



## PlexPCR<sup>®</sup> VHS

**Ensayo multiplex de PCR en tiempo real para la detección del virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, virus de la varicela-zóster y *Treponema pallidum*.**



Producto	Plataforma	Tamaño (reacciones)	N.º de catálogo
<i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> VHS <sub>(610)</sub>	LC480 II	100	<b>REF</b> 1121001
<i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> VHS <sub>(550)</sub>	ABI 7500 Fast	100	<b>REF</b> 1123001
<i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> VHS <sub>(675)</sub>	CFX96 Dx CFX96 Touch	100	<b>REF</b> 1125001

### Productos complementarios – Software de análisis

<i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> VHS (LC480)	<b>REF</b> 99005
<i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> VHS (7500)	<b>REF</b> 99004
<i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> VHS (CFX)	<b>REF</b> 99006



**MedEnvoy Global B.V.**  
Prinses Margrietplantsoen 33  
Suite 123  
2595 AM La Haya  
Países bajos



**SpeedX Pty Ltd**  
Suite 102, National Innovation Centre  
4 Cornwallis Street, Eveleigh,  
NSW 2015, Australia  
Tel.: +61 2 9209 4170, Correo electrónico: [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au)

### SOLO PARA USO PROFESIONAL\*

No destinado a comercialización en EE. UU.

## Contenido

1	Descripción del producto.....	4
2	Uso previsto.....	4
3	Información sobre el patógeno.....	4
4	Contenido del kit.....	5
5	Envío y almacenamiento.....	6
6	Advertencias y precauciones.....	6
6.1	General.....	6
6.2	Laboratorio.....	6
6.3	Manipulación de las muestras.....	6
6.4	Ensayo.....	6
6.5	Precauciones de seguridad.....	6
6.6	Plugins del ensayo: Advertencias/Precauciones/Limitaciones.....	7
7	Productos y consumibles asociados.....	7
8	Principio de la tecnología.....	9
9	Presentación del procedimiento.....	10
10	Procedimiento detallado.....	11
10.1	Muestras: recogida, transporte y almacenamiento.....	11
10.1.1	Dispositivos de obtención de muestras validados.....	11
10.1.2	Hisopo seco en medio de transporte viral, recogida, transporte y almacenamiento.....	11
10.1.3	Obtención, transporte y conservación del FLOQSwab™ normal estéril en tubo seco (Copan, n.º de cat. 552C).....	11
10.1.4	Obtención, transporte y conservación del hisopo seco suspendido en 1 mL de medio UTM (Copan, n.º de cat. 350C) 11	11
10.2	Procesamiento de las muestras.....	11
10.3	Internal Control (IC) (Control interno (CI)).....	12
10.3.1	Internal Control (control interno) en el QIASymphony SP.....	12
10.3.2	Internal Control (control interno) en el QIAcube HT.....	13
10.3.3	Internal Control (Control interno) en el MagNA Pure 96.....	13
10.4	Preparación de la PCR en tiempo real.....	14
10.4.1	Preparación de la mezcla maestra.....	14
11	Programación y análisis.....	14
12	Interpretación de los resultados.....	15
13	Limitaciones.....	15
14	Control de calidad.....	16
15	Instrucciones del control positivo de HSV/VZV/TP.....	16
15.1	Instrucciones de uso.....	16
16	Características de eficacia.....	17
16.1	Eficacia diagnóstica clínica.....	17
16.1.1	Estudio clínico 1.....	17
16.1.2	Estudio clínico 2.....	17
16.2	Eficacia analítica.....	18
16.2.1	Reproducibilidad y repetibilidad.....	18
16.2.2	Sensibilidad analítica.....	20
16.2.3	Especificidad analítica.....	21

16.2.4	Interferencia competitiva.....	22
16.2.5	Sustancias potencialmente interferentes .....	22
17	Soporte técnico y al cliente .....	23
18	Referencias.....	23
19	Apéndice 1: LightCycler® 480 Instrument II .....	24
19.1	Programación del LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II) .....	24
19.2	Compensación de color para LightCycler® 480 Instrument II .....	31
19.3	Interpretación de los resultados.....	32
20	Apéndice 2: Sistema Applied Biosystems® 7500 Fast .....	33
20.1	Programación del Applied Biosystems® 7500 Fast .....	33
20.2	Interpretación de los resultados.....	36
21	Apéndice 3: Sistema de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Dx™ y CFX96 Touch™ .....	37
21.1	Programar el CFX96 Dx y CFX96 Touch Real-time PCR System .....	37
21.2	Interpretación de los resultados.....	40
22	Apéndice A: Interpretación de resultados utilizando el software de análisis <i>PlexPCR</i> ® VHS.....	41
22.1	Plataforma FastFinder: Requisitos mínimos de TI .....	41
22.2	Complemento de ensayo (nuevo usuario) .....	42
22.3	Nombre de la muestra .....	42
22.4	Análisis.....	43
22.5	Resultados .....	45
22.5.1	Pestaña Summary (de resumen).....	45
22.5.2	Pestaña Details .....	47
22.6	Curva de referencia.....	48
22.7	Exportación de resultados .....	48
22.8	Recuperación de análisis autorizados .....	48
22.9	Gráficos de ejemplo de control .....	48
22.9.1	Control negativo (Na) .....	49
22.9.2	Sin control de plantilla (Nb).....	49
22.9.3	Control positivo (todos los objetivos) (Pa).....	50
22.10	Ejemplos .....	51
22.10.1	Ejemplo 1. Muestra positiva: Objetivo único detectado .....	51
22.10.2	Ejemplo 2. Muestra positiva: Varios objetivos detectados .....	52
22.10.3	Ejemplo 3. Muestra negativa .....	53
22.10.4	Ejemplo 4. Muestra no válida.....	54
23	Glosario .....	56

## 1 Descripción del producto

El kit **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS es un ensayo cualitativo de PCR en tiempo real (qPCR) para la detección del virus del herpes simple 1 (HSV-1), virus del herpes simple 2 (HSV-2), virus de la varicela-zóster (VZV) y *Treponema pallidum*. El ensayo ha sido validado con las muestras extraídas mediante el MagNA Pure 96 (Roche), QIA Symphony<sup>®</sup> SP (QIAGEN) y QIAcube HT (QIAGEN), y la detección en tiempo real que proporciona Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Fast (7500 Fast), Roche LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II (LC480 II) y Bio-Rad CFX96 Dx<sup>™</sup> (CFX96 Dx) y los sistemas CFX96 Touch<sup>™</sup> (CFX96 Touch) Real-time PCR Detection System.

## 2 Uso previsto

El kit **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS es una prueba de PCR en tiempo real de diagnóstico *in vitro* para la detección y diferenciación cualitativa de HSV-1, HSV-2, VZV y *T. pallidum*.

El kit **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS está destinado para ayudar en el diagnóstico de HSV-1, HSV-2, VZV y *T. pallidum* de muestras de hisopos genitales, no genitales, anales/rectales y orales.

Los resultados negativos no excluyen las infecciones por HSV-1, HSV-2, VZV y *T. pallidum* y no deben utilizarse como única base para el diagnóstico, tratamiento u otras decisiones de gestión del paciente.

El kit **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS está indicado para utilizarse en un entorno profesional, por ejemplo en hospitales o laboratorios estatales o de referencia. No está destinado para el autodiagnóstico, uso doméstico o análisis de diagnóstico inmediato.

**ADVERTENCIA: El kit **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS no está destinado para su uso con líquido cefalorraquídeo ni para su uso en el diagnóstico prenatal.**

## 3 Información sobre el patógeno

Los virus del herpes simple de los serotipos 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2) y el virus de la varicela-zóster (VZV) son virus de ADN de doble cadena pertenecientes a la familia Herpesviridae<sup>1</sup>. Las infecciones de HSV-1 y HSV-2 en humanos pueden causar lesiones en una variedad de zonas entre las que se incluye, oral-facial, genital, ojos, piel y sistema nervioso central. Las lesiones pueden ser el resultado de una infección primaria o derivada de la reactivación de una infección latente. El HSV-1 causa predominantemente infecciones orales-faciales, mientras que el HSV-2 se asocia habitualmente con las infecciones de transmisión sexual<sup>2</sup>. La infección primaria con VZV causa varicela, y la posterior reactivación en el sistema nervioso produce el herpes zóster.<sup>3</sup> Las muestras cutáneas incluyen la piel y el pene, y las muestras mucocutáneas incluyen las zonas oculares, orales y vaginales. En raras ocasiones, los virus del herpes también se pueden asociar con encefalitis viral y meningitis, así como con infecciones neonatales causadas por transmisión perinatal.

El *Treponema pallidum subespecie pallidum* (*T. pallidum*) es una bacteria espiroqueta que es el agente causal de la sífilis, una enfermedad de transmisión sexual capaz de infectar una variedad de tejidos y órganos. La típica característica de la sífilis primaria es la aparición de una lesión cutánea llamada chancro en la zona de la infección<sup>4</sup>. Esto generalmente ocurre en las regiones genitales, pero también puede ocurrir en las zonas extragenitales de inoculación, incluyendo las zonas orales-faciales. La sífilis secundaria se caracteriza por un sarpullido difuso en el torso y las extremidades, y también puede manifestarse como lesiones de la mucosa en las zonas orales y genitales<sup>5</sup>. La sífilis terciaria, si no se trata, puede provocar manifestaciones más graves, como hepatitis, artritis, neurosífilis, sífilis cardiovascular y sífilis granulomatosa<sup>4</sup>.

#### 4 Contenido del kit

Número de pruebas: Suficiente para 100 reacciones (reacción de 20 µL)

Tabla 1. Contenido del kit <i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> VHS <sub>(610)</sub> (cat. n.º 1121001)			
Color del tapón	Contenido	Descripción	Cantidad
Azul	<i>Plex</i> Mastermix, 2x	Mezcla maestra con los componentes necesarios para la qPCR, como dNTP, ADN polimerasa y tampón	1 x 1 mL
Verde	VHS Mix, 20x	Mezcla con oligonucleótidos <sup>^</sup> para la amplificación y la detección de HSV-1, HSV-2, VZV y <i>T. pallidum</i>	1 x 100 µL
Blanco	Control Mix (mezcla de control) 1, 20x	Mezcla con oligonucleótidos <sup>^</sup> para la amplificación y la detección del ensayo de control interno para LC480 II	1 x 100 µL
Rojo	Internal Control Cells (células de control interno) <sup>#</sup>	Células de control interno con patrón de ADN de control interno para determinar la eficacia de la extracción y la amplificación	1 x 500 µL
Neutro	Agua sin nucleasa	Agua para PCR	1 x 1 mL

# Almacene los tubos patrón separados de las mezclas de oligonucleótidos, es decir, en la sala de manipulación de patrones o ácidos nucleicos.

<sup>^</sup> Los oligonucleótidos son parejas de cebadores de PCR, *PlexZyme*<sup>®</sup> enzimas y sondas fluorescentes

Tabla 2. Contenido del kit <i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> VHS <sub>(550)</sub> (cat. n.º 1123001)			
Color del tapón	Contenido	Descripción	Cantidad
Azul	<i>Plex</i> Mastermix, 2x	Mezcla maestra con los componentes necesarios para la qPCR, como dNTP, ADN polimerasa y tampón	1 x 1 mL
Verde	VHS Mix, 20x	Mezcla con oligonucleótidos <sup>^</sup> para la amplificación y la detección de HSV-1, HSV-2, VZV y <i>T. pallidum</i>	1 x 100 µL
Blanco	Control Mix (mezcla de control) 2, 20x	Mezcla con oligonucleótidos <sup>^</sup> para la amplificación y la detección del ensayo de control interno para 7500 Fast	1 x 100 µL
Rojo	Internal Control Cells (células de control interno) <sup>#</sup>	Células de control interno con patrón de ADN de control interno para determinar la eficacia de la extracción y la amplificación	1 x 500 µL
Neutro	Agua sin nucleasa	Agua para PCR	1 x 1 mL

# Almacene los tubos patrón separados de las mezclas de oligonucleótidos, es decir, en la sala de manipulación de patrones o ácidos nucleicos.

<sup>^</sup> Los oligonucleótidos son parejas de cebadores de PCR, *PlexZyme*<sup>®</sup> enzimas y sondas fluorescentes

Tabla 3. Contenido del kit <i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> VHS <sub>(675)</sub> (cat. n.º 1125001)			
Color del tapón	Contenido	Descripción	Cantidad
Azul	<i>Plex</i> Mastermix, 2x	Mezcla maestra con los componentes necesarios para la qPCR, como dNTP, ADN polimerasa y tampón	1 x 1 mL
Verde	VHS Mix, 20x	Mezcla con oligonucleótidos <sup>^</sup> para la amplificación y la detección de HSV-1, HSV-2, VZV y <i>T. pallidum</i>	1 x 100 µL
Blanco	Control Mix (mezcla de control) 3, 20x	Mezcla con oligonucleótidos <sup>^</sup> para la amplificación y la detección del ensayo de control interno para CFX96 Dx y CFX96 Touch	1 x 100 µL
Rojo	Internal Control Cells (células de control interno) <sup>#</sup>	Células de control interno con patrón de ADN de control interno para determinar la eficacia de la extracción y la amplificación	1 x 500 µL
Neutro	Agua sin nucleasa	Agua para PCR	1 x 1 mL

# Almacene los tubos patrón separados de las mezclas de oligonucleótidos, es decir, en la sala de manipulación de patrones o ácidos nucleicos.

<sup>^</sup> Los oligonucleótidos son parejas de cebadores de PCR, *PlexZyme*<sup>®</sup> enzimas y sondas fluorescentes

## 5 Envío y almacenamiento

- Los componentes de los kits **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS se envían en nieve carbónica o paquetes de gel frío. Todos los componentes deben conservarse entre -25 °C y -15 °C tras la recepción. Se recomienda limitar a 15 los ciclos de congelación/descongelación.
- La eficacia de los kits se mantiene hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta si el kit se almacena en las condiciones recomendadas y se manipula adecuadamente. No debe utilizarse con posterioridad a la fecha de caducidad.

## 6 Advertencias y precauciones

### 6.1 General

- Solo para uso diagnóstico *in vitro*.
- Lea atentamente estas instrucciones de uso antes de utilizar el producto. Siga detenidamente los procedimientos descritos para garantizar la legibilidad de los resultados de la prueba. Cada vez que no siga los procedimientos, puede afectar a la eficacia de la prueba.
- Se debe formar al usuario adecuadamente para utilizar el ensayo **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS.
- Cualquier incidente grave deberá notificarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario y/o el paciente.

### 6.2 Laboratorio

- Se recomienda llevar a cabo la preparación y extracción de las muestras, la preparación de las mezclas maestras, la adición de las muestras y el termociclado en espacios separados. Como mínimo, lo ideal es que se sitúe el instrumento de PCR en una habitación separada de las zonas en las que se preparen las reacciones.
- Se recomienda tomar las precauciones habituales de laboratorio. Al manipular los reactivos, lleve equipo de protección personal adecuado, como guantes, protección ocular y bata de laboratorio.
- En las muestras clínicas puede haber organismos patógenos. Todas las muestras biológicas deben manipularse como si fuesen potencialmente infecciosas, y se deben seguir los procedimientos de seguridad para manipular muestras químicas y biológicas establecidos por la institución.
- Siga los procedimientos para desechar los residuos peligrosos de su institución para el correcto desecho de las muestras, reactivos y demás materiales potencialmente contaminados.

### 6.3 Manipulación de las muestras

- Las muestras deben tomarse, transportarse y almacenarse siguiendo técnicas de laboratorio estándar, o conforme a las instrucciones del kit de recogida.

### 6.4 Ensayo

- Las precauciones básicas para evitar la contaminación de las reacciones de PCR incluyen el uso de puntas de pipeta con filtro estériles, el uso de una punta de pipeta nueva para cada acción de pipeteo y la separación del flujo de trabajo.
- Las pruebas de PCR son propensas a resultar contaminadas por productos de PCR anteriores. Nunca abra los vasos de reacción después de que acabe la PCR.
- Los reactivos de ensayo contienen tampón IDTE que puede causar irritación ocular grave. Se recomienda utilizarlos en una zona bien ventilada y llevar equipo de protección personal adecuado, como guantes, gafas protectoras y bata de laboratorio, cuando se manipulen los reactivos.

### 6.5 Precauciones de seguridad

- Hay disponibles fichas de datos de seguridad (FDS) si se solicitan. Contacte con [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au) para obtener más información.

## 6.6 Plugins del ensayo: Advertencias/Precauciones/Limitaciones

- El software SpeedX solo puede controlar el análisis de los datos brutos generados a partir del kit del ensayo cuando se utiliza con su respectivo instrumento de PCR. No controla la preparación de las muestras, las reacciones, la programación del equipo ni la administración del tratamiento.
- Los usuarios deben estar debidamente formados en el uso del software de análisis **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS, y el acceso debe limitarse a cada usuario asignado.
- Se recomienda implementar la autenticación de acceso de los usuarios y los controles de ciberseguridad tales como software antivirus o el uso de un cortafuegos dentro del sistema informático y la infraestructura que utiliza el software.
- Si detecta un incidente de ciberseguridad, como un acceso no autorizado o un ataque de ransomware, póngase en contacto con [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au) para obtener más ayuda.

## 7 Productos y consumibles asociados

### *Material de control positivo*

- Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n.º cat. 95007). Consulte la **Sección 15.1** para obtener las instrucciones de uso.

### *Dispositivos de obtención de muestras*

- FLOQSwab<sup>™</sup> normal estéril en tubo seco (Copan, n.º de cat. 552C)
- Hisopo seco suspendido en 1 mL de medio UTM (Copan, n.º de cat. 350C)

### *Consumibles generales de laboratorio*

- Guantes y batas de laboratorio limpias
- Agitadora vorticial
- Centrífuga de sobremesa para tubos de 0,5 mL y 1,5 mL
- Micropipetas
- Puntas de pipeta estériles resistentes a los aerosoles
- Tubos de 0,5 mL o tubos de 1,5 mL (para PCR)
- Tubo de 2,0 mL (para la predilución de células de control interno)
- Medios de transporte universales (UTM) para la preparación del control positivo de HSV/VZV/TP. Consulte la **Sección 15.1** para obtener más información.

### *Para el MagNA Pure 96 Instrument*

- 1 Phosphate Buffered Saline (PBS) (Tampón fosfato salino, PBS)
- MagNA Pure 96 Internal Control Tube (Roche, Cat. n.º 06374905001)
- MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche, n.º de cat. 06543588001)
- MagNA Pure 96 System Fluid (externo) (Roche, cat. n.º 06640729001)
- MagNA Pure 96 Processing Cartridge (Roche, cat. n.º 06241603001)
- MagNA Pure 96 Pure tip 1000 µL (Roche, cat. n.º 6241620001)
- MagNA Pure 96 Output Plate (Roche, cat. n.º 06241611001)
- Papel de sellado MagNA Pure Sealing Foil (Roche, cat. n.º 06241638001)

### *Para el instrumento QIA Symphony<sup>®</sup> SP*

- 1 Phosphate Buffered Saline (PBS) (Tampón fosfato salino, PBS)
- Cartuchos de preparación de muestras de 8 pocillos (Qiagen, cat. n.º 997002)
- Fundas para 8 varillas (Qiagen, cat. n.º 997004)
- Puntas con filtro, 200 µL y 1500 µL (Qiagen, cat. n.º 990332 y 997024)
- Tubos de 2 mL (utilizados para preparar la mezcla de control interno) (Sarstedt, cat. n.º 72.639 o 72.694)
- Tubos de 14 mL (utilizados para preparar la mezcla de control interno) (Corning, cat. n.º 352051)

*Para el instrumento QIAcube HT*

- 1 Phosphate Buffered Saline (PBS) (Tampón fosfato salino, PBS)
- Kit QIAamp 96 Virus QIAcube HT (Qiagen, cat. n.º 57731)
- Pipetas y puntas de pipeta desechables con barreras de aerosol (20-1000 µL)
- Isopropanol
- Etanol (96-100%)
- Cubetas reactivas QIAcube HT
- Tampón ATL (Qiagen, cat. n.º 19076)
- QIAGEN Proteinase K (Qiagen, cat. n.º 19131 o 19133)

*Para el Applied Biosystems® 7500 Fast*

- Placas MicroAmp® Optical 96-well reaction plates (ThermoFisher Scientific, cat. n.º 4316813)
- Adhesivo MicroAmp® Optical Adhesive Film (ThermoFisher Scientific, cat. n.º 4360954)

*Para el instrumento LightCycler® 480 Instrument II*

- **PlexPCR**® Colour Compensation (CC) kit (SpeedX, cat. n.º 90001)
- Placa LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (Roche, cat. n.º 04729692001)
- Papel de sellado LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche, cat. n.º 04729757001)

*Para los sistemas Bio-Rad CFX96™ Dx y el CFX96 Touch™ Real-time PCR Detection System*

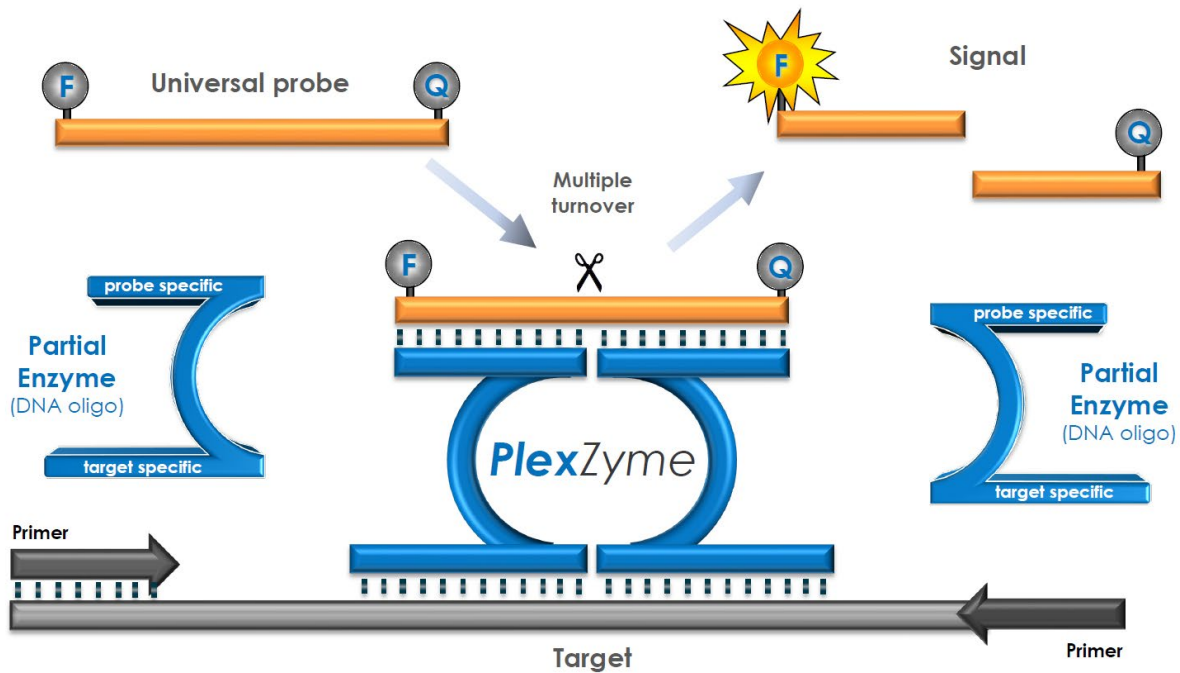
- Placas Multiplate® 96-well PCR plates (Bio-rad, cat. n.º MLP9601)
- Papel de sellado Microseal® PCR Plate sealing Film (Bio-Rad, cat. n.º MSB1001)

## 8 Principio de la tecnología

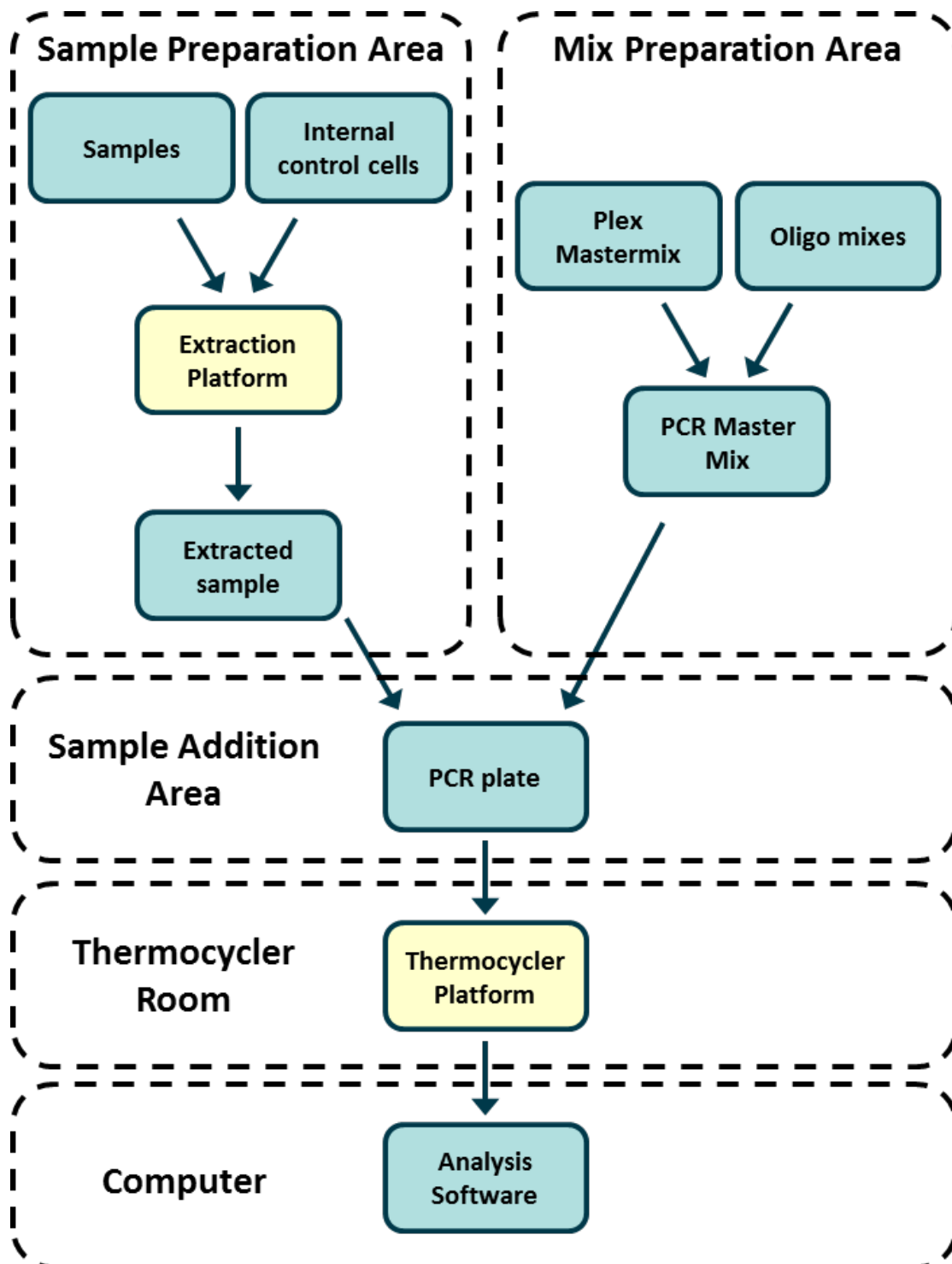
La PCR en tiempo real (qPCR) se puede utilizar para amplificar y detectar ácidos nucleicos diana específicos de patógenos. **PlexPCR**<sup>®</sup> es una tecnología qPCR que utiliza enzimas **PlexZyme**<sup>®</sup> que detectan y notifican el producto amplificado mediante la generación de una señal fluorescente (**Figura 1**).

Las enzimas **PlexZyme**<sup>®</sup> son complejos de ADN catalíticos compuestos por dos oligos de ADN que se denominan “Enzimas parciales”. Cada enzima parcial tiene una región específica de diana, un núcleo catalítico y una región de unión a la sonda universal. Cuando el producto diana está presente, las dos enzimas parciales se unen de manera adyacente para formar la **PlexZyme**<sup>®</sup> activa, que tiene actividad catalítica para escindir una sonda marcada. La escisión separa el fluoróforo del colorante inactivador, produciendo una señal fluorescente que puede monitorizarse en tiempo real. Las enzimas **PlexZyme**<sup>®</sup> tienen especificidad adicional en comparación con otras tecnologías de detección, ya que dos enzimas parciales deben unirse para efectuar la detección. Las enzimas **PlexZyme**<sup>®</sup> también son enzimas de uso múltiple, y se pueden escindir varias sondas en cada ciclo de la PCR, dando lugar a una señal intensa y sensible. Los ensayos **PlexZyme**<sup>®</sup> son muy sensibles y específicos, y resultan idóneos para la detección multiplexada de patógenos.

**Figura 1. Representación esquemática de la detección y señalización universal con **PlexZyme**<sup>®</sup>**



9 Presentación del procedimiento



## 10 Procedimiento detallado

**Nota:** Los reactivos suministrados se indican en cursiva y a continuación se incluye el color del tubo entre paréntesis.

### 10.1 Muestras: recogida, transporte y almacenamiento

Las muestras de lesiones genitales, extragenitales, no genitales, anales/rectales y orales, masculinas y femeninas, deben recogerse, transportarse y almacenarse mediante técnicas de laboratorio estándar o de acuerdo con las instrucciones del kit de recogida.

#### 10.1.1 Dispositivos de obtención de muestras validados

Una obtención, conservación y transporte de las muestras inadecuados o inapropiados es probable que generen resultados de análisis falsos. Es muy recomendable realizar la formación adecuada para la obtención de muestras, a fin de asegurar la calidad y la estabilidad de las muestras.

A continuación, se incluyen los dispositivos de obtención de muestras que se han validado con el kit *PlexPCR*<sup>®</sup> VHS, junto con una breve guía respecto a las instrucciones de obtención, manejo y transporte del fabricante. Estas instrucciones no reemplazan ni sustituyen a ninguna instrucción proporcionada por el fabricante. Consulte siempre las instrucciones de obtención de muestras del fabricante del dispositivo para conocer los métodos de obtención adecuados.

Antes de poner en práctica un método de obtención, el personal debidamente formado debe asegurarse de que entiende bien el dispositivo y el método. Como mínimo, revise la descripción de la prueba respecto a lo siguiente: indicación del tipo de muestra, volumen suficiente, procedimientos, materiales de obtención necesarios, preparación del paciente e instrucciones de manipulación y conservación adecuadas.

#### 10.1.2 Hisopo seco en medio de transporte viral, recogida, transporte y almacenamiento

Los hisopos secos pueden utilizarse para que el facultativo o el paciente obtengan diversas muestras. Debido a la variabilidad, consulte el prospecto del fabricante para conocer los tipos de muestras y los métodos de obtención adecuados.

#### 10.1.3 Obtención, transporte y conservación del FLOQSwab<sup>™</sup> normal estéril en tubo seco (Copan, n.º de cat. 552C)

1. Abra la bolsa en el lado indicado por la flecha y retire el hisopo, teniendo cuidado de no tocar nada con la punta del hisopo.
2. Obtenga la muestra. Durante la obtención de la muestra, la punta del hisopo solo debe entrar en contacto con la zona de la que se va a obtener la muestra, para reducir los riesgos de contaminación.
3. Procese el hisopo de acuerdo con el procedimiento de laboratorio interno.
4. Conservación sugerida a 4°C durante un máximo de 24 horas. Para una conservación a largo plazo, conservar a -80°C o a una temperatura inferior.

#### 10.1.4 Obtención, transporte y conservación del hisopo seco suspendido en 1 mL de medio UTM (Copan, n.º de cat. 350C)

1. Abra el envase del kit UTM y retire el tubo de análisis con medio y la bolsa interna que contiene el hisopo estéril.
2. Saque el hisopo estéril de la bolsa y obtenga la muestra clínica; para evitar el riesgo de contaminación, asegúrese de que la punta del hisopo entre en contacto solo con el lugar de obtención.
3. Después de obtener la muestra, desenrosque y retire la tapa del tubo de análisis, teniendo cuidado de no verter el medio.
4. Inserte el hisopo en el tubo de análisis hasta que el punto de rotura esté al nivel de la abertura del tubo de análisis.
5. Doble y rompa el hisopo por el punto de rotura sujetando el tubo de análisis lejos de la cara y deseche la parte sobrante.
6. Enroque la tapa de nuevo en el tubo de análisis y ciérrela herméticamente.
7. Procesar la muestra contenida en el UTM en las 48 horas siguientes a la obtención, conservando el tubo de ensayo a 4°C durante un máximo de 24 horas. Para una conservación a largo plazo, conservar a -80°C o a una temperatura inferior.
8. Antes del procesamiento, agite con un vórtex durante 20 segundos, para favorecer la separación de la muestra del hisopo y homogeneizar el medio.

### 10.2 Procesamiento de las muestras

El kit *PlexPCR*<sup>®</sup> VHS se ha validado en los instrumentos de extracción indicados en la **Tabla 4**.

Consulte la **sección 10.3** para obtener instrucciones para el uso del Internal Control (control interno).

Tabla 4. Protocolos de extracción validados				
Instrumento	Kit de extracción	Volumen de muestra	Protocolo	Volumen de elución
QIAasymphony SP <sup>a</sup>	DSP Virus/Pathogen Minikit	200 µL	Cellfree200_V7_DSP	85 µL
QIAcube HT <sup>b</sup>	QIAamp® 96 Virus QIAcube® HT Kit	200 µL	QIAamp 96 Virus QIAcube HT.QSP	60 µL
MagNA Pure 96 <sup>c</sup>	MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit	200 µL	Pathogen Universal 200	100 µL

<sup>a</sup> Consulte la **sección 10.3.1** para aprender a usar el control interno de QIAasymphony SP

<sup>b</sup> Consulte la **sección 10.3.2** para aprender a usar el control interno con QIAcube HT

<sup>c</sup> Consulte **10.3.3** para saber cómo utilizar el control interno con el sistema MagNA Pure 96. El medio líquido del hisopo de Positive Control HSV/VZV/TP eluido se ha verificado para la extracción de ácido nucleico con este método. Consulte la **Sección 15.1** para obtener más información.

### 10.3 Internal Control (IC) (Control interno (CI))

En el kit viene incluido un control interno para determinar la eficiencia de la extracción y la inhibición de la qPCR. El ensayo del control interno se suministra como una *Control Mix (mezcla de control)* (**BLANCA**) e *Internal Control Cells (células de control interno)* (**ROJAS**). La *Control Mix (mezcla de control)* se añade a la PCR Master Mix (mezcla maestra de PCR) (**Tabla 10**). Las *Internal Control Cells (células de control interno)* contienen el patrón de ADN de control interno. Las *Internal Control Cells (células de control interno)* se diluyen y se procesan como se indica a continuación para los instrumentos de extracción específicos. Por lo tanto, el patrón de ADN de control interno se extrae concomitantemente con la muestra y se amplifica concomitantemente en la reacción.

#### 10.3.1 Internal Control (control interno) en el QIAasymphony SP

Para obtener información detallada, consulte las "Instrucciones de uso del virus/patógeno de DSP de QIAasymphony (Manual)". Se debe preparar la mezcla de control interno-ARN portador-tampón AVE justo antes de empezar el análisis. La extracción se debe realizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Diluya las *Internal Control Cells (células de control interno)* (**ROJAS**) a una dilución 1:50 en 1 PBS (**Tabla 5**). Ajuste el volumen según sea necesario utilizando el mismo factor de dilución correspondiente al número de muestras requerido.

**Nota:** NO almacene Internal Control Cells (células de control interno) diluidas

Tabla 5. Dilución de Internal Control Cells (células de control interno) para el QIAasymphony (dilución 1:50)		
Internal Control Cells (células de control interno) (ROJAS) (µL)	1 PBS (µL)	Volumen total (µL)
40	1960	2000

A continuación, se usan las células de control interno para preparar una mezcla de control interno-ARN portador-tampón AVE, tal y como se muestra en la **Tabla 6**. Ajuste el volumen según sea necesario utilizando el mismo factor de dilución correspondiente al número de muestras requerido (consulte el manual del kit de extracción para saber el volumen mínimo para el número de muestras requerido).

Los tubos que contienen la mezcla de control interno-ARN portador-tampón AVE, se colocan en un porta-tubos y se cargan en el compartimento A del cajón de muestras del QIAasymphony® SP. Se agregan 120 µL (cantidad predeterminada) de la mezcla a cada muestra.

**Tabla 6. Preparación de la mezcla de control interno-ARN portador-tampón AVE para el QIAAsymphony**

Tipo de tubo	Número de muestras	N.º de células de control interno disueltas (µL)	Disolución con ARN portador (µL)	Tampón AVE (µL)	Volumen total (µL)
-	1	10	3	107	120
2 mL	1 + volumen vacío <sup>^</sup>	40	12	428	480
14 mL	1 + volumen vacío <sup>#</sup>	60	18	642	720

<sup>^</sup> El tubo de 2 mL requiere 3 muestras más (360 µL) para compensar el volumen vacío.

<sup>#</sup> El tubo de 14 mL requiere 5 muestras más (600 µL) para compensar el volumen vacío.

### 10.3.2 Internal Control (control interno) en el QIAcube HT

Diluya las *Internal Control Cells (Células de control interno)* (**ROJAS**) a una dilución 1:10 en PBS 1x (consulte la **Tabla 7** para ver resultados de ejemplo). Ajuste el volumen según sea necesario utilizando el mismo factor de dilución correspondiente al número de muestras requerido.

**Nota:** NO almacene *Internal Control Cells (células de control interno)* diluidas

**Tabla 7. Dilución de Internal Control Cells (células de control interno) para el QIAcube HT (dilución 1:10)**

<i>Internal Control Cells (células de control interno)</i> ( <b>ROJAS</b> ) (µL)	1 PBS (µL)	Volumen total (µL)
30	270	300

Las células de control interno diluidas se utilizan para preparar la mezcla de control interno-ARN portador-tampón ACL y células de control interno. Los volúmenes requeridos por muestra se muestran en el "Manual de usuario de QIAcube HT"; consulte la **Tabla 8** para ver resultados de ejemplo.

El software QIAcube HT calcula los volúmenes de reactivos y el número de puntas necesarias para completar el protocolo. Estos valores se muestran con la distribución de la mesa de trabajo en el espacio de trabajo de QIAcube HT. Para obtener información detallada, consulte el "Manual de usuario de QIAcube HT". La mezcla de ACL debe prepararse y añadirse a la cubeta correspondiente justo antes de empezar el análisis. La extracción se debe realizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**Tabla 8. Preparación de la mezcla de control interno-ARN portador-tampón ACL**

Número de muestras	N.º de células de control interno disueltas (µL)	Disolución con ARN portador (µL)	Tampón ACL (mL)
24	280	140	4,5

Abra el archivo de ejecución de QIAcube HT correspondiente al protocolo QIAcube HT.QSP del virus QIAcube 96, haga clic en el botón de ejecución para iniciar el análisis.

### 10.3.3 Internal Control (Control interno) en el MagNA Pure 96

Diluya las *Internal Control Cells (células de control interno)* (**ROJAS**) a una dilución 1:200 en 1 PBS (**Tabla 9**). Ajuste el volumen según sea necesario utilizando el mismo factor de dilución (consulte el manual del kit de extracción para saber el volumen mínimo para el número de muestras requerido). Las células de control interno diluidas se cargan en el Internal Control Tube (tubo de control interno) en el MagNA Pure 96 y se agregan 20 µL automáticamente a cada muestra (valor predeterminado).

**Nota:** NO almacene *Internal Control Cells (células de control interno)* diluidas

**Tabla 9. Dilución de Internal Control Cells (células de control interno) para el MagNA Pure 96 (dilución 1:200)**

<i>Internal Control Cells (células de control interno)</i> <b>(ROJAS)</b> (μL)	1 PBS (μL)	Volumen total (μL)	Volumen agregado a la muestra (μL)
18	3582	3600	20

#### 10.4 Preparación de la PCR en tiempo real

**Nota:** Antes de utilizar los reactivos, descongélelos por completo y mézclelos bien mediante una breve agitación vorticial.

En **Tabla 1 – Tabla 3** se describe el contenido del kit.

##### 10.4.1 Preparación de la mezcla maestra

Para obtener un volumen de reacción de 20 μL, son necesarios 15 μL de mezcla maestra y 5 μL de extracto. Prepare la mezcla maestra como se indica en la **Tabla 10**.

- Pipetee la mezcla maestra en la placa de PCR y, a continuación, agregue la muestra extraída a la reacción.
- En cada placa deberán realizarse controles positivos y negativos.
- Selle la placa, después centrifúguela y transfírela al termociclador.

<b>Tabla 10. Mezcla maestra</b>		
Reactivo	Concentración	Volumen por reacción de 20 μL (μL)
Nuclease Free Water (agua sin nucleasa) <b>(Neutra)</b>	—	3,0
<b>Plex</b> Mastermix (mezcla maestra Plex) <b>(BLUE)</b>	2x	10,0
VHS mix, 20x <b>(VERDE)</b>	20x	1,0
Control Mix <sup>‡</sup> (mezcla de control) <b>(BLANCA)</b>	20x	1,0
Volumen total (μL)		15,0
Añada 5 μL de muestra para obtener un volumen final de 20 μL		

<sup>‡</sup> Las mezclas de control son específicas para los instrumentos qPCR; consulte la **Sección 4** para conocer la mezcla de control suministrada.

## 11 Programación y análisis

Los detalles de la programación y el análisis se describen en la **Sección 19 - Sección 21**.

El kit **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS utiliza cinco canales para la detección de HSV-1, HSV-2, VZV y *T. pallidum* y Control Interno (**Tabla 11**).

**Tabla 11. Canales para las dianas de PlexPCR<sup>®</sup> VHS**

Instrumento de qPCR	HSV-2	HSV-1	VZV	Control interno	<i>T. pallidum</i>
LC480 II	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660
7500 Fast	FAM	JOE	Texas Red	TAMRA	Cy5
CFX96 Dx y CFX96 Touch	FAM	HEX	Texas Red	Quasar 705	Cy5

## 12 Interpretación de los resultados

Para la interpretación de datos se precisa el software de análisis **PlexPCR® VHS**. El software de análisis de **PlexPCR® VHS** automatiza la interpretación de la información sobre los resultados de la amplificación y optimiza el flujo de trabajo. Las instrucciones de uso del software de análisis se describen en la **Sección 22**.

Consulte la **Tabla 12** para ver el software de análisis adecuado para cada uno de los instrumentos de PCR en tiempo real. El software de análisis se puede proporcionar si se solicita. Contacte con [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au) para obtener más información.

Tabla 12. Software de análisis		
N.º de cat.	Software de análisis	Instrumento de qPCR
99005	<b>PlexPCR® VHS</b> (LC480)	LC480 II
99004	<b>PlexPCR® VHS</b> (7500)	7500 Fast
99006	<b>PlexPCR® VHS</b> (CFX)	CFX96 Dx y CFX96 Touch

Consulte el sitio web <https://www.plexpcr.com/plexpcr-vhs/resources> para asegurarse de que está utilizando la versión más reciente del software de análisis.

## 13 Limitaciones

- El ensayo **PlexPCR® VHS** solo lo debe llevar a cabo personal formado en el procedimiento, y se debe realizar conforme a estas instrucciones de uso.
- La fiabilidad de los resultados depende de que tanto la recogida, el transporte, el almacenamiento y el procesamiento de las muestras se realicen correctamente. Si no se siguen los procedimientos adecuados en alguno de los pasos, se podrían obtener resultados incorrectos.
- El ensayo **PlexPCR® VHS** es un ensayo cualitativo que no proporciona valores cuantitativos ni información sobre la carga de organismos.
- Los resultados de la prueba deben correlacionarse con el historial médico, los datos epidemiológicos, los datos procedentes del laboratorio, y otros datos que el médico pueda tener disponibles.
- Los resultados negativos no excluyen la posibilidad de que exista infección, lo cual puede deberse a una recogida de muestras incorrecta, errores técnicos, la presencia de inhibidores, la mezcla de muestras o un número reducido de organismos en la muestra clínica.
- Se pueden producir falsos positivos por la contaminación cruzada procedente de organismos diana, de sus ácidos nucleicos o del producto amplificado.
- El kit **PlexPCR® VHS** no está destinado para su uso con líquido ceforraquídeo ni para su uso en el diagnóstico prenatal

## 14 Control de calidad

El kit **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS incluye un control interno para supervisar la eficiencia de la extracción y la inhibición de la qPCR (**sección 10.3**).

El Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n.º cat. 95007) se recomienda como control positivo externo. Los controles positivos externos se utilizan para las pruebas sistemáticas de control de calidad para ayudar al usuario a detectar condiciones inesperadas que pueden conducir a errores de prueba. Las instrucciones detalladas se proporcionan en la **Sección 15.1** para el Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n.º cat. 95007). Se recomienda utilizar una muestra negativa conocida como control negativo.

## 15 Instrucciones del control positivo de HSV/VZV/TP

El Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n.º cat. 95007) es el control positivo externo recomendado que se ha validado para su uso como control positivo externo con el kit **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS. Los controles positivos externos se utilizan para las pruebas sistemáticas de control de calidad para ayudar al usuario a detectar condiciones inesperadas que pueden conducir a errores de prueba.

El Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n.º cat. 95007) debe conservarse entre 2 °C y 30 °C hasta su uso. Una vez abierto, el Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n.º cat. 95007) no debe reutilizarse.

Consulte el prospecto de Positive Control HSV/VZV/TP para obtener más información sobre el almacenamiento y las limitaciones.

### 15.1 Instrucciones de uso

Prepare el Positive Control HSV/VZV/TP de SpeedX en medio de transporte universal (UTM) sumergiendo la punta del hisopo en 3 mL de UTM, luego rompa el hisopo en el punto de rotura antes de cerrar la tapa de rosca e incube a temperatura ambiente durante un minuto. Agite el vial con la punta sumergida durante 45 segundos (no retire la punta).

El medio líquido del hisopo de Positive Control HSV/VZV/TP eluido se ha verificado para la extracción de ácido nucleico con el sistema MagNA Pure 96. Procese el medio líquido procedente del hisopo del Positive Control HSV/VZV/TP eluido en la etapa de extracción de ácidos nucleicos con el sistema MagNA Pure 96, según se describe en la **Sección 10.2** y la **Sección 10.3.3**.

Prepare las reacciones qPCR como se describe en la **Sección 10.4** con el control positivo como muestra.

Una vez preparado el control positivo en 3 mL de UTM, puede alicuotarse en volúmenes de un solo uso (volumen de alícuota recomendado de 210 µL) y es estable a entre -25 °C y -15 °C durante 30 días.

Una vez abierta la bolsa de aluminio, el hisopo para Positive Control HSV/VZV/TP debe utilizarse de inmediato.

## 16 Características de eficacia

### 16.1 Eficacia diagnóstica clínica

#### 16.1.1 Estudio clínico 1

Se realizó un estudio clínico retrospectivo en el Public Health Laboratory (Laboratorio de Salud Pública) (PHL), Bristol, Inglaterra. Se obtuvieron muestras de enero a marzo de 2017 y, sobre la base de los resultados obtenidos en laboratorios clínicos, se seleccionaron 222 muestras de hisopos positivas y 205 muestras de hisopos negativas para su inclusión en el estudio. Las 222 muestras consistían en 161 hisopos genitales, 14 hisopos anales/rectales, 46 hisopos no genitales y 1 hisopo (ningún sitio especificado). Las muestras se extrajeron utilizando la plataforma de extracción QIAAsymphony SP (Qiagen) utilizando el minikit de virus/patógenos de DSP (Qiagen) y el protocolo Cell free 200. Se extrajeron 200 µL de muestra y el volumen de elución final fue de 85 µL. Las muestras se probaron en reacciones de 20 µL en el instrumentos 7500 Fast utilizando el kit **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS<sub>(550)</sub>.

La eficacia del kit **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS se comparó con los resultados de laboratorio clínico de la PCR en tiempo real del PHL de Bristol, y el resultado interno se consideró como el resultado verdadero. La sensibilidad y especificidad del kit **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS se muestran en la **Tabla 13**. **Tabla 14** aparecen los análisis de los resultados según el tipo de muestra.

Tabla 13. Comparación del kit <b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> VHS <sub>(550)</sub> y los ensayos internos de PCR en tiempo real del PHL									
		Ensayos internos de PCR en tiempo real del PHL							
		Resultado de HSV-1		Resultado de HSV-2		Resultado de VZV		Resultado de <i>T. pallidum</i>	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
<b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> VHS <sub>(550)</sub>	Positivo	83	1	70	1	47	1	21	0
	Negativo	2	341	0	356	0	379	0	406
Total		85	342	70	357	47	380	21	406
Sensibilidad		97,7% (95 % IC 91,8-99,7%)		100,0% (95 % IC 94,9-100,0%)		100,0% (95 % IC 92,5-100,0%)		100,0% (95 % IC 83,9-100%)	
Especificidad		99,7% (95 % IC 98,4-100,0%)		99,7% (95 % IC 98,5-100,0%)		99,7% (95 % IC 98,5-100,0%)		100,0% (95 % IC 99,1-100,0%)	

95% IC – intervalo de confianza del 95%

Tabla 14. Análisis de los resultados clínicos según el tipo de muestra					
Muestra	HSV-1	HSV-2	VZV	<i>T. pallidum</i>	Negativo
Genital	73/75	66/66	0/0	21/21	190/190
Anal/rectal	10/10	3/3	1/1	0/0	12/13
No genital	0/0	0/0	46/46	0/0	0/0

#### 16.1.2 Estudio clínico 2

Se realizó un estudio clínico prospectivo-retrospectivo en el Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory (VIDRL), Melbourne, Australia. Se obtuvieron muestras de enero a abril de 2018 y, sobre la base de los resultados obtenidos en laboratorios clínicos, se seleccionaron 156 muestras de hisopos positivas y 54 muestras de hisopos negativas para su inclusión en el estudio. Las 210 muestras consistían en 52 hisopos anales/rectales, 131 hisopos genitales, 2 hisopos genitales/anales/rectales, 1 hisopo genitales/no genitales, 1 hisopo genital/no genital/oral, 3 hisopos genitales/oral, 9 hisopos no genitales, 10 hisopos orales y 1 hisopo no especificado. Las muestras se extrajeron utilizando la plataforma de extracción QIAcube HT (Qiagen) utilizando el kit QIAamp 96 Virus QIAcube HT y el protocolo QSP QIAamp 96 Virus QIAcube HT. Se extrajeron 200 µL de muestra y el volumen de elución final fue de 60 µL. Las muestras se probaron en reacciones de 20 µL en el instrumento LC480 II utilizando el kit **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS<sub>(610)</sub>.

La eficacia del kit **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS se comparó con los resultados de laboratorio clínico de la PCR en tiempo real del VIDRL, y el resultado interno se consideró como el resultado verdadero. La sensibilidad y especificidad del kit **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS se muestran en la **Tabla 15**. En la **Tabla 16** aparecen los análisis de los resultados según el tipo de muestra.

**Tabla 15. Comparación del kit *PlexPCR*<sup>®</sup> VHS<sub>(610)</sub> y los ensayos internos de PCR en tiempo real del VIDRL**

		Ensayos internos de PCR en tiempo real del VIDRL							
		Resultado de HSV-1		Resultado de HSV-2		Resultado de VZV		Resultado de <i>T. pallidum</i>	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
<i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> VHS <sub>(610)</sub>	Positivo	56	2	48	2	2	0	50	0
	Negativo	0	152	2	158	0	208	0	160
<b>Total</b>		56	154	50	160	2	208	50	160
<b>Sensibilidad</b>		100,0% (95 % IC 93,6-100,0%)		96,0% (95 % IC 86,3-99,5%)		100,0% (95 % IC 15,8-100,0%)		100,0% (95 % IC 92,9-100,0%)	
<b>Especificidad</b>		98,7% (95 % IC 95,4-99,8%)		98,8% (95 % IC 95,6-99,8%)		100,0% (95 % IC 98,2-100,0%)		100,0% (95 % IC 97,7-100,0%)	

95% IC – intervalo de confianza del 95%

**Tabla 16. Análisis de los resultados clínicos según el tipo de muestra**

Muestra	HSV-1	HSV-2	VZV	<i>T. pallidum</i>	Negativo
Anal/rectal	16/16	13/13	0/0	9/9	15/15
Genital	34/34	31/32	1/1	31/31	33/34
Genital/anal/rectal	0/0	0/0	0/0	2/2	0/0
Genital/no genital	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0
Genital/no genital/oral	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0
Genital/oral	0/0	0/0	0/0	3/3	0/0
No genital	2/2	3/3	0/0	1/1	3/3
Oral	4/4	0/1	0/0	3/3	2/2

## 16.2 Eficacia analítica

### 16.2.1 Reproducibilidad y repetibilidad

La reproducibilidad y repetibilidad del kit *PlexPCR*<sup>®</sup> VHS fue evaluado utilizando un patrón sintético para HSV-1, HSV-2, VZV y *T. pallidum* a 3x copias LOD por reacción. Los experimentos se realizaron en el 7500 Fast.

Para determinar la variabilidad de un lote a otro, se analizaron dos lotes procesados en una máquina por un operador (**Tabla 17**). Los dos lotes mostraron una buena reproducibilidad con un coeficiente de variación (% CV) de 1,56-1,94%.

**Tabla 17. Variabilidad de un lote a otro**

	Media de Cq	DEV. EST.	% CV	N.º muestras
<b>HSV-1 12 copias</b>	26,0	0,50	1,94	12/12
<b>HSV-2 36 copias</b>	25,0	0,43	1,71	12/12
<b>VZV 48 copias</b>	24,0	0,37	1,56	12/12
<b><i>T. pallidum</i> 24 copias</b>	25,2	0,47	1,87	12/12

Para determinar la variabilidad de un día a otro, un operador realizó análisis durante un periodo de tres días en la misma máquina (**Tabla 18**). Las tres tandas de análisis mostraron una buena reproducibilidad entre los diferentes días con un coeficiente de variación (% CV) de 1,45-2,33%.

Tabla 18. Variabilidad de un día a otro				
	Media de Cq	DEV. EST.	% CV	N.º muestras
HSV-1 12 copias	26,2	0,60	2,29	18/18
HSV-2 36 copias	24,7	0,36	1,45	18/18
VZV 48 copias	24,1	0,40	1,64	18/18
<i>T. pallidum</i> 24 copias	25,1	0,58	2,33	18/18

Para determinar la variabilidad de una tanda de análisis a otra, se compararon tres tandas de análisis qPCR, realizadas el mismo día por el mismo operador (**Tabla 19**). Las tres tandas de análisis mostraron una buena reproducibilidad, con un coeficiente de variación de 0,88-2,05%.

Tabla 19. Variabilidad de una tanda de análisis a otra				
	Media de Cq	DEV. EST.	% CV	N.º muestras
HSV-1 12 copias	26,5	0,50	1,89	18/18
HSV-2 36 copias	24,7	0,22	0,88	18/18
VZV 48 copias	24,1	0,37	1,53	18/18
<i>T. pallidum</i> 24 copias	25,1	0,51	2,05	18/18

Para determinar la variabilidad entre operadores, se compararon dos tandas analíticas realizadas por dos operadores (**Tabla 20**). Las dos tandas de análisis realizadas por los diferentes operadores mostraron una buena reproducibilidad, con un coeficiente de variación que varía entre el 0,96-2,73%.

Tabla 20. Variabilidad entre operadores				
	Media de Cq	DEV. EST.	% CV	N.º muestras
HSV-1 12 copias	25,9	0,71	2,73	12/12
HSV-2 36 copias	24,8	0,24	0,96	12/12
VZV 48 copias	24,1	0,45	1,86	12/12
<i>T. pallidum</i> 24 copias	25,2	0,30	1,18	12/12

Para determinar la variabilidad entre instrumentos, se compararon dos tandas de análisis realizadas en dos máquinas por el mismo operador (**Tabla 21**). Las tandas de análisis realizadas en diferentes instrumentos mostraron una buena reproducibilidad, con un coeficiente de variación que varía entre el 1,27-3,49%.

Tabla 21. Variabilidad entre instrumentos				
	Media de Cq	DEV. EST.	% CV	N.º muestras
<b>HSV-1 12 copias</b>	26,1	0,91	3,49	12/12
<b>HSV-2 36 copias</b>	24,9	0,32	1,27	12/12
<b>VZV 48 copias</b>	24,1	0,41	1,69	12/12
<b><i>T. pallidum</i> 24 copias</b>	25,0	0,38	1,53	12/12

Para determinar la variabilidad dentro de las tandas de análisis, se compararon tres experimentos, preparados por separado por el mismo operador procesando cada diana en la misma placa (**Tabla 22**). Los tres experimentos mostraron una buena reproducibilidad, con un coeficiente de variación de 1,28-2,54%.

Tabla 22. Variabilidad dentro de las tandas de análisis				
	Media de Cq	DEV. EST.	% CV	N.º muestras
<b>HSV-1 12 copias</b>	25,9	0,66	2,54	18/18
<b>HSV-2 36 copias</b>	24,4	0,31	1,28	18/18
<b>VZV 48 copias</b>	24,3	0,42	1,74	18/18
<b><i>T. pallidum</i> 24 copias</b>	25,0	0,37	1,47	18/18

#### 16.2.2 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del kit **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS del 7500 Fast se determinó analizando series de diluciones limitadas, utilizando un patrón sintético para HSV-1, HSV-2, VZV y *T. pallidum*. La sensibilidad correspondiente a cada diana se determinó como el número de copias por reacción con una detección  $\geq 95$  %, mostrado en la (**Tabla 23**).

Tabla 23. Sensibilidad analítica	
	Sensibilidad analítica (copias/reacción)
<b>HSV-1</b>	4
<b>HSV-2</b>	12
<b>VZV</b>	20
<b><i>T. pallidum</i></b>	8

## 16.2.3 Especificidad analítica

El **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS está diseñado para que sea específico de los microorganismos diana comprobando la homología en comparación con microorganismos no diana en bases de datos de secuencias públicas. Las pruebas de especificidad de los microorganismos seleccionados no mostraron reactividad cruzada (**Tabla 24**). Los experimentos se realizaron en el 7500 Fast.

Tabla 24. Especificidad analítica		
Microorganismo	Origen	Concentración de prueba (copias por reacción)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> cepa FA 1090	ATCC	10 <sup>6</sup>
<i>Mycoplasma hominis</i> , cepa ZK-CU2	Vircell	10 <sup>4</sup>
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Vircell	10 <sup>4</sup>
<i>Chlamydia trachomatis</i> LGV, cepa 434	Vircell	10 <sup>4</sup>
<i>Ureaplasma parvum</i>	Aislamiento clínico	10 <sup>4</sup>
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Aislamiento clínico	10 <sup>4</sup>
<i>Haemophilus influenzae</i> , cepa Rd KW20	ATCC	10 <sup>6</sup>
<i>Neisseria meningitidis</i> , cepa MC58	ATCC	10 <sup>6</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> , cepa V583	ATCC	10 <sup>6</sup>
<i>Escherichia coli</i> , cepa Crooks	ATCC	10 <sup>6</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , cepa MGH78578	ATCC	10 <sup>6</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , cepa PAO1-LAC	ATCC	10 <sup>6</sup>
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> , cepa CM-1	Vircell	10 <sup>4</sup>
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , cepa R6	ATCC	10 <sup>6</sup>
<i>Haemophilus ducreyi</i> , cepa 35000 HP	ATCC	10 <sup>6</sup>
Virus del herpes humano 6	Vircell	10 <sup>4</sup>
Virus de Epstein-Barr (Virus del herpes humano 4)	Vircell	10 <sup>4</sup>
Cytomegalovirus (Virus del herpes humano 5)	Vircell	10 <sup>4</sup>

#### 16.2.4 Interferencia competitiva

Para estudiar la interferencia competencia, se probó la detección de dianas con el kit **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS en muestras artificiales que simulaban coinfecciones. La detección del patrón sintético para HSV-1, HSV-2, VZV y *T. pallidum* en bajas concentraciones (3x copias del LOD por reacción) se comparó con la detección en muestras mixtas con picos de alta concentración de otra diana. Los experimentos se realizaron en el 7500 Fast. Se detectaron correctamente todas las dianas y no se observó ninguna interferencia competitiva (**Tabla 25**).

Tabla 25. Interferencia competitiva							
Diana de baja concentración		Interferente competitivo (alta concentración)		N.º de muestras detectadas			
Diana	Concentración (copias por reacción)	Diana	Concentración (copias por reacción)	HSV-1	HSV-2	VZV	<i>T. pallidum</i>
HSV-1	12	--	--	3/3	0/3	0/3	0/3
		HSV-2	10.000	3/3	3/3	0/3	0/3
		VZV	10.000	3/3	0/3	3/3	0/3
		<i>T. pallidum</i>	10.000	3/3	0/3	0/3	3/3
HSV-2	36	--	--	0/3	3/3	0/3	0/3
		HSV-1	10.000	3/3	3/3	0/3	0/3
		VZV	10.000	0/3	3/3	3/3	0/3
		<i>T. pallidum</i>	10.000	0/3	3/3	0/3	3/3
VZV	48	--	--	0/3	0/3	3/3	0/3
		HSV-1	10.000	3/3	0/3	3/3	0/3
		HSV-2	10.000	0/3	3/3	3/3	0/3
		<i>T. pallidum</i>	10.000	0/3	0/3	3/3	3/3
<i>T. pallidum</i>	24	--	--	0/3	0/3	0/3	3/3
		HSV-1	10.000	3/3	0/3	0/3	3/3
		HSV-2	10.000	0/3	3/3	0/3	3/3
		VZV	10.000	0/3	0/3	3/3	3/3

#### 16.2.5 Sustancias potencialmente interferentes

El efecto de las sustancias potencialmente interferentes en el kit **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS fue evaluado en muestras artificiales mediante el procesamiento del Internal Control (control interno), que supervisa la extracción e inhibición de la qPCR. Se añadieron tres sustancias a las muestras negativas (solo PBS), extraídas con las Células de control interno. Se observó una pequeña desviación ( $\Delta Cq < 0,5$ ) en la señal del Internal Control (Control interno) en presencia de las sustancias que no afectan a la detección (**Tabla 26**).

Tabla 26. Sustancias potencialmente interferentes					
Sustancia	Concentración	CI Media de Cq	DEV. EST.	$\Delta Cq$	N.º de muestras detectadas
--	--	26,6	0,78	--	4/4
Albúmina	10 mg/mL	26,9	0,31	0,31	3/3
Sangre completa	10 % (v/v)	27,0	0,14	0,38	3/3
EDTA	3 mM	27,0	0,35	0,43	3/3

## 17 Soporte técnico y al cliente

Póngase en contacto con la asistencia técnica si tiene alguna pregunta sobre la preparación de las reacciones, las condiciones del ciclado u otras consultas.

Tel.: +61 2 9209 4170, Correo electrónico: [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au)

## 18 Referencias

1. Fan F, Day S, Lu X, Tang Y. Laboratory diagnosis of HSV and varicella zoster virus infections. *Future medicine*. 2014, 9(8):721-731.
2. Garland S, Eundem F, Steben M. Genital herpes. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 2014, 28:1098-1110.
3. Heaton P, Espy M, Binnicker M. Evaluation of 2 multiplex real-time PCR assays for the detection of HSV-1/2 and Varicella zoster virus directly from clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2015, 81:168-170.
4. Klein J, McLaud M, Rogers D. Syphilis on the rise: diagnosis, treatment, and prevention. *The Journal for Nurse Practitioners*. 2015, 11(1):49-55.
5. Smith N, Dhillon S, Cotter J, Ahmed Z. Syphilis: an atypical case of sepsis and multiple anogenital lesions in secondary syphilis. *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives*. 2016, 6:32495.

## 19 Apéndice 1: LightCycler® 480 Instrument II

La siguiente información se basa en el *LightCycler 480 Software (versión 1.5)*.

El kit **PlexPCR® VHS<sub>(610)</sub>** contiene colorantes para el LightCycler® 480 Instrument II. El kit **PlexPCR® Colour Compensation** (Compensación del color) (cat. n.º 90001) debe procesarse y aplicarse para los análisis realizados con el LC480 II (consulte la **Sección 19.2**). Este kit se puede proporcionar si se solicita.

### 19.1 Programación del LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II)

#### Detection Format (Formato de detección)

Cree un **Detection Format (Formato de detección)** personalizado

##### **Open Tools (Abrir Herramientas) > Detection Formats (Formatos de detección)**

Cree un formato de detección nuevo y asígnele el nombre "SpeedX PlexPCR" (puede crearse durante la generación del archivo de SpeedX Colour Compensation [Compensación del color]) (consulte la **Figura 2**)

Para la **selección de la combinación de filtros**, seleccione las siguientes (excitación-emisión), tal como se muestra en la **Tabla 27**:

Tabla 27. Filter Combinations (Combinaciones de filtros) <sup>^</sup>						
LC480 II	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

<sup>^</sup> Estas combinaciones de filtros son los nombres predeterminados de los canales.

Establezca la **Selected Filter Combination List (Lista de combinaciones de filtros seleccionadas)** para todos los canales como:

Melt Factor (Factor de fusión): 1

Quant Factor (Factor de cuantificación): 10

Max Integration Time (sec) (Tiempo máximo de integración [s]): 1

**Figura 2. Formato de detección personalizado del SpeedX**

Filter Combination Selection						
Emission						
E	488	510	580	610	640	660
x	440	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
i	465	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
t	498	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
a	533	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
t	618	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
i						
o						
n						

Selected Filter Combination List					
Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time (Sec)
440	488	440-488	1	10	1
465	510	465-510	1	10	1
533	580	533-580	1	10	1
533	610	533-610	1	10	1
533	640	533-640	1	10	1
618	660	618-660	1	10	1

### **Instrument Settings (Configuración del instrumento)**

Cree un **Detection Format (Formato de detección)** personalizado

**Open Tools (Abrir Herramientas) > Instruments (Instrumentos)**

En **Instrument Settings (Configuración del instrumento)** > seleccione **Barcode Enabled (Código de barras habilitado)**

### **Configuración experimental**

Seleccione **New Experiment (Nuevo experimento)**

En la pestaña **Run Protocol (Ejecutar protocolo)**

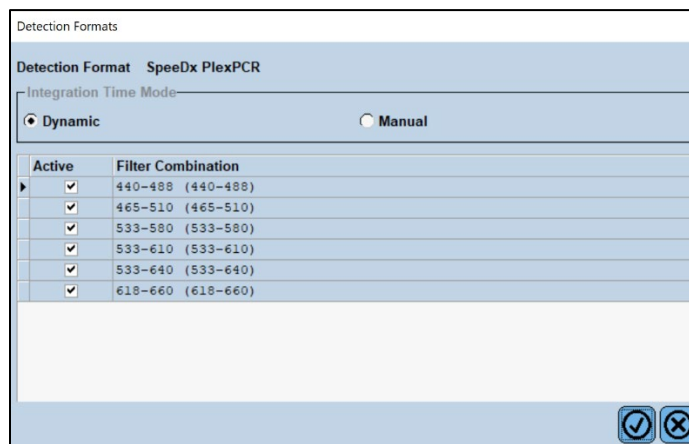
Para el **Detection Format (formato de detección)**, seleccione la opción personalizada 'SpeedX PlexPCR' (**Figura 3**).

Seleccione **Customize (Personalizar)** >

Seleccione **Integration Time Mode > Dynamic (Modo de tiempo de integración) > Dinámico**

Seleccione todas las **combinaciones de filtros** activos como se muestra en **Figura 3**.

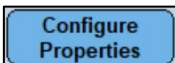
**Figura 3. Personalizar formato de detección**



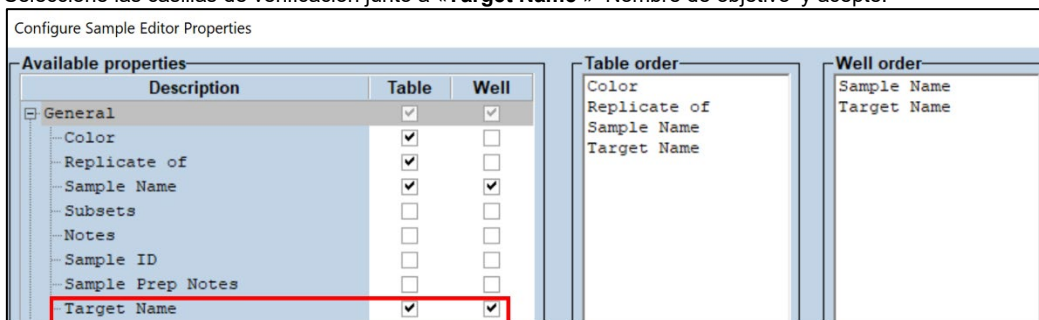
Para permitir la detección automatizada de muestras en el software de análisis, añada nombres de objetivo y asigne etiquetas de identificación a los pocillos de la placa.

Abra el módulo **Sample Editor (Editor de muestras)**.

Para añadir nombres de objetivo, seleccione **Configurar propiedades**.



Seleccione las casillas de verificación junto a «**Target Name**» 'Nombre de objetivo' y acepte.



Edite el **nombre de objetivo** de cada canal para que coincida con la Target Instrument Reference (referencia del instrumento objetivo) definida en el menú Configuración de laboratorio > Ensayos del software de análisis y mostrada en la (**Tabla 28**).

**Tabla 28. Canales y nombres de objetivo para objetivos de VHS de PlexPCR®**

Nombre de objetivo	HSV-2	HSV-1	VZV	IC	<i>T. pallidum</i>
Canal LC480 II	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

Para asignar etiquetas de identificación, seleccione el pocillo.

Edite el **Sample name (nombre de la muestra)** para que coincida con la etiqueta definida en el menú Lab Configuration > Assays (Configuración de laboratorio > Ensayos) del software de análisis (consulte la **Sección 22.3**).

Las muestras deben etiquetarse con la etiqueta de identificación como prefijo. Se proporcionan etiquetas de identificación predeterminadas para las reacciones de control (como se muestra en la **Tabla 29** y **Figura 4**). Pueden definirse etiquetas de identificación adicionales tanto para muestras habituales como para controles dentro del software de análisis o del software editado para que coincidan con el software del instrumento.

**Nota:** La etiqueta de identificación debe coincidir exactamente con las asignadas en el archivo de ejecución.

**Tabla 29. Etiquetas de muestra para software de análisis**

Tipo de muestra	Prefijo predeterminado (en software de análisis)
Muestra habitual	Sin valor predeterminado: Definido por el usuario
Control negativo	NC
Sin control de plantilla	NTC
Control positivo (todos los objetivos) (Pa) Nota: Utilice esto para el Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n.º cat. 95007)	PA
Control positivo (HSV-1) (Pb)	PB
Control positivo (HSV-2) (Pc)	PC
Control positivo (VZV) (Pd)	PD
Control positivo ( <i>T. pallidum</i> ) (Pe)	PE

**Figura 4. Editor de muestras: Asignación de nombres de objetivo y etiquetas de identificación de muestra a pocillos**

Pos	Filter combination	Color	Sample Name	Repl Of	Target Name
A1	465-510 (465)	Blue	NC		HSV-2
A1	533-580 (533)	Blue	NC		HSV-1
A1	533-610 (533)	Blue	NC		VZV
A1	533-640 (533)	Blue	NC		Internal Control
A1	618-660 (618)	Blue	NC		T. pallidum
A2	465-510 (465)	Red	NTC		HSV-2
A2	533-580 (533)	Red	NTC		HSV-1
A2	533-610 (533)	Red	NTC		VZV
A2	533-640 (533)	Red	NTC		Internal Control
A2	618-660 (618)	Red	NTC		T. pallidum
A3	465-510 (465)	Green	Pa		HSV-2
A3	533-580 (533)	Green	Pa		HSV-1
A3	533-610 (533)	Green	Pa		VZV
A3	533-640 (533)	Green	Pa		Internal Control
A3	618-660 (618)	Green	Pa		T. pallidum
A4	465-510 (465)	Magenta	Pb		HSV-2
A4	533-580 (533)	Magenta	Pb		HSV-1
A4	533-610 (533)	Magenta	Pb		VZV
A4	533-640 (533)	Magenta	Pb		Internal Control
A4	618-660 (618)	Magenta	Pb		T. pallidum
A5	465-510 (465)	Grey	Pc		HSV-2
A5	533-580 (533)	Grey	Pc		HSV-1
A5	533-610 (533)	Grey	Pc		VZV
A5	533-640 (533)	Grey	Pc		Internal Control
A5	618-660 (618)	Grey	Pc		T. pallidum
A6	465-510 (465)	Yellow	Pd		HSV-2
A6	533-580 (533)	Yellow	Pd		HSV-1
A6	533-610 (533)	Yellow	Pd		VZV
A6	533-640 (533)	Yellow	Pd		Internal Control
A6	618-660 (618)	Yellow	Pd		T. pallidum
A7	465-510 (465)	Dark Red	Pe		HSV-2
A7	533-580 (533)	Dark Red	Pe		HSV-1
A7	533-610 (533)	Dark Red	Pe		VZV
A7	533-640 (533)	Dark Red	Pe		Internal Control
A7	618-660 (618)	Dark Red	Pe		T. pallidum

Establezca el **volumen de reacción** > 20 µL.

Cree el siguiente programa en la **Tabla 30** (que se muestra con más detalle en la **Figura 5 - Figura 8**):

Tabla 30. Thermocycling Program Programa de termociclado				
Nombre del programa	Ciclos	°C objetivo	Mantenimiento	Velocidad de rampa (°C/s) <sup>≠</sup>
Polymerase activation (Activación de la polimerasa)	1	95 °C	2 min	4,4
Touch down cycling (Cyclage Touchdown) <sup>δ</sup> Ciclado touchdown: Baje -0,5 °C/ciclo	10	95 °C	5 s	4,4
		61 °C - 56,5 °C <sup>δ</sup>	30 s	2,2
Quantification cycling (Cyclage par quantification) <sup>+</sup> : Ciclado de cuantificación: Adquisición/detección	40	95 °C	5 s	4,4
		52 °C <sup>+</sup>	40 s	2,2
Cooling Enfriamiento	1	40 °C	30 s	2,2

<sup>≠</sup> Velocidad de rampa predeterminada (placa de 96 pocillos)

<sup>δ</sup> Step Size (Tamaño del paso): -0,5 °C/ciclo, temp. Sec Target (objetivo sec.): 56 °C

<sup>+</sup> Analysis mode (Modo de análisis): cuantificación, Quantification, Acquisition mode (modo de adquisición): Single (único)

Figura 5. Programa de termociclado: Activación de la polimerasa

The screenshot shows the 'Programs' table with the following data:

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Polymerase activation	1	None
Touchdown cycling	10	None
Quantification cycling	40	Quantification
Cooling	1	None

The 'Polymerase activation Temperature Targets' table is also visible:

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:02:00	4.4	0	0	0	0

Figura 6. Programa de termociclado: Ciclado touchdown

The screenshot shows the 'Programs' table with the following data:

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Polymerase activation	1	None
Touchdown cycling	10	None
Quantification cycling	40	Quantification
Cooling	1	None

The 'Touchdown cycling Temperature Targets' table is also visible:

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.4	0	0	0	0
61	None	00:00:30	2.2	56	0.5	0	0

Figura 7. Programa de termociclado: Ciclado de cuantificación

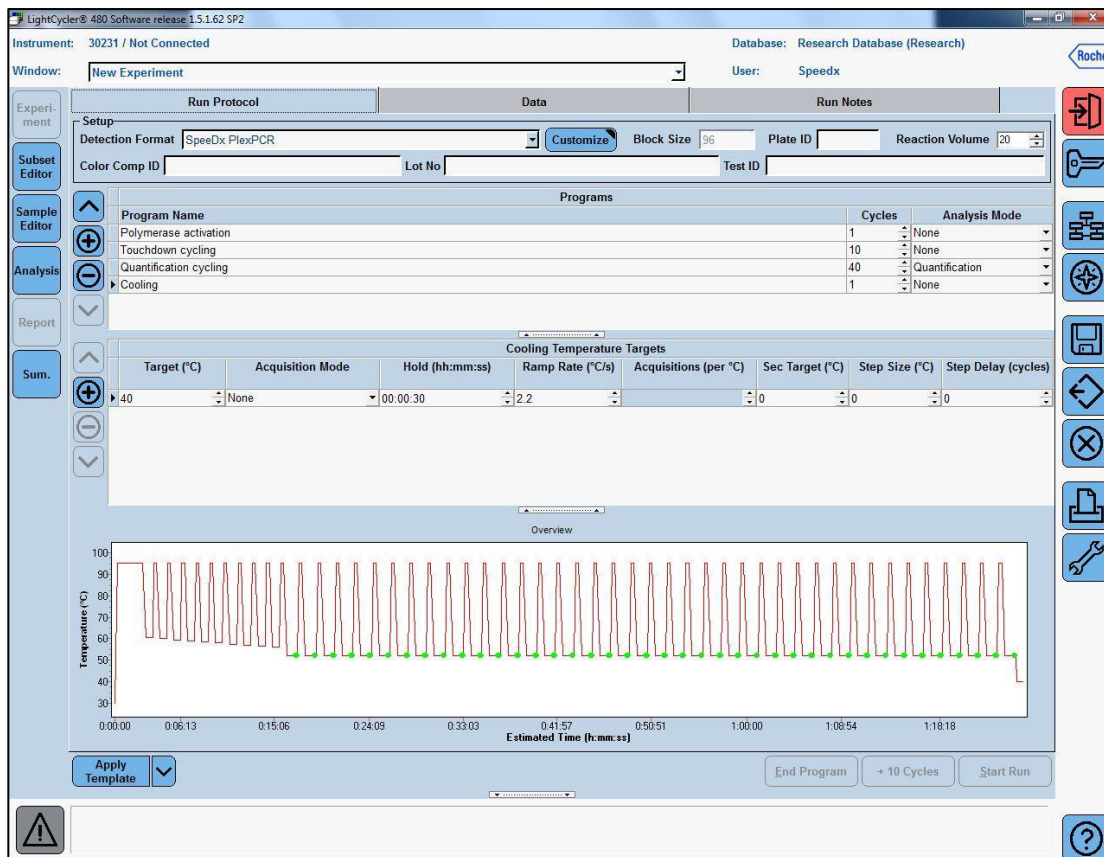
The screenshot shows the 'Programs' table with the following data:

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Polymerase activation	1	None
Touchdown cycling	10	None
Quantification cycling	40	Quantification
Cooling	1	None

The 'Quantification cycling Temperature Targets' table is also visible:

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.4	0	0	0	0
52	Single	00:00:40	2.2	0	0	0	0

Figura 8. Programa de termociclado: Enfriamiento



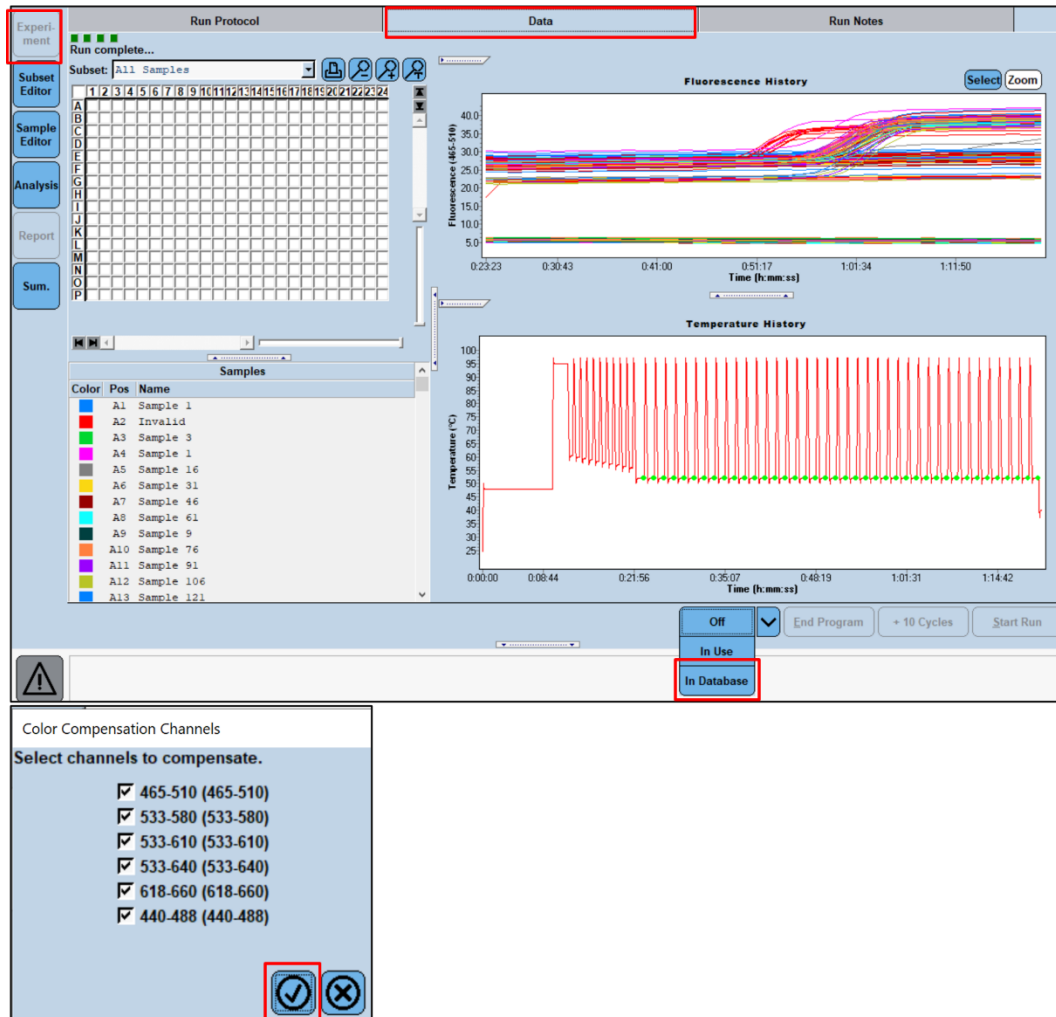
### > Start Run (Comience la ejecución)

Cuando finalice el programa de ciclado, adjunte el objeto CC al archivo de ejecución, tal como se muestra en la **Figura 9**, y expórtelo como un archivo .IXO para su análisis en el software de análisis *PlexPCR*<sup>®</sup> VHS. Consulte la **Sección 19.2** para obtener instrucciones sobre cómo crear el objeto CC y almacenarlo en la base de datos de software LightCycler 480.

Seleccione **Experiment (Experimento) > Data (Datos)**.

Haga clic en la flecha desplegable junto a **Colour Comp (Off) (Composición de color (Off))** y seleccione **In Database (En la base de datos)**.

Figura 9. Unir el objeto CC al archivo de ejecución



Seleccione el objeto CC correspondiente, asegúrese de que todos los canales estén seleccionados y haga clic en el icono de

verificación

Seleccione el icono **Save (Guardar)**

Seleccione el icono **Export (Exportar)**

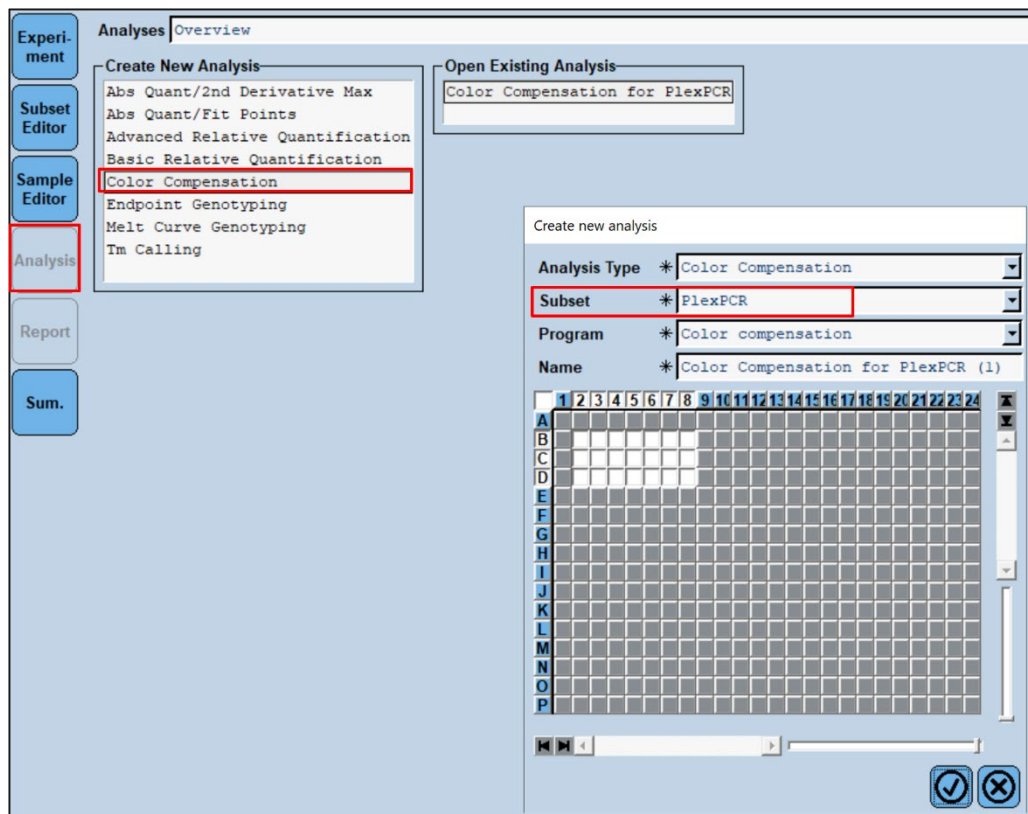
Guarde en un lugar fácilmente identificable.

## 19.2 Compensación de color para LightCycler® 480 Instrument II

**NOTA:** El kit *PlexPCR*® Colour Compensation (n. cat 90001) debe ejecutarse y aplicarse para el análisis LC480 II. Este kit se puede suministrar bajo petición.

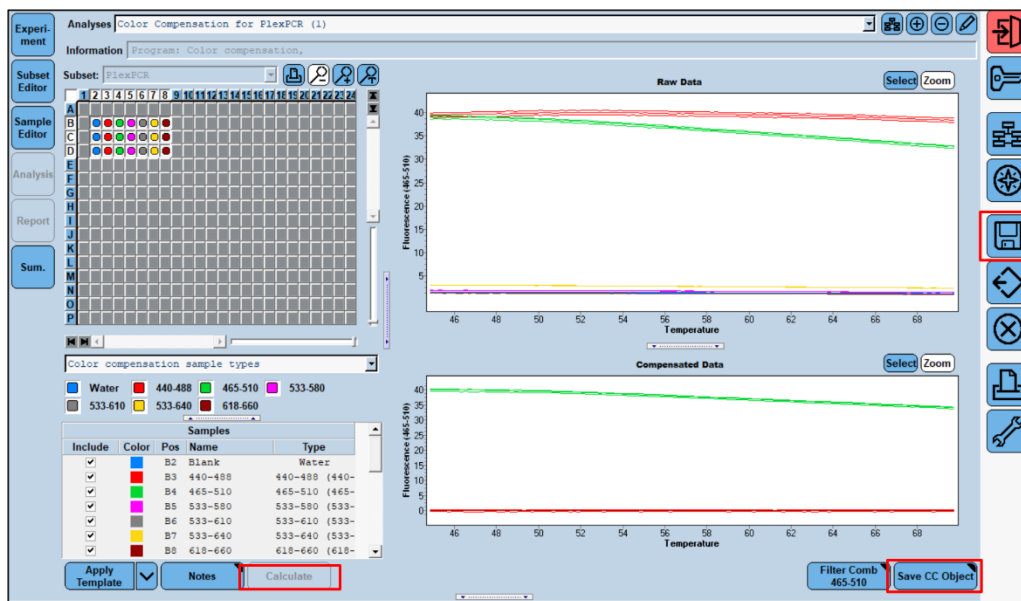
Analice el archivo de compensación de color a través de **Analysis (Análisis) > Colour Compensation (Compensación de color)** y seleccione el subconjunto correcto, que se muestra en la **Figura 10**.

Figura 10. Análisis: Compensación de color



Seleccione **Calculate (Calcular)** (Figura 11).

Figura 11. Calcular y guardar objetos CC



Consulte las Instrucciones de uso de compensación de color de PlexPCR (IF-IV0001) para obtener más detalles y asegurarse de que el archivo de compensación de color se ha creado correctamente.



Seleccione **Save (Guardar)**

### 19.3 Interpretación de los resultados

La interpretación de datos requiere el software de análisis **PlexPCR®** VHS (LC480). El software de análisis puede suministrarse bajo pedido. Para obtener más información, póngase en contacto con [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Consulte la **Sección 22** para obtener instrucciones sobre el uso del software de análisis **PlexPCR®** VHS (LC480).

## 20 Apéndice 2: Sistema Applied Biosystems® 7500 Fast

La información siguiente se basa en el 7500 Software v2.3.

El kit **PlexPCR® VHS<sub>(650)</sub>** contiene colorantes para el Applied Biosystems® (ABI) 7500 Fast. Se utilizan calibraciones de colorantes predeterminadas para todos los canales. No se requiere una calibración personalizada.

### 20.1 Programación del Applied Biosystems® 7500 Fast

Seleccione **Advanced Setup (Configuración avanzada)**

En **Setup (Configuración)** > abra **Experiment Properties (Propiedades del experimento)** y seleccione lo siguiente

Dé un nombre al experimento

**Instrument (Instrumento)** > 7500 Fast (96 pocillos)

**Type of experiment (Tipo de experimento)** > Quantitation – Standard Curve (Cuantificación - Curva estándar)

**Reagents (Reactivos)** > Other (Otros)

**Ramp Speed (Velocidad de rampa)** > Standard (Estándar)

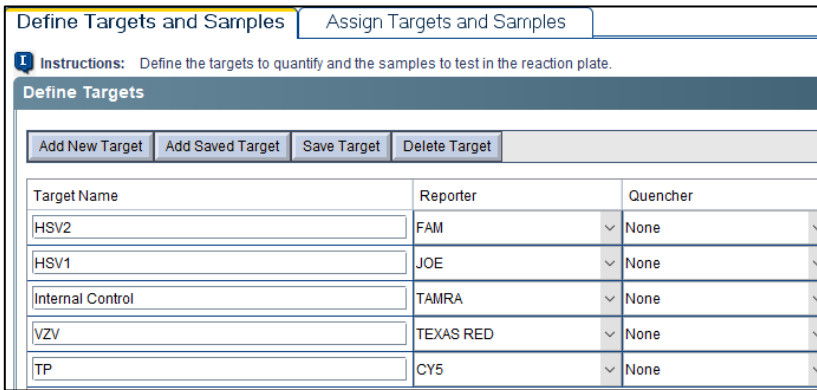
En **Setup (Configuración)**, abra **Plate Setup (Configuración de placa)**

En la pestaña **Define Targets and Samples (Definir dianas y muestras)** >

**Defina objetivos** como se muestra a continuación en la **Tabla 31** y la **Figura 12** (defina colores según sea necesario).

Tabla 31. Define Targets (Definir dianas)		
Target name (Nombre de diana)	Reporter (Indicador)	Quencher (Extintor)
HSV-2	FAM	None (Ninguno)
HSV-1	JOE	None (Ninguno)
VZV	Texas Red	None (Ninguno)
CI	TAMRA	None (Ninguno)
<i>T. pallidum</i>	Cy5	None (Ninguno)

Figura 12. Definir objetivos y muestras



Target Name	Reporter	Quencher
HSV2	FAM	None
HSV1	JOE	None
Internal Control	TAMRA	None
VZV	TEXAS RED	None
TP	CY5	None

**Definir muestras** (defina los colores según sea necesario).

Para permitir la detección automatizada de muestras en el software de análisis, asegúrese de que el nombre del objetivo (que se muestra en la **Tabla 32**) coincida con la referencia del instrumento del objetivo definida en el menú **Lab Configuration > Assays (Configuración de laboratorio > Ensayos)** del software de análisis.

Además, también será necesario asignar etiquetas de muestra a los pocillos de la placa.

En **Setup (Configuración)** > abra **Plate Setup (Configuración de la placa)**

En la pestaña **Define Targets and Samples (Definir objetivos y muestras)** >

**Define Samples (Definir muestras)**

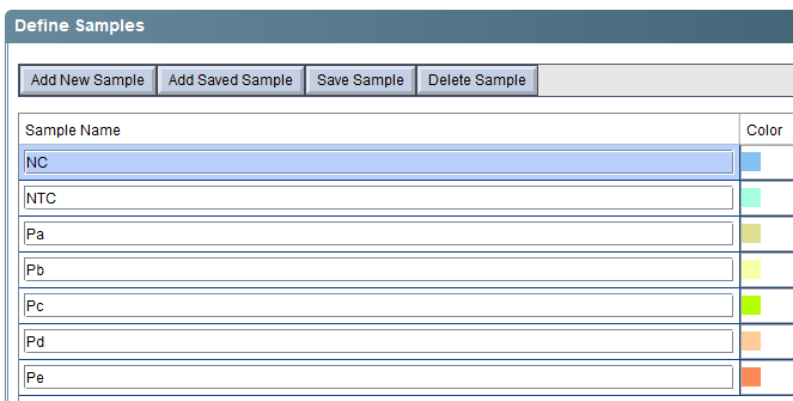
Edite el **Sample name (nombre de la muestra)** para que coincida con la etiqueta definida en el menú **Lab Configuration > Assays (Configuración de laboratorio > Ensayos)** del software de análisis (consulte la **Sección 22.3**).

Las muestras deben etiquetarse con la etiqueta de nombre como prefijo. Para las reacciones de control se proporcionan etiquetas de identificación predeterminadas (como se muestra en la **Tabla 32** y en la **Figura 13**). Pueden definirse etiquetas adicionales tanto para las muestras habituales como para los controles dentro del software de análisis, o modificarse en el software correspondiente para que coincidan con el software del instrumento.

**Nota:** La etiqueta de identificación debe coincidir exactamente con las asignadas en el archivo de ejecución.

Tabla 32. Etiquetas de muestra para software de análisis	
PlexPCR® VHS (7500)	
Tipo de muestra	Prefijo predeterminado (en software de análisis)
Muestra habitual	Sin valor predeterminado: Definido por el usuario
Control negativo	NC
Sin control de plantilla	NTC
Control positivo (todos los objetivos) (Pa) Nota: Utilice esto para el Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n.º cat. 95007)	PA
Control positivo (HSV-1) (Pb)	PB
Control positivo (HSV-2) (Pc)	PC
Control positivo (VZV) (Pd)	PD
Control positivo ( <i>T. pallidum</i> ) (Pe)	PE

**Figura 13. Definir muestras – Asignación de nombres de objetivo y etiquetas de nombre de muestra a pocillos**



En la pestaña **Assign Targets and Samples (Asignar objetivos y muestra)** >

Seleccione pocillos y asigne objetivos y muestras a los pocillos seleccionados.

Seleccione **Passive reference > None (Referencia pasiva > Ninguna)**.

En **Setup (Configuración)** > abra **Run Method (Método de ejecución)**.

Establezca **Reaction Volume Per Well (Volumen de reacción por pocillo)** > 20 µL.

Cree el siguiente programa en la **Tabla 33** (que se muestra con más detalle en la vista gráfica (**Figura 14** y **Figura 15**) y la vista tabular (**Figura 16**):

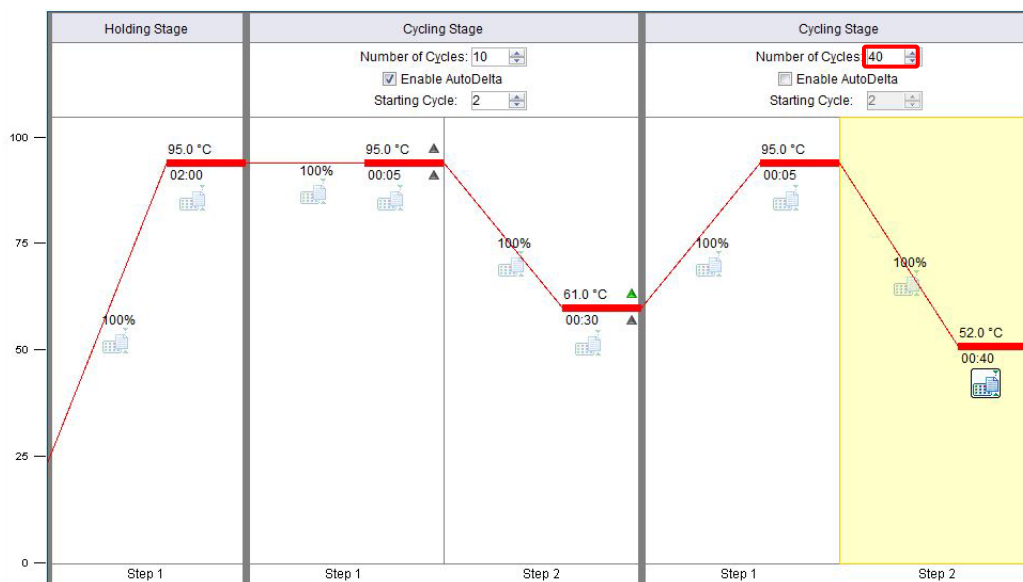
Tabla 33. Thermocycling Program (Programa de termociclado)				
Program name (Nombre del programa)	Cycles (Ciclos)	Target °C (Diana °C)	Hold (Suspensión)	Ramp (Rampa)*
Polymerase activation (Activación de polimerasa)	1	95 °C	2 min	100 %
Touch down cycling (Ciclado de toque): Step down (Disminución) de -0,5 °C/ciclo <sup>♠</sup>	10	95 °C	5 s	100 %
		61 °C – 56,5 °C <sup>♠</sup>	30 s	100 %
Quantification cycling (Ciclado de cuantificación)*: Acquisition/Detection (Adquisición/detección)	40	95 °C	5 s	100 %
		52 °C <sup>+</sup>	40 s	100 %

\* ≠ Tasa de rampa predeterminada

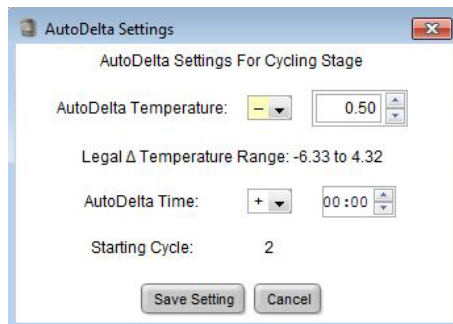
♠ Enable AutoDelta (Activar AutoDelta): -0,5 °C/ciclo

+ Collect data on hold (Recogida de datos en suspensión)

**Figura 14. Método de análisis - Graphical View (Vista gráfica)**



**Figura 15. Método de análisis - Graphical View – Enable AutoDelta (Vista gráfica - Activar AutoDelta)**



**Figura 16. Método de análisis - Tabular View (Vista tabular)**

	Holding Stage	Cycling Stage		Cycling Stage	
		Number of Cycles: 10		Number of Cycles: 40	
		<input checked="" type="checkbox"/> Enable AutoDelta		<input type="checkbox"/> Enable AutoDelta	
		Starting Cycle: 2		Starting Cycle: 2	
Ramp Rate (%)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Temperature (°C)	95.0	95.0	61.0	95.0	52.0
Time	02:00	00:05	00:30	00:05	00:40
AutoDelta Temp		+ 0.00	- 0.50		
AutoDelta Time		+ 00:00	+ 00:00		
Collect Data on Ramp	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Collect Data on Hold	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Step 1	Step 1	Step 2	Step 1	Step 2

En **Setup (Configuración)** > abra **Run Method (Método de análisis)**

Seleccione **Start Run (Iniciar análisis)**

## 20.2 Interpretación de los resultados

Para la interpretación de datos se precisa el software de análisis **PlexPCR® VHS (7500)**. El software de análisis se puede proporcionar si se solicita. Contacte con [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au) para obtener más información.

Consulte la **Sección 22** para obtener instrucciones sobre el uso del software de análisis **PlexPCR® VHS (7500)**.

## 21 Apéndice 3: Sistema de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Dx™ y CFX96 Touch™

La información siguiente se basa en el Bio-Rad CFX Manager v3.1.

El kit **PlexPCR**® VHS<sub>(675)</sub> contiene colorantes para el CFX96 Real-Time PCR System. Se utilizan calibraciones de colorantes predeterminadas para todos los canales. No se requiere una calibración personalizada.

### 21.1 Programar el CFX96 Dx y CFX96 Touch Real-time PCR System

Seleccione **View (Ver)** > Abra **Run Setup (Configuración de análisis)**

En la pestaña **Run Setup (Configuración de análisis)** > **Protocol (Protocolo)** > Seleccione **Create New (Crear nuevo)**

En el **Protocol Editor (Editor de protocolos)** (consulte la **Figura 17**):

Ajuste **Sample Volume (Volumen de muestra)** > 20 µL

Cree el siguiente programa de termociclado en la **Tabla 34** y guárdelo como 'SpeedX PCR'. Este protocolo se puede seleccionar para futuras ejecuciones.

Para el ciclado de toque, seleccione el paso 3 y seleccione **Step options (Opciones de paso)** > Increment (Incremento): -0,5 °C/ciclo (se muestra en más detalle en la **Figura 18**).

Tabla 34. Thermocycling Program (Programa de termociclado)			
Program name (Nombre del programa)	Cycles (Ciclos)	Target °C (Diana °C)	Hold (Suspensión)
Polymerase activation (Activación de polimerasa)	1	95°C	2 min
Touch down cycling (Ciclado de toque) <sup>o</sup> : Step down (Disminución) de -0,5 °C/ciclo	10	95°C	5 s
		61°C – 56,5°C <sup>o</sup>	30 s
Quantification cycling (Ciclado de cuantificación) <sup>+</sup> : Acquisition/Detection (Adquisición/detección)	40	95°C	5 s
		52°C <sup>+</sup>	40 s

<sup>o</sup> **Step options (Opciones de paso)** > Increment (Incremento): -0,5 °C/ciclo

<sup>+</sup> **Add Plate Read to Step (Añadir lectura de placa al paso)**

Figura 17. Protocol Editor (Editor de protocolos)

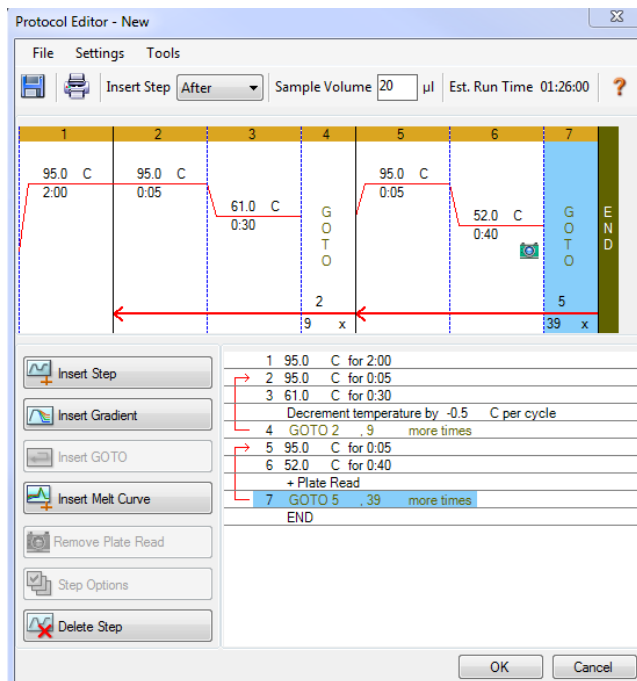
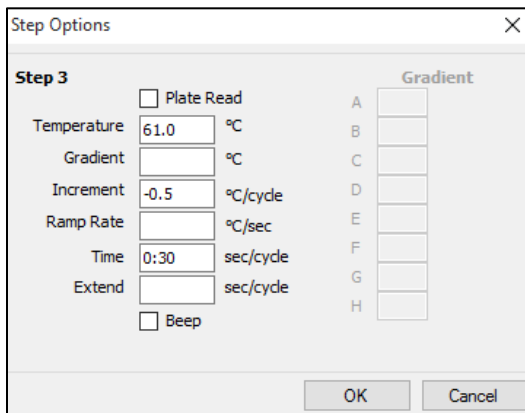


Figura 18. Protocol Editor (Editor de protocolos) – Step Options (Opciones de paso)



En la pestaña **Run Setup (Configuración de análisis) > Plate (Placa)**

Seleccione **Create New (Crear nueva)**

Seleccione **Settings (Configuración) > Plate Type (Tipo de placa) > Seleccione BR Clear (BR transparente)**

Ajuste **Scan mode (Modo de escaneo) > All channels (Todos los canales)**

**Select Fluorophores (Seleccione fluoróforos) > FAM, HEX, Texas Red, Quasar 705, Cy 5 (consulte la Tabla 35)**

Seleccione los pocillos que contengan muestras, asigne el **Sample Type (Tipo de muestra)** y marque **Load (Cargar)** para los fluoróforos (FAM, HEX, Texas Red, Quasar 705, Cy5)

Guarde la placa

Tabla 35. Canales para objetivos VHS de PlexPCR®					
Target Name (Nombre de objetivo)	HSV-2	HSV-1	VZV	Control interno	<i>T. pallidum</i>
Canal CFX96	FAM	HEX	Texas Red	Quasar 705	Cy5

En la pestaña **Run Setup (Configuración de análisis) > Start Run (Iniciar análisis)**

Seleccione bloque

**Start Run (Iniciar análisis)**

Para permitir la detección automatizada de muestras en el software de análisis, asegúrese de que el canal y el **Target Name (nombre del objetivo)** (mostrados en la **Tabla 35** coincidan con la referencia del instrumento del objetivo definida en el menú **Lab Configuration > Assays (Configuración de laboratorio > Ensayos)** del software de análisis.

Además, también será necesario asignar etiquetas de muestra a los pocillos de la placa.

Abra el módulo **Plate setup (Configuración de la placa)**.

Seleccione el pocillo.

Edite el **Sample name (nombre de muestra)** para que coincida con la etiqueta de nombre definida en el módulo **Lab Configuration > Assays (Configuración de laboratorio > Ensayos)** del software de análisis (consulte la **Sección 22.3**).

Las muestras deben etiquetarse con la etiqueta de nombre como un prefijo. Para las reacciones de control se proporcionan etiquetas de identificación predeterminadas (como se muestra en la **Tabla 36** y en la **Figura 19**). Pueden definirse etiquetas adicionales tanto para las muestras habituales como para los controles dentro del software de análisis, o modificarse en el software correspondiente para que coincidan con el software del instrumento.

**NOTA:** La etiqueta de identificación debe coincidir exactamente con las asignadas en el archivo de ejecución.

Tabla 36. Etiquetas de muestra para software de análisis	
PlexPCR® VHS (CFX)	
Tipo de muestra	Prefijo predeterminado (en software de análisis)
Muestra habitual	Sin valor predeterminado: Definido por el usuario
Control negativo	NC
Sin control de plantilla	NTC
Control positivo (todos los objetivos) (Pa) Nota: Utilice esto para el Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n.º cat. 95007)	PA
Control positivo (HSV-1) (Pb)	PB
Control positivo (HSV-2) (Pc)	PC
Control positivo (VZV) (Pd)	PD
Control positivo ( <i>T. pallidum</i> ) (Pe)	PE

**Figura 19. Editor de placas – Asignación de nombres de objetivo y etiquetas de nombre de muestra a los pocillos**

	1	2
A	<b>Pos</b>	<b>Neg</b>
	HSV-2	HSV-2
	HSV-1	HSV-1
	VZV	VZV
	T. pallidum	T. pallidum
	IC	IC
	Pa	NC
B	<b>Pos</b>	<b>NTC</b>
	HSV-2	HSV-2
	HSV-1	HSV-1
	VZV	VZV
	T. pallidum	T. pallidum
	IC	IC
	Pb	NTC
C	<b>Pos</b>	<b>Unk</b>
	HSV-2	HSV-2
	HSV-1	HSV-1
	VZV	VZV
	T. pallidum	T. pallidum
	IC	IC
	Pc	Sample 1
D	<b>Pos</b>	<b>Unk</b>
	HSV-2	HSV-2
	HSV-1	HSV-1
	VZV	VZV
	T. pallidum	T. pallidum
	IC	IC
	Pd	Sample 2
E	<b>Pos</b>	<b>Unk</b>
	HSV-2	HSV-2
	HSV-1	HSV-1
	VZV	VZV
	T. pallidum	T. pallidum
	IC	IC
	Pe	Sample 3

## 21.2 Interpretación de los resultados

La interpretación de datos requiere el software de análisis **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS (CFX). El software de análisis puede suministrarse bajo pedido. Para obtener más información, póngase en contacto con [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Consulte la **Sección 22** para obtener instrucciones sobre el uso del software de análisis **PlexPCR**<sup>®</sup> VHS (CFX).

## 22 Apéndice A: Interpretación de resultados utilizando el software de análisis *PlexPCR*<sup>®</sup> VHS

Para la interpretación de datos se precisa FastFinder con el software de análisis *PlexPCR*<sup>®</sup> VHS.

Consulte la **Tabla 37** para obtener el software de análisis adecuado que permita la comunicación de HSV-1, HSV-2, VZV y *T. pallidum* con el kit *PlexPCR*<sup>®</sup> VHS. El software de análisis se puede proporcionar si se solicita. Contacte con [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au) para obtener más información.

Tabla 37. Software de análisis		
N.º de cat.	Software de análisis*	Instrumento de qPCR
99004	<i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> VHS (7500)	7500 Fast
99005	<i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> VHS (LC480)	LC480 II
99006	<i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> VHS (CFX)	CFX96 Dx y CFX96 Touch

\* Consulte el sitio web <https://www.plexpcr.com/plexpcr-vhs/resources> para asegurarse de que está utilizando la versión más reciente del software de análisis.

**NOTA:** Siga las prácticas habituales de laboratorio para transferir, comunicar y almacenar los resultados con el fin de evitar la pérdida de información de las muestras.

### 22.1 Plataforma FastFinder: Requisitos mínimos de TI

El software de análisis está disponible en la plataforma FastFinder (<https://www.ugentec.com/fastfinder/analysis>). Se recomienda que los clientes accedan a la plataforma de software desde una red y un ordenador seguros y confiables. Los requisitos mínimos de TI para el acceso y uso de la plataforma FastFinder se enumeran a continuación.

#### Requisitos de equipo

Conexión a Internet Cable o DSL

Resolución de pantalla mínima: 1366 x 768 píxeles, óptimo 1920 x 1080 píxeles o superior

#### Navegadores compatibles

- Microsoft Edge 88 o posterior
- Firefox 83 o posterior
- Google Chrome 88 o posterior.

#### Requisitos de cortafuegos

Los siguientes hosts deben ser accesibles a través de HTTPS (puerto 443):

- \*.ugentec.app
- \*.fastfinder.app
- \*.pendo.io
- \*.fonts.gstatic.com
- \*.googleapis.com
- \*.msecnd.net
- \*.visualstudio.com
- \*.browser-update.org
- \*.blob.core.windows.net

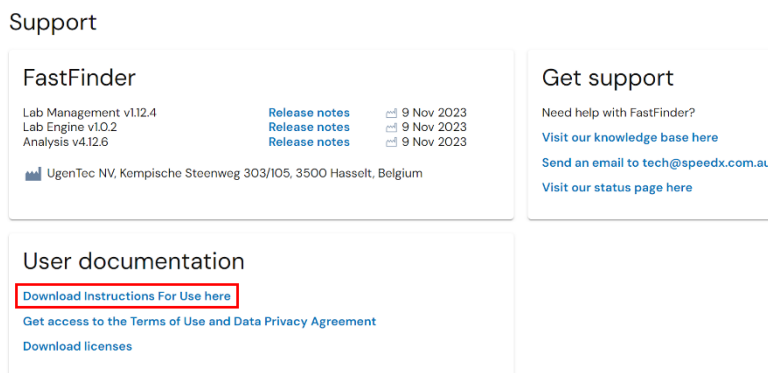
- \*.powerbi.com
- \*.analysis.windows.net
- \*.pbideldicated.windows.net
- \*.content.powerapps.com

Si es necesario, se tendrán que configurar excepciones de cortafuegos para estos hosts. Para acceder a todo el contenido de las guías de usuario integradas en la aplicación, el host \*.player.vimeo.com también debe estar disponible.

Para obtener más instrucciones detalladas sobre la plataforma **FastFinder**, consulte las **Instrucciones de uso de FastFinder** accesibles desde el menú **Support**.

Para acceder al menú **Support**

- Seleccione **Support** de la lista de menús en el panel lateral izquierdo.
- Seleccione **Download Instructions For Use here (Descargar Instrucciones de uso, aquí)**, en la sección **User documentation (Documentación del usuario)**.



## 22.2 Complemento de ensayo (nuevo usuario)

Consulte las **Instrucciones de uso de FastFinder** para obtener instrucciones detalladas para configurar ensayos, accesibles desde el menú **Support**.

Se puede acceder a FastFinder directamente a través de un navegador web iniciando sesión con su nombre de usuario y contraseña exclusivos en <https://customer.fastfinder.app>.

- Seleccione **Lab Configuration > Assays (Configuración de laboratorio > Ensayos)** en el menú izquierdo.
- Seleccione **Add New Assay (Añadir nuevo ensayo)**.
  - > Para LC480 II > Seleccione **PlexPCR VHS (LC480)** de la lista.
  - > Para 7500 Fast > Seleccione **PlexPCR VHS (7500)** de la lista.
  - > Para CFX96 Dx y CFX96 Touch > Seleccione **PlexPCR VHS (CFX)** de la lista.
- Seleccione **Import Selected (Importar lo seleccionado)**.



Para activar o desactivar versiones del complemento del ensayo

- > En la **pestaña General**
- > Vaya a Estado
- > Seleccione  **Active** para activar o desactivar la versión del ensayo

## 22.3 Nombre de la muestra

Pueden asignarse etiquetas de muestra a un complemento de ensayo para automatizar la detección de pocillos y tipos de muestra durante el análisis.

Seleccione **Lab Configuration > Assays (Configuración de laboratorio > Ensayos)** en el menú izquierdo.

- En la **pestaña General**, vaya a la tabla **Sample types (Tipos de muestra)** etiquetas (prefijo) y seleccione  para añadir una nueva etiqueta.
  - > Añada la palabra, acrónimo o letra deseados al cuadro de texto.
  - > Las etiquetas predeterminadas se proporcionan para los controles. Estos se pueden eliminar seleccionando  junto a la etiqueta.
  
- En el software del instrumento (antes o después de completar la ejecución) asigne la misma etiqueta a los pocillos apropiados.
  - > Para **LC480 II**, consulte la **Sección 19** para obtener instrucciones sobre la programación de etiquetas de nombre de ejemplo en el archivo de ejecución.
  - > Para **7500 Fast**, consulte la **Sección 20** obtener instrucciones sobre la programación de etiquetas de nombre de ejemplo en el archivo de ejecución.
  - > Para **CFX96 Dx** y **CFX96 Touch**, consulte la **Sección 21** para obtener instrucciones sobre la programación de etiquetas de nombre de muestra en el archivo de ejecución.

**NOTA:** Las etiquetas de muestra son sensibles a mayúsculas y minúsculas. La etiqueta de nombre debe coincidir exactamente con las asignadas en el archivo de ejecución.

## 22.4 Análisis

Seleccione **Análisis** en el menú izquierdo para iniciar un nuevo análisis.

Seleccione **+ Create New Analysis (Crear nuevo análisis)** en la parte superior derecha de la pantalla.

Busque el archivo que se va a cargar para su análisis desde un directorio especificado.

- Seleccione ejecutar (datos) archivo de la carpeta pertinente.
  - > Seleccione **Open (Abrir)**.

El análisis aparecerá en la **pestaña Open (Abrir)** como una nueva fila dentro de la tabla.

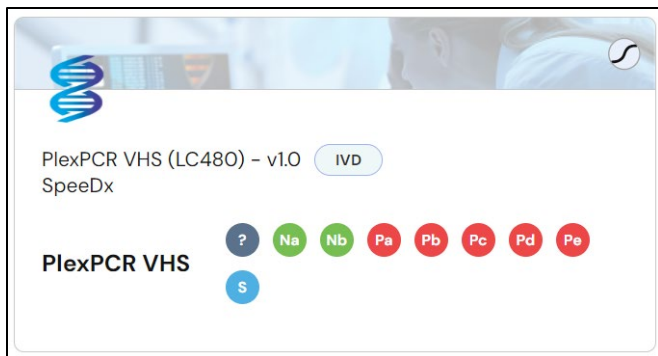
- Si todas las etiquetas se han aplicado y leído correctamente, el estado aparecerá como **Ready for review (Listo para revisión)**.
- Si la información del ensayo necesita asignarse manualmente a los pocillos, el estado aparecerá como **Manual PCR setup required (Configuración PCR manual requerida)**.

Asigne manualmente la información del ensayo a la placa si la asignación de nombres de muestra no se ha configurado en el menú **Lab Configuration > Assays (Configuración de laboratorio > Ensayos)** o si los nombres/objetivos de muestra no se han aplicado en el software del instrumento.

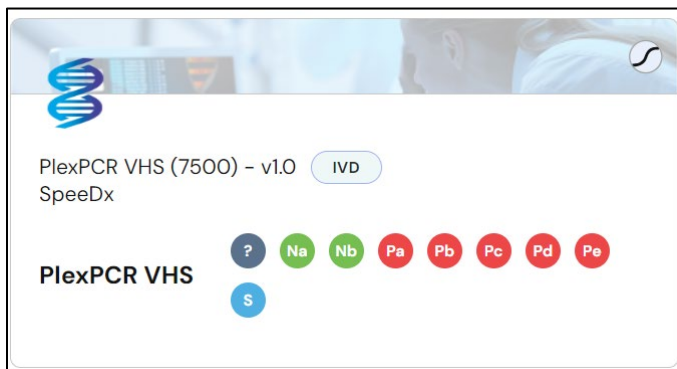
Seleccione el archivo de ejecución desde la **pestaña Abrir** del menú **Análisis**.

La configuración de la placa se mostrará en la **pestaña configuración de PCR** para el análisis abierto.

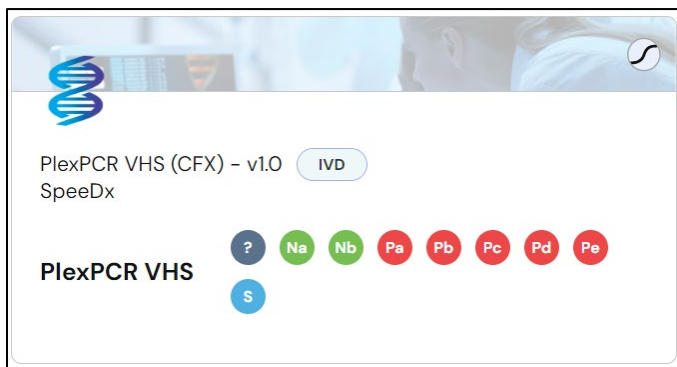
- Para **LC480 II** > Seleccione **PlexPCR VHS (LC480)**.



- Para **7500 Fast** > Seleccione **PlexPCR VHS (7500)**.



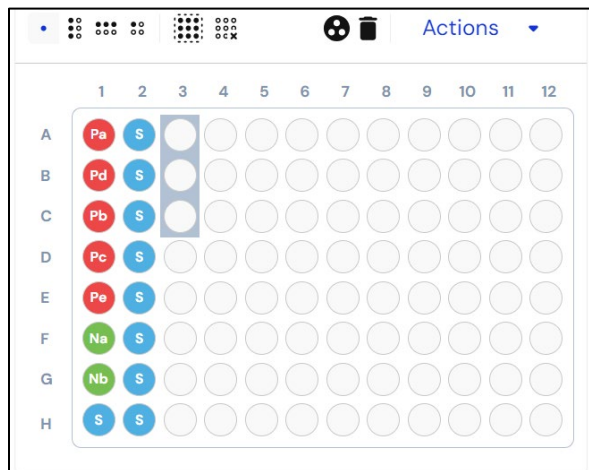
- Para **CFX96 Dx** y **CFX96 Touch** > Seleccione **PlexPCR VHS (CFX)**.



- Seleccione los pocillos y asigne como:
  - > Muestra habitual (S)
  - > Control negativo (Na)
  - > Sin control de plantilla (Nb)
  - > Control positivo (todos los objetivos) (Pa): Utilícelo para el Positive Control HSV/VZV/TP (SpeedX, n.º cat. 95007)
  - > Control positivo (HSV-1) (Pb)
  - > Control positivo (HSV-2) (Pc)
  - > Control positivo (VZV) (Pd)
  - > Control positivo (T. pallidum) (Pe)

Para asignar pocillos en la placa, ya sea:

- Haga clic y arrastre los símbolos de colores para colocarlos en la placa.
- Seleccione uno o varios pocillos (utilice las teclas Ctrl y shift) y, a continuación, haga clic en los símbolos de colores pertinentes para asignarlos a la selección.



- Seleccione **Analyser (Analizar)**.

## 22.5 Resultados

Consulte la **Tabla 39** para un resumen de los posibles resultados de la muestra notificados.

**NOTA:** Es muy recomendable que las curvas de amplificación se inspeccionen visualmente y se confirmen para todas las muestras positivas.

### 22.5.1 Pestaña Summary (de resumen)

Los resultados de control para cada ensayo se muestran en la parte superior izquierda de la pestaña Summary (Resumen), lo que permite evaluar la validez del control para la ejecución. Puede encontrar más detalles expandiendo este bloque, mostrando los detalles por control.

Control Results

Filters | ⚙️

Assay	Status	Info
<a href="#">See all assay details →</a>		
<input checked="" type="checkbox"/> Pos_VHS	<input checked="" type="checkbox"/> Tp_VHS	<input checked="" type="checkbox"/> HSV1_VHS
<input checked="" type="checkbox"/> HSV2_VHS	<input checked="" type="checkbox"/> VZV_VHS	
Pos_VHS	VALID	VALID
Tp_VHS	VALID	VALID
HSV1_VHS	VALID	VALID
HSV2_VHS	VALID	VALID
VZV_VHS	VALID	VALID
HSV-2	⊕ Detected	⊖ Not detected
HSV-1	⊕ Detected	⊖ Not detected
VZV	⊕ Detected	⊖ Not detected
T. pallidum	⊕ Detected	⊖ Not detected








Si un control no es válido, todas las muestras pueden marcarse como fallidas seleccionando **Fail all samples for this assay (Rechazar todas las muestras para este ensayo)**.

Fail all samples for this assay  
  

Failure reason ▼

Es necesario elegir un motivo de rechazo en el menú desplegable.










Los resultados de la muestra se muestran en la parte inferior izquierda de la pestaña Resumen. Junto al encabezado, los iconos adicionales pueden proporcionar una visión general de alto nivel de los resultados del análisis, así como indicar el número total de muestras correspondientes a un icono en particular.

	• Containing an error notification
	• Containing a warning notification
	• Marked for retest
	• Containing at least one detected assay result
	• Containing at least one not detected assay result
	• Containing at least one invalid assay result
	• Containing at least one inconclusive assay result

Cada muestra se indica como una fila dentro de la tabla de resultados de la muestra.

Sample Results ▲ 1 ⊕ 10 ⊖ 1 ⊗ 1

Filters | ⚙️

			Sample	Assay	Result
▶	<input type="checkbox"/>		Sample_VHS 	PlexPCR VHS (CFX)	Invalid: HSV-2, HSV-1, VZV, T. pallidum
▶	<input type="checkbox"/>		Sample_VHS 	PlexPCR VHS (CFX)	Detected: VZV
▶	<input type="checkbox"/>		Sample_VHS 	PlexPCR VHS (CFX)	Detected: HSV-2, HSV-1
▶	<input type="checkbox"/>		Sample_VHS 	PlexPCR VHS (CFX)	Detected: T. pallidum
▶	<input type="checkbox"/>		Sample_VHS 	PlexPCR VHS (CFX)	Detected: HSV-2, HSV-1
▶	<input type="checkbox"/>		Sample_VHS 	PlexPCR VHS (CFX)	Not detected
▶	<input type="checkbox"/>		Sample_VHS 	PlexPCR VHS (CFX)	Detected: T. pallidum
▶	<input type="checkbox"/>		Sample_VHS 	PlexPCR VHS (CFX)	Detected: VZV

Items per page: 250 1 – 12 of 12+ |< < > >|

El menú desplegable ofrece más detalles sobre cada resultado objetivo y Cq por muestra (consulte los ejemplos mostrados en la **Sección 0**).

Las muestras individuales pueden marcarse como fallidas si se desea (por ejemplo, si la muestra no es válida) seleccionando **Fail all samples for this assay (Rechazar esta muestra para este ensayo)**.

Fail this sample for this assay  
  

Failure reason ▼

Es necesario elegir un motivo de rechazo en el menú desplegable.

Los gráficos de fluorescencia se pueden ver en la parte superior derecha de la pestaña Summary (Resumen).

Se puede ver una disposición de las placas en la parte inferior derecha de la pestaña Resumen.

Los ejemplos de notificaciones informativas y de advertencia se resumen a continuación en la **Tabla 38**.

Tabla 38. Ejemplo de información y notificaciones de advertencia para el software de análisis PlexPCR® VHS*		
Tipo de muestra	Error	Notificación
<b>Notificaciones de objetivos de ensayo</b>		
Muestra habitual	No válido: Fallo del IC	Warning: IC invalid. Re-extract and re-test sample.
	Válido, pero control no válido: Advertencia de control no válido en una muestra habitual con resultado válido.	Warning: Invalid control present. Re-extract and re-test the sample..
Control negativo	No válido: Contaminación	Warning: Possible contamination detected.
Sin control de plantilla		
<b>Notificaciones de objetivos genéticos</b>		
Muestra habitual	Cq del objetivo fuera del valor de corte	Info: Cq outside cutoff
Control positivo	No válido: Objetivo no detectado	Warning: Expected reaction did not occur in control.
Control negativo	No válido: Contaminación	Warning: Possible contamination
	No válido: IC no detectado.	Warning: IC not detected
	No válido: Cq del IC fuera del valor de corte.	Warning: Cq outside cutoff
Sin control de plantilla	No válido: Contaminación	Warning: Possible contamination
Muestra habitual o control	Señal de fluorescencia incierta.	Warning: Uncertain fluorescence signal. Review required.
	Cq detectado con baja fluorescencia.	dRn end fluorescence below cut-off

\*Los ejemplos que se indican aquí pueden no ser aplicables a todos los complementos de ensayo. Consulte las instrucciones de uso de FastFinder para todas las notificaciones posibles, accesibles desde el menú Soporte.

### 22.5.2 Pestaña Details

Todos los objetivos se muestran para cada muestra como filas separadas dentro de la tabla del lado izquierdo. Al seleccionar una o varias filas, se mostrarán las curvas de fluorescencia correspondientes en el gráfico situado en la parte superior derecha y se resaltarán los pocillos en la disposición de las placas mostrada en la parte inferior derecha.


Seleccione **Filters (Filtros)** para mostrar los resultados según parámetros como el nombre del ensayo, el tipo de muestra, el objetivo y el resultado.

Para finalizar el análisis y evitar nuevas ediciones de usuario

- > Seleccione **Authorize (Autorizar)**.
- > Seleccione **Authorize (Autorizar)** de nuevo para confirmar.
- Para asignar una segunda revisión
  - > Seleccione **Assign label (Acciones, Asignar etiqueta)** y **Second Review (Segunda revisión)**.
- Para asignar el análisis a un usuario diferente
  - > Seleccione **Acciones** y **Assign User (Asignar usuario)**
  - > Seleccione el usuario apropiado de la lista desplegable.
- Para rechazar el análisis
  - > Seleccione **Acciones** y **Discard Analysis (Descartar análisis)**.
  - > Añada un comentario y seleccione **Discard (Descartar)** para confirmar.

## 22.6 Curva de referencia

Se puede guardar una curva de referencia y usarla para comparar con muestras en la misma placa o a través de diferentes placas.

- Seleccione la muestra de interés en la pestaña **Summary (Resumen)** o **Details (Detalles)**.
- En el menú de **Amplification graph** (gráficos de amplificación) > Seleccione .
  - > Seleccione la casilla de verificación para la curva de interés y seleccione **Mark as reference (Marcar como referencia)**.

Esta curva de referencia ahora aparecerá vinculada al ensayo en el menú **Lab Configuration > Assays (Configuración de laboratorio > Ensayos)** en la pestaña **PCR** y se puede desactivar en cualquier momento.

## 22.7 Exportación de resultados

- Para exportar los resultados de una ejecución autorizada individual como archivo CSV o PDF:
  - > Seleccione **Actions (Acciones) > Downloads (Descargas)** en la esquina superior derecha.
  - > Seleccione cualquiera de los siguientes tipos de informe: **Analysis (Análisis (CSV))** o **Analysis (Análisis (PDF))**.
- Para exportar los resultados de varias ejecuciones previamente autorizadas como un único archivo CSV:
  - > Navegue al menú **Archive (Archivo) > Sample Results (Resultados)** de la muestra.
  - > Utilice los filtros en la parte superior de la página para mostrar los resultados de interés (el archivo CSV se limita a un máximo de 10.000 resultados).
  - > Seleccione **Exportar CSV** en la esquina superior derecha.

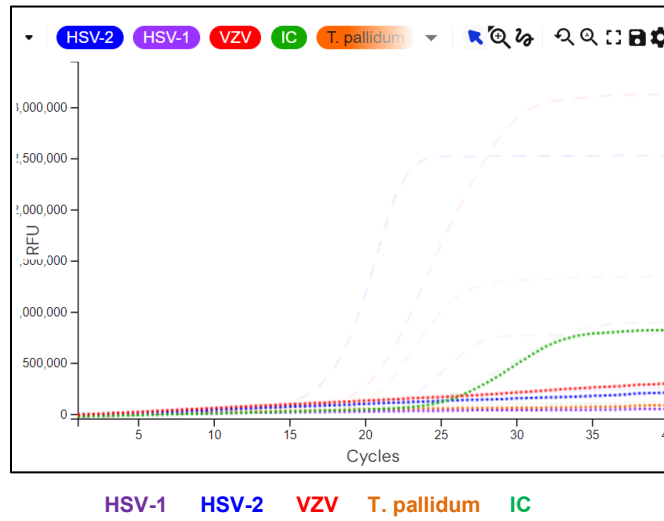
## 22.8 Recuperación de análisis autorizados

- Todos los análisis autorizados están disponibles seleccionando **Archive (Archivo) > Analysis Results (Resultados de los análisis)**. Seleccione una fila para volver a la descripción general de resultados para ese análisis en particular.
- Todas las muestras habituales autorizadas se almacenan en el menú **Archive (Archivo) > Sample Results (Resultados de muestras)**. Al seleccionar una muestra se mostrará información adicional, incluido el nombre del análisis y los detalles del resultado.
- Los resultados objetivo individuales para todas las muestras y los controles habituales autorizados se almacenan en el menú **Archive (Archivo) > Target Results (Resultados de objetivo)**. Seleccionar un objetivo lo resaltará en el gráfico de fluorescencia. Al seleccionar el nombre del análisis, se volverá a la descripción general de los resultados de ese análisis en particular.

## 22.9 Gráficos de ejemplo de control

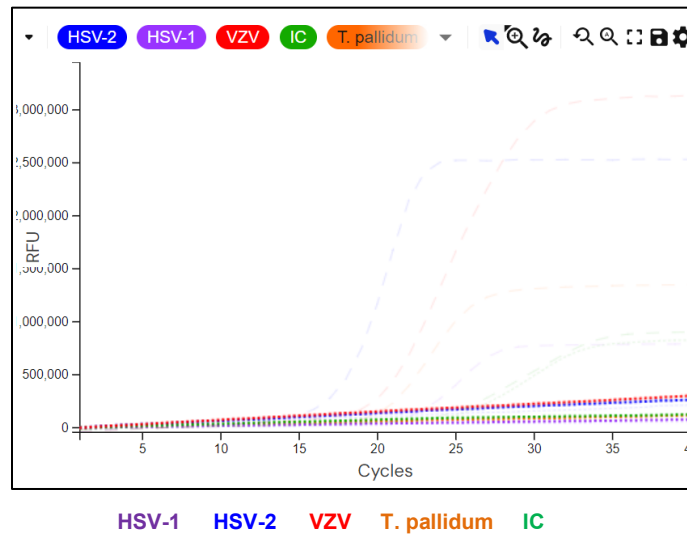
En los siguientes ejemplos se muestran las curvas de amplificación (curvas de amplificación corregidas al inicio) y la descripción general de los resultados del software de análisis **VHS (7500) de PlexPCR** para tipos de muestras de control.

22.9.1 Control negativo (Na)



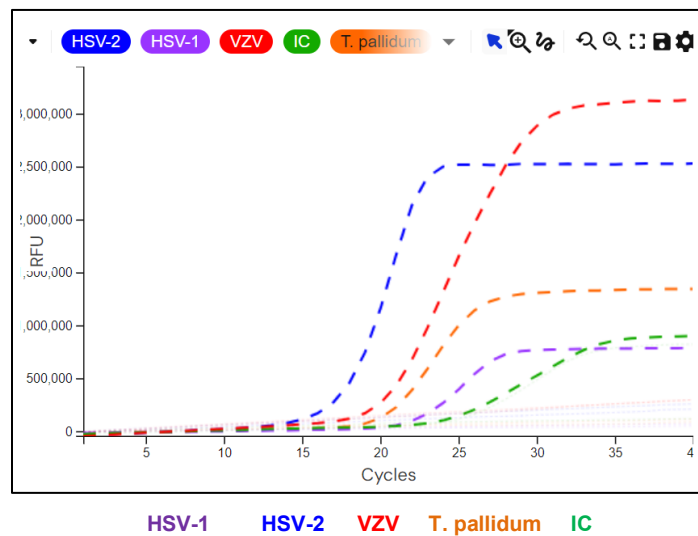
Muestra	Ensayo	Resultado
Na	PlexPCR VHS (7500)	Valid
	HSV-2	⊖ Not detected
	HSV-1	⊖ Not detected
	VZV	⊖ Not detected
	T. pallidum	⊖ Not detected

22.9.2 Sin control de plantilla (Nb)



Muestra	Ensayo	Resultado
Nb	PlexPCR VHS (7500)	<b>Valid</b>
	HSV-2	⊖ Not detected
	HSV-1	⊖ Not detected
	VZV	⊖ Not detected
	T. pallidum	⊖ Not detected

22.9.3 Control positivo (todos los objetivos) (Pa)




Muestra	Ensayo	Resultado
Pa	PlexPCR VHS (7500)	<b>Valid</b>
	HSV-2	⊕ Detected
	HSV-1	⊕ Detected
	VZV	⊕ Detected
	T. pallidum	⊕ Detected

### 22.10 Ejemplos

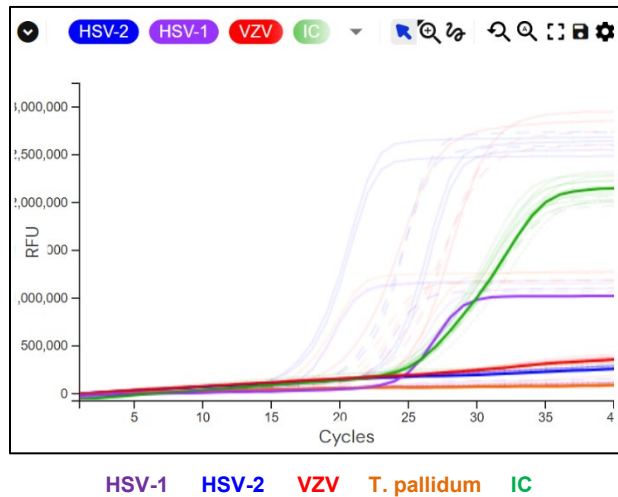
Los resultados de ejemplo para el software de análisis VHS *PlexPCR*<sup>®</sup> se muestran en la **Tabla 39**.

Tabla 39. Ejemplo de resultados para la interpretación del software de análisis VHS <i>PlexPCR</i> <sup>®</sup>			
	Muestra	Ensayo	Resultado
	Muestra 101	PlexPCR VHS (7500)	Not detected
	Muestra 102	PlexPCR VHS (7500)	Detected: HSV-2
	Muestra 103	PlexPCR VHS (7500)	Detected: HSV-1
	Muestra 104	PlexPCR VHS (7500)	Detected: VZV
	Muestra 105	PlexPCR VHS (7500)	Detected: T. pallidum
<sup>1</sup>	Muestra 106	PlexPCR VHS (7500)	Invalid: HSV-2, HSV-1, VZV, T. pallidum

<sup>1</sup> Una muestra interpretada como No válida se marcará con .

Los siguientes resultados de muestra indican curvas iniciales de amplificación con corrección lineal y la vista general de resultados del complemento de ensayo *PlexPCR*<sup>®</sup> VHS (7500).

#### 22.10.1 Ejemplo 1. Muestra positiva: Objetivo único detectado



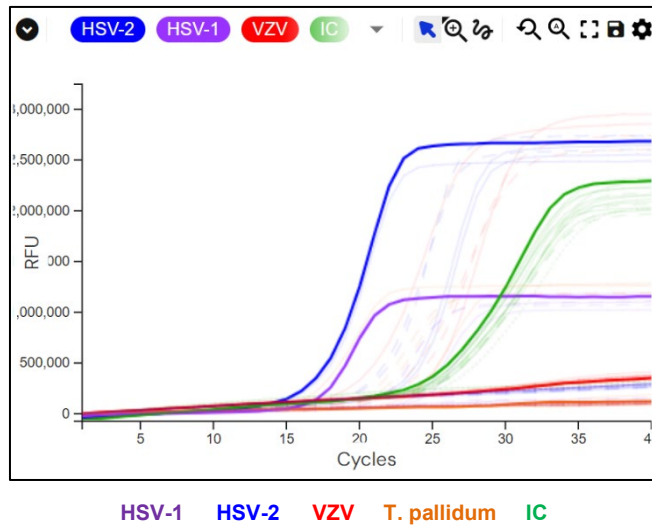
Muestra	Ensayo	Resultado
Muestra 107	PlexPCR VHS (7500)	Detected: HSV-1

Assay results	
HSV-2	⊖ Not detected
HSV-1	⊕ Detected
VZV	⊖ Not detected
T. pallidum	⊖ Not detected

HSV-2	E2	● Not detected
HSV-1	E2	● Detected 23.968
VZV	E2	● Not detected
IC	E2	● Detected 26.162
T. pallidum	E2	● Not detected

22.10.2 Ejemplo 2. Muestra positiva: Varios objetivos detectados

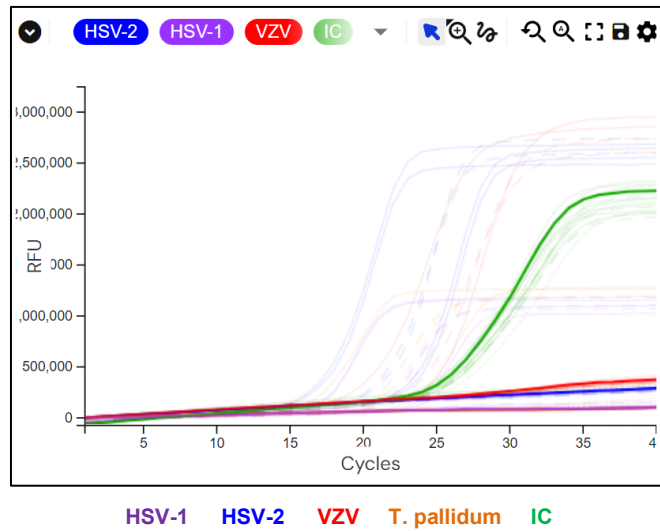


Muestra	Ensayo	Resultado
Muestra 108	PlexPCR VHS (7500)	<b>Detected:</b> HSV-2, HSV-1

<b>Assay results</b> HSV-2 <span style="color: red;">⊕ Detected</span> HSV-1 <span style="color: red;">⊕ Detected</span> VZV <span style="color: green;">⊖ Not detected</span> T. pallidum <span style="color: green;">⊖ Not detected</span>		HSV-2 ↳ B3 <span style="color: red;">● Detected</span> 17.277 HSV-1 ↳ B3 <span style="color: red;">● Detected</span> 16.924 VZV ↳ B3 <span style="color: green;">● Not detected</span> IC ↳ B3 <span style="color: red;">● Detected</span> 25.742 T. pallidum ↳ B3 <span style="color: green;">● Not detected</span>
--	--	---

22.10.3 Ejemplo 3. Muestra negativa



Muestra	Ensayo	Resultado
Muestra 109	PlexPCR VHS (7500)	Not detected

**Assay results**

HSV-2	⊖ Not detected
HSV-1	⊖ Not detected
VZV	⊖ Not detected
T. pallidum	⊖ Not detected

HSV-2  
↳ C2 ● Not detected

---

HSV-1  
↳ C2 ● Not detected

---

VZV  
↳ C2 ● Not detected

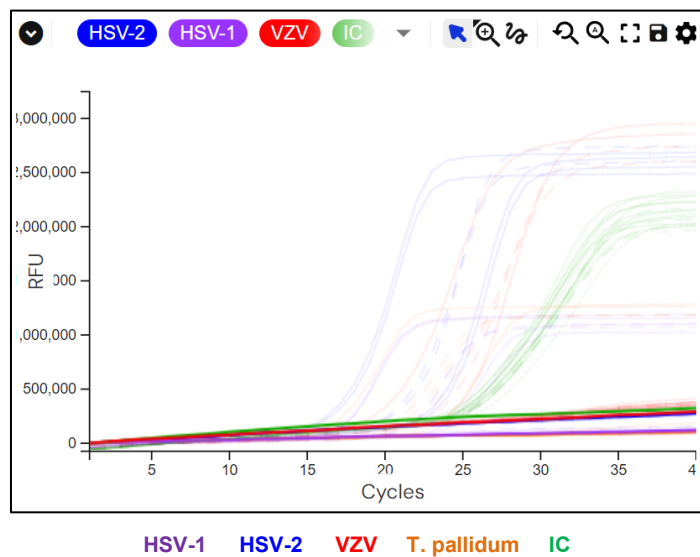
---

IC  
↳ C2 ● Detected 25.869

---

T. pallidum  
↳ C2 ● Not detected

22.10.4 Ejemplo 4. Muestra no válida



Muestra	Ensayo	Resultado
Muestra 110	PlexPCR VHS (7500)	Invalid: HSV-2, HSV-1, VZV, T.pallidum

**Assay results**

HSV-2	Invalid	Warning: IC invalid. Re-extract and re-test sample.
HSV-1	Invalid	Warning: IC invalid. Re-extract and re-test sample.
VZV	Invalid	Warning: IC invalid. Re-extract and re-test sample.
T. pallidum	Invalid	Warning: IC invalid. Re-extract and re-test sample.

Retest this sample for this assay

HSV-2

↳ G2 ● Not detected ▼

---

HSV-1

↳ G2 ● Not detected ▼

---

VZV

↳ G2 ● Not detected ▼

---

IC

↳ G2 ● Not detected ▼

---

T. pallidum

↳ G2 ● Not detected ▼

## 23 Glosario



Conformidad europea  
para uso diagnóstico *in vitro*



Número de catálogo



Código de lote



Representante autorizado  
en la Comunidad Europea



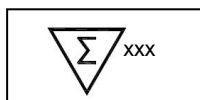
Fabricante



Fecha de fabricación



Limitación de la temperatura



Contiene cantidad suficiente  
para xxx determinaciones



Fecha de caducidad



Importador europeo



Marca de evaluación de  
conformidad del Reino Unido

Los productos SpeedX pueden estar cubiertos por una o más patentes locales o extranjeras. Consulte [www.plexpcr.com/patents](http://www.plexpcr.com/patents) para obtener información detallada de las patentes.

**PlexPCR**<sup>®</sup>, **ResistancePlus**<sup>®</sup>, **PlexPrime**<sup>®</sup> y **PlexZyme**<sup>®</sup> son marcas comerciales propiedad de SpeedX. Los demás copyrights y marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios.

© Copyright 2026 SpeedX Pty. Ltd.