PANAGENE

Kit PANARealTyper ™ STD

www.gentechbio.com · contacto@gentechbio.com
gentechbio @gentechbio

GENTECH BIOSCIENCES

Kit PANARealTyper ™ STD

USO PREVISTO

El kit PANA RealTyper ™ STD es un reactivo de diagnóstico in vitro para la genotipificación de 7 patógenos involucrados en infecciones de transmisión sexual (ITS) de hisopos vaginales y orina. Este kit es una prueba de ADN amplificado para la detección cualitativa de un total de 7 patógenos de ETS utilizando sondas de ácido nucleico peptídico (PNA) y análisis de temperatura de fusión (Tm) en un sistema de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real.

Categoría	Patógeno de ETS
Bacterias	• *Chlamydia trachomatis* • *Ureaplasma parvum* • *tricomonas vaginalis* • *Mycoplasma genitalium* • *Mycoplasma hominis* • *Neisseria gonorrhoeae* • *Ureaplasma urealyticum*

El kit PANARealTyper ™ STD es un dispositivo de diagnóstico con la marca CE de acuerdo con la Unión Europea *in vitro* Directiva de dispositivos médicos de diagnóstico 98/79 / EC.

Kit PANARealTyper ™ STD

PRINCIPIO Y RESUMEN

El kit PANA RealTyper ™ STD utiliza tecnología de análisis de curva de fusión de fluorescencia basada en sondas PNA en un sistema de PCR en tiempo real. Cada sonda de PNA específica de genotipo, que se conjuga con un tinte fluorescente y un extintor, se utiliza como informador en una reacción de PCR en tiempo real. Estas sondas de PNA están diseñadas para hibridar solo con su secuencia diana específica durante el paso de hibridación de la reacción de PCR. Esta unión específica se ve interferida incluso por un único desajuste entre una sonda de PNA y una secuencia diana. Por lo tanto, este sistema de sonda de PNA tiene una alta propiedad de detección de blancos específicos y se puede utilizar para detectar múltiples blancos en un solo tubo de reacción de PCR.

Además, el kit PANA RealTyper ™ STD implementa el análisis de la curva de fusión y luego se determinan los genes diana midiendo la temperatura de fusión. Un total de 7 sondas de PNA específicas de genotipos tienen cada valor de Tm único. La combinación de Tm única y un colorante fluorescente predeterminado de la sonda de PNA se utiliza para genotipar el ADN bacteriano amplificado en la reacción de PCR. Este kit permite la genotipificación múltiple en una única reacción de PCR. Además, la muestra clínica con múltiples infecciones de diferentes genotipos también se determina con precisión utilizando este kit.

El principio del ensayo esbozado en la Figura 1. El kit está diseñado para detectar un fragmento en el gen único de cada bacteria y virus. El ADN bacteriano o viral se extrae de muestras clínicas simultáneamente. (Los kits de recogida de muestras y extracción de ADN no forman parte del kit).

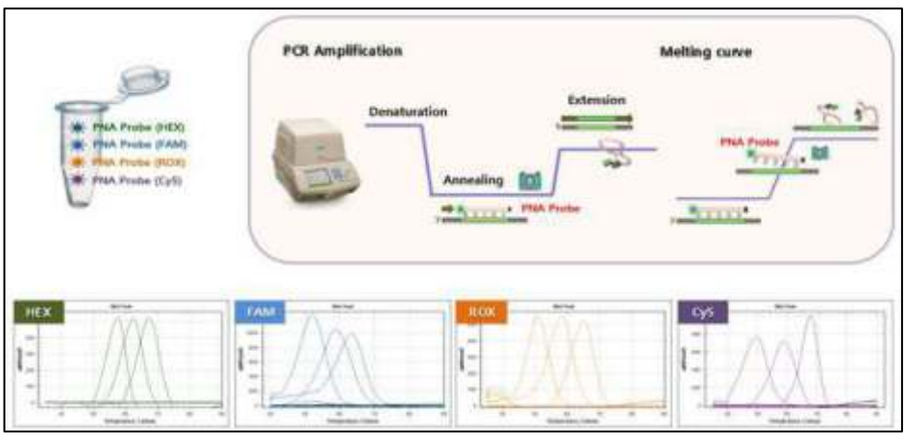


Figura 1. Principio del PANARealTyper ™ STDKit

Los tubos STD Mix contienen un colorante fluorescente (FAM, HEX (o VIC), ROX o Cy5) y sondas de PNA específicas de genotipo conjugado de extintor. El genotipo de ETS se puede identificar analizando el valor único de Tm.

EQUIPOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS POR EL USUARIO

- Reactivos y equipo para extracción de ADN Pipetas
- (capacidad 10 µl, 20 µl y 200 µl) Puntas de pipeta con filtro
-
- Microcentrífuga de mesa
- Mezclador Vortex
- Guantes desechables sin polvo
- **Se recomienda utilizar el sistema de PCR inferior y los consumibles de plástico para obtener el mejor rendimiento.**

Tabla 1. Instrumentos de PCR en tiempo real compatibles y consumibles plásticos

Empresa	Modelo	Consumibles
Bio-Rad	CFX96	• Placa de PCR blanca (número de catálogo BRMLL-9651) • Sellos adhesivos (No. de catálogo MSB-1001)
Thermo Fisher Scientific QuantStudio® 5	• Placa de 96 pocillos (número de catálogo N8010560)	• Película adhesiva (número de catálogo 4311971)

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- **Lea atentamente estas instrucciones y familiarícese con todos los componentes del kit antes de usarlo.**

- **PANARealTyper ™ STDKit es para *in vitro* uso diagnóstico.**
- Este kit debe ser utilizado por profesionales de laboratorio capacitados.
- Todos los experimentos deben realizarse en condiciones de limpieza adecuadas para evitar la contaminación. Se recomienda que el usuario tenga pipetas dedicadas separadas y puntas de pipeta con filtro para agregar la plantilla de ADN y preparar los reactivos de PCR.
- Utilice siempre guantes sin talco cuando manipule el kit.
- Para evitar la congelación y descongelación repetidas, coloque alícuotas de todos los reactivos en volúmenes apropiados y almacénelos congelados hasta su uso. Descongele los volúmenes apropiados de reactivos antes de cada experimento.
- Todos los procedimientos experimentales deben realizarse a temperatura ambiente. Sin embargo, minimice el tiempo de exposición de la ADN polimerasa Taq a temperatura ambiente para una amplificación óptima. Disuelva los reactivos completamente y mézclelos bien con
- vórtex.
- Los tubos deben centrifugarse brevemente antes de su uso.
- Los tubos que contienen PNAprobe deben protegerse de la exposición prolongada a la luz.
- Utilice únicamente el instrumento y los consumibles recomendados. De lo contrario, puede causar una pérdida de rendimiento y aumentar la posibilidad de resultados falsos.
- Puede ser necesario realizar pruebas de validación adicionales por parte de un usuario cuando se utiliza un instrumento no recomendado. No utilice
- un volumen incorrecto de reactivo o ADN diana; puede causar una pérdida de rendimiento y aumentar la posibilidad de resultados falsos.

- No intercambie ni mezcle reactivos de diferentes lotes u otros productos de fabricación. No reutilice los reactivos
- restantes después de que se complete la amplificación por PCR. No utilice los reactivos después de su fecha de
- caducidad.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El kit PANARealTyper ™ STD se envía en paquetes de hielo y aún debe estar congelado a la llegada. Si el kit no está congelado a su llegada, póngase en contacto con PANAGENE o con el distribuidor local (consulte la contraportada).

El kit PANA RealTyper ™ STD debe almacenarse inmediatamente después de recibirlo por debajo de -20 ℃. Cuando se almacena en las condiciones de almacenamiento recomendadas, el kit es estable hasta la fecha de vencimiento etiquetada.

Después de abrir el kit, los reactivos se pueden almacenar en su embalaje original por debajo de -20 ℃ durante 90 días o hasta la fecha de vencimiento, lo que ocurra primero.

CONTENIDO DEL KIT

- Se pueden analizar un total de 96 muestras con un kit.

Tabla 2. Reactivos proporcionados en el kit PANA RealTyper ™ STD (número de catálogo: PNAM-2001-A)

No.	Nombre del contenido	Descripción	Volumen	Etiqueta y color de la gorra	Cant.
1	STD Mix #A	Sondas y cebadores STD PNA	1 ml	STD # A	2 viales
2	ADN polimerasa Taq	ADN polimerasa Taq	100 µ l	STD Taq	1 vial
3	Control positivo	Control positivo	200 µ l	PC STD	1 vial
4	Control negativo	Control negativo	200 µ l	STD NC	1 vial

PROCEDIMIENTOS

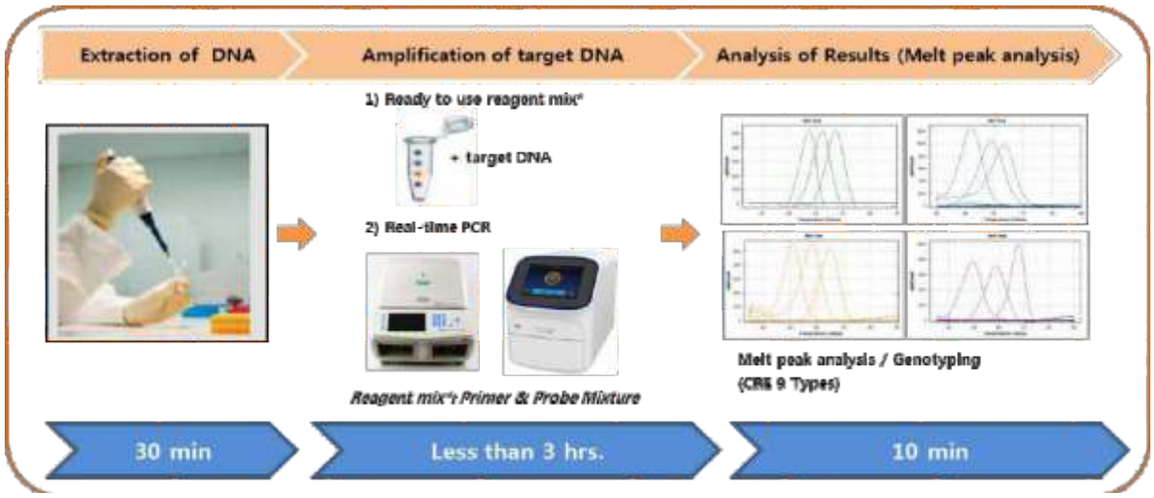


Figura 2. Flujo de trabajo del PANARealTyper ™ STDKit

1. Preparación y almacenamiento de muestras

1) Se pueden usar hisopos vaginales y orina como muestras

2) Idealmente, las muestras deben procesarse el mismo día en que se recolectan. Alternativamente, para hisopos vaginales, se pueden almacenar a 4 ℃ en 24 horas. A largo plazo

almacenamiento, la muestra debe almacenarse a -70 ℃.

Para la orina, se pueden almacenar a temperatura ambiente dentro de las 24 horas o en 4 ℃ En los próximos 3 días. Xa

almacenamiento a largo plazo, la muestra debe almacenarse a -70 ℃.

3) El ADN se puede aislar usando uno de los kits recomendados en la Tabla 3.

Tabla 3. La lista de kits de aislamiento de ADN recomendados para hisopos vaginales y orina

Modelo	Empresa
TANBead® OptiPure ViralAutoTube	Taiwan Advanced Nanotech Inc. (Taiwán)
Kit QIAamp DNAMini	QIAGEN (EE. UU.)
Kit QIAamp DNAMini QIAcube	QIAGEN (EE. UU.)

4) El ADN extraído se puede almacenar a 4 ℃ hasta siete días o a -80 ℃ para almacenamiento a largo plazo.

2. Preparación de la mezcla de PCR en tiempo real

Tabla 4. Preparar la mezcla de reacción por reacción

Reactivo	Volumen*
STD Mix #A	19 µ l
ADN polimerasa Taq	1 µ l
ADN extraído, control positivo (PC) o control negativo (NC)	5 µ l
Volumen total	25 µ l

* Prepare un volumen adicional para cada componente para compensar el error de la pipeta.

1) Prepare la mezcla de reactivo (STDMix # A) después de descongelar, agitar y centrifugar a temperatura ambiente.

2) Prepare la muestra de prueba (ADN extraído) y las muestras de control (NC y PC).

3) Prepare la placa de PCR. Etiquételos como A1 si es necesario.

4) Cargue 19 µl de la mezcla de reactivos (STDMix # A) en la placa de PCR. Por ejemplo, el pozo A1 contendrá STDMix #A.

5) Añada 1 µl de ADN polimerasa Taq a la placa de PCR.

6) Añada 5 µl de muestra de prueba preparada en cada pocillo de la placa de PCR para obtener un total de 25 µ l de final volumen.

7) Se debe incluir un juego de PC y NC para STDMix #A en cada ejecución. Añada 5 µl de PC o NC en los pocillos de la placa de PCR para obtener un total de 25 µ l de volumen final.

8) Selle inmediatamente la placa de PCR firmemente y centrifugue. De lo contrario, la mezcla de PCR se puede evaporar y el resultado de la prueba puede no ser exacto.

3. Reacción de PCR en tiempo real

1) Coloque la placa de PCR preparada en el bloque de un instrumento de PCR en tiempo real.

2) Configure el protocolo de PCR de acuerdo con la siguiente Tabla 5.

Tabla 5. Protocolo de PCR en tiempo real para PANA RealTyper ™ STDKit

UN CICLO		
Incubación	50 ℃	2 minutos
Activación taq	95 ℃	15 minutos
CICLOS DE 3 PASOS (45 CICLOS)		
Desnaturalización	95 ℃	15 segundos
Recocido y detección *	55 ℃	45 segundos
Extensión	72 ℃	15 segundos
CURVA DE FUSIÓN ANÁLISIS		
95 ℃		5 minutos
35 ℃		5 minutos
35 ℃ hasta 80 ℃ (incremento 0.5 ℃) *		5 segundos

3) Seleccione cuatro tintes fluorescentes (FAM, HEX, ROX y Cy5 para CFX96 y FAM, VIC, ROX y Cy5 para QuantStudio® 5) para todos los pocillos de reacción (*).

4. Análisis de datos y resultados de la PCR

1) Establezca el umbral de referencia del análisis del pico de fusión de acuerdo con cada tubo y colorante, respectivamente, de acuerdo con la Tabla 6.

Tabla 6. Los valores de umbral de referencia para la determinación de Tm

CFX96		® 5	
Tinte fluorescente	**Umbral de referencia valores**	**Tinte fluorescente**	**Umbral de referencia valores**
FAM	80	FAM	8.000
MALEFICIO	50	VIC	6.000
ROX	80	ROX	8.000
Cy5	100	Cy5	8.000

2) Evalúe los resultados de acuerdo con los tintes fluorescentes y las temperaturas de fusión enumeradas en la Tabla 7 y 8.

A. Control negativo y control positivo

Las temperaturas de fusión para el control negativo (NC) y el control positivo (PC) deben estar dentro de los rangos que se indican en la Tabla 7. El ensayo debe repetirse si los valores no se encuentran en estos rangos recomendados.

Tabla 7. Los rangos aceptables de temperatura de fusión para NC y PC

STDMix #A		
Tipo	**Colorante**	**Tm (℃)**
Control negativo		
-	FAM	-
-	HEX (o VIC)	-
-	ROX	-
Interno controlar	Cy5	55,0 - 70,0
Control positivo		
Connecticut	FAM	40,0 - 55,0
MG	HEX (o VIC)	57.0 - 72.0
MH	ROX	47,0 - 60,0
Interno controlar	Cy5	55,0 - 70,0

B. Muestra

Si la Tm de cada tinte fluorescente en STD Mix #A está en el rango de criterios (Tabla 8), evalúe el resultado como "Positivo". Si la Tm de cada tinte fluorescente está fuera del rango de criterios, evalúe el resultado como 'Negativo'.

Tabla 8. Criterios de genotipificación de ETS

STDMix #A		
Tipo	**Colorante**	**Tm (℃)**
Connecticut	FAM	40,0 - 55,0
TV		58,5 - 73,5
ARRIBA	MALEFICIO (o VIC)	40,0 - 55,0
MG		57,0 - 72,0
MH	ROX	47,0 - 60,0
NG		61,0 - 76,0
UU	Cy5	40,0 - 54,0
Interno controlar		55,0 - 70,0

C. Interpretación de resultados

Los resultados de la prueba se interpretan como se muestra en la Tabla 9.

Cuadro 9. Interpretación de los resultados

Control interno	STDMix #A	Interpretación
Válido	Positivo	STD detectada *
Válido	Negativo	STD no detectado †
Inválido	Positivo	STD detectada *
Inválido	Negativo	Inválido#

STD detectada (*)

Los resultados positivos en STD Mix #A indican la presencia de ADN STD en la muestra clínica cuando el control interno muestra resultados válidos. El genotipo de ETS debe identificarse a partir de los criterios de la Tabla 8.

ETS no detectada: no se detectan 7 genotipos de ETS probados (†)

Los resultados negativos en STD Mix # A indican que no se detecta ADN de STD en la muestra clínica cuando el control interno muestra resultados válidos o no válidos. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que los genotipos de ETS no dirigidos puedan estar presentes en la muestra clínica analizada. El resultado de “ETS no detectada” no excluye la presencia de ETS en la muestra clínica porque los resultados dependen de la integridad adecuada de la muestra, la ausencia de inhibidores y suficiente ADN para ser detectado.

No válido (#)

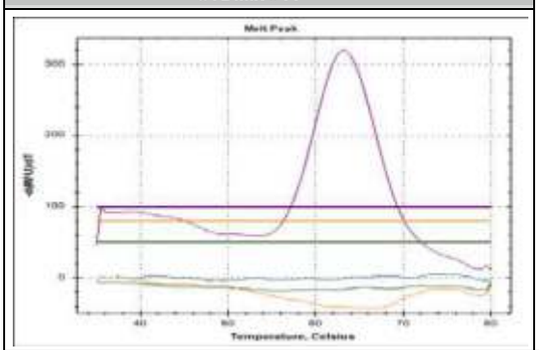
Los resultados negativos en STD Mix #A indican que no se detecta ADN dirigido al control interno en la muestra clínica cuando el control interno muestra resultados no válidos. Puede indicar que la amplificación de la muestra clínica ha fallado o que la cantidad de ADN aislado no es suficiente. Repita todo el procedimiento de prueba para esa muestra clínica, comenzando con el aislamiento del ADN.

EJEMPLOS DE ANÁLISIS

1. Uso de Bio-Rad CFX96

1) Perfil de control negativo (NC)

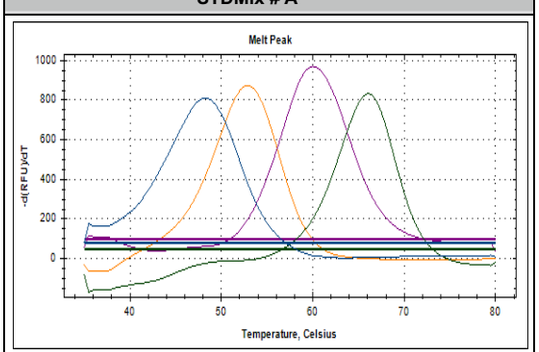
STDMix # A



STDMix # A			Resultado
Colorante	Tm (°C)	Evaluación	
FAM	-	Negativo	Aceptable
MALEFICIO	-	Negativo	
ROX	-	Negativo	
Cy5	63,0	IC válido	

2) Perfil de control positivo (PC)

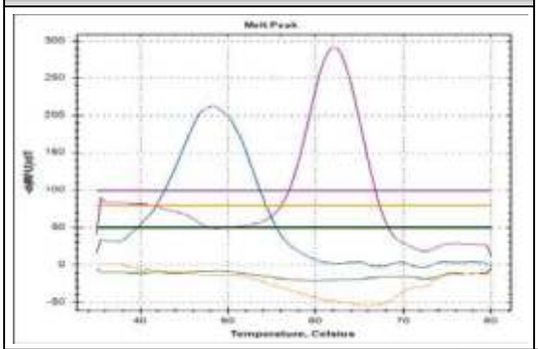
STDMix # A



STDMix # A			Resultado
Colorante	Tm (°C)	Evaluación	
FAM	48,5	Connecticut	Aceptable
MALEFICIO	66,0	MG	
ROX	53,0	MH	
Cy5	60,0	IC válido	

3) Muestra 1

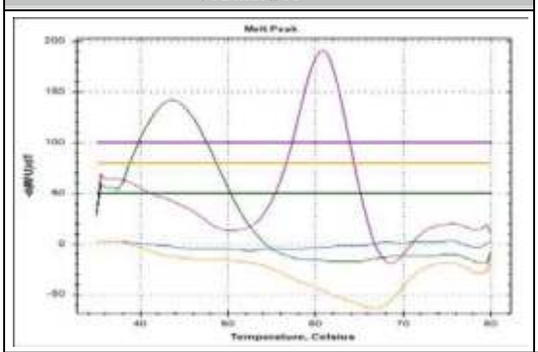
STDMix # A



STDMix # A			Resultado
Colorante	Tm (°C)	Evaluación	
FAM	48,5	Connecticut	Connecticut
MALEFICIO	-	Negativo	
ROX	-	Negativo	
Cy5	62,0	IC válido	

4) Muestra 2

STDMix # A



STDMix # A			Resultado
Colorante	Tm (°C)	Evaluación	
FAM	-	Negativo	ARRIBA, GV
MALEFICIO	43,5	ARRIBA	
ROX	-	Negativo	
Cy5	61,0	IC válido	

5) Muestra 3

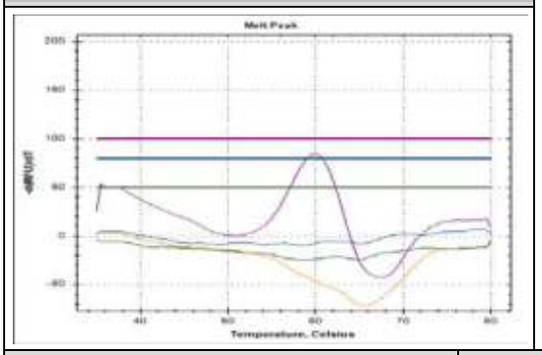
STDMix # A			Resultado
Colorante	Tm (℃)	Evaluación	
FAM	-	Negativo	Negativo
MALEFICIO	-	Negativo	
ROX	-	Negativo	
Cy5	63,0	IC válido	

6) Muestra 4

STDMix # A			Resultado
Colorante	Tm (℃)	Evaluación	
FAM	-	Negativo	NG
MALEFICIO	-	Negativo	
ROX	68,5	NG	
Cy5	-	IC no válido	

7) Muestra 5

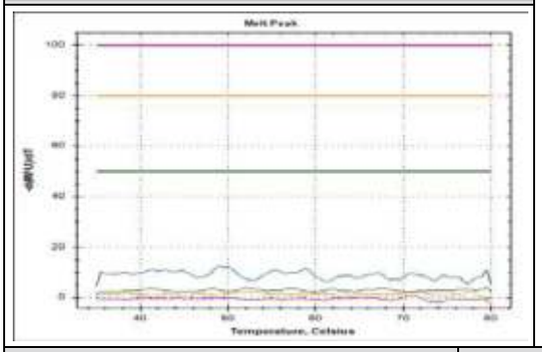
STDMix # A



STDMix # A			Resultado
Colorante	Tm (℃)	Evaluación	
FAM	-	Negativo	TP
MALEFICIO	-	Negativo	
ROX	-	Negativo	
Cy5	-	IC no válido	

8) Muestra 6

STDMix # A

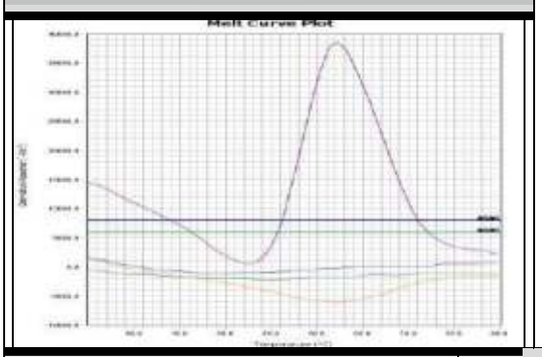


STDMix # A			Resultado
Colorante	Tm (℃)	Evaluación	
FAM	-	Negativo	Inválido
MALEFICIO	-	Negativo	
ROX	-	Negativo	
Cy5	-	IC no válido	

2. Uso de ABI QuantStudio® 5

1) Perfil de control negativo (NC)

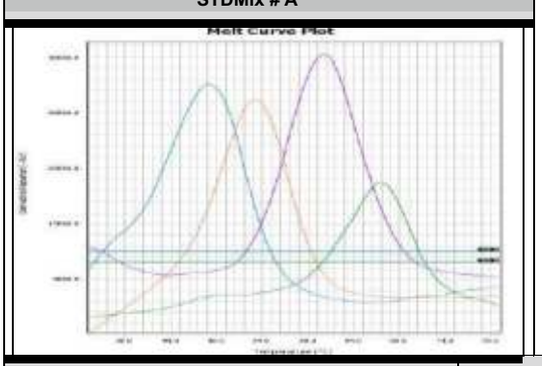
STDMix # A



STDMix # A			Resultado
Colorante	Tm (℃)	Evaluación	
FAM	-	Negativo	Aceptable
VIC	-	Negativo	
ROX	-	Negativo	
Cy5	62,0	IC válido	

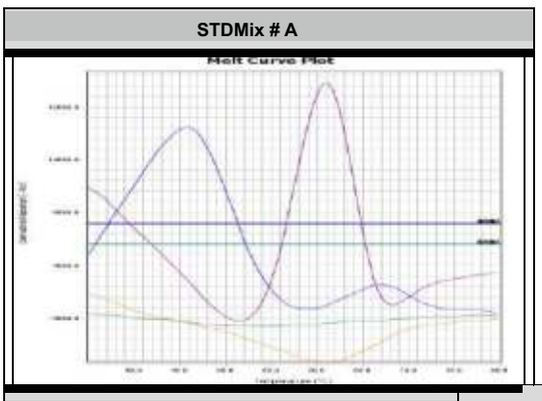
2) Perfil de control positivo (PC)

STDMix # A



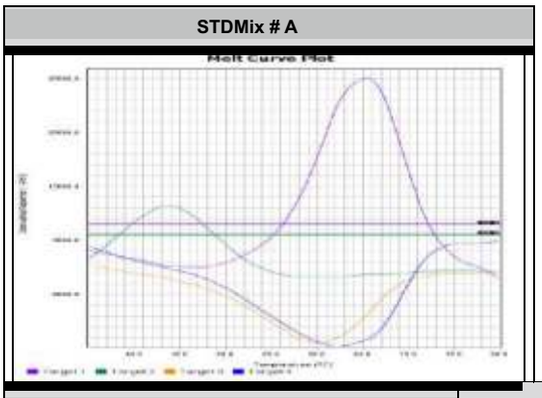
STDMix # A			Resultado
Colorante	Tm (℃)	Evaluación	
FAM	48,2	Connecticut	Aceptable
VIC	67,0	MG	
ROX	53,4	MH	
Cy5	60,8	IC válido	

3) Muestra 1



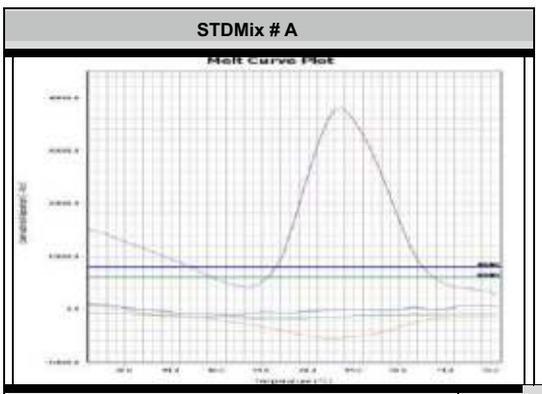
STDMix # A			Resultado
Colorante	Tm (°C)	Evaluación	
FAM	45,6	Connecticut	Connecticut
VIC	-	Negativo	
ROX	-	Negativo	
Cy5	61,0	IC válido	

4) Muestra 2



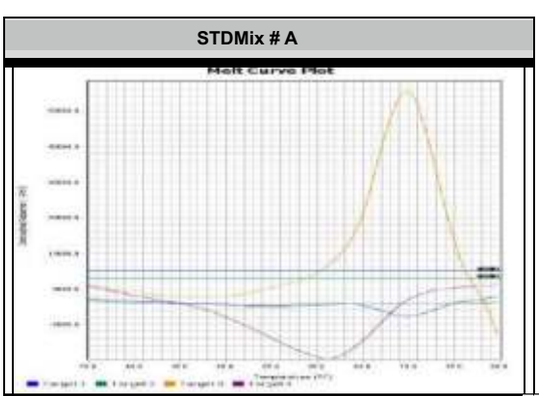
STDMix # A			Resultado
Colorante	Tm (°C)	Evaluación	
FAM	-	Negativo	ARRIBA, GV
VIC	43,6	ARRIBA	
ROX	-	Negativo	
Cy5	65,5	IC válido	

5) Muestra 3



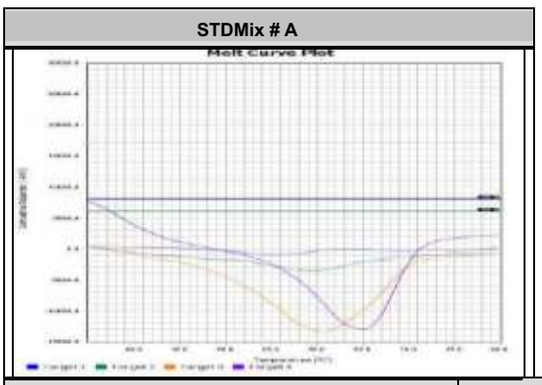
STDMix # A			Resultado
Colorante	Tm (℃)	Evaluación	
FAM	-	Negativo	Negativo
VIC	-	Negativo	
ROX	-	Negativo	
Cy5	62,5	IC válido	

6) Muestra 4



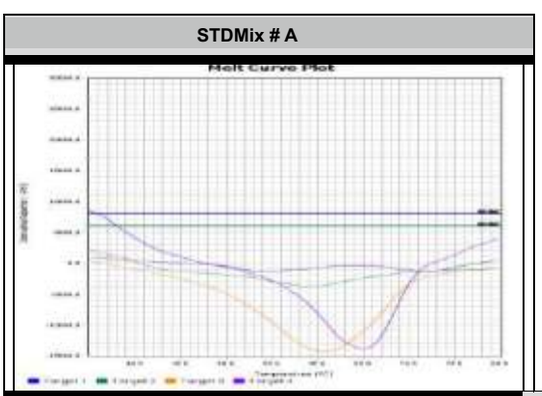
STDMix # A			Resultado
Colorante	Tm (℃)	Evaluación	
FAM	-	Negativo	NG
VIC	-	Negativo	
ROX	69,7	NG	
Cy5	-	IC no válido	

7) Muestra 5



STDMix # A			Resultado
Colorante	Tm (℃)	Evaluación	
FAM	-	Negativo	TP
VIC	-	Negativo	
ROX	-	Negativo	
Cy5	-	IC no válido	

8) Muestra 6



STDMix # A			Resultado
Colorante	Tm (℃)	Evaluación	
FAM	-	Negativo	Inválido
VIC	-	Negativo	
ROX	-	Negativo	
Cy5	-	IC no válido	

CONTROL DE CALIDAD

Cada lote de PANA RealTyper ™ STD Kit se prueba con especificaciones predeterminadas para garantizar una calidad constante del producto de acuerdo con el Sistema de Gestión de Calidad certificado por ISO 9001 y 13485 de PANAGENE.

PRUEBA DE RENDIMIENTO

1. Sensibilidad analítica

El estudio de límite de detección se evaluó utilizando tres lotes de kits y los materiales estándar, plásmidos que contienen el gen diana. El límite de detección para cada gen diana se resume en la Tabla 10.

Tabla 10. Límite de detección del kit PANA RealTyper ™ STD

Reactivo	Tipo	Límite de detección (LOD)
STD Mix #A	*Chlamydia trachomatis*	5×10^{1} copias / rxn
	tricomonas vaginalis	5×10^{1} copias / rxn
	Ureaplasma parvum	5×10^{0} copias / rxn
	Mycoplasma genitalium	5×10^{1} copias / rxn
	Mycoplasma hominis	5×10^{1} copias / rxn
	Neisseria gonorrhoeae	5×10^{1} copias / rxn
	Ureaplasma urealyticum	5×10^{1} copias / rxn

2. Especificidad analítica

El estudio de reactividad cruzada se evaluó utilizando tres lotes de kits y muestras de ADN aisladas de 21 microorganismos diferentes. Los resultados no mostraron reactividad cruzada con ninguno de los microorganismos patógenos probados a continuación.

Organismo bacteriano		Virus	Organismo
Veillonella sp.	*Prevotella buccae*	Papi humano	virus del lloma 16
Proteus mirabilis	*Candida glabrata*	Papi humano	virus del lloma 18
Klebsiella oxytoca	*Candida parapsilosis*	Papi humano	virus del lloma 68
Pseudomonas aeruginosa	*Candida tropicalis*		
Staphylococcus epidermidis	*Clostridium perfringens*		
Enterococcus faecium	*Escherichia coli*		
Treponema phagedenis	*Haemophilus influenzae*		
Streptococcus entericus	*Staphylococcus aureus*		
Peptostreptococcus prevotii	*Vibrio parahaemolyticus*		

3. Reproducibilidad

El estudio de reproducibilidad se evaluó en sitios de prueba, operadores, corridas y días utilizando dos lotes de kits y los materiales estándar, plásmidos que contienen el gen objetivo. Todos los resultados se mostraron dentro del 5% de CV (coeficiente de variación).

4. Interferencia

El estudio de interferencia se evaluó agregando la sustancia potencialmente interferente al paso de lisis durante el procedimiento de preparación de la muestra.

Sangre total (≤ 1,5% v / v) y leucocitos (≤ 10^7 células / ml) no interfieren con los resultados de la prueba.

REFERENCIAS

1. BANDEA, Claudiu I., et al. Desarrollo de ensayos de PCR para la detección de Trichomonas vaginalis en muestras de orina. *Revista de microbiología clínica,* 2013, 51.4: 1298-1300.
2. OYEBANJI, Tolulope. Evaluación de Cepheid SmartCycler y EuroClone Duplicareal time Dual Easy CT ensayo para la confirmación de Chlamydia trachomatis. *Horizontes de biociencia,* 2013, 6.
3. TWIN, Jimmy y col. Transmisión y selección de infecciones por Mycoplasma genitalium resistentes a macrólidos detectadas mediante análisis rápido de fusión de alta resolución. *Más uno,* 2012, 7.4: e35593.
4. XIAO, Li y col. Detección y caracterización de especies de Ureaplasma humano y serovares mediante PCR en tiempo real. *Revista de microbiología clínica,* 2010, 48.8: 2715-2723.
5. ZARIFFARD, M. Reza y col. Detección de organismos relacionados con la vaginosis bacteriana mediante PCR en tiempo real para Lactobacilli, Gardnerella vaginalis y Mycoplasma hominis. *Inmunología y microbiología médica FEMS,* 2002, 34.4: 277-281.
6. PAPP, John R. y col. Recomendaciones para la detección de laboratorio de Chlamydia trachomatis y Neisseria gonorrhoeae — 2014. *MMWR. Recomendaciones e informes: Informe semanal de morbilidad y mortalidad. Recomendaciones e informes / Centros para el Control de Enfermedades,* 2014, 63: 1.
7. HASAN, Mohammad R. y col. Estabilidad a corto plazo de dianas de ácidos nucleicos específicos de patógenos en muestras clínicas. *Revista de microbiología clínica,* 2012, 50.12: 4147-4150.

EXPLICACIÓN DE SÍMBOLOS EN LA ETIQUETA

IVD	*In vitro* Dispositivo médico de diagnóstico		Fabricante
LOT	Código de lote	Σ	Contiene suficiente para < *n*> pruebas
REF	Número de catalogo		Límite superior de temperatura de almacenamiento
EC REP	Representante europeo autorizado		Usar por
	Consultar instrucciones de uso	CE 0123	Este producto cumple los requisitos de la Directiva Europea 98/79 EC para *in vitro* diagnóstico médico dispositivos.

NOTAS FINALES

El kit en sí o cualquiera de los componentes del kit no se puede modificar, revender o transferir sin la aprobación del fabricante. La información contenida en este documento está sujeta a cambios.

PANAGENE

Kit PANARealTyper ™ STD

www.gentechbio.com · contacto@gentechbio.com
gentechbio @gentechbio

GENTECH BIOSCIENCES