

Allplex™

MTB/XDRe Detection

(N.º de cat. TB9500X, TB10387Z)

Sistema real-time PCR multiplex para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a medicamentos antituberculosos de segunda línea (fluoroquinolonas y medicamentos inyectables) basado en análisis de temperatura de fusión.

Para uso con

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



Solo para uso en diagnóstico *in vitro*



TB9500X



100



TB10387Z



25



Seegene Inc.

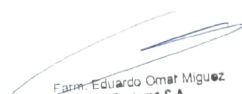
Taewon Bldg., 91 Ogeum-ro, Songpa-gu, Seúl, República de Corea 05548



Medical Technology Promedt Consulting GmbH

Ernst-Heckel-Straße 7, 66386 St. Ingbert, Alemania

No disponible en los Estados Unidos


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


Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

ÍNDICE

AVISOS	3
USO PREVISTO	5
PRINCIPIOS Y DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROCEDIMIENTO	5
ANTECEDENTES	7
REACTIVOS	10
ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN	12
MATERIALES NECESARIOS, PERO NO INCLUIDOS	12
PROTOCOLO	13
CONFIGURACIÓN DEL INSTRUMENTO REAL-TIME PCR Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	22
RESULTADOS	42
SOLUCIÓN DE PROBLEMAS	47
RENDIMIENTO	49
REFERENCIAS	60
CLAVE DE LOS SÍMBOLOS	61
INFORMACIÓN PARA PEDIDOS	62



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




Dr.a. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

AVISOS

- Solo para uso en diagnóstico *in vitro*.
- El ensayo Allplex™ MTB/XDRe Detection debe realizarlo personal cualificado y con la formación adecuada.
- La fiabilidad de los resultados depende de que los procedimientos de recogida, almacenamiento, transporte y procesamiento de las muestras primarias sean adecuados.
- El producto puede usarse un máximo de 5 veces con las siguientes plataformas automatizadas: **Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS, Seegene STARlet y Seegene STARlet 96MPH.**
- **Esta prueba se ha validado para los siguientes tipos de muestras primarias: esputo, cultivo y lavado bronquial.** Esta prueba no se ha validado para otros tipos de muestras primarias.
- **El sistema de extracción de ácido nucleico automatizada solo se ha validado para el esputo.**
- **Almacene las muestras de DNA a ≤ -20 °C hasta que las use y consérvelas en hielo durante el uso.**
- La sensibilidad del ensayo puede reducirse si las muestras se congelan o descongelan varias veces o si se almacenan durante más tiempo.
- **Se debe usar el tubo de PCR [EU 0.1 mL, Thin-wall 8-tube strip (N.º de cat. B77009) y EU 8-Single attachable optical wide indented cap-strip (N.º de cat. B79501); BIOplastics] exclusivo para las reacciones de PCR de este producto.**
- **La reacción del control de tipo natural se debe llevar a cabo siempre en cada ejecución de la prueba.**
- El flujo de trabajo del laboratorio debe ser unidireccional.
- En todo momento deben usarse guantes desechables y cambiarlos antes de entrar en otras zonas. Cámbiese los guantes inmediatamente si se contaminan o trátelos con reactivo de descontaminación de DNA
- Los consumibles y el equipo deben ser específicos de las zonas de trabajo y no se deben trasladar de una zona a otra.
- No pipetee con la boca.
- No coma, beba ni fume en las zonas de trabajo del laboratorio. Use guantes sin polvo desechables, batas de laboratorio y protección ocular cuando manipule muestras primarias y reactivos. Lávese bien las manos después de manipular muestras primarias y reactivos de prueba.
- Evite contaminar los reactivos al tomar alícuotas de los tubos. Se recomienda usar puntas de pipeta desechables, estériles y que sean resistentes a los aerosoles
- No agrupe reactivos de lotes diferentes ni de tubos diferentes del mismo lote.
- No use el producto después de su fecha de caducidad.
- No reutilice los artículos desechables.
- Use tubos con tapón de rosca y evite posibles salpicaduras o contaminación cruzada de muestras primarias durante la preparación.

- Tenga cuidado de no contaminar los reactivos con los ácidos nucleicos extraídos, los productos de PCR ni los controles positivos. Para evitar la contaminación de los reactivos, se recomienda usar puntas con filtro.
- Use zonas de trabajo separadas y segregadas para cada experimento.
- Para evitar la contaminación de las zonas de trabajo con productos amplificados, abra los tubos de reacción de PCR o las tiras solo en las áreas de trabajo designadas después de la amplificación.
- Almacene los controles positivos separados de los reactivos del kit.
- Deben seguirse los procedimientos de seguridad en laboratorios (consulte “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories” y los documentos del CLSI) al manipular muestras primarias. Limpie y desinfecte exhaustivamente todas las superficies de trabajo con hipoclorito de sodio al 0,5% v/v (en agua desionizada o destilada). Los componentes del producto (residuos, envoltorio, etc.) pueden considerarse desechos de laboratorio. Deseche los reactivos sin utilizar y los residuos conforme a las normativas nacionales, regionales y locales en vigor.
- La fecha de caducidad es de 12 meses a partir de la fecha de fabricación a ≤ -20 °C. Consulte la fecha de caducidad en la etiqueta.
- Seegene NIMBUS y Seegene STARlet son el mismo equipo que Microlab NIMBUS IVD y Microlab STARlet IVD, aunque el fabricante sea diferente. Dado que no ha habido cambios de hardware en el dispositivo, los resultados de la prueba son los mismos.
- El nombre del equipo “CFX96™ Real-time PCR Detection System-IVD” se cambió por “CFX96™ Dx system”. Dado que no ha habido cambios de hardware en los sistemas, se espera que los resultados sean los mismos en ambos.
- El programa “CFX Manager™ Dx Software v3.1” es una versión actualizada de “CFX Manager™ Software-IVD v1.6”. Esta versión actualizada incluye mejoras en el menú “Run (Ejecución)”. Estas mejoras no influyen en los resultados del análisis de datos; por lo tanto, los resultados serán los mismos.
- Este kit está pensado para el diagnóstico diferencial de infecciones por patógenos objetivo: *Mycobacterium tuberculosis*
- This kit is intended to aid in the differential diagnosis of target pathogen infections; *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a medicamentos antituberculosos de segunda línea (fluoroquinolonas y medicamentos inyectables)



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



Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

USO PREVISTO

Allplex™ MTB/XDRe Detection es una prueba *in vitro* cualitativa para la detección simple o múltiple de *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a medicamentos antituberculosos de segunda línea (fluoroquinolonas y medicamentos inyectables) a partir de muestras primarias de esputo, cultivos o lavado bronquial de pacientes sintomáticos. Cubre 7 mutaciones que causan resistencia a las fluoroquinolonas en el gen *gyrA* y 6 mutaciones que causan resistencia a los medicamentos inyectables en el gen *rrs* y en la región promotora de *eis*.

PRINCIPIOS Y DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROCEDIMIENTO

1. Principios

Seegene posee dos destacadas tecnologías relacionadas con la PCR: la **tecnología dual priming oligonucleotide (DPO™)** y la **tecnología TOCE™**. DPO™ es una herramienta fundamental para bloquear la extensión de plantillas no específicamente cebadas, lo que permite diseñar y desarrollar ensayos con una especificidad excepcional. La fortaleza y la utilidad de la tecnología DPO™ pueden incorporarse a diferentes sistemas de diagnóstico molecular, como los ensayos moleculares multiplex y los ensayos para la detección de mutación puntual. TOCE™ es una novedosa tecnología para la lectura en tiempo real basada en análisis de temperatura de fusión. Hasta ahora, el análisis de temperatura de fusión tenía varias limitaciones inherentes, a saber: diseño limitado de la sonda, multiplex insuficiente e ineficiente y alta sensibilidad de las temperaturas de fusión debida a la variación de secuencia en el sitio de la sonda. La tecnología TOCE™ supera estas limitaciones proporcionando capacidades multiplex mejoradas, aumentando la flexibilidad del diseño de la sonda, facilitando una lectura independiente de la variación de secuencia objetivo y ofreciendo compatibilidad entre plataformas. Combinar las tecnologías DPO™ y TOCE™ permite Real-time Detection simultánea de varias mutaciones puntuales con alta especificidad.

Allplex™ MTB/XDRe Detection es un ensayo real-time PCR multiplex que permite la amplificación y la detección simultáneas de secuencias objetivo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), **7 mutaciones causantes de resistencia a fluoroquinolonas (FQ) [*gyrA* A90V(GTG), S91P(CCG), D94A(GCC), D94G(GGC), D94H(CAC), D94N(AAC), D94Y(TAC)]**, **6 mutaciones causantes de resistencia a medicamentos inyectables [*rrs* 1401(G), 1402(T), 1484(T), promotor de *eis* -37(T), -14(T), -10(A)]** y control interno (IC).


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

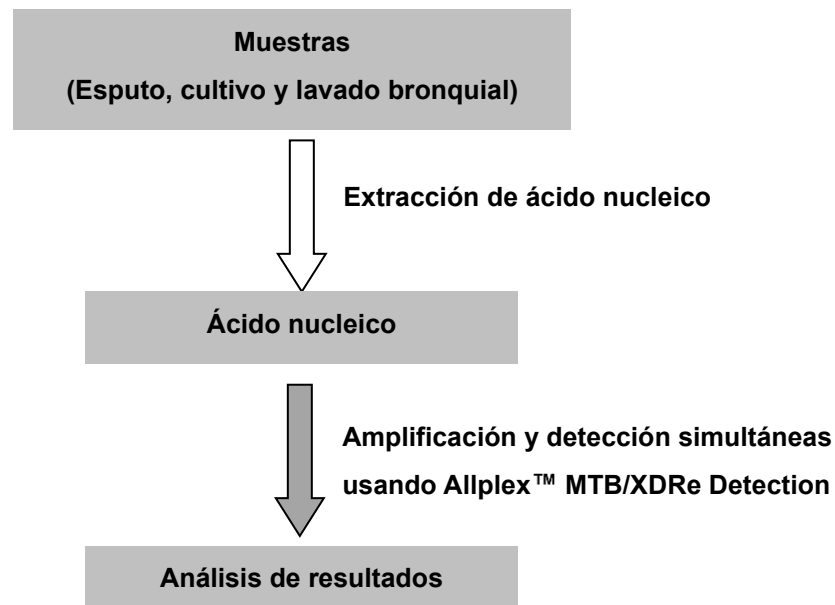

Dra. MARIANA VILA PEREZ
APROBADA
BioSystems S.A.


Allplex™ MTB/XDRe Detection incluye control interno. El control interno se añade para supervisar las muestras primarias procesadas que contienen sustancias que podrían interferir con la amplificación de la PCR.

La especificidad de los oligonucleótidos de detección de mutaciones en Allplex™ MTB/XDRe Detection puede confirmarse con el control de tipo natural (WTC). El control de tipo natural está diseñado para mostrar el mismo patrón de resultados que la muestra de *M. tuberculosis* farmacosensible. **La reacción del control de tipo natural se debe llevar a cabo siempre para cada ejecución de la prueba, y el resultado de resistencia a los medicamentos de muestras desconocidas se analiza en función del resultado del control de tipo natural.**

El sistema de Uracilo-DNA glicosilasa (UDG)-dUTP se emplea en Allplex™ MTB/XDRe Detection. Esta tecnología se utiliza comúnmente para eliminar los amplicones sobrantes de la PCR mediante la escisión de los enlaces *N*-glicosídicos.

2. Resumen del procedimiento




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


Dra. MARINA VILA PEREZ
APROBADA
BioSystems S.A.


ANTECEDENTES

1. Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad bacteriana infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* y se sabe que se propaga por el aire. Cuando la persona infectada tose, escupe o habla, los organismos de *M. tuberculosis* se dispersan en el aire. Un pequeño número de *M. tuberculosis* es suficiente para causar infección si se inhala. Sin embargo, no todas las personas infectadas por *M. tuberculosis* enfermarán; el sistema inmunitario mata o aísla los gérmenes, que pueden permanecer inactivos durante años. Si el sistema inmunitario no logra controlar la infección por *M. tuberculosis*, se activa la enfermedad. La tuberculosis y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) son una combinación letal. El SIDA debilita el sistema inmunitario, y una persona con positivo en human immunodeficiency virus (HIV) infectada por *M. tuberculosis* tiene muchas más probabilidades de enfermar de tuberculosis que alguien con negativo en HIV infectado por *M. tuberculosis*.

2. Tuberculosis resistente a los medicamentos

Cuando se identifica una persona con tuberculosis infecciosa, debe iniciarse el tratamiento con medicamentos antituberculosos. Los medicamentos antituberculosos más habituales (medicamentos de primera línea) son Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamide y Ethambutol. Se han documentado cepas resistentes a un solo medicamento en todos los países estudiados; es más, han aparecido cepas de *M. tuberculosis* resistentes a todos los principales medicamentos antituberculosos. Una forma especialmente peligrosa de tuberculosis resistente a los medicamentos es la tuberculosis multirresistente (MDR-TB), definida como la enfermedad causada por *M. tuberculosis* resistente como mínimo a dos de los medicamentos antituberculosos más eficaces y usados, Isoniazid y Rifampicin. La MDR-TB está presente en casi todos los países estudiados por la Organización Mundial de la Salud (WHO). La tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB), un tipo de MDR-TB relativamente raro, es resistente a Isoniazid y Rifampicin y, además, a cualquier fluoroquinolona y como mínimo a uno de los tres medicamentos de segunda línea inyectables (Amikacin, Kanamycin y Capreomycin). En julio de 2010, 58 países y territorios habían declarado como mínimo un caso de XDR-TB.



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



Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

3. Diagnóstico de tuberculosis y tuberculosis resistente a los medicamentos

Un diagnóstico rápido y exacto de los pacientes sintomáticos es la piedra angular de las estrategias globales de control de la tuberculosis. La tuberculosis activa se diagnostica actualmente mediante una evaluación total de síntomas, signos clínicos y resultados de pruebas. Entre los métodos de prueba diagnósticos de la tuberculosis se incluyen la radiografía de tórax (rayos X), la microscopía (tinción con bacilos acidorresistentes [AFB]), el cultivo y el diagnóstico molecular. Junto con el cultivo como método analítico de referencia, los métodos de diagnóstico molecular basados en la PCR se usan mucho para el diagnóstico precoz de tuberculosis.


Detectar la resistencia a los medicamentos antes del inicio de una quimioterapia inadecuada evita morbilidad, mortalidad, costes económicos y tratamiento innecesario con medicamentos ineficaces. Los métodos rutinarios de prueba de susceptibilidad a medicamentos (DST), método analítico de referencia para el diagnóstico de tuberculosis resistente a los medicamentos, son lentos y rara vez están disponibles en entornos con recursos limitados. El hecho de que con frecuencia se tardan varias semanas en producir un resultado retrasa el inicio del tratamiento eficaz, lo que aumenta el riesgo de que la *M. tuberculosis* resistente a los medicamentos se transmita a los contactos. Además, los pacientes pueden recibir tratamiento inadecuado que aumente la resistencia y ponga en peligro la posibilidad de obtener buenos resultados con el tratamiento. Por lo tanto, un diagnóstico exacto, sencillo y rápido es necesario para un cribado eficaz y es una útil ayuda clínica para aplicar el tratamiento adecuado y luchar contra la tuberculosis en todo el mundo.

Entre los avances recientes de las DST fenotípicas se incluyen el uso de indicadores de crecimiento de micobacterias y los ensayos basados en fagos. Aunque estos métodos pueden mostrar resistencia fenotípica en un plazo que va de 2 a 10 días, el cultivo de *M. tuberculosis* viable representa un riesgo para la salud del personal de laboratorio y, por lo tanto, requiere elevados niveles de bioseguridad. Para superar estas limitaciones y aumentar la velocidad de detección de resistencia a los medicamentos, se han desarrollado numerosos métodos basados en PCR. Sin embargo, el enorme número de polimorfismos de nucleótido único no sinónimos (nsSNPs) diferentes que proporcionan resistencia sigue siendo un reto importante a la hora de desarrollar métodos de prueba genotípicos. Además, muchos de estos métodos basados en PCR se ven obstaculizados por la necesidad de procesamiento posterior para permitir la detección de nsSNPs en el dominio amplificado por PCR (por ejemplo, hibridación de oligonucleótidos inmovilizados, microarray, hibridación Dot Blot, cromatografía líquida de alta resolución desnaturante y secuenciación de DNA).

Las mutaciones objetivo de Allplex™ MTB/XDRe Detection se resumen en la tabla incluida a continuación.

Mutaciones objetivo de Allplex™ MTB/XDRe Detection

Resistencia a los medicamentos	Gen relacionado	Mutaciones objetivo			
Resistencia a fluoroquinolonas (FQ-R)	<i>gyrA</i>	A90V (GCG→GTG)	S91P (TCG→CCG)	D94A (GAC→GCC)	D94G (GAC→GGC)
		D94H (GAC→CAC)	D94N (GAC→AAC)	D94Y (GAC→TAC)	
Resistencia a medicamentos inyectables (Inj. drug-R)	<i>rrs</i>	1401 (A→G)	1402 (C→T)	1484 (G→T)	
	Promotor de <i>eis</i>	-37 (G→T)	-14 (C→T)	-10 (G→A)	



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




Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

REACTIVOS

El kit incluye reactivos suficientes para 100 reacciones.

Información para pedidos (**REF** TB9500X)

Allplex™ MTB/XDRe Detection			
Símbolo	Contenido	Volumen	Descripción
PRIMER	MTBe TOM	500 µL	Oligomezcla TOCE (TOM): - Reactivo de amplificación y detección
PRIMER	XDRe TOM	500 µL	Oligomezcla TOCE (TOM): - Reactivo de amplificación y detección
PREMIX	EM1	500 µL X 2	- DNA polimerasa - Uracilo-DNA glicosilasa (UDG) - Solución tampón con dNTPs
CONTROL +	MTB/DRe PC	300 µL	Control positivo (PC): - Mezcla de patógenos y clones del IC
CONTROL IC	MTB/DRe IC	1.000 µL	Control interno (IC) exógeno Para Allplex™ MTB/XDRe Detection
CONTROL W	MTB/DRe WTC	300 µL	Control de tipo natural (WTC): - Mezcla de clones de objetivos MTB de tipo natural y clones de IC
WATER	RNase-free Water	1.000 µL X 2	Agua ultrapura sin nucleasas para PCR
DNA ES	DNA Extraction Solution	10 mL X 2	Reactivo para extracción de DNA bacteriano
	Manual del usuario		


Producto accesorio: software de análisis
Seegene Viewer *

* El software de análisis de resultados lo proporcionan Seegene o el distribuidor regional.

Utilice una versión de Seegene Viewer posterior a V3.

El kit incluye reactivos suficientes para 25 reacciones.

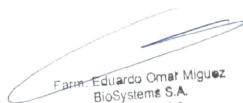
Información para pedidos (**REF** TB10387Z)

Allplex™ MTB/XDRe Detection			
Símbolo	Contenido	Volumen	Descripción
PRIMER	MTBe TOM	125 µL	Oligomezcla TOCE (TOM): - Reactivo de amplificación y detección
PRIMER	XDRe TOM	125 µL	Oligomezcla TOCE (TOM): - Reactivo de amplificación y detección
PREMIX	EM1	125 µL X 2	- DNA polimerasa - Uracilo-DNA glicosilasa (UDG) - Solución tampón con dNTPs
CONTROL +	MTB/DRe PC	300 µL	Control positivo (PC): - Mezcla de patógenos y clones del IC
CONTROL IC	MTB/DRe IC	250 µL	Control interno (IC) exógeno Para Allplex™ MTB/XDRe Detection
CONTROL W	MTB/DRe WTC	300 µL	Control de tipo natural (WTC): - Mezcla de clones de objetivos MTB de tipo natural y clones de IC
WATER	RNase-free Water	1.000 µL X 2	Agua ultrapura sin nucleasas para PCR
DNA ES	DNA Extraction Solution	10 mL	Reactivo para extracción de DNA bacteriano
	Manual del usuario		

Producto accesorio: software de análisis

Seegene Viewer *

* El software de análisis de resultados lo proporcionan Seegene o el distribuidor regional. Utilice una versión de Seegene Viewer posterior a V3.


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

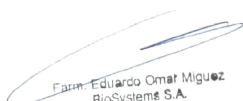

Dra. MARIANA VILA PEREZ
APDERADA
BioSystems S.A.

ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

Todos los componentes de Allplex™ MTB/XDRe Detection deben almacenarse a ≤ -20 °C y son estables en las condiciones de almacenamiento recomendadas hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El rendimiento de los reactivos no se ve afectado si se han realizado 5 o menos ciclos de congelación/descongelación. Si el uso de los reactivos es intermitente, se recomienda almacenarlos en alícuotas.

MATERIALES NECESARIOS, PERO NO INCLUIDOS

- NALC-NaOH (0,5% de NALC, 2% de NaOH y 1,47% de citrato de trisodio) o 4% NaOH (1 N NaOH)
- Solución 1X PBS
- Aguja o asa de plástico desechables
- Guantes sin polvo desechables (de látex o nitrilo)
- Pipetas (ajustables) y puntas de pipeta estériles
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL
- Máquina de hielo
- Centrífuga de sobremesa
- Agitador vórtex
- Bloque de calor
- Mesa de trabajo estéril
- CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- EU 0.1 mL, Thin-wall 8-tube Strip, white (N.º de cat. B77009; BIOplastics)
- EU 8-single attachable optical wide indented cap-strip (N.º de cat. B79501; BIOplastics)



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



Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

PROTOCOLO

1. Recogida, almacenamiento y transporte de las muestras primarias

Nota: Todas las muestras deben tratarse como material potencialmente infeccioso. Las muestras deben recogerse, almacenarse y transportarse siguiendo rigurosamente las siguientes normas e instrucciones.

Nota: Para garantizar una alta calidad de las muestras, las muestras primarias deben transportarse lo más rápidamente posible y a la temperatura indicada.

A. Recogida de las muestras primarias

Espujo

- Cuando recoja muestras primarias de espujo, dé instrucciones claras a los pacientes. Los pacientes deben recoger las muestras en el exterior, al aire libre o alejados de otras personas. Los pacientes no deben recoger las muestras en lugares cerrados, como baños.
- Enjuagar la boca con agua antes de recoger el espujo. El paciente debe toser fuerte y expectorar el espujo directamente en el recipiente.
- Una muestra de espujo debe tener un volumen de 3 a 5 mL.

Cultivo sólido (Ogawa)

- Pueden realizarse pruebas en las muestras en cuanto el crecimiento es visible y durante los 60 días de incubación posteriores.
- La colonia puede recogerse con una aguja o un asa de plástico desechables. Evite recoger el medio Ogawa junto con la célula.

Cultivo líquido (MGIT)

- Los tubos indicadores de crecimiento de micobacterias (MGIT) se examinan diariamente con una lámpara UV en busca de fluorescencia naranja brillante en la parte inferior de dichos tubos, reflejada en el menisco. Si hay señal positiva de fluorescencia, pipetee 0,5 mL de muestra de la parte inferior del tubo.

Lavado bronquial

- El médico debe recoger el lavado bronquial asépticamente en un recipiente estéril utilizando técnicas de aspiración o procedimientos quirúrgicos.

B. Almacenamiento y transporte de las muestras primarias

Muestra primaria	Almacenamiento y transporte		Nota
	Temp.	Duración*	
Espuito	2-8 °C	5 días	- El rendimiento puede verse afectado por el almacenamiento prolongado de las muestras primarias. - Para el transporte de las muestras primarias se deben seguir las normativas locales y nacionales de transporte de material patógeno.
Cultivo sólido (Ogawa)			
Cultivo líquido (MGIT)			
Lavado bronquial			

* **Duración:** tiempo transcurrido desde la recogida de las muestras primarias hasta la prueba final (incluye el transporte y el almacenamiento de las muestras primarias antes de la prueba).

2. Pretratamiento de las muestras primarias

Espuito

1) Para la extracción de ácido nucleico manual

- Añada el mismo volumen de NALC-NaOH (0,5% de NALC, 2% de NaOH y 1,47% de citrato de trisodio) a la muestra primaria del recipiente de espuito y mézclela en el agitador vórtex durante 1 minuto.

Nota: Puede utilizarse NaOH 4% (1 N NaOH) en lugar de NALC-NaOH.

- Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Transfiera 1,5 mL a un nuevo tubo estéril y centrifugue a 15.000 x g (13.000 rpm) durante 5 minutos.
- Deseche el sobrenadante, añada 1 mL de solución 1X PBS y mezcle bien.
- Centrifugue a 15.000 x g (13.000 rpm) durante 5 minutos y deseche el sobrenadante con una pipeta.
- Añada 1 mL de solución 1X PBS y mezcle bien.
- Centrifugue a 15.000 x g (13.000 rpm) durante 5 minutos y deseche el sobrenadante con una pipeta.

2) Para el sistema de extracción de ácido nucleico automatizada (STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit)

- Añada el mismo volumen de NALC-NaOH (0,5% de NALC, 2% de NaOH y 1,47% de citrato de trisodio) a la muestra primaria del recipiente de espuito y mézclela en el agitador vórtex durante 1 minuto.
- Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Transfiera 1 mL a un nuevo tubo estéril y centrifugue a 15.000 x g (13.000 rpm) durante 5 minutos.

- Deseche el sobrenadante, añada 300 µL de Lysis Buffer del Universal Cartridge Kit al precipitado y mezcle bien.
- Bloquee el tapón del tubo con un seguro y hierva durante 5 minutos a 100 °C en el bloque de calor.

3) Para el sistema de extracción de ácido nucleico automatizada (STARMag N/S, S96H, SP32, M96 kits)

- Añada el mismo volumen de NALC-NaOH (0,5% de NALC, 2% de NaOH y 1,47% de citrato de trisodio) a la muestra primaria del recipiente de esputo y mézclela en el agitador vórtex durante 1 minuto.

Nota: Puede utilizarse NaOH 4% (1 N NaOH) en lugar de NALC-NaOH.

- Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Transfiera 1 mL a un nuevo tubo estéril y centrifugue a 15.000 x g (13.000 rpm) durante 5 minutos.
- Deseche el sobrenadante, añada 300 µL de PBS al precipitado y mezcle bien.
- Bloquee el tapón del tubo con un seguro y hierva durante 5 minutos a 100 °C en el bloque de calor.

Lavado bronquial

- Sin añadir NALC-NaOH, centrifugue 1,5 mL de muestra primaria a 15.000 x g (13.000 rpm) durante 5 minutos.
- Deseche el sobrenadante, añada 1 mL de solución 1X PBS y mezcle bien.
- Centrifugue a 15.000 x g (13.000 rpm) durante 5 minutos y deseche el sobrenadante con una pipeta.

3. Extracción de ácido nucleico

A. Control interno

Nota: El control interno (IC) se incluye en el kit para permitir a los usuarios no solo confirmar el procedimiento de extracción de ácido nucleico, sino también identificar las inhibiciones de PCR.

- Deben añadirse 10 µL de MTB/DRe IC a cada muestra primaria antes de la extracción de ácido nucleico.
- El IC puede añadirse directamente a la DNA Extraction Solution o a la mezcla de muestra primaria y DNA Extraction Solution.
- Al usar Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS, Seegene STARlet o Seegene STARlet 96MPH, MTB/DRe IC se debe cargar en el equipo de extracción antes de la extracción de ácido nucleico.
- Al usar SEEPREP32, o Maelstrom™ 9600, se deben añadir 10 µL de MTB/DRe IC a cada muestra primaria antes de la extracción de ácido nucleico.

B. Kit de extracción de ácido nucleico manual

Nota: DNA Extraction Solution está incluida en el kit Allplex™ MTB/XDRe Detection.

Todas las muestras primarias, excepto las de cultivo

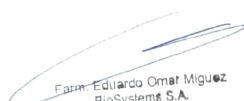
- (Opcional) Añada 1 mL de agua estéril al sedimento preparado, centrifugue a 15.000 x g (13.000 rpm) durante 5 minutos y deseche el sobrenadante con una pipeta.
- Añada 100 µL de DNA Extraction Solution al sedimento y mezcle en el agitador vórtex durante 30 segundos.
- Bloquee el tapón del tubo con un seguro y hierva durante 20 minutos a 100 °C en el bloque de calor.
- Centrifugue a 15.000 x g (13.000 rpm) durante 5 minutos.
- Utilice 5 µL de sobrenadante como plantilla para PCR.

Cultivo sólido (Ogawa)

- Suspenda una colonia en 200 µL de DNA Extraction Solution en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
- Mézclelo en el agitador vórtex durante 30 segundos.
- Bloquee el tapón del tubo con un seguro y hierva durante 20 minutos a 100 °C en el bloque de calor.
- Centrifugue a 15.000 x g (13.000 rpm) durante 5 minutos.
- Utilice 5 µL de sobrenadante como plantilla para PCR.

Cultivo líquido (MGIT)

- Transfiera 0,5 mL del cultivo de la parte inferior a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
- Centrifugue a 15.000 x g (13.000 rpm) durante 5 minutos.
- Deseche el sobrenadante y añada 200 µL de DNA Extraction Solution al sedimento.
- Mézclelo en el agitador vórtex durante 30 segundos.
- Bloquee el tapón del tubo con un seguro y hierva durante 20 minutos a 100 °C en el bloque de calor.
- Centrifugue a 15.000 x g (13.000 rpm) durante 5 minutos.
- Utilice 5 µL de sobrenadante como plantilla para PCR.



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



Dra. MARIANA MILA PEREZ
APLICADA
BioSystems S.A.

C. Sistema de extracción de ácido nucleico automatizada

Nota: Los sistemas de extracción de ácido nucleico automatizada solo se han validado para el esputo.

Nota: Use los volúmenes recomendados de muestra primaria y elución indicados a continuación. Para lo demás, consulte el protocolo del fabricante.

C-1. Microlab NIMBUS IVD

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

Sistema de extracción automatizada	Fabricante	N.º de cat.	Vol. recomendado
Microlab NIMBUS IVD	Hamilton	65415-02*	-
STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	Seegene	744300.4. UC384	Muestra primaria: 300 µL Elución: 100 µL
STARMag™ N/S Kit	Seegene	EX00031C	Muestra primaria: 300 µL Elución: 100 µL

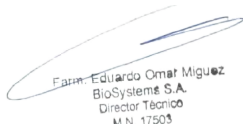
* Use los números de catálogo mostrados en la tabla para comprar productos a Seegene Inc.

C-2. Microlab STARlet IVD

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

Sistema de extracción automatizada	Fabricante	N.º de cat.	Vol. recomendado
Microlab STARlet IVD	Hamilton	173000-075*	-
STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	Seegene	744300.4. UC384	Muestra primaria: 300 µL Elución: 100 µL
STARMag™ N/S Kit	Seegene	EX00031C	Muestra primaria: 300 µL Elución: 100 µL

* Use los números de catálogo mostrados en la tabla para comprar productos a Seegene Inc.


 Edgardo Omar Miguez
 BioSystems S.A.
 Director Técnico
 M.N. 17503


 Dra. MARINA VILA PEREZ
 APODERADA
 BioSystems S.A.

C-3. Seegene NIMBUS

Nota: Consulte el manual de funcionamiento de **Seegene NIMBUS**.

Sistema de extracción automatizada	Fabricante	N.º de cat.	Vol. recomendado
Seegene NIMBUS	Seegene	65415-03	-
STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	Seegene	744300.4.UC384	Muestra primaria: 300 µL Elución: 100 µL
STARMag™ N/S Kit	Seegene	EX00031C	Muestra primaria: 300 µL Elución: 100 µL

C-4. Seegene STARlet

Nota: Consulte el manual de funcionamiento de **Seegene STARlet**.

Sistema de extracción automatizada	Fabricante	N.º de cat.	Vol. recomendado
Seegene STARlet	Seegene	67930-03	-
STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	Seegene	744300.4. UC384	Muestra primaria: 300 µL Elución: 100 µL
STARMag™ N/S Kit	Seegene	EX00031C	Muestra primaria: 300 µL Elución: 100 µL

C-5. Seegene STARlet 96MPH

Nota: Consulte el manual de funcionamiento de **STARlet 96MPH**.

Sistema de extracción automatizada	Fabricante	N.º de cat.	Vol. recomendado
Seegene STARlet 96MPH	Seegene	SG71101	-
STARMag™ S96H Kit	Seegene	EX00032P EX00033P EX00034P EX00035P	Muestra primaria: 300 µL Elución: 100 µL

C-6. SEEPREP32


- Continúe con el proceso de extracción con **“STARMag SP32”**.

Sistema de extracción automatizada	Fabricante	N.º de cat.	Vol. recomendado
SEEPREP32	Seegene	SG71100	-
STARMag™ SP32 Kit (Plate Type)	Seegene	EX00028P	Muestra primaria: 200 µL Elución: 100 µL
STARMag™ SP32 Kit (Tube Type)	Seegene	EX00028T	Muestra primaria: 200 µL Elución: 100 µL

C-7. Maelstrom™ 9600

- Continúe con el proceso de extracción con **“STARMAGM96”**.

Sistema de extracción automatizada	Fabricante	N.º de cat.	Vol. recomendado
Maelstrom™ 9600	Taiwan Advanced Nanotech Inc.	M9600	-
STARMag™ M96 Kit	Seegene	EX00029P EX00030P	Muestra primaria: 200 µL Elución: 100 µL


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


 Dra. MARIANA VILA PEREZ
 APDERADA
 BioSystems S.A.

4. Preparación para Real-time PCR

Nota: Deben usarse los tapones y los tubos correctos (ver MATERIALES NECESARIOS, PERO NO INCLUIDOS).

Nota: Deben usarse guantes ajustados y puntas con filtro resistentes a aerosoles al preparar reacciones de PCR. Tenga mucho cuidado para evitar la contaminación cruzada.

Nota: Descongele completamente todos los reactivos en hielo.

Nota: Centrifugue brevemente los tubos de reactivo para quitar las gotitas del interior del tapón.

Nota: Cada muestra se probará simultáneamente en dos reacciones diferentes (MTBe y XDRe).

Nota: Los pasos A-D se procesan automáticamente en Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS, Seegene STARlet y Seegene STARlet 96MPH. Consulte cada manual de funcionamiento.

A. Prepare la PCR Mastermix.

5 µL	MTBe TOM o XDRe TOM
5 µL	EM1
5 µL	RNase-free Water
15 µL	Volumen total de PCR Mastermix

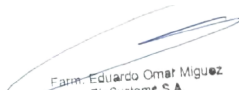
Nota: Calcule la cantidad total de cada reactivo en función del número de reacciones, incluidas muestras y controles.

B. Mezcle en el agitador vórtex con rapidez y centrifugue brevemente.

C. Divida en partes alícuotas 15 µL de PCR Mastermix en tubos de PCR.

D. Añada 5 µL de ácidos nucleicos de cada muestra al tubo que contiene la parte alícuota de la PCR Mastermix.

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

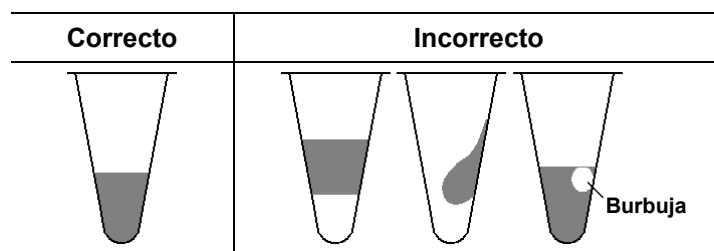

Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.V. 1988


Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

E. Cierre el tapón y centrifugue brevemente los tubos de PCR.

F. Compruebe que el líquido que contiene todos los componentes de PCR esté en la parte inferior de cada tubo de PCR. Si no lo está, centrifugue de nuevo a más rpm durante más tiempo.

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



Nota: Use una punta de pipeta estéril nueva para cada muestra.

Nota: Para el **control negativo (NC)**, use 5 µL de RNase-free Water en lugar del ácido nucleico de la muestra.


Nota: Para el **control positivo (PC)**, use 5 µL de MTB/DRe PC en lugar del ácido nucleico de la muestra.

Nota: Para el **control de tipo natural (WTC)**, use 5 µL de MTB/DRe WTC en lugar del ácido nucleico de la muestra.

Nota: La reacción del control de tipo natural se debe llevar a cabo siempre para cada ejecución de la prueba, y el resultado de resistencia a los medicamentos de muestras desconocidas se analiza en función del resultado del control de tipo natural.

Nota: Tenga cuidado de no contaminar de forma cruzada la PCR Mastermix y las muestras con el control positivo o el control de tipo natural.

Nota: No etiquete los tubos de reacción en el tapón. La fluorescencia se detecta desde la parte superior de cada tubo de reacción.


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


Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

CONFIGURACIÓN DEL INSTRUMENTO REAL-TIME PCR Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

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

1.1. Configuración del instrumento Real-time PCR

Nota: Para el análisis de datos sencillo en Seegene Viewer, instale cada tubo de reacción MTBe y XDRe en la posición especificada del bloque como se indica a continuación.

- **MTBe: columnas 1-6**
- **XDRe: columnas 7-12**

Nota: La configuración del experimento de CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad) puede dividirse en tres pasos: Protocol Setup (Configuración del protocolo), Plate Setup (Configuración de la placa) y Start Run (Iniciar ejecución).

A. Protocol Setup (Configuración del protocolo)

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

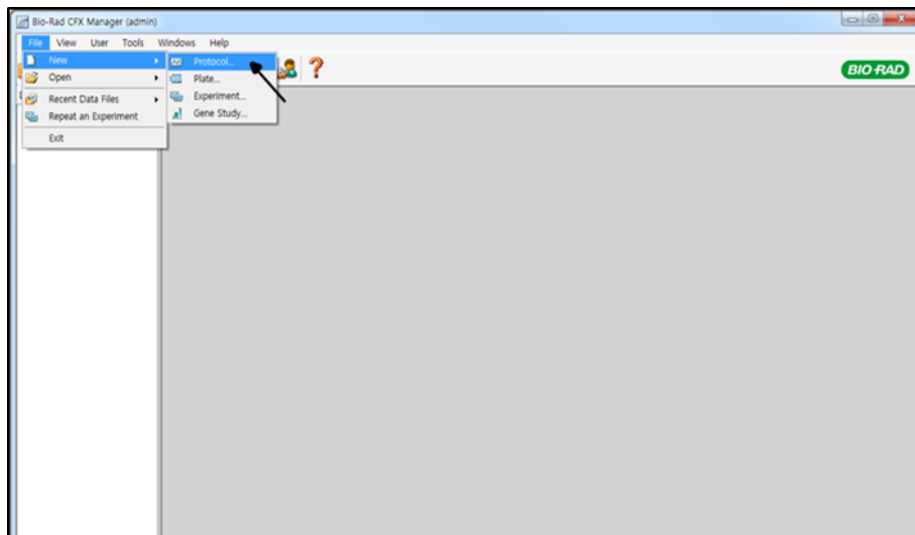
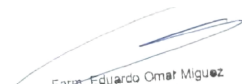


Fig. 1. Protocol Setup (Configuración del protocolo)


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


Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

2) En **Protocol Editor (Editor de protocolos)**, defina el perfil térmico como se indica a continuación:

Paso	Núm. ciclos	Temperatura	Duración
1	1	95 °C	15 min
2		95 °C	30 s
3*	50	60 °C	1 min
4		72 °C	30 s
5		Paso GOTO (IR A) 2, 49 veces más	
6	1	55 °C	30 s
7*	1	Curva de fusión 55 °C-85 °C (5 s/0,5 °C)	

***Lectura de placa en paso 3 y 7.** Se detecta fluorescencia a 60 °C y curva de fusión.

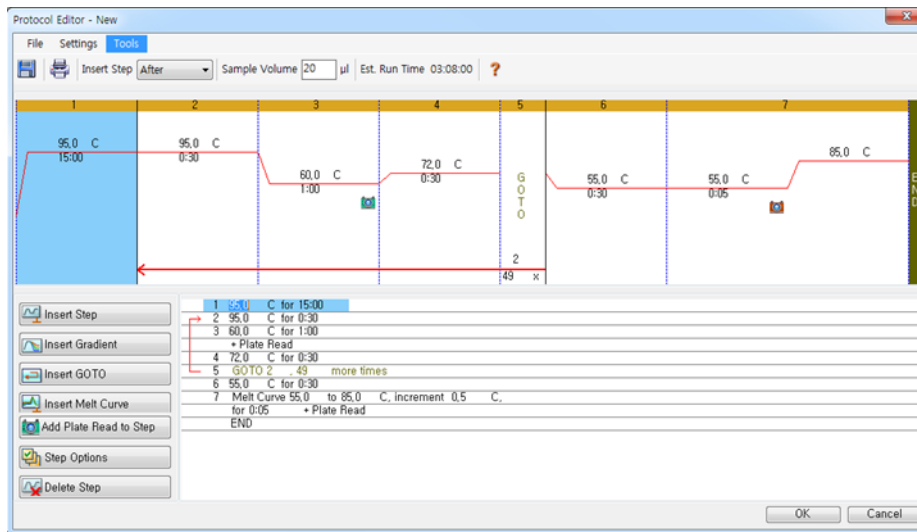


Fig. 2. **Protocol Editor (Editor de protocolos)**

3) Haga clic en el cuadro situado junto a **Sample Volume (Volumen de muestra)** para introducir directamente **20 µL**.

Faren: *EdUARDO OMAR MIGUEZ*
 BioSysteme S.A.
 Director Técnico
 M.N. 17503

Dr. *MARINA VILA PEREZ*
 APDTERADA
 BioSystems S.A.

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

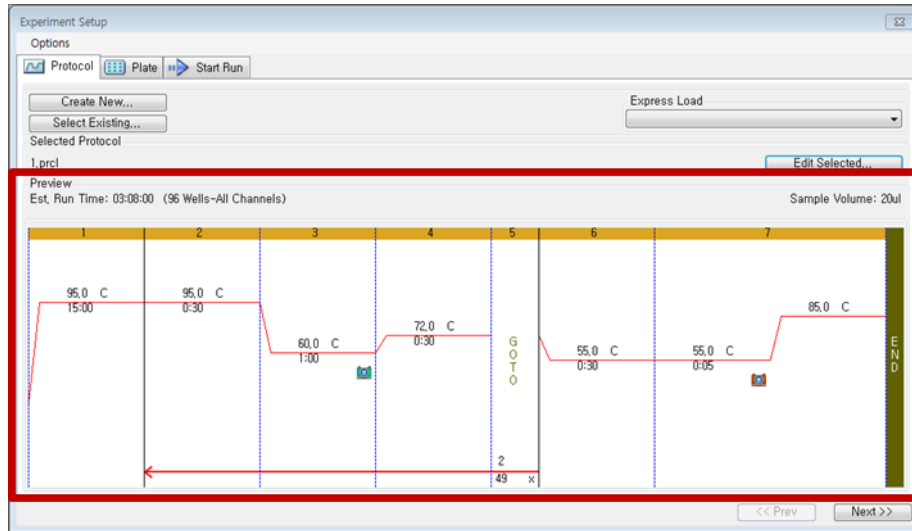


Fig. 3. **Experiment Setup (Configuración del experimento): Protocol (Protocolo)**

B. Plate Setup (Configuración de la placa)

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

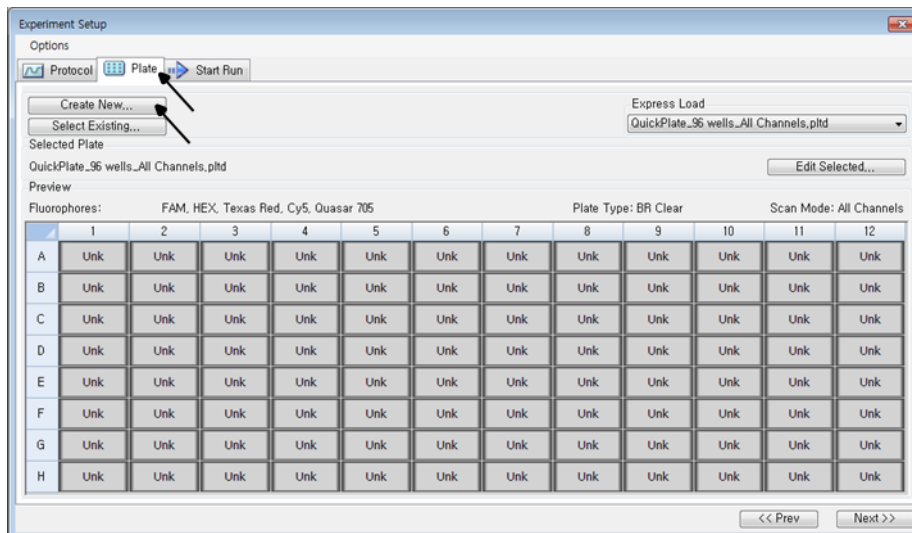


Fig. 4. **Plate Editor (Editor de placas)**

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

Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

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

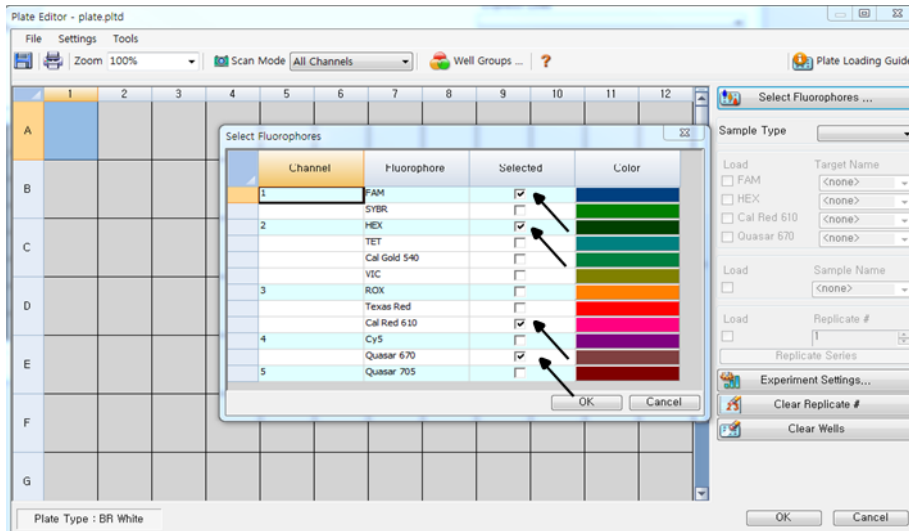


Fig. 5. **Select Fluorophores (Seleccionar fluorocromos) (FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670)**

3) Seleccione los pocillos en los que se colocará el tubo de PCR y seleccione su tipo de muestra en el menú desplegable **Sample Type (Tipo de muestra)**.

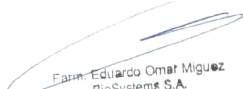
- **Unknown (Desconocido):** muestras clínicas y controles de tipo natural
- **Negative Control (Control negativo)**
- **Positive Control (Control positivo)**

4) Haga clic en las casillas correspondientes (**FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670**) para especificar los fluorocromos que se detectarán en los pocillos seleccionados.

5) Escriba el **Sample Name (Nombre de la muestra)** y pulse la tecla Entrar.

Nota: Con control de tipo natural, debe escribirse el nombre correcto como se indica a continuación.

- **WTc** para la reacción MTBe
- **XWTc** para la reacción XDRe


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


 Dra. MARINA VILA PEREZ
 APDADERADA
 BioSystems S.A.

6) En **Settings (Configuración)** del menú principal **Plate Editor (Editor de placas)**, elija **Plate Size (96 wells) (Tamaño de placa [96 pocillos])** y **Plate Type (BR White) (Tipo de placa [blanco BR])**.

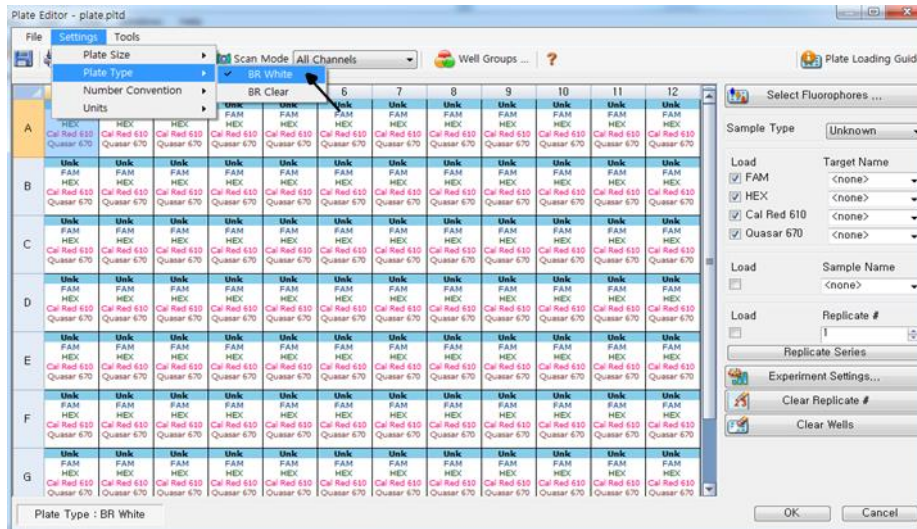


Fig. 6. Plate Setup (Configuración de la placa)

7) Haga clic en **OK (Aceptar)** para guardar la nueva placa.

8) Volverá a la ventana **Experiment Setup (Configuración del experimento)**.

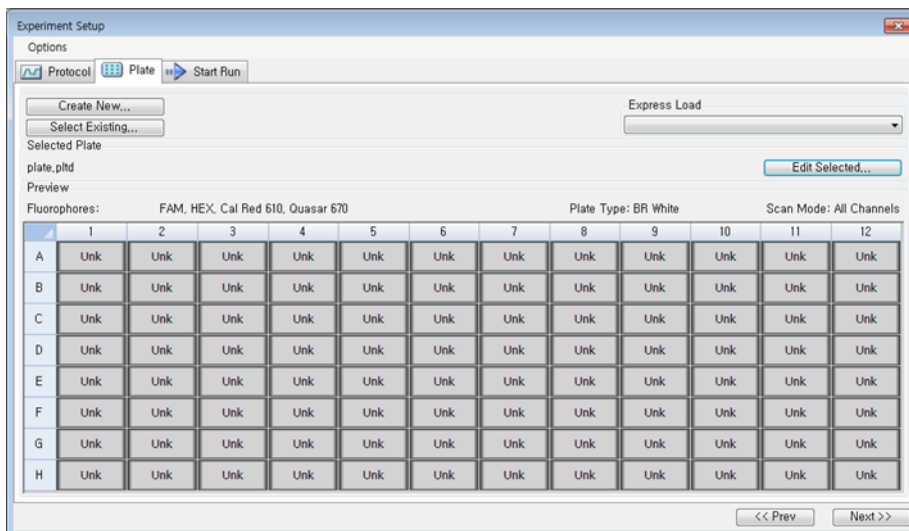


Fig. 7. Experiment Setup (Configuración del experimento): Plate (Placa)

9) Haga clic en **Next (Siguiete)** para Start Run (Iniciar ejecución).

C. Start Run (Iniciar ejecución)

1) En la ficha **Start Run (Iniciar ejecución)** de **Experiment Setup (Configuración del experimento)**, haga clic en **Close Lid (Cerrar tapa)** para cerrar la tapa del instrumento.

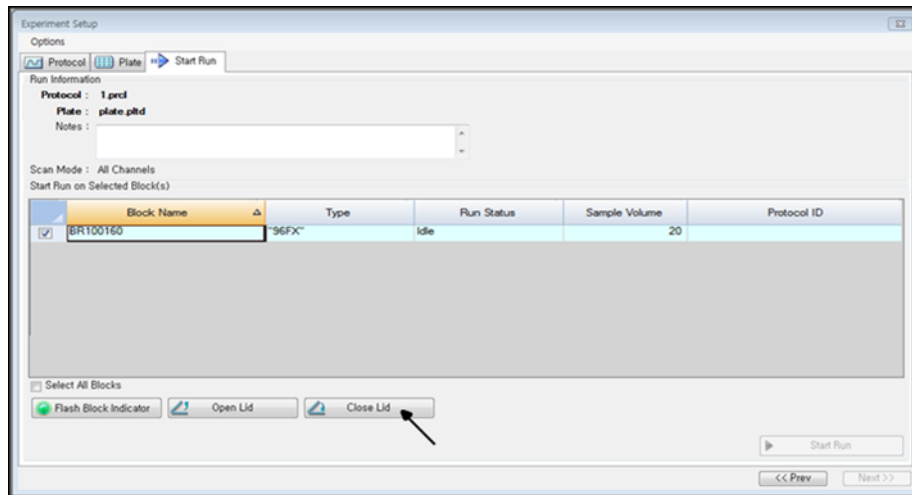


Fig. 8. **Close Lid (Cerrar tapa)**

2) Haga clic en **Start Run (Iniciar ejecución)**.


3) Almacene el archivo de la ejecución en My Documents (Mis documentos) o en una carpeta específica. Introduzca el nombre del archivo, haga clic en **SAVE (GUARDAR)** y se iniciará la ejecución.

1.2. Data Analysis (Análisis de datos)

A. Cree carpetas para la exportación de datos

1) Para guardar datos de todos los pasos de detección de las curvas de amplificación desde el archivo de resultados, cree una carpeta.

2) El nombre de la carpeta puede ser el que desee el usuario (para la función “Seegene Export [Exportación de Seegene]”, se crean automáticamente las carpetas “QuantStep3” y “MeltStep7” para guardar los datos de cada curva de amplificación y curva de fusión en la carpeta creada por el usuario).


Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
MAY 2023


Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

B. Preconfiguración de Data Analysis (Análisis de datos) en CFX Manager™

1) Después de la prueba, haga clic en las fichas Quantitation (Cuantificación) y Melt Curve (Curva de fusión) para confirmar los resultados.

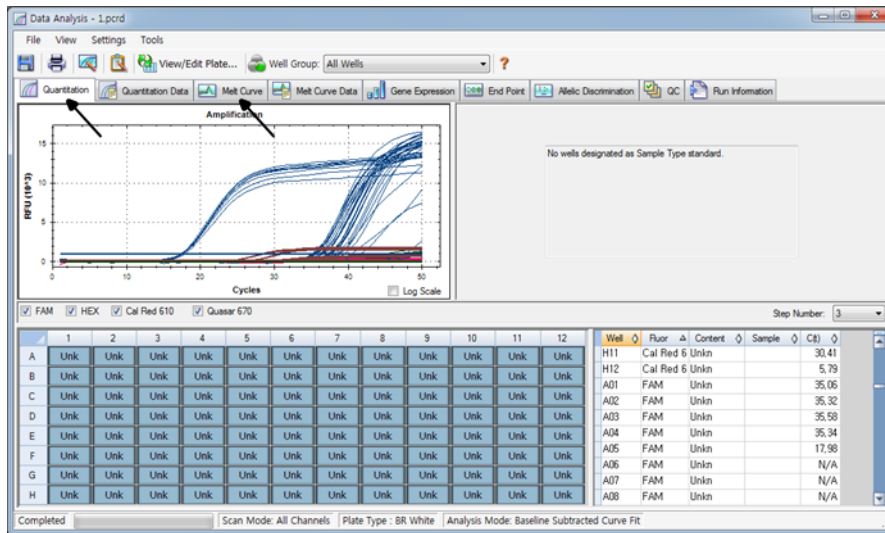


Fig. 9. Resultados de la curva de amplificación y la curva de fusión

2) Seleccione **Baseline Subtracted Curve Fit (Línea de base menos ajuste de curva)** en la sección **Analysis Mode (Modo de análisis)** del menú **Settings (Configuración)**.

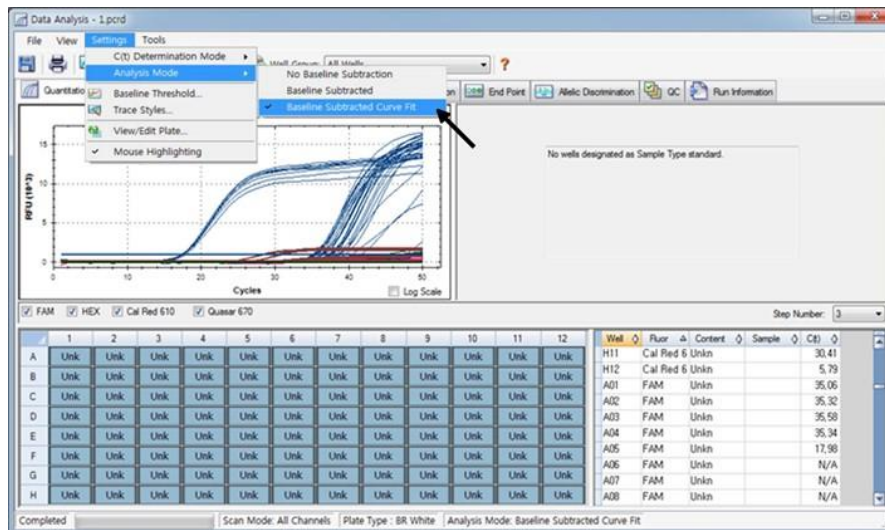


Fig. 10. Baseline Subtracted Curve Fit (Línea de base menos ajuste de curva)

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

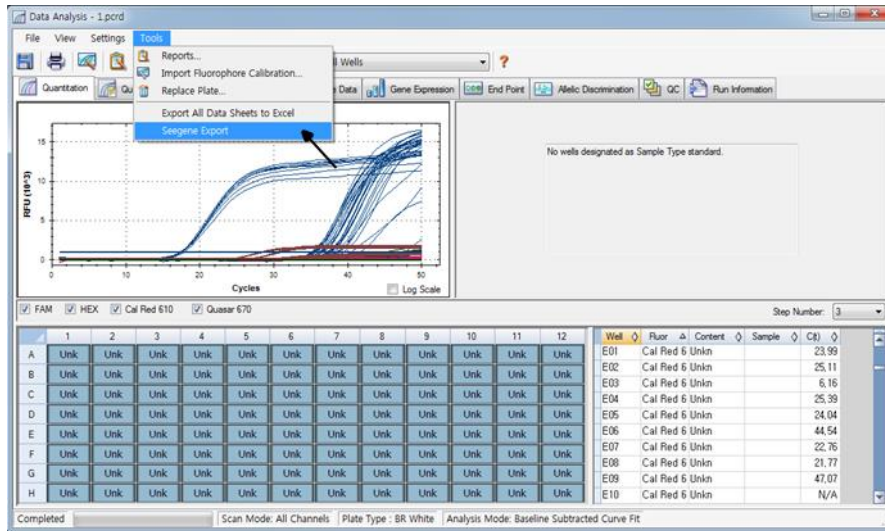


Fig. 11. Seegene Export (Exportación de Seegene)

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

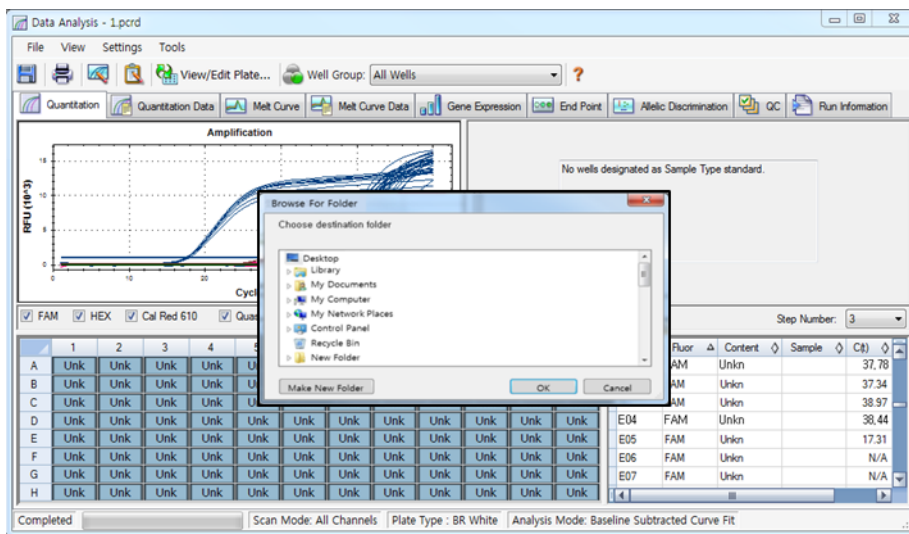


Fig. 12. Seegene Export (Exportación de Seegene) a la carpeta específica

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

Dr. MARINA VILA PEREZ
Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

C. Configuración de Data Analysis (Análisis de datos) en Seegene Viewer

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

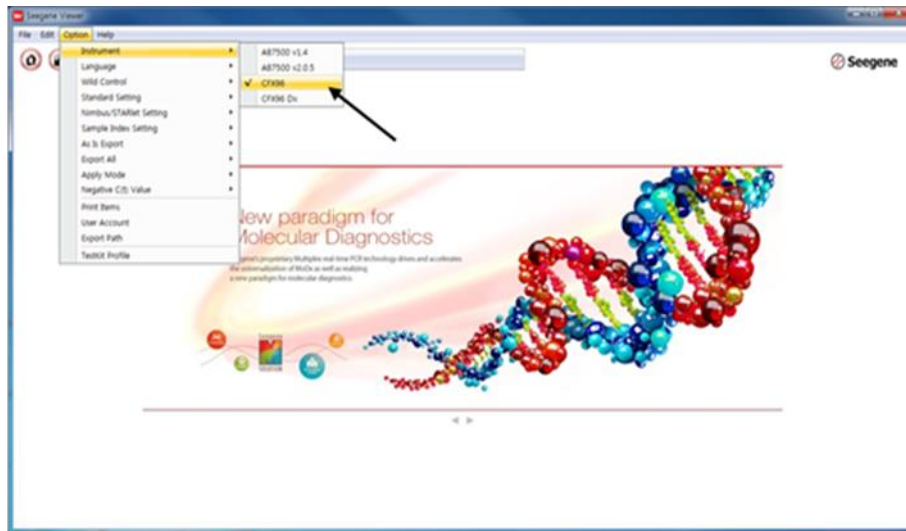


Fig. 13. Seegene Viewer

2) Haga clic en **Open (Abrir)** para buscar el archivo guardado en la carpeta “QuantStep3”, abra el archivo de resultados y seleccione el kit de prueba en el menú **PRODUCT (PRODUCTO)**.

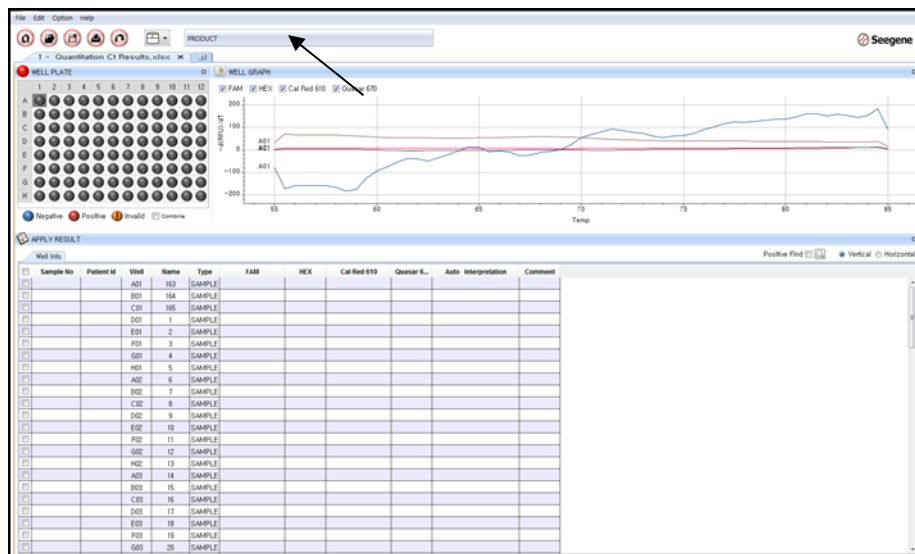


Fig. 14. Configuración de Data Analysis (Análisis de datos) en Seegene Viewer

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

Dr. MARINA VILA PEREZ
 APROBADA
 BioSystems S.A.

3) Compruebe el resultado de cada pocillo.

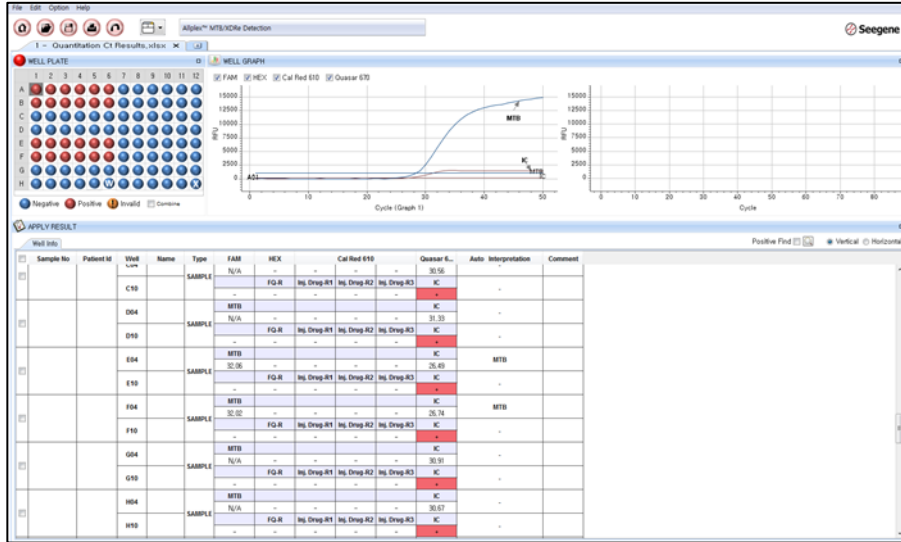


Fig. 15. Resultado de la prueba en Seegene Viewer

4) Criterios de validez de los resultados de control

1. Ejecución del ensayo válida

Para confirmar la validez de los experimentos, las ejecuciones de PCR deben ir acompañadas de PC (control positivo) y NC (control negativo). Se determina que la ejecución del ensayo es válida cuando se cumplen todos los criterios siguientes:

Control	Reacción	Resultado de Seegene Viewer (Ct)				Interpretación automática
		FAM	HEX	Cal Red 610	Quasar 670	
Control positivo	MTBe	Ct ≤ 28	-	-	Ct ≤ 29	Control positivo (+)
	XDRe	-	Positivo	Positivo	Positivo	
Control negativo	MTBe	N/A	-	-	N/A	Control negativo (-)
	XDRe	-	N/A	N/A	N/A	

2. Ejecución del ensayo no válida

En caso de fallo de la validez, los resultados no deben interpretarse ni debe informarse de ellos. Además, la reacción de PCR debe repetirse.

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

Dra. MARINA VILA PEREZ
 APDBERADA
 BioSystems S.A.

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

2.1. Configuración del instrumento Real-time PCR

Nota: Para el análisis de datos sencillo en Seegene Viewer, instale cada tubo de reacción MTBe y XDRe en la posición especificada del bloque como se indica a continuación.

- **MTBe:** columnas 1-6
- **XDRe:** columnas 7-12

Nota: La configuración del experimento de CFX96™ Dx System (Bio-Rad) puede dividirse en tres pasos: Protocol Setup (Configuración del protocolo), Plate Setup (Configuración de la placa) y Start Run (Iniciar ejecución).

A. Protocol Setup (Configuración del protocolo)

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

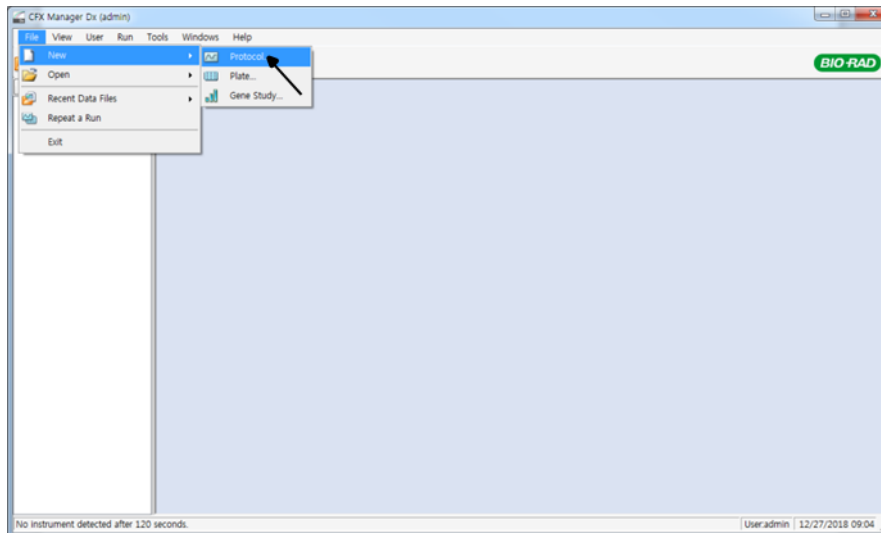
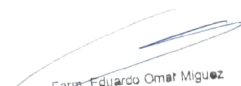


Fig. 1. Protocol Setup (Configuración del protocolo)


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


Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

2) En **Protocol Editor (Editor de protocolos)**, defina el perfil térmico como se indica a continuación:

Paso	Núm. ciclos	Temperatura	Duración
1	1	95 °C	15 min
2		95 °C	30 s
3*	50	60 °C	1 min
4		72 °C	30 s
5		Paso GOTO (IR A) 2, 49 veces más	
6	1	55 °C	30 s
7*	1	Curva de fusión 55 °C-85 °C (5 s/0,5 °C)	

*Lectura de placa en paso 3 y 7. Se detecta fluorescencia a 60 °C y curva de fusión.

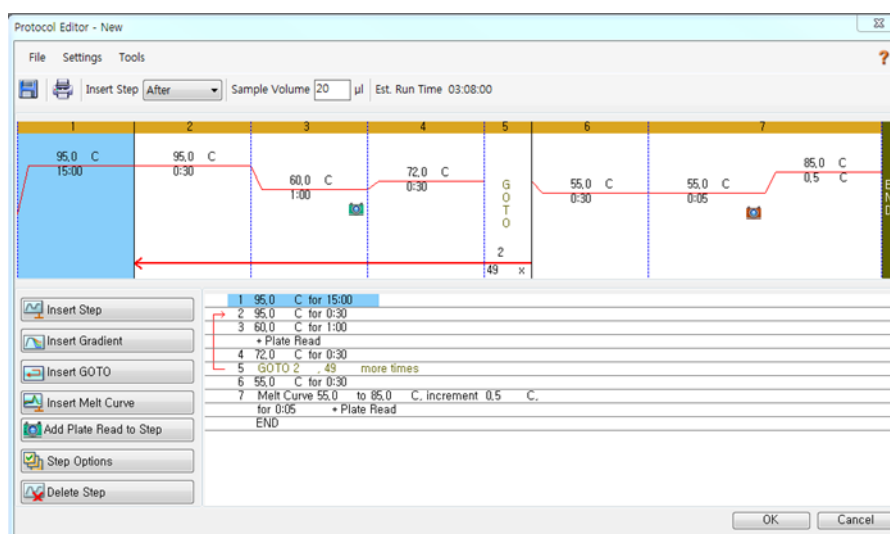


Fig. 2. **Protocol Editor (Editor de protocolos)**

3) Haga clic en el cuadro situado junto a **Sample Volume (Volumen de muestra)** para introducir directamente **20 µL**.

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

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APDERADA
BioSystems S.A.

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

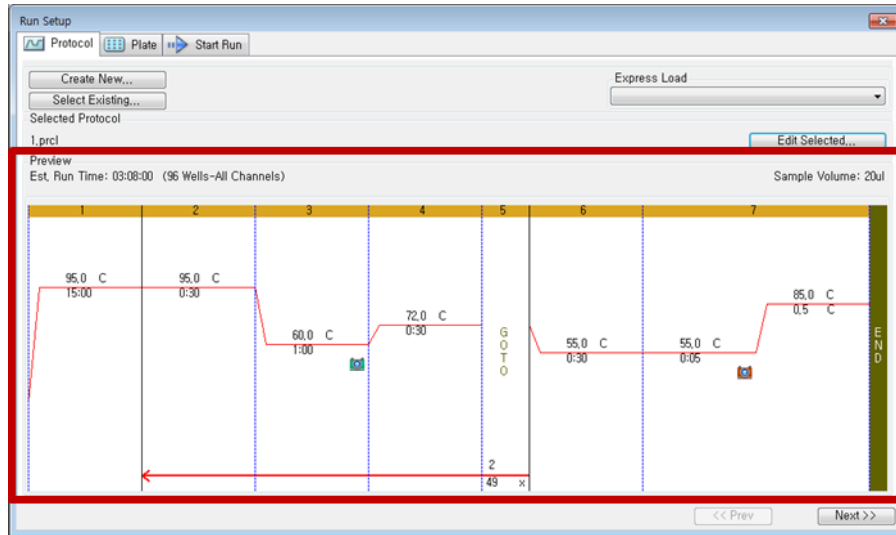


Fig. 3. Run Setup (Configuración de la ejecución): Protocol (Protocolo)

B. Plate Setup (Configuración de la placa)

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



Fig. 4. Plate Editor (Editor de placas)

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

Dr. MARTINA VILA PEREZ
 APDGRADA
 BioSystems S.A.

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

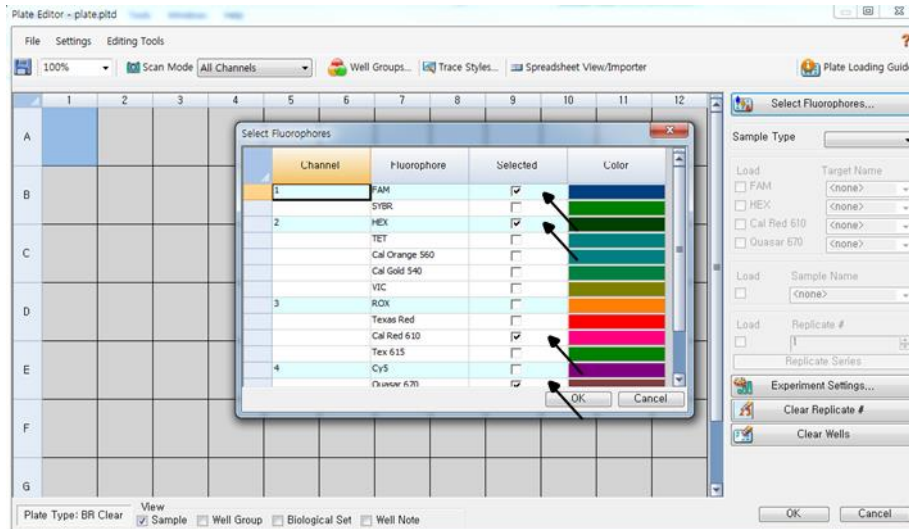


Fig. 5. **Select Fluorophores (Seleccionar fluorocromos) (FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670)**

3) Seleccione los pocillos en los que se colocará el tubo de PCR y seleccione su tipo de muestra en el menú desplegable **Sample Type (Tipo de muestra)**.

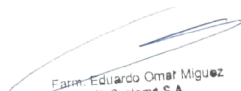
- **Unknown (Desconocido):** muestras clínicas y controles de tipo natural
- **Negative Control (Control negativo)**
- **Positive Control (Control positivo)**

4) Haga clic en las casillas correspondientes (**FAM, HEX, Cal Red 610 y Quasar 670**) para especificar los fluorocromos que se detectarán en los pocillos seleccionados.

5) Escriba el **Sample Name (Nombre de la muestra)** y pulse la tecla Entrar.

Nota: Con control de tipo natural, debe escribirse el nombre correcto como se indica a continuación.

- **WTcE para la reacción MTBe**
- **XWTcE para la reacción XDRe**


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


 Dr. MARIANA VILA PEREZ
 APODERADA
 BioSystems S.A.

- 6) En **Settings (Configuración)** del menú principal **Plate Editor (Editor de placas)**, elija **Plate Size (96 wells) (Tamaño de placa [96 pocillos])** y **Plate Type (BR White) (Tipo de placa [blanco BR])**.



Fig. 6. Plate Setup (Configuración de la placa)

- 7) Haga clic en **OK (Aceptar)** para guardar la nueva placa.
- 8) Volverá a la ventana **Run Setup (Configuración de la ejecución)**.

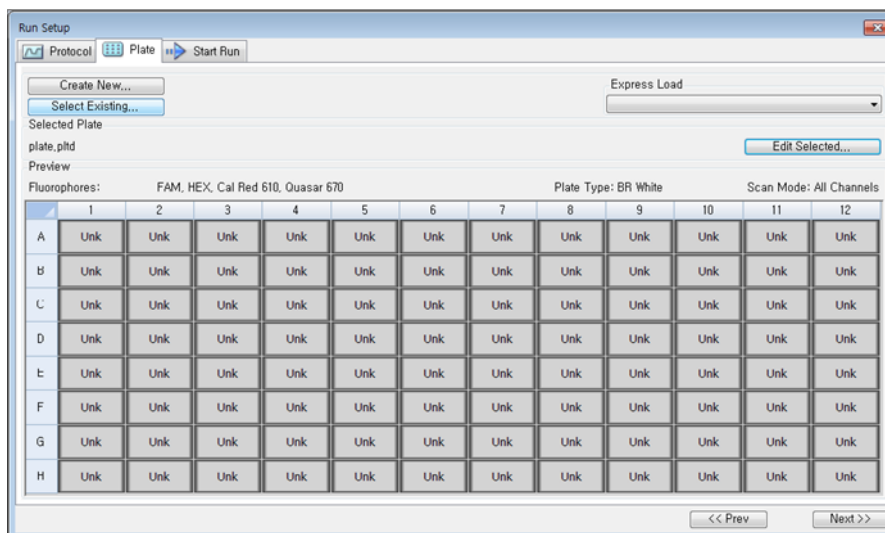


Fig. 7. Run Setup (Configuración de la ejecución): Plate (Placa)

- 9) Haga clic en **Next (Siguiete)** para Start Run (Iniciar ejecución).

C. Start Run (Iniciar ejecución)

1) En la ficha **Start Run (Iniciar ejecución)** de **Run Setup (Configuración de la ejecución)**, haga clic en **Close Lid (Cerrar tapa)** para cerrar la tapa del instrumento.

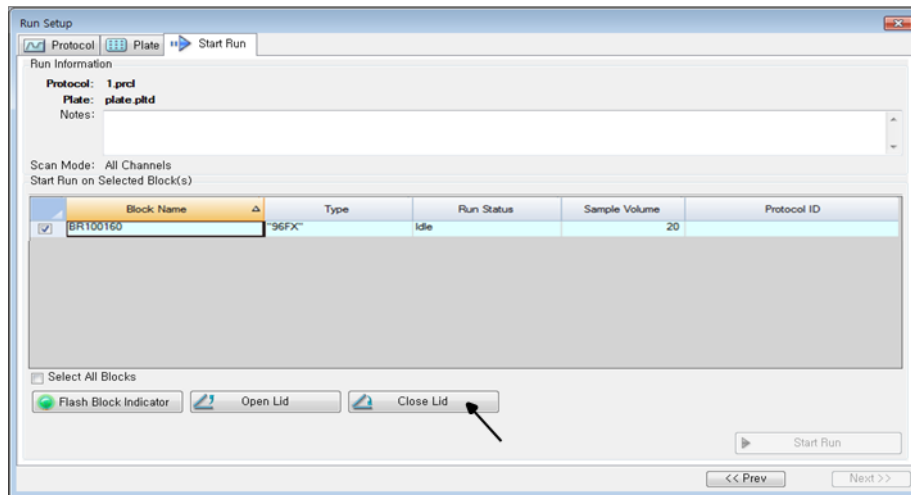


Fig. 8. **Close Lid (Cerrar tapa)**

2) Haga clic en **Start Run (Iniciar ejecución)**.

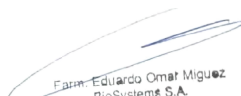
3) Almacene el archivo de la ejecución en My Documents (Mis documentos) o en una carpeta específica. Introduzca el nombre del archivo, haga clic en **SAVE (GUARDAR)** y se iniciará la ejecución.

2.2. Data Analysis (Análisis de datos)

A. Cree carpetas para la exportación de datos

1) Para guardar datos de todos los pasos de detección de las curvas de amplificación desde el archivo de resultados, cree una carpeta.

2) El nombre de la carpeta puede ser el que desee el usuario (para la función “Seegene Export [Exportación de Seegene]”, se crean automáticamente las carpetas “QuantStep3” y “MeltStep7” para guardar los datos de cada curva de amplificación y curva de fusión en la carpeta creada por el usuario).


Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Sistema Técnico
M.N. 17503


Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

B. Preconfiguración de Data Analysis (Análisis de datos) en CFX Manager™

1) Después de la prueba, haga clic en las fichas Quantification (Cuantificación) y Melt Curve (Curva de fusión) para confirmar los resultados.

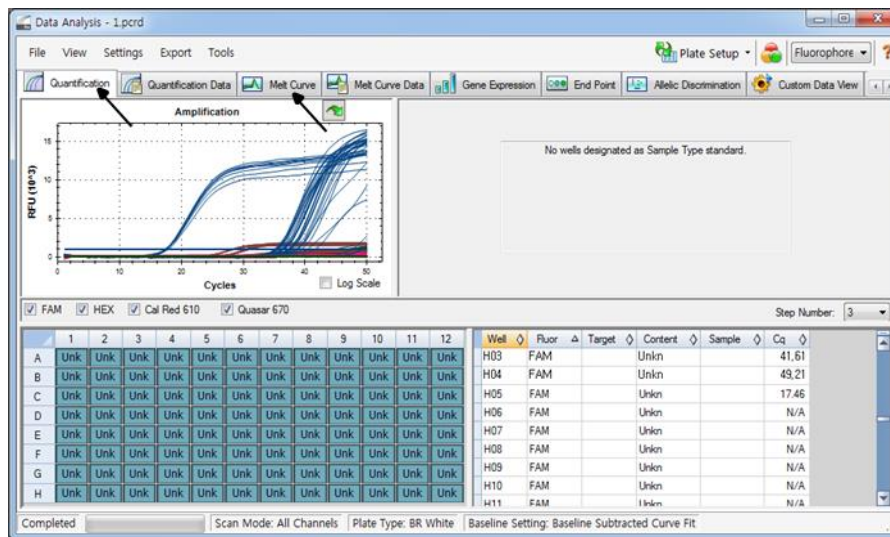


Fig. 9. Resultados de la curva de amplificación y la curva de fusión

2) Seleccione **Baseline Subtracted Curve Fit (Línea de base menos ajuste de curva)** en la sección **Baseline Setting (Configuración de la línea de base)** del menú **Settings (Configuración)**.

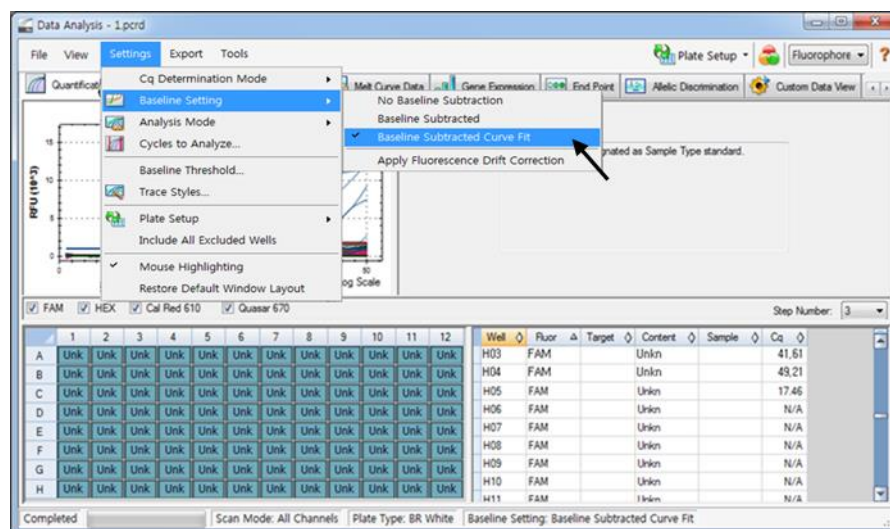
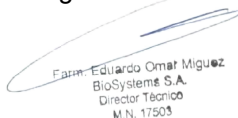


Fig. 10. Baseline Subtracted Curve Fit (Línea de base menos ajuste de curva)


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


 Dra. Mariana Vila Perez
 APDORADA
 BioSystems S.A.

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

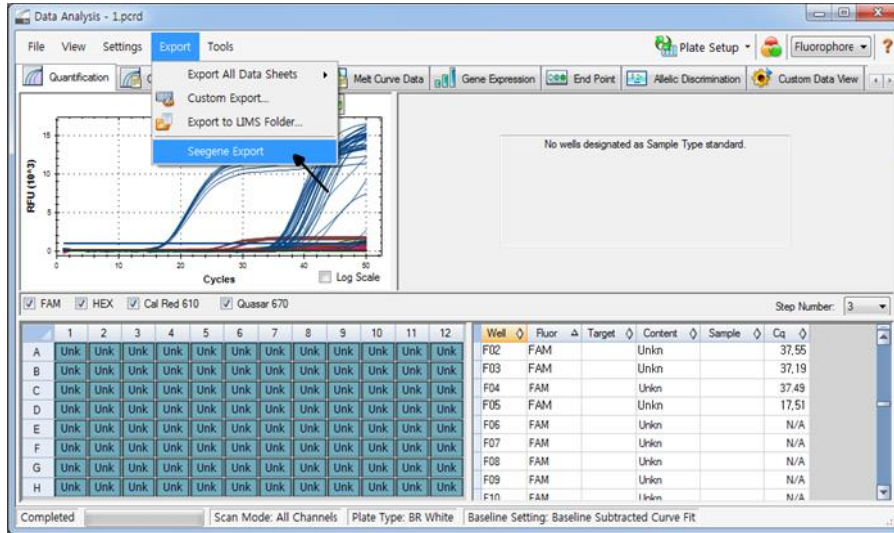


Fig. 11. Seegene Export (Exportación de Seegene)

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

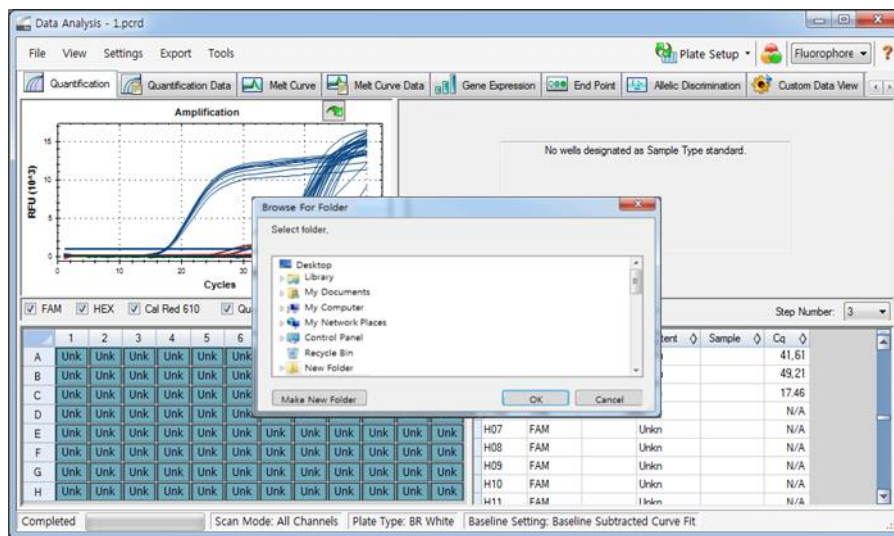



Fig. 12. Seegene Export (Exportación de Seegene) a la carpeta específica


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


 Dra. MARINA VILA PEREZ
 APDOERADA
 BioSystems S.A.

C. Configuración de Data Analysis (Análisis de datos) en Seegene Viewer

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

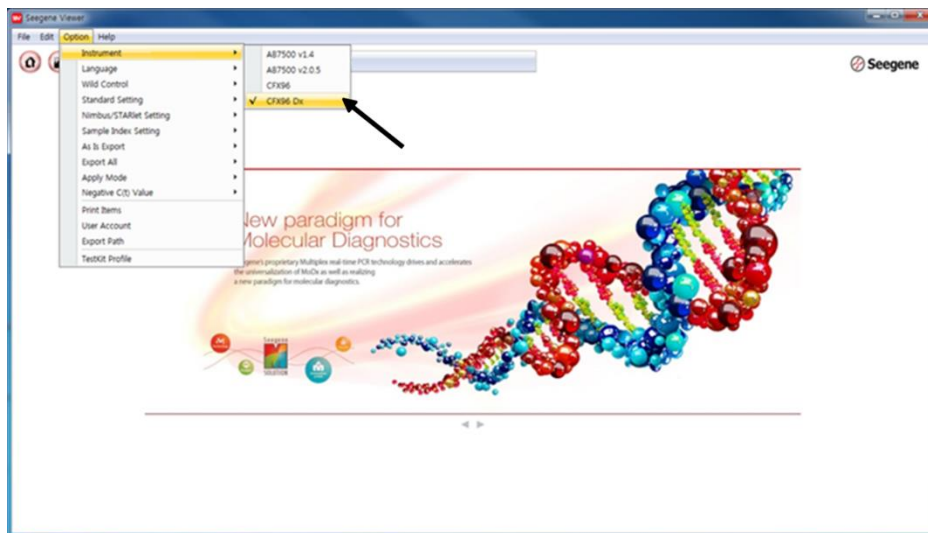


Fig. 13. Seegene Viewer

2) Haga clic en **Open (Abrir)** para buscar el archivo guardado en la carpeta “QuantStep3”, abra el archivo de resultados y seleccione el kit de prueba en el menú **PRODUCT (PRODUCTO)**.

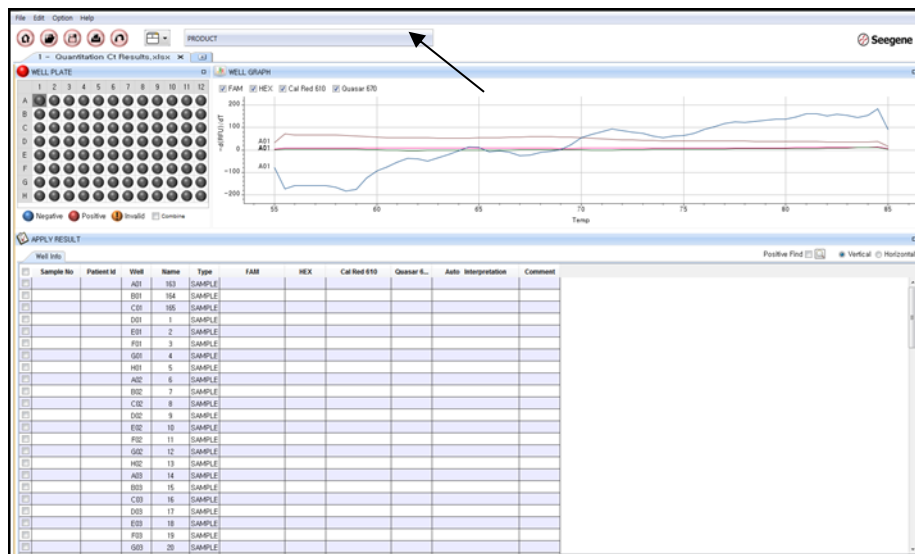
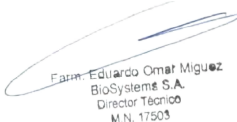


Fig. 14. Configuración de Data Analysis (Análisis de datos) en Seegene Viewer


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


 Dra. MARINA VILA PEREZ
 APDADERADA
 BioSystems S.A.

3) Compruebe el resultado de cada pocillo.

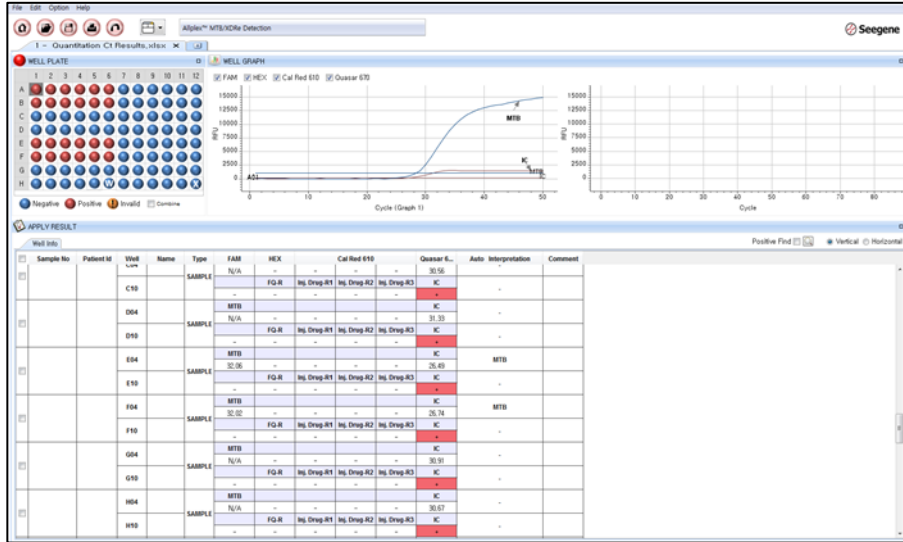


Fig. 15. Resultado de la prueba en Seegene Viewer

4) Criterios de validez de los resultados de control

a. Ejecución del ensayo válida

Para confirmar la validez de los experimentos, las ejecuciones de PCR deben ir acompañadas de PC (control positivo) y NC (control negativo). Se determina que la ejecución del ensayo es válida cuando se cumplen todos los criterios siguientes:

Control	Reacción	Resultado de Seegene Viewer (Ct)				
		FAM	HEX	Cal Red 610	Quasar 670	Interpretación automática
Control positivo	MTBe	Ct ≤ 28	-	-	Ct ≤ 29	Control positivo (+)
	XDRe	-	Positivo	Positivo	Positivo	
Control negativo	MTBe	N/A	-	-	N/A	Control negativo (-)
	XDRe	-	N/A	N/A	N/A	

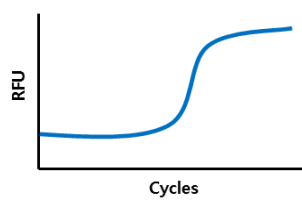
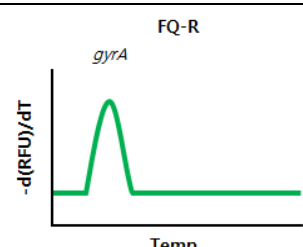
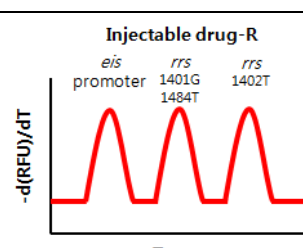
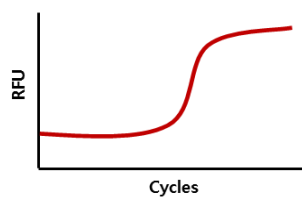
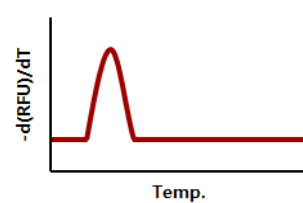
b. Ejecución del ensayo no válida

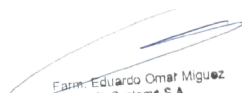
En caso de fallo de la validez, los resultados no deben interpretarse ni debe informarse de ellos. Además, la reacción de PCR debe repetirse.

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

Dra. MARINA VILA PEREZ
 APODERADA
 BioSystems S.A.

RESULTADOS
1. Información sobre analitos

Fluorocromo	MTBe	XDRe
FAM	<p>MTB</p> 	Sin objetivo
HEX	Sin objetivo	<p>FQ-R</p> <p><i>gyrA</i></p> 
Cal Red 610	Sin objetivo	<p>Injectable drug-R</p> <p><i>eis</i> promoter <i>rfs</i> 1401G 1484T <i>rfs</i> 1402T</p> 
Quasar 670	<p>IC</p> 	<p>IC</p> 


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

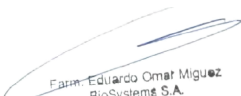

 Dra. MARINA MILA PEREZ
 APDADERADA
 BioSystems S.A.

<MTBe>

Fluorocromo	Analito	Resultado en Seegene Viewer
FAM	MTB	MTB
Quasar 670	IC	IC

<XDRe>

Fluorocromo	Analito	Resultado en Seegene Viewer
HEX	FQ-R (7 mutaciones en <i>gyrA</i>)	FQ-R
Cal Red 610	Inj. drug-R (3 mutaciones en promoter de <i>eis</i>)	Inj. drug-R1 (<i>eis</i>)
	Inj. drug-R (2 mutaciones en <i>rrs</i>: 1401G y 1484T)	Inj. drug-R2 (<i>rrs</i>)
	Inj. drug-R (1 mutación en <i>rrs</i>: 1402T)	Inj. drug-R3 (<i>rrs</i> 1402T)
Quasar 670	IC	IC


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


 Dra. MARIANA VILA PEREZ
 APODERADA
 BioSystems S.A.

2. Interpretación de los resultados

2.1. Reacción MTBe

Valor de Ct	Resultado
≤ 45	Detectado (+)
> 45 o N/A	No detectado (-)

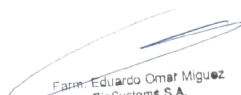
Caso	Resultado		automática
	IC (Quasar 670)	MTB (FAM)	
1	+	+	MTB detectado
2	+	-	MTB no detectada
3	-	+	MTB detectado
4	-	-	No válido ¹⁾

2.2. Reacción XDRe

El resultado de la reacción XDRe depende del resultado de la reacción MTBe.

A. En caso de “MTB detectada”

Caso	Resultado			automática
	IC (Quasar 670)	FQ-R (HEX)	Inj. drug-R (Cal Red 610)	
1	+	+	+	FQ-R e Inj. drug-R detectado
2		+	-	FQ-R detectado
3		-	+	Inj. drug-R detectado
4		-	-	MTB detectado
5	-	+/-	+/-	No válido ²⁾


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


 Dra. MARINA VILA PEREZ
 ARDORADA
 BioSystems S.A.

B. En caso de “MTB no detectada”

Caso	Resultado			automática
	IC (Quasar 670)	FQ-R (HEX)	Inj. drug-R (Cal Red 610)	
1	+	+	+	No válido ³⁾
2		+	-	No válido ³⁾
3		-	+	No válido ³⁾
4		-	-	-
5	-	+/-	+/-	No válido ¹⁾

C. En caso de reacción MTBe “No válida”

Caso	Resultado			automática
	IC (Quasar 670)	FQ-R (HEX)	Inj. drug-R (Cal Red 610)	
1	+	+	+	No válido ¹⁾
2		+	-	
3		-	+	
4		-	-	
5	-	+/-	+/-	

2.3 Explicación complementaria sobre No válida

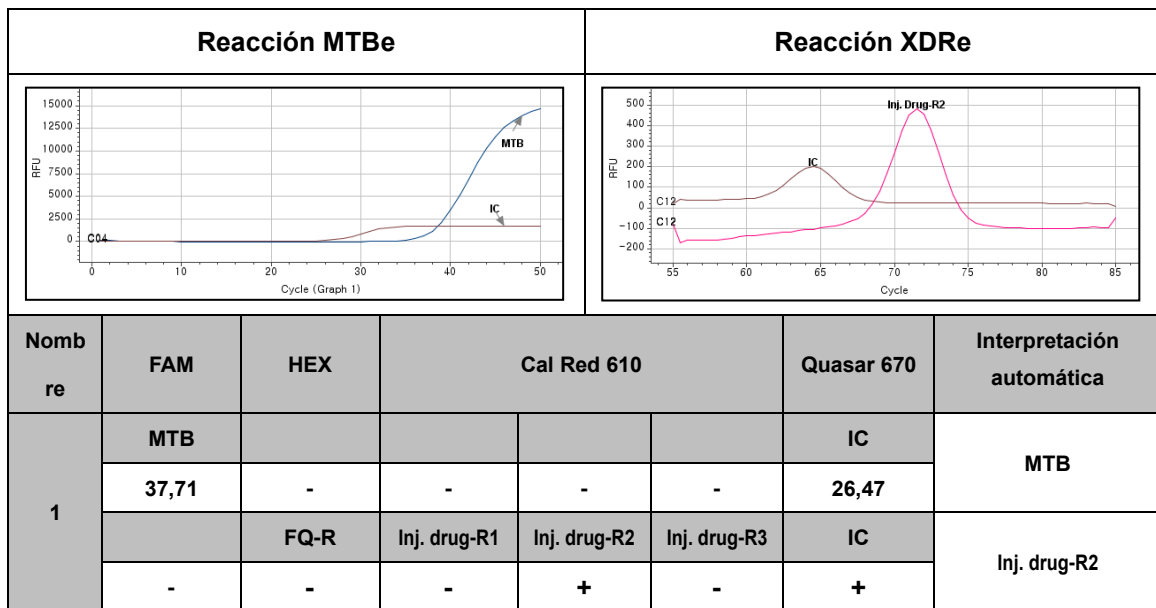
No válido¹⁾ Repita la prueba desde la extracción de ácido nucleico con otra parte alícuota de la muestra primaria original. Si se muestra el mismo resultado en el ácido nucleico que se ha vuelto a extraer, diluya la muestra primaria (1/10-1/100) en RNase-free Water y repita la extracción (después de añadir MTB/DRe IC) y la PCR.

No válido²⁾ El resultado de la prueba MTB es válido. Para confirmar el resultado de resistencia a los medicamentos, repita la prueba desde la extracción de ácido nucleico con otra parte alícuota de la muestra primaria original. Si se muestra el mismo resultado en el ácido nucleico que se ha vuelto a extraer, diluya la muestra primaria (1/10-1/100) en RNase-free Water y repita la extracción (después de añadir MTB/DRe IC) y la PCR.

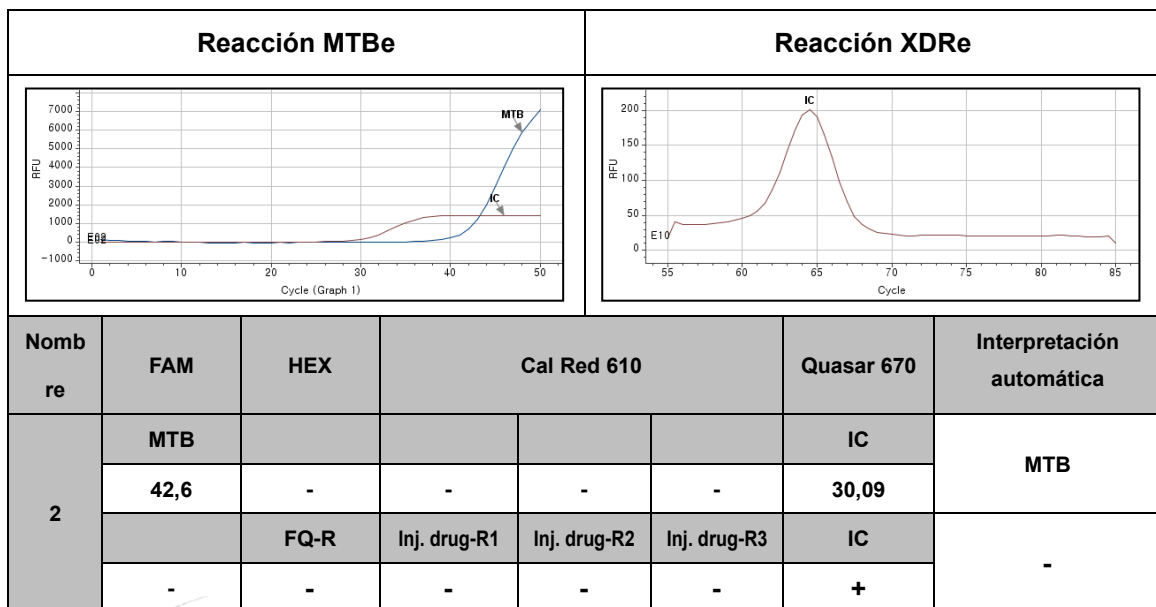
No válido³⁾ No se detecta MTB, pero se detecta resistencia a los medicamentos. Repita la prueba desde la extracción de ácido nucleico con otra parte alícuota de la muestra primaria original. Si se muestra el mismo resultado, consulte los resultados de otros métodos diagnósticos.

3. Aplicación a muestras clínicas

Muestra 1



Muestra 2



SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Allplex™ MTB/XDRe Detection		
OBSERVACIÓN	CAUSAS PROBABLES	SOLUCIÓN
No hay señal	Los fluorocromos para el análisis de datos no cumplen el protocolo	Seleccione los fluorocromos correctos del análisis de datos y exporte los datos de nuevo. No es necesario repetir la prueba en este caso.
	Configuración incorrecta del termociclador real-time	Compruebe las condiciones del ciclo térmico y repita la prueba con la configuración correcta.
	Almacenamiento incorrecto o fecha de caducidad vencida del kit de prueba	Compruebe las condiciones de almacenamiento (consulte la página 12) y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta) del kit de prueba y use un kit nuevo si es necesario.
	Fallo de la extracción de ácido nucleico	Ninguna señal que incluya IC puede indicar la pérdida de ácido nucleico durante la extracción. Asegúrese de usar el método de extracción recomendado. Si se debe a los inhibidores, vuelva a extraer la muestra primaria original o diluya la muestra primaria (1/0-1/100) en RNase-free Water y repita la prueba desde el paso de extracción.
No hay señal de control interno	Carga elevada de ácido nucleico de la muestra primaria	Si se observa una señal de patógeno objetivo, pero no el IC, es posible que la amplificación del IC se haya inhibido debido a un título elevado de patógeno objetivo. Para confirmar la señal de IC, diluya la muestra primaria (1/0-1/100) en RNase-free Water y repita la prueba desde el paso de extracción.
	Presencia de inhibidor	Diluya la muestra primaria (1/0-1/100) en RNase-free Water y repita la prueba desde el paso de extracción.
Señales putativas de falso positivo u objetivo observadas en el control negativo	Contaminación	Descontamine las superficies y los instrumentos con hipoclorito de sodio y etanol. Use solo puntas con filtro durante todo el procedimiento y cambie las puntas entre tubos. Repita todo el procedimiento desde la extracción de ácido nucleico hasta la detección con un nuevo conjunto de reactivos.

Allplex™ MTB/XDRe Detection		
OBSERVACIÓN	CAUSAS PROBABLES	SOLUCIÓN
Señales putativas de falso negativo o ausencia de señal observadas en el control positivo	Error en la recogida de las muestras primarias	Compruebe el método de recogida de las muestras primarias y recoja de nuevo la muestra primaria.
	Almacenamiento incorrecto de la muestra primaria	Recoja de nuevo la muestra primaria y repita todo el procedimiento. Asegúrese de que la muestra primaria se almacene como se recomienda.
	Error en la extracción de ácido nucleico	Compruebe el procedimiento de extracción de ácido nucleico y la concentración de ácido nucleico y vuelva a extraer el ácido nucleico.
	Error en la adición de ácido nucleico a los tubos de PCR correspondientes	Compruebe los números de muestra de los tubos que contienen ácido nucleico, asegúrese de añadir ácido nucleico a los tubos de PCR correctos y repita con cuidado la prueba si es necesario.
	Presencia de inhibidor	Diluya el ácido nucleico de la plantilla (1/10-1/100) en RNase-free Water y repita la prueba con el ácido nucleico diluido.
	Mezcla de PCR incorrecta	Confirme que se hayan añadido todos los componentes a la mezcla de PCR (la sensibilidad se pone en riesgo con la premezcla precompuesta). Todos los reactivos deben homogeneizarse y centrifugarse antes de usarse.
Mensaje de error en Seegene Viewer	"WTC is not identified" (No se ha identificado WTC)	Lleve a cabo la prueba de WTC y asigne la prueba de WTC bien para el análisis de resultados
	"The test result of WTC is abnormal" (El resultado de la prueba de WTC es anómalo)	Este mensaje de error se muestra en los siguientes casos: (i) el valor de la altura del pico de fusión es superior al valor de umbral máximo seleccionado en los canales HEX o Cal Red 610; o (ii) el valor de la altura del pico de fusión es inferior al valor de umbral seleccionado en los canales FAM o Quasar 670. En el caso (i), puede deberse a la contaminación de los reactivos o los espacios; compruebe si se produjo contaminación. En el caso (ii), puede deberse a un error en la preparación de la mezcla de la reacción o en la configuración del termociclador, o a un almacenamiento incorrecto del kit; repita la prueba con cuidado y compruebe las condiciones de almacenamiento del kit.

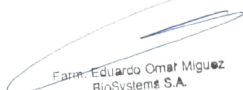
RENDIMIENTO
1. Especificidad

La elevada especificidad de Allplex™ MTB/XDRe Detection la garantizan los oligonucleótidos diseñados específicamente para los objetivos de interés en las condiciones de reacción establecidas. Se ha probó la reactividad cruzada de Allplex™ MTB/XDRe Detection con 122 patógenos diferentes, y solo se identificaron detección y amplificación de PCR en los objetivos especificados.

1.1. MTBe

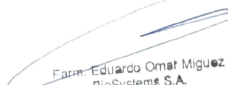
N.º	Organismo	N.º de cepa		MTB†	
				IC	MTB
1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	KMRC	0110-00007	+	+
2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> L511P)	DNA plasmídico		+	+
3	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> Q513K)	DNA plasmídico		+	+
4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> Q513L)	DNA plasmídico		+	+
5	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> Q513P)	DNA plasmídico		+	+
6	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> 3 amino acid deletion in 513~516)	DNA plasmídico		+	+
7	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> D516V)	DNA plasmídico		+	+
8	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> D516Y)	DNA plasmídico		+	+
9	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> S522L)	DNA plasmídico		+	+
10	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> S522Q)	DNA plasmídico		+	+
11	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> H526C)	DNA plasmídico		+	+
12	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> H526D)	DNA plasmídico		+	+
13	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> H526L)	DNA plasmídico		+	+
14	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> H526N)	DNA plasmídico		+	+
15	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> H526R)	DNA plasmídico		+	+
16	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> H526Y)	DNA plasmídico		+	+
17	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> S531L)	DNA plasmídico		+	+
18	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> S531W)	DNA plasmídico		+	+
19	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> L533P)	DNA plasmídico		+	+
20	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>katG</i> S315T(ACC))	DNA plasmídico		+	+

N.º	Organismo	N.º de cepa		MTB ⁺	
				IC	MTB
21	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (katG S315T(ACA))	DNA plasmídico		+	+
22	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (katG S315N)	DNA plasmídico		+	+
23	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (katG S315I)	DNA plasmídico		+	+
24	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (inhA promoter -15T)	DNA plasmídico		+	+
25	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (inhA promoter -8A)	DNA plasmídico		+	+
26	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (inhA promoter -8C)	DNA plasmídico		+	+
27	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA A90V)	DNA plasmídico		+	+
28	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA S91P)	DNA plasmídico		+	+
29	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA D94A)	DNA plasmídico		+	+
30	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA D94G)	DNA plasmídico		+	+
31	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA D94H)	DNA plasmídico		+	+
32	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA D94N)	DNA plasmídico		+	+
33	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA D94Y)	DNA plasmídico		+	+
34	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rrs 1401G)	DNA plasmídico		+	+
35	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rrs 1402T)	DNA plasmídico		+	+
36	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rrs 1484T)	DNA plasmídico		+	+
37	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (eis promoter -37T)	DNA plasmídico		+	+
38	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (eis promoter -14T)	DNA plasmídico		+	+
39	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (eis promoter -10A)	DNA plasmídico		+	+
40	<i>Mycobacterium abscessus</i>	ATCC	19977D-5	+	-
41	<i>Mycobacterium asiaticum</i>	KCTC	9503	+	-
42	<i>Mycobacterium avium</i> (Chester)	ATCC	700735	+	-
43	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	ATCC	25291	+	-
44	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	ATCC	19698	+	-
45	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	ATCC	49884	+	-
46	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>suis</i>	ATCC	19978	+	-
47	<i>Mycobacterium celatum</i>	ATCC	51131	+	-
48	<i>Mycobacterium chelonae</i>	KCTC	9505	+	-
49	<i>Mycobacterium fallax</i>	KCTC	9508	+	-
50	<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>	ATCC	43266	+	-


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


 Dra. MARINA VILA PEREZ
 APDOERADA
 BioSystems S.A.

N.º	Organismo	N.º de cepa		MTB [†]	
				IC	MTB
51	<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	KCTC	1122	+	-
52	<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>thermophilum</i>	ATCC	27408	+	-
53	<i>Mycobacterium gastri</i>	ATCC	25162	+	-
54	<i>Mycobacterium gordonae</i>	KCTC	9513	+	-
55	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	ATCC	25122	+	-
56	<i>Mycobacterium kansasii</i>	KCTC	9515	+	-
57	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	ATCC	51988	+	-
58	<i>Mycobacterium malmoense</i>	ATCC	29571	+	-
59	<i>Mycobacterium marinum</i>	ATCC	BAA535D-5	+	-
60	<i>Mycobacterium massiliense</i>	KCTC	19086	+	-
61	<i>Mycobacterium moriokaense</i>	KCTC	9516	+	-
62	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	KCTC	19088	+	-
63	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	KCTC	19096	+	-
64	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	ATCC	25265	+	-
65	<i>Mycobacterium phlei</i>	KCTC	9087	+	-
66	<i>Mycobacterium porcinum</i>	KCTC	9517	+	-
67	<i>Mycobacterium seoulense</i>	KCTC	19146	+	-
68	<i>Mycobacterium simiae</i>	ATCC	BAA-1478	+	-
69	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	KCTC	9108	+	-
70	<i>Mycobacterium szulgai</i>	KCTC	9520	+	-
71	<i>Mycobacterium terrae</i>	KCTC	9614	+	-
72	<i>Mycobacterium triviale</i>	ATCC	23292	+	-
73	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	ATCC	33728	+	-
74	<i>Mycobacterium vaccae</i>	KCTC	19087	+	-
75	<i>Arthrobacter oxydans</i>	KCTC	3383	+	-
76	<i>Arthrobacter woluwensis</i>	KCTC	9905	+	-
77	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	KCTC	3432	+	-
78	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	KCTC	9098	+	-
79	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	KCTC	3075	+	-
80	<i>Corynebacterium durum</i>	KCTC	19318	+	-


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


 Dra. MARINA MILA PEREZ
 APDORADA
 BioSystems S.A.

N.º	Organismo	N.º de cepa		MTB†	
				IC	MTB
81	<i>Corynebacterium flavescens</i>	KCTC	3414	+	-
82	<i>Corynebacterium genitalium</i>	ATCC	33030	+	-
83	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	KCTC	1854	+	-
84	<i>Corynebacterium imitans</i>	ATCC	700354	+	-
85	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	KCCM	41661	+	-
86	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	ATCC	10700	+	-
87	<i>Corynebacterium striatum</i>	ATCC	43751	+	-
88	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	ATCC	35692	+	-
89	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	ATCC	51799	+	-
90	<i>Corynebacterium xerosis</i>	KCTC	3435	+	-
91	<i>Dietzia</i> sp.	KCTC	19232	+	-
92	<i>Gordonia bronchialis</i>	KCTC	3076	+	-
93	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	ATCC	BAA-14	+	-
94	<i>Gordonia rubripertincta</i>	ATCC	27864	+	-
95	<i>Gordonia sputi</i>	KCTC	3436	+	-
96	<i>Nocardia abscessus</i>	ATCC	23824	+	-
97	<i>Nocardia asteroides</i>	KCTC	9956	+	-
98	<i>Nocardia blacklockiae</i>	ATCC	BAA-1635	+	-
99	<i>Nocardia brasiliensis</i>	KCTC	9136	+	-
100	<i>Nocardia farcinica</i>	KCTC	9958	+	-
101	<i>Nocardia nova</i>	ATCC	33727	+	-
102	<i>Nocardia pseudobrasiliensis</i>	ATCC	51512	+	-
103	<i>Nocardia transvalensis</i>	ATCC	29982	+	-
104	<i>Nocardia wallacei</i>	ATCC	BAA-1636	+	-
105	<i>Rhodococcus equi</i>	KCTC	1298	+	-
106	<i>Candida albicans</i>	ATCC	7965	+	-
107	<i>Escherichia coli</i>	KCCM	11591	+	-
108	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC	51299	+	-
109	<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC	51559	+	-
110	<i>Haemophilus ducreyi</i>	ATCC	700724D-5	+	-

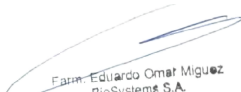

 F.º Eduardo Omar Miguez
 BioSystems S.A.
 Director Técnico
 M.N. 17503


 Dra. MARINA VILA PEREZ
 APDPERADA
 BioSystems S.A.

N.º	Organismo	N.º de cepa		MTB [†]	
				IC	MTB
111	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KCTC	47085D	+	-
112	<i>Rothia dentocariosa</i>	KCTC	19319	+	-
113	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	KCTC	BAA-255D	+	-
114	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KCCM	40890	+	-
115	<i>Staphylococcus aureus</i>	KCCM	40881	+	-
116	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCCM	35494	+	-
117	<i>Streptococcus pyogenes</i>	KCCM	40411	+	-
118	<i>Streptococcus mitis</i>	KCTC	3556	+	-
119	<i>Neisseria meningitidis</i>	ATCC	700532D	+	-
120	<i>Bordetella pertussis</i>	ATCC	BAA-589D	+	-
121	<i>Legionella pneumophila</i>	KCCM	41783	+	-
122	Human genomic DNA (500 ng)	Biochain	D1234275	+	-

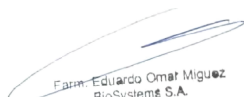
1.2. XDRe

N.º	Organismo	N.º de cepa		XDR [†]		
				IC	FQ-R	Inj. drug-R
1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	KMRC	0110-00007	+	-	-
2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> L511P)	DNA plasmídico		+	-	-
3	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> Q513K)	DNA plasmídico		+	-	-
4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> Q513L)	DNA plasmídico		+	-	-
5	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> Q513P)	DNA plasmídico		+	-	-
6	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> 3 amino acid deletion in 513~516)	DNA plasmídico		+	-	-
7	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> D516V)	DNA plasmídico		+	-	-
8	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> D516Y)	DNA plasmídico		+	-	-
9	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> S522L)	DNA plasmídico		+	-	-
10	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> S522Q)	DNA plasmídico		+	-	-
11	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>rpoB</i> H526C)	DNA plasmídico		+	-	-


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

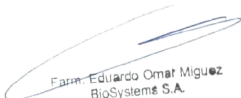

 Dra. MARIANA VILA PEREZ
 APDORADA
 BioSystems S.A.

N.º	Organismo	N.º de cepa	XDR [†]		
			IC	FQ-R	Inj. drug-R
12	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB H526D)	DNA plasmídico	+	-	-
13	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB H526L)	DNA plasmídico	+	-	-
14	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB H526N)	DNA plasmídico	+	-	-
15	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB H526R)	DNA plasmídico	+	-	-
16	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB H526Y)	DNA plasmídico	+	-	-
17	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB S531L)	DNA plasmídico	+	-	-
18	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB S531W)	DNA plasmídico	+	-	-
19	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rpoB L533P)	DNA plasmídico	+	-	-
20	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (katG S315T(ACC))	DNA plasmídico	+	-	-
21	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (katG S315T(ACA))	DNA plasmídico	+	-	-
22	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (katG S315N)	DNA plasmídico	+	-	-
23	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (katG S315I)	DNA plasmídico	+	-	-
24	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (inhA promoter -15T)	DNA plasmídico	+	-	-
25	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (inhA promoter -8A)	DNA plasmídico	+	-	-
26	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (inhA promoter -8C)	DNA plasmídico	+	-	-
27	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA A90V)	DNA plasmídico	+	+	-
28	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA S91P)	DNA plasmídico	+	+	-
29	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA D94A)	DNA plasmídico	+	+	-
30	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA D94G)	DNA plasmídico	+	+	-
31	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA D94H)	DNA plasmídico	+	+	-
32	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA D94N)	DNA plasmídico	+	+	-
33	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gyrA D94Y)	DNA plasmídico	+	+	-
34	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rrs 1401G)	DNA plasmídico	+	-	+
35	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rrs 1402T)	DNA plasmídico	+	-	+
36	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (rrs 1484T)	DNA plasmídico	+	-	+
37	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (eis promoter -37T)	DNA plasmídico	+	-	+
38	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (eis promoter -14T)	DNA plasmídico	+	-	+
39	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (eis promoter -10A)	DNA plasmídico	+	-	+


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


 Dra. MARIANA VILA PEREZ
 APDSEERADA
 BioSystems S.A.

N.º	Organismo	N.º de cepa		XDR†		
				IC	FQ-R	Inj. drug-R
40	<i>Mycobacterium abscessus</i>	ATCC	19977D-5	+	-	-
41	<i>Mycobacterium asiaticum</i>	KCTC	9503	+	-	-
42	<i>Mycobacterium avium (Chester)</i>	ATCC	700735	+	-	-
43	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	ATCC	25291	+	-	-
44	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	ATCC	19698	+	-	-
45	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	ATCC	49884	+	-	-
46	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>suis</i>	ATCC	19978	+	-	-
47	<i>Mycobacterium celatum</i>	ATCC	51131	+	-	-
48	<i>Mycobacterium chelonae</i>	KCTC	9505	+	-	-
49	<i>Mycobacterium fallax</i>	KCTC	9508	+	-	-
50	<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>	ATCC	43266	+	-	-
51	<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	KCTC	1122	+	-	-
52	<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>thermophilum</i>	ATCC	27408	+	-	-
53	<i>Mycobacterium gastri</i>	ATCC	25162	+	-	-
54	<i>Mycobacterium goodii</i>	KCTC	9513	+	-	-
55	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	ATCC	25122	+	-	-
56	<i>Mycobacterium kansasii</i>	KCTC	9515	+	-	-
57	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	ATCC	51988	+	-	-
58	<i>Mycobacterium malmoense</i>	ATCC	29571	+	-	-
59	<i>Mycobacterium marinum</i>	ATCC	BAA535D-5	+	-	-
60	<i>Mycobacterium massiliense</i>	KCTC	19086	+	-	-
61	<i>Mycobacterium moriokaense</i>	KCTC	9516	+	-	-
62	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	KCTC	19088	+	-	-
63	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	KCTC	19096	+	-	-
64	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	ATCC	25265	+	-	-
65	<i>Mycobacterium phlei</i>	KCTC	9087	+	-	-
66	<i>Mycobacterium porcinum</i>	KCTC	9517	+	-	-
67	<i>Mycobacterium seoulense</i>	KCTC	19146	+	-	-


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


 Dra. MARINA MILA PEREZ
 APODERADA
 BioSystems S.A.

N.º	Organismo	N.º de cepa		XDR†		
				IC	FQ-R	Inj. drug-R
68	<i>Mycobacterium simiae</i>	ATCC	BAA-1478	+	-	-
69	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	KCTC	9108	+	-	-
70	<i>Mycobacterium szulgai</i>	KCTC	9520	+	-	-
71	<i>Mycobacterium terrae</i>	KCTC	9614	+	-	-
72	<i>Mycobacterium triviale</i>	ATCC	23292	+	-	-
73	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	ATCC	33728	+	-	-
74	<i>Mycobacterium vaccae</i>	KCTC	19087	+	-	-
75	<i>Arthrobacter oxydans</i>	KCTC	3383	+	-	-
76	<i>Arthrobacter woluwensis</i>	KCTC	9905	+	-	-
77	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	KCTC	3432	+	-	-
78	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	KCTC	9098	+	-	-
79	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	KCTC	3075	+	-	-
80	<i>Corynebacterium durum</i>	KCTC	19318	+	-	-
81	<i>Corynebacterium flavescens</i>	KCTC	3414	+	-	-
82	<i>Corynebacterium genitalium</i>	ATCC	33030	+	-	-
83	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	KCTC	1854	+	-	-
84	<i>Corynebacterium imitans</i>	ATCC	700354	+	-	-
85	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	KCCM	41661	+	-	-
86	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	ATCC	10700	+	-	-
87	<i>Corynebacterium striatum</i>	ATCC	43751	+	-	-
88	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	ATCC	35692	+	-	-
89	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	ATCC	51799	+	-	-
90	<i>Corynebacterium xerosis</i>	KCTC	3435	+	-	-
91	<i>Dietzia</i> sp.	KCTC	19232	+	-	-
92	<i>Gordonia bronchialis</i>	KCTC	3076	+	-	-
93	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	ATCC	BAA-14	+	-	-
94	<i>Gordonia rubripertincta</i>	ATCC	27864	+	-	-
95	<i>Gordonia sputi</i>	KCTC	3436	+	-	-
96	<i>Nocardia abscessus</i>	ATCC	23824	+	-	-
97	<i>Nocardia asteroides</i>	KCTC	9956	+	-	-
98	<i>Nocardia blacklockiae</i>	ATCC	BAA-1635	+	-	-

N.º	Organismo	N.º de cepa		XDR [†]		
				IC	FQ-R	Inj. drug-R
99	<i>Nocardia brasiliensis</i>	KCTC	9136	+	-	-
100	<i>Nocardia farcinica</i>	KCTC	9958	+	-	-
101	<i>Nocardia nova</i>	ATCC	33727	+	-	-
102	<i>Nocardia pseudobrasiliensis</i>	ATCC	51512	+	-	-
103	<i>Nocardia transvalensis</i>	ATCC	29982	+	-	-
104	<i>Nocardia wallacei</i>	ATCC	BAA-1636	+	-	-
105	<i>Rhodococcus equi</i>	KCTC	1298	+	-	-
106	<i>Candida albicans</i>	ATCC	7965	+	-	-
107	<i>Escherichia coli</i>	KCCM	11591	+	-	-
108	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC	51299	+	-	-
109	<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC	51559	+	-	-
110	<i>Haemophilus ducreyi</i>	ATCC	700724D-5	+	-	-
111	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KCTC	47085D	+	-	-
112	<i>Rothia dentocariosa</i>	KCTC	19319	+	-	-
113	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	KCTC	BAA-255D	+	-	-
114	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KCCM	40890	+	-	-
115	<i>Staphylococcus aureus</i>	KCCM	40881	+	-	-
116	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCCM	35494	+	-	-
117	<i>Streptococcus pyogenes</i>	KCCM	40411	+	-	-
118	<i>Streptococcus mitis</i>	KCTC	3556	+	-	-
119	<i>Neisseria meningitidis</i>	ATCC	700532D	+	-	-
120	<i>Bordetella pertussis</i>	ATCC	BAA-589D	+	-	-
121	<i>Legionella pneumophila</i>	KCCM	41783	+	-	-
122	Human genomic DNA (500 ng)	Biochain	D1234275	+	-	-


※ ATCC: American Type Culture Collection

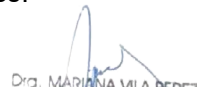
KCTC: Korean Collection for Type Culture

KCCM: Korean Culture Center of Microorganisms

KMRC: Korea Mycobacterium Resource Center

† Las pruebas de especificidad se repitieron 3 veces.


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


 Dra. MARIANA VILA PEREZ
 ARDORUSA
 BioSystems S.A.

2. Sensibilidad

La sensibilidad se define como la concentración más baja de organismo que se puede detectar de manera coherente ($\geq 95\%$ de resultados positivos entre todas las muestras analizadas).

La sensibilidad de Allplex™ MTB/XDRe Detection se ha determinado utilizando el DNA plasmídico (de 10^4 a 10^0 copias/reacción). El límite de detección de Allplex™ MTB/XDRe Detection fue de 20 copias/reacción.

Allplex™ MTB/XDRe Detection tiene como objetivo los genes *mpb64* e *IS6110* en cepas de MTB. En presencia de varias copias de la secuencia *IS6110* en cepas de MTB, se ha mejorado la sensibilidad de las pruebas de PCR. El analito MTB de Allplex™ MTB/XDRe Detection ha detectado hasta 10 copias/reacción cuando hay varias copias de la secuencia *IS6110* presentes en la cepa de MTB.

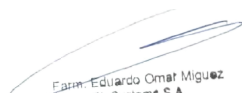
3. Reproducibilidad

La reproducibilidad de Allplex™ MTB/XDRe Detection se ha evaluado entre centros, lotes de producto, experimentadores y puntos temporales utilizando muestras de 3 concentraciones de cada analito. Los índices de positivo por concentración cumplieron los criterios de satisfacción (100% para muestras moderadamente positivas, $\geq 95\%$ para muestras débilmente positivas y $< 95\%$ o sin detección para muestras muy negativas).

Los resultados fueron acordes a los criterios, lo que confirma la reproducibilidad de Allplex™ MTB/XDRe Detection.

4. Sustancias interferentes

Esta prueba se realizó con 8 sustancias interferentes para confirmar el rendimiento de Allplex™ MTB/XDRe Detection en presencia de posibles sustancias interferentes. No se observó efecto alguno en el resultado al añadir las sustancias: ni detección no específica ni inhibición de la amplificación del objetivo. De acuerdo con la prueba realizada, ninguna de las 8 sustancias interferentes afecta a los resultados de Allplex™ MTB/XDRe Detection.



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



Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

N.º	Sustancias interferentes	Concentración
1	Mucin (glándula submaxilar bovina, tipo I-S)	60 µg/ml
2	Mupirocin (antibiótico, ungüento nasal)	6,6 mg/ml
3	Tobramycin (antibacteriano, sistémico)	4,0 µg/ml
4	Oxymetazoline (spray nasal Afrin)	15% (v/v)
5	Zanamivir (medicamento antiviral Relenza)	3,3 mg/ml
6	Oseltamivir (medicamento antiviral Tamiflu)	25 mg/ml
7	Isoniazid	50 µg/ml
8	Rifampicin	25 µg/ml

5. Estudio clínico

Se probaron un total de 108 muestras primarias clínicas con Allplex™ MTB/XDRe Detection y el ensayo de referencia.

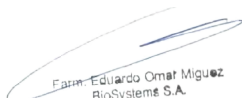
La tasa de concordancia de MTB, FQ-R, Inj. drug-R1, Inj. drug-R2 y Inj. drug-R3 debe ser superior al 95%. Esta prueba comparativa ha demostrado una tasa de concordancia del 100% en las muestras clínicas entre Allplex™ MTB/XDRe Detection y el ensayo de referencia. Por tanto, se confirma que la calidad de Allplex™ MTB/XDRe Detection es válida.

Analito	Sensibilidad (en comparación con el ensayo de referencia)			Especificidad (en comparación con el ensayo de referencia)		
	TP/ (TP+FN)	% ^{a)}	95% CI ^{c)}	TN/ (TN+FP)	% ^{b)}	95% CI ^{c)}
MTB	96/96	100	97,3~100,0	12/12	100	78,6~100,0
FQ-R	40/40	100	93,2~100,0	56/56	100	95,1~100,0
Inj. drug-R1	7/7	100	65,7~100,0	89/89	100	97,3~100,0
Inj. drug-R2	41/41	100	93,4~100,0	55/55	100	95,1~100,0
Inj. drug-R3	0/0	-	-	96/96	100	100

a) Sensibilidad: $100 \times TP / (TP + FN)$

b) Especificidad: $100 \times TN / (FP + TN)$

c) Se han calculado los intervalos de confianza del 95% bilaterales.


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






















 Dra. MARINA VILA PEREZ
 APODERADA
 BioSystems S.A.

REFERENCIAS

1. Chun, J. Y., Kim, K. J., Hwang, I. T., Kim, Y. J., Lee, D. H., and Lee, I. K. [Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene] *Nucleic Acids Res.* (2007) 35: e40
2. Da Silva, P. E. A. and Palomino, J. C. [Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs] *J. Antimicrob. Chemother.* (2011) 66: 1417-1430
3. Georghiou, S. B., Magana, M., Garfein, R. S., Catanzaro, D. G., Catanzaro, A., and Rodwell, T. C. [Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review] *PLoS ONE* (2012) 7(3): e33275
4. Gikalo, M. B., Nosoca, E. Y., Krylova, L. Y., Moroz, A. M. [The role of *eis* mutations in the development of kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Moscow region] *J. Antimicrob. Chemother.* (2012) 67(9): 2017-2109
5. Johnson, R., Streicher, E. M., Louw, G. E., Warren, R. M., van Helden, P. D., and Victor, T. C. [Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*] *Curr. Issues Mol. Biol.* (2006) 8(2): 97-111
6. Maus, C. E., Plikaytis, B. B., and Shinnick, T. M. [Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*] *Antimicrob. Agents Chemother.* (2005) 49(8): 3192-3197
7. Medappa, N. and Srivastava, V. K. [What is new in the diagnosis of tuberculosis?] *ICMR Bulletin* (2002) 32
8. Merza, M. and Masjedi, M. R. [Extensively drug resistant tuberculosis (XDR) and extremely drug resistant tuberculosis (XXDR): risk factors and molecular perspectives] *Iranian J. Clin. Infect. Dis.* (2010) 5(3): 174-188
9. Migliori, G. B., Dheda, K., Centis, R., Mwaba, P., Bates, M., O'Grady, J., Hoelscher, M., and Zumla, A. [Review of multidrug-resistant and extensively drug-resistant TB: global perspectives with a focus on sub-Saharan Africa] *Trop. Med. Int. Health* (2010) 15(9): 1052-1066
10. Qi, Y. C., Ma, M. J., Li, D. J., Chen, M. J., Lu, Q. B., Li, X. J., Li, J. L., Liu, W., and Cao, W. C. [Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in multi-ethnic region, Xinjiang Uygur Autonomous region, China] *PLoS ONE* (2012) 7(2): e32103
11. Santos, L. C. [Review: the molecular basis of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*] *J. Med. Microbiol.* (2012) 2(1): 24-36
12. Yuan, X., Zhang, T., Kawakami, K., Zhu, J., Li, H., Lei, J., and Tu, S. [Molecular characterization of multidrug and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Jiangxi, China] *J. Clin. Microbiol.* (2012) 50(7): 2403-2413
13. World Health Organization. [Global tuberculosis control] WHO Report (2011) WHO/HTM/TB/2011.16
14. World Health Organization. [Towards universal access to diagnosis and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis by 2015] WHO Progress Report (2011) WHO/HTM/TB/2011.3

CLAVE DE LOS SÍMBOLOS

Clave de los símbolos usados en el manual y las etiquetas

Símbolo	Explicación
	Dispositivo sanitario de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Número de catálogo
	Fecha de caducidad
	Límite máximo de temperatura
	Mezcla de oligonucleótidos para amplificación y detección
	Mezcla de detección o PCR Master Mix
	Dispositivo sanitario de diagnóstico <i>in vitro</i>
	RNase-free Water
	DNA Extraction Solution
	Control positivo (PC)
	Control interno (IC)
	Control de tipo natural (WTC)
	Fabricante
	Fecha de fabricación
	Representante autorizado en la Comunidad Europea
	Consultar instrucciones de uso
	Contiene suficiente para <n> pruebas
	Identificador único del dispositivo
	Código de barras de reacción para sistema de extracción automatizada

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

Dra. MARINA VILA PEREZ
 APODERADA
 BioSystems S.A.

INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

N.º de cat.	Producto	Tamaño
Serie Allplex™ TB		
TB10173Y	Allplex™ MTB/MDR/XDRe Detection	50 rxns
TB10174X	Allplex™ MTB/MDR/XDRe Detection	100 rxns
TB10385Z	Allplex™ MTB/MDR/XDRe Detection	25 rxns
TB9400Y	Allplex™ MTB/MDRe Detection	50 rxns
TB9400X	Allplex™ MTB/MDRe Detection	100 rxns
TB10386Z	Allplex™ MTB/MDRe Detection	25 rxns
TB9500Y	Allplex™ MTB/XDRe Detection	50 rxns
TB9500X	Allplex™ MTB/XDRe Detection	100 rxns
TB10387Z	Allplex™ MTB/XDRe Detection	25 rxns

Serie Anyplex™ II TB

TB7500Y	Anyplex™ II MTB/MDR/XDR Detection	50 rxns
TB7301Y	Anyplex™ II MTB/MDR Detection	50 rxns
TB7302Y	Anyplex™ II MTB/XDR Detection	50 rxns

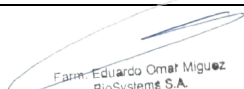
Serie Anyplex™ TB


TB10218Y	Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0)	50 rxns
TB7200X	Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0)	100 rxns*
TB7202Y	Anyplex™ MTB/NTMe Real-time Detection	50 rxns
TB7202X	Anyplex™ MTB/NTMe Real-time Detection	100 rxns
TB10383Z	Anyplex™ MTB/NTMe Real-time Detection	25 rxns
TB7203Y	Anyplex™ MTB/NTM Combi	50 rxns
TB7203X	Anyplex™ MTB/NTM Combi	100 rxns*

* Para uso solo con el sistema de extracción de ácido nucleico automatizada

Serie Seeplex® TB

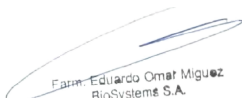
TB2110Y	Seeplex® MTB Nested ACE Detection (V2.3)	50 rxns
---------	--	---------


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


 Dra. MARIANA VILA PEREZ
 APODERADA
 BioSystems S.A.

Sistemas de extracción automatizada

65415-02	Microlab NIMBUS IVD	EA
173000-075	Microlab STARlet IVD	EA
65415-03	Seegene NIMBUS	EA
67930-03	Seegene STARlet	EA
SG71101	Seegene STARlet 96MPH	EA
744300.4.UC384	STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	384T / 1box
EX00031C	STARMag™ N/S Kit	384T / 1box
EX00032P	STARMag™ S96H Kit	48T / 1box
EX00033P	STARMag™ S96H Kit	480T / 1crt
EX00034P	STARMag™ S96H Kit	96T / 1box
EX00035P	STARMag™ S96H Kit	960T / 1crt
SG71100	SEEPREP32	EA
EX00028P	STARMag™ SP32 Kit (Plate Type)	96T / 1box
EX00028T	STARMag™ SP32 Kit (Tube Type)	96T / 1box
M9600	Maelstrom™ 9600	EA
EX00029P	STARMag™ M96 Kit	96T / 1box
EX00030P	STARMag™ M96 Kit	960T / 1crt


 F. Omar Miguez
 BioSystems S.A.
 Director Técnico
 M.N. 17503


 Dra. MARIANA VILA PEREZ
 APODERADA
 BioSystems S.A.

ROTULOS "Allplex™ MTB/XDRe Detection"

Rotulo Externo: Allplex™ MTB/XDRe Detection (TB10387Z) x 25 determinaciones:

UDI

Allplex™

CE IVD

MTB/XDRe Detection

REF TB10387Z Σ 25

LOT TB6622D01

2023-03-31 2022-04-01

EC REP MT Promed Consulting GmbH
Ernst-Heckel-Straße 7, 66386
St. Ingbert, Germany

Allplex™
MTB/XDRe Detection

(01)08809240103876(1)220401
(17)230331(10)TB6622D01

Information of components included in kit

- 1 vial of MTBe TOM
- 1 vial of XDRe TOM
- 2 vials of EM1
- 1 vial of MTB/DRe PC
- 1 vial of MTB/DRe IC
- 1 vial of MTB/DRe WTC
- 2 vials RNase-free Water
- 2 vials DNA Extraction Solution



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

Seegene Inc.

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

Importado por:

BioSystems S.A.

Av. Dorrego 673 (C1414CKB)

TEL: (54-11) 4854-7775

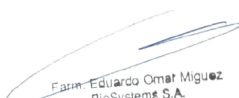
Director Técnico: Eduardo Omar Miguez, MN17503

Producto para Diagnostico uso "In Vitro"

**"USO PROFECIONAL EXCLUSIVO-VENTA A LABORATORIOS DE
ANALISIS CLINICOS**

Autorizado por ANMAT:

PM-626-240


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


Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Rótulos Internos

1) MTBe TOM



2) XDRe TOM



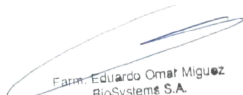
3) EM1



4) MTB/DRe PC



5) MTB/DRe IC


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


Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.



6) MTB/DRe WTC.

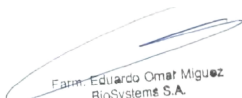


7) RNase-free Water



8) DNA Extraction Solution




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


Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Rotulo Externo: Allplex™ MTB/XDRe Detection (TB9500X) x 100 determinaciones:

UDI

Allplex™

CE IVD

MTB/XDRe Detection

REF TB9500X 100

LOT TB4121A01

2021-12-31 2021-01-01

EC REP MT Promedt Consulting GmbH
Ernst-Heckel-Straße 7, 66386
St. Ingbert, Germany

Allplex™
MTB/XDRe Detection

(01)08809240101179 (11)210101
(17)211231 (10)TB4121A01

Information of components included in kit

- 1 vial of MTBe TOM
- 1 vial of XDRe TOM
- 2 vials of EM1
- 1 vial of MTB/DRe PC
- 1 vial of MTB/DRe IC
- 1 vial of MTB/DRe WTC
- 2 vials RNase-free Water
- 2 vials DNA Extraction Solution



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

Seegene Inc.

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

Importado por:

BioSystems S.A.

Av. Dorrego 673 (C1414CKB)

TEL: (54-11) 4854-7775

Director Técnico: Eduardo Omar Miguez, MN17503

Producto para Diagnostico uso "In Vitro"

**"USO PROFESIONAL EXCLUSIVO-VENTA A LABORATORIOS DE
ANALISIS CLINICOS**

Autorizado por ANMAT:

PM-626-240

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

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Rótulos Internos

1) MTBe TOM



2) XDRe TOM



3) EM1



4) MTB/DRe PC



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

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

5) MTB/DRe IC



6) MTB/DRe WTC



7) RNase-free Water



8) DNA Extraction Solution



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

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Año de la Grandeza Argentina

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: rotulo E INSTRUCCIONES DE USO- BIOSYSTEMS S.A.

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 69 pagina/s.