC	17427	CO Detectado
4	<i>Candida glabrata</i>	KCCM	50044	CO Detectado
5	<i>Candida krusei</i>	KCCM	50633	CO Detectado
6	<i>Candida lusitanae</i>	KCCM	50541	CO Detectado
7	<i>Candida parapsilosis</i>	KCTC	7653	CO Detectado
8	<i>Candida tropicalis</i>	KCCM	32008	CO Detectado
9	<i>Gardnerella vaginalis</i>	KCTC	5096	GV Detectado
10	<i>Lactobacillus crispatus</i>	KCTC	5054	Lacto Detectado
11	<i>Lactobacillus gasseri</i>	KCTC	3163	Lacto Detectado
12	<i>Lactobacillus jensenii</i>	KCTC	5194	Lacto Detectado
13	<i>Mobiluncus curtisii</i>	ATCC	35241	Mob Detectado
14	<i>Mobiluncus mulieris</i>	ATCC	35240D-5	Mob Detectado
15	<i>Trichomonas vaginalis</i>	ATCC	30001	TV Detectado
16	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KCCM	35401	No detectado
17	<i>Acinetobacter calcoeticus</i>	KCTC	2357	No detectado
18	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	KCTC	12407	No detectado
19	<i>Acinetobacter schindleri</i>	KCTC	12409	No detectado
20	<i>Acinetobacter ursingii</i>	KCTC	12410	No detectado
21	<i>Actinomyces israelii</i>	KCTC	9054	No detectado
22	<i>Aerococcus viridans</i>	ATCC	11563	No detectado
23	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	KCTC	2358	No detectado
24	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	KCCM	12137	No detectado
25	<i>Alcaligenes faecalis</i>	KCTC	2678	No detectado
26	<i>Atopobium minutum</i>	KCTC	5038	No detectado

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.M. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Núm	Organismo	Fuente	Aislado núm.	Resultado†
27	<i>Atopobium parvulum</i>	KCTC	3663	No detectado
28	<i>Bacillus subtilis</i>	KCTC	1021	No detectado
29	<i>Bacteroides caccae</i>	ATCC	43185	No detectado
30	<i>Bacteroides fragilis</i>	KCTC	5013	No detectado
31	<i>Bacteroides ovatus</i>	KCTC	5827	No detectado
32	<i>Bacteroides vulgatus</i>	ATCC	8480	No detectado
33	<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	KCTC	15192	No detectado
34	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	KCCM	11206	No detectado
35	<i>Bifidobacterium longum</i>	KCCM	11953	No detectado
36	<i>Bifidobacterium minimum</i>	KCTC	3273	No detectado
37	<i>Blautia producta</i> (prevot) Liu et al.	ATCC	27340	No detectado
38	<i>Brevibacterium linens</i>	KCTC	9099	No detectado
39	<i>Candida orthopsilosis</i>	ATCC	96139	No detectado
40	<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV I)	ATCC	VR-901BD	No detectado
41	<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV II)	ATCC	VR-902BD	No detectado
42	<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV III)	ATCC	VR-903D	No detectado
43	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar A)	ATCC	VR-571B	No detectado
44	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar B)	ATCC	VR-573	No detectado
45	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar Ba)	ATCC	VR-347	No detectado
46	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar C)	ATCC	VR-1500	No detectado
47	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar D)	ATCC	VR-885	No detectado
48	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar E)	ATCC	VR-348B	No detectado
49	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar F)	ATCC	VR-346	No detectado
50	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar G)	ATCC	VR-878	No detectado
51	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar H)	ATCC	VR-879D	No detectado
52	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar I)	ATCC	VR-880	No detectado
53	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar J)	ATCC	VR-886	No detectado
54	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar K)	ATCC	VR-887	No detectado
55	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	ATCC	VR-1360	No detectado
56	<i>Chromobacterium violaceum</i>	KCTC	2897	No detectado
57	<i>Citrobacter freundii</i>	KCTC	2509	No detectado
58	<i>Clostridium difficile</i> (Toxin A+ / B+)	ATCC	9689D-5	No detectado
59	<i>Clostridium perfringens</i>	KCTC	3269	No detectado

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Núm	Organismo	Fuente	Aislado núm.	Resultado†
60	<i>Corynebacterium genitalium</i>	ATCC	33031	No detectado
61	<i>Corynebacterium xerosis</i>	KCTC	3435	No detectado
62	<i>Cryptococcus neoformans</i>	KCCM	50564	No detectado
63	<i>Cytomegalovirus</i>	ATCC	VR-807	No detectado
64	<i>Deinococcus radiopugnans</i>	ATCC	19172	No detectado
65	<i>Derxia gummosa</i>	KCTC	12784	No detectado
66	<i>Enterobacter aerogenes</i>	KCTC	2190	No detectado
67	<i>Enterobacter cloacae</i>	KCCM	12178	No detectado
68	<i>Enterococcus avium</i>	ATCC	14025	No detectado
69	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC	11700	No detectado
70	<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC	5155951559	No detectado
71	<i>Epstein Barr Virus</i>	ATCC	VR-1492	No detectado
72	<i>Escherichia coli</i>	KCCM	11591	No detectado
73	<i>Gemella haemolysans</i>	ATCC	10379	No detectado
74	<i>Haemophilus ducreyi</i>	KCTC	2745	No detectado
75	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC	51907D	No detectado
76	<i>Hepatitis A virus</i>	ATCC	VR-1541	No detectado
77	<i>Hepatitis B virus</i>	ATCC	VR-3232SD	No detectado
78	<i>Human Herpesvirus 1</i>	KBPV	VR-52	No detectado
79	<i>Human Herpesvirus 2</i>	KBPV	VR-53	No detectado
80	<i>Varicella-zoster virus</i>	ATCC	VR-1367	No detectado
81	<i>Human papillomavirus strain 18</i>	KCLB	10002	No detectado
82	<i>Kingella denitrificans</i>	ATCC	33394	No detectado
83	<i>Kingella kingae</i>	ATCC	23330	No detectado
84	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Rhinoscleromatis</i>	ATCC	6908	No detectado
85	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	KCCM	32820	No detectado
86	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	KCCM	40431	No detectado
87	<i>Lactobacillus brevis</i>	KCTC	3498	No detectado
88	<i>Lactobacillus casei</i>	KCCM	12452	No detectado
89	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Lactis</i>	KCTC	3035	No detectado
90	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Delbrueckii</i>	KCTC	13730	No detectado

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Núm	Organismo	Fuente	Aislado núm.	Resultado†
91	<i>Lactobacillus fermentum</i>	KCCM	40401	No detectado
92	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	KCCM	40987	No detectado
93	<i>Lactobacillus helveticus</i>	KCTC	15060	No detectado
94	<i>Lactobacillus hominis</i> DSM 23910	KCTC	21045	No detectado
95	<i>Lactobacillus iners</i>	CCARM	123	No detectado
96	<i>Lactobacillus intestinalis</i>	KCCM	40990	No detectado
97	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	KCCM	32825	No detectado
98	<i>Lactobacillus kalixensis</i>	KCTC	5856	No detectado
99	<i>Lactobacillus oris</i>	KCCM	40993	No detectado
100	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	KCTC	3503	No detectado
101	<i>Lactobacillus pentosus</i>	KCCM	40997	No detectado
102	<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC	700934	No detectado
103	<i>Lactobacillus reuteri</i>	KCCM	40717	No detectado
104	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	KCCM	32405	No detectado
105	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>Salicinius</i>	KCCM	40998	No detectado
106	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	ATCC	27651	No detectado
107	<i>Lactobacillus ultunensis</i>	KCTC	5857	No detectado
108	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	KCTC	41001	No detectado
109	<i>Legionella pneumophila</i>	KCCM	41781	No detectado
110	<i>Micrococcus luteus</i>	KCTC	3063	No detectado
111	<i>Moraxella catarrhalis</i>	KCCM	42707	No detectado
112	<i>Moraxella osloensis</i>	ATCC	19976	No detectado
113	<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>morganii</i>	KCCM	11497	No detectado
114	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	KCTC	9108	No detectado
115	<i>Mycoplasma arginini</i>	ATCC	23838D	No detectado
116	<i>Mycoplasma felis</i> Cole et al.	ATCC	23391	No detectado
117	<i>Mycoplasma genitalium</i>	ATCC	33530	No detectado
118	<i>Mycoplasma hominis</i>	ATCC	27545-TTR	No detectado
119	<i>Mycoplasma iowae</i> Jordan et al.	ATCC	33552	No detectado
120	<i>Mycoplasma leonicaptivi</i> Hill	ATCC	49890	No detectado
121	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC	15531	No detectado

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Núm	Organismo	Fuente	Aislado núm.	Resultado†
122	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	ATCC	19612	No detectado
123	<i>Mycoplasma spumans</i>	ATCC	19526	No detectado
124	<i>Neisseria cinerea</i>	ATCC	14685	No detectado
125	<i>Neisseria elongata</i>	KCTC	23361	No detectado
126	<i>Neisseria flavescens</i>	ATCC	13120	No detectado
127	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC	700825	No detectado
128	<i>Neisseria lactamica</i>	ATCC	23970	No detectado
129	<i>Neisseria meningitidis</i>	KCCM	41562	No detectado
130	<i>Neisseria mucosa</i>	ATCC	19696	No detectado
131	<i>Neisseria perflava</i>	ATCC	10555	No detectado
132	<i>Neisseria polysaccharea</i>	ATCC	43768	No detectado
133	<i>Neisseria sicca</i>	ATCC	29256	No detectado
134	<i>Neisseria subflava</i>	ATCC	19243	No detectado
135	<i>Paracoccus denitrificans</i>	KCTC	2530	No detectado
136	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC	49031D-5	No detectado
137	<i>Prevotella bivia</i>	KCTC	5454	No detectado
138	<i>Prevotella buccalis</i>	KCTC	5496	No detectado
139	<i>Prevotella disiens</i>	KCTC	5499	No detectado
140	<i>Prevotella intermedia</i>	KCTC	5692	No detectado
141	<i>Prevotella melaninogenica</i>	KCTC	5457	No detectado
142	<i>Propionibacterium acnes</i>	KCTC	3314	No detectado
143	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC	12453	No detectado
144	<i>Providencia stuartii</i>	KCTC	2568	No detectado
145	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KCCM	11328	No detectado
146	<i>Pseudomonas putida</i>	KCTC	1643	No detectado
147	<i>Rahnella aquatilis</i>	KCTC	2863	No detectado
148	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	KCTC	1372	No detectado
149	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KCCM	50511	No detectado
150	<i>Salmonella enteritidis</i>	KCCM	12021	No detectado
151	<i>Salmonella typhimurium</i>	KCCM	40253	No detectado
152	<i>Staphylococcus aureus</i>	KCTC	1621	No detectado
153	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC	12228	No detectado
154	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KCCM	40417	No detectado

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARIANA VILA PEREZ
ABOGERADA
BioSystems S.A.

Núm	Organismo	Fuente	Aislado núm.	Resultado†
155	<i>Streptococcus bovis</i>	KCCM	40409	No detectado
156	<i>Streptococcus mitis</i>	KCTC	5650	No detectado
157	<i>Streptococcus mutans</i>	KCTC	3065	No detectado
158	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC	BAA-255D	No detectado
159	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC	19615	No detectado
160	<i>Streptococcus salivarius</i>	KCCM	11926	No detectado
161	<i>Streptococcus sanguinis</i>	KCTC	3299	No detectado
162	<i>Treponema pallidum</i>	ATCC	BAA-2642SD	No detectado
163	<i>Trichomonas tenax</i>	ATCC	30207	No detectado
164	<i>Ureaplasma parvum</i>	ATCC	27818	No detectado
165	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	ATCC	27816	No detectado
166	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCTC	2471	No detectado
167	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC	23715	No detectado

† Las pruebas de especificidad se repitieron 3 veces.

- ※ ATCC: American Type Culture Collection
- ZMC : ZeptoMetrix Corporation
- KCTC : Korean Collection for Type Culture
- KCCM : Korean Culture Center of Microorganisms
- KCLB: Korean Cell Line Bank

2. Sensibilidad

La sensibilidad se define como la concentración más baja de organismo que se puede detectar consistentemente ($\geq 95\%$ de los resultados positivos entre todas las muestras analizadas). Se confirmó cuando se obtuvieron los resultados correctos de organismo/ensayo de al menos 30 de las 30 muestras ($30/30 = 100\%$) evaluadas.

La sensibilidad de Allplex™ Vaginitis Screening Assay se determinó utilizando muestras adulteradas de DNA plasmídico diana. El límite de detección para el Allplex™ Vaginitis Screening Assay fue de 100 copias/reacción.

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

3. Reproducibilidad

Se preparó el panel de reproducibilidad de 21 analitos simulados que incluía muestras muy negativas (0,1X LoD), poco positivas (1X LoD) y ligeramente positivas (3X LoD). En cada centro de pruebas se analizó el panel durante cinco días, dos operadores diferentes llevaron a cabo dos ciclos cada día y triplicaron el ciclo de cada panel a partir de una extracción. Se analizó con un único lote de Allplex™ Vaginitis Screening Assay en tres centros diferentes y con tres lotes en un centro interno. Se observaron tasas positivas de cada analito para el estudio de reproducibilidad: 100,00% de muestras ligeramente positivas, $\geq 100,00\%$ de muestras poco positivas y $\geq 79,33\%$ de muestras muy negativas.

La reproducibilidad del Allplex™ Vaginitis Screening Assay se evaluó entre corridas, sitios y lotes de productos. Los resultados cumplieron con los criterios establecidos anteriormente, confirmando así los rendimientos reproducibles del Allplex™ Vaginitis Screening Assay.

4. Sustancias interferentes

Esta prueba se llevó a cabo usando sustancias interferentes compuestas por 4 sustancias para confirmar el rendimiento de Allplex™ Vaginitis Screening Assay en la presencia de potenciales sustancias interferentes. El resultado no se vio afectado al añadir las sustancias: ni detección no específica ni inhibición en la amplificación objetiva. Teniendo en cuenta los resultados, las 4 sustancias interferentes no afectaron los resultados de Allplex™ Vaginitis Screening Assay.

Núm.	Sustancias interferentes	Concentración
1	Human whole blood	2,5 % (v/v)
2	Albumin (BSA)	60g/L
3	Bilirubin	342 $\mu\text{mol/L}$
4	Mucus	-

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

REFERENCIAS








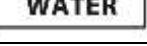
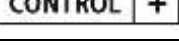
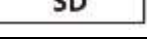



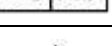



1. Bai G, Gajer P, Nandy M, Ma B, Yang H, Melissa N, Bing M, Hongqiu Y and Joyce So [Comparison of Storage Conditions for Human Vaginal Microbiome Studies]. PLoS ONE. (2012) 7(5): e36934
2. J.Y. Chun, K.J. Kim, I. T. Hwang, Y. J. Kim, D. H. Lee, I. K. Lee, and J. K. Kim [Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene.] Nucleic Acids Res. (2007) 35(6): e40
3. D. H. Lee. [TOCE: Innovative Technology for High Multiplex Real-time PCR.] Seegene Bulletin. (2012) 1: 5-10
4. David N. Fredricks, Tina L. Fiedler, and Jeanne M. Marrazzo, M.P.H. [Molecular Identification of Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis.] N Engl J Med. (2005) 353(18): 1899-911
5. Jane Mashburn, CNM, MN and FACNM [Etiology, Diagnosis, and Management of Vaginitis] Journal of Midwifery & Women's Health. (2006) 51: 423-430
6. Jason D. Mintz and Mark G. Martens [Prevalence of Non-Albicans Candida Infections in Women with Recurrent Vulvovaginal Symptomatology] Advances in Infectious Diseases. (2013) 3: 238-242
7. J. Y. Chun. [High Multiplex Molecular Diagnostics.] Seegene Bulletin. (2012) 1: 1-4.
8. K.M.G.R. Branco, R.M.D. Nardi, J.L.S. Moreira, A.C. Nunes, L.M. Farias, J.R. Nicoli and M.A.R. Carvalho. [Identification and in vitro production of Lactobacillus antagonists from women with or without bacterial vaginosis] Braz J Med Biol Res. (2010) 43(4): 338-344.
9. Lori Newman, Jane Rowley, Stephen Vander Hoorn, Nalinka Saman Wijesooriya, Magnus Unemo, Nicola L. Low, Gretchen Stevens, Sami Gottlieb, James Kiarie and Marleen Temmerman [Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting] PLoS ONE. (2015) 10(12): e0143304
10. Sujatha Srinivasan, Congzhou Liu, Caroline M. Mitchell, Tina L. Fiedler, Katherine K. Thomas, Kathy J. Agnew, Jeanne M. Marrazzo and David N. Fredricks [Temporal Variability of Human Vaginal Bacteria and Relationship with Bacterial Vaginosis.] PLoS ONE. (2010) 5(4): e10197.
11. Y. J. Lee, D. Kim, K. Lee, and J. Y. Chun. [Single-channel multiplexing without melting curve analysis in real-time PCR] Scientific Reports. (2014) 4:7439.
12. Yarbrough ML and Burnham CA [The ABCs of STIs: An Update on Sexually Transmitted Infection] Clin Chem. (2016) 62(6): 811-23
13. Anderson MR, Klink K and Cohrsen A [Evaluation of vaginal complaints] JAMA. (2004) 291(11): 1368-79
14. Hainer BL and Gibson MV [Vaginitis] Am Fam Physician. (2011) 83(7): 807-15

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

SÍMBOLOS

Clave sobre los símbolos que se han usado en el manual y las etiquetas.

Símbolo	Explicación
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Código do lote
	Número de catálogo
	Utilizar por fecha
	Limite superior de temperatura
	Mistura de oligonucleótidos para amplificação e detecção
	Mastermix de PCR ou Mix de Detecção
	RNase-free Water
	Controlo Positivo (PC)
	DNA Padrão
	Consultar instruções de uso
	Fabricante
	Data de fabricação
	Representante autorizado na Comunidade Europeia
	Cuidado
	Contém o suficiente para <n> testes
	Identificador único del dispositivo

INFORMACIÓN DE PEDIDO

Núm. Cat.	Producto	Tamaño
-----------	----------	--------

Allplex™ series

SD9750Y	Allplex™ Vaginitis Screening Assay	50 rxns
SD9750X	Allplex™ Vaginitis Screening Assay	100 rxns*

* Para usar solo con Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS y Seegene STARlet.

Productos accesorios

SG1701	Ribo_spin vRD (Viral RNA/DNA Extraction Kit)	50 preps
--------	--	----------

Sistemas de Extração Automatizada

65415-02	Microlab NIMBUS IVD	EA
173000-075	Microlab STARlet IVD	EA
65415-03	Seegene NIMBUS	EA
67930-03	Seegene STARlet	EA
744300.4.UC384	STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	384T / 1box

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

ROTULOS "Allplex™ Vaginitis Screening Assay"

Rotulo Externo "Allplex™ Vaginitis Screening Assay (SD9750Y)"



Allplex™  

Vaginitis Screening Assay

REF SD9750Y  50

LOT SDC418A01

    -20°C

2018-12-31 2018-01-01

 **MT Promedt Consulting GmbH**
Altenhofstrasse 80, D-66386
St. Ingbert, Germany

(01) 08809240101575 (11) 180101
(17) 181231 (10) SDC418A01 (21) 0077



Allplex™

Vaginitis Screening Assay

Information of components included in kit

1 vial of VS MOM
1 vial of EM1
1 vial of VS PC
1 vial of VS SD1
1 vial of VS SD2
1 vial of VS SD3
1 vial of RNase-free Water




Seegene Inc.
Taewon Bldg., 91, Ogeum-ro, Songpa-gu,
Seoul, Republic of Korea, 05548

www.seegene.com

Seegene Inc.
Taewon Bldg., 91, Ogeum-ro, Songpa-gu, Seoul,
Republic of Korea, 05548
TEL : +82-2-2240-4000 / FAX : +82-2-2240-4040
E-mail : info@seegene.com
www.seegene.com



Allplex™

 **Seegene**

Next Generation of Real-time PCR

Importado por
BioSystems S.A.
Av. Dorrego 673 (C1414CKB)
TEL: (54-11) 4854-7775
Director Técnico: Eduardo Omar Miguez, MN 17503
Producto para Diagnostico de uso In Vitro
Uso Profesional Exclusivo
Autorizado por ANMAT N°: PM-626-167

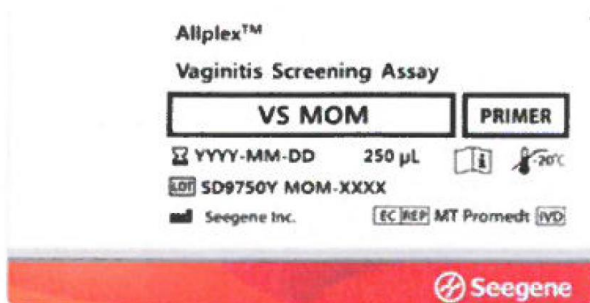
Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

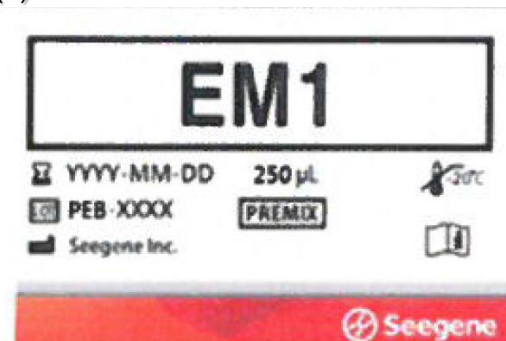
Rótulos Internos

(1) VS MOM

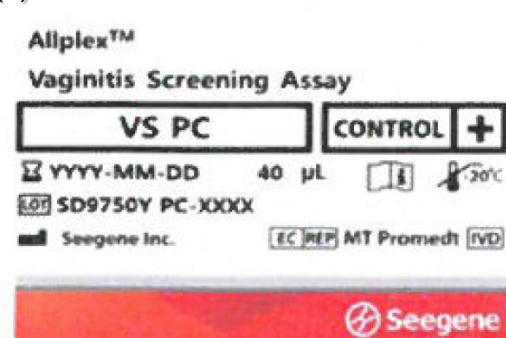
20m



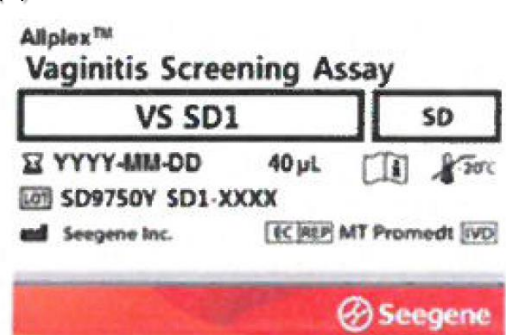
(2) EM1



(3) VS PC



(4) VS SD1



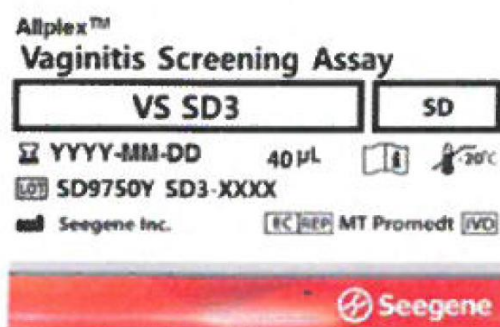
Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

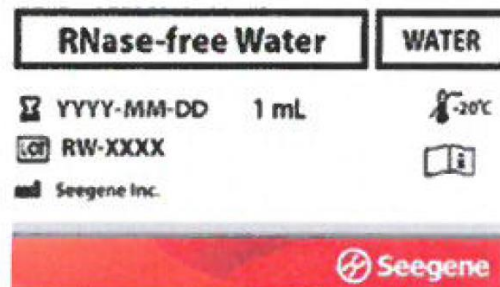
(5) VS SD2



(6) VS SD3



(7) RNase-free Water






Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Rotulo Externo "Allplex™ Vaginitis Screening Assay (SD9750X)"

(01) 08809240101186 (11) 180101
(17) 181231 (10) SDC018A01 (21) 0077





Allplex™  


Vaginitis Screening Assay


REF SD9750X


LOT SDC018A01

 100


 2018-12-31

 2018-01-01



 -20°C

EC REP MT Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80, D-66386
St. Ingbert, Germany



Allplex™
Vaginitis Screening Assay
(only for NIMBUS, STARlet)

Information of components included in kit

- 1 vial of VS MOM
- 1 vial of EM1
- 1 vial of VS PC
- 1 vial of VS SD1
- 1 vial of VS SD2
- 1 vial of VS SD3
- 1 vial of RNase-free Water



Seegene Inc.
Taewon Bldg., 91, Ogeum-ro, Songpa-gu,
Seoul, Republic of Korea, 05548

www.seegene.com

Seegene Inc.

Taewon Bldg., 91, Ogeum-ro, Songpa-gu, Seoul,
Republic of Korea, 05548
TEL : +82-2-2240-4000 / FAX : +82-2-2240-4040
E-mail : info@seegene.com
www.seegene.com



Allplex™



Seegene

Next Generation of Real-time PCR

Importado por

BioSystems S.A.

Av. Dorrego 673 (C1414CKB)

TEL: (54-11) 4854-7775

Director Técnico: Eduardo Omar Miguez, MN 17503

Producto para Diagnostico de uso In Vitro

Uso Profesional Exclusivo

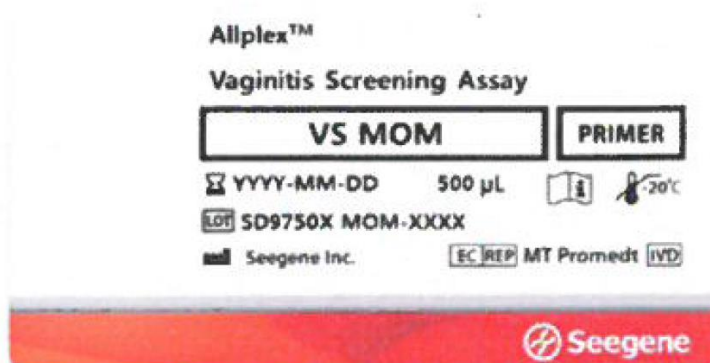
Autorizado por ANMAT N°: PM-626-167

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

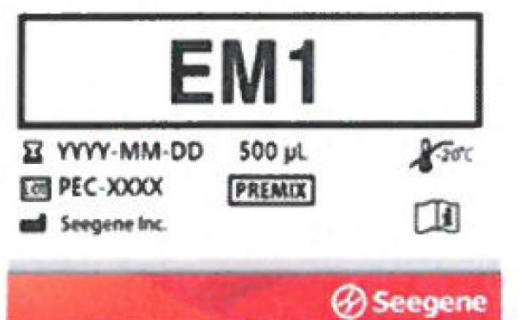
Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Rótulos Internos

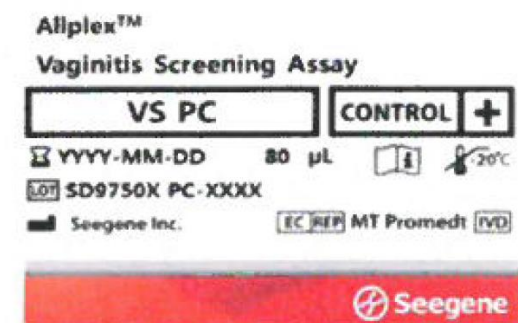
(1) VS MOM



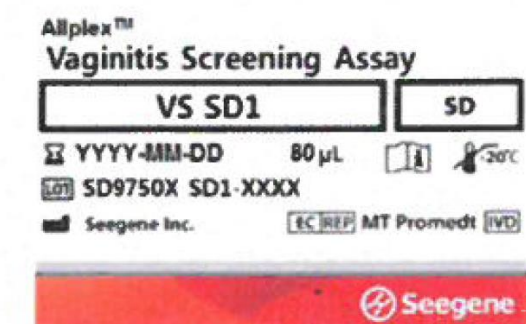
(2) EM1



(3) VS PC



(4) VS SD1



(5) VS SD2

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Allplex™
Vaginitis Screening Assay

VS SD2	SD
---------------	-----------

YYYY-MM-DD 80 µL 20°C
 SD9750X SD2-XXXX
 Seegene Inc. MT Promedt

Seegene

(6) VS SD3

Allplex™
Vaginitis Screening Assay

VS SD3	SD
---------------	-----------

YYYY-MM-DD 80 µL 20°C
 SD9750X SD3-XXXX
 Seegene Inc. MT Promedt

Seegene

(7) RNase-free Water

RNase-free Water	WATER
-------------------------	--------------

YYYY-MM-DD 1 mL 20°C
 RWA-XXXX
 Seegene Inc.

Seegene

Firm. Eduardo Omar Miguez
 BioSystems S.A.
 Director Técnico
 M.N. 17503

Dra. MARINA VILA PEREZ
 APODERADA
 BioSystems S.A.



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: BIOSYSTEMS S.A. rótulos e instrucciones de uso

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 116 pagina/s.