



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Disposición

Número:

Referencia: EX-2021-06579807-APN-DGA#ANMAT

VISTO el expediente N° EX-2021-06579807-APN-DGA#ANMAT del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma **TECNOLAB S.A.** solicita autorización para la venta del Producto Médico para diagnóstico de uso in vitro denominado: **1) GenoType MTBDRplus VER 2.0.**

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establecen la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99. Que en el expediente de referencia consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico in vitro que establece que el producto reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia y corresponde autorizar la inscripción en el RPPTM del producto médicos para diagnóstico in vitro objeto de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por el Decreto N° 1490/92 y sus modificatorios.

Por ello;

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

DISPONE:

ARTÍCULO 1°.- Autorízase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología

Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) del producto médico para diagnóstico de uso in vitro: **1) GenoType MTBDRplus VER 2.0.** de acuerdo con lo solicitado por **TECNOLAB S.A.**, con los Datos Característicos que figuran al pie de la presente.

ARTICULO 2°.- Autorízase los textos de los proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones que obran en el documento N° IF-2022-11726976-APN-INPM#ANMAT.

ARTÍCULO 3°.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda “Autorizado por la ANMAT PM 1252-164”, con exclusión de toda otra leyenda no contemplada en la normativa vigente.

ARTICULO 4°.- Extiéndase el Certificado de Autorización e Inscripción en el RPPTM con los datos característicos mencionados en esta disposición.

ARTÍCULO 5°.- Regístrese. Inscríbese en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica al nuevo producto. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de usos autorizados y el Certificado mencionado en el artículo 4°. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.-

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERISTICOS

NOMBRE COMERCIAL: 1) GenoType MTBDRplus VER 2.0.

INDICACIÓN DE USO: 1) Ensayo cualitativo in vitro para la identificación del complejo Mycobacterium tuberculosis y su resistencia a rifampicina (RMP) y/o isoniazida (INH), desde muestras clínicas pulmonares con baciloscopía positiva o negativa y muestras de cultivo. Las siguientes especies están incluidas en la tuberculosis causada por el complejo M. tuberculosis: M. tuberculosis, M. africanum, M. bovis subsp. bovis, M. bovis subsp. caprae, M. bovis BCG, M. microti, M. canettii, y M. pinnipedii. La identificación de la resistencia a rifampicina es posible gracias a la detección de las mutaciones más significativas asociadas del gen rpoB (que codifica por la subunidad β de la RNA polimerasa). Para testear la resistencia de isoniazida son estudiados el gen katG (que codifica la catalasa peroxidasa), y la región del promotor del gen inhA (que codifica la NADH enoil ACP reductasa).

FORMA DE PRESENTACIÓN:

1. El producto es provisto en dos kits separados debido a su diferente temperatura de conservación. Existe presentación para 12 determinaciones (código del producto: 304A) y para 96 determinaciones (código del producto: 30496A).

A) Componente del Kit 1 de 2. Código n° 304A y Código 30496A:

1. Tiras de membranas recubiertas con sondas específicas (MTBDRplus VER 2.0 STRIPS). 12 tiras y 2x48 tiras.
2. Solución de Desnaturalización (DEN) contiene <2% NaOH, colorante. 240μ y 2x 960μ
3. Tampón de Hibridación (HYB) contiene surfactante aniónico al <10%, colorante. 12ml y 96ml.
4. Solución de Lavado Astringente (STR) contiene compuesto cuaternario de amonio al >25%, surfactante

- aniónico al <1%, colorante. 12ml y 96ml.
5. Solución de Aclarado (RIN) contiene tampón, <1% NaCl, surfactante no iónico al <1%. 36ml y 3x 96ml.
 6. Conjugado Concentrado (CON-C) contiene fosfatasa alcalina conjugada con streptavidina, colorante. 120µ y 960µ
 7. Tampón del Conjugado (CON-D) contiene tampón, reactivo de bloqueo al 1%, <1% NaCl. 12ml y 96ml.
 8. Sustrato Concentrado (SUB-C) contiene <70% dimetilsulfóxido, <10% 4-nitroazul de tetrazolio (NBT), <10% 5-bromo-4-cloro-3-indolilo fosfato. 120µy 960µ.
 9. Tampón del Sustrato (SUB-D) contiene tampón, <1% MgCl₂, <1% NaCl, 12ml y 96ml.
 10. Bandeja, hoja de evaluación. 1 de cada y 4 de cada.
 11. Instrucciones de uso, plantilla, 1 de cada.
 12. Etiqueta de los lotes, 3.

B) Componente del Kit 2 de 2. Código nº 304A y Código 30496A:

1. Mezcla de Amplificación A (AM-A GT MTBDRplus VER 2.0) contiene tampón, nucleótidos, Taq polimerasa. 120µy 4x 240µ.
2. Mezcla de Amplificación B (AM-B GT MTBDRplus VER 2.0) contiene sales, primers específicos, colorante. 420µy 4x 480 µ

PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 1) Mantener todos los Componentes del Kit 1 entre 2°C y 8°C. Mantenga todos los Componentes del Kit 2 entre -20°C y -18°C y manténgalos estrictamente aislados de DNA contaminante. Debe evitarse las congelaciones y descongelaciones repetidas (>4x) del AM-A y AM-B; si se procesan únicamente unas pocas muestras por ciclo, se debe alicuotar el AM-A y AM-B usando tubos con tapón de rosca. Vida útil: 18 meses.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: Hain Lifescience GmbH. Hardwiesenstr 1. 72147 Nehren. Alemania.

CONDICION DE VENTA/CATEGORIA: venta a Laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO

N°EX-2021-06579807-APN-DGA#ANMAT

AM

Digitally signed by GARAY Valeria Teresa
Date: 2022.05.04 17:02:09 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2022.05.04 17:02:11 -03:00



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Certificado - Redacción libre

Número:

Referencia: EX-2021-06579807-APN-DGA#ANMAT

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN

PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO DE USO IN VITRO

Nº EX-2021-06579807-APN-DGA#ANMAT

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que de acuerdo con lo solicitado por la firma **TECNOLAB S.A.** se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), de un nuevo producto médico para diagnóstico de uso in vitro con los siguientes datos identificatorios característicos:

NOMBRE COMERCIAL: 1) **GenoType MTBDRplus VER 2.0.**-----

INDICACIÓN DE USO: 1) Ensayo cualitativo in vitro para la identificación del complejo Mycobacterium tuberculosis y su resistencia a rifampicina (RMP) y/o isoniazida (INH), desde muestras clínicas pulmonares con baciloscopía positiva o negativa y muestras de cultivo. Las siguientes especies están incluidas en la tuberculosis causada por el complejo M. tuberculosis: M. tuberculosis, M. africanum, M. bovis subsp. bovis, M. bovis subsp. caprae, M. bovis BCG, M. microti, M. canettii, y M. pinnipedii. La identificación de la resistencia a rifampicina es posible gracias a la detección de las mutaciones más significativas asociadas del gen rpoB (que codifica por la subunidad β de la RNA polimerasa). Para testear la resistencia de isoniazida son estudiados el gen katG (que codifica la catalasa peroxidasa), y la región del promotor del gen inhA (que codifica la

NADH enoil ACP reductasa).-----

FORMA DE PRESENTACIÓN: 1) El producto es provisto en dos kits separados debido a su diferente temperatura de conservación. Existe presentación para 12 determinaciones (código del producto: 304A) y para 96 determinaciones (código del producto: 30496A).

A) Componente del Kit 1 de 2. Código nº 304A y Código 30496A:

1. Tiras de membranas recubiertas con sondas específicas (MTBDRplus VER 2.0 STRIPS). 12 tiras y 2x48 tiras.
2. Solución de Desnaturalización (DEN) contiene <2% NaOH, colorante. 240µ y 2x 960µ
3. Tampón de Hibridación (HYB) contiene surfactante aniónico al <10%, colorante. 12ml y 96ml.
4. Solución de Lavado Astringente (STR) contiene compuesto cuaternario de amonio al >25%, surfactante aniónico al <1%, colorante. 12ml y 96ml.
5. Solución de Aclarado (RIN) contiene tampón, <1% NaCl, surfactante no iónico al <1%. 36ml y 3x 96ml.
6. Conjugado Concentrado (CON-C) contiene fosfatasa alcalina conjugada con streptavidina, colorante. 120µ y 960µ
7. Tampón del Conjugado (CON-D) contiene tampón, reactivo de bloqueo al 1%, <1% NaCl. 12ml y 96ml.
8. Sustrato Concentrado (SUB-C) contiene <70% dimetilsulfóxido, <10% 4-nitroazul de tetrazolio (NBT), <10% 5-bromo-4-cloro-3-indolilo fosfato. 120µy 960µ.
9. Tampón del Sustrato (SUB-D) contiene tampón, <1% MgCl₂, <1% NaCl, 12ml y 96ml.
10. Bandeja, hoja de evaluación. 1 de cada y 4 de cada.
11. Instrucciones de uso, plantilla, 1 de cada.
12. Etiqueta de los lotes, 3.

B) Componente del Kit 2 de 2. Código nº 304A y Código 30496A:

13. Mezcla de Amplificación A (AM-A GT MTBDRplus VER 2.0) contiene tampón, nucleótidos, Taq polimerasa. 120µy 4x 240µ.
14. Mezcla de Amplificación B (AM-B GT MTBDRplus VER 2.0) contiene sales, primers específicos, colorante. 420µy 4x 480 µ

PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 1) Mantener todos los Componentes del Kit 1 entre 2°C y 8°C. Mantenga todos los Componentes del Kit 2 entre -20°C y -18°C y manténgalos estrictamente aislados de DNA contaminante. Debe evitarse las congelaciones y descongelaciones repetidas (>4x) del AM-A y AM-B; si se procesan únicamente unas pocas muestras por ciclo, se debe alicuotar el AM-A y AM-B usando tubos con tapón de rosca. Vida útil: 18 meses.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: Hain Lifescience GmbH. Hardwiesenstr 1. 72147 Nehren. Alemania.-----

CONDICIÓN DE VENTA/CATEGORÍA: Venta a Laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO-----

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del PRODUCTO PARA DIAGNOSTICO USO

IN VITRO PM N° 1252-164. -----

N° EX-2021-06579807-APN-DGA#ANMAT

AM

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2022.04.22 15:44:01 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2022.04.22 15:44:01 -03:00

MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.

Director Técnico

Firma y Sello

GenoType MTBDR*plus*

VER 2.0

Instrucciones de Uso

IFU-304A-09

CE

IVD sólo para uso diagnóstico in vitro

2019-04-25



GenoType MTBDRplus VER 2.0

Ensayo de Genética Molecular para la Identificación del Complejo *M. tuberculosis* y su Resistencia a Rifampicina e Isoniazida a partir de Muestras Clínicas y de Muestras de Cultivos

Por favor, lea las instrucciones de uso detenidamente antes de utilizar el ensayo. Cíñase estrictamente a los procesos establecidos para obtener resultados correctos.

Uso Previsto

El GenoType MTBDRplus VER 2.0 es un ensayo cualitativo in vitro, para la identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a rifampicina (RMP) y/o isoniazida (INH), desde muestras clínicas pulmonares baciloscopia positiva o negativa y muestras de cultivos. Las siguientes especies están incluidas en la tuberculosis causada por el complejo *M. tuberculosis*: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. canettii*, y *M. pinnipedii*. La identificación de la resistencia a rifampicina es posible gracias a la detección de las mutaciones asociadas más significativas del gen *rpoB* (que codifica por la subunidad β de la RNA polimerasa). Para testar la resistencia de isoniazida son examinados el gen *katG* (que codifica por la catalasa peroxidasa), y la región del promotor del gen *inhA* (que codifica por la NADH enoil ACP reductasa). El ensayo está indicado como soporte al diagnóstico y previsto para uso en laboratorios médicos.

Resumen y Explicación

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa bacteriana contagiada por la inhalación de aerosoles transportados por el aire. En 2017, se estimaron 10,0 millones de episodios de TB a escala mundial, con 1,3 millones de muertes [1]. El tratamiento para la TB requiere una terapia de varios meses. Aún así, la aparición y propagación de la tuberculosis multiresistente (TB-MDR) es un grave problema médico y social que amenaza la salud mundial. La TB-MDR se define como la TB resistente a al menos RMP e INH, los dos fármacos de primera línea más importantes para el tratamiento de la TB [2]. La MDR-TB es un desafío para el control de la TB debido a su complejo diagnóstico y las dificultades en el tratamiento. En 2013, se estimaron unos 480 000 casos de TB-MDR entre los 11 millones de casos prevalentes de tuberculosis a escala mundial [1]. Mientras la TB-MDR no es diagnosticada, el uso de antibióticos inadecuados puede fomentar la propagación de bacterias resistentes y el aumento de la resistencia. Por lo tanto, el rápido diagnóstico e identificación de la TB-MDR es un requisito previo para un tratamiento adecuado.

Principios del Procedimiento

El GenoType MTBDRplus VER 2.0 está basado en la tecnología DNA-STRIP. El procedimiento completo se divide en tres pasos: (i) extracción de DNA procedente de muestra clínica (muestras pulmonares descontaminadas) o de cultivo (medio sólido/medio líquido) – los reactivos necesarios no son suministrados – (ii) una amplificación multiplex con primers marcados con biotina, y (iii) una hibridación reversa.

Todos los reactivos necesarios para la amplificación, así como la polimerasa y los primers, están incluidos en las Mezclas de Amplificación A y B (AM-A y AM-B) que fueron optimizados para este ensayo. Las tiras de membrana están recubiertas con sondas específicas complementarias a los ácidos nucleicos amplificados. Después de la desnaturalización, las cadenas simples de las amplicones se unen a las sondas (hibridación). La alta especificidad de unión de las sondas con el DNA complementario está asegurada por las condiciones astringentes resultantes de la combinación de la composición del tampón y la correcta temperatura. De este modo las sondas discriminan realmente las variaciones en la secuencia de las regiones de los genes estudiados. La fosfatasa alcalina conjugada con la estreptavidina se une a la biotina de los amplicones a través de la fracción de estreptavidina. Finalmente, la fosfatasa alcalina transforma el sustrato añadido en un colorante que resulta visible en la membrana en forma de precipitado de color. Una plantilla asegura la interpretación sencilla y rápida del perfil de bandas obtenido.



MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.

Director Técnico
Firma y Sello

Reactivos e Instrumentos

Contenido del kit

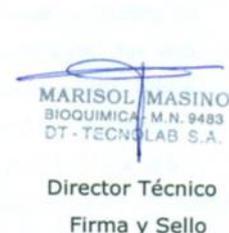
Código n°	304A	30496A
Tests	12	96

Componente del Kit 1 de 2 (almacene entre 2°C y 8°C)

Tiras de membranas recubiertas con sondas específicas (MTBDRplus VER 2.0 STRIPS)	12	2x 48
Solución de Desnaturalización (DEN) contiene <2% NaOH, colorante	240 µl	2x 960 µl
Tampón de Hibridación (HYB) contiene surfactante aniónico al <10%, colorante	12 ml	96 ml
Solución de Lavado Astringente (STR) contiene compuesto cuaternario de amonio al >25%, surfactante aniónico al <1%, colorante	12 ml	96 ml
Solución de Aclarado (RIN) contiene tampón, <1% NaCl, surfactante no iónico al <1%	36 ml	3x 96 ml
Conjugado Concentrado (CON-C) contiene fosfatasa alcalina conjugada con streptavidina, colorante	120 µl	960 µl
Tampón del Conjugado (CON-D) contiene tampón, reactivo de bloqueo al 1%, <1% NaCl	12 ml	96 ml
Sustrato Concentrado (SUB-C) contiene <70% dimetilsulfóxido, <10% 4-nitroazul de tetrazolio (NBT), <10% 5-bromo-4-cloro-3-indolilo fosfato	120 µl	960 µl
Tampón del Sustrato (SUB-D) contiene tampón, <1% MgCl ₂ , <1% NaCl	12 ml	96 ml
Bandeja, hoja de evaluación	1 de cada	4 de cada
Instrucciones de uso, plantilla	1 de cada	1 de cada
Etiqueta de los lotes	3	3

Componente del Kit 2 de 2 (almacene entre -20°C y -18°C)

Mezcla de Amplificación A (AM-A GT MTBDRplus VER 2.0) contiene tampón, nucleótidos, Taq polimerasa	120 µl	4x 240 µl
Mezcla de Amplificación B (AM-B GT MTBDRplus VER 2.0) contiene sales, primers específicos, colorante	420 µl	4x 840 µl



MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.
Director Técnico
Firma y Sello

Almacenamiento, manipulación y eliminación de los componentes del kit

1/2 Componente del Kit 1 de 2

2/2 Componente del Kit 2 de 2

Mantenga todos los Componentes del Kit 1 entre 2°C y 8°C. Mantenga todos los Componentes del Kit 2 entre -20°C y -18°C y manténgalos estrictamente aislados de DNA contaminante. Debe evitarse las congelaciones y descongelaciones repetidas (>4x) del AM-A y AM-B; si se procesan únicamente unas pocas muestras por ciclo, se debe alícuotar el AM-A y AM-B usando tubos con tapón de rosca (recomendación: ver capítulo Información para Pedidos). No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad. El desecho de los reactivos no utilizados y de los residuos se realizará de acuerdo a las regulaciones federales, estatales y locales.

Precauciones para el manejo de los componentes del kit

Observe todas las normas medioambientales y de seguridad, tanto federales, estatales como locales. Lleve siempre guantes y ropa adecuada. Cuando manipule los reactivos del kit debe tomar las siguientes medidas especiales de seguridad:

El Tampón de Hibridación (**HYB**) y el Sustrato Concentrado (**SUB-C**) no está clasificados como sustancia peligrosa. Sin embargo, debido a sus ingredientes, le aplica la indicación de peligro EUH210: Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad.



La Solución de Desnaturalización (**DEN**) contiene <2% de hidróxido sódico.

¡Atención!

H315: Provoca irritación cutánea. H319: Provoca irritación ocular grave.

P280: Llevar guantes/ropa de protección/equipo de protección para los ojos. P305+351+338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. P313: Consultar a un médico.

Para información adicional, consulte las fichas de datos de seguridad. También puede descargarse de: www.hain-lifescience.com/products/msds.html

El Conjugado Concentrado (**CON-C**) y el Tampón del Conjugado (**CON-D**) contienen material biológico. Por tanto deben considerarse y manipularse como potencialmente infecciosos (p.ej. ver [3] o [4]).

Materiales requeridos pero no suministrados

- Agua (destilada)
- Agua (grado biología molecular, para controles negativos)
- Baño de agua con agitación + plataforma de agitación **o** TwinCubator (aparato para hibridación manual) **o** aparato para hibridación automática
- Cronómetro
- Guantes desechables
- Kit para extracción de DNA (**GenoLyse® o GXT DNA/RNA Extraction Kit**, ver capítulo Información para Pedidos) así como todos los equipo necesarios
- Microtubos de 0,5 ml con tapón de rosca o microtubos de 1,5 ml con tapón de rosca para la preparación de alícuotas (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania; ver capítulo Información para Pedidos)
- Papel absorbente
- Pinzas
- Pipetas ajustables de 10, 20, 200, 1000 µl
- Probeta graduada
- Puntas de pipeta desechables con filtro
- Reactivos de descontaminación de la muestra, así como el equipamiento necesario
- Reactivos para cultivo de micobacterias así como el equipo necesario (cuando se utilizan muestras de cultivos)
- Termociclador
- Tubos para PCR, libres de DNasa y RNasa

Control de Calidad

A fin de validar el funcionamiento correcto del test y la funcionalidad de los componentes del kit, cada tira incluye 5 zonas de control:

- una zona de Control de Conjugado (CC) para comprobar la unión del conjugado a la tira y una reacción cromogénica correcta
- una zona de Control de Amplificación (AC) para comprobar la amplificación correcta de la reacción
- tres zonas del Locus Control (*rpoB*, *katG* e *inhA*) para comprobar la sensibilidad óptima de la reacción de cada locus testado

Observe las precauciones normales para preparar la amplificación. Es esencial que todos los materiales (como por ejemplo, las puntas de pipeta) que entren en contacto con los reactivos estén libres de DNasas.

No intercambie o mezcle Mezclas de Amplificación o tiras de membranas de kits diferentes, excepto si tienen el mismo lote. Puede encontrar el lote del kit y los lotes correspondientes de los componentes del kit en las etiquetas de los lotes incluidas en el kit.

Debe realizarse un control negativo para la detección de una posible contaminación, añadiendo agua (grado biología molecular) en vez de DNA, en cada tanda de ensayos; la tira del ensayo debe mostrar solamente las bandas CC y AC.

Requerimiento de la Muestra

Se puede utilizar como material de partida para la extracción de DNA, muestras clínicas pulmonares descontaminadas baciloscopia positivas o negativas como esputo (inducido o por expectoración), muestras bronquiales (p.ej. lavados broncoalveolares) o aspirados (p.ej. aspirados de líquido pleural) así como muestras de cultivos (medio sólido/líquido). Hasta la presente edición de las instrucciones, la realización del ensayo no ha sido validada con otro tipo de muestras que las mencionadas más arriba.

Precauciones para el manejo de muestras

Los especímenes de los pacientes y los cultivos realizados a partir de especímenes de pacientes deben ser considerados siempre como infecciosos y deben manejarse de acuerdo a ello (p. ej. ver [3] o [4]). Lleve siempre guantes y ropa adecuada. Las muestras de pacientes de riesgo (infectados por microorganismos patógenos o virus incluyendo Hepatitis B y Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)) y los cultivos realizados a partir de esas muestras deben ser etiquetados y manejados siempre bajo las condiciones de seguridad adecuadas, de acuerdo con las guías institucionales.

Todos los especímenes que puedan contener micobacterias deben ser manipulados aplicando prácticas Biosafety Level 2 o, cuando se indique, prácticas Biosafety Level 3 (p.ej. ver [3]). Observe todas las normas medioambientales y de seguridad, tanto federales, estatales como locales.

Desechar las puntas de pipeta usadas inmediatamente después de su uso en un contenedor para residuos de riesgo biológico. Después de finalizar el ensayo, desechar todo el material de un solo uso en un contenedor para residuos de riesgo biológico.

Conservación y transporte

Todas las muestras deben recogerse y transportarse según las recomendaciones publicadas en el CDC "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory" [5], el "Clinical Microbiology Procedures Handbook" [6], o según los manuales de procedimiento de su laboratorio. Debe asegurarse de que, hasta que se realice la descontaminación, los especímenes se conservan en contenedores de plástico estériles, a una temperatura entre 2°C y 8°C. El transporte de las muestras a temperatura ambiente ha de llevarse a cabo tan pronto como sea posible, en 1-2 días [7,8]. Muestras usadas para descontaminación no pueden tener más de 4 días.

Después de la descontaminación y la posterior resuspensión del pellet bacteriano en tampón fosfato, las muestras pueden almacenarse a -20°C o -80°C durante un máximo de 5 días, hasta realizar la extracción de DNA.

Preparación

Las muestras clínicas deben procesarse utilizando el método "NALC-NaOH" según la publicación de la CDC "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory" [5]. Después de la descontaminación, el precipitado de células o pellet debe resuspenderse en máx. 1-1,5 ml de tampón fosfato. Al probar muestras de pacientes, volúmenes más altos podrían incidir en la sensibilidad del ensayo. Debido a la potencial falta de homogeneidad del espécimen, la muestra descontaminada debe mezclarse antes de obtener la alícuota a analizar; de otro modo, la sensibilidad del ensayo podría verse afectada.

Cuando la muestra se debe cultivar, el cultivo se puede realizar en medio sólido (ej.: Loewenstein-Jensen, Middlebrook), o en medio líquido (ej.: MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)).

El manejo de muestras potencialmente infecciosas debe ser llevado a cabo en una cabina de seguridad de clase II.



MARISOL MASINO
BIOQUIMICA S.A. M. N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.

Director Técnico
Firma y Sello

Extracción de DNA

Las muestras descontaminadas de pacientes así como las bacterias cultivadas en medio sólido (por ejemplo, Loewenstein-Jensen, Middlebrook) o en medio líquido (por ejemplo MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)) pueden utilizarse como material de partida para la extracción de DNA.

Para la extracción de DNA de muestras clínicas descontaminadas con NALC-NaOH o cultivos se usa el kit **GenoLyse**[®] (ver capítulo Información para Pedidos). Como alternativa, se puede usar el **GenoXtract**[®] combinado con el **GXT DNA/RNA Extraction Kit** (ver capítulo Información para Pedidos) para la extracción automatizada de DNA de muestras clínicas. Para las instrucciones de manejo, siga las respectivas instrucciones de uso.

Los métodos aquí mencionados fueron utilizados para la realización de la evaluación del ensayo **GenoType MTBDRplus** VER 2.0. Hasta la presente edición de las instrucciones, la realización del ensayo no ha sido validada con ningún otro método de extracción de DNA.

Amplificación

Todos los reactivos necesarios para la amplificación, así como la polimerasa y los primers, están incluidos en las Mezclas de Amplificación A y B (AM-A y AM-B) que fueron optimizados para este ensayo. Descongele AM-A y AM-B poco antes de preparar la mezcla madre, centrifugue brevemente y mezcle cuidadosamente pipeteando arriba y abajo. Pipetee AM-A y AM-B en una habitación libre de DNA contaminante. Para evitar problemas de contaminación, la solución de DNA debe añadirse en un área separada.

Prepare para cada muestra:

Después de extraer el DNA con GenoLyse [®]	Después de extraer el DNA con el GXT DNA/RNA Extraction Kit
- 10 µl AM-A (ver Componente del Kit 2)	- 10 µl AM-A (ver Componente del Kit 2)
- 35 µl AM-B (ver Componente del Kit 2)	- 35 µl AM-B (ver Componente del Kit 2)
- 5 µl de solución de DNA	- 10 µl de solución de DNA
Volumen final: 50 µl	Volumen final: 55 µl

Determine el número total de muestras (número de muestras a analizar más las muestras de control). Prepare el número de tubos que necesite. Prepare una mezcla madre que contenga AM-A y AM-B y mezcle cuidadosa, pero concienzudamente. No utilice vortex. Alternativamente, puede transferirse el contenido del tubo de reacción AM-A al tubo de reacción AM-B. Se obtiene mezcla madre suficiente para 12 reacciones de amplificación (kit para análisis de 12 muestras) o para 4x 24 reacciones de amplificación (kit para análisis de 96 muestras). Por favor, tenga en cuenta que la mezcla madre debe ser preparada fresca para cada uso y se debe procesar rápidamente. Alicuote la mezcla madre en volúmenes de 45 µl en tubos preparados de PCR y añada 5 o 10 µl de agua (grado biología molecular) a una de las alícuotas (muestra de control negativo). En un área separada, añada 5 o 10 µl de solución de DNA en cada una de las alícuotas (salvo para el control negativo).

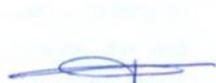
Perfil de amplificación:

Cuando utilice un termociclador de Hain Lifescience previamente instalado, seleccione el protocolo "MDR DIR" para muestras clínicas o protocolo "MDR CUL" para muestras de cultivo.

	Muestras clínicas	Muestras de cultivo
15 min 95°C	1 ciclo	1 ciclo
30 seg 95°C } 2 min 65°C }	20 ciclos	10 ciclos
25 seg 95°C } 40 seg 50°C } 40 seg 70°C }	30 ciclos	20 ciclos
8 min 70°C	1 ciclo	1 ciclo
Rampa de calentamiento	≤2,2°C/seg	≤2,2°C/seg

La tapa calentada debe estar encendida durante todo el programa.

Los productos de amplificación pueden almacenarse entre -20°C y +8°C.


MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA / M. N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.
Director Técnico
Firma y Sello

Hibridación

Cuando utilice un aparato de hibridación de Hain Lifescience, por favor, consulte el documento "Overview equipment programs" disponible en www.hain-lifescience.com para localizar el protocolo de hibridación a usar.

El siguiente protocolo describe la hibridación manual utilizando un baño de agua o un **TwinCubator**.

Preparación

Precaliente el baño de agua con agitación a **45°C** (la máxima desviación tolerada en la temperatura idónea es de $\pm 1^\circ\text{C}$) o poner en marcha el **TwinCubator**. Precaliente las soluciones HYB y STR a 37-45°C antes de usar. Los reactivos han de estar libres de precipitado (tenga en cuenta, no obstante que la solución CON-D es opaca). Mezcle si fuera necesario. Caliente a temperatura ambiente los restantes reactivos, con la excepción del CON-C y el SUB-C. Usando un tubo adecuado, diluya el Conjugado Concentrado (CON-C, naranja) y el Sustrato Concentrado (SUB-C, amarillo) 1:100 con sus tampones respectivos (**CON-C con CON-D, SUB-C con SUB-D**) en las cantidades necesarias. Mezcle bien y equilibre a temperatura ambiente. Para cada tira añada 10 µl de concentrado a 1 ml de los respectivos tampones. Diluya el CON-C antes de cada uso. El SUB-C diluido es estable durante 4 semanas si se almacena a temperatura ambiente y se protege de la luz.

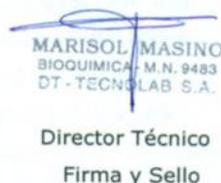
- 1. Dispense 20 µl de la Solución de Desnaturalización (DEN, azul) en una esquina de cada uno de los pocillos usados.**
- 2. Añada a la solución 20 µl de muestra amplificada, pipetee arriba y abajo para mezclar bien e incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.**
Entre tanto, saque las tiras de sus tubos usando pinzas e identifíquelas marcando bajo el marcador coloreado con un lápiz. Lleve siempre guantes cuando manipule las tiras.
- 3. Añada cuidadosamente a cada pocillo 1 ml de Tampón de Hibridación (HYB, verde) precalentado. Agite suavemente la bandeja hasta que la solución tenga un color homogéneo.**
Tenga la precaución de no derramar solución en los pocillos cercanos.
- 4. Ponga una tira en cada pocillo.**
Las tiras tienen que quedar completamente cubiertas por la solución y el lado con la sonda hacia arriba (identificable por el marcador coloreado próximo al extremo inferior). Usando pinzas, de la vuelta a las tiras que pudieran haberse girado durante su inmersión. Limpie cuidadosamente las pinzas después de cada uso para evitar contaminación. Esto, es también aplicable a los pasos siguientes.
- 5. Ponga la bandeja en el baño de agua con agitación o en el TwinCubator durante 30 minutos a 45°C.**
Ajuste la frecuencia de agitación del baño de agua para que realice una mezcla completa y constante de la solución. Para obtener una adecuada transferencia de calor, la bandeja debe estar sumergida en el agua, al menos, 1/3 de su altura.
- 6. Aspire completamente el Tampón de Hibridación.**
Por ejemplo, use una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío.
- 7. Añada 1 ml de Solución de Lavado Astringente (STR, roja) a cada tira e incube durante 15 minutos a 45°C en un baño con agitación o TwinCubator.**
- 8. Desde este paso, en adelante, trabaje a temperatura ambiente.**
Elimine completamente la Solución de Lavado Astringente.
Deseche la Solución de Lavado en un contenedor y elimine todo el líquido restante volcando la bandeja y golpeándola suavemente sobre un papel absorbente. Esto es también aplicable a todos los demás pasos de lavado.
- 9. Lave una vez cada tira con 1 ml de Solución de Aclarado (RIN) sobre la plataforma de agitado del TwinCubator (elimine el RIN después de la incubación).**
- 10. Añada 1 ml de Conjugado diluido (ver más arriba) a cada tira e incube durante 30 minutos sobre la plataforma de agitado del TwinCubator.**
- 11. Elimine la solución y lave cada tira dos veces durante 1 minuto con 1 ml de Solución de Aclarado (RIN) y de nuevo durante 1 minuto aproximadamente con 1 ml de agua destilada (ej.: botella de lavado) sobre la plataforma de agitación del TwinCubator (deseche la solución cada vez).**
Asegúrese de eliminar cualquier resto de agua después del lavado anterior.
- 12. Añada 1 ml de sustrato diluido (ver más arriba) a cada tira e incube sin agitación y protegiéndolas de la luz.**
Dependiendo de las condiciones del test (por ej. la temperatura ambiente), el tiempo de incubación del sustrato, es decir, el tiempo hasta que las bandas son claramente visibles, puede variar entre 3 y 20 minutos. Tiempos prolongados de incubación del sustrato pueden conducir a una tinción incrementada del fondo y podrían dificultar la interpretación de los resultados.
- 13. Detenga la reacción cuando las bandas sean claramente visibles, aclarando brevemente por dos veces con agua destilada.**
- 14. Usando pinzas, saque las tiras de la bandeja y séquelas entre dos capas de papel absorbente.**


MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.
Director Técnico
Firma y Sello

Evaluación e Interpretación de Resultados

Pegue las tiras y almacénelas protegidas de la luz. Con cada kit se proporciona una hoja de evaluación. Cuando se utilice esta hoja de evaluación, pegue las tiras reveladas en los campos marcados, alineando las bandas CC y AC con las respectivas líneas de la hoja. Por razones técnicas, la distancia entre cada sonda de la tira puede variar ligeramente. **Por tanto, para una lectura precisa, por favor utilice la plantilla que encontrará en cada kit, y alinee separadamente para cada uno de los locus detectados, con su respectiva banda Locus Control.** Determine el estado de la resistencia y anote en las respectivas columnas. Como ayuda para la interpretación se dan ejemplos de evaluaciones en el siguiente apartado. Cada tira tiene un total de 27 zonas de reacción (ver esquema).

—	Control de Conjugado (CC)
—	Control de Amplificación (AC)
—	<i>M. tuberculosis</i> complex (TUB)
—	<i>rpoB</i> Locus Control (<i>rpoB</i>)
—	<i>rpoB</i> sonda wild type 1 (<i>rpoB</i> WT1)
—	<i>rpoB</i> sonda wild type 2 (<i>rpoB</i> WT2)
—	<i>rpoB</i> sonda wild type 3 (<i>rpoB</i> WT3)
—	<i>rpoB</i> sonda wild type 4 (<i>rpoB</i> WT4)
—	<i>rpoB</i> sonda wild type 5 (<i>rpoB</i> WT5)
—	<i>rpoB</i> sonda wild type 6 (<i>rpoB</i> WT6)
—	<i>rpoB</i> sonda wild type 7 (<i>rpoB</i> WT7)
—	<i>rpoB</i> sonda wild type 8 (<i>rpoB</i> WT8)
—	<i>rpoB</i> sonda de mutación 1 (<i>rpoB</i> MUT1)
—	<i>rpoB</i> sonda de mutación 2A (<i>rpoB</i> MUT2A)
—	<i>rpoB</i> sonda de mutación 2B (<i>rpoB</i> MUT2B)
—	<i>rpoB</i> sonda de mutación 3 (<i>rpoB</i> MUT3)
—	<i>katG</i> Locus Control (<i>katG</i>)
—	<i>katG</i> sonda wild type (<i>katG</i> WT)
—	<i>katG</i> sonda de mutación 1 (<i>katG</i> MUT1)
—	<i>katG</i> sonda de mutación 2 (<i>katG</i> MUT2)
—	<i>inhA</i> Locus Control (<i>inhA</i>)
—	<i>inhA</i> sonda wild type 1 (<i>inhA</i> WT1)
—	<i>inhA</i> sonda wild type 2 (<i>inhA</i> WT2)
—	<i>inhA</i> sonda de mutación 1 (<i>inhA</i> MUT1)
—	<i>inhA</i> sonda de mutación 2 (<i>inhA</i> MUT2)
—	<i>inhA</i> sonda de mutación 3A (<i>inhA</i> MUT3A)
—	<i>inhA</i> sonda de mutación 3B (<i>inhA</i> MUT3B)
—	marcador coloreado



Nota: La tira no se muestra a tamaño original.

Control de Conjugado (CC)

Debe aparecer una línea en esta zona, documentando la eficacia del conjugado unido y la reacción del sustrato.

Control de Amplificación (AC)

Cuando el ensayo se realiza correctamente, un amplicón control se unirá a la zona del Control de Amplificación. Solamente han de considerarse aquellas bandas cuyas intensidades sean tan fuertes, o más fuertes, que la intensidad de la zona de Control de Amplificación (AC).

En caso de un resultado positivo del ensayo, la señal del Control de Amplificación puede ser débil e incluso puede llegar a desaparecer completamente. Esto puede ser debido a reacciones de competencia durante la amplificación. En este caso, el ensayo se realizó correctamente y no tiene que ser repetido. Cuando solamente se desarrollan las bandas CC y AC, esto representa un resultado negativo válido. La ausencia de señal en la banda AC en caso de un ensayo negativo, indica errores durante la preparación y/o la realización de la amplificación o la presencia en la muestra de inhibidores de amplificación. En este caso, el resultado no es válido y el ensayo ha de ser repetido con la muestra respectiva. En caso de intensidades de señal fuertes en general pero con ausencia o tinción débil de la banda del Control de Amplificación, una banda wild type más débil que el resto de bandas wild type del mismo locus (o que la banda Locus Control del *katG*) debe considerarse negativa.

M. tuberculosis complex (TUB)

Esta zona híbrida con amplicones generados de todos los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Si la zona TUB es negativa y no se desarrolla ninguna banda de resistencia, la muestra ensayada no contiene bacterias que pertenecen al complejo *M. tuberculosis* y no puede ser evaluada mediante este sistema. En raras ocasiones, la banda TUB puede ser negativa y a la vez se puede desarrollar un patrón de resistencia. Si esto sucede, debe sospecharse la presencia de una cepa perteneciente al complejo *M. tuberculosis* y debe repetirse el ensayo. (ver "casos especiales" nº 3).

Locus Control (*rpoB*, *katG* e *inhA*)

Las zonas del Locus Control detectan una región del gen específica para cada respectivo locus. En caso de un resultado positivo (patrón de bandas evaluable para wildtype y mutaciones) del ensayo, la señal del Locus Control puede ser débil.

Sondas wild type

Las sondas wild type comprenden las áreas de resistencia más importantes de los genes respectivos (ver figura 1, tabla 1, 2 y 3). Cuando todas las sondas wild type de un gen son positivas, no se detectan mutaciones en las regiones examinadas. Esto indica que la cepa testada es sensible para el respectivo antibiótico. En caso de una mutación, el respectivo amplicón no puede unirse a la correspondiente sonda wild type. La ausencia de señal en al menos una de las sondas wild type indica, resistencia de la cepa testada al respectivo antibiótico.

Cada patrón que se desvíe del patrón wild type indica resistencia de la cepa testada. El patrón de bandas obtenido con las sondas *rpoB* permite dibujar una conclusión sobre la resistencia a rifampicina de las cepas testadas, el patrón de bandas obtenido con las sondas *katG* e *inhA* permite dibujar una conclusión sobre las resistencias a isoniazida de las cepas testadas.

Sondas de mutación

Las sondas de mutación detectan algunas de las resistencias más comunes mediadas por mutaciones (ver tabla 1, 2 y 3). Comparadas con otras muestras, las señales positivas de las sondas de mutación *rpoB* MUT2A y MUT2B pueden mostrar una señal más débil.

En raras ocasiones, cuando la banda *rpoB* MUT3 es positiva, una señal débil puede ser detectada en la banda *rpoB* WT8; ésta debe ser considerada como negativa.

Cada patrón que se desvíe del patrón del wild type indica resistencia de la cepa testada. El patrón de bandas obtenido con la sonda *rpoB* permite dibujar una conclusión sobre la resistencia a rifampicina de la cepa testada, el patrón de bandas de las sondas *katG* e *inhA* sobre la resistencia a isoniazida.

Por favor, note:

Solamente serán consideradas como positivas aquellas bandas cuya intensidad sea igual o mayor que la banda de Control de Amplificación.

No todas las bandas de una tira han de mostrar la misma intensidad.

Atención a los siguientes casos especiales:

1. Existe la posibilidad de que el espécimen testado contenga una cepa heteroresistente. En caso de una heteroresistencia, se pueden detectar, en una misma muestra, tanto una secuencia mutada, como una secuencia salvaje; por tanto pueden aparecer una de las sondas de mutación, así como la sonda wild type correspondiente. Si la respectiva resistencia se evidencia fenotípicamente o no, depende del ratio entre las secuencias mutadas y no mutadas en la muestra investigada.
2. Existe la posibilidad de que el espécimen testado contenga más de una cepa del complejo *M. tuberculosis* (debido a un cultivo mixto o una contaminación). Si, al menos, una de estas cepas contiene una mutación, una de las sondas de mutación, así como su correspondiente sonda wild type, pueden aparecer. Si la respectiva resistencia se evidencia fenotípicamente o no, depende del ratio entre las cepas mutadas y no mutadas en la muestra investigada.
3. Existe la posibilidad de una infección mixta en la cual la muestra contenga una cepa del complejo *M. tuberculosis* y una cepa no tuberculosa del género *Mycobacterium*. En raras ocasiones, la banda TUB puede no aparecer debido a la competencia durante la PCR. Sin embargo, cuando aparece un patrón de bandas evaluable de resistencia, se debe sospechar la presencia de una cepa perteneciente al complejo *M. tuberculosis* y debe repetirse el ensayo.
4. En raras ocasiones, todas las bandas de un locus génico (incluyendo la banda del Locus Control) pueden faltar por completo en una tira reactiva. Si este resultado se genera a partir de una muestra clínica, posibles razones pueden ser, pero sin limitarse a ellas, una concentración de DNA en la muestra por debajo del límite de detección o la presencia de sustancias interferentes en la muestra. Este patrón de bandas no puede ser evaluado y el ensayo ha de ser repetido.
Si una muestra cultivada genera un resultado con el locus *katG* faltando por completo, esto indica una resistencia a isoniácida (INH) de la cepa ensayada.

Regiones de resistencia y principales mutaciones responsables de resistencia

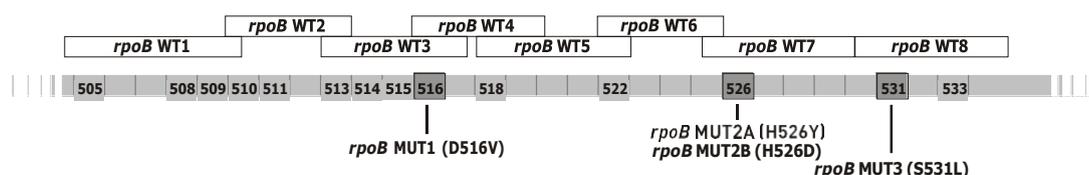


Figura 1: Regiones de resistencia a rifampicina del gen *rpoB*
rpoB WT1-8: sonda *rpoB* wild type; *rpoB* MUT1-3: sonda de mutación *rpoB*.

Los números especifican las posiciones de los aminoácidos (codones) para todas las mutaciones listadas en la tabla. Los codones que fueron designados para cada sonda de mutación están remarcados.

Tabla 1: Mutaciones en el gen *rpoB* y sus correspondientes bandas wild type y de mutación (modificado de acuerdo con [9])

Ausencia de banda wild type	Codón analizado	Desarrollo de banda de mutación	Mutación
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513		Q510H L511P*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A <i>rpoB</i> MUT2B	H526Y H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L S531Q* S531W L533P

* Estas mutaciones raras han sido detectadas sólo teóricamente (in silico).

Tabla 2: Mutaciones en el gen *katG* y sus correspondientes bandas wild type y de mutación.

Ausencia de banda wild type	Codón analizado	Desarrollo de banda de mutación	Mutación
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1 <i>katG</i> MUT2	S315T1 S315T2

MARISOL MASINO
BIOQUÍMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.
Director Técnico
Firma y Sello

Tabla 3: Mutaciones en la región promotora de *inhA* y sus correspondientes bandas wild type y de mutación.

Ausencia de banda wild type	Ácido nucleico analizado posición	Desarrollo de banda de mutación	Mutación
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C-15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A-16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T-8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T-8A



Director Técnico

Firma y Sello

Ejemplos de Evaluación

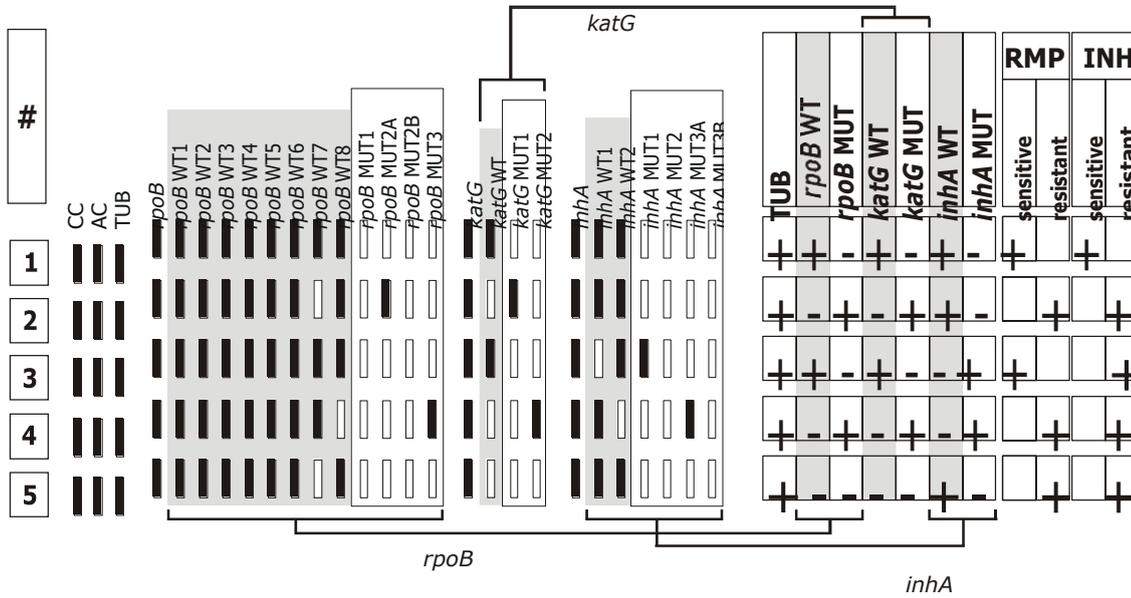


Figura 2: Ejemplos para modelos de bandedo y su evaluación con respecto a la resistencias a rifampicina y/o isoniazida

Si todas las bandas wild type muestran señal, este resultado es clasificado como positivo y marcaremos la columna de WT de los respectivos genes con el signo "+". Si al menos una de las bandas de wild type está ausente, este resultado es clasificado como negativo y marcaremos la columna de WT de los mismos genes con "-". Las columnas de mutación solamente se marcarán con un signo negativo cuando no aparezca ninguna de las bandas correspondientes a las mutaciones. Si al menos una de las bandas de mutación aparece positiva, este resultado se clasificará como positivo, y la columna MUT del respectivo gen se marcará con un "+".

Seguidamente se explican dos de los ejemplos arriba mostrados:

El **ejemplo 1** muestra el patrón de bandas del wild type. Todas las sondas de wild type muestran señal, pero ninguna de las sondas de mutación lo hace, por tanto, la tarjeta de evaluación muestra un "+" en las tres columnas del wild type y un "-" en las tres columnas de las mutaciones. De acuerdo a estos datos, las casillas "RMP sensitive" e "INH sensitive" se marcarán "+".

En el **ejemplo 5**, una de las sondas de *rpoB* y de *katG* wild type están ausentes; por tanto en las casillas de "rpoB WT" y "katG WT" se marcarán "-". Ya que ninguna de las sondas de mutación son positivas, estas casillas se marcarán también con "-". La región promotora de *inhA* no se desvía del patrón wild type. La cepa es evaluada como RMP e INH resistente.

Limitaciones

Cifñase estrictamente a los protocolos establecidos y procedimientos, para obtener resultados correctos y evitar contaminaciones.

La utilización de este ensayo está limitada a personas cualificadas, bien entrenadas en el procedimiento de utilización del ensayo y familiarizadas con métodos de biología molecular.

El test refleja los conocimientos actuales de Hain Lifescience.

Como en cualquier análisis basado en DNA, este test solamente analiza la secuencia de ácidos nucleicos y no la de aminoácidos. Es posible, por tanto, que mutaciones en la región de la sonda que no causan un cambio de aminoácido (mutaciones silenciosas) puedan producir la ausencia de una de las bandas wild type. En raras ocasiones se ha observado una mutación silenciosa en el codón 514 del gen *rpoB* que conduce a una ausencia de la banda *rpoB* WT3 [10]. Por tanto, si se detecta una mutación únicamente con ausencia de la banda *rpoB* WT3, se deben considerar los resultados de la determinación fenotípica de resistencia.

Además, han sido publicadas mutaciones adicionales dentro de las testadas en la región del gen *rpoB*, causantes de la resistencia a rifampicina [11]. Ya que estas mutaciones son muy raras, estas no fueron accesibles para la validación de este sistema y fueron solamente detectadas in silico.

El **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 solamente detecta aquellas resistencias que tienen sus orígenes en las regiones de *rpoB*, *katG* e *inhA* examinadas aquí. Resistencias que tienen sus orígenes en mutaciones en otros genes o regiones de genes, así como otras resistencias o mecanismos de resistencia rifampicina e isoniazida no serán detectados por este test.

Teóricamente, puede existir resistencia a pesar de que aparezca un modelo wild type. Si, en un ensayo, la muestra contiene una cepa que ha desarrollado una heteroresistencia y la resistencia es debida a una mutación no cubierta por las sondas, aparecerá el patrón de bandas de wild type. Del mismo modo, si la muestra contiene más de una cepa del complejo *M. tuberculosis* (debido a un cultivo mixto o una contaminación) y una de ellas alberga una mutación que no está cubierta por las sondas de mutación, aparecerá también el patrón de bandas de wild type.

Al igual que cualquier método de detección de DNA este sistema de ensayo detecta DNA tanto de bacterias viables como no viables. Por tanto, el ensayo no puede ser utilizado para monitorización de la progresión o el éxito del tratamiento de pacientes bajo terapia antibiótica.

El ensayo **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 genera resultados cualitativos. La intensidad de las bandas en una tira no informa acerca del número de células en una muestra positiva.

La presencia de múltiples especies de bacterias en la muestra a analizar puede dificultar la interpretación de resultados.

Los miembros del complejo MTB no pueden ser diferenciados.

El test sólo funciona dentro de los límites de las regiones genómicas para las que los primers y sondas han sido elegidos.

Como cualquier sistema de detección basado en la hibridación, este sistema contempla la posibilidad de que variaciones de las secuencias en las regiones genómicas que fueron elegidas para los primers y sondas, y la detección de regiones para las cuales el kit no fue diseñado, pueden conducir a resultados falsos. Debido a la gran variabilidad existente en los genomas bacterianos es posible que ciertos subtipos puedan no ser detectados.

La evaluación del rendimiento del ensayo fue realizada utilizando el kit **GenoLyse**® para extracción de DNA a partir de muestras clínicas pulmonares descontaminadas con baciloscopias positivas, muestras clínicas pulmonares con baciloscopias negativas y muestras de cultivo así como el **GXT** DNA/RNA Extraction Kit para extracción automatizada de DNA de muestras clínicas descontaminadas. Hasta la presente edición de las instrucciones, la realización del ensayo no ha sido validada con ningún otro método de extracción de DNA o otro tipo de muestras.

Los resultados de este ensayo sólo pueden interpretarse en conjunción con otros datos clínicos y de laboratorio adicionales, a disposición del facultativo responsable. Además, deben considerarse en ciertos casos los resultados de la determinación fenotípica de resistencias.

El usuario debe tener o adquirir información sobre el patrón de distribución de las mutaciones locales de los genes investigados con este test. Podría ser necesaria la confirmación de los resultados del ensayo a través de la determinación de la resistencia fenotípica.

Resolución de Problemas

Todas las señales son débiles o no hay señales (incluyendo la zona de Control de Conjugado)

- Temperatura ambiente demasiado baja o reactivos no equilibrados a temperatura ambiente.
- Se ha usado muy poco, o nada, de CON-C y/o SUB-C.

Debe repetirse la hibridación reversa.

Ausencia de señales, o señales débiles, excepto en la zona de Control de Conjugado

- La calidad del DNA extraído no permite una amplificación eficiente. Repita la extracción
- Las Mezclas de Amplificación (AM-A y AM-B) han sido mezcladas de manera inadecuada, invertidas o añadidas en c: nueva mezcla madre y repita la amplificación.
- Temperatura de incubación demasiado alta. Debe repetirse la hibridación reversa.

Tinción no homogénea

- Tiras no sumergidas por completo durante los pasos de incubación.

- Bandeja no agitada adecuadamente.
Debe repetirse la hibridación reversa.

Fuerte color de fondo

- CON-C y/o SUB-C se han usado demasiado concentrados.
- Los pasos de lavado no fueron realizados con el cuidado necesario.
- Soluciones de lavado demasiado frías.
Debe repetirse la hibridación reversa.

Resultado inesperado

- Temperatura de incubación incorrecta.
- El Tampón de Hibridación y/o la Solución de Lavado Astringente no se ha precalentado o mezclado adecuadamente.
- Contaminación de pocillos adyacentes debido a derrame durante la adición del Tampón de Hibridación.
Debe repetirse la hibridación reversa.
- Contaminación de DNA extraído con DNA extraído o amplificado previamente. Repita la extracción.
- Contaminación de los reactivos de amplificación. En este caso, el control negativo muestra bandas adicionales al CC y AC. Repita la amplificación usando nuevos reactivos.
- Dependiendo de la cantidad de DNA usado, y dependiendo de las condiciones específicas de la reacción, puede producirse un desarrollo fuerte y rápido del color. En tales casos interrumpa la incubación del sustrato tan pronto como las señales sean claramente visibles a fin de evitar bandas de hibridación cruzada.
- Cultivo no puro como material de partida. Vuelva a cultivarlo para eliminar la contaminación.
- Inadecuada toma de la muestra, almacenamiento, transporte o preparación de ésta. Solicite nueva muestra y repita el ensayo.
- Error durante la extracción de DNA. Repita la extracción.

Información para Pedidos

Hain Lifescience	Código nº
GenoType MTBDRplus VER 2.0 (kit para análisis de 12 muestras)	304A
GenoType MTBDRplus VER 2.0 (kit para análisis de 96 muestras)	30496A
GenoLyse® (kit de extracción manual de DNA para 12 muestras)	51612
GenoLyse® (kit de extracción manual de DNA para 96 muestras)	51610
GXT DNA/RNA Extraction Kit (kit de extracción automatizada de DNA/RNA para 96 muestras usando el GenoXtract®)	12.01.02
GenoXtract® (instrumento para extracción de ácidos nucleicos; capacidad de hasta 12 muestras)	8.31.01
Sarstedt, Nümbrecht, Alemania	Código nº
Microtubos de 0,5 ml con tapón de rosca	72.730.105
Microtubos de 1,5 ml con tapón de rosca	72.692.005



MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.

Director Técnico
Firma y Sello

Características de Rendimiento

Rendimiento Diagnóstico

Muestras clínicas pulmonares

Las características de rendimiento del diagnóstico del **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 se determinaron en un estudio [12] con 338 muestras (esputo, lavado broncoalveolar y aspirados pleurales) en comparación con el cultivo (cultivo exitoso en medio sólido Loewenstein-Jensen o en MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA) y posterior especiación utilizando el **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0) y las pruebas de susceptibilidad a medicamentos fenotípicos (DST). Además, las muestras se examinaron mediante microscopía. Los datos clínicos de los pacientes se incluyeron en la evaluación.

El sitio de estudio se ubicó en un país de alta carga de TB-MR. Se llevaron a cabo métodos de microscopía y cultivo in situ. Se enviaron alícuotas de las muestras de esputo descontaminadas por NALC a un segundo laboratorio para realizar la extracción de DNA y el **GenoType MTBDRplus** VER 2.0. Se realizó la extracción manual de DNA con el kit **GenoLyse**® (162 de las 338 muestras de esputo), la extracción automatizada de DNA se llevó a cabo en el **GenoXtract**® utilizando el **GXT** DNA/RNA Extraction Kit (176 de las 338 muestras de esputo) de acuerdo con las instrucciones de uso respectivas.

Un resultado positivo de **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 y positivo clínico congruente se definió ya sea mediante la positividad del cultivo y el **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 o cuando sólo **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 era positivo y el cultivo negativo, pero la tuberculosis se indicó mediante hallazgos anteriores basados en cultivos del paciente respectivo. Un resultado discrepante (**GenoType MTBDRplus** VER 2.0 positivo y cultivo negativo) no excluye en todos los casos una infección de tuberculosis en el paciente, ya que, en el caso de algunos pacientes, no estaban disponibles los historiales de una infección probable de tuberculosis.

Tabla 1: Características de rendimiento del **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 para la detección de MTBC a partir de muestras clínicas pulmonares en comparación con los hallazgos del cultivo/ **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0 (GT Myco CM) y clínicos

			Baciloscopia positiva		Sens: 100% Spec: /* PPV: 100% NPV: /*	Baciloscopia negativa		Sens: 80,3% Spec: 98,4% PPV: 98,0% NPV: 83,3%	
			Hallazgos del cultivo/GT Myco CM y clínicos			Hallazgos del cultivo/GT Myco CM y clínicos			
			Positivo	Negativo		Positivo	Negativo		
GenoLyse ®	GenoType MTBDRplus VER 2.0	Positivo	39	0		Positivo	49	1	
		Negativo	0	1		Negativo	12	60	
			Hallazgos del cultivo/GT Myco CM y clínicos		Sens: 97,5% Spec: /* PPV: 97,5% NPV: /*	Hallazgos del cultivo/GT Myco CM y clínicos		Sens: 78,3% Spec: 96,0% PPV: 94,0% NPV: 84,7%	
GXT	GenoType MTBDRplus VER 2.0	Positivo	39	1		Positivo	47	3	
		Negativo	1	0		Negativo	13	72	

Sens, sensibilidad diagnóstica; Spec, especificidad diagnóstica; PPV, valor predictivo positivo; NPV, valor predictivo negativo

* ningún valor debido al bajo número de muestras

Para la evaluación de la detección de resistencia, se utilizaron las 156 muestras (78 cepas de **GenoLyse**® y 78 cepas de **GXT**) que fueron positivas en MTBC tanto en cultivo como en **GenoType MTBDRplus** VER 2.0.

Tabla 2: Características de rendimiento del **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 para la detección de resistencia de RMP de muestras clínicas pulmonares en comparación con cultivos/DST

			Baciloscopia positiva		Sens: 100% Spec: 92,3% PPV: 96,2% NPV: 100%	Baciloscopia negativa		Sens: 96,0% Spec: 93,3% PPV: 96,0% NPV: 93,3%	
			Cultivos/DST			Cultivos/DST			
			RMP-R	RMP-S		RMP-R	RMP-S		
GenoLyse ®	GenoType MTBDRplus VER 2.0	RMP-R	25	1		RMP-R	24	1	
		RMP-S	0	12		RMP-S	1	14	
			Cultivos/DST		Sens: 96,3% Spec: 100% PPV: 100% NPV: 92,3%	Cultivos/DST		Sens: 86,2% Spec: 100% PPV: 100% NPV: 71,4%	
GXT	GenoType MTBDRplus VER 2.0	RMP-R	26	0		RMP-R	25	0	
		RMP-S	1	12		RMP-S	4	10	

Sens, sensibilidad diagnóstica; Spec, especificidad diagnóstica; PPV, valor predictivo positivo; NPV, valor predictivo negativo;

RMP-R, resistente a la rifampicina; RMP-S, susceptible a la rifampicina

Tabla 3: Características de rendimiento del **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 para la detección de resistencia de INH de muestras clínicas pulmonares en comparación con cultivos/DST

			Baciloscopia positiva		Sens: 96,7% Spec: 87,5% PPV: 96,7% NPV: 87,5%	Baciloscopia negativa		Sens: 96,7% Spec: 90,0% PPV: 96,6% NPV: 90,0%	
			Cultivos/DST			Cultivos/DST			
			INH-R	INH-S		INH-R	INH-S		
GenoLyse ®	GenoType MTBDRplus VER 2.0	INH-R	29	1		INH-R	29	1	
		INH-S	1	7		INH-S	1	9	
			Cultivos/DST		Sens: 100% Spec: 100% PPV: 100% NPV: 100%	Cultivos/DST		Sens: 90,6% Spec: 71,4% PPV: 93,5% NPV: 62,5%	
GXT	GenoType MTBDRplus VER 2.0	INH-R	28	0		INH-R	29	2	
		INH-S	0	11		INH-S	3	5	

Sens, sensibilidad diagnóstica; Spec, especificidad diagnóstica; PPV, valor predictivo positivo; NPV, valor predictivo negativo;

INH-R, resistente a la isoniazida; INH-S, susceptible a la isoniazida

Muestras cultivadas

Las características de rendimiento de diagnóstico del **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 se determinaron en un estudio con 74 muestras cultivadas comparadas con **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0 y pruebas de susceptibilidad a medicamentos fenotípicos (DST). El sitio de estudio se ubicó en un país de baja carga de TB-MR. La extracción manual de DNA se realizó utilizando el kit **GenoLyse®** de acuerdo con las instrucciones de uso. De 74 cultivos, 49 fueron positivos para complejo de *M. tuberculosis* (MTBC) y 25 cultivos mostraron crecimiento de micobacterias no tuberculosas. Por lo tanto, para la detección de resistencia en material cultivado había 49 cepas disponibles.

Tabla 4: Características de rendimiento del **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 para la detección de MTBC de muestras cultivadas en comparación con cultivos/**GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0 (GT Myco CM)

GenoType MTBDRplus VER 2.0	Cultivos/GT Myco CM		Sens: 100% Spec: 100% PPV: 100% NPV: 100%
	Positivo	Negativo	
	Positivo	49	
Negativo	0	25	

Sens, sensibilidad diagnóstica; Spec, especificidad diagnóstica; PPV, valor predictivo positivo; NPV, valor predictivo negativo

Tabla 5: Características de rendimiento del **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 para la detección de resistencia de RMP de muestras cultivadas en comparación con cultivos/DST

GenoType MTBDRplus VER 2.0	Cultivos/DST		Sens: /* Spec: 100% PPV: /* NPV: 100%
	RMP-R	RMP-S	
	RMP-R	0	
RMP-S	0	49	

Sens, sensibilidad diagnóstica; Spec, especificidad diagnóstica; PPV, valor predictivo positivo; NPV, valor predictivo negativo; RMP-R, resistente a la rifampicina; RMP-S, susceptible a la rifampicina

* ningún valor debido al bajo número de muestras

Tabla 6: Características de rendimiento del **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 para la detección de resistencia de INH de muestras cultivadas en comparación con cultivos/DST

GenoType MTBDRplus VER 2.0	Cultivos/DST		Sens: /* Spec: 100% PPV: /* NPV: 100%
	INH-R	INH-S	
	INH-R	3	
INH-S	0	46	

Sens, sensibilidad diagnóstica; Spec, especificidad diagnóstica; PPV, valor predictivo positivo; NPV, valor predictivo negativo; INH-R, resistente a la isoniazida; INH-S, susceptible a la isoniazida

* ningún valor debido al bajo número de muestras



Director Técnico
Firma y Sello

Rendimiento analítico

Especificidad analítica

La especificidad de esta prueba está garantizada por el diseño preciso de los primers y sondas específicas que tiene en consideración, entre otras cosas, las comparaciones homológicas de las secuencias publicadas en bases de datos genéticas, y mediante las estrictas condiciones de reacción. La especificidad analítica se determinó con 61 cepas de DNA, que incluían las siguientes cepas MTBC: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, and *M. pinnipedii* (todas sensibles a RMP e INH). Se analizaron las siguientes cepas no detectables con el sistema de ensayo: *Actinomyces naeslundii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *C. bovis*, *C. durum*, *Escherichia coli*, *Gordona rubropertinctus*, *Klebsiella oxytoca*, *Mycobacterium abscessus*, *M. alvei*, *M. asiaticum*, *M. avium*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. chimaera*, *M. fortuitum* (2 sequevars), *M. frederiksbergense*, *M. gastri*, *M. genavense*, *M. goodii*, *M. gordonae*, *M. heckeshornense*, *M. immunogenum*, *M. interjectum*, *M. intermedium*, *M. intracellulare*, *M. lentiflavum*, *M. marinum*, *M. mucogenicum*, *M. palustre*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. szulgai*, *M. triplex*, *M. ulcerans*, *M. xenopi*, MRSA, *Nocardia abscessus*, *N. africana*, *N. amarae*, *N. asteroides*, *N. farcinica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Rhodococcus erythropolis*, *Saccharomonospora glauca*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Tsukamurella inchonensis*, *T. pulmonis*.

Las seis cepas de MTBC se identificaron correctamente como cepas MTBC sensibles a RMP e INH. Las otras 55 cepas no mostraron banda TUB ni patrón evaluable de bandas para resistencias a RMP e INH. Por lo tanto, se logró una especificidad analítica del 100%.

Sensibilidad analítica (límite de detección, LOD)

Para la determinación de la sensibilidad analítica del **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 para muestras clínicas, se diluyeron diez cultivos paralelos de BCG y se mezclaron con muestras de esputo negativas en MTBC (concentraciones finales en muestras de esputo: 1000, 500, 160 y 100 CFU/ml). Incluyendo un control negativo, el DNA se extrajo una vez usando el kit **GenoLyse®** y una vez usando el **GXT DNA/RNA Extraction Kit**, y se analizó con el **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 aplicando el protocolo PCR "MDR DIR". Se determinó un límite de detección de 160 CFU/ml con ambos métodos de extracción.

Para la determinación de la sensibilidad analítica del **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 en muestras de cultivo, se establecieron por triplicado cuatro cultivos BCG (sensibles a RMP e INH, $1,6 \times 10^4$, $1,6 \times 10^3$, $1,6 \times 10^2$ y 100 CFU/ml). Incluyendo un control negativo, el DNA se extrajo usando el kit **GenoLyse®** kit y se analizó con el **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 aplicando el protocolo PCR "MDR CUL". Se determinó un límite de detección de $1,6 \times 10^4$ CFU/ml.

Reproducibilidad

A fin de determinar la precisión intraensayo del **GenoType MTBDRplus** VER 2.0, se establecieron dos cultivos de BCG (sensibles a RMP e INH, 1,500 y 150 CFU/ml) y un cultivo de *M. avium* (10,000 CFU/ml) en triplicado y se introdujeron en muestras de esputo negativas. Estas muestras y un control negativo se analizaron con el **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 en condiciones idénticas, aplicando el protocolo PCR "MDR DIR". La extracción de DNA se realizó una vez utilizando el kit **GenoLyse®** y una vez utilizando el **GXT DNA/RNA Extraction Kit**. Todos los paralelos mostraron patrones de bandas idénticos y correctos, e intensidades de señal comparables. Además, eran comparables las intensidades de la señal entre los dos métodos de extracción de DNA y entre las diferentes diluciones de las mismas muestras. Por lo tanto, se logró una precisión intraensayo del 100%.

A fin de determinar la precisión interensayo del **GenoType MTBDRplus** VER 2.0, se establecieron dos cultivos de BCG (sensibles a RMP e INH, 1,500 y 150 CFU/ml) y un cultivo de *M. avium* (10,000 CFU/ml) en triplicado y se mezclaron con muestras de esputo negativas. Estas muestras y un control negativo se analizaron en nueve ciclos: en tres días diferentes, utilizando tres conjuntos diferentes de instrumentos, y llevadas a cabo por tres operadores diferentes. La extracción de DNA se realizó una vez utilizando el kit **GenoLyse®** y una vez utilizando el **GXT** DNA/RNA Extraction Kit. El protocolo PCR "MDR DIR" se aplicó para el PCR. Aparte del parámetro variado, todas las demás condiciones de prueba fueron idénticas. No se detectaron desviaciones entre muestras paralelas, es decir, los patrones de bandas entre ciclos fueron idénticos y correctos, y las intensidades de señal fueron comparables. Además, las intensidades de la señal fueron comparables entre diferentes métodos de extracción de DNA y diferentes concentraciones bacterianas. Por lo tanto, la precisión interensayo fue del 100%.

Sustancias interferentes

Las sustancias que interfieren también pueden transferirse del material de la muestra. Por lo tanto, las sustancias indicadas en el cuadro 7 se analizaron a fin de evaluar una posible interferencia del **GenoType MTBDRplus** VER 2.0, se cultivaron 6 muestras diferentes de complejo de *M. tuberculosis* (4 resistentes a RMP e INH, 2 sensibles a RMP e INH) en 4 medios diferentes (medios sólidos: Loewenstein-Jensen, Stonebrink y Middlebrook-7H10, medio líquido: MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)). Se extrajo DNA de las muestras del cultivo utilizando el kit **GenoLyse®** DNA y luego se analizó con el **GenoType MTBDRplus** VER 2.0.

Todas las muestras complejas de *M. tuberculosis* mostraron los mismos resultados correctos. Por tanto, se puede excluir que los medios probados importen inhibidores a la prueba **GenoType MTBDRplus** VER 2.0.

Las sustancias que interfieren también pueden transferirse del material de la muestra. Por lo tanto, las sustancias indicadas en el tabla 7 se analizaron a fin de evaluar una posible interferencia del **GenoType MTBDRplus** VER 2.0. Las diluciones definidas de cultivos de BCG por encima del límite de detección y en él, se mezclaron con varias cantidades de los inhibidores potenciales. A partir de todas las muestras, se realizó la extracción de DNA utilizando el kit **GenoLyse®**. A continuación, las diluciones del cultivo se analizaron con el **GenoType MTBDRplus** VER 2.0.

Tabla 7: Posibles interferentes probados del **GenoType MTBDRplus** VER 2.0

Sustancia/clase	Descripción/ingrediente activo	Concentraciones de las pruebas
Medicamentos antialérgicos	Aceite de árbol del té	0,008 % v/v a 0,5 % v/v
Anestésicos (intubación endotraqueal)	Lidocaína HCl 4%	20% v/v; 30% v/v
Anestésicos (orales)	Benzocaína 20%	5% p/v
Antibióticos (ungüento nasal)	Mupirocina	1,2 mg/ml; 2,4 mg/ml
Antibióticos (sistémicos)	Amoxicilina	2,2 µg/ml
Medicamentos contra la tuberculosis	Isoniazida 1 mg/ml	50 µg/ml
Medicamentos contra la tuberculosis	Rifampicina 1 mg/ml	25 µg/ml
Medicamentos contra la tuberculosis	Pyrazinamide 10 mg/ml	100 µg/ml
Medicamentos contra la tuberculosis	Ethambutol 1 mg/ml	5 µg/ml; 50 µg/ml
Medicamentos contra la tuberculosis	Estreptomina 1 mg/ml	25 µg/ml
Medicamentos antivirales	Zanamivir	800 µg/ml
Sangre	Sangre entera	0,2% v/v a 5% v/v
Sangre	Hemoglobina	0,05% v/v a 0,3% v/v
Broncodilatadores	Teofilina	222 pmol/ml
DNA (humano)		10 µg/ml
Expectorantes (orales)	Guaifenesina 400 mg/pastilla	2,5 mg/ml; 5 mg/ml
Ácido gástrico	0,5% HCl, 0,1 M KCl, 0,1 M NaCl, pH 1-2	5% v/v
Vacuna antigripal como aerosol nasal (FluMist®)	Vacuna antigripal viva atenuada	5% v/v
Broncodilatadores inhalados	Sulfato de salbutamol 2,5 mg/3 ml	50 µg/ml; 100 µg/ml
Soluciones de enjuague bucal/gárgaras	Listerine (eucalyptol 0,029%, mentol 0,042%, metil salicilato 0,06%, timol 0,064%, alcohol desnaturalizado 20%)	20% v/v
Mucina: glándula submaxilar bovina, tipo I-S	Proteína de mucina purificada 5% p/v	1,5% p/v; 5% p/v
Corticosteroides nasales	Dexametasona	1,52 pmol/ml
Gel nasal (homeopático)	Azufre	5% p/v
Aerosoles o gotas nasales	Fenilefrina 0,5%	25% v/v; 100% v/v
Soluciones para nebulización (solución salina hipertónica)	NaCl	3% p/v; 5% p/v
Salino fisiológico	NaCl (0,9%)	0,9% p/v
Medicamentos para <i>Pneumocystis jiroveci</i>	Pentamidina	300 ng/ml
Pus		0,2% v/v to 5% v/v
Reactivos de procesamiento de muestras	NALC-NaOH (N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sodio)	0,5% v/v; 1% v/v
Tabaco	Nicogel (40% extracto de tabaco)	0,5% p/v

Se observó inhibición del **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 (resultado no válido de la prueba) en presencia de las siguientes sustancias en las concentraciones que se indican: sangre entera al 0,6%, hemoglobina al 0,1%, pus al 2%, lidocaína al 30%, mupirocina al 2,4 mg/ml, aceite de árbol del té al 0,5% y guaifenesina al 5 mg/ml.

Estabilidad

Vida de anaquel del kit de prueba cuando se almacena según lo recomendado: ver la etiqueta de la caja.

La estabilidad se determina según DIN EN ISO 23640.



Director Técnico

Firma y Sello

Referencias

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. WHO/CDS/TB/2018.20. World Health Organization, Geneva, Switzerland 2018.
2. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13: 1320-1330.
3. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th edition. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 2009.
4. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards), USA, Document M29 (please refer to the latest version).
5. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 1985.
6. Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA 1992.
7. Richter E, Beer J, Diel R, Hillemann D, Hoffmann H, Klotz M, Mauch H, Rüsç-Gerdes S. MiQ 5, Tuberkulose, Mykobakteriose. In: Podbielski A, Herrmann M, Kniehl E, Mauch H, Rüssmann H (eds): Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards. Elsevier, Munich, Germany 2010.
8. DIN, Deutsches Institut für Normung e.V. (ed). DIN 58943-4:2009-02: Medical microbiology - Diagnosis of tuberculosis - Part 4: Primary samples for the diagnosis of tuberculosis and mycobacteria – Qualitative and quantitative requirements, extraction, transport and storage. Beuth, Berlin, Germany 2009.
9. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993, 341: 647-650.
10. Alonso M, Palacios JJ, Herranz M, Penedo A, Menéndez A, Bouza E, García de Viedma D. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2688-2690.
11. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 496-514.
12. Crudu V, Stratan E, Romancenco E, Allerheiligen V, Hillemann A, Moraru N. First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as RMP and INH resistances. *J Clin Microbiol* 2012; Epub ahead of print, doi:10.1128/JCM.05903-11.

Cambios Importantes en IFU-304A-09

Capítulo	Cambio
Reactivos e Instrumentos,	Debe evitarse las congelaciones y descongelaciones repetidas (>4x) de los componentes del kit.
Información para Pedidos	Si es necesario, alícuota de reactivos usando tubos con tapón de rosca adecuados.
Evaluación e Interpretación de Resultados	Nuevo: "En caso de intensidades de señal fuertes en general pero con ausencia o tinción débil de la banda del Control de Amplificación, una banda wild type más débil que el resto de bandas wild type del mismo locus (o que la banda Locus Control del <i>katG</i>) debe considerarse negativa."

MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.

Director Técnico

Firma y Sello


MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.
Director Técnico
Firma y Sello

CE **IVD**



Hain Lifescience GmbH

Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany
www.hain-lifescience.de, +49 (0) 74 73- 94 51- 0

PROYECTO DE RÓTULOS EXTERNOS - GenoType MTBDRplus VER 2.0

12 reacciones	96 reacciones
<div style="text-align: center;">  <p>GenoType MTBDRplus VER 2.0</p> <p>for identification of the <i>M. tuberculosis</i> complex and its resistance to rifampicin and isoniazid from clinical specimens or cultivated samples</p> </div> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> <p>Store Kit Component 2 (included in box) immediately upon receipt at -20°C</p> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>REF 304A</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>1/2 2°C ↘ 8°C</p> <p>2/2 -20°C ↘ -18°C</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;"> <p>GenoType MTBDRplus VER 2.0</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>1/2 2°C ↘ 8°C</p> <p>2/2 -20°C ↘ -18°C</p> </div> </div> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> <p>Store Kit Component 2 (included in box) immediately upon receipt at -20°C</p> </div> <div style="font-size: small; margin-top: 20px;"> <p>Hain Lifescience GmbH Hardwiesenstr. 1 72147 Nehren Germany www.hain-lifescience.de E-Mail: info@hain-lifescience.de Tel.: +49 (0) 74 73- 94 51- 0</p> </div>	<div style="text-align: center;">  <p>GenoType MTBDRplus VER 2.0</p> <p>for identification of the <i>M. tuberculosis</i> complex and its resistance to rifampicin and isoniazid from clinical specimens or cultivated samples</p> </div> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> <p>Store Kit Component 2 (included in box) immediately upon receipt at -20°C</p> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>REF 30496A</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>1/2 2°C ↘ 8°C</p> <p>2/2 -20°C ↘ -18°C</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;"> <p>GenoType MTBDRplus VER 2.0</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>1/2 2°C ↘ 8°C</p> <p>2/2 -20°C ↘ -18°C</p> </div> </div> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> <p>Store Kit Component 2 (included in box) immediately upon receipt at -20°C</p> </div> <div style="font-size: small; margin-top: 20px;"> <p>Hain Lifescience GmbH Hardwiesenstr. 1 72147 Nehren Germany www.hain-lifescience.de E-Mail: info@hain-lifescience.de Tel.: +49 (0) 74 73- 94 51- 0</p> </div>


MARISOL MASINO
 BIOQUÍMICA | M.N. 9483
 DT - TECNOLAB S.A.
 Director Técnico
 Firma y Sello

12 reacciones

96 reacciones

GenoType MTBDRplus VER 2.0 IVD HAIN LIFESCIENCE

LOT OUxxxxxx YYYY-MM-DD YYYY-MM-DD

1/2 12 STRIPS Membrane strips, Membranestreifen, bandelettes, strisce di membrana, tira de membranas, tira de membranas, packi membranowe

240 µl DEN Denaturation solution, Denaturierungsreagenz, solution de dénaturation, soluzione di denaturazione, solución de denaturalización, solução de denaturação, roztwór denaturacyjny

12 ml HYB Hybridization buffer, Hybridisierungspuffer, solution d'hybridation, tampone di ibridazione, tampón de hibridación, buffer hybridacyjny

12 ml STR Stringent wash solution, Stringent-Waschlösung, solution de lavage stringent, soluzione di lavaggio stringente, solución de lavado stringent, solução de lavagem stringent, roztwór płuczacy stringent

36 ml RIN Rinse solution, Rinse-Lösung, solution de rinçage, soluzione di risciacquo, solución de aclarado, solução rinse, roztwór płuczacy

120 µl CON-C Conjugate concentrate, Konjugat-Konzentrat, conjugate concentré, conjugato concentrato, conjugata concentrata, stężony konjugat

12 ml CON-D Conjugate buffer, Konjugat-Puffer, tampon conjugat, tampone di diluizione del conjugato, tampón del conjugado, buffer konjugat

120 µl SUB-C Substrate concentrate, Substrat-Konzentrat, substrat concentré, substrato concentrato, sustrato concentrado, substrato concentrado, stężony substrat

12 ml SUB-D Substrate buffer, Substrat-Puffer, tampon substrat, tampone di diluizione del substrato, tampón del sustrato, buffer substrat

2/2 120 µl AM-A Amplification mix A, Amplifikations-Mix A, mélange d'amplification A, mix di amplificazione A, mezcla de amplificación A, mistura de amplificação A, mieszanina de amplifikacji A

420 µl AM-B Amplification mix B, Amplifikations-Mix B, mélange d'amplification B, mix di amplificazione B, mezcla de amplificación B, mistura de amplificação B, mieszanina de amplifikacji B

GenoType MTBDRplus VER 2.0 IVD HAIN LIFESCIENCE

LOT OVxxxxxx YYYY-MM-DD YYYY-MM-DD

1/2 96 STRIPS Membrane strips, Membranestreifen, bandelettes, strisce di membrana, tira de membranas, tira de membranas, packi membranowe

1.92 ml DEN Denaturation solution, Denaturierungsreagenz, solution de dénaturation, soluzione di denaturazione, solución de denaturalización, solução de denaturação, roztwór denaturacyjny

96 ml HYB Hybridization buffer, Hybridisierungspuffer, solution d'hybridation, tampone di ibridazione, tampón de hibridación, buffer hybridacyjny

96 ml STR Stringent wash solution, Stringent-Waschlösung, solution de lavage stringent, soluzione di lavaggio stringente, solución de lavado stringent, solução de lavagem stringent, roztwór płuczacy stringent

288 ml RIN Rinse solution, Rinse-Lösung, solution de rinçage, soluzione di risciacquo, solución de aclarado, solução rinse, roztwór płuczacy

960 µl CON-C Conjugate concentrate, Konjugat-Konzentrat, conjugate concentré, conjugato concentrato, conjugata concentrata, stężony konjugat

96 ml CON-D Conjugate buffer, Konjugat-Puffer, tampon conjugat, tampone di diluizione del conjugato, tampón del conjugado, buffer konjugat

960 µl SUB-C Substrate concentrate, Substrat-Konzentrat, substrat concentré, substrato concentrato, sustrato concentrado, substrato concentrado, stężony substrat

96 ml SUB-D Substrate buffer, Substrat-Puffer, tampon substrat, tampone di diluizione del substrato, tampón del sustrato, buffer substrat

2/2 960 µl AM-A Amplification mix A, Amplifikations-Mix A, mélange d'amplification A, mix di amplificazione A, mezcla de amplificación A, mistura de amplificação A, mieszanina de amplifikacji A

3.36 ml AM-B Amplification mix B, Amplifikations-Mix B, mélange d'amplification B, mix di amplificazione B, mezcla de amplificación B, mistura de amplificação B, mieszanina de amplifikacji B

CE GenoType MTBDRplus VER 2.0 HAIN LIFESCIENCE

LOT OUxxxxxx YYYY-MM -20°C -16°C IVD Σ 12

2/2 120 µl AM-A Amplification mix A, Amplifikations-Mix A, mélange d'amplification A, mix di amplificazione A, mezcla de amplificación A, mistura de amplificação A, mieszanina de amplifikacji A

420 µl AM-B Amplification mix B, Amplifikations-Mix B, mélange d'amplification B, mix di amplificazione B, mezcla de amplificación B, mistura de amplificação B, mieszanina de amplifikacji B

CE GenoType MTBDRplus VER 2.0 HAIN LIFESCIENCE

LOT OVxxxxxx YYYY-MM -20°C -16°C IVD Σ 96

2/2 960 µl AM-A Amplification mix A, Amplifikations-Mix A, mélange d'amplification A, mix di amplificazione A, mezcla de amplificación A, mistura de amplificação A, mieszanina de amplifikacji A

3.36 ml AM-B Amplification mix B, Amplifikations-Mix B, mélange d'amplification B, mix di amplificazione B, mezcla de amplificación B, mistura de amplificação B, mieszanina de amplifikacji B

IFU-304A-08

Valid edition of the instructions for use (IFU): see above
If you do not have this edition, you can obtain it from our website or by calling (see below).

Geltende Ausgabe der Arbeitsanleitung (instructions for use, IFU): siehe oben
Wenn Ihnen diese Ausgabe nicht vorliegt, können Sie sie über unsere Website oder durch einen Anruf beziehen (siehe unten).

Dernière version de la notice d'utilisation (instructions for use, IFU) : voir ci-dessus
Si vous ne disposez pas de cette version, vous pouvez la télécharger sur notre site ou nous contacter (voir ci-dessous).

Edizione valida delle istruzioni per l'uso (instructions for use, IFU): vedi sopra
Se non possiedi questa edizione, puoi ottenerla dal nostro sito web oppure telefonando (vedi sotto).

Edición válida de las instrucciones de uso (instructions for use, IFU): ver arriba
Si no posee esta edición, puede obtenerla en nuestra página web o llamando (ver abajo).

Edição válida das instruções de uso (instructions for use, IFU): ver acima
Se você não tem esta edição, pode obtê-la a partir do nosso site ou telefonar (ver abaixo).

Obowiązująca wersja ulotki (instructions for use, IFU): patrz powyżej
W razie nieposiadania tej wersji można uzyskać ją z naszej strony internetowej lub po kontakcie telefonicznym (patrz poniżej).



www.hain-lifescience.de/ifu.html | +49 (0) 74 73- 94 51- 0



DEN: Warning/Achtung/Attention/Attenzione/Atención/Atenção/Uwaga
contains/enthält/contient/contiene/contém/zawiera: <2% NaOH
H315-319, P280-305+351+338-313

HYB, SUB-C: EUH210

002813
Hain Lifescience GmbH | Hardwiesenstr. 1 | 72147 Nehren | Germany | Tel.: +49 (0) 74 73- 94 51- 0

IMPORTADOR: TECNOLAB S.A. Estomba Nº 964 - c1427cco.
C.A.B.A. Argentina. Teléfono: 54-11- 4-555-0010.

DIRECTOR TECNICO: Bioq. Marisol Masino.

ORIGEN DE ELABORACIÓN: Hain Lifescience GmbH.
Hardwiesenstr 1. 72147 Nehren. Alemania.

APROBADO POR A.N.M.A.T.

CON PM: 1252-164



MARISOL MASINO
BIOQUIMICA - M.N. 9483
DT - TECNOLAB S.A.

Director Técnico
Firma y Sello

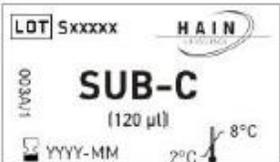
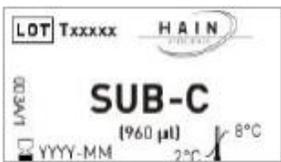
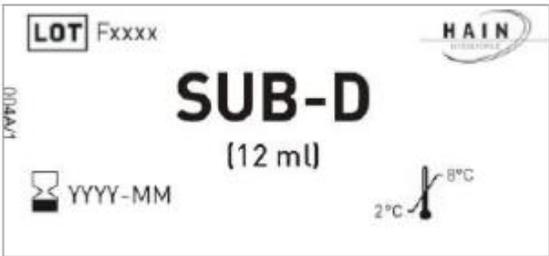
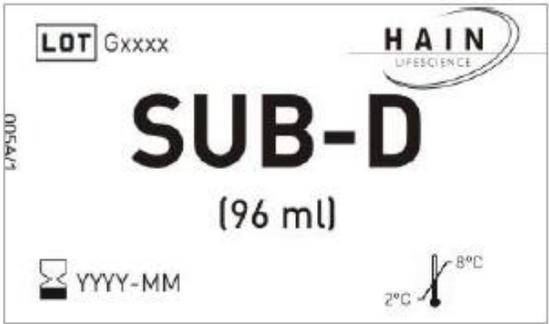
PROYECTO DE RÓTULOS INTERNOS - GenoType MTBDRplus VER 2.0

Etiquetas de los viales de mezcla de amplificación (kit N° 2)	
12 reacciones	96 reacciones

Etiquetas de los tubos con las tiras de membrana (kit N° 1)	
12 reacciones	96 reacciones

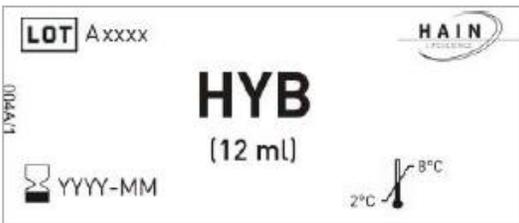
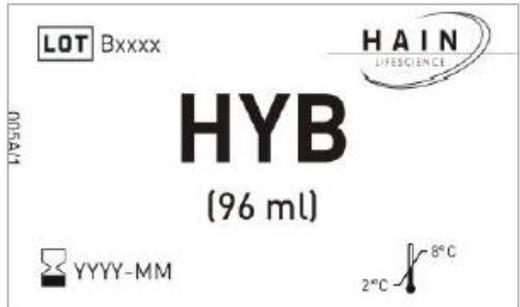
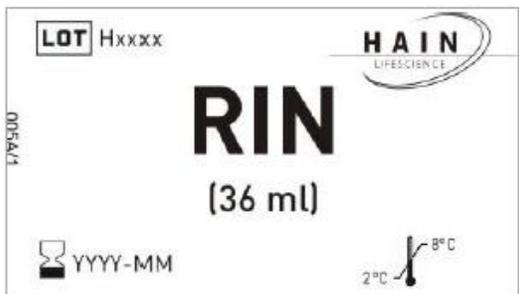
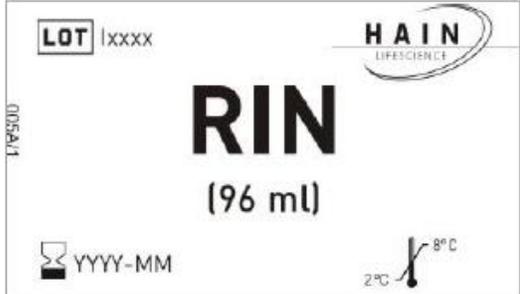
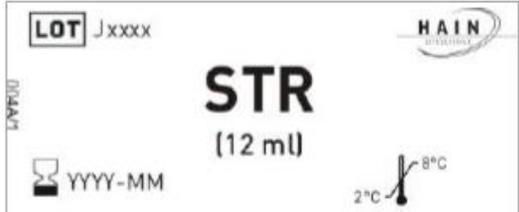
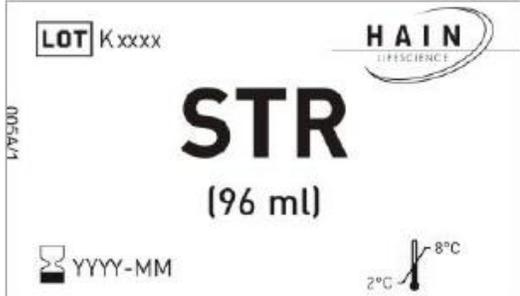

MARISOL MASINO
 BIOQUIMICA - M.N. 9483
 DT - TECNOLAB S.A.

 Director Técnico
 Firma y Sello

Etiquetas de las botellas con soluciones de hibridación (kit N° 1)	
12 reacciones	96 reacciones
	
	
	


MARISOL MASINO
 BIOQUIMICA M.N. 9483
 DT - TECNOLAB S.A.

 Director Técnico
 Firma y Sello

12 reacciones	96 reacciones
 <p>HYB (12 ml)</p>	 <p>HYB (96 ml)</p>
 <p>RIN (36 ml)</p>	 <p>RIN (96 ml)</p>
 <p>STR (12 ml)</p>	 <p>STR (96 ml)</p>
 <p>CON-C (120 µl)</p>	 <p>CON-C (960 µl)</p>
 <p>CON-D (12 ml)</p>	 <p>CON-D (96 ml)</p>



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Hoja Adicional de Firmas
Informe gráfico

Número:

Referencia: Rótulos y manuales PM 1252-164

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 23 pagina/s.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2022.02.07 13:24:19 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2022.02.07 13:24:20 -03:00