



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

DISPOSICIÓN N° 5852

BUENOS AIRES, 31 MAYO 2016

VISTO el expediente N° 1-47-6105/11-6 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma BIOSYSTEMS S.A. solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos de los Productos para diagnóstico de uso "in vitro" denominados 1) **HSV2 ELITE MGB Kit**/ prueba cuali-cuantitativa para la detección y cuantificación de ADN del virus Herpes Simplex tipo 2 (HSV2) en muestras de líquido cefalorraquídeo, sangre entera y plasma recolectado con EDTA, 2) **HSV2 ELITE Positive Control**/ Control positivo en las pruebas cualitativas de detección con HSV2 ELITE MGB Kit 3) **HSV2 ELITE Standard** /Control positivo y y ADN standard de cantidad conocida para la detección y cuantificación con HSV2 ELITE MGB Kit .

Que a fojas 311 consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que la Dirección Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

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

[Handwritten signature and initials]



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

DISPOSICIÓN N° 5852

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

Por ello;

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

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la venta a laboratorios de análisis clínicos de los productos de diagnóstico para uso in Vitro denominados 1) **HSV2 ELITE MGB Kit/** prueba cuali-cuantitativa para la detección y cuantificación de ADN del virus Herpes Simplex tipo 2 (HSV2) en muestras de líquido cefalorraquídeo, sangre entera y plasma recolectado con EDTA, 2) **HSV2 ELITE Positive Control/** Control positivo en las pruebas cualitativas de detección con HSV2 ELITE MGB Kit; 3) **HSV2 ELITE Standard /**Control positivo y y ADN standard de cantidad conocida para la detección y cuantificación con HSV2 ELITE MGB Kit el que será elaborado por ELITechGroup SpA, Corso Svizzera 185, 10149, Torino (Italia) e importado terminado por la firma BIOSYSTEMS S.A., en envases por 1) por 100 determinaciones conteniendo: HSV2 Q PCR Mix 4 x 540µl; 2) control positivo 4 x 65µl; 3) HSV2 Q-PCR Standard 10² 2 x 200µl, HSV2 Q-PCR Standard 10³ 2 x 200µl, HSV2 Q-PCR Standard 10⁴ 2 x 200µl y HSV2 Q-PCR Standard 10⁵ 2 x



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

DISPOSICIÓN N° 5852

200µl, con una vida útil VENTICUATRO (24) meses conservado a -20°C y que la composición se detalla a fojas 157.

ARTICULO 2º.- Acéptense los proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones a fojas 238 a 241, 243 a 246, 248 a 305. (Desglosándose las fojas 238 a 241, 280 a 295, 304 y 305)debiendo constar en los mismos que la fecha de vencimiento es la declarada por el elaborador impreso en los rótulos de cada partida.

ARTÍCULO 3º.- Extiéndase el Certificado correspondiente.

ARTICULO 4º.- LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MEDICA se reserva el derecho de reexaminar los métodos de control, estabilidad y elaboración cuando las circunstancias así lo determinen.

ARTÍCULO 5º.- Regístrese, gírese a la Dirección de Gestión de información Técnica a sus efectos, por Mesa de Entradas de la Dirección Nacional de Productos Médicos notifíquese al interesado y hágasele entrega de la copia autenticada de la presente Disposición junto con la copia de los proyectos de rótulos, manual de instrucciones y el certificado correspondiente. Cumplido, archívese.-

EXPEDIENTE N° 1-47-6105/11-6

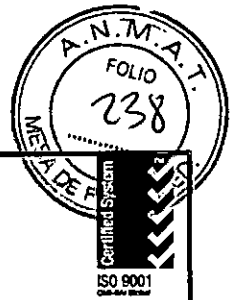
DISPOSICIÓN N°:

5852

Fd

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

58537 MAYO 2016



	<p>Av. Dorrego 673 1414 - Buenos Aires Tel.: 54-11-4854-7775 Fax: 54-11-4857-0884 e-mail: info@biosystems.com.ar</p>	
--	--	--

Rótulos Externos

(17) 170131 (10) UMMYYXX

8 0 3 3 8 9 1 4 8 3 5 8 3

<http://www.elitechgroup.com/corporate/ifu-emi>

00 800 135 79 135
 (Móvil: 0080018122057789)

For assistance with downloading
 Aide au téléchargement
 Obtenir ayuda para la descarga
 Para ajuda no download
 Kitte für Download

ELITechGroup

HSV2 ELITE MIX IFU REV. 1:

ELITechGroup

REF RTS032PLD
 HSV2 ELITE MGB® Kit

LOT UMMYYXX 2017/01

100

CONT

RTS032PLD	HSV2 Q - PCR Mix	4 x 540 µL
-----------	------------------	------------

RTS032PLO-Ex.1, Rev.01

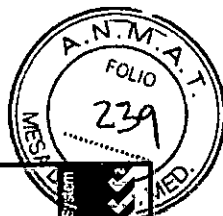
ELITechGroup S.p.A.
 Cas. 572219, 105 - 10145 Torino - ITALY
 Tel. +39 011 370131 - Fax +39 011 337611

Importado por:
BioSystems S.A
 Av. Dorrego 673 (C1414CKB)
 TEL:(54-11)4854-7775
 Directora Técnica: Silvina Zanela MN 14421
 Producto para diagnóstico de uso In Vitro
 Uso Profesional Exclusivo
 Autorizado por ANMAT
 Certificado N°:

Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

5852



	<p>Av. Dorrego 673 1414 - Buenos Aires Tel.: 54-11-4854-7775 Fax: 54-11-4857-0884 e-mail: info@biosystems.com.ar</p>	
--	--	--

Rótulos Externos

(17) 170131 (10) UMMYYXX

8 0 3 3 8 9 1 4 8 3 4 8 4

<http://www.elitechgroup.com/corporate/ru-emi>

(Tel: 54-11-0080018122057799)

00 800 135 79 135

For assistance with downloading
 Aide au téléchargement
 Otener ayuda para la descarga
 Para ajuda no download
 Hilfe für Download

ELITechGroup

HSV2 ELITe CTR IFU REV. 11

ELITechGroup

REF CTR032PLD

HSV2 - ELITe Positive Control

LOT UMMYYXX 2017/01

-20°C 12

CONT

CTR032PLD	HSV2 - Positive Control	4 x 0.5 µL
-----------	-------------------------	------------

CTR032PLD-EL.1, Rev. 01

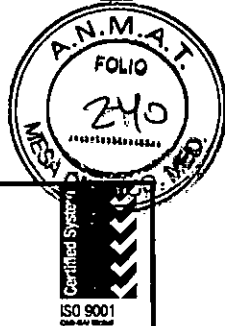
MGB
 ELITechGroup S.p.A.
 Casa Svezia, 135 - 10148 Torino - ITALY
 Tel. +39 011 9376191 - Fax +39 011 9357611

Importado por:
BioSystems S.A
 Av. Dorrego 673 (C1414CKB)
 TEL:(54-11)4854-7775
 Directora Técnica: Silvina Zanela MN
 14421
 Producto para diagnóstico de uso In Vitro
 Uso Profesional Exclusivo
 Autorizado por ANMAT
 Certificado N°:

Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

5852



BioSystems	Av. Dorrego 673 1414 - Buenos Aires Tel.: 54-11-4854-7775 Fax: 54-11-4857-0884 e-mail: info@biosystems.com.ar	
-------------------	---	--

Rótulos Externos

(17) UMMYYXX (01) 170131

8 0 3 0 3 8 9 1 4 8 3 8 8 5

<http://www.elitechgroup.com/cepo/18/ifu-std>
 (Folios: 0080018122057799)

00 800 135 79 135
 Para asistencia por el download
 Obtener ayuda para la descarga
 Aide au téléchargement
 Hilfe für Download

ELITechGroup

HSV2 ELITe STD IFU REV. 11

ELITechGroup

REF STD032PLD
HSV2 ELITe Standard

LOT UMMYYXX 2017/01
CE IVD -20°C

CONT			
STD032PLD-2	HSV2 Q - PCR Standard 10 ⁻²	2 x 200 µL	
STD032PLD-3	HSV2 Q - PCR Standard 10 ⁻³	2 x 200 µL	
STD032PLD-4	HSV2 Q - PCR Standard 10 ⁻⁴	2 x 200 µL	
STD032PLD-5	HSV2 Q - PCR Standard 10 ⁻⁵	2 x 200 µL	

STD032PLD-EL1, Rev.01

ELITechGroup S.p.A.
 C.so Saffi, 115 - 10143 Torino - ITALY
 Tel. +39 011 978191 - Fax +39 011 4367811

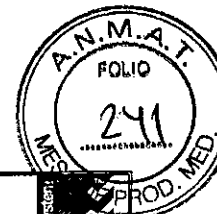
ELITe
MGB

Importado por:
BioSystems S.A
 Av. Dorrego 673 (C1414CKB)
TEL:(54-11)4854-7775
 Directora Técnica: Silvina Zanela MN 14421
 Producto para diagnóstico de uso In Vitro
 Uso Profesional Exclusivo
 Autorizado por ANMAT
 Certificado N°:

Lic. Alejandro Diez
 Apoderado
 BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
 DIRECTORA TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

5852



	<p>Av. Dorrego 673 1414 - Buenos Aires Tel.: 54-11-4854-7775 Fax: 54-11-4857-0884 e-mail: info@biosystems.com.ar</p>	
--	--	--

Rótulos Internos

<p>REF STD032PLD-2 HSV2 Q - PCR Standard 10^{^2} LOT UMMYYXX 2017/03 ELITechGroup S.p.A. C.so Svizzera 185, 10148 Torino, ITALY</p>	<p>REF STD032PLD-3 HSV2 Q - PCR Standard 10^{^3} LOT UMMYYXX 2017/03 ELITechGroup S.p.A. C.so Svizzera 185, 10148 Torino, ITALY</p>
---	---

<p>REF STD032PLD-4 HSV2 Q - PCR Standard 10^{^4} LOT UMMYYXX 2017/03 ELITechGroup S.p.A. C.so Svizzera 185, 10148 Torino, ITALY</p>	<p>REF STD032PLD-5 HSV2 Q - PCR Standard 10^{^5} LOT UMMYYXX 2017/03 ELITechGroup S.p.A. C.so Svizzera 185, 10148 Torino, ITALY</p>
---	---

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

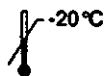
Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TECNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez
 Propiedad
 Biosystems S.A.



HSV2 ELITE MGB® Kit
 reactivo por Amplificación Real Time del ADN

REF RTS032PLD



INDICE

USO PREVISTO	pág. 1
PRINCIPIO DE LA PRUEBA	pág. 2
PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO	pág. 3
MATERIAL PROVISTO EN EL PRODUCTO	pág. 3
MATERIAL REQUERIDO NO PROVISTO EN EL PRODUCTO	pág. 3
OTROS PRODUCTOS REQUERIDOS	pág. 4
MUESTRAS Y CONTROLES	pág. 4
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	pág. 7
PROCEDIMIENTO	pág. 8
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	pág. 17
EVALUACION DE DESEMPEÑO	pág. 18
BIBLIOGRAFÍA	pág. 23
PROBLEMAS Y SOLUCIONES	pág. 24
SIGNIFICADO DE LOS SÍMBOLOS	pág. 25
AVISO AL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA	pág. 26
HOJA DE TRABAJO	pág. 27

USO PREVISTO

El producto «HSV2 ELITE MGB® Kit» forma parte de una prueba cualitativa y cuantitativa de amplificación de los ácidos nucleicos para la detección y cuantificación del ADN del virus humano Herpes Simplex de tipo 2 (HSV2) en muestras de ADN recolectado de líquido cefalorraquídeo, sangre entera recolectada en EDTA, plasma recolectado en EDTA.

El producto se utiliza para el diagnóstico y el monitoreo de la infección por HSV2, junto con los datos clínicos del paciente y con los resultados de otros exámenes de laboratorio.

*ELITE MGB® y el logotipo "ELITE MGB" están registrados como marcas comerciales en la Unión Europea.

HSV2 ELITE MGB® Kit
 reactivo por Amplificación Real Time del ADN

REF RTS032PLD

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba prevé la realización de una reacción de amplificación real time en microplaca con un termostato programable con sistema óptico de detección de la fluorescencia (thermal cycler para amplificación real time).

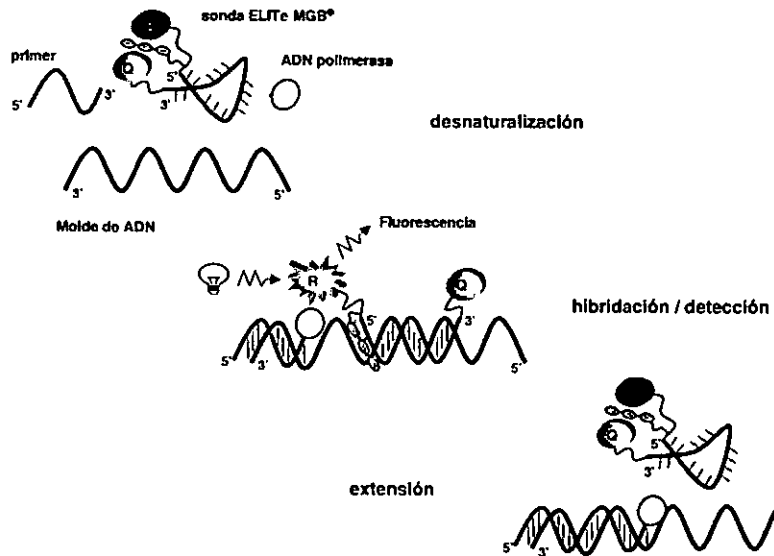
En cada pocillo se efectúan dos reacciones de amplificación: una específica para la región del gen que codifica la glucoproteína G (gpG) de HSV2 y otra específica para la región del gen humano que codifica la beta Globina (Control Interno de inhibición) utilizando el ADN recolectado de las muestras en examen. La sonda con tecnología ELITE MGB® específica para HSV2, marcada con el fluoróforo FAM, se activa cuando hibrida con el producto específico de la reacción de amplificación para HSV2.

La sonda con tecnología ELITE MGB® específica para el Control Interno, marcada con el fluoróforo AP525 (equivalente a VIC), se activa cuando hibrida con el producto de la reacción de amplificación para el Control Interno. La emisión de la fluorescencia aumenta al aumentar de los productos específicos de la reacción de amplificación y es medida y registrada por el aparato. La elaboración de los datos permite determinar la presencia y el título del ADN de HSV2 en la muestra de partida.

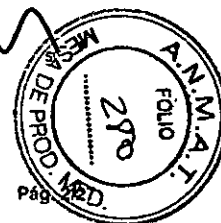
Cuando finaliza una sesión, se puede analizar la curva de disociación (melting curve) y determinar la temperatura de disociación (melting temperature) para confirmar la presencia del target correcto o identificar la presencia de mutaciones.

La evaluación de la prueba ha sido realizada con equipos 7300 Real Time PCR System y 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.

En la figura presentada a continuación se resume el mecanismo de activación y emisión de la fluorescencia de la sonda con tecnología ELITE MGB®. Notar de qué manera la sonda no se hidroliza durante el ciclo de amplificación y, por lo tanto, se puede utilizar para el análisis de la curva de disociación.



5852



DR. SILVANA ZANELLA
 DIRECCIÓN TÉCNICA
 MN 14.421
 BIOSYSTEMS S.A.

HSV2 ELITE MGB® Kit
reactivo por Amplificación Real Time del ADN

REF RTS032PLD

PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO

El producto «**HSV2 ELITE MGB® Kit**» provee la mezcla de reacción completa y lista para su uso «**HSV2 Q - PCR Mix**» para la amplificación real time en una solución estabilizadora, previamente dosificada en cuatro tubos. Cada tubo contiene 540 µL de solución, suficiente para 25 test.

Los oligonucleótidos primers y la sonda para HSV2, (estabilizada por el grupo MGB®, marcada con el fluoróforo FAM y con inactividad determinada por un quencher no fluorescente), son específicos para una región del gen que codifica la **gpG** de HSV2 (región US4).

Los oligonucleótidos primers y la sonda para el Control Interno, (estabilizada por el grupo MGB®, marcada con el fluoróforo AP525, equivalente a VIC, y con inactividad determinada por un quencher no fluorescente), son específicos para la región **promotora** y 5' UTR del gen humano que codifica la **beta Globina**.

La mezcla de reacción suministra el tampón, el cloruro de magnesio, los nucleótidos trifosfatos y el fluoróforo AP593, usado en lugar del ROX o del Cy5 como referencia pasiva para la normalización de la fluorescencia, la enzima Uracil-N-glicosidasa (UNG) para la inactivación de las contaminaciones por productos de amplificación y la enzima ADN polimerasa Platinum Tfi exo- de activación térmica (hot start).

El producto permite efectuar 100 determinaciones, estándar y controles incluidos.

MATERIAL PROVISTO EN EL PRODUCTO

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación de los peligros
HSV2 Q - PCR Mix	mezcla completa de reacción	4 x 540 µL	

MATERIAL REQUERIDO NO PROVISTO EN EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.
- Guantes sin polvo descartables de látex o similares.
- Mezclador vortex.
- Microcentrifuga de mesa (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas y tips estériles con filtro para aerosol o de dispensación positiva (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Agua bidestillada estéril.
- Termostato programable con sistema óptico de detección de la fluorescencia 7300 Real Time PCR System o 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument calibrado según las indicaciones del fabricante.

OTROS PRODUCTOS REQUERIDOS

Los reactivos para la extracción del ADN de las muestras a analizar, el control positivo de extracción, las microplacas para la amplificación, el control positivo de amplificación y los ADN estándar de cantidad conocida, no están incluidos en este producto.

Para la extracción manual del ADN de las muestras a analizar, se aconseja utilizar los productos genéricos «**EXTRAblood**» (ELITechGroup S.p.A., código EXTB01), kit de extracción del ADN de muestras celulares o «**EXTRAgen**» (ELITechGroup S.p.A., código EXTG01), kit de extracción de los ácidos nucleicos de muestras no celulares.

Para la extracción automática del ADN de las muestras a analizar, se aconseja utilizar el producto genérico «**ELITE STAR 200 Extraction Kit**» (ELITechGroup S.p.A., código INT011EX), kit de extracción de los ácidos nucleicos de muestras biológicas, con el instrumento «**ELITE STAR**» (ELITechGroup S.p.A., código INT010).

«**ELITE STAR 200 Extraction Kit**» y «**ELITE STAR**» constituyen **ELITE STAR System**.

HSV2 ELITE MGB® Kit
reactivo por Amplificación Real Time del ADN

REF RTS032PLD

Para la extracción automática del ADN de las muestras a analizar, se aconseja utilizar el producto genérico «**ELITE GALAXY 300 Extraction Kit**» (ELITechGroup S.p.A., código INT021EX), kit de extracción de los ácidos nucleicos de muestras biológicas, con el instrumento «**ELITE GALAXY**» (ELITechGroup S.p.A., código INT020).

«**ELITE GALAXY 300 Extraction Kit**» y «**ELITE GALAXY**» constituyen **ELITE GALAXY System**.

Para la configuración automática de la PCR con las muestras recolectadas, se recomienda el uso de productos **ELITE MGB® Kits** (ELITechGroup S.P.A.), con el instrumento «**ELITE GALAXY**».

Para la extracción automática del ADN de las muestras a analizar, se aconseja utilizar los productos genéricos «**NucliSENS® easyMAG® Reagents**» (bioMérieux SA, códigos 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), kit de extracción de los ácidos nucleicos de muestras biológicas, con el equipo «**NucliSENS® easyMAG®**» (bioMérieux SA, código 200111).

Para la extracción automática del ADN de las muestras a analizar, se recomienda también el empleo del producto «**QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit**» (QIAGEN GmbH, código 937055), kit de extracción de los ácidos nucleicos de muestras biológicas, con el equipo «**QIASymphony® SP/AS**» (códigos 9001297, 9001301) y los relativos productos genéricos.

Como control positivo de extracción y control de inhibición se requiere el empleo de producto genérico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., código CTRCPE), una solución estabilizada que contiene dos plásmido de ADN y ARN genómico del fago MS2.

Si estuviera previsto el uso de un equipo 7300 Real-Time PCR System, se aconseja utilizar el producto genérico «**Q - PCR Microplates**» (ELITechGroup S.p.A., código RTSACC01) microplacas con pocillos de 0,2 mL y láminas adhesivas para la amplificación real time.

Si estuviera previsto el uso de un equipo 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, se aconseja utilizar el producto genérico «**Q - PCR Microplates Fast**» (ELITechGroup S.p.A., código RTSACC02) microplacas con pocillos de 0,1 mL y láminas adhesivas para la amplificación real time.

Si se requiere la detección del ADN de HSV2 (análisis cualitativo), se aconseja usar el producto «**HSV2 - ELITE Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., código CTR032PLD), control positivo de ADN plasmídico.

Si se requiere la detección y cuantificación del ADN de HSV2 (análisis cuantitativo) se aconseja usar el producto «**HSV2 ELITE Standard**» (ELITechGroup S.p.A., código STD032PLD), cuatro diluciones de ADN plasmídico en cantidad conocida para obtener la curva estándar.

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

Este producto debe ser utilizado con **ADN recolectado** de las siguientes muestras clínicas: líquido cefalorraquídeo, sangre entera recolectada en EDTA, plasma recolectado en EDTA.

Líquido cefalorraquídeo

Las muestras de líquido cefalorraquídeo destinadas a la extracción de los ácidos nucleicos deben ser recolectadas según las indicaciones del laboratorio evitando la contaminación con la sangre del paciente, transportadas a +2° / +8 C° y conservadas a +2° / +8 C° por un máximo de cuatro horas, de lo contrario deben congelarse y conservarse a -20 C° por un máximo de treinta días o bien a -70 C° por tiempos más prolongados.

Se aconseja dividir en diferentes alícuotas las muestras para conservarlas congeladas y no someterlas a repetidos ciclos de congelación / descongelación.

Nota: cuando se extrae el ADN con el sistema «**EXTRAgen**» seguir las indicaciones del Manual de instrucciones de uso: partir con 300 µL de muestra, agregar 5 µL de CPE para el control interno al iniciar la extracción, resuspender los ácidos nucleótidos en 60 µL de agua ultrapura.

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
Biosystems S.A.

Dra. SILVIA ZANIELA
DIRECTORA TÉCNICA
Biosystems S.A.



5852

Lic. Alejandro Diez
Médico
Biosystems S.A.

Nota: cuando se realiza la extracción de ADN de muestras de líquido cefalorraquídeo (líquido) usando el ELITE STAR System, con versión de software 3.4.13 (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción "UUNI_E100S200_EL1", que emplea 200 µL de muestra y eluye el ARN recolectado en 100 µL (la elución se realiza en 115 µL efectivos, de los cuales se recuperan 100 µL). Las muestras en los tubos primarias pueden cargarse directamente en el «ELITE STAR». Es necesario siempre un volumen mínimo de 400-600 µL para cada muestra según la clase de tubo utilizado. Agregar 200 µL de CPE en los tubos de Proteinase-Carrier, como se indica en el manual del kit de extracción. Para conocer detalles sobre el procedimiento de extracción, seguir atentamente las indicaciones del Manual de instrucciones de uso del kit.

Nota: cuando se realiza la extracción de ADN de muestras de líquido cefalorraquídeo usando el ELITE GALAXY System, con versión de software 1.3.1 (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción xNA Extraction (Universal), que emplea 300 µL de muestra y eluye el producto de la extracción en 200 µL (la elución se realiza en 210 µL efectivos, de los cuales se recuperan 200 µL). Las muestras en los tubos primarias pueden cargarse directamente en «ELITE GALAXY». Es necesario siempre para cada muestra un volumen mínimo de 400-650 µL según la clase de tubo utilizado. Agregar 10 µL / muestra de CPE (al CPE debe agregarse el IC + Carrier solution, como se indica en el manual del kit de extracción). Para conocer detalles sobre el procedimiento de extracción, seguir atentamente las indicaciones del Manual de instrucciones de uso del kit.

Nota: cuando se extrae el ADN de líquido cefalorraquídeo con el equipo «NucliSENS® easyMAG®», utilizar el protocolo de extracción Generic 2.0.1 y respetar estas indicaciones: distribuir 500 µL de muestra en la Strip de 8 pocillos y comenzar con la extracción. Después de 10 minutos de incubación, agregar 5 µL de CPE a cada muestra para el control interno, antes de agregar NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica y continuar con la extracción. Recuperar el ADN con 100 µL de tampón de elución.

Sangre entera recolectada en EDTA

Las muestras de sangre entera destinadas a la extracción de los ácidos nucleicos deben ser recolectadas en EDTA según las indicaciones del laboratorio, transportadas a +2° / +8 °C y conservadas a +2° / +8 °C por un máximo de tres días, de lo contrario deben ser congeladas y conservadas a -20 °C por un máximo de treinta días o bien a -70 °C por tiempos más prolongados.

Se aconseja subdividir en varias alícuotas las muestras que se deben conservar congeladas, para no someterlas a repetidos ciclos de congelación / descongelación.

Nota: cuando se realiza la extracción de ADN de muestras de sangre entera usando el ELITE STAR System, con versión de software 3.4.13 (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción "UUNI_E100S200_EL1", que emplea 200 µL de muestra y eluye el ARN recolectado en 100 µL (la elución se realiza en 115 µL efectivos, de los cuales se recuperan 100 µL). Las muestras en los tubos primarias pueden cargarse directamente en el «ELITE STAR». Es necesario siempre un volumen mínimo de 400-600 µL para cada muestra según la clase de tubo utilizado. Agregar 200 µL de CPE en los tubos de Proteinase-Carrier, como se indica en el manual del kit de extracción. Para conocer detalles sobre el procedimiento de extracción, seguir atentamente las indicaciones del Manual de instrucciones de uso del kit.

Nota: cuando se realiza la extracción de ADN de muestras de sangre entera usando el ELITE GALAXY System, con versión de software 1.3.1 (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción xNA Extraction (Universal), que emplea 300 µL de muestra y eluye el producto de la extracción en 200 µL (la elución se realiza en 210 µL efectivos, de los cuales se recuperan 200 µL). Las muestras en los tubos primarias pueden cargarse directamente en «ELITE GALAXY». Es necesario siempre para cada muestra un volumen mínimo de 400-650 µL según la clase de tubo utilizado. Agregar 10 µL / muestra de CPE (al CPE debe agregarse el IC + Carrier solution, como se indica en el manual del kit de extracción). Para conocer detalles sobre el procedimiento de extracción, seguir atentamente las indicaciones del Manual de instrucciones de uso del kit.

Nota: cuando se realiza la extracción del ADN de sangre entera con el kit «EXTRAblood» se deben respetar las indicaciones del Manual de instrucciones de uso: partir de una muestra de 200 µL (2 millones de células como máximo), recuperar el ADN con 100 µL de tampón de elución.

Dra. Silvana Zanella
Directora Técnica
Biosystems S.A.

Plasma recolectado en EDTA

Las muestras de sangre destinadas a la extracción de los ácidos nucleicos deben ser recolectadas en EDTA según las indicaciones del laboratorio, transportadas a +2° / +8 °C y conservadas a +2° / +8 °C por un máximo de tres días, de lo contrario deben ser congeladas y conservadas a -20 °C por un máximo de treinta días o bien a -70 °C por tiempos más prolongados.

Se aconseja subdividir en varias alícuotas las muestras que se deben conservar congeladas, para no someterlas a repetidos ciclos de congelación / descongelación.

Nota: cuando se realiza la extracción de ARN de muestras de plasma usando el ELITE STAR System, con versión de software 3.4.13 (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción "UUNI_E100S200_EL1", que emplea 200 µL de muestra y eluye el ARN recolectado en 100 µL (la elución se realiza en 115 µL efectivos, de los cuales se recuperan 100 µL). Las muestras en los tubos primarias pueden cargarse directamente en el «ELITE STAR». Es necesario siempre un volumen mínimo de 400-600 µL para cada muestra según la clase de tubo utilizado. Agregar 200 µL de CPE en los tubos de Proteinase-Carrier, como se indica en el manual del kit de extracción. Para conocer detalles sobre el procedimiento de extracción, seguir atentamente las indicaciones del Manual de instrucciones de uso del kit.

Nota: cuando se realiza la extracción de ADN de muestras de plasma usando el ELITE GALAXY System, con versión de software 1.3.1 (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción xNA Extraction (Universal), que emplea 300 µL de muestra y eluye el producto de la extracción en 200 µL (la elución se realiza en 210 µL efectivos, de los cuales se recuperan 200 µL). Las muestras en los tubos primarias pueden cargarse directamente en «ELITE GALAXY». Es necesario siempre para cada muestra un volumen mínimo de 400-650 µL según la clase de tubo utilizado. Agregar 10 µL / muestra de CPE (al CPE debe agregarse el IC + Carrier solution, como se indica en el manual del kit de extracción). Para conocer detalles sobre el procedimiento de extracción, seguir atentamente las indicaciones del Manual de instrucciones de uso del kit.

Nota: cuando se extrae el ADN de plasma con el equipo «NucliSENS® easyMAG®», utilizar el protocolo de extracción Generic 2.0.1 y respetar estas indicaciones: distribuir 500 µL de muestra en la Strip de 8 pocillos y comenzar con la extracción. Después de 10 minutos de incubación, agregar 5 µL de CPE a cada muestra para el control interno, antes de agregar NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica y continuar con la extracción. Recuperar el ADN con 100 µL de tampón de elución.

Nota: cuando se realiza la extracción del ADN de muestras de plasma con el equipo «QIASymphony® SP/AS» el kit «QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midl kit», con versión de software 3.5, utilizar el protocolo de extracción "Virus Cell free 500_V3_DSP_default IC" y seguir estas indicaciones: el equipo tiene la capacidad de utilizar directamente el tubo primario, el volumen de muestra retirado para la extracción es 500 µL, siempre se requiere un volumen muerto mínimo de 100 µL. Preparar la solución que contiene el buffer AVE y el carrier ARN según las instrucciones del Manual de instrucciones de uso del kit de extracción. Agregar a la solución 6 µL de CPE para cada muestra requerida. Cargar en el equipo, en la posición prevista para los tubos "control interno" los tubos que contienen la solución, como se indica en el Manual de instrucciones de uso del kit; indicar la posición en la cual se distribuirán los eluatos y especificar el volumen de elución a 85 µL (la elución se produce en 115 µL efectivos de los cuales 85 µL son recuperados). Para conocer detalles sobre el procedimiento de extracción, seguir atentamente las indicaciones del Manual de instrucciones de uso del kit.

Sustancias interferentes

El ADN recolectado de la muestra de partida no debe contener heparina, hemoglobina, dextrano, Ficoll®, etanol o 2-propanol para evitar fenómenos de inhibición y la aparición de frecuentes resultados no válidos.

Cantidades elevadas de ADN genómico humano en el ADN recolectado de la muestra pueden inhibir la reacción de amplificación.

No son disponibles datos referidos a eventuales fenómenos de inhibición por parte de fármacos antibióticos, antivirales, quimioterápicos o inmunosupresores.

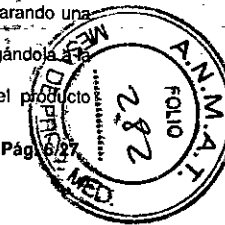
Controles de amplificación

Es absolutamente necesario convalidar cada una de las sesiones de amplificación preparando una reacción de control negativo y una reacción de control positivo.

Para el control negativo utilizar agua bidestilada estéril (no provista en el producto) agregándola a la reacción en lugar del ADN recolectado de la muestra.

Para el control positivo utilizar el producto «HSV2 - ELITE Positive Control» o el producto «HSV2 ELITE Standard».

5852



Controles de calidad

Se aconseja confirmar todo el procedimiento de análisis de cada una de las sesiones, extracción y amplificación, utilizando una muestra negativa y una muestra positiva ya testadas o del material de referencia calibrado.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto es para uso exclusivo *in vitro*.

Advertencias y precauciones generales

Manipular y eliminar todas las muestras biológicas como si pudiesen transmitir agentes infecciosos. Evitar el contacto directo con las muestras biológicas. No producir salpicaduras ni aerosol. El material que está en contacto con las muestras biológicas debe ser tratado con hipoclorito de sodio al 3 % por al menos 30 minutos o bien, tratado en autoclave a 121°C durante una hora antes de ser eliminado.

Manipular y eliminar todos los reactivos y todos los materiales utilizados para realizar la prueba como si fuesen potencialmente infecciosos. Evitar el contacto directo con los reactivos. No producir salpicaduras ni aerosol. Los residuos deben ser tratados y eliminados según normas de seguridad adecuadas. El material combustible monouso debe ser incinerado. Los residuos líquidos que contienen ácidos o bases deben ser neutralizados antes de la eliminación.

Usar indumentaria de protección y guantes adecuados, protegerse los ojos / la cara. No pipetear con la boca ninguna solución.

No comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos en el área de trabajo.

Lavarse bien las manos después del manejo de muestras y reactivos.

Eliminar los reactivos sobrantes y los residuos según las normas vigentes.

Leer atentamente todas las instrucciones provistas en el producto antes de realizar la prueba.

Respetar las Instrucciones provistas en el producto durante la ejecución de la prueba.

Respetar la fecha de caducidad del producto.

Utilizar sólo los reactivos presentes en el producto y los aconsejados por el fabricante.

No usar reactivos que provengan de lotes diferentes.

No utilizar reactivos de otros fabricantes.

Advertencias y precauciones en los procedimientos de biología molecular

Los procedimientos de biología molecular, como la extracción, la amplificación y la detección de ácidos nucleicos, requieren personal competente e instruido para evitar el riesgo de resultados incorrectos, en particular a causa de la degradación de los ácidos nucleicos de las muestras o de la contaminación de las mismas por parte de productos de amplificación.

Es necesario disponer de áreas separadas para la extracción / preparación de las reacciones de amplificación o para la amplificación / detección de los productos de amplificación. Nunca introducir un producto de amplificación en el área de extracción / preparación de las reacciones de amplificación.

Es necesario disponer de batas, guantes e instrumentos destinados para la extracción / preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación / detección de productos de amplificación. Nunca transferir batas, guantes e instrumentos del área de amplificación / detección de productos de amplificación al área de extracción / preparación de las reacciones de amplificación.

Las muestras deben ser destinadas exclusivamente a este tipo de análisis. Las muestras deben ser manipuladas bajo una campana de flujo laminar. Los tubos que contengan muestras diferentes nunca deben ser abiertas al mismo tiempo. Las pipetas utilizadas para manipular las muestras deben ser destinadas sólo a este uso. Las pipetas deben ser del tipo de dispensación positiva o usar tips con filtro para aerosol. Los tips utilizados deben ser estériles, sin la presencia de ADNasa y ARNasa, sin la presencia de ADN y ARN.

Los reactivos deben ser manipulados bajo campana de flujo laminar. Los reactivos necesarios para la amplificación deben ser preparados de manera tal que sean utilizados en una sola sesión. Las pipetas utilizadas para manipular los reactivos deben ser destinadas sólo a este uso. Las pipetas deben ser del tipo de dispensación positiva o usar tips con filtro para aerosoles. Los tips utilizados deben ser estériles, sin la presencia de ADNasa y ARNasa, sin la presencia de ADN y ARN.

Los productos de amplificación deben ser manipulados en modo de limitar al máximo su dispersión en el ambiente para evitar contaminaciones. Las pipetas utilizadas para manipular los productos de amplificación deben ser destinadas sólo a este uso.

Advertencias y precauciones específicas para los componentes

La HSV2 Q - PCR Mix debe ser conservada en lugar oscuro a -20°C.

La HSV2 Q - PCR Mix puede ser congelado y descongelado por un máximo de tres veces. Otros ciclos de congelación / descongelación pueden provocar una pérdida de las prestaciones del producto.

La HSV2 Q - PCR Mix no presenta frases de riesgo (R) y presenta los siguientes consejos de prudencia (S):

S 23-24/25. No respirar los gases/humos/vapores/aerosoles. Evitar el contacto con los ojos y la piel.

PROCEDIMIENTO

Programación de la sesión de amplificación real time

(A realizarse en el área de amplificación / visualización de los productos de amplificación)

Si se utiliza un equipo 7300 Real-Time PCR System:

- Antes de iniciar la sesión, tomando como referencia la documentación del equipo, es necesario:
 - encender el thermal cycler para real time, encender el computador de control, iniciar el software destinado y abrir una sesión "absolute quantification";
 - programar (Detector Manager) el "detector" para la sonda para HSV2 con el "reporter" = "FAM" y el "quencher" = "none" (no fluorescente) y denominarlo "HSV2";
 - programar (Detector Manager) el "detector" para la sonda de control interno con el "reporter" = "VIC" (AP525 equivalente al VIC) y el "quencher" = "none" (no fluorescente) y denominarlo "CI";
 - para cada pocillo en uso de la microplaca, programar (Well Inspector) los "detector" (tipo de fluorescencia a medir), el "passive reference" = "ROX" (se usa AP593 en lugar del ROX, normalización de la fluorescencia medida) y el tipo de reacción (muestra, control negativo de amplificación, control positivo de amplificación o estándar con la correspondiente cantidad conocida). Completar el Plan de trabajo adjunto al final de este manual de instrucciones de uso transcribiendo estas informaciones o bien imprimir la organización de la microplaca. El Plan de trabajo deberá seguirse con atención durante la transferencia de la mezcla de reacción y de las muestras a los pocillos.

Nota: para la determinación del título del ADN en la muestra de partida es necesario preparar una serie de reacciones con los Q - PCR Standard (10⁵ copias, 10⁴ copias, 10³ copias, 10² copias) para obtener la Curva estándar.

Se ilustra a continuación, a modo de ejemplo, cómo puede organizarse el análisis cuantitativo de 12 muestras.

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
CN	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵							

Leyenda: C1 - C12: Muestras a analizar; CN: Control negativo de amplificación; 10²: Estándar 10² copias; 10³: Estándar 10³ copias; 10⁴: Estándar 10⁴ copias; 10⁵: Estándar 10⁵ copias

Con referencia a la documentación del instrumento, programar en el software específico (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile), los parámetros del ciclo térmico: - agregar, en la fase de amplificación (Add Step), el paso de extensión a 72°C;

Lic. Alejandra Díez
Biosystems S.A.

Dra. SILVANA ZANELLA
DIRECTORA TÉCNICA
BIOSYSTEMS S.A.

5852



HSV2 ELiTe MGB® Kit
reactivo por Amplificación Real Time del ADN

REF RTS032PLD

Nota: la adquisición de la fluorescencia (Instruments > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) debe permanecer programada en el paso de hibridación a 60°C.

- modificar los tiempos, como se indica en la siguiente tabla "Ciclo térmico";
- programar un número de 45 ciclos;
- programar el valor de volumen para la simulación software de la transferencia térmica en la reacción ("Sample volume") a 30 µL;
- opcional: agregar la fase de disociación (Add Dissociation Stage) y programar la temperatura en un rango de 40°C a 80°C.

Ciclo térmico		
Fase	Temperaturas	Tiempos
Descontaminación	50C°	2 min.
Desnaturalización inicial	94C°	2 min.
Amplificación y detección (45 ciclos)	94C°	10 seg.
	60C° (adquisición de la fluorescencia)	30 seg.
	72C°	20 seg.
Disociación(opcional)	95C°	15 seg.
	40C°	30 seg.
	80C°	15 seg.

Si se utiliza un equipo 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument:

Antes de iniciar la sesión, tomando como referencia la documentación del equipo, es necesario:

- encender el thermal cycler para real time, encender el computador de control, iniciar el software destinado y abrir una sesión "absolute quantification" y programar "Run mode: Fast 7500";
- programar (Detector Manager) el "detector" para la sonda para HSV2 con el "reporter" = "FAM" y el "quencher" = "none" (no fluorescente) y denominarlo "HSV2";
- programar (Detector Manager) el "detector" para la sonda de control interno con el "reporter" = "VIC" (AP525 equivalente al VIC) y el "quencher" = "none" (no fluorescente) y denominarlo "CI";
- para cada pocillo en uso de la microplaca, programar (Well Inspector) los "detector" (tipo de fluorescencia a medir), el "passive reference" = "Cy5" (se usa AP593 en lugar del Cy5, normalización de la fluorescencia medida) normalización de la fluorescencia medida) y el tipo de reacción (muestra, control negativo de amplificación, control positivo de amplificación o estándar con la correspondiente cantidad conocida). Completar el Plan de trabajo adjunto al final de este manual de instrucciones de uso transcribiendo estas informaciones o bien imprimir la organización de la microplaca. El Plan de trabajo deberá seguirse con atención durante la transferencia de la mezcla de reacción y de las muestras a los pocillos.

Nota: para la determinación del título del ADN en la muestra de partida es necesario preparar una serie de reacciones con los Q - PCR Standard (10⁵ copias, 10⁴ copias, 10³ copias, 10² copias) para obtener la Curva estándar.

En la sección anterior, relativa al procedimiento para el equipo 7300 Real Time PCR System, se describe un ejemplo de la modalidad de organización de un análisis cuantitativo de algunas muestras.

Con referencia a la documentación del instrumento, programar en el software específico (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile), los parámetros del ciclo térmico:

- agregar, en la fase de amplificación, el paso (Add Step) de extensión a 72°C;

Nota: la adquisición de la fluorescencia (Instruments > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) debe permanecer programada en el paso de hibridación a 60°C.

HSV2 ELiTe MGB® Kit
reactivo por Amplificación Real Time del ADN

REF RTS032PLD

- modificar los tiempos, como se indica en la siguiente tabla "Ciclo térmico";
- programar un número de 45 ciclos;
- programar el valor de volumen para la simulación software de la transferencia térmica en la reacción ("Sample volume") a 30 µL;
- opcional: agregar la fase de disociación (Add Dissociation Stage) y programar la temperatura en un rango de 40°C a 80°C.

Ciclo térmico		
Fase	Temperaturas	Tiempos
Descontaminación	50C°	2 min.
Desnaturalización inicial	94C°	2 min.
Amplificación y detección (45 ciclos)	94C°	10 seg.
	60C° (adquisición de la fluorescencia)	30 seg.
	72C°	20 seg.
Disociación(opcional)	95C°	15 seg.
	40C°	1 min.
	80C°	15 seg.
	60C°	15 seg.

Preparación de la amplificación

(A realizarse en el área de extracción / preparación de la reacción de amplificación)

Antes de iniciar la sesión es necesario:

- extraer y descongelar los tubos con las muestras a analizar. Agitar delicadamente los tubos, centrifugarlos durante 5 segundos para obtener en el fondo el contenido y mantenerlos en hielo;
- extraer y descongelar los tubos HSV2 Q - PCR Mix necesarias para la sesión teniendo presente que el contenido de cada una es suficiente para preparar 25 reacciones. Agitar delicadamente los tubos, centrifugarlos durante 5 segundos para obtener en el fondo el contenido y mantenerlos en hielo;
- extraer y descongelar el tubo de HSV2 - Positive Control o bien los tubos de HSV2 Q - PCR Standard. Agitar delicadamente los tubos, centrifugarlos durante 5 segundos para obtener en el fondo el contenido y mantenerlos en hielo;
- extraer la Amplification microplate que será utilizada en la sesión, prestando atención de manejarla con guantes sin polvo y de no dañar los pocillos.

1. Transferir, depositándolos cuidadosamente en el fondo sin crear burbujas, 20 µL de mezcla de reacción HSV2 Q - PCR MIX en los pocillos de la Amplification microplate como fue establecido previamente en el Plan de trabajo.

Nota: Si no se utiliza toda la mezcla de reacción, conservar el volumen restante en lugar oscuro a -20°C por un máximo de un mes. Congelar y descongelar la mezcla de reacción por un máximo de 3 VECES.

2. Transferir, depositándolos cuidadosamente en la mezcla de reacción, 20 µL de ADN recolectado de la primera muestra en el correspondiente pocillo de la Amplification microplate como fue establecido previamente en el Plan de trabajo. Mezclar bien la muestra pipeteando tres veces el volumen de 20 µL en la mezcla de reacción. Prestar atención a no crear burbujas. Proceder del mismo modo con todos los otros ADN recolectados.

3. Transferir, depositándolos cuidadosamente en la mezcla de reacción, 20 µL de Agua bidestilada estéril (no provista en el producto) en el pocillo de la Amplification microplate de control negativo de amplificación como fue establecido previamente en el Plan de trabajo. Mezclar bien el control negativo pipeteando tres veces el agua bidestilada estéril en la mezcla de reacción. Prestar atención a no crear burbujas.

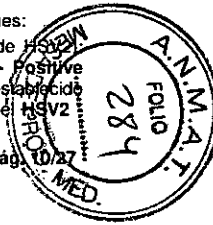
4. En base al tipo de resultado requerido (cualitativo o cuantitativo), seguir una de las dos opciones:

- En caso de que se requiera un resultado **cualitativo** del análisis (detección del ADN de HSV2) Transferir, depositándolos cuidadosamente en la mezcla de reacción, 20 µL de HSV2 - Positive Control en el pocillo correspondiente de la Amplification microplate como fue establecido previamente en el Plan de trabajo. Mezclar bien el control positivo pipeteando tres veces el HSV2 Positive Control en la mezcla de reacción. Prestar atención a no crear burbujas.

Lic. Alejandro Díez
Fotodiseño
Biosystems S.A.

Dra. Silvana Zanella
DIRECCIÓN TÉCNICA
TEL. 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

5852

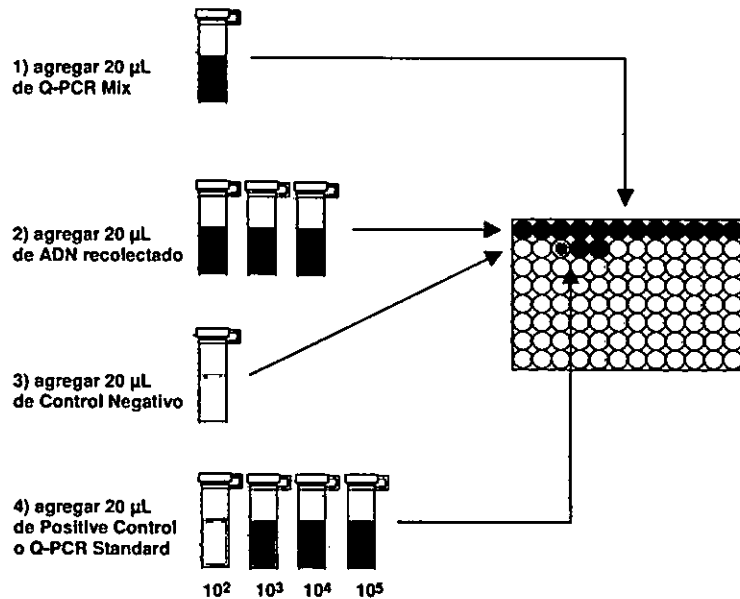


- En caso de que se requiera un resultado cuantitativo del análisis (cuantificación del ADN de HSV2): Transferir, depositándolos cuidadosamente en la mezcla de reacción, 20 µL de HSV2 - PCR Standard 10² en el pocillo correspondiente de la Amplification microplate como fue establecido previamente en el Plan de trabajo. Mezclar bien el estándar pipeteando tres veces el HSV2 Q - PCR Standard 10² en la mezcla de reacción. Prestar atención a no crear burbujas. Proceder de igual manera con los HSV2 Q - PCR Standard 10³, 10⁴, 10⁵.

- Sellar cuidadosamente la Amplification microplate con la Amplification Sealing Sheet.
- Transferir la Amplification microplate en el thermal cycler para real time ubicado en el área de "amplificación / detección" de los productos de amplificación e iniciar el ciclo térmico de amplificación, guardando la programación de la sesión con una identificación unívoca y reconocible (por ej. "año-mes-día-HSV2-EGSpA").

Nota: Al finalizar el ciclo térmico, se debe quitar la Amplification microplate con los productos de reacción del equipo y se debe eliminar para no generar contaminaciones ambientales. Nunca levantar la Amplification Sealing Sheet de la Amplification microplate para evitar que se derramen los productos de reacción.

En la siguiente figura se ilustra de manera sintética el procedimiento para la preparación de las reacciones de amplificación.



Nota: Si la preparación de la amplificación se realiza mediante el equipo «QIASymphony® SP/AS», introducir la microplaca con los extractos, los reactivos y la microplaca de amplificación en los alojamientos específicos, usando los adaptadores, luego respetar lo previsto en el manual de uso del preparador automático y los pasos requeridos por el software.

Licenciario: Diego Alejandro Diez Parodi
Biosystems S.A.

Dra. SHYNNAZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
M. T. A. 421
BIOSYSTEMS S.A.

Análisis cualitativo de los resultados

Los valores registrados de la fluorescencia emitida por la sonda específica para HSV2 (detector FAM "HSV2") y por la sonda específica para el Control Interno (detector VIC "CI") en las reacciones de amplificación deben ser analizados con el software del equipo.

Antes de efectuar el análisis, tomando como referencia la documentación del equipo, es necesario:
- programar manualmente (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) el intervalo de cálculo del Nivel de fluorescencia de fondo (Baseline) desde el ciclo 6 al ciclo 15;

Nota: En caso de una muestra positiva con alto título de HSV2, la fluorescencia FAM de la sonda específica para HSV2 puede comenzar a crecer antes del 15º ciclo. En este caso el intervalo de cálculo del Nivel de fluorescencia de fondo debe ser adaptado desde el ciclo 6 al ciclo en el cual la fluorescencia FAM comienza a crecer.

Si se utiliza un equipo 7300 Real-Time PCR System:

- programar manualmente el Umbral (Threshold) para el detector FAM "HSV2" en 0,1;
- programar manualmente el Umbral (Threshold) para el detector VIC "CI" en 0,05.

Si se utiliza un equipo 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument:

- programar manualmente el Umbral (Threshold) para el detector FAM "HSV2" en 0,1;
- programar manualmente el Umbral (Threshold) para el detector VIC "CI" en 0,1.

Los valores de fluorescencia emitidos por las sondas específicas en la reacción de amplificación y el valor Umbral de fluorescencia se utilizan para determinar el Ciclo Umbral (Ct, Threshold cycle), el ciclo en el cual se ha alcanzado el valor Umbral de fluorescencia.

En la reacción de amplificación con el Positive Control*, el valor de Ct para HSV2 (Results > Report) se utiliza para confirmar la amplificación y la detección como se describe en la tabla siguiente:

Reacción Positive Control detector FAM "HSV2"	Resultado de la prueba	Amplificación / Detección
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRECTA

Si el resultado de la reacción de amplificación del Positive Control es Ct > 25 o CtNo determinado (Undetermined) para HSV2, no ha sido detectada correctamente la presencia de ADN blanco. Se han verificado problemas en la fase de amplificación o en la de detección (dispensación incorrecta de la mezcla de reacción o del control positivo, degradación de la mezcla de reacción o del control positivo, programación incorrecta de la posición del control positivo, programación incorrecta del ciclo térmico) que pueden provocar resultados incorrectos. La sesión no es válida y se debe repetir a partir de la fase de amplificación.

*Nota: Cuando se utiliza este producto para la cuantificación del ADN de HSV2, en vez de la reacción con el Positive Control se ha preparado la serie de reacciones con los Q - PCR Standard. En este caso para convalidar la amplificación y la detección se debe tomar como referencia la reacción de amplificación del Q - PCR Standard 10⁵ (Ct ≤ 25).

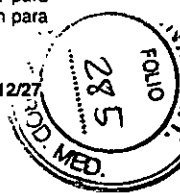
En la reacción de amplificación de Control negativo, el valor de Ct para HSV2 (Results > Report) se utiliza para confirmar la amplificación y la detección como se describe en la tabla siguiente:

Reacción Control negativo detector FAM "HSV2"	Resultado de la prueba	Amplificación / Detección
Ct No determinado	NEGATIVO	CORRECTA

Si el resultado de la reacción de amplificación del Control negativo es distinto de Ct No determinado (Undetermined) para HSV2, ha sido detectada la presencia de ADN blanco. Se han verificado problemas en la fase de amplificación (contaminación) que pueden causar resultados incorrectos y falsos positivos. La sesión no es válida y se debe repetir a partir de la fase de amplificación.

En las reacciones de amplificación de cada muestra, el valor de Ct para HSV2 se utiliza para detectar la presencia de ADN blanco, mientras que los valores de Ct para el Control Interno se utilizan para confirmar la extracción, la amplificación y la detección.

5852



Nota: Verificar con el software del equipo (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) que el Ct sea determinado por un aumento rápido y regular de los valores de fluorescencia y no por fenómenos de pico o aumento gradual de la señal de fondo (fondo irregular o alto).

Este producto tiene capacidad para detectar una cantidad mínima de 10 copias de ADN del gen de la gpG de HSV2 por reacción de amplificación, correspondientes a los genomas Equivalentes por reacción (límite de detección del producto, ver Evaluación de Desempeño en la página 18).

Los resultados como Ct de las reacciones de amplificación de cada muestra (Results > Report) son utilizados como se describe en la siguiente tabla:

Reacción muestra		Idoneidad de la muestra	Resultado de la prueba	ADN de HSV2
detector FAM "HSV2"	detector VIC "Ct"			
Ct No determinado	Ct > 35 o Ct No determinado	no idónea	no válido	-
	Ct ≤ 35	idónea	válido, negativo	NO DETECTADO
Ct Determinado	Ct > 35 o Ct No determinado	idónea	válido, positivo	DETECTADO
	Ct ≤ 35	idónea	válido, positivo	DETECTADO

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es Ct No determinado para HSV2 y Ct > 35 o Ct No determinado para el Control Interno, no ha sido posible detectar de manera eficiente el ADN del Control Interno. En este caso se han verificado problemas en la fase de amplificación (amplificación no eficiente o nula) o en la fase de extracción (pérdida de ADN, presencia de inhibidores) que pueden causar resultados incorrectos y falsos negativos. La muestra no es apta, la prueba no es válida y debe repetirse a partir de la extracción de una nueva muestra.

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es Ct No determinado para HSV2 y Ct ≤ 35 para el Control Interno, el ADN de HSV2 no ha sido detectado en el ADN obtenido de la muestra, pero no se puede excluir que el ADN de HSV2 esté presente con un título inferior al límite de detección del producto (ver Evaluación de Desempeño en la página 18). En este caso el resultado sería un falso negativo.

Los resultados obtenidos con esta prueba deben ser interpretados considerando todos los datos clínicos y otros exámenes de laboratorio correspondientes al paciente.

Nota: Cuando en la reacción de amplificación correspondiente a una muestra ha sido detectada la presencia de ADN de HSV2, la amplificación del Control Interno puede dar como resultado un Ct > 35 o Ct No determinado. En efecto, la reacción de amplificación de baja eficiencia del Control Interno puede ser anulada por competición de la reacción de amplificación de alta eficiencia de HSV2. En este caso, la muestra de todas maneras es apta y el resultado positivo de la prueba es válido.

Análisis cuantitativo de los resultados

Después de realizar el procedimiento para el análisis cualitativo de los resultados se puede hacer el análisis cuantitativo de los resultados correspondientes a las muestras positivas.

Los valores de Ct para HSV2 en las reacciones de amplificación de los cuatro Q - PCR Standard se utilizan para calcular la Curva estándar (Results > Standard Curve) de la sesión de amplificación y para confirmar la amplificación y la detección como se describe en la siguiente tabla:

Curva estándar detector FAM "HSV2"	Intervalo de aceptación	Amplificación / Detección
Coefficiente de Correlación (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRECTA

Si el valor del Coeficiente de correlación (R2) no está contenido dentro de los límites, ha ocurrido un problema en la fase de amplificación o de detección (dispensación incorrecta de la mezcla de reacción o de los estándares, degradación de la mezcla de reacción o de los estándares, programación incorrecta de la posición de los estándares, programación incorrecta del ciclo térmico) que pueden causar resultados incorrectos. La sesión no es válida y se debe repetir a partir de la fase de amplificación.

Los valores de Ct para HSV2 en las reacciones de amplificación de cada muestra y la Curva estándar de la sesión de amplificación son utilizados para calcular la Cantidad (Quantity) de ADN blanco presente en las reacciones de amplificación correspondientes a las muestras.

Este producto tiene capacidad para dosar de 1.000.000 a 10 copias de ADN del gen de la gpG de HSV2 por reacción de amplificación, correspondientes a los genomas Equivalentes por reacción (intervalo de medición lineal ver apartado sobre las Características de las prestaciones en la página 18), como se describe en la siguiente tabla:

Resultado de la muestra detector FAM "HSV2"	genomas Equivalentes de HSV2 por reacción
Cantidad > 1 x 10 ⁶	SUPERIORES A 1.000.000
1 x 10 ¹ ≤ Cantidad ≤ 1 x 10 ⁶	= Cantidad
Cantidad < 1 x 10 ¹	INFERIORES A 10

Los resultados (Cantidad) de cada muestra (Results > Report) son utilizados para calcular los genomas Equivalentes (gEq) de HSV2 presentes en la muestra de partida (Nc) según esta fórmula:

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = \frac{Vc \times Cantidad}{Vc \times Va \times Ee}$$

Donde:
Vc es el volumen de la muestra usado en la extracción expresado en mL;
Ee es la eficiencia de la extracción expresada en decimales;
Ve es el volumen total obtenido de la extracción expresado en µL;
Va es el volumen del producto de extracción usado en la reacción de amplificación expresado en µL;
Cantidad es el resultado de la reacción de amplificación correspondiente a la muestra expresado en gEq por reacción.

Cuando se utilizan muestras de líquido cefalorraquídeo y el kit de extracción «EXTRAGEN», y se desea obtener el resultado expresado en gEq / mL, la fórmula es:

$$\text{Fórmula simplificada para líquido cefalorraquídeo y «EXTRAGEN»}$$

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 12,5 \times Cantidad$$

Cuando se utilizan muestras de sangre entera, plasma recolectadas en EDTA o líquido cefalorraquídeo y el sistema de extracción ELITE STAR System y se desea obtener el resultado expresado en gEq / mL, la fórmula es:

$$\text{Fórmula simplificada para sangre entera, plasma o líquido cefalorraquídeo y ELITE STAR System}$$

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 28 \times Cantidad$$

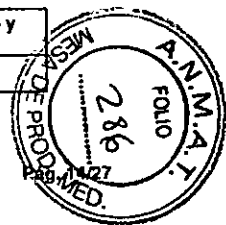
Cuando se utilizan muestras de sangre entera, plasma recolectadas en EDTA o líquido cefalorraquídeo y el sistema de extracción ELITE GALAXY System y se desea obtener el resultado expresado en gEq / mL, la fórmula es:

$$\text{Fórmula simplificada para sangre entera, plasma o líquido cefalorraquídeo y ELITE GALAXY System}$$

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 35 \times Cantidad$$

Lic. Alejandro Diez
Biosystems S.A.

DRA. SILVANA ZANELLA
DIRECTORA TÉCNICA
BIOSYSTEMS S.A.



5852

Cuando se utilizan muestras de sangre entera recolectada en EDTA y el kit de extracción «EXTRAblood», y se desea obtener el resultado expresado en gEq / mL, la fórmula es:

Fórmula simplificada para sangre entera y «EXTRAblood»
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 25 \times \text{Cantidad}$

Cuando se utilizan muestras de plasma recolectado en EDTA o de líquido cefalorraquídeo y el sistema de extracción «NucliSENS® easyMAG®» y se desea obtener el resultado expresado en gEq / mL, la fórmula es:

Fórmula simplificada para plasma, líquido cefalorraquídeo y «NucliSENS® easyMAG®»
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 10 \times \text{Cantidad}$

Cuando se utilizan muestras de plasma recolectado en EDTA y el sistema de extracción «QIASymphony® SP/AS», y se desea obtener el resultado expresado en gEq / mL, la fórmula es:

Fórmula simplificada para plasma y «QIASymphony® SP/AS»
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 12 \times \text{Cantidad}$

Cálculo de los límites del intervalo de medición lineal

Los límites del intervalo de medición lineal como gEq / mL de muestra, cuando se utiliza una metodología de extracción en particular, pueden calcularse a partir del intervalo de medición lineal de la reacción de amplificación según la siguiente fórmula:

$\text{Límite inferior (gEq / mL)} = \frac{V_e \times 10 \text{ gEq}}{V_c \times V_a \times E_e}$

$\text{Límite superior (gEq / mL)} = \frac{V_e \times 1.000.000 \text{ gEq}}{V_c \times V_a \times E_e}$
--

Cuando se utiliza el sistema de extracción «EXTRAGEN» con muestras no celulares, la fórmula es:

Límites del intervalo de medición lineal (gEq / mL) con «EXTRAGEN»
Límite inferior (gEq / mL) = 12,5 x 10 gEq
Límite superior (gEq / mL) = 12,5 x 1.000.000 gEq
de 125 a 12.500.000 gEq / mL

Cuando se utiliza el kit de extracción «EXTRAblood» con muestras celulares, la fórmula es:

Límites del intervalo de medición lineal (gEq / mL) con «EXTRAblood»
Límite inferior (gEq / mL) = 25 x 10 gEq
Límite superior (gEq / mL) = 25 x 1.000.000 gEq
de 250 a 25.000.000 gEq / mL

Lic. Alejandra Diez
Fábrica de
Biosystems S.A.

Dra. SILVANA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

Cuando se utiliza el sistema de extracción ELITE STAR System con muestras no celulares, la fórmula es:

Límites del intervalo de medición lineal (gEq / mL) con ELITE STAR System
Límite inferior (gEq / mL) = 28 x 10 gEq
Límite superior (gEq / mL) = 28 x 1.000.000 gEq
de 280 a 28.000.000 gEq / mL

Cuando se utiliza el sistema de extracción ELITE STAR System con muestras celulares, la fórmula es:

Límites del intervalo de medición lineal (gEq / mL) con ELITE STAR System
Límite inferior (gEq / mL) = 28 x 10 gEq
Límite superior (gEq / mL) = 28 x 1.000.000 gEq
de 280 a 28.000.000 gEq / mL

Cuando se utiliza el sistema de extracción ELITE GALAXY System con muestras celulares, la fórmula es:

Límites del intervalo de medición lineal (gEq / mL) con ELITE GALAXY System
Límite inferior (gEq / mL) = 35 x 10 gEq
Límite superior (gEq / mL) = 35 x 1.000.000 gEq
de 350 a 35.000.000 gEq / mL

Cuando se utiliza el sistema de extracción ELITE GALAXY System con muestras no celulares, la fórmula es:

Límites del intervalo de medición lineal (gEq / mL) con ELITE GALAXY System
Límite inferior (gEq / mL) = 35 x 10 gEq
Límite superior (gEq / mL) = 35 x 1.000.000 gEq
de 350 a 35.000.000 gEq / mL

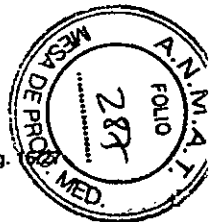
Cuando se utiliza el sistema de extracción «NucliSENS® easyMAG®» con muestras no celulares, la fórmula es:

Límites del intervalo de medición lineal (gEq / mL) con «NucliSENS® easyMAG®»
Límite inferior (gEq / mL) = 10 x 10 gEq
Límite superior (gEq / mL) = 10 x 1.000.000 gEq
de 100 a 10.000.000 gEq / mL

Cuando se utiliza el sistema de extracción «QIASymphony® SP/AS» con muestras no celulares, la fórmula es:

Límites del intervalo de medición lineal (gEq / mL) con «QIASymphony® SP/AS»
Límite inferior (gEq / mL) = 12 x 10 gEq
Límite superior (gEq / mL) = 12 x 1.000.000 gEq
de 120 a 12.000.000 gEq / mL

5852



LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Utilizar con este producto sólo el ADN recolectado de las siguientes muestras clínicas: líquido cefalorraquídeo, sangre entera recolectada en EDTA, plasma recolectado en EDTA.

No utilizar con este producto el ADN recolectado de muestras heparinizadas: la heparina inhibe la reacción de amplificación de los ácidos nucleicos y produce resultados no válidos.

No utilizar con este producto ADN recolectado contaminado por hemoglobina, dextrano, Ficoll®, etanol o 2-propanol: estas sustancias inhiben la reacción de amplificación de los ácidos nucleicos y pueden causar resultados no válidos.

Con este producto no utilizar ADN que contenga elevadas cantidades de ADN genómico humano, dado que puede inhibir la reacción de amplificación de los ácidos nucleicos.

No están disponibles datos referidos a las prestaciones de este producto con el ADN recolectado de las siguientes muestras clínicas: tampones de lesiones muco-cutáneas, líquido amniótico.

No son disponibles datos referidos a eventuales fenómenos de inhibición por parte de fármacos antibióticos, antivirales, quimioterápicos o inmunosupresores.

Los resultados obtenidos con este producto dependen de la correcta identificación, recolección, transporte, conservación y preparación de las muestras; para evitar resultados erróneos es necesario tener una particular atención a estas fases y seguir atentamente las instrucciones provistas con los productos para la extracción de los ácidos nucleicos.

La metodología de amplificación real time de los ácidos nucleicos utilizada en este producto, debido a su alta sensibilidad analítica, está sujeta a contaminación por parte de muestras clínicas positivas para HSV2, de los controles positivos y de los mismos productos de la reacción de amplificación. Las contaminaciones llevan a resultados falsos positivos. Las modalidades de realización del producto son capaces de reducir las contaminaciones; sin embargo, estos fenómenos pueden evitarse sólo con una buena práctica de las técnicas de laboratorio y siguiendo atentamente las instrucciones provistas en este manual.

Este producto requiere personal competente e instruido para la manipulación de muestras biológicas capaces de transmitir infecciones y de preparados químicos clasificados como peligrosos, para evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario u otras personas.

Este producto requiere indumentaria y áreas de trabajo adecuadas para la manipulación de muestras biológicas capaces de transmitir infecciones y de preparados químicos clasificados como peligrosos, para evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario u otras personas.

Este producto requiere personal competente e instruido para los procedimientos de biología molecular, como la extracción, la amplificación y la detección de ácidos nucleicos para evitar resultados incorrectos.

Este producto requiere áreas separadas para la extracción / preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación / detección de los productos de amplificación para evitar resultados falsos positivos.

Este producto requiere el uso de indumentaria de trabajo e instrumentos destinados a la extracción / preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación / detección de los productos de amplificación para evitar resultados falsos positivos.

Un resultado negativo obtenido con este producto indica que el ADN de HSV2 no ha sido detectado en el ADN recolectado de la muestra, pero no se puede excluir que el ADN de HSV2 esté presente con un título inferior al límite de detección del producto (ver Evaluación de Desempeño en la página 18); en este caso el resultado sería un falso negativo.

Como para cualquier otro dispositivo de diagnóstico, los resultados obtenidos con este producto deben ser interpretados considerando todos los datos clínicos y otros exámenes de laboratorio correspondientes al paciente.

Como para cualquier otro dispositivo de diagnóstico, existe un riesgo latente de obtener resultados no válidos, falsos positivos y falsos negativos con este producto. Dicho riesgo latente no puede ser eliminado ni reducido ulteriormente. Este riesgo latente en situaciones particulares, como los diagnósticos prenatales y de urgencia, puede contribuir a decisiones incorrectas con consecuencias potencialmente graves para el paciente.

EVALUACION DE DESEMPEÑO

Sensibilidad analítica: límite de detección

La sensibilidad analítica de esta prueba permite identificar la presencia de aproximadamente 10 moléculas de ADN blanco en las 20 µL de ADN agregadas a la reacción de amplificación.

La sensibilidad analítica de la prueba, como límite de detección, ha sido testada utilizando un ADN plasmídico que contiene el producto de amplificación cuya concentración inicial ha sido medida espectrofotométricamente. El ADN plasmídico ha sido diluido con un título de 10 copias / 20 µL en ADN genómico humano con un título de 500 ng / 20 µL. Dicha muestra fue utilizada en 50 repeticiones para realizar la amplificación con el producto ELITechGroup S.p.A.

Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
10 copias ADN plasmídico + 500 ng de ADN genómico humano	50	50	0

La sensibilidad analítica de la prueba se ha verificado utilizando un panel de diluciones de HSV2 dentro de la concentración límite junto con muestras de sangre entera y ELITE GALAXY System. El panel se ha preparado diluyendo la muestra HSV08-12 del "QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel" (Onostics, Ltd, Escocia, Reino Unido) en sangre entera recolectada en EDTA y negativa para el ADN de HSV2. Las concentraciones virales variaban de 10 gEq / mL a 560 gEq / mL. Cada muestra del panel se ha testado en doce repeticiones para llevar a cabo todo el procedimiento de análisis: extracción y configuración PCR con sistema de extracción automático ELITE GALAXY System y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se ha realizado con la regresión Probit. El límite de detección ha sido definido como la concentración en la cual la probabilidad de obtener un resultado positivo es del 95%. Los resultados se presentan en las siguientes tablas.

Límite de detección con muestras de sangre entera y ELITE GALAXY System (gEq / mL)			
Intervalo de fiabilidad del 95%			
		Valor inferior	Valor superior
95% resultado positivo	171 gEq / mL	112 gEq / mL	505 gEq / mL

La sensibilidad analítica de la prueba se ha verificado utilizando un panel de diluciones de HSV2 dentro de la concentración límite junto con muestras de plasma y ELITE GALAXY System. El panel se ha preparado diluyendo la muestra HSV08-12 del "QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel" (Onostics, Ltd, Escocia, Reino Unido) en plasma recolectado en EDTA y negativo para el ADN de HSV2. Las concentraciones virales variaban de 10 gEq / mL a 560 gEq / mL. Cada muestra del panel se ha testado en doce repeticiones para llevar a cabo todo el procedimiento de análisis: extracción y configuración PCR con sistema de extracción automático ELITE GALAXY System y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se ha realizado con la regresión Probit. El límite de detección ha sido definido como la concentración en la cual la probabilidad de obtener un resultado positivo es del 95%. Los resultados se presentan en las siguientes tablas.

Límite de detección con muestras de plasma y ELITE GALAXY System (gEq / mL)			
Intervalo de fiabilidad del 95%			
		Valor inferior	Valor superior
95% resultado positivo	95 gEq / mL	55 gEq / mL	554 gEq / mL

Sensibilidad analítica: Intervalo lineal de medición

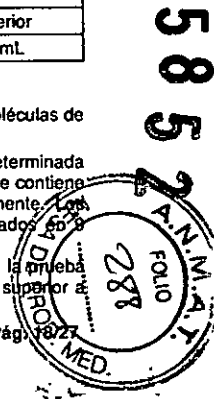
La sensibilidad analítica de esta prueba permite determinar un título de 1.000.000 a 10 moléculas de ADN blanco en los 20 µL de ADN agregados a la reacción de amplificación.

La sensibilidad analítica de la prueba, como intervalo lineal de medición, ha sido determinada utilizando un panel de diluciones (1 log₁₀ entre una dilución y la siguiente) de ADN plasmídico que contiene el producto de amplificación cuya concentración inicial ha sido medida espectrofotométricamente. Los puntos del panel de 10⁷ moléculas por reacción a 10¹ moléculas por reacción han sido utilizados en 50 repeticiones para efectuar la amplificación con el producto ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos, realizado con la regresión lineal, ha demostrado que la prueba presenta una respuesta lineal para todos los puntos del panel (coeficiente de correlación lineal superior a 0,99).

Licenciario Diego Abadillo Biosystems S.A.

Dra. Silvia Zanella Directora Técnica Biosystems S.A.



585

HSV2 ELITE MGB® Kit
reactivo por Amplificación Real Time del ADN

REF RTS032PLD

El límite superior del intervalo lineal de medición ha sido fijado en 10^6 moléculas por reacción, correspondientes a los genomas Equivalentes por reacción, en torno a un logaritmo del valor del estándar de amplificación Q - PCR Standard de concentración más alta, (10^5 moléculas / 20 μ L).

El límite inferior del intervalo lineal de medición ha sido fijado en 10 moléculas por reacción, correspondientes a los genomas Equivalentes por reacción, en torno a un logaritmo del valor del estándar de amplificación Q - PCR Standard de concentración más alta, (10^2 moléculas / 20 μ L).

Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Intervalo lineal de medición	
Límite superior	1.000.000 copias ADN / reacción
Límite inferior	10 copias ADN / reacción

En la página 15 están calculados los límites del intervalo de medición lineal gEq / mL referidos al kit de extracción utilizado.

Sensibilidad analítica: Precisión y Exactitud

La precisión de la prueba, entendida como variabilidad de los resultados obtenidos en una misma sesión de amplificación con distintas repeticiones de una muestra, permitió determinar un Coeficiente de Variación porcentual (CV %) promedio del 18,6% dentro del intervalo de 10^6 moléculas a 10^1 moléculas en los 20 μ L de ADN agregados a la reacción de amplificación.

La exactitud de la prueba, como diferencia entre el promedio de los resultados obtenidos en una misma sesión con distintas repeticiones de una muestra y el valor teórico de la concentración de la muestra, permitió obtener una Inexactitud porcentual promedio del 14,4% dentro del intervalo lineal de medición de 10^6 moléculas a 10^1 moléculas en los 20 μ L de ADN agregados a la reacción de amplificación.

La precisión y la exactitud han sido determinadas utilizando los datos obtenidos en las pruebas para el estudio del intervalo de medición lineal.

Sensibilidad analítica: reproducibilidad con material de referencia calibrado

La sensibilidad analítica de la prueba, como reproducibilidad de los resultados en comparación con los resultados obtenidos con otras metodologías y en distintos laboratorios, ha sido verificada con un panel para proficiency test.

Las pruebas se realizaron utilizando como material de referencia calibrado un panel de diluciones de HSV2 dentro de la concentración límite (QCMD 2007 Herpes simplex virus Proficiency Panel, Qnostics Ltd, Escocia, Reino Unido). Cada muestra del panel fue utilizada en 2 repeticiones para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción y amplificación, con los productos ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Pruebas con material de referencia calibrado				
Muestra	Consensus de los sistemas comerciales Log ₁₀ conc. viral	Desviación Estándar	Positivas / Repeticiones	Promedio de los resultados Log ₁₀ gEq / mL
HSV07-01	HSV2, 4,243	0,730	2 / 2	4,688
HSV07-02	HSV2, 4,282	0,363	0 / 2	No detectado
HSV07-03	Negativo, NA	NA	0 / 2	No detectado
HSV07-04	HSV2, 2,593	0,536	0 / 2	No detectado
HSV07-05	HSV2, 2,695	1,301	2 / 2	3,687
HSV07-06	Negativo, NA	NA	0 / 2	No detectado
HSV07-07	HSV2, 7,292	0,387	0 / 2	No detectado
HSV07-08	HSV2, 4,204	0,339	0 / 2	No detectado
HSV07-09	HSV2, 1,890	0,313	2 / 2	1,993
HSV07-10	HSV2, 5,275	0,292	0 / 2	No detectado
HSV07-11	HSV2, 6,134	0,897	2 / 2	6,567
HSV07-12	VZV, NA	NA	0 / 2	No detectado

Todas las muestras se han identificado correctamente. Los resultados cuantitativos obtenidos están comprendidos en el intervalo definido por el Consensus \pm 1 Desviación Estándar.

HSV2 ELITE MGB® Kit
reactivo por Amplificación Real Time del ADN

REF RTS032PLD

Se han realizado otras pruebas utilizando material de referencia calibrado, un panel de diluciones de HSV2 comprendido dentro del límite de concentración (QCMD 2009 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Escocia, Reino Unido). Cada muestra ha sido testada en duplicado para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema de extracción automático ELITE STAR System y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Pruebas con material de referencia calibrado y ELITE STAR System				
Muestra	Consensus Log ₁₀ conc. viral	Desviación Estándar	Positivas / Repeticiones	Promedio de los resultados Log ₁₀ gEq / mL
HSV09-01	HSV1	2,215	0,789	-
HSV09-02	HSV2	2,236	0,938	1,709
HSV09-03	HSV2	3,293	0,915	3,746
HSV09-04	HSV2	2,314	0,898	2,372
HSV09-05	Negativo	NA	-	-
HSV09-06	HSV1	2,402	0,665	-
HSV09-07	HSV1	4,189	0,599	-
HSV09-08	HSV2	2,389	0,827	2,391
HSV09-09	Negativo	NA	-	-
HSV09-10	HSV1	3,205	0,767	-

Todas las muestras se han identificado correctamente. Los resultados cuantitativos obtenidos están comprendidos en el intervalo definido por el Consensus \pm 1 Desviación Estándar.

Se han realizado otras pruebas utilizando material de referencia calibrado, un panel de diluciones de HSV2 comprendido dentro del límite de concentración (QCMD 2012 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Escocia, Reino Unido). Cada muestra ha sido testada en duplicado para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción y configuración PCR con el sistema de extracción automático ELITE GALAXY System y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Pruebas con material de referencia calibrado y ELITE GALAXY System				
Campione	Consensus Log ₁₀ conc. viral	Desviación Estándar	Positivas / Repeticiones	Promedio de los resultados Log ₁₀ gEq / mL
HSV12-01	Negativo, NA	-	0/2	-
HSV12-02	HSV1, 3,910	0,582	2/2	-
HSV12-03	HSV2, 1,948	0,305	0/2	2,123
HSV12-04	HSV1, 3,680	0,547	2/2	-
HSV12-05	HSV2, 1,352	0,629	0/2	-
HSV12-06	HSV1, 2,318	0,441	2/2	-
HSV12-07	HSV1, 2,014	0,296	1/2	-
HSV12-08	HSV2, 3,424	1,098	0/2	3,677
HSV12-09	Negativo, NA	-	0/2	-
HSV12-10	HSV2, 3,417	1,042	0/2	3,865

Todas las muestras negativas han sido detectadas correctamente. Las muestras positivas están comprendidos en el intervalo teórico definido (350 copias / mL) han sido detectadas correctamente por el Consensus de las pruebas \pm 1 Desviación Estándar, tal como es requerido. Una muestra por debajo del límite de detección teórico del sistema (22,5 copias / mL) se informó negativo. Las muestras con el título debajo del límite de detección pueden ser reportados estocásticamente como positivo o negativo.

Sensibilidad diagnóstica: eficiencia de detección y cuantificación en distintos genotipos / subtipos

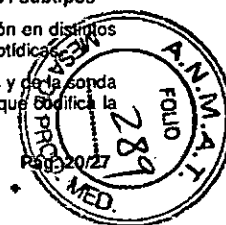
La sensibilidad diagnóstica de la prueba, como eficiencia de detección y cuantificación en distintos genotipos / subtipos, ha sido evaluada confrontando las secuencias con bases de datos nucleotídicas.

El análisis de las regiones elegidas para la hibridación de los oligonucleótidos primers y de la sonda fluorescente sobre la alineación de las secuencias disponibles en la base de datos del gen que codifica la gpG de HSV2 ha demostrado su conservación y la ausencia de mutaciones significativas.

LIC. Aparicio Diez Apodaca Biosystems S.A.

Dra. S. V. AZANELA DIRECTORA TÉCNICA BIOSYSTEMS S.A.

5852



Sensibilidad de diagnóstico: confirmación de muestras positivas

La sensibilidad de diagnóstico de la prueba, entendida como confirmación de muestras clínicas positivas, ha sido evaluada utilizando algunas muestras clínicas de líquido cefalorraquídeo y de sangre entera recolectada en EDTA positivas con el ADN de HSV2, resultando mayor del 97,6%.

La sensibilidad de diagnóstico ha sido evaluada utilizando como material de referencia 21 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas, positivas a bajo título para el ADN de HSV2 con el QCMD 2007 Herpes simplex virus Proficiency Panel (Onostics Ltd, Escocia, Reino Unido) y 20 muestras de sangre entera recolectadas en EDTA, de donadores presumiblemente negativos (Biological Sample Library Europe S.A.S., Lión, Francia), positivas a bajo título para el ADN de HSV2 con el QCMD 2008 Herpes simplex virus EQA Panel (Onostics Ltd, Scotland, UK). Para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción y amplificación, en cada muestra se utilizaron los productos ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Líquido cefalorraquídeo positivo para el ADN de HSV2	21	21	0
Sangre entera recolectada en EDTA positiva para el ADN de HSV2	20	20	0

Todas las muestras positivas para el ADN de HSV2 se han identificado correctamente como positivo.

La sensibilidad de diagnóstico ha sido evaluada utilizando 22 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas para el ADN de HSV2, positivas a bajo título añadiendo la muestra QC032RH de ELITechGroup S.p.A., 30 muestras de plasma recolectado en EDTA negativas, positivas a bajo título para el ADN de HSV2 añadiendo la muestra HSV08-12 (QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel, Onostics Ltd, Escocia, Reino Unido) y 30 muestras de sangre entera recolectada en EDTA negativas, positivas a bajo título para el ADN de HSV2 añadiendo la muestra HSV08-12 (QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel, Onostics Ltd, Escocia, Reino Unido). Cada muestra ha sido testada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema de extracción automático ELITE STAR System y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Líquido cefalorraquídeo positivo para el ADN de HSV2	22	22	0
Plasma recolectado en EDTA positivo para el ADN de HSV2	30	30	0
recolectada en EDTA positiva para el ADN de HSV2	30	29	0

Una muestra positiva de sangre entera para HSV2 no era válida.

La sensibilidad de diagnóstico de la prueba fue igual a 100%.

La sensibilidad de diagnóstico ha sido evaluada utilizando 21 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas para el ADN de HSV2, positivas a bajo título añadiendo la muestra HSV2MQP01 - High sample (Molecular Q Panel HSV2MQP01, Onostics Ltd, Escocia, Reino Unido), 30 muestras de plasma recolectado en EDTA negativas, positivas a bajo título para el ADN de HSV2 añadiendo la muestra HSV08-12 (QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel, Onostics Ltd, Escocia, Reino Unido) y 30 muestras de sangre entera recolectada en EDTA negativas, positivas a bajo título para el ADN de HSV2 añadiendo la muestra HSV08-12 (QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel, Onostics Ltd, Escocia, Reino Unido) y la muestra HSV08-10 (QCMD 2010 Herpes Simplex Virus EQA Panel, Onostics Ltd, Escocia, Reino Unido). Cada muestra ha sido testada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción y configuración PCR con el sistema de extracción automático ELITE GALAXY System y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Líquido cefalorraquídeo positivo para el ADN de HSV2	21	21	0
Plasma recolectado en EDTA positivo para el ADN de HSV2	30	30	0
Sangre entera recolectada en EDTA positiva para el ADN de HSV2	32	32	0

Todas las muestras positivas para el ADN de HSV2 se han identificado correctamente como positivos. La sensibilidad de diagnóstico de la prueba fue igual a 100%.

Especificidad analítica: ausencia de reactividad cruzada con marcadores potencialmente interferentes

La especificidad analítica de la prueba, como ausencia de reactividad cruzada con otros marcadores potencialmente interferentes, ha sido evaluada confrontando las secuencias con bases de datos nucleotídicas.

El análisis de la alineación de las secuencias de los oligonucleótidos primers y de la sonda fluorescente con las secuencias disponibles en la base de datos de organismos distintos del HSV2, entre los cuales se encuentran las de los genomas completos de HSV1 y VZV, el herpesvirus humano más parecido al HSV2, ha demostrado su especificidad y la ausencia de homologías significativas.

La especificidad analítica de la prueba, como ausencia de reactividad cruzada con otros marcadores potencialmente interferentes, ha sido verificada utilizando un panel para proficiency test.

La especificidad analítica ha sido verificada utilizando como material de referencia calibrado un panel con muestras positivas para HSV1 y VZV (QCMD 2007 Herpes simplex virus Proficiency Panel, Onostics Ltd, Escocia, Reino Unido). Cada muestra del panel fue utilizada en 2 repeticiones para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción y amplificación, con los productos ELITechGroup S.p.A.

Los resultados obtenidos se presentan en el apartado "Sensibilidad analítica: reproducibilidad con panel para proficiency test".

No se ha detectado ninguna reactividad cruzada con las muestras positivas para el ADN de HSV1 y VZV.

Especificidad de diagnóstico: confirmación de muestras negativas

La sensibilidad de diagnóstico de la prueba, entendida como confirmación de muestras negativas, ha sido evaluada utilizando algunas muestras clínicas de líquido cefalorraquídeo y de sangre entera recolectada en EDTA negativas para el ADN de HSV2, resultando mayor al 98,0 %.

La especificidad de diagnóstico ha sido evaluada utilizando como material de referencia 31 muestras de líquido cefalorraquídeo, todas negativas para el ADN de HSV2 (probadas con un producto CE IVD de amplificación real time) y 24 muestras de sangre entera recolectada en EDTA de donadores presumiblemente negativos para el ADN de HSV2 (Biological Sample Library Europe S.A.S., Lión, Francia). Para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción y amplificación, en cada muestra se utilizaron los productos ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Líquido cefalorraquídeo negativo para el ADN de HSV2	31	0	26
Sangre entera recolectada en EDTA negativa para el ADN de HSV2	24	0	24

Cinco muestras de líquido cefalorraquídeo han arrojado un resultado no válido por la probable presencia de un inhibidor y no han sido utilizadas para el cálculo de la especificidad.

La especificidad de diagnóstico ha sido evaluada utilizando 24 muestras de líquido cefalorraquídeo, negativas para el ADN de HSV2, 30 muestras de plasma recolectado en EDTA negativas para el ADN de HSV2 y 30 muestras de sangre entera recolectada en EDTA negativas para el ADN de HSV2 (testadas con un producto CE-IVD de amplificación real-time). Cada muestra ha sido testada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema de extracción automático ELITE STAR System y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Líquido cefalorraquídeo negativo para el ADN de HSV2	24	0	24
Plasma recolectado en EDTA negativo para el ADN de HSV2	30	0	30
Sangre entera recolectada en EDTA negativa para el ADN de HSV2	30	0	30

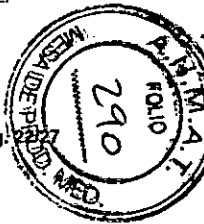
Todas las muestras se han identificado correctamente como negativas para el ADN de HSV2.

La especificidad de diagnóstico de la prueba fue igual a 100%.

Lic. Alejandro Diez
Cepodólogo
Biosystems S.A.

Dra. SILVIA ANZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
14.421
BIOSYSTEMS S.A.

5852



La especificidad de diagnóstico ha sido evaluada utilizando 22 muestras de líquido cefalorraquídeo, negativas para el ADN de HSV2, 34 muestras de plasma recolectado en EDTA negativas para el ADN de HSV2 y 36 muestras de sangre entera recolectada en EDTA negativas para el ADN de HSV2 (testadas con un producto CE-IVD de amplificación real-time). Cada muestra ha sido testada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema de extracción automático ELITE GALAXY System y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Líquido cefalorraquídeo negativo para el ADN de HSV2	22	0	22
Plasma recolectado en EDTA negativo para el ADN de HSV2	34	0	34
Sangre entera recolectada en EDTA negativa para el ADN de HSV2	36	0	36

Todas las muestras se han identificado correctamente como negativas para el ADN de HSV2. La especificidad de diagnóstico de la prueba fue igual a 100%.

Nota: Los datos y los resultados completos de las pruebas realizadas para evaluar la evaluación de desempeño del producto con las matrices y los equipos están señaladas en la Sección 7 del Fascículo Técnico del Producto "HSV2 ELITE MGB® Kit", FTP RTS032PLD.

BIBLIOGRAFÍA

- E. Aurelius et al. (1993) *J. Med. Virology* **39**: 179 - 186
- E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**: e30

Dra. SILVINA ZANELLA
DIRECTORA TÉCNICA
M/N 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

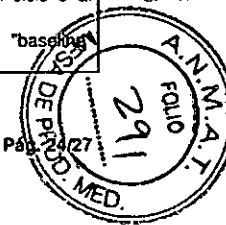
PROBLEMAS Y SOLUCIONES

ADN blanco no detectado en la reacción de Positivo Control / o del Q - PCR Standard o Coeficiente de correlación de la Curva estándar no válido	
Causas posibles	Soluciones
Error en la dispensación de la microplaca.	Dispensar cuidadosamente los reactivos en la microplaca siguiendo el plan de trabajo. Controlar los volúmenes de mezcla de reacción dispensados. Controlar los volúmenes de control positivo o los estándar distribuidos.
Degradación de la sonda.	Utilizar una nueva alícuota de la mezcla de amplificación.
Degradación del control positivo o estándar.	Utilizar una nueva alícuota de control positivo o estándar.
Error en la programación del equipo.	Controlar la posición de las reacciones del control positivo o del estándar programada en el equipo. Controlar el ciclo térmico programado en el equipo.

ADN blanco detectado en la reacción de Control negativo	
Causas posibles	Soluciones
Error en la dispensación de la microplaca.	Evitar esparcir el contenido de las tubos de las muestras. Cambiar siempre el tip entre una muestra y la otra. Dispensar cuidadosamente muestras, control negativo y control positivo o estándar en la microplaca siguiendo el plan de trabajo.
Error durante la programación del equipo.	Controlar la posición de muestras, control negativo y control positivo o estándar programada en el equipo.
Microplaca mal cerrada.	Cerrar con cuidado la microplaca.
Contaminación del agua bidestilada estéril.	Utilizar una nueva alícuota de agua estéril.
Contaminación de la mezcla de amplificación.	Utilizar una nueva alícuota de la mezcla de amplificación.
Contaminación del área de extracción / preparación de las reacciones de amplificación.	Limpier superficies e instrumentos con detergentes acuosos, lavar batas, sustituir tubos y tips en uso.

Presencia de fluorescencia de fondo irregular o elevada en las reacciones	
Causas posibles	Soluciones
Error en la dispensación de la muestra.	Mezclar cuidadosamente, pipeteando tres veces, muestras, control negativo y control positivo o estándar en la mezcla de reacción. Evitar crear burbujas.
Error en la programación de la "baseline".	Programar el intervalo de cálculo de "baseline" en una zona de ciclos en la cual la fluorescencia de fondo ya se encuentre estabilizada (controlar los registros "Results", "Component") y que la fluorescencia de la señal no haya comenzado a crecer todavía, por ejemplo del ciclo 6 al ciclo 15. Programar el cálculo automático de la "baseline" seleccionando la opción "autobaseline".

5852



HSV2 ELITE MGB® Kit
reactivo por Amplificación Real Time del ADN

REF RTS032PLD

HSV2 ELITE MGB® Kit
reactivo por Amplificación Real Time del ADN












REF RTS032PLD

AVISO AL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

Presencia de curva de disociación anómala	
Causas posibles	Soluciones
Ausencia de un pico definido. Pico definido pero diferente del de otras muestras y de los estándares.	Controlar que el Ct del detector FAM sea inferior a 30. Cantidades elevadas de producto de amplificación presentes al finalizar la reacción pueden interferir en el análisis de la curva de disociación. Repetir la amplificación de la muestra para confirmar la presencia de un ADN blanco con una posible mutación. Para confirmar la presencia de una mutación, se debería secuenciar el ADN blanco presente en la muestra.

SIGNIFICADO DE LOS SIMBOLOS

Licenciario Diez Apoderao Biosystems S.A.

-  **REF** Número de catálogo.
-  Límite superior de temperatura.
-  **LOT** Código de lote.
-  Utilizar antes del último día del mes.
-  **IVD** Dispositivo médico diagnóstico *in vitro*.
-  **CE** Conforme a los requisitos de la Directiva Europea 98/79/CE correspondiente a los dispositivos médicos diagnósticos *in vitro*.
-  **Σ** Contenido suficiente para "N" test.
-  **!** Atención, consultar las instrucciones de uso.
-  **CONT** Contenido.
-  Mantener alejado de la luz solar.
-  **■** Fabricante.

DRA. SILVINA ZANELLA
DIRECTORA TÉCNICA
MN 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

Este producto se vende sobre la base del contrato de licencia entre Epoch Biosciences, LLC y Life Technologies, Inc. El precio de compra de este producto incluye los derechos - limitados y no transferibles - de usar esta cantidad de producto, únicamente para las actividades del comprador que sean directamente relacionadas con el diagnóstico humano. Para obtener información sobre la adquisición de una licencia de este producto para fines diferentes a los definidos anteriormente, por favor comuníquese con el Departamento de Licencias de Life Technologies, Inc., 5791 Val Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Correo electrónico: outlicensing@lifetech.com.

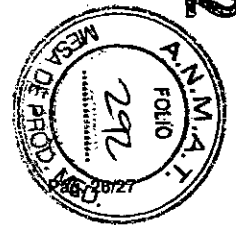
Los reactivos de detección ELITE MGB® están cubiertos por una o más patentes U.S. número 5,801,155; 6,127,121; 6,312,894; 6,426,408; 6,485,906; 6,492,346; 6,660,845; 6,699,975; 6,727,356; 6,790,945; 6,949,367; 6,972,328; 7,045,610; 7,319,022; 7,368,549; 7,381,818; 7,556,923; 7,662,942; 7,671,218; 7,715,989; 7,723,078; 7,759,126; 7,767,834; 7,794,945; 7,897,736; 8,008,522; 8,067,177; RE 38,416 y de las patentes EP 0819133, 1068358, 1144429, 1232157, 1261616 y 1789587, así como de solicitud de patentes que están actualmente pendientes.

La compra de este producto incluye una licencia limitada, no transferible y no exclusiva (sin derecho a revender, volver a empaquetar, o sublicenciar) sobre la base de las patentes U.S. número 6,030,787; 5,723,591 y 5,876,930 y las correspondientes patentes extranjeras, únicamente para usar este producto en un análisis en el que la detección de una secuencia de un ácido nucleico no incluya el corte de una sonda de ácido nucleico, con exclusión de cualquier otro propósito. Ninguna otra licencia en virtud de estas patentes o cualquier otra patente es concedida, expresamente, implícitamente o en forma excepcional.

Esta licencia limitada permite a la persona o entidad legal a la cual se proporcionó este producto, de usar el producto y los datos generados por el uso del producto, sólo para el diagnóstico humano. Ni ELITechGroup S.p.A., ni sus licenciadores conceden cualquier otra licencia, explícita o implícita para cualquier otro propósito.

Platinum® Tfi es una marca registrada de Life Technologies Inc.
 «NucliSENS® easyMAG®» son marcas registradas de bioMérieux.
 «QIASymphony®» es una marca registrada de QIAGEN.

5852



HOJA DE TRABAJO

5852



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Revisión 12


03/11/14

SCH mRTS032PLD_es

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA
DIRECTORA TÉCNICA
MN. 14.421
BIOSYSTEMS S.A.

Lic. Alejandro Diez
Propietario
BioSystems S.A.



ELITE
MGB

ELITechGroup
MOLECULAR DIAGNOSTICS

ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Torino ITALY

Oficinas: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E. mail: emd.support@elitechgroup.com
sitio WEB: www.elitechgroup.com

HSV2 - ELITe Positive Control
control positivo de ADN plásmidico por análisis cualitativo

REF CTR032PLD

MATERIAL PROVISTO EN EL PRODUCTO

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación y etiquetado
HSV2 - Positivo Control	solución de plásmido	4 x 65 µL	-

MATERIAL REQUERIDO NO PROVISTO EN EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.
- Guantes sin polvo descartables de látex o similares.
- Mezclador vortex.
- Microcentrifuga de mesa (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas y tips estériles con filtro para aerosol o de dispensación positiva (2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL).
- Agua bidestilada estéril.
- Termostato programable con sistema óptico de detección de la fluorescencia 7300 Real Time PCR System o 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument calibrado según las indicaciones del fabricante.

OTROS PRODUCTOS REQUERIDOS

Los reactivos para la amplificación no están incluidos en este producto. Para realizar estas fases analíticas se aconseja la utilización de los siguientes productos producidos por ELITechGroup S.p.A.:

«HSV2 ELITe MGB® Kit» (código RTS032PLD), mezcla de reacción completa y lista para su uso para la amplificación real time en una solución estabilizadora.

Para la extracción manual del ADN de las muestras a analizar, se aconseja utilizar los productos genéricos «EXTRAblood» (ELITechGroup S.p.A., código EXTB01), kit de extracción del ADN de muestras celulares o «EXTRAgen» (ELITechGroup S.p.A., código EXTG01), kit de extracción de los ácidos nucleicos de muestras no celulares.

Para la extracción automática del ADN de las muestras a analizar, se aconseja utilizar los productos genéricos NucliSENS® easyMAG® Reagents (bioMérieux SA, códigos 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), kit de extracción de los ácidos nucleicos de muestras biológicas, con el equipo NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux SA, código 200111).

Para el control positivo de extracción y control de inhibición se requiere el uso de los productos genéricos «CPE-DNA - Internal Control» (ELITechGroup S.p.A., código CTREXTG) o «CPE - Internal Control» (ELITechGroup S.p.A., código CTCPE), control positivo de extracción de ADN plasmidico para extracciones del ADN de muestras no celulares.

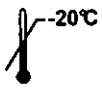
Si estuviera previsto el uso de un equipo 7300 Real-Time PCR System, se aconseja utilizar el producto genérico «Q - PCR Microplates» (ELITechGroup S.p.A., código RTSACC01) microplacas con pocillos de 0,2 mL y láminas adhesivas para la amplificación real time.

Si estuviera previsto el uso de un equipo 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, se aconseja utilizar el producto genérico «Q - PCR Microplates Fast» (ELITechGroup S.p.A., código RTSACC02) microplacas con pocillos de 0,1 mL y láminas adhesivas para la amplificación real time.

Si se requiere la detección y cuantificación del ADN de HSV2 (análisis cuantitativo) se aconseja usar el producto «HSV2 ELITe Standard» (ELITechGroup S.p.A., código STD032PLD), cuatro diluciones de ADN plasmidico en cantidad conocida para obtener la curva estándar.

HSV2 - ELITe Positive Control
control positivo de ADN plásmidico por análisis cualitativo

REF CTR032PLD



INDICE

USO PREVISTO	pág. 1
PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO	pág. 1
MATERIAL PROVISTO EN EL PRODUCTO	pág. 2
MATERIAL REQUERIDO NO PROVISTO EN EL PRODUCTO	pág. 2
OTROS PRODUCTOS REQUERIDOS	pág. 2
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	pág. 3
PROCEDIMIENTO	pág. 4
BIBLIOGRAFÍA	pág. 4
SIGNIFICADO DE LOS SÍMBOLOS	pág. 4

USO PREVISTO

El producto «HSV2 - ELITe Positive Control» se utiliza como control positivo en las pruebas cualitativas de amplificación de los ácidos nucleicos para la detección del ADN del virus humano Herpes Simplex de tipo 2 (HSV2) con el producto «HSV2 ELITe MGB® Kit» de ELITechGroup S.p.A.

PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO

El producto provee el Positivo Control, una solución estable de plásmido que contiene la secuencia de interés, dosificada en cuatro probetas y listas para su uso. Cada probeta contiene 65 µL de solución, suficiente para 3 sesiones.

El plásmido contiene una región del gen codificante, la glicoproteína G (gpG) de HSV2. La detección del ADN blanco durante la reacción de amplificación confirma su capacidad para identificar la presencia de ADN de HSV2.

El producto permite efectuar 12 reacciones de amplificación utilizando 20 µL por reacción.

Dra. SILVANA ZANELLA
DIRECCIÓN TÉCNICA
TEL. 14.421
BIO SYSTEMS S.A.

5852



HSV2 - ELITe Positive Control
control positivo de ADN plásmidico por análisis cualitativo

REF CTR032PLD

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto es para uso exclusivo *in vitro*.

Advertencias y precauciones generales

Manipular y eliminar todas las muestras biológicas como si pudiesen transmitir agentes infecciosos. Evitar el contacto directo con las muestras biológicas. No producir salpicaduras ni aerosol. El material que está en contacto con las muestras biológicas debe ser tratado con hipoclorito de sodio al 3% por al menos 30 minutos o bien tratado en autoclave a 121C° durante una hora antes de ser eliminado.

Manipular y eliminar todos los reactivos y todos los materiales usados para realizar la prueba como si fuesen agentes infecciosos. Evitar el contacto directo con los reactivos. No producir salpicaduras ni aerosol. Los residuos deben ser tratados y eliminados según normas de seguridad adecuadas. El material combustible monouso debe ser incinerado. Los residuos líquidos que contienen ácidos o bases deben ser neutralizados antes de la eliminación.

Usar indumentaria de protección y guantes adecuados, protegerse los ojos o la cara.

No pipetear con la boca ninguna solución.

No comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos en el área de trabajo.

Lavarse bien las manos después del manejo de muestras y reactivos.

Eliminar los reactivos sobrantes y los residuos según las normas vigentes.

Leer atentamente todas las instrucciones provistas en el producto antes de realizar la prueba.

Respetar las instrucciones provistas en el producto durante la ejecución de la prueba.

Respetar la fecha de caducidad del producto.

Utilizar sólo los reactivos presentes en el producto y los aconsejados por el fabricante.

No usar reactivos que provengan de lotes diferentes.

No utilizar reactivos que provengan de productos de otros fabricantes.

Advertencias y precauciones en los procedimientos de biología molecular

Los procedimientos de biología molecular, como la extracción, la transcripción inversa, la amplificación y la detección de ácidos nucleicos, requieren personal competente e instruido para evitar el riesgo de resultados incorrectos, en particular a causa de la degradación de los ácidos nucleicos de las muestras o de la contaminación de las mismas por parte de productos de amplificación.

Es necesario disponer de áreas separadas para la extracción / preparación de las reacciones de amplificación o para la amplificación / detección de los productos de amplificación. Nunca introducir un producto de amplificación en el área de extracción / preparación de las reacciones de amplificación.

Es necesario disponer de batas, guantes e instrumentos destinados para la extracción / preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación / detección de productos de amplificación. Nunca transferir batas, guantes e instrumentos del área de amplificación / detección de productos de amplificación al área de extracción / preparación de las reacciones de amplificación.

Las muestras deben ser destinadas exclusivamente a este tipo de análisis. Las muestras deben ser manipuladas bajo una campana de flujo laminar. Las probetas que contengan muestras diferentes nunca deben ser abiertas al mismo tiempo. Las pipetas utilizadas para manipular las muestras deben ser destinadas sólo a este uso. Las pipetas deben ser del tipo de dispensación positiva o usar tips con filtro para aerosol. Los tips utilizados deben ser estériles, sin la presencia de ADNasa y ARNasa, sin la presencia de ADN y ARN.

Los reactivos deben ser manipulados bajo campana de flujo laminar. Los reactivos necesarios para la amplificación deben ser preparados de manera tal que sean utilizados en una sola sesión. Las pipetas utilizadas para manipular los reactivos deben ser destinadas sólo a este uso. Las pipetas deben ser del tipo de dispensación positiva o usar tips con filtro para aerosoles. Los tips utilizados deben ser estériles, sin la presencia de ADNasa y ARNasa, sin la presencia de ADN y ARN.

Los productos de amplificación deben ser manipulados en modo de limitar al máximo su dispersión en el ambiente para evitar contaminaciones. Las pipetas utilizadas para manipular los productos de amplificación deben ser destinadas sólo a este uso.

Advertencias y precauciones específicas para los componentes

El HSV2 - Positive Control debe ser congelado y descongelado por un máximo de tres veces.

El HSV2 - Positive Control no presenta frases de riesgo (R) y presenta los siguientes consejos de prudencia (S):

SCH mCTR032PLD_es

28/05/13

Revisión 08

Pág. 3/4

HSV2 - ELITe Positive Control
control positivo de ADN plásmidico por análisis cualitativo

REF CTR032PLD

PROCEDIMIENTO

S 23-25. No respirar los gases/humos/vapores/aerosoles. Evitar el contacto con los ojos.

El producto «HSV2 - ELITe Positive Control» debe ser usado con la mezcla completa de reactivo del producto «HSV2 ELITe MGB® Kit».

Antes de uso, extraer y descongelar las probetas de HSV2 - Positive Control. Agitar delicadamente las probetas, centrifugarlas durante 5 segundos para obtener en el fondo el contenido y mantenerlas en hielo.

El HSV2 - Positive Control está listo para su uso, por lo tanto debe utilizarse agregándole 20 µL directamente a la mezcla de reacción.

El procedimiento completo, que prevé la preparación y la realización de una reacción de amplificación real time en microplaca con un termostato programable con sistema óptico de detección de la fluorescencia (thermal cycler para amplificación real time), se describe de manera detallada en el manual de instrucciones para el uso que se adjunta al producto «HSV2 ELITe MGB® Kit».











Las características de las prestaciones y los límites del procedimiento de la prueba completa para la detección del ADN de HSV2 se describen de manera detallada en el manual de instrucciones de uso adjunto al producto «HSV2 ELITe MGB® Kit».

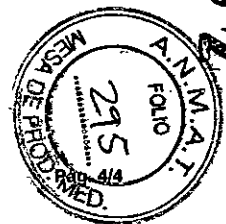
Nota: El HSV2 - Positive Control puede ser congelado y descongelado hasta tres veces.

BIBLIOGRAFÍA

E. Aurelius et al. (1993) *J. Med. Virology* 39: 179 - 186

SIGNIFICADO DE LOS SÍMBOLOS

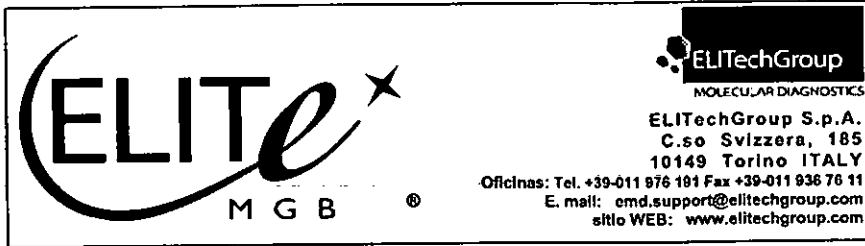
- | | |
|---|--|
|  | Número de catálogo. |
|  | Límite superior de temperatura. |
|  | Código de lote. |
|  | Utilizar antes del último día del mes. |
|  | Dispositivo médico diagnóstico <i>in vitro</i> . |
|  | Conforme a los requisitos de la Directiva Europea 98/79/CE correspondiente a los dispositivos médicos diagnósticos <i>in vitro</i> . |
|  | Contenido suficiente para "N" test. |
|  | Atención, consultar las instrucciones de uso. |
|  | Contenido. |
|  | Fabricante. |



5852

Lic. Alejandro Diez
Laboratorio
BioSystems S.A.

Dra. Silvana Zanella
Directora Técnica
BioSystems S.A.



HSV2 ELITE Standard
control de ADN plásmidico por análisis cuantitativo

REF STD032PLD

MATERIAL PROVISTO EN EL PRODUCTO

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación y etiquetado
HSV2 Q - PCR Standard 10 ⁵	solución de plásmido en probeta con tapón ROJO	2 x 200 µL	-
HSV2 Q - PCR Standard 10 ⁴	solución de plásmido en probeta con tapón AZUL	2 x 200 µL	-
HSV2 Q - PCR Standard 10 ³	solución de plásmido en probeta con tapón VERDE	2 x 200 µL	-
HSV2 Q - PCR Standard 10 ²	solución de plásmido en probeta con tapón AMARILLO	2 x 200 µL	-

HSV2 ELITE Standard
control de ADN plásmidico por análisis cuantitativo

REF STD032PLD



INDICE

USO PREVISTO
PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO
MATERIAL PROVISTO EN EL PRODUCTO
MATERIAL REQUERIDO NO PROVISTO EN EL PRODUCTO
OTROS PRODUCTOS REQUERIDOS
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES
PROCEDIMIENTO
BIBLIOGRAFÍA
SIGNIFICADO DE LOS SÍMBOLOS

pág. 1
pág. 1
pág. 2
pág. 2
pág. 2
pág. 3
pág. 4
pág. 4
pág. 4

USO PREVISTO

El producto «HSV2 ELITE Standard» se utiliza como control positivo y ADN estándar de cantidad conocida en las pruebas cualitativas de amplificación de los ácidos nucleicos para la detección y cuantificación del ADN del virus humano Herpes Simplex de tipo 2 (HSV2) con el producto «HSV2 ELITE MGB® KIt» de ELITechGroup S.p.A.

PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO

El producto suministra los Q - PCR Standard, cuatro soluciones estabilizadas de plásmido* de título conocido que contienen las secuencias de interés, dosificadas en dos probetas cada una y listas para su uso. Cada probeta contiene 200 µL de solución, suficiente para ocho sesiones.

El plásmido contiene una región del gen codificante, la glicoproteína G (gpG) de HSV2. La detección del ADN blanco durante la reacción de amplificación real time confirma su capacidad para identificar la presencia del ADN de HSV2 y permite calcular la curva estándar.

El producto permite efectuar 16 sesiones analíticas distintas utilizando 20 µL por reacción.

* No estando disponibles materiales de referencia de orden superior o aprobados por la OMS para HSV2, la concentración del estándar ha sido determinada espectrofotométricamente a través de la medición de la absorbancia de la preparación de ADN del plásmido.

MATERIAL REQUERIDO NO PROVISTO EN EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.
- Guantes sin polvo descartables de látex o similares.
- Mezclador vortex.
- Microcentrifuga de mesa (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas y tips estériles con filtro para aerosol o de dispensación positiva (2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL).
- Agua bidestilada estéril.
- Termostato programable con sistema óptico de detección de la fluorescencia 7300 Real Time PCR System o 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument calibrado según las indicaciones del fabricante.

OTROS PRODUCTOS REQUERIDOS

Los reactivos para la amplificación no están incluidos en este producto. Para realizar estas fases analíticas se aconseja la utilización de los siguientes productos accesorios producidos por ELITechGroup S.p.A.:

«HSV2 ELITE MGB® KIt» (código RTS032PLD), mezcla de reacción completa y lista para su uso para la amplificación real time en una solución estabilizadora.

Para la extracción manual del ADN de las muestras a analizar, se aconseja utilizar los productos genéricos «EXTRAblood» (ELITechGroup S.p.A., código EXTB01), kit de extracción del ADN de muestras celulares o «EXTRAGEN» (ELITechGroup S.p.A., código EXTG01), kit de extracción de los ácidos nucleicos de muestras no celulares.

Para la extracción automática del ADN de las muestras a analizar, se aconseja utilizar los productos genéricos NucliSENS® easyMAG® Reagents (bioMérieux SA, códigos 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), kit de extracción de los ácidos nucleicos de muestras biológicas, con el equipo NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux SA, código 200111).

Para el control positivo de extracción y control de inhibición se requiere el uso de los productos genéricos «CPE-DNA - Internal Control» (ELITechGroup S.p.A., código CTREXTG) o «CPE - Internal Control» (ELITechGroup S.p.A., código CTRCPE), control positivo de extracción de ADN plásmidico para extracciones del ADN de muestras no celulares.

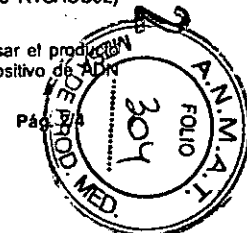
Si estuviera previsto el uso de un equipo 7300 Real-Time PCR System, se aconseja utilizar el producto genérico «Q - PCR Microplates» (ELITechGroup S.p.A., código RTSACC01) microplacas con pocillos de 0,2 mL y láminas adhesivas para la amplificación real time.

Si estuviera previsto el uso de un equipo 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, se aconseja utilizar el producto genérico «Q - PCR Microplates Fast» (ELITechGroup S.p.A., código RTSACC02) microplacas con pocillos de 0,1 mL y láminas adhesivas para la amplificación real time.

Si se requiere la detección del ADN de HSV2 (análisis cualitativo), se aconseja usar el producto genérico «HSV2 - ELITE Positive Control» (ELITechGroup S.p.A., código CTR032PLD), control positivo de ADN plásmidico.

Lic. Alejandro Diez
Biosystems S.A.

DRA SILVIA PANELA
DIRECTORA TECNICA
BIOSYSTEMS S.A.



5052

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto es para uso exclusivo *in vitro*.

Advertencias y precauciones generales

Manipular y eliminar todas las muestras biológicas como si pudiesen transmitir agentes infecciosos. Evitar el contacto directo con las muestras biológicas. No producir salpicaduras ni aerosol. El material que está en contacto con las muestras biológicas debe ser tratado con hipoclorito de sodio al 3% por al menos 30 minutos o bien tratado en autoclave a 121°C durante una hora antes de ser eliminado.

Manipular y eliminar todos los reactivos y todos los materiales utilizados para realizar la prueba como si fuesen potencialmente infecciosos. Evitar el contacto directo con los reactivos. No producir salpicaduras ni aerosol. Los residuos deben ser tratados y eliminados según normas de seguridad adecuadas. El material combustible monouso debe ser incinerado. Los residuos líquidos que contienen ácidos o bases deben ser neutralizados antes de la eliminación.

Usar indumentaria de protección y guantes adecuados, protegerse los ojos / la cara.

No pipetear con la boca ninguna solución.

No comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos en el área de trabajo.

Lavarse bien las manos después del manejo de muestras y reactivos.

Eliminar los reactivos sobrantes y los residuos según las normas vigentes.

Leer atentamente todas las instrucciones provistas en el producto antes de realizar la prueba.

Respetar las instrucciones provistas en el producto durante la ejecución de la prueba.

Respetar la fecha de caducidad del producto.

Utilizar sólo los reactivos presentes en el producto y los aconsejados por el fabricante.

No usar reactivos que provengan de lotes diferentes.

No utilizar reactivos que provengan de productos de otros fabricantes.

Advertencias y precauciones en los procedimientos de biología molecular

Los procedimientos de biología molecular, como la extracción, la transcripción inversa, la amplificación y la detección de ácidos nucleicos, requieren personal competente e instruido para evitar el riesgo de resultados incorrectos, en particular a causa de la degradación de los ácidos nucleicos de las muestras o de la contaminación de las mismas por parte de productos de amplificación.

Es necesario disponer de áreas separadas para la extracción / preparación de las reacciones de amplificación o para la amplificación / detección de los productos de amplificación. Nunca introducir un producto de amplificación en el área de extracción / preparación de las reacciones de amplificación.

Es necesario disponer de batas, guantes e instrumentos destinados para la extracción / preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación / detección de productos de amplificación. Nunca transferir batas, guantes e instrumentos del área de extracción / detección de productos de amplificación al área de extracción / preparación de las reacciones de amplificación.

Las muestras deben ser destinadas exclusivamente a este tipo de análisis. Las muestras deben ser manipuladas bajo una campana de flujo laminar. Las probetas que contengan muestras diferentes nunca deben ser abiertas al mismo tiempo. Las pipetas utilizadas para manipular las muestras deben ser destinadas sólo a este uso. Las pipetas deben ser del tipo de dispensación positiva o usar tips con filtro para aerosol. Los tips utilizados deben ser estériles, sin la presencia de ADNasa y ARNasa, sin la presencia de ADN y ARN.

Los reactivos deben ser manipulados bajo campana de flujo laminar. Los reactivos necesarios para la amplificación deben ser preparados de manera tal que sean utilizados en una sola sesión. Las pipetas utilizadas para manipular los reactivos deben ser destinadas sólo a este uso. Las pipetas deben ser del tipo de dispensación positiva o usar tips con filtro para aerosoles. Los tips utilizados deben ser estériles, sin la presencia de ADNasa y ARNasa, sin la presencia de ADN y ARN.

Los productos de amplificación deben ser manipulados en modo de limitar al máximo su dispersión en el ambiente para evitar contaminaciones. Las pipetas utilizadas para manipular los productos de amplificación deben ser destinadas sólo a este uso.

Advertencias y precauciones específicas para los componentes

El Q - PCR Standard debe ser congelado y descongelado por un máximo de ocho veces. Otros ciclos de congelación / descongelación podrían causar una pérdida de título.

El Q - PCR Standard no presenta frases de riesgo (R) y presenta los siguientes consejos de prudencia (S):

S 23-25. No respirar los gases/humos/vapores/aerosoles. Evitar el contacto con los ojos.

PROCEDIMIENTO

El producto «HSV2 ELITE Standard» debe ser usado con la mezcla completa de reactivo del producto «HSV2 ELITE MGB® Kit».

Antes de uso, extraer y descongelar las probetas de HSV2 Q - PCR Standard. Agitar delicadamente las probetas, centrifugarlas durante 5 segundos para obtener en el fondo el contenido y mantenerlas en hielo.

El HSV2 Q - PCR Standard está listo para su uso, por lo tanto debe utilizarse agregándole 20 µL directamente a la mezcla de reacción.

El procedimiento completo, que prevé la preparación y la realización de una reacción de amplificación real time en microplaca con un termostato programable con sistema óptico de detección de la fluorescencia (thermal cycler para amplificación real time), se describe de manera detallada en el manual de instrucciones para el uso que se adjunta al producto «HSV2 ELITE MGB® Kit».

Las características de las prestaciones y los límites del procedimiento de la prueba completa de detección y cuantificación del ADN de HSV2 se describen de manera detallada en el manual de instrucciones para el uso que se adjunta al producto «HSV2 ELITE MGB® Kit».

Nota: El HSV2 Q - PCR Standard debe ser congelado y descongelado por un máximo de ocho veces.

BIBLIOGRAFÍA

E. Aurelius et al. (1993) *J. Med. Virology* 39: 179 - 186

SIGNIFICADO DE LOS SÍMBOLOS



Número de catálogo.



Límite superior de temperatura.



Código de lote.



Utilizar antes del último día del mes.



Dispositivo médico diagnóstico *in vitro*.



Conforme a los requisitos de la Directiva Europea 98/79/CE correspondiente a los dispositivos médicos diagnósticos *in vitro*.



Contenido suficiente para "N" test.



Atención, consultar las instrucciones de uso.



Contenido.

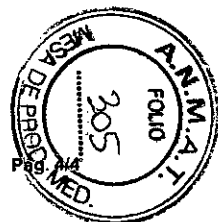


Fabricante.

Lic. Alejandro Diez
Apoderado
Biosystems S.A.

Dra. SILVANA ZANELLA
DIRECTORA TÉCNICA
BIO SYSTEMS S.A.

5852





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

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN DE VENTA DE
PRODUCTOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO

Expediente nº 1-47-6105/11-6


Se autoriza a la firma BIOSYSTEMS S.A. a importar y comercializar los Productos para diagnóstico de uso in vitro denominados 1) **HSV2 ELITE MGB Kit**/ prueba cuali-cuantitativa para la detección y cuantificación de ADN del virus Herpes Simplex tipo 2 (HSV2) en muestras de líquido cefalorraquídeo, sangre entera y plasma recolectado con EDTA, 2) **HSV2 ELITE Positive Control**/ Control positivo en las pruebas cualitativas de detección con HSV2 ELITE MGB Kit 3) **HSV2 ELITE Standard** / Control positivo y ADN standard de cantidad conocida para la detección y cuantificación con HSV2 ELITE MGB Kit. En envases por 1) 100 determinaciones conteniendo: HSV2 Q PCR Mix 4 x 540µl; 2) control positivo 4 x 65µl; 3) HSV2 Q-PCR Standard 10² 2 x 200µl, HSV2 Q-PCR Standard 10³ 2 x 200µl, HSV2 Q-PCR Standard 10⁴ 2 x 200µl y HSV2 Q-PCR Standard 10⁵ 2 x 200µl. Vida útil: VENTICUATRO (24) meses conservado a -20°C. Se le asigna la categoría: venta a Laboratorios de análisis clínicos por hallarse en las condiciones establecidas en la Ley Nº 16.463 y Resolución Ministerial Nº 145/98. Lugar de elaboración: ELITechGroup SpA, Corso Svizzera 185, 10149, Torino (Italia). En las etiquetas de los envases, anuncios y prospectos deberá constar PRODUCTO PARA DIAGNOSTICO USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA. Certificado

nº **008422**

//..
ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA
MEDICA

Buenos Aires,

31 MAYO 2016



Firma y sello

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

