

MODELO DE ROTULO e INSTRUCCIONES DE USO

MultiTarget® ITS Ferti I KIT

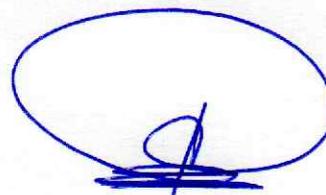
PM 2900-4

DETx MOL S.A.

Registro de Producto para diagnóstico uso "in vitro"

Disposición ANMAT 2198/2022 y 2674/99.


Diego Chouhy
Responsable legal


Germán R. Perez
Director Técnico

RÓTULOS EXTERNOS:

1 - NOMBRE DEL PRODUCTO: **MultiTarget® ITS Ferti I KIT**

2 - ESTABLECIMIENTO ELABORADOR., DOMICILIO LEGAL Y NOMBRE DEL DIRECTOR TÉCNICO:

DETx MOL S.A.

Juan Manuel de Rosas 950 - Rosario (CP 2000) - Argentina.

Teléfono: +54 (0341) 7352035

Director Técnico: Bioq. Germán R. Perez, PhD.

3 - AUTORIZADO POR ANMAT N° PM 2900-4.

4 - NÚMERO DE LOTE O PARTIDA:

LOT

5 - FECHA DE VENCIMIENTO



6 - CONSTITUCIÓN DEL EQUIPO (NÚMERO DE DETERMINACIONES POSIBLES)



25 det.



50 det.



100 det.

7 - CONFORMACIÓN DEL EQUIPO (INDICACIÓN DE LAS UNIDADES MÉTRICAS)

IT1-KIT-001.25

1 x → 56 µl	IT1-OLIGOMIX	(COD: IT1-OM-001.25)
1 x → 56 µl	OLIGO-CTR	(COD: IT1-CT-001.25)
1 x → 56 µl	OLIGO-NGO	(COD: IT1-NG-001.25)
1 x → 56 µl	OLIGO-MGE	(COD: IT1-MG-001.25)
1 x 110 µl	MASTERMIX FP 5X	(COD: FPM-MM-001.25)
1 x 200 µl	IT1-CTRL POS	(COD: IT1-CP-001)
1 x 1500 µl	AGUA DNAsa/RNAsa free	(COD: AT1-LAB-001)

IT1-KIT-001.50

1 x → 110 µl	IT1-OLIGOMIX	(COD: IT1-OM-001.50)
1 x → 110 µl	OLIGO-CTR	(COD: IT1-CT-001.50)
1 x → 110 µl	OLIGO-NGO	(COD: IT1-NG-001.50)
1 x → 110 µl	OLIGO-MGE	(COD: IT1-MG-001.50)
1 x 220 µl	MASTERMIX FP 5X	(COD: FPM-MM-001.50)
1 x 200 µl	IT1-CTRL POS	(COD: IT1-CP-001)
1 x 1500 µl	AGUA DNAsa/RNAsa free	(COD: AT1-LAB-001)

Bioq. GERMAN PEREZ

Director Técnico

DETx MOL S.A.

Dr. DIEGO CHOUHY

Apoderado
DETx MOL S.A.

IT1-KIT-001.100

1 x → 220 µl	IT1-OLIGOMIX	(COD: IT1-OM-001.100)
1 x → 220 µl	OLIGO-CTR	(COD: IT1-CT-001.100)
1 x → 220 µl	OLIGO-NGO	(COD: IT1-NG-001.100)
1 x → 220 µl	OLIGO-MGE	(COD: IT1-MG-001.100)
1 x 440 µl	MASTERMIX FP 5X	(COD: FPM-MM-001.100)
1 x 200 µl	IT1-CTRL POS	(COD: IT1-CP-001)
1 x 1500 µl	AGUA DNAsa/RNAsa free	(COD: AT1-LAB-001)

8 - LEYENDA "USO DIAGNÓSTICO IN-VITRO"

IVD

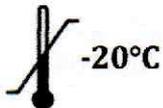
9 - DESCRIPCIÓN DE LA FINALIDAD DE USO

Método de diagnóstico in vitro para la detección cualitativa y simultánea de los patógenos *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Mycoplasma genitalium* en pacientes con sospecha de infección genitourinaria y síntomas asociados a partir de muestras de exudado endocervical, exudado uretral, orina y semen.

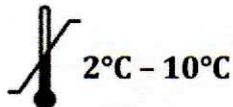
10 - DESCRIPCIÓN DE LAS PRECAUCIONES



11 - CONDICIONES DE CONSERVACIÓN



12 - CONDICIONES DE TRANSPORTE




Bioq. GERMAN PÉREZ
Director Técnico
DETx MOL S.A.


Dr. DIEGO CHOUHY
Apoderado
DETx MOL S.A.

RÓTULOS INTERNOS

1 - IT1-OLIGOMIX

IT1-OLIGOMIX

LOT IT1-OM-aa.##

Agregar xxx µl de AGUA DNAsa/RNAsa free

 mm.aa

IVD

 -20°C
ALMACENAMIENTO

 2°C - 10°C
TRANSPORTE

2 - OLIGO-CTR

OLIGO- CTR

LOT IT1-CT-aa.##

Agregar xxx µl de AGUA DNAsa/RNAsa free

 mm.aa

IVD

 -20°C
ALMACENAMIENTO

 2°C - 10°C
TRANSPORTE



Bloq. GERMAN PEREZ

Piso 3, Cabecera Nave 4, Ca Director Técnico Laborativo Cooperativo Núcleo
Ruta provincial 16 km 5, Alvear (2130), Santa Fe, Argentina

TE: +54 (0341) 7352035 info@detxmol.com.ar www.detxmol.com.ar



Dr. DIEGO CHOUHY
Apoderado
DETx MOL S.A.

detx mol

3 - OLIGO-NGO

OLIGO- NGO

LOT IT1-NG-aa.##

Agregar xxx µl de AGUA DNAsa/RNAsa free

 mm.aa

IVD

 -20°C
ALMACENIAMIENTO

 2°C - 10°C
TRANSPORTE

4 - OLIGO-MGE

OLIGO- MGE

LOT IT1-MG-aa.##

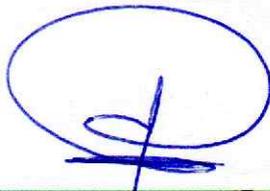
Agregar xxx µl de AGUA DNAsa/RNAsa free

 mm.aa

IVD

 -20°C
ALMACENIAMIENTO

 2°C - 10°C
TRANSPORTE




Dr. DIEGO CHOUHY
Apoderado
DETx MOL S.A.

5 - MASTERMIX FP 5X

MASTERMIX FP 5X

LOT FPM-MM-aa.##

Listo para usar

 mm.aa

IVD

 -20°C
ALMACENAMIENTO

 2°C - 10°C
TRANSPORTE

6 - IT1-CTRL POS

IT1-CTRL POS

LOT IT1-CP-aa.##

Listo para usar

 mm.aa

IVD

 -20°C
ALMACENAMIENTO

 2°C - 10°C
TRANSPORTE


Bioq. GERMAN PEREZ
Director Técnico
DETx MOL S.A.


Dr. DIEGO CHOUHY
Apoderado
DETx MOL S.A.

7 - AGUA DNAsa/RNAsa free

AGUA DNAsa/RNAsa free

LOT AT1-LAB-aa.##

Listo para usar



mm.aa

IVD



-20°C

ALMACENAMIENTO



2°C - 10°C

TRANSPORTE

Bloq. GERMAN PEREZ

Director Técnico

Piso 3, Cabecera Nave 4, Calle 14, Cooperativa Cooperativo Núcleo
Ruta provincial 16 km 5, Alvear (2130), Santa Fe, Argentina

TE: +54 (0341) 7352035 info@detxmol.com.ar www.detxmol.com.ar

Dr. DIEGO CHOUHY

Apoderado
DETx MOL S.A.

detx mol

INSTRUCCIONES DE USO

MultiTarget[®] ITS Ferti I KIT



detx mol

***MultiTarget*[®] ITS Ferti I KIT**

Para utilizar en los equipos:

QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
cobas® z 480 analyzer (Roche Molecular Systems, Inc.)
Mic® qPCR Thermal Cycler- 4 (Biomolecular Systems)

Fabricado por DETx MOL S.A.

Piso 3 / Nave 4
Campus Corporativo Cooperativo Núcleo
Ruta Provincial N° 16 km 5
Alvear (2130). Santa Fe. Argentina

Dir. Tec.: Germán R. Perez
Bioquímico. PhD.
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
PM-2900-4

Versión: 01

Última revisión: 13/09/2024



DISPOSITIVOS
MÉDICOS
IRAM - ISO 13485:2016
GESTIÓN
DE LA CALIDAD
IRAM - ISO 9001:2015

Dr. DIEGO CHICHUY
Apoderado
DETx MOL S.A.

Bioq. GERMAN PEREZ
Director Técnico
DETx MOL S.A.

detx mol

DETx MOL garantiza todos sus productos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de fabricación, siendo extensible hasta su fecha de vencimiento, siempre que se mantengan las condiciones de conservación especificadas en este manual. Todos nuestros productos comercializados se producen bajos procesos de un sistema de gestión integral de la calidad certificados por las normas ISO 9001:2015 e ISO 13485:2019. De esta forma, se confirma la reproducibilidad y fiabilidad de cada lote fabricado. **Nuestros productos están diseñados para su uso en diagnóstico *in vitro*.**

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, se puede contactar a soporte@detxmol.com.ar.

CÓDIGO	IT1-KIT-001.25	IT1-KIT-001.50	IT1-KIT-001.100
N° REACCIONES	25	50	100

COMPONENTES			
IT1-OLIGOMIX	1 x → 56 µl	1 x → 110 µl	1 x → 220 µl
OLIGO-CTR	1 x → 56 µl	1 x → 110 µl	1 x → 220 µl
OLIGO-NGO	1 x → 56 µl	1 x → 110 µl	1 x → 220 µl
OLIGO-MGE	1 x → 56 µl	1 x → 110 µl	1 x → 220 µl
MASTERMIX FP 5X	1 x 110 µl	1 x 220 µl	1 x 420 µl
IT1-CTRL POS	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
AGUA DNase/RNase free	1 x 1500 µl	1 x 1500 µl	1 x 1500 µl

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS	
Secuencias dianas	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Chlamydia trachomatis</i> (gen cromosómico <i>OmpA</i> y gen <i>ORF1</i> del plásmido crítico) • <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (gen <i>porA</i>) • <i>Mycoplasma genitalium</i> (gen <i>mpgA</i>)
Tipos de muestras	Hisopado endocervical. Hisopado uretral. Orina.
Especificidad analítica	100%
Límite de detección (IC95%)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Chlamydia trachomatis</i>: 4,9 cop/rxn (3,1 - 9,6 cop/rxn) • <i>Neisseria gonorrhoeae</i>: 7,5 cop/rxn (5,6 - 11,1 cop/rxn) • <i>Mycoplasma genitalium</i>: 26,4 cop/rxn (20,6 - 38,3 cop/rxn)
Interferente	ninguno de los testeados
CV _{promedio}	1,99%
Validación clínica (328 exudados endocervicales en 2 paneles)	Concordancia: Kappa (IC95%) <ul style="list-style-type: none"> • <i>Formato Screening</i> > 0,94. • <i>Con OLIGO-NGO</i> > 0,97. • <i>Con OLIGO-CTR</i> > 0,94. • <i>Con OLIGO-MGE</i> = 1,00.

INDICE

Información clínica	1
Uso previsto	1
Fundamento del método	2
Contenido del kit	2
Materiales necesarios no provistos por el kit	3
Equipos necesarios no provistos por el kit	3
Condiciones de conservación	4
Advertencias y precauciones sobre su uso	4
Muestra: consideraciones generales	5
Procedimiento	6
1. Obtención de ADN viral	6
2. Reconstitución de los reactivos liofilizados	6
3. Preparación de la mezcla de reacción	7
4. Programación del termociclador	8
5. Análisis de los resultados	8
6. Criterios de validación del ensayo	9
Interpretación de resultados	10
Limitaciones del ensayo	11
Control de calidad	11
Desempeño del producto	11
1. Especificidad <i>in silico</i>	11
2. Especificidad analítica	13
3. Validación clínica	13
4. Límite de Detección	16
5. Precisión/Variabilidad	17
6. Interferencias y contaminantes	18
Referencias bibliográficas	18
Solución de problemas	19
Marcas comerciales y aviso legal	20
Código QR	20

INFORMACIÓN CLÍNICA

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) son uno de los problemas más frecuentes y universales en salud. Presentan elevada morbilidad, pueden cursar asintómicamente y desarrollar secuelas a medio o largo plazo. Además, como no generan inmunidad, una persona puede contraer la misma infección más de una vez.

Las ITS son un conjunto de enfermedades infecciosas que se transmiten de una persona a otra durante el contacto sexual, causadas por más de 30 patógenos. Las más comunes incluyen a la clamidiasis (*Chlamydia trachomatis*), sífilis (*Treponema pallidum*), gonorrea (*Neisseria gonorrhoeae*) y tricomoniasis (*Trichomonas vaginalis*). La identificación temprana permite el tratamiento adecuado inmediato y el estudio de contactos a fin de interrumpir la cadena de transmisión y prevenir nuevas infecciones. Los ensayos moleculares han demostrado tener un rendimiento general superior al de otros métodos de diagnóstico de cultivo o inmunológicos. Por ejemplo, se detectan un 20% a 50% más de clamidiasis que utilizando los métodos no moleculares¹.

El **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** permite la detección de los siguientes patógenos:

- **Chlamydia trachomatis:** bacteria intracelular, principal agente responsable de las ITS a nivel mundial, siendo la mayoría de las infecciones genitales asintomáticas (subdiagnóstico elevado). Cuando hay síntomas, la infección del tracto urogenital inferior puede manifestarse como cervicitis en las mujeres y uretritis en hombres y mujeres. La infección no tratada puede ascender al tracto genital superior causando epididimitis en hombres y enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) en mujeres. Además, se ha observado correlación entre la infección por clamidia no tratada con embarazos ectópicos e infertilidad. Por ello, su detección temprana es crítica para controlar su diseminación, así evitar sus posibles secuelas.
- **Neisseria gonorrhoeae:** patógeno humano obligado y agente etiológico de la gonorrea. Los síntomas incluyen cervicitis en mujeres y uretritis, faringitis y proctitis en ambos sexos. Si no se trata, las mujeres pueden experimentar secuelas graves de EIP, dolor pélvico crónico, embarazo ectópico e infertilidad tubárica, mientras que los hombres pueden desarrollar epididimitis, prostatitis y estenosis uretral.
- **Mycoplasma genitalium:** bacteria anaeróbica facultativa de crecimiento lento y causante de uretritis no gonocócica en los hombres, mientras que en mujeres se ha asociado con cervicitis, endometritis, EIP e infertilidad.

USO PREVISTO

Método de diagnóstico in vitro para la detección cualitativa y simultánea de los patógenos Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae y Mycoplasma genitalium en pacientes con sospecha de infección genitourinaria y síntomas asociados a partir de muestras de exudado endocervical, exudado uretral, orina y semen.

¹ Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*--2014. MMWR Recomm Rep. 2014 Mar 14;63(RR-02):1-19.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** se basa en la tecnología de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) para la detección específica en forma simultánea o individual de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Mycoplasma genitalium*. A partir del ADN purificado de muestras endocervicales, se realiza la amplificación mediante qPCR utilizando cebadores específicos y sondas de hidrólisis (tipo TaqMan®). Estas sondas son oligonucleótidos conjugados con un fluoróforo en el extremo 5' y una molécula extintora (*quencher*) en el extremo 3' la cual por transferencia de energía de resonancia fluorescente inhibe la emisión del fluoróforo cuando se encuentra cercana. La mezcla de reacción contiene dUTP y la enzima UNG para evitar la contaminación residual (*carryover*). La reacción se lleva a cabo mediante la acción de una enzima *Hot-Start Fast* ADN polimerasa con actividad exonucleasa y tolerante a los inhibidores más comunes, que provoca la degradación de la sonda separándose el fluoróforo del *quencher*. El aumento de la señal de fluorescencia resultante por acumulación del ADN templado es detectado por el instrumento de qPCR en los canales:

- FAM para detección de patógeno.
- VIC/JOE/HEX para detección del control endógeno (CE).

Para **Chlamydia trachomatis** se amplifican en simultáneo secuencias del *gen ORF1 del plásmido críptico* (elemento extracromosómico altamente conservado intraespecie y presente en múltiples copias en la mayoría de las cepas) y del *gen ompA, cromosómico*, que codifica para la proteína principal de membrana externa (MOMP) la cual define el serotipo bacteriano.

Para **Neisseria gonorrhoeae** se amplifica un segmento del *pseudogen porA*, altamente conservado y presente en todas las cepas gonocócicas. Además, carece de especies comensales de *Neisseria* y es lo suficientemente diferente del homólogo en *Neisseria meningitidis* teniendo una alta especificidad para fines de diagnóstico.

Para **Mycoplasma genitalium** se amplifica un segmento del *operón mgpA*, relativamente conservado entre los aislamientos, pero lo suficientemente diferente del de otras especies, y codifica para la adhesina principal (MgPa) bacteriana.

Además, se provee un control positivo (CP) y agua libre de nucleasas para su uso como control de reactivos (CR) a fin de validar cada ensayo.

CONTENIDO DEL KIT

IT1-OLIGOMIX: mezcla de oligonucleótidos antisentido para la amplificación específica de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Mycoplasma genitalium* y CE. **Presentación:** seco. **Color de tapa:** azul.

OLIGO-CTR: mezcla de oligonucleótidos sentido y sondas para la amplificación específica de *Chlamydia trachomatis*. **Presentación:** seco. **Color de tapa:** verde.

OLIGO-NGO: mezcla de oligonucleótidos sentido y sonda para la amplificación específica de *Neisseria gonorrhoeae*. **Presentación:** seco. **Color de tapa:** amarillo.

OLIGO-MGE: mezcla de oligonucleótidos sentido y sonda para la amplificación específica de *Mycoplasma genitalium*. Presentación: seco. Color de tapa: naranja.

MASTERMIX FP 5X: mezcla de reacción que contiene todos los componentes para la reacción de amplificación (buffer de reacción, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, *Hot-Start Fast* DNA polimerasa, MgCl₂, UNG, agentes aditivos que maximizan la eficiencia de la PCR, estabilizantes y conservantes). Presentación: líquido. Color de tapa: marrón.

IT1-CTRL POS: CP que consiste en secuencias de ácidos nucleicos específicas para detectar *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Mycoplasma genitalium* y el gen endógeno ALB que codifica para albúmina humana. Presentación: líquido. Color de tapa: rojo.

AGUA DNase/RNase free: agua libre de nucleasas. Presentación: líquido. Color de tapa: sin color.

MATERIALES NECESARIOS NO PROVISTOS POR EL KIT

- Sistema comercial de purificación de ADN genómico (mediante columnas de sílica o partículas magnéticas).

El **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** fue verificado en los siguientes sistemas comerciales:

- NucleoSpin Tissue, Mini kit for DNA from cells and tissue (cod. 740952.50), Macherey-Nagel (Alemania).
- ADN PuriPrep-S Kit (cod. K1205), Inbio Highway (Argentina).
- TAN Bead Nucleic Acid Extraction kit (cod. W665A46), TANBEAN (Taiwan).

- Micropipetas de volumen variable.
- Tips con filtro libres de nucleasas.
- Tubos de microcentrífuga (x 1,5 o 2 ml) libres de nucleasas.
- Gradilla para tubos de 1,5 ml o 2 ml.
- Guantes descartables látex, vinilo o nitrilo sin polvo.
- Soporte de reacción acorde al Instrumento de PCR en tiempo real que se utilice (ej. microplacas con films ópticos, tubos de qPCR, etc.).
- Recipiente para el descarte de material biológico.
- Equipo de protección personal.

EQUIPOS NECESARIOS NO PROVISTOS POR EL KIT

- Termociclador o instrumento de qPCR siempre que cuenten con canal de detección de fluorescencia para FAM y VIC/JOE/HEX.

El **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** fue validado en QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) y verificado en los siguientes equipos:

- Applied Biosystems 7500® (Applied Biosystems).
- Mic® qPCR Thermal Cycler- 4 (Biomolecular Systems).
- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- cobas® z480 analyzer (Roche Molecular Systems, Inc.).

- Agitador vórtex.
- Microcentrífuga de mesa con rotor para tubos de 1,5 a 2 ml.

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

CONDICIONES DE TRANSPORTE, ALMACENAMIENTO Y CONSERVACIÓN DEL KIT
El kit se puede transportar en forma refrigerada (2 - 10°C). Una vez recibido, almacenar el kit completo a -20°C hasta la fecha de vencimiento indicada en el rótulo de la caja.

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN DEL KIT UNA VEZ ABIERTO

Una vez resuspendidos los reactivos que vienen liofilizados, también conservarlos a -20°C y protegidos de la luz.

Para la utilización de los reactivos líquidos, se sugiere descongelar previamente a 2 a 8°C no más de 20 minutos previo a su uso.

Evitar los repetidos ciclos de congelamiento/descongelamiento de los reactivos (no más de 10 ciclos) ya que pueden causar pérdida de reactividad.

En caso de no usar regularmente los reactivos reconstituidos, es aconsejable dividirlos en alícuotas y colocar las mismas a -20°C, teniendo en cuenta la utilización de material libre de nucleasas.

Los reactivos son estables hasta la fecha de vencimiento impresa en los rótulos, no pudiendo ser utilizados con posterioridad. Todos los reactivos deben ser conservados de -18 a -25°C y protegidos de la luz.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES SOBRE SU USO

ADVERTENCIAS

- El procesamiento del ensayo debe llevarse a cabo únicamente por **personal profesional calificado**, cumpliendo con las buenas prácticas de laboratorio y procedimientos de Biología Molecular (áreas separadas de procesamiento de muestras, pre y post amplificación, flujo del trabajo, uso de material apropiado, etc.).
- Los reactivos son **solamente para uso diagnóstico "in vitro"**.
- Lea atentamente las instrucciones de uso antes de realizar el ensayo para obtener resultados óptimos.
- Todos los reactivos líquidos o los reconstituidos deben descongelarse completamente, homogeneizarse suavemente (evitando formación de espuma) y centrifugarse brevemente antes de iniciar el ensayo.
- No usar los reactivos luego de la fecha de vencimiento.
- No intercambiar reactivos de distintos lotes ni modificar los procedimientos del ensayo.
- No emplear reactivos de origen diferente al indicado.
- No someter el producto a ciclos repetidos de congelado/descongelado.
- En caso de daños visibles en los envases, no utilizar el producto.
- El control positivo provisto no constituye material potencialmente infeccioso y no debe utilizarse para verificar el desempeño de otros productos similares del mercado.

- Es recomendable verificar el sistema comercial de purificación de ADN o el equipo de qPCR si es diferente al detallado por el fabricante.
- Una vez utilizado el kit, deberá desecharlo según la legislación vigente, teniendo en cuenta que dentro de sus componentes no contiene sustancias peligrosas, infecciosas o tóxicas que estén sometidas a normas de seguridad especiales, y que el embalaje está fabricado de papel y de polipropileno. En caso de cualquier duda contacte con nuestro departamento de atención al cliente.

PRECAUCIONES

- Todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infección.
- Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo con la normativa local vigente.
- Extremar los cuidados para evitar que los reactivos sufran contaminación microbiana, con nucleasas o sustancias inhibitorias cuando se introduzcan elementos dentro de los mismos.
- Si el sistema de purificación de ADN a utilizar contiene soluciones de lavado con etanol, asegurar la eliminación de posibles trazas del mismo antes de eluir el ADN ya que inhibe la reacción de qPCR.
- Las muestras de pacientes, los controles y los tubos de reacción usados deben manipularse como desechos infecciosos. Todos los reactivos deben descartarse conforme a las normativas legales.
- Utilice tips con filtro y evite tocar el extremo de la pipeta y/o los tips con los dedos.
- Utilice guantes libres de polvo y equipo de protección biológica.

MUESTRA: CONSIDERACIONES GENERALES

El correcto funcionamiento del producto depende de la adecuada extracción, transporte y conservación del material genético (**ADN bacteriano**) presente en la muestra (**exudado endocervical, exudado uretral, orina**). Para ello se debe utilizar un método de extracción apropiado para cada tipo de muestra. Tenga en cuenta las instrucciones del fabricante.

RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA.

La toma de muestra debe ser realizada utilizando material estéril y guantes descartables. No se requiere preparación especial del paciente.

Para los exudados endocervicales o uretrales: se recomienda la toma con hisopo estéril (punta de dacrón/rayón y mango de plástico o metal) por profesional especializado y debe ser colocada en un tubo seco. Posteriormente adicione 200 a 500 µl de medio de transporte molecular (MTM), agite vigorosamente durante 15-20 segundos.

Para la muestra de orina: se recomienda utilizar primer chorro. Es requerida una retención urinaria mínima de al menos 1 hora (no es necesario que sea la primera orina de la mañana). No debe higienizar sus genitales antes de realizar la toma. El paciente debe recolectar los primeros 10 a 20 ml en recipiente estéril (volumen

correspondiente a menos de una cuarta parte del frasco de urocultivo). En el laboratorio, trasvasar la totalidad de la orina a un tubo adecuado y centrifugar durante 30 minutos a 3000 g. Desechar con cuidado el sobrenadante y dejar unos 200 a 500 µl de solución. Resuspender el sedimento y utilizar la suspensión para la extracción de los ácidos nucleicos.

Para semen: se recomienda recolectar la muestra luego de la hora posterior a orinar, con una abstinencia sexual de 72 horas, por masturbación en recolector estéril.

Los procedimientos se realizan en condiciones de seguridad adecuadas para manejo de material infeccioso (según los documentos M29 - *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections* del NCCLS y *Laboratory Biosafety Manual 4th edition* de la WHO).

OBTENCIÓN DEL ADN.

Se debe realizar según los requerimientos e instrucciones del fabricante del sistema de extracción utilizado, el cual debe ser compatible con la metodología de qPCR.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO DEL ADN.

Los ensayos moleculares son particularmente sensibles a las condiciones preanalíticas subóptimas, por lo cual la calidad del ADN a utilizar es fundamental. Un almacenamiento temporal del ADN purificado (hasta 2 horas) entre 2°C y 10°C es posible hasta el momento de su utilización. Si es necesario conservarlo por un período mayor de tiempo, se recomienda guardar entre -18°C y -25 °C, idealmente a -70°C o utilizar un medio de transporte molecular (MTM). Evite más de un ciclo de congelamiento y descongelamiento, mediante el fraccionamiento en alícuotas.

El incorrecto almacenamiento del ADN y los repetidos ciclos de congelamiento y descongelamiento, pueden afectar su integridad y causar pérdida de desempeño y/o resultados falsos negativos.

PROCEDIMIENTO

1. OBTENCIÓN DEL ADN

En el área de muestras, realizar la extracción del ADN utilizando los sistemas de extracción diseñados a tal efecto, manuales o automatizados, disponibles en el mercado. En caso de no emplear uno de los métodos verificados por DETx MOL se recomienda evaluar su desempeño. Más información en el apartado MUESTRA: CONSIDERACIONES GENERALES.

2. RECONSTITUCIÓN DE LOS REACTIVOS LIOFILIZADOS

- Centrifugar brevemente los tubos para evitar pérdidas de reactivo al abrirlos.
- **En el área de pre-PCR,** reconstituir los reactivos IT1-OLIGOMIX, OLIGO-CTR, OLIGO-NGO y OLIGO-MGE utilizando el reactivo AGUA DNase/RNase free con los volúmenes indicados en cada rótulo.
- Homogeneizar con vórtex por 30 segundos y centrifugar brevemente antes de uso.
- Mantener en frío los reactivos reconstituidos durante su uso.
- Guardar los reactivos reconstituidos a -20°C luego de su uso.

3. PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN

- Centrifugar brevemente los tubos para evitar pérdidas de reactivo al abrirlos.
- *En el área de pre-PCR*, descongelar el reactivo **MASTERMIX FP 5X** por completo, mezclar suavemente evitando formación de espuma y centrifugar brevemente antes de su uso.
- Mantener en frío durante su uso.
- Preparar la mezcla de reacción siguiendo las proporciones que indica la tabla, teniendo en cuenta el número de reacciones a realizar en el ensayo.

SCREENING - MEZCLA DE REACCIÓN	
REACTIVO	VOLUMEN POR REACCIÓN
IT1-OLIGOMIX	2 µl
OLIGO-CTR	2 µl
OLIGO-NGO	2 µl
OLIGO-MGE	2 µl
MASTERMIX FP 5X	4 µl
AGUA DNase/RNase free	3 µl

<i>Chlamydia trachomatis</i> - MEZCLA DE REACCIÓN	
REACTIVO	VOLUMEN POR REACCIÓN
IT1-OLIGOMIX	2 µl
OLIGO-CTR	2 µl
MASTERMIX FP 5X	4 µl
AGUA DNase/RNase free	7 µl

<i>Neisseria gonorrhoeae</i> - MEZCLA DE REACCIÓN	
REACTIVO	VOLUMEN POR REACCIÓN
IT1-OLIGOMIX	2 µl
OLIGO-NGO	2 µl
MASTERMIX FP 5X	4 µl
AGUA DNase/RNase free	7 µl

<i>Mycoplasma genitalium</i> - MEZCLA DE REACCIÓN	
REACTIVO	VOLUMEN POR REACCIÓN
IT1-OLIGOMIX	2 µl
OLIGO-MGE	2 µl
MASTERMIX FP 5X	4 µl
AGUA DNase/RNase free	7 µl

- Dispensar 15 µl de la mezcla de reacción en cada tubo/pocillo de reacción.

- *En el área de pre-PCR*, agregar a los pocillos/tubos de reacción correspondientes:
 - *Muestras a analizar*: 5 µl de ADN purificado correspondiente a cada muestra.
 - *Control de Reactivo (NTC)*: 5 µl del reactivo AGUA DNase/RNase free.
- *En el área de PCR*, agregar 5 µl del reactivo **IT1-CTRL POS** al pocillo/tubo de reacción correspondiente al *Control Positivo (CP)*.
- El volumen final de reacción es de 20 µl.
- Cerrar los tubos/pocillos de reacción y, si es necesario, centrifugue brevemente antes de introducir en el instrumento de qPCR.

4. PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR

- Es necesario tener información básica respecto al manejo y programación del instrumento de qPCR a utilizar, por lo cual se recomienda referirse al manual correspondiente.
- Las condiciones generales para llevar a cabo la reacción de qPCR, son las siguientes:

CONDICIONES GENERALES	VOLUMEN POR REACCIÓN
Programa	Cuantificación absoluta
Volumen de reacción	20 µl
Colorante de referencia pasivo*	No contiene
Tipo de enzima (Taq)	Fast
Tipo de química	Sonda de hidrólisis
Canales de detección ($\lambda_{abs}/\lambda_{em}$)	FAM (492 nm / 516 nm) VIC/JOE/HEX (530 nm / 550 nm)

*Solo utilizar en equipos que requieran colorantes pasivos

PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN				
Etapas	Temperatura	Tiempo (min:seg)	Nº Ciclos	Adquisición
Preincubación	50°C	5 min	1	NO
Activación	95°C	10 min	1	NO
Desnaturalización	95°C	5 seg	45	NO
Elongación	60°C	20 seg (*)		SI

(*) utilizar 30 segundos de elongación en el equipo ABI7500

5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

- Es importante tener información básica respecto al procedimiento de análisis de datos del *software* del instrumento de qPCR utilizado, por lo cual se recomienda referirse al manual correspondiente.

• Para el análisis de las curvas de amplificación, se deberá establecer de forma correcta los siguientes parámetros que influyen en la determinación del valor de Ct (ciclo que supera el valor umbral de fluorescencia) para cada muestra:

- línea de base (baseline):** debe comprender los ciclos de PCR en los cuales la señal de fluorescencia se encuentra por debajo de los límites de detección del instrumento (normalmente un rango de valores de Ct desde 3 a 15).
- valor umbral de fluorescencia (threshold):** fijar en la fase exponencial de las curvas de amplificación de las muestras para el templado que se analiza. Por lo general, se fija alrededor del 10% respecto a la fluorescencia máxima del plateau general de las curvas de amplificación.

6. CRITERIOS DE VALIDACIÓN DEL ENSAYO

Una vez definidos los parámetros anteriores, el ensayo se considera válido si se cumplen simultáneamente las siguientes condiciones:

- **Detección de inhibición y presencia de material genético celular:** el ensayo **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** detecta la secuencia del gen ALB (albúmina humana) como una señal de control endógeno (CE) para evaluar la presencia de ADN genómico celular, la extracción de las muestras y la eficiencia de la amplificación. El valor del Ct del CE de una muestra o control debe ser menor o igual a 40.
- **Controles positivo (CP) y negativo (NTC):** deben estar presentes en cada ensayo y procesados junto con las muestras. El NTC está compuesto por Agua libre de DNasa/RNasa, por lo cual no debe haber señal (o el Ct ser mayor a 40) en ninguno de los canales. La presencia de señal es indicio de contaminación por otras muestras o por producto amplificado durante la preparación de las muestras o durante la preparación de los tubos de reacción. El CP está compuesto por ADN que contiene secuencias de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Mycoplasma genitalium* y gen endógeno ALB debiéndose detectar señal (Ct menores a 37) en el canal FAM y VIC/JOE/HEX.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Se considera **DETECTABLE** en uno de los canales cuando se observa una curva de amplificación que cruza el umbral (*threshold*) dando lugar a un valor de Ct ≤ 40 . Se considera **NO DETECTABLE** en uno de los canales cuando no se observa curva de amplificación (ausencia de Ct) o cuando la curva de fluorescencia cruza el umbral (*threshold*) con un valor de Ct > 40 .
- **Cada muestra puede ser evaluada en formato screening** (detección simultánea en una única reacción de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Mycoplasma genitalium*) o **en formato individual para cada patógeno**.
- Las muestras en las que no se detecte señal para el o los patógenos (canal FAM), pero se detecte la señal del CE (canal VIC/JOE/HEX), serán consideradas **VÁLIDAS** y se informarán como **NO DETECTABLE**.

- Las muestras en las que se detecte señal para el o los patógenos (canal FAM) se interpretarán como **DETECTABLE** independientemente de la señal del CE (canal VIC/JOE/HEX).
- Las muestras en las que no se detecte señal para el o los patógenos (canal FAM) ni para el CE (canal VIC/JOE/HEX), serán consideradas **INVÁLIDAS** y se recomienda repetir el ensayo a partir de una nueva purificación del ADN o recolectar una nueva muestra del paciente.
- Los resultados y las interpretaciones del ensayo serán similares al ejemplo siguiente

canal FAM	canal HEX/VIC/JOE	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
NO DET o Ct > 40	Ct ≤ 40	VÁLIDO	NO DETECTABLE
NO DET o Ct > 40	NO DET o Ct > 40	INVÁLIDO	REPETIR
Ct ≤ 40	NO DET o Ct > 40	VÁLIDO	DETECTABLE

- En caso de que una muestra resulte de interpretación dudosa o inválida, se recomienda repetir el ensayo a partir de una nueva purificación del ADN o recolectar una nueva muestra del paciente.
- La Figura 1 muestra las curvas de amplificación del **IT1-CTRL POS**.

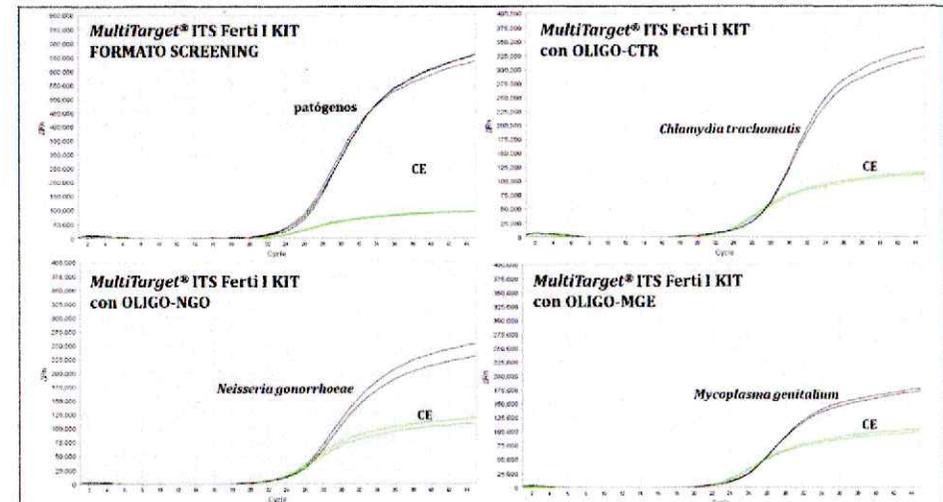


Figura 1. Gráficos de amplificación utilizando el MultiTarget® ITS Ferti I KIT. Se muestra las curvas de amplificación obtenidas con el control positivo IT1-CTRL POS. Instrumento de qPCR utilizado: QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific).

LIMITACIONES DEL ENSAYO

- Cualquier resultado diagnóstico obtenido con este kit debe ser interpretado en conjunto con otros hallazgos clínicos y/o de laboratorio.
- El incumplimiento del procedimiento del ensayo puede afectar negativamente el rendimiento y/o invalidar el resultado del mismo.
- Los resultados falsos negativos pueden deberse a: recolección y/o conservación inadecuada de las muestras clínicas; degradación del DNA durante el envío o almacenamiento en condiciones inadecuadas; la presencia de inhibidores, error al seguir las instrucciones de uso, etc.

CONTROL DE CALIDAD

Se deben incluir en cada ensayo, al menos un Control Positivo (5µl del reactivo **IT1-CTRL POS**) y un Control de Reacción (5µl del reactivo **AGUA DNase/RNase free**). Ambos reactivos se encuentran incluidos en el kit. Para que el ensayo sea válido, es requisito que los resultados para los 2 controles sean los correctos, de lo contrario, deberá repetirse el ensayo.

DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

1. ESPECIFICIDAD *IN SILICO*

CON SECUENCIA COMPLETA DEL GENOMA HUMANO: El análisis *in silico* de los oligonucleótidos y sondas incluidos en el **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** mostró que los mismos se hibridan con un 100% de identidad con su *target* específico. Este análisis también reveló una potencial hibridación de los oligonucleótidos en zonas no específicas del genoma humano, pero en condiciones que no permite la correcta amplificación y detección. Por lo tanto, se concluye que por predicción *in silico*, el ensayo amplificaría específicamente las regiones esperadas de los 3 patógenos [*Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG) y *Mycoplasma genitalium* (MG)] y del control endógeno con la secuencia del cromosoma 4 del genoma humano en donde se encuentra el gen ALB.

CON SECUENCIAS DE MICROORGANISMOS (análisis de exclusividad): El análisis *in silico* de los oligonucleótidos y sondas incluidos en el **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** mostró una potencial hibridación individual de los mismos en zonas no específicas de los genomas de microorganismos que pueden estar presentes en las muestras clínicas [*Acinetobacter calcaceticus*, *Acinetobacter Iwoffii*, *Actinomyces israelii*, *Aerococcus viridans*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter ureolyticus*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*), *Candida tropicalis*,

Chlamydia trachomatis, *Citrobacter braakii*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium genitalium*, *Cutibacterium acnes*, *Eikenella corrodens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Gemella morbillorum*, *Haemophilis ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, HIV CRF12_BF, HIV CRF17_BF, HIV CRF89_BF, HIV genotipo B, HIV genotipo F1, HPV06b, HPV11, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV40, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV68b, HPV72, HPV73, Human alphaherpesvirus 1 (Herpes Simplex Virus type 1: HSV1), Human alphaherpesvirus 2 (Herpes Simplex Virus type 2: HSV2), Human betaherpesvirus 5 (Citomegalovirus: CMV), Human gammaherpesvirus 4 (Epstein-barr virus: EBV), Human hepatitis B virus (HBV), Human hepatitis C virus (HCV), *Kingella kingae*, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Micrococcus luteus*, *Mobiluncus curtisii*, *Moraxella osloensis*, *Morganella morganii*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasmoides pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Pasteurella maltocida*, *Pediococcus acidilactici*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus sanguis*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Veillonella parvula*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Weissella paramesenteroides*, *Yersinia enterocolitica*). Sin embargo, estas hibridaciones presentaban más de una discordancia nucleotídica en el extremo 3' de los mismos, o distancias muy separadas entre sí como para permitir la correcta amplificación y detección, o no había hibridación de alguna de las sondas de modo que permita la detección entre las regiones de hibridación de los cebadores. Por lo que no se espera obtener reacciones cruzadas (falsos positivos) ante la presencia de los microorganismos analizados.

CON SECUENCIAS DE PATÓGENOS DETECTADOS POR EL KIT (análisis de inclusividad): El análisis *in silico* de los oligonucleótidos y sondas incluidos en el **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** mostró que un alto porcentaje (>90%) de las secuencias analizadas presentó ≤1 *mismatch* con los oligonucleótidos diseñados. Por lo tanto, se concluye que el **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** amplificaría de forma específica a cada uno de los patógenos declarados. Además, no se espera la presencia de falsos positivos (amplificación y detección inespecífica) en el canal VIC/JOE/HEX (control endógeno) debida a la hibridación de este sistema de oligonucleótidos con los distintos patógenos.



DISPOSITIVOS
MÉDICOS
IRAM - ISO 13485:2019
GESTIÓN
DE LA CALIDAD
IRAM - ISO 9001:2015

detx mol


Dr. DIEGO CHOURY
Apoderado
DETx MOL S.A.


Dr. GERMAN PEREZ
Director Técnico
DETx MOL S.A.

detx mol

2. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

REACTIVIDAD CRUZADA CON MICROORGANISMOS: Se ensayó un panel de diferentes microorganismos que pueden estar presentes en la muestra clínica: *Candida albicans*, CMV, EBV, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, HBV, HCV, HIV, HPV6, HPV11, HPV16, HPV18, HPV40, HPV66, HPV72, HPV73, HSV1, HSV2, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Mycoplasma hominis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* y *Neisseria meningitidis*. Cada microorganismo fue preparado en concentraciones adecuadas en matriz de muestra clínica negativa para CT, NG y MG (MCN). Se procedió a la purificación de los ácidos nucleicos con un método comercial según instrucciones del fabricante y se ensayaron réplicas de cada uno con el **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** en formato SCREENING y OLIGO ESPECÍFICO. Los resultados indican ausencia de reactividad cruzada con los microorganismos analizados.

REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE LOS PATÓGENOS DETECTADOS POR EL KIT: Se ensayó un panel con los distintos patógenos detectados por **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** para analizar reacción cruzada entre ellos. Para ello, se prepararon ADN plasmídicos de cada microorganismo en concentraciones 10⁶ copias/reacción en MCN. Luego se procedió a la purificación de los ácidos nucleicos con un método comercial según instrucciones del fabricante. Luego se ensayaron réplicas de cada uno con el **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** usando mezclas de reacción con OLIGOS ESPECÍFICOS. Los resultados indican ausencia de reactividad cruzada entre los patógenos detectados por el **MultiTarget® ITS Ferti I KIT**.

ESTUDIO DE COMPETENCIA: Se evaluó si altas concentraciones de uno de los patógenos podrían interferir con la capacidad de detección de los otros 2 patógenos detectados con el kit. Para ello, se prepararon soluciones conteniendo ADN plasmídico 3x LOD en MCN en presencia y ausencia de CT, NG y MG, según corresponda, en alta concentración (10⁵ copias/reacción) y se ensayaron con el **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** en formato OLIGO ESPECÍFICO. Los resultados indican que la detección de cada patógeno con sus OLIGOMIX específica no se ve afectada en presencia de altas concentraciones de los otros patógenos detectados por el **MultiTarget® ITS Ferti I KIT**.

3. VALIDACIÓN CLÍNICA

El análisis de concordancia (*agreement*) se utiliza para comparar distintos métodos clínicos entre sí cuando son aplicados al mismo grupo de individuos (muestras apareadas). Se utilizó al estadístico Kappa (κ) de Cohen como medida de concordancia, donde valores entre 0.8 y 1.0 considera una estimación muy buena del grado de concordancia de la prueba.

Se utilizaron distintos paneles de muestras clínicas. En caso de necesitar completar el número deseado de muestras positivas de cada patógeno (CT, NG y MG) se utilizaron muestras artificiales (*spiking*) utilizando los controles Amplirun®

Chlamydia Trachomatis DNA Control (MBC012-C), cultivo de NG (ST00238_A1) y Amplirun® *Mycoplasma Genitalium* DNA Control (MBC085).

Para los exudados endocervicales. Se utilizaron 2 paneles de muestras:

- **PANEL EX01:** 100 muestras testeadas en laboratorio clínico de origen mediante cobas® 4800 CT/NG – Roche.
- **PANEL EX02:** 228 muestras testadas en laboratorios clínicos de origen mediante VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit – CerTest o DiaPlexQ™ STI6 Detection Kit -SolGent.

EXUDADOS ENDOCERVICALES – PANEL A – VALIDACIÓN CLÍNICA							
		SCREENING			TOTAL		
		DET	NO DET	INVALIDO		Concordancia POS	
REF	DET	47	3	0	50	Concordancia NEG	94,0%
	NO DET	0	49	1	49	Concordancia GENERAL	100,0%
	TOTAL	47	52	1	99	KAPPA de COHEN: 0.94 (1.13-0.74)	97,0%
		OLIGO-CTR					
		DET	NO DET	INVALIDO	TOTAL	Concordancia POS	91,7%
REF	DET	22	2	0	24	Concordancia NEG	100,0%
	NO DET	0	75	1	76	Concordancia GENERAL	98,0%
	TOTAL	22	77	1	99	KAPPA de COHEN: 0.94 (1.14-0.75)	99,0%
		OLIGO-NGO					
		DET	NO DET	INVALIDO	TOTAL	Concordancia POS	96,2%
REF	DET	25	1	0	26	Concordancia NEG	100,0%
	NO DET	0	73	1	73	Concordancia GENERAL	99,0%
	TOTAL	25	74	1	99	KAPPA de COHEN: 0.97 (1.17-0.78)	99,0%

EXUDADOS ENDOCERVICALES – PANEL B – VALIDACIÓN CLÍNICA							
		SCREENING			TOTAL		
		DET	NO DET	INVALIDO		Concordancia POS	
REF	DET	76	2	0	78	Concordancia NEG	97,4%
	NO DET	0	148	2	148	Concordancia GENERAL	100,0%
	TOTAL	76	150	2	226	KAPPA de COHEN: 0.98 (1.11-0.85)	99,1%
		OLIGO-CTR					
		DET	NO DET	INVALIDO	TOTAL	Concordancia POS	100,0%
REF	DET	32	0	0	32	Concordancia NEG	100,0%
	NO DET	0	193	3	193	Concordancia GENERAL	100,0%
	TOTAL	32	193	3	225	KAPPA de COHEN: 1.00 (1.13-0.83)	100,0%
		OLIGO-NGO					
		DET	NO DET	INVALIDO	TOTAL	Concordancia POS	100,0%
REF	DET	22	0	0	22	Concordancia NEG	100,0%
	NO DET	0	204	2	204	Concordancia GENERAL	100,0%
	TOTAL	22	204	2	226	KAPPA de COHEN: 1.00 (1.13-0.87)	100,0%
		OLIGO-MGE					
		DET	NO DET	INVALIDO	TOTAL	Concordancia POS	100,0%
REF	DET	26	0	0	26	Concordancia NEG	100,0%
	NO DET	0	200	2	200	Concordancia GENERAL	100,0%
	TOTAL	25	163	1	226	KAPPA de COHEN: 1.00 (1.17-0.78)	100,0%

Para los exudados uretrales. Se analizaron 96 muestras provenientes de dos laboratorios clínicos posteriormente al análisis estándar de referencia del laboratorio de origen.

EXUDADOS URETRALES - VALIDACIÓN CLÍNICA						
		SCREENING				
		DET	NO DET	INVALIDO	TOTAL	
REF	DET	70	2	0	72	Concordancia POS 97,2%
	NO DET	0	21	3	21	Concordancia NEG 100,0%
	TOTAL	70	23	3	93	Concordancia GENERAL 97,8%
KAPPA de COHEN: 0.94 (1.14 - 0.74)						
		OLIGO-CTR				
		DET	NO DET	INVALIDO	TOTAL	
REF	DET	55	2	0	57	Concordancia POS 96,5%
	NO DET	1	30	3	31	Concordancia NEG 96,8%
	TOTAL	56	32	3	88	Concordancia GENERAL 96,6%
KAPPA de COHEN: 0.93 (1.13 - 0.72)						
		OLIGO-NGO				
		DET	NO DET	INVALIDO	TOTAL	
REF	DET	16	0	0	16	Concordancia POS 100,0%
	NO DET	1	68	3	69	Concordancia NEG 98,6%
	TOTAL	17	68	3	85	Concordancia GENERAL 98,8%
KAPPA de COHEN: 0.95 (1.24 - 0.67)						
		OLIGO-MGE				
		DET	NO DET	INVALIDO	TOTAL	
REF	DET	8	0	0	8	Concordancia POS 100,0%
	NO DET	1	84	3	85	Concordancia NEG 98,8%
	TOTAL	9	84	3	93	Concordancia GENERAL 98,9%
KAPPA de COHEN: 0.93 (1.13 - 0.73)						

Para orinas. Se analizaron un total de 39 muestras de posteriormente al análisis estándar de referencia del laboratorio de origen. Se utilizaron orinas de primer chorro, con una retención urinaria mínima de al menos 1 hora.

ORINAS - VALIDACIÓN CLÍNICA						
		SCREENING				
		DET	NO DET	INVALIDO	TOTAL	
REF	DET	28	2	0	30	Concordancia POS 93,3%
	NO DET	0	8	1	8	Concordancia NEG 100,0%
	TOTAL	28	10	1	38	Concordancia GENERAL 94,7%
KAPPA de COHEN: 0.85 (1.17 - 0.54)						
		OLIGO-CTR				
		DET	NO DET	INVALIDO	TOTAL	
REF	DET	11	2	0	13	Concordancia POS 84,6%
	NO DET	0	8	1	8	Concordancia NEG 100,0%
	TOTAL	11	10	1	21	Concordancia GENERAL 90,5%
KAPPA de COHEN: 0.81 (1.23 - 0.39)						
		OLIGO-NGO				
		DET	NO DET	INVALIDO	TOTAL	
REF	DET	7	1	0	8	Concordancia POS 87,5%
	NO DET	0	22	1	22	Concordancia NEG 100,0%
	TOTAL	6	24	1	30	Concordancia GENERAL 96,7%
KAPPA de COHEN: 0.91 (1.27 - 0.55)						
		OLIGO-MGE				
		DET	NO DET	INVALIDO	TOTAL	
REF	DET	9	0	0	9	Concordancia POS 100,0%
	NO DET	0	21	1	21	Concordancia NEG 100,0%
	TOTAL	9	21	1	30	Concordancia GENERAL 100,0%
KAPPA de COHEN: 1.00 (1.36 - 0.64)						

Para semen. Se analizaron un total de 56 muestras de semen posteriormente al análisis estándar de referencia del laboratorio de origen.

SEMEN - VALIDACIÓN CLÍNICA						
		SCREENING				
		DET	NO DET	INVALIDO	TOTAL	
REF	DET	40	3	1	43	Concordancia POS 93,0%
	NO DET	0	11	0	11	Concordancia NEG 100,0%
	TOTAL	40	14	1	54	Concordancia GENERAL 94,4%
KAPPA de COHEN: 0.84 (1.11 - 0.58)						
		OLIGO-CTR				
		DET	NO DET	INVALIDO	TOTAL	
REF	DET	25	3	1	28	Concordancia POS 89,3%
	NO DET	0	10	1	10	Concordancia NEG 100,0%
	TOTAL	24	14	2	38	Concordancia GENERAL 92,1%
KAPPA de COHEN: 0.81 (1.23 - 0.50)						
		OLIGO-NGO				
		DET	NO DET	INVALIDO	TOTAL	
REF	DET	7	1	0	8	Concordancia POS 87,5%
	NO DET	0	39	1	39	Concordancia NEG 100,0%
	TOTAL	7	40	1	47	Concordancia GENERAL 96,7%
KAPPA de COHEN: 0.92 (1.20 - 0.63)						
		OLIGO-MGE				
		DET	NO DET	INVALIDO	TOTAL	
REF	DET	9	0	0	9	Concordancia POS 100,0%
	NO DET	0	37	1	37	Concordancia NEG 100,0%
	TOTAL	9	37	1	46	Concordancia GENERAL 100,0%
KAPPA de COHEN: 1.00 (1.29 - 0.71)						

4. LÍMITE DE DETECCIÓN

Se determinó el límite de detección (LOD) para los distintos targets (CT, NG y MG) en la prueba **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** en formato OLIGO ESPECÍFICO utilizando los siguientes controles disueltos en matriz clínica negativa (MCN) en concentraciones adecuadas:

- Amplirun® Chlamydia Trachomatis DNA Control (MBC012-C),
- Cultivo de Ngo (ST00238_A1)
- Amplirun® Mycoplasma Genitalium DNA Control (MBC085).

La estimación se realizó mediante análisis *probit* en base a al menos 5 niveles de concentración diferentes con 40 réplicas en cada uno.

PATÓGENO	LOD
CT	4,9 copias/reacción (IC95%: 3,1 - 9,6 copias/reacción)
NG	7,5 copias/reacción (IC95%: 5,6 - 11,1 copias/reacción)
MG	26,4 copias/reacción (IC95%: 20,6 - 38,3 copias/reacción)

Se procedió a verificar el LOD obtenido para cada patógeno, para la detección de CT, NG y MG con **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** en formato SCREENING. Para ello se realizaron 2 niveles de 40 réplicas cada uno en 3 experimentos independientes en concentraciones aproximadas al 1x LOD. De esta forma se verificó que a la concentración 1x LOD se detectan al menos 95% de las réplicas.

5. PRECISIÓN/VARIABILIDAD

Se realizó un **análisis 5 x 5 x 3** (guía CLSI EP05-A3) para obtener estimaciones de reproducibilidad (*variación entre ensayos*), repetibilidad (*variación intraensayo*) y precisión entre equipos (*variación de instrumento*).

Los equipos utilizados fueron: *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System de Thermo Fisher Scientific (QS5)*, *Mic® qPCR Thermal Cycler-4 de Biomolecular Systems (MIC)* y *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System de Bio-Rad (CFX)*.

Se emplearon diferentes paneles dependiendo la estrategia de detección:

DETECCIÓN DE CADA PATÓGENO EN FORMATO SCREENING:

- Control positivo IT1 CTRL POS (IT1-CP-001).
- ADN plasmídicos disueltos en ADN genómico proveniente de línea celular HEK293 (5 ng/rxn) en concentraciones 3x LOD para CT, NG y MG (pCT / pNG / pMG).

DETECCIÓN DE CADA PATÓGENO EN FORMATO OLIGO-ESPECÍFICO

- Control positivo IT1 CTRL POS (IT1-CP-001).
- Matriz de muestra clínica negativa para CT, NG y MG (MCN).
- ADN plasmídicos en ADN genómico proveniente de línea celular HEK293 (5 ng/rxn) en concentraciones 3x LOD y 10x LOD para CT, NG y MG (pCT/pNG/pMG).
- muestras clínicas artificiales fabricadas mediante el agregado de ADN plasmídico (*spiking*) a matriz negativa de exudado endocervical (MC CT / MC NG / MC MG).

El cálculo para cada uno de los canales donde se detecta el tipo de HPV-AR y el control endógeno se realizó con el software *Analyse-it Ultimate edition* (Analyse-it Software, Ltd. UK).

MUESTRA	PROMEDIO Ct	REPETITIVIDAD		INTRA EQUIPO		REPRODUCIBILIDAD	
		CV%	SD	CV%	SD	CV%	SD
MultiTarget® ITS Ferti I KIT - SCREENING							
IT1-CTRL POS	24,71	3,6%	0,899	3,6%	0,901	3,9%	0,966
LOD CT	33,83	1,8%	0,615	1,8%	0,615	2,5%	0,853
LOD MG	32,80	3,0%	0,982	3,0%	0,982	3,6%	1,195
LOD NG	33,63	3,5%	1,178	3,5%	1,178	3,7%	1,243
MultiTarget® ITS Ferti I KIT - OLIGO-CTR							
IT1-CTRL POS	26,04	2,0%	0,530	2,0%	0,530	2,8%	0,736
LOD 3X	33,64	1,3%	0,451	1,3%	0,451	2,6%	0,859
LOD 10X	32,03	1,0%	0,334	1,0%	0,334	2,5%	0,792
MC	24,51	0,9%	0,218	0,9%	0,218	2,7%	0,668
MultiTarget® ITS Ferti I KIT - OLIGO-NGO							
IT1-CTRL POS	25,09	1,2%	0,303	1,2%	0,303	2,2%	0,555
LOD 3X	33,40	1,3%	0,421	1,3%	0,421	2,7%	0,893
LOD 10X	31,60	1,4%	0,451	1,4%	0,451	1,9%	0,594
MC	23,79	0,8%	0,196	0,9%	0,223	2,3%	0,556
MultiTarget® ITS Ferti I KIT - OLIGO-MGE							
IT1-CTRL POS	26,31	1,4%	0,372	1,4%	0,372	1,8%	0,483
LOD 3X	32,30	0,9%	0,300	0,9%	0,300	2,4%	0,784
LOD 10X	30,41	1,4%	0,426	1,4%	0,432	2,3%	0,691
MC	24,51	1,3%	0,309	1,3%	0,309	2,1%	0,508

El **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** demostró una reproducibilidad, repetitividad y precisión intraequipo del 100% para la detección de CT, NG y MG en formato SCREENING con CV_{promedio} de 3,14%, y en formato OLIGO ESPECÍFICO con CV_{promedio} de 1,77% para NG, 1,55% para NG y 1,55% para MG. En todos los controles y muestras clínicas ensayadas, los valores de CV fueron inferiores al 4%.

6. INTERFERENCIAS Y CONTAMINANTES

Se evaluó el rendimiento del **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** ante la presencia eventual de posibles sustancias endógenas y exógenas interferentes en la muestra endocervical en concentraciones potencialmente similares a las que podrían encontrarse durante la recolección de muestras. Para ello se utilizaron muestras artificiales adicionando plásmidos para CT, NG o MG a concentraciones 3x LOD en una matriz de MCN. Este estudio se realizó con el **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** en formato SCREENING, testeando que no haya interferencia para la amplificación de ninguno de los targets, como así tampoco resultados falsos positivos en el testeo de muestras negativas.

Para fármacos, se agregó la potencial sustancia interferente (en concentraciones efectivas altamente superiores a las descriptas para su uso clínico) a alícuotas de MCN y plásmidos para CT, NG o MG 3x LOD, y se procedió a la extracción del ADN genómico.

Cada sustancia se ensayó por triplicado. Las sustancias ensayadas y sus concentraciones fueron: CISTALGINA (Phenazopyridine Hydrochloride) 0,5%, EMPECID (Clotrimazole) 0,5%, MICROSONA (Hydrocortisone) 0,5%, MICOTRAL (Miconazole nitrate) 0,5%, HONGUIL (Tioconazole) 0,5%, BENZOCAINA 0,5%, KY GEL LUBRICANTE 0,5%, EVAGINA GEL 0,5%, CLIDAN (Clorohidrato de Clindamicina) 0,5%, DERMO VAGISIL (Jabón líquido) 0,5%, ACERPES (Acyclovir) 0,5%, METRAL (Metronidazol) 0,5%, DERMO VAGISIL DESOD SPRAY 0,5%, APRIL (Estradiol) 0,5%.

Además, se evaluó la presencia de ADN humano en altas concentraciones (50ng y 100ng), etanol 5% y sangre entera 5% en el eluato por triplicado como posible contaminante.

Los resultados indican que, de todas las sustancias evaluadas, el rendimiento de **MultiTarget® ITS Ferti I KIT** no se ve afectado en presencia de los interferentes estudiados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the laboratory-based detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae--2014. MMWR Recomm Rep. 2014 Mar 14;63(RR-02):1-19.
- Documento de consenso sobre diagnóstico y tratamiento de las infecciones de transmisión sexual en adultos, niños y adolescentes. 2017. <https://gesida-seimc.org/> (revisado: 14/09/2024).
- Public Health England. National chlamydia screening programme standards 2022. <https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment>

- _data/file/574351/NCSP_Standards_7th_edition.pdf (revisado: 14/09/2024).
- Public Health England. Guidance for the detection of gonorrhoea in England. 2021. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/405293/170215_Gonorrhoea_testing_guidance_REVISED_2_pdf (revisado: 14/09/2024).
 - Gnanadurai R, Fifer H. Mycoplasma genitalium: A Review. Microbiology (Reading). 2020 Jan;166(1):21-29. doi: 10.1099/mic.0.000830.
 - Leos-Alvarado C, Llaca-Díaz J, Flores-Aréchiga A, Pérez-Chávez F, Casillas-Vega N. Male urethritis. A review of the ideal diagnostic method. Actas Urol Esp (Engl Ed). 2020 Oct;44(8):523-528. English, Spanish. doi: 10.1016/j.acuro.2019.11.008. Epub 2020 Jul 16.
 - Malhotra M, Sood S, Mukherjee A, Muralidhar S, Bala M. Genital Chlamydia trachomatis: an update. Indian J Med Res. 2013 Sep;138(3):303-16. PMID: 24135174; PMCID: PMC3818592.
 - Ng LK, Martin IE. The laboratory diagnosis of Neisseria gonorrhoeae. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2005 Jan;16(1):15-25. doi: 10.1155/2005/323082.

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Verifique siempre antes de su uso:

- la fecha de caducidad del kit
- las condiciones de almacenamiento y manipulación
- los ajustes de la pipeta y del termociclador

HALLAZGO	POSIBLE MOTIVO Y ACCIÓN CORRECTIVA
Se detecta señal baja en un canal sin curva de amplificación característica.	Emisión de señal inespecífica que en algunos equipos puede interpretarse como un resultado detectable. Aumente el valor umbral justo por encima de la señal no específica.
Se detecta una señal en la reacción del Control de Reacción (NTC).	Posible contaminación con productos de amplificación en concentración elevada. Repetir el análisis.
No se detectó señal en la reacción del Control Positivo.	Descarte un error de pipeteo. Repetir el análisis.
En la muestra examinada, se detecta baja señal de fluorescencia junto con un valor bajo de Ct en el control endógeno.	Elevada cantidad de ADN genómico en el eluato utilizado. Verifique que la concentración no sea superior a 200 ng/reacción. En caso contrario, diluya la muestra o prepare un nuevo aislado de ADN viral.

MARCAS COMERCIALES Y AVISO LEGAL

MultiTarget® (DETx MOL S.A.); ABI Prism®, QuantStudio™ (Applied Biosystems); CFX96 TOUCH™ (Bio-Rad); LightCycler®, cobas® (Roche); Highway® (Inbio Highway); Mic® (Biomolecular Systems).

Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc usados en este documento, incluso si no están marcados específicamente como tales, no se deben considerar privados de protección legal.

El *MultiTarget*® ITS Ferti I KIT es un kit de diagnóstico con marcado IVD de conformidad con las directivas de A.N.M.A.T. de diagnóstico in vitro.

No disponible en todos los países.

(C) 2024 DETx MIL S.A.; reservados todos los derechos.

CÓDIGO QR

El código de barras en 2D (código QR) en la portada de este manual de instrucciones y en la tarjeta que acompaña al kit permite el acceso a la versión última del protocolo del ensayo para el uso del *MultiTarget*® ITS Ferti I KIT.

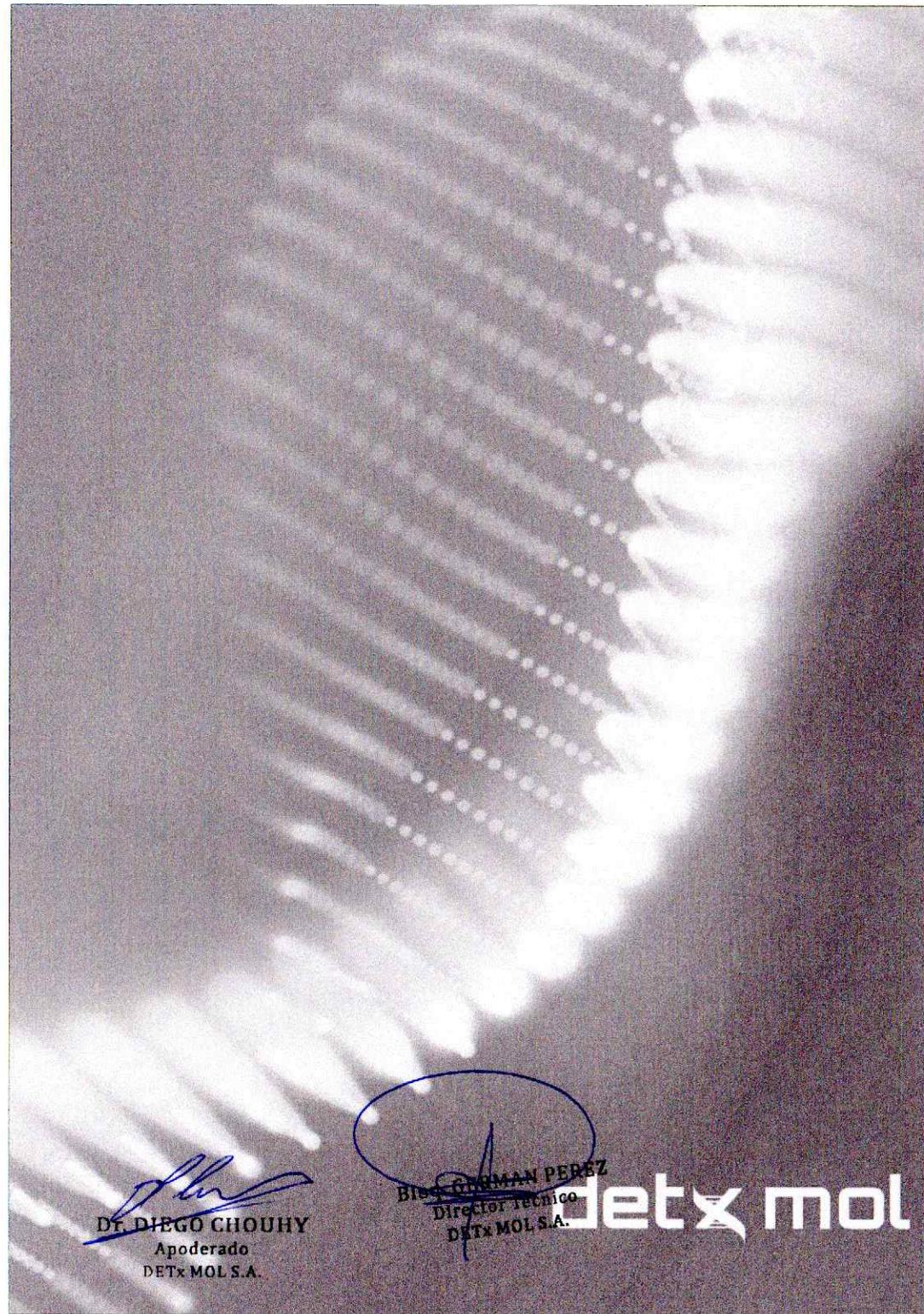
El código QR solo se puede escanear en forma impresa. Puede escanear el código directamente desde la tarjeta que acompaña al kit o imprimirlo en una hoja independiente.

Hoja en blanco



DISPOSITIVOS
MÉDICOS
IRAM - ISO 13485:2015
GESTIÓN
DE LA CALIDAD
IRAM - ISO 9001:2015

detx mol





República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA RECONSTRUCCIÓN DE LA NACIÓN ARGENTINA

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: ROTULOS E INSTRUCCIONES DE USO DETX MOL S.A.

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 20 pagina/s.