



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Disposición

Número:

Referencia: 1-0047-3110-000649-24-5

VISTO el Expediente N° 1-0047-3110-000649-24-5 del Registro de esta Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), y:

CONSIDERANDO:

Que por las presentes actuaciones BioSystems S.A. solicita se autorice la inscripción en el Registro Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de esta Administración Nacional, de un nuevo/s Producto/s Médico/s para diagnóstico in vitro, denominado: Nombre descriptivo: Allplex™ Entero-DR Assay.

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico in vitro que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización .

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 y normas complementarias.

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

Que corresponde autorizar la inscripción en el RPPTM del producto médico objeto de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 y sus modificatorias.

Por ello;

LA ADMINISTRADORA NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL
DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- 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, Nombre descriptivo: Allplex™ Entero-DR Assay, de acuerdo con lo solicitado por BioSystems S.A. con los Datos Característicos que figuran al pie de la presente.

ARTÍCULO 2º.- Autorízanse los textos de los proyectos de rótulo/s y de instrucciones de uso que obran en documento N° IF-2024-37893838-APN-DVPCYAR#ANMAT..

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda "Autorizado por la ANMAT PM 626-213 ", con exclusión de toda otra leyenda no contemplada en la normativa vigente.

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

ARTÍCULO 5º.- La vigencia del Certificado de Autorización será de cinco (5) años, a partir de la fecha de la presente disposición.

ARTÍCULO 6º.- Regístrese. Inscríbase 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 uso autorizados y el Certificado mencionado en el artículo 4º. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

Nombre descriptivo: Allplex™ Entero-DR Assay

Marca comercial: Seegene

Modelos:

- 1) Allplex™ Entero-DR Assay (CR10384Z) x 25 determinaciones.
- 2) Allplex™ Entero-DR Assay (CR9700X) x 100 determinaciones.

Indicación/es de uso:

Allplex™ Entero-DR Assay es una prueba de diagnóstico cualitativa in vitro que utiliza la reacción en cadena de la polimerasa múltiplex en tiempo real (múltiplex PCR en tiempo real).

Esta prueba permite la detección única o múltiple de genes carbapenemasas (NDM, KPC, OXA-48, VIM, IMP), gen (CTX-M) de Beta-Lactamasa de espectro extendido (ESBL) y genes de resistencia a la vancomicina (VanA, VanB) en hisopos rectales o colonias bacterianas.

Allplex™ Entero-DR Assay es un ensayo de PCR en tiempo real

Forma de presentación: 1) Allplex™ Entero-DR Assay (CR10384Z) x 25 determinaciones:

- Entero-DR MOM (Mezcla de oligos de MuDT (MOM): Reactivos de amplificación y detección) 1 x 125 µL
- EM4 (Polimerasa de DNA; Uracil-DNA glicosilasa (UDG); Tampón que contiene dNTPs) 1 x 125 µL.
- EM4 Buffer (Tampón para PCR en tiempo real: Tampón que contiene BSA y glicerol) 1 x 125 µL.
- Entero-DR PC (Control Positivo (PC): Mezcla de patógenos y clones IC) 1 x 50 µL.
- Entero-DR IC (Control Interno (IC) exógeno para muestras de colonias bacterianas) 1 x 1000 µL.
- RNase-free Water (Calidad ultrapura, grado PCR) 1 x 1000 µL.

2) Allplex™ Entero-DR Assay (CR9700X) x 100 determinaciones:

- Entero-DR MOM (Mezcla de oligos de MuDT (MOM): Reactivos de amplificación y detección) 1 x 500 µL
- EM4 (Polimerasa de DNA; Uracil-DNA glicosilasa (UDG); Tampón que contiene dNTPs) 1 x 500 µL.
- EM4 Buffer (Tampón para PCR en tiempo real: Tampón que contiene BSA y glicerol) 1 x 500 µL.
- Entero-DR PC (Control Positivo (PC): Mezcla de patógenos y clones IC) 1 x 50 µL.
- Entero-DR IC (Control Interno (IC) exógeno para muestras de colonias bacterianas) 1 x 1000 µL.
- RNase-free Water (Calidad ultrapura, grado PCR) 1 x 1000 µL.

Período de vida útil y condición de conservación: 12 meses de vida útil, desde su fabricación, cuando se almacena a =-20°C.

Nombre del fabricante:

Seegene Inc.

Lugar de elaboración:

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

Condición de uso: Uso profesional exclusivo

N° 1-0047-3110-000649-24-5

N° Identificadorio Trámite: 56229

AM

Allplex™

Entero-DR Assay

(Cat. No. CR9700X, CR10384Z)

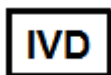
Un ensayo múltiple PCR en tiempo real para la detección de genes carbapenemasas (NDM, KPC, OXA-48, VIM, IMP), gen (CTX-M) de Beta-Lactamasa de espectro extendido (ESBL) y genes de resistencia a la vancomicina (VanA, VanB) de hisopos rectales y colonias bacterianas.

Para usar solo con

1. Microlab NIMBUS IVD y Microlab STARlet IVD
2. Seegene NIMBUS y Seegene STARlet

Para usar 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 diagnóstico *in vitro*



CR9700X



CR10384Z



Seegene Inc.

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



Medical Technology Promedt Consulting GmbH

Altenhofstrasse 80, D-66386 St.Ingbert, Germany

No está disponible en Estados Unidos

Farm. 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 E INFORMACIÓN SOBRE EL PROCEDIMIENTO | 5 |
| INFORMACIÓN GENERAL | 6 |
| REACTIVOS | 7 |
| ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN | 9 |
| MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS | 9 |
| PROTOCOL | 10 |
| CONFIGURACIÓN DE INSTRUMENTOS DE PCR EN TIEMPO REAL Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS | 18 |
| RESULTADOS | 38 |
| SOLUCIÓN DE PROBLEMAS | 42 |
| RENDIMIENTO | 44 |
| REFERENCIAS | 48 |
| SÍMBOLOS | 49 |
| INFORMACIÓN DE PEDIDO | 50 |

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

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

AVISOS

- Solo para diagnóstico *in vitro*.
- El Allplex™ Entero-DR Assay debe ser utilizado por personal calificado y capacitado.
- La fiabilidad de los resultados depende de que las muestras sean adecuadamente recogidas, almacenadas, transportadas y procesadas.
- Si este producto se utiliza con **Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS, y Seegene STARlet**, máximo 5 pruebas separadas.
- **Esta prueba ha sido aprobada para los siguientes tipos de muestras: Hisopos rectales y colonias bacterianas.** Esta prueba no ha sido aprobada para ningún otro tipo de muestra.
- **Almacene las muestras de DNA a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ hasta que se vayan a usar y consérvelas sobre hielo durante su uso.**
- La sensibilidad del ensayo puede disminuir si las muestras se congelan y descongelan repetidas veces o si se almacenan durante mucho tiempo.
- El flujo de trabajo en el laboratorio debería desarrollarse de manera unidireccional.
- Utilice guantes desechables y cámbielos antes de ingresar a diferentes áreas. Cambiar los guantes inmediatamente si están contaminados o trátelos con reactivo descontaminante de ADN.
- Los suministros y equipos deben ser asignados a cada área de trabajo y no se deben intercambiar entre una y otra área.
- No se debe pipetear con la boca.
- No se debe comer, beber ni fumar en las zonas de trabajo del laboratorio. Al manipular las muestras y reactivos, han de llevarse guantes sin talco desechables, bata de laboratorio y protección en los ojos. Deben lavarse bien las manos después de manipular las muestras y los reactivos de la prueba.
- Evite contaminar los reactivos al quitar las partes alícuotas de los tubos de reactivos. Se recomienda usar puntas de pipeta desechables estériles, resistentes a los aerosoles.
- No mezcle reactivos de diferentes lotes o de diferentes tubos del mismo lote.
- No use el producto después de su fecha de caducidad.
- No reúse los elementos desechables.
- Use tubos con tapa de rosca y evite cualquier posible salpicadura o contaminación cruzada de las muestras durante la preparación.
- Por favor, tenga cuidado de no contaminar los reactivos con ácidos nucleicos extraídos, productos de PCR y control positivo. Para evitar la contaminación de los reactivos, se recomienda utilizar puntas con filtro.
- Use zonas de trabajo separadas y segregadas para cada experimento.

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

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

- Prepare y utilice un juego de pipetas diferente para cada una de las siguientes áreas: extracción de ácidos nucleicos, mezcla de reactivos, adición de plantillas de ácidos nucleicos y manipulación de productos de PCR.
- Para evitar la contaminación de áreas de trabajo con productos amplificados, abra los tubos de reacción o cintas PCR solamente en las áreas de trabajo asignadas, después de la amplificación.
- Los materiales positivos se han de almacenar separados de los reactivos del kit.
- Deben adoptarse los procedimientos de seguridad de laboratorio (consulte los documentos de Bioseguridad en los laboratorios microbiológicos y biomédicos y CLSI) al manipular las muestras. Limpie y desinfecte exhaustivamente todas las superficies de trabajo con hipoclorito de sodio al 0,5% (en agua desionizada o destilada). Los componentes del producto (residuos del producto, embalaje) se pueden considerar como residuos de laboratorio. Deseche los reactivos sin utilizar y los residuos conforme a las normativas nacionales, regionales y locales de aplicación.
- La fecha de caducidad es de 12 meses desde la fecha de fabricación, a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Por favor consulte la etiqueta para comprobar la fecha de caducidad.
- Seegene NIMBUS y Seegene STARlet son el mismo equipo que Microlab NIMBUS IVD y Microlab STARlet IVD, aunque el fabricante sea distinto. Dado que no hay cambios en el hardware del dispositivo, los resultados son los mismos.
- La marca “CFX96™ Real-time PCR Detection System-IVD” a pasado a ser “CFX96™ Dx system”. Dado que no hay cambios en el hardware del dispositivo, se espera que los resultados sean los mismos con cualquiera de los dispositivos.
- “CFX Manager™ Dx Software v3.1” es una versión actualizada del “CFX Manager™ Software-IVD v1.6”. La actualización del software incluye mejoras al menú “Run” (Ejecutar). Estas mejoras no impactan los resultados del análisis de datos; así que los resultados serán los mismos.
- Este kit está pensado para ayudar en el diagnóstico diferencial enfocado en ciertas infecciones patógenas; Genes carbapenemasas (NDM, KPC, OXA-48, VIM, IMP), gen (CTX-M) de Beta-Lactamasa de espectro extendido (ESBL) y genes de resistencia a la vancomicina (VanA, VanB)
- AIOS combina Seegene STARlet vendido por Seegene con equipo de PCR en tiempo real (CFX96 Dx, Fabricante: Bio-Rad) y sellador de placas (Fabricante: SAMICK THK) para formar una estructura de enlace automatizada desde la extracción de ácidos nucleicos hasta la PCR.

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

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

USO PREVISTO

Allplex™ Entero-DR Assay es una prueba de diagnóstico cualitativa in vitro que utiliza la reacción en cadena de la polimerasa múltiplex en tiempo real (múltiplex PCR en tiempo real). Esta prueba permite la detección única o múltiple de genes carbapenemasas (NDM, KPC, OXA-48, VIM, IMP), gen (CTX-M) de Beta-Lactamasa de espectro extendido (ESBL) y genes de resistencia a la vancomicina (VanA, VanB) en hisopos rectales o colonias bacterianas.

Allplex™ Entero-DR Assay debe usarse junto con otras pruebas de laboratorio, incluida la prueba de susceptibilidad antimicrobiana fenotípica. Allplex™ Entero-DR Assay pretende ser una ayuda para el control de infecciones en la detección de marcadores genéticos de resistencia para monitorear la propagación de Enterobacteriaceae (CPE) productoras de carbapenemasas, Enterobacteriaceae productoras de CTX-M y Enterococci resistentes a la vancomicina (VRE) en entornos de atención médica. Allplex™ Entero-DR Assay no tiene la intención de guiar o monitorear el tratamiento de Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas (CPE), Enterobacteriaceae productoras de CTX-M, Enterococci resistentes a la vancomicina (VRE).

PRINCIPIOS E INFORMACIÓN SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. Principios

Allplex™ Entero-DR Assay presenta tecnología MuDT™ propiedad de Seegene, que permite proporcionar valores multi-C_t (ciclo umbral) en un único canal de fluorescencia sin análisis de curva de fusión por PCR en tiempo real.

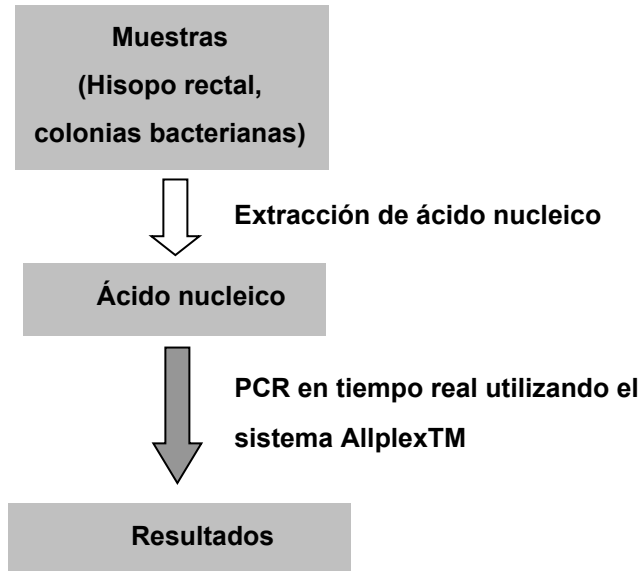
Allplex™ Entero-DR Assay es un ensayo múltiplex en tiempo real de PCR que permite la amplificación y detección simultáneas de ácidos nucleicos diana de genes carbapenemasas (NDM, KPC, OXA-48, VIM, IMP), gen (CTX-M) de Beta-Lactamasa de espectro extendido (ESBL) y genes de resistencia a la vancomicina (VanA, VanB) con Control Interno (IC). La presencia de una secuencia de gen específica en la reacción se informa como un valor de Ct a través del software de análisis Seegene Viewer.

Se utiliza un gen de bacteroides humanos endógenos como Control interno (IC) para muestras de hisopos rectales para supervisar todo el proceso de recogida de muestras, extracción de ácido nucleico y para verificar cualquier posible inhibición de la PCR. Sin embargo, debido a la colonización insuficiente de la flora humana de bacteroides normales en el intestino del lactante, el IC puede agregarse de manera exógena a las muestras de frotis rectal del lactante y puede usarse como control exógeno de todo el proceso.

Para evitar que el producto de amplificación actúe como potencial contaminante, en el Allplex™ Entero-DR Assay se utiliza un sistema Uracil-DNA glicosilasa (UDG)-dUTP. El sistema UDG-dUTP se usa comúnmente cuando se realiza una PCR para eliminar

los amplicones sobrantes usando escisiones por UDG de residuos de uracilo desde el DNA mediante la escisión del enlace Nglicosílicos.

2. Información sobre el procedimiento



INFORMACIÓN GENERAL

Las infecciones causadas por organismos resistentes a los antibióticos (ARO) a menudo son difíciles de resolver y la prevalencia de ARO ha ido en aumento, lo que incrementa los costos para el sistema de salud.

Sobre todo, la emergencia en todo el mundo y la propagación de Enterobacteriaceae (CPE) productoras de carbapenemasas, Enterobacteriaceae productoras de ESBL y Enterococci resistentes a la vancomicina (VRE) en establecimientos de salud son graves amenazas para el sistema público de salud.

CPE tiene resistencia elevada o completa a carbapenémicos y la mayoría de los otros antibióticos beta-lactámicos. Hoy en día, los CPE más comunes están asociados con la presencia de genes de Carbapenemasas que codifican KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemase), VIM (metalo-beta-lactamasa codificada por la integrina Verona), NDM (metalo-beta-lactamasa de Nueva Delhi), OXA-48 (Oxacilinasas-48) o IMP (imipenemasa).

El espectro extendido de betalactamasa (ESBL) es una enzima bacteriana que cataliza la hidrólisis de antibióticos betalactámicos de espectro extendido. Las Enterobacteriaceae productoras de ESBL tienen la capacidad de romper antibióticos betalactámicos, incluidas cefalosporinas y monobactamas. CTX-M es el gen más frecuente que codifica ESBL en los últimos días.

Los VRE son Enterococci que han adquirido resistencia a la vancomicina (el fármaco de elección para tratar las infecciones por Enterococci resistentes a múltiples fármacos).


Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17533

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

REAGENTS

Los reactivos contenidos en un kit son suficientes para 100 reacciones.

Información de pedido (**REF** CR9700X)

| Allplex™ Entero-DR Assay | | | |
|---|--------------------|----------------|--|
| Símbolo | Contenido | Volumen | Descripción |
| PRIMER | Entero-DR MOM | 500 µL | Mezcla de oligos de MuDT (MOM): - Reactivos de amplificación y detección |
| ENZYME | EM4 | 500 µL | - Polimerasa de DNA - Uracil-DNA glicosilasa (UDG) - Tampón que contiene dNTPs |
| BUFFER | EM4 Buffer | 500 µL | Tampón para PCR en tiempo real - Tampón que contiene BSA y glicerol |
| CONTROL + | Entero-DR PC | 50 µL | Control Positivo (PC): - Mezcla de patógenos y clones IC |
| CONTROL IC | Entero-DR IC | 1,000 µL | Control Interno (IC) exógeno para muestras de colonias bacterianas |
| WATER | RNase-free Water | 1,000 µL | Calidad ultrapura, grado PCR |
|  | Manual del usuario | | |

Producto accesorio: software de análisis

Seegene Viewer*


* El software de análisis lo proporciona Seegene o el director regional. Utilice Seegene Viewer superior a V3.

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

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Los reactivos contenidos en un kit son suficientes para 25 reacciones.

Información de pedido (**REF** CR10384Z)

| Allplex™ Entero-DR Assay | | | |
|---|--------------------|----------------|--|
| Símbolo | Contenido | Volumen | Descripción |
| PRIMER | Entero-DR MOM | 125 µL | Mezcla de oligos de MuDT (MOM): - Reactivos de amplificación y detección |
| ENZYME | EM4 | 125 µL | - Polimerasa de DNA - Uracil-DNA glicosilasa (UDG) - Tampón que contiene dNTPs |
| BUFFER | EM4 Buffer | 125 µL | Tampón para PCR en tiempo real - Tampón que contiene BSA y glicerol |
| CONTROL + | Entero-DR PC | 50 µL | Control Positivo (PC): - Mezcla de patógenos y clones IC |
| CONTROL IC | Entero-DR IC | 250 µL | Control Interno (IC) exógeno para muestras de colonias bacterianas |
| WATER | RNase-free Water | 1,000 µL | Calidad ultrapura, grado PCR |
|  | Manual del usuario | | |

Producto accesorio: software de análisis

Seegene Viewer*

* El software de análisis lo proporciona Seegene o el director regional. Utilice Seegene Viewer superior a V3.

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

Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

Todos los componentes de Allplex™ Entero-DR Assay deben almacenarse a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Todos los componentes son estables en las condiciones de almacenamiento recomendadas, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El rendimiento de los componentes del kit no se ve afectado hasta que se lleven a cabo 5 congelaciones y descongelaciones. Si se van a utilizar los reactivos solo de forma intermitente, deben almacenarse en partes alícuotas.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS

- Guantes desechables sin talco (látex o nitrilo)
- Pipetas (ajustables) y puntas de pipeta estériles
- Tubo de microcentrifugación de 1,5 mL
- Kit de extracción de ácido nucleico (ver Extracción de ácido nucleico)
- Máquina de hielo
- Centrífuga de sobremesa
- Mezclador vórtex
- CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- Tiras de 8 tubos de perfil bajo de 0,2 mL sin tapas (color blanco, Núm. Cat. TLS0851, Bio-Rad)
- Tiras de 8 tapas planas ópticas (Núm. Cat. TCS0803, Bio-Rad)
- Placas para PCR de 96 pocillos Hard-Shell®, de perfil bajo, pared fina, con faldón, blanca/blanca (Núm. Cat. HSP9655, Bio-Rad)
- Placas para PCR de 96 pocillos Hard-Shell®, de perfil bajo, pared fina, con faldón, blanca/blanca, código de barras (Núm. Cat. HSP-9955, Bio-Rad)
- AIOS (Cat. No. SG72100, Seegene)
- Tapa perforable (Cat. No. 922119, SPL) (solo para uso en AIOS)
- Sellado térmico transparente permanente. (Cat. No. 1814035, Bio-Rad)*
- PX1 PCR sellador de placas (sellador automático, Cat. No. 181-4000, Bio-Rad)*
- Agujas y asa de plástico desechables
- Mesa de trabajo limpia

* Asegúrese de usar la máquina de sellado térmico y el sellador para placas indicados anteriormente juntos.

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

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

PROTOCOLO**1. Recogida de muestras, almacenamiento y transporte**

Nota: Todas las muestras se deben tratar como material potencialmente infeccioso. Solo se permiten los materiales de las muestras que se recojan, almacenen y transporten de acuerdo con las siguientes normas e instrucciones de forma rigurosa.

Hisopo rectal**colonia bacteriana**

Nota: Para asegurar la alta calidad de las muestras, estas deben ser transportadas tan rápido como sea posible, a las temperaturas indicadas.

A. Recogida de muestras***Hisopo rectal***

Para recoger los hisopos rectales use los siguiente materiales:

- Los hisopos rectales se pueden recoger y transportar en 2 mL de los siguientes

| Kit de recogida | Fabricante | Cat. No. |
|--------------------------------|-------------------|-----------------|
| Fecal Swab™ | COPAN | 470CE.A |
| Fecal Swab 2mL w/ PnR – R swab | COPAN | 4U150S* |

* Volver a sellar con una tapa de repuesto (Cat. No. 2E003S500, COPAN) después de su uso para su posterior almacenamiento.

- Deje el hisopo en el medio de transporte. Cierre y etiquete el recipiente de la muestra.

Siga estrictamente las instrucciones suministradas para el almacenamiento y transporte.

Colonia bacteriana

Las colonias se pueden recoger con una aguja y un asa de plástico desechables. Las muestras pueden someterse a ensayo tan pronto como sea visible el crecimiento y durante las 24 a 48 horas posteriores a la incubación.

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

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

B. Almacenamiento y transporte de muestras

| Muestras | Almacenamiento y transporte | | Nota |
|--------------------|-----------------------------|-----------|--|
| | Temp. | Duración* | |
| Hisopo rectal | 2~8°C | 3 días | - El rendimiento puede verse afectado por el almacenamiento a largo plazo de la muestra. |
| Colonia bacteriana | 2~8°C | 5 días | - Las muestras también deben adherirse a las instrucciones locales y nacionales para el transporte de material patógeno. |

* Duración: El período de tiempo desde la recolección de la muestra hasta la prueba final (incluye el transporte y almacenamiento de las muestras antes de la prueba).

2. Extracción de ácido nucleico
A. Control Interno (IC)

Nota: Para muestras de hisopo rectal, se utiliza un gen endógeno como Control Interno. No se necesita adición de IC. Pero en el caso de los lactantes, el Control interno endógeno puede mostrarse como no válido, por lo que si la muestra es un frotis rectal de un lactante, se puede agregar Entero-DR IC como Control interno exógeno.

Nota: Se pueden mostrar ocasionalmente resultados no válidos para el Control Interno endógeno en muestras de hisopos rectales. En este caso, consulte la sección de resolución de problemas.

Nota: el IC se incluye en el kit para permitir al usuario confirmar no solo el procedimiento de extracción de ácido nucleico, sino también para identificar cualquier inhibición de PCR.

- Para colonias bacterianas deben añadirse 10 µL de Entero-DR IC a cada muestra de colonias bacterianas antes de realizar el procedimiento de extracción de ácido nucleico.
- En el caso de frotis rectales, el tubo Entero-DR IC puede cargarse en casos excepcionales* en Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS o Seegene STARlet antes de la extracción de ácido nucleico.
- Cuando se utilizan Maelstrom™ 9600, SEEPREP32, NucliSENS® easyMAG® o kits manuales de ácido nucleico para hisopos rectales, se pueden agregar 10 µL de Entero-DR IC como caso inusual* antes de la extracción del ácido nucleico.

* * En caso de frotis rectal de lactante.

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

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

B. Sistema de extracción de ácido nucleico automatizado para hisopo rectal

Nota: Use la muestra recomendada y los volúmenes de la elución tal y como se indica a continuación. Para el resto, consulte el manual del fabricante.

B-1. Microlab NIMBUS IVD

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

| Sistema de extracción automatizado | Fabricante | Cat. N°. | Vol. recomendado |
|--|------------|--------------------|------------------------------------|
| Microlab NIMBUS IVD | Hamilton | 65415-02* | - |
| STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit | Seegene | 744300.4. UC384 | Muestra: 300 µL Elución: 100 µL |
| STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C kit | Seegene | EX00013C | Muestra: 300 µL Elución: 100 µL |

*Por favor, utilice los números de catálogo mostrados anteriormente para la compra de productos a Seegene Inc.

B-2. Microlab STARlet IVD

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

| Sistema de extracción automatizado | Fabricante | Cat. N°. | Vol. recomendado |
|--|------------|--------------------|------------------------------------|
| Microlab STARlet IVD | Hamilton | 173000- 075* | - |
| STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit | Seegene | 744300.4. UC384 | Muestra: 300 µL Elución: 100 µL |
| STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C kit | Seegene | EX00013C | Muestra: 300 µL Elución: 100 µL |

*Por favor, utilice los números de catálogo mostrados anteriormente para la compra de productos a Seegene Inc.

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

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

B-3. Seegene NIMBUS

Note: Consulte el manual de funcionamiento de Seegene NIMBUS.

| Sistema de extracción automatizado | Fabricante | Cat. N°. | Vol. recomendado |
|--|------------|--------------------|------------------------------------|
| Seegene NIMBUS | Seegene | 65415-03 | - |
| STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit | Seegene | 744300.4. UC384 | Muestra: 300 µL Elución: 100 µL |
| STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C kit | Seegene | EX00013C | Muestra: 300 µL Elución: 100 µL |

B-4. Seegene STARlet

Opción: Estructura de enlace automatizada (consulte el manual de operación de AIOS)

| Estructura de enlace automatizada | Fabricante | Cat. N°. |
|-----------------------------------|------------|----------|
| AIOS | Seegene | SG72100 |

Nota: Reemplace la tapa del Control Positivo (PC) con una tapa perforable. Luego de finalizar la operación, reemplace la tapa del Control Positivo (PC) con la tapa original.

Nota: El tapón perforable es un producto de un solo uso y debe desecharse después de un solo uso.

Nota: Si se usa con AIOS, este producto se puede usar para un máximo de 3 ejecuciones separadas.

Note: Consulte el manual de funcionamiento de Seegene STARlet.

| Sistema de extracción automatizado | Fabricante | Cat. N°. | Vol. recomendado |
|--|------------|--------------------|------------------------------------|
| Seegene STARlet | Seegene | 67930-03 | - |
| STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit | Seegene | 744300.4. UC384 | Muestra: 300 µL Elución: 100 µL |
| STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C kit | Seegene | EX00013C | Muestra: 300 µL Elución: 100 µL |

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

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

B-5. SEEPREP32

- Continúe con el proceso de extracción utilizando el "**Pro-Protocolo A**".

| Sistema de extracción automatizado | Fabricante | Cat. N°. | Vol. recomendado |
|------------------------------------|------------|----------|------------------------------------|
| SEEPREP32 | Seegene | SG71100 | - |
| STARMag 96 ProPrep (Plate Type) | Seegene | EX00009P | Muestra: 200 µL Elución: 100 µL |
| STARMag 96 ProPrep (Tube Type) | Seegene | EX00009T | Muestra: 200 µL Elución: 100 µL |
| STARMag 96 ProPrep C (Plate Type) | Seegene | EX00017P | Muestra: 200 µL Elución: 100 µL |
| STARMag 96 ProPrep C (Tube Type) | Seegene | EX00017T | Muestra: 200 µL Elución: 100 µL |

- Proceed the extraction process using '**STARMag SP32**'.

| Sistema de extracción automatizado | Fabricante | Cat. N°. | Vol. recomendado |
|------------------------------------|------------|----------|------------------------------------|
| SEEPREP32 | Seegene | SG71100 | - |
| STARMag™ SP32 Kit (Plate Type) | Seegene | EX00028P | Muestra: 200 µL Elución: 100 µL |
| STARMag™ SP32 Kit (Tube Type) | Seegene | EX00028T | Muestra: 200 µL Elución: 100 µL |

B-6. NucliSENS® easyMAG®

- Continúe con el proceso de extracción utilizando el "**protocolo genérico**".

| Sistema de extracción automatizado | Fabricante | Cat. N°. | Vol. recomendado |
|------------------------------------|------------|----------|---|
| NucliSENS® easyMAG® | bioMérieux | 200111 | Muestra: 200 µL Sílice magnética: 50 µL Elución: 100 µL |

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

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

B-7. Maelstrom™ 9600

- Continúe el proceso de extracción utilizando **'STARMAGM96'**.

| Sistema de extracción automatizado | Fabricante | Cat. N°. | Vol. recomendado |
|------------------------------------|-------------------------------|----------------------|------------------------------------|
| Maelstrom™ 9600 | Taiwan Advanced Nanotech Inc. | M9600 | - |
| STARMag™ M96 Kit | Seegene | EX00029P EX00030P | Muestra: 200 µL Elución: 100 µL |

C. Kits manuales de extracción de ácidos nucleicos para hisopo rectal

| Kit de extracción | Fabricante | Cat. N°. | Vol. recomendado |
|---|------------|--------------------|-----------------------------------|
| QIAamp® DSP DNA Mini Kit | QIAGEN | 61304 | Muestra: 200 µL Elución: 50 µL |
| QIAamp® DNA Mini Kit | QIAGEN | 51304 | Muestra: 200 µL Elución: 50 µL |
| Ribo_spin vRD (Viral RNA/DNA Extraction Kit) | GeneAll | 302-150 SG1701* | Muestra: 200 µL Elución: 50 µL |

*Utilice los números de catálogo que se muestran arriba para comprar productos de Seegene Inc.

D. Para colonia bacteriana (Método de ebullición sin kit de extracción de ácido nucleico)

- Agregue 200 µL de DW y 10 µL de Entero-DR IC a cada tubo de 1,5 mL esterilizado y adecuadamente etiquetado.
- Recoja colonias bacteriales en un tubo de 1,5 mL utilizando un asa de plástico estéril y agítelo ligeramente en un mezclador de vórtice.
- Bloquee la tapa del tubo usando un tapón de bloqueo y hierva durante 15 min en un bloque de calor o en un baño de agua hirviendo.
- Coloque el tubo hervido a temperatura ambiente para enfriarlo.
- Centrifugue durante 1 minuto a 15.000 x g (13.000 rpm).
- Use 5 µL of DNA de sobrenadante para PCR en tiempo real. Tenga cuidado de no coger muestra de detritos.

Firm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17305

Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

3. Preparación de PCR en tiempo real

Nota: Deben usarse tubos y tapas adecuados (véase MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS).

Nota: Deben usarse filtros resistentes a los aerosoles y guantes ajustados al preparar las reacciones de PCR de un solo paso. Tenga especial cuidado para evitar la contaminación cruzada.

Nota: Descongele totalmente todos los reactivos en baño de hielo.

Nota: Centrifugue brevemente los tubos de reactivos para recoger las gotas residuales de dentro de la tapa.

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

A. Prepare la Mastermix de PCR

| | |
|-------|-----------------------------------|
| 5 µL | Entero-DR MOM |
| 5 µL | EM4 |
| 5 µL | EM4 Buffer |
| <hr/> | |
| 15 µL | Volumen total de Mastermix de PCR |

Nota: Calcule la cantidad total necesaria de cada reactivo, con base en la cantidad de reacciones, incluyendo muestras y controles.

B. Mezcle rápido en un mezclador de vórtice y centrifugue brevemente.

C. Utilice una parte proporcional de 15 µL de Mastermix de PCR en los tubos de PCR.

D. Añada 5 µL de los ácidos nucleicos de cada muestra en el tubo que contiene la Mastermix de PCR.

| | |
|-------|------------------------------|
| 15 µL | Mastermix de PCR |
| 5 µL | Ácido nucleico de la muestra |
| <hr/> | |
| 20 µL | Volumen total de la reacción |

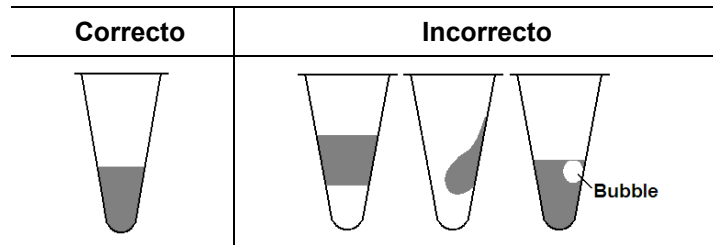
E. Cierre y centrifugue brevemente los tubos de PCR.

F. Verifique que el líquido que contiene todos los componentes de PCR se encuentre en el fondo de cada tubo de PCR. Si no es así, centrifugue de nuevo a mayores rpm durante más tiempo.

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

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

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 el fondo de los tubos



Nota: Con cada muestra, use una nueva punta de pipeta estéril.

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 Entero-DR PC en lugar del ácido nucleico de la muestra.

Nota: Tenga cuidado de que no se produzca una contaminación cruzada de la mastermix PCR y de las muestras con el Control Positivo.

Nota: No etiquete el tubo de reacción en su tapa. La fluorescencia se detecta desde la parte superior de cada tubo de reacción.

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

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

CONFIGURACIÓN DE INSTRUMENTOS DE PCR EN TIEMPO REAL Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

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

1.1. Configuración de los instrumentos de PCR en tiempo real

Nota: CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad) puede dividirse en tres pasos: Protocol Setup (configuración del protocolo), Plate Setup (configuración de la placa) e Start run (inicio del ciclo).

A. Protocol Setup (Configuración del protocolo)

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

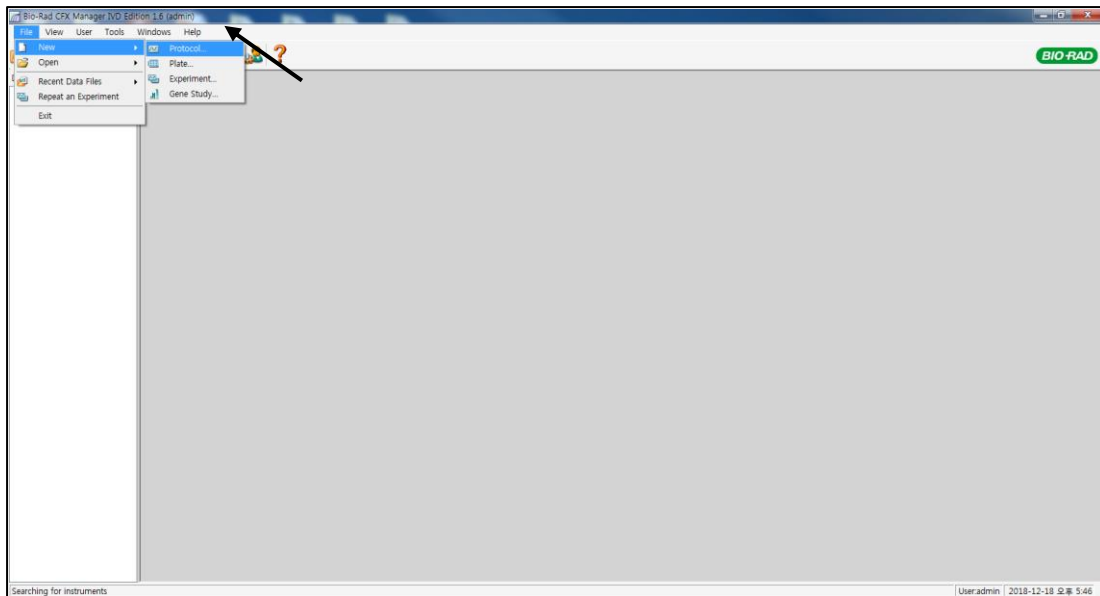


Fig. 1. Protocol Setup (Configuración del protocolo)

2) En **Protocol Editor (Editor de protocolo)**, defina el perfil térmico como sigue:

| Paso | N°. de ciclos | Temp. | Duración |
|------|-------------------------------------|-------|----------|
| 1 | 1 | 95°C | 15 min |
| 2 | | 95°C | 10 seg |
| 3* | 45 | 60°C | 15 seg |
| 4* | | 72°C | 10 seg |
| 5 | GOTO (VAYA AL) Paso 2, 44 veces más | | |

Note*: Lectura de placa en el paso 3 y 4. La fluorescencia se detecta a 60°C y 72°C.

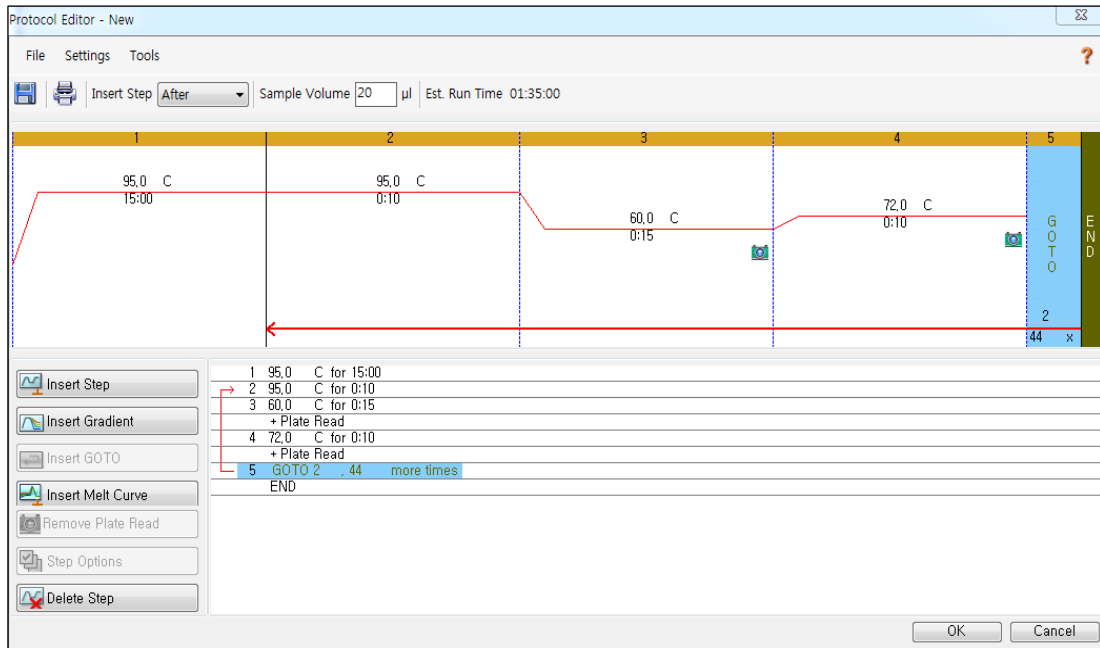


Fig. 2. Protocol Editor (Editor de protocolo)

- 3) Haga clic en el cuadro al lado de **Sample Volume (Volumen de la muestra)** para añadir directamente 20 µL.
- 4) Haga clic en **OK (Aceptar)** y guarde el protocolo para abrir la ventana **Experiment Setup (Configuración del experimento)**.

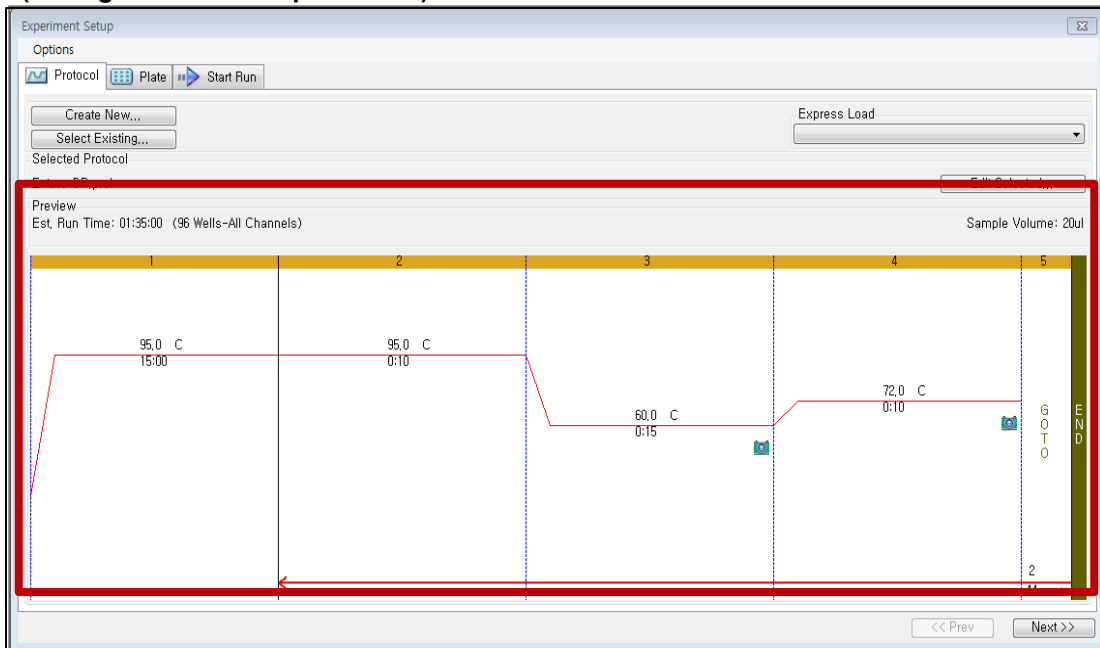


Fig. 3. Experiment Setup (Configuración del experimento): Protocol (Protocolo)

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

Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

B. Plate Setup (Configuración de la placa)

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

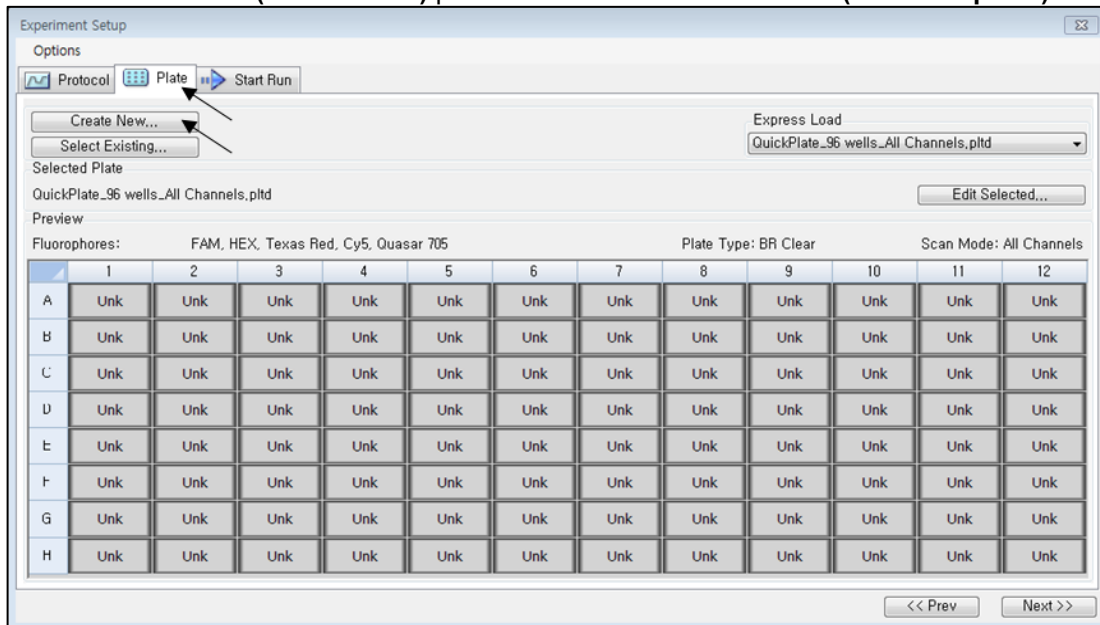


Fig. 4. Plate Editor (Editor de placa).

2) Haga clic en **Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos)** para indicar los fluoróforos (**FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670, y Quasar 705**) que se van a usar y haga clic en **OK (Aceptar)**.

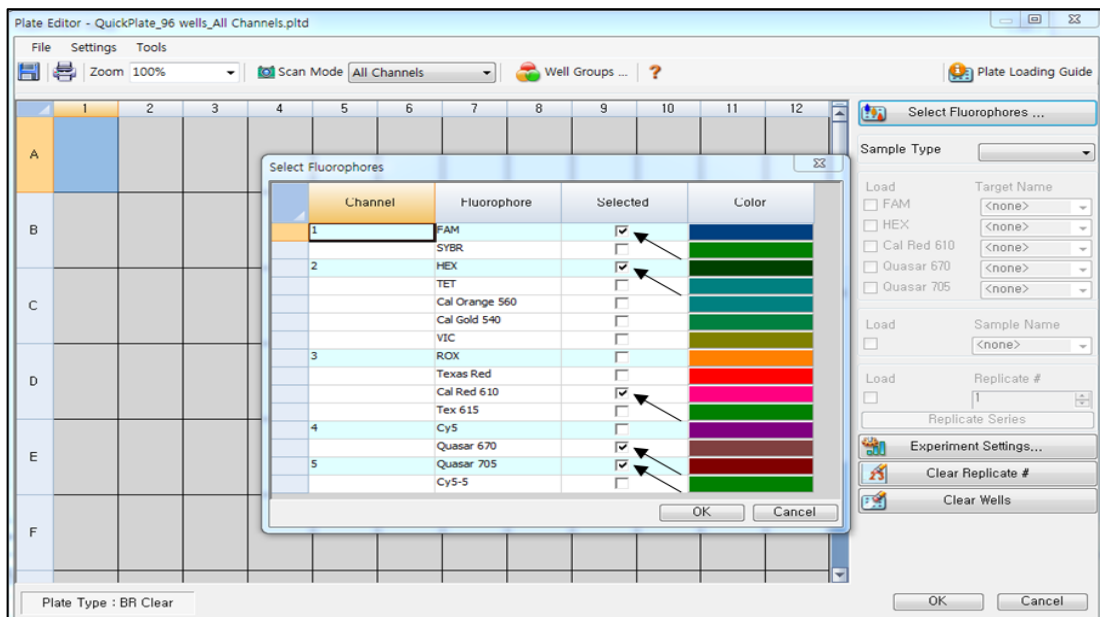


Fig. 5. Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos) (FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670, y Quasar 705)

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

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

3) Seleccione los pocillos donde se colocará el tubo de PCR y seleccione sus tipos de muestra en el menú desplegable **Sample Type (Tipo de muestra)**.

- **Unknown (Desconocidos):** muestras clínicas
- **Negative Control (Control negativo)**
- **Positive Control (Control positivo)**

4) Haga clic en las casillas de verificación adecuadas (**FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670, y Quasar 705**) para especificar los fluoróforos que se van a detectar en los pocillos seleccionados.

5) Escriba el **Sample Name (Nombre de la muestra)** y presione la tecla Intro.

6) En **Settings (Configuración)** del menú principal de **Plate Editor (Editor de placa)**, escoja **Plate Size (96 wells) (Tamaño de la placa (96 pocillos))** y **Plate Type (BR White) (Tipo placa (Blanco BR))**.

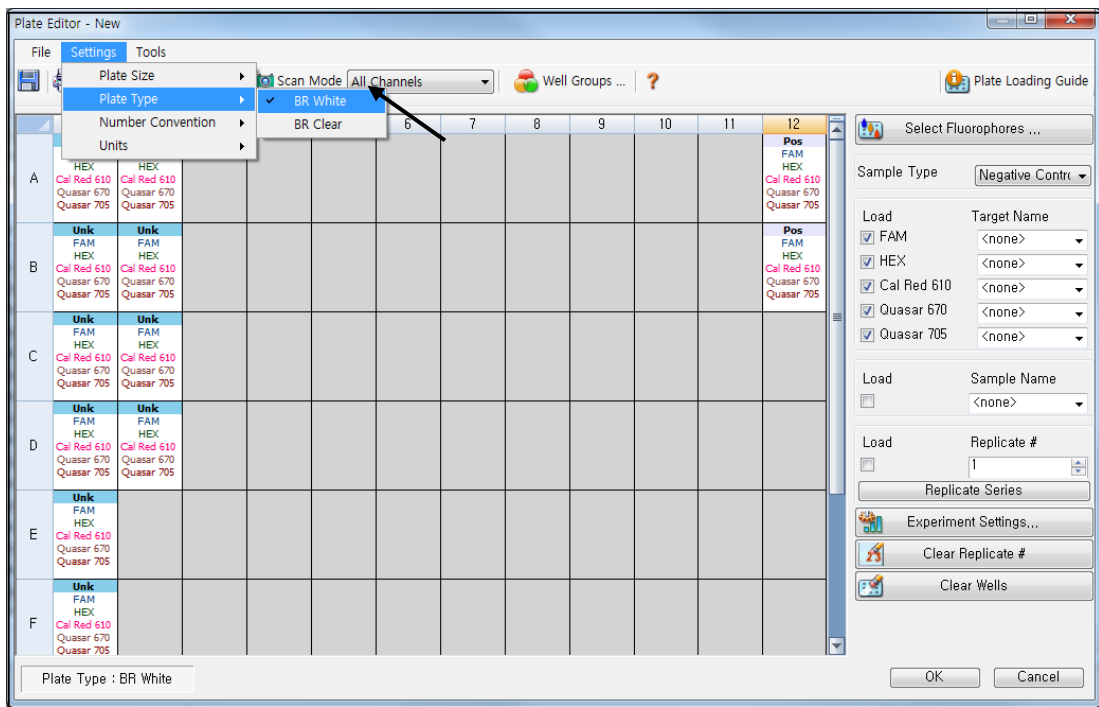


Fig. 6. Plate Setup (Configuración de la placa)

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

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

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

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

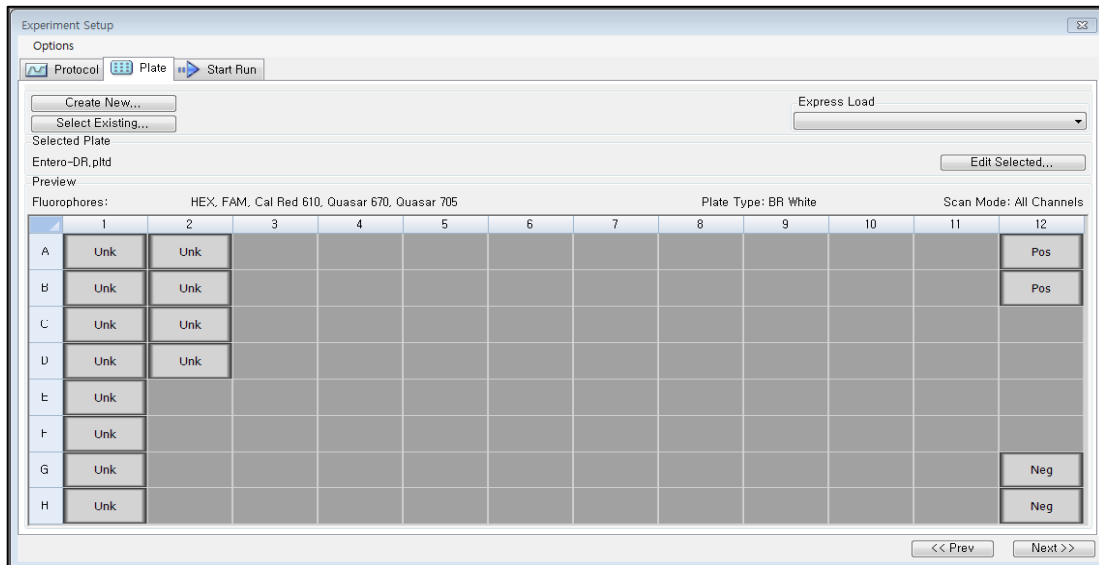


Fig. 7. **Experiment Setup (Configuración del experimento): Plate (Placa)**

9) Haga clic en **Next (Siguiete)** para iniciar la ejecución.

C. Start Run (Inicio del ciclo)

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

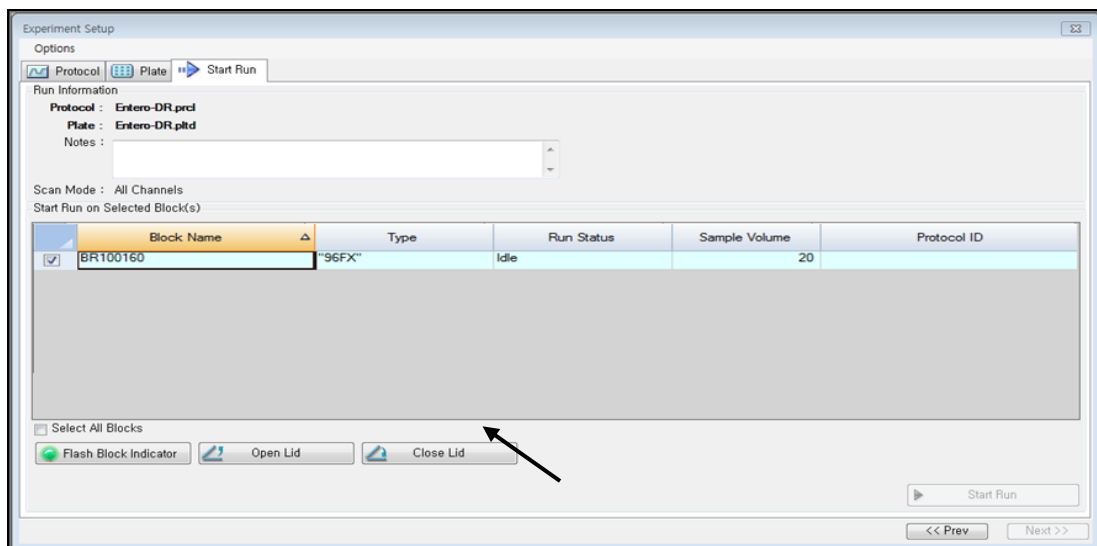


Fig. 8. **Close Lid (Cerrar tapa)**

2) Haga clic en **Start Run (Inicio de ejecución)**.

3) Almacene el archivo del ensayo en Mis documentos o en una carpeta que especifique.

Introduzca el nombre del archivo, haga clic en **SAVE (GUARDAR)** y se iniciará el ciclo.

1.2. Análisis de datos

A. Crear carpetas para exportar datos

- 1) Cree una carpeta para guardar los datos de todos los pasos de detección de las curvas de amplificación a partir del archivo de resultados.
- 2) El nombre de la carpeta puede ser la que desee el usuario (para la función 'Seegene Export' (Exportación de Seegene)', se crearán automáticamente las carpetas "QuantStep3" y "QuantStep4" para guardar los datos de cada curva de amplificación dentro de la carpeta que creó el usuario).

B. Configuración previa para el análisis CFX Manager™

- 1) Después del test, haga clic en la pestaña Quantitation (Cuantificación) para confirmar los resultados de la curva de amplificación.

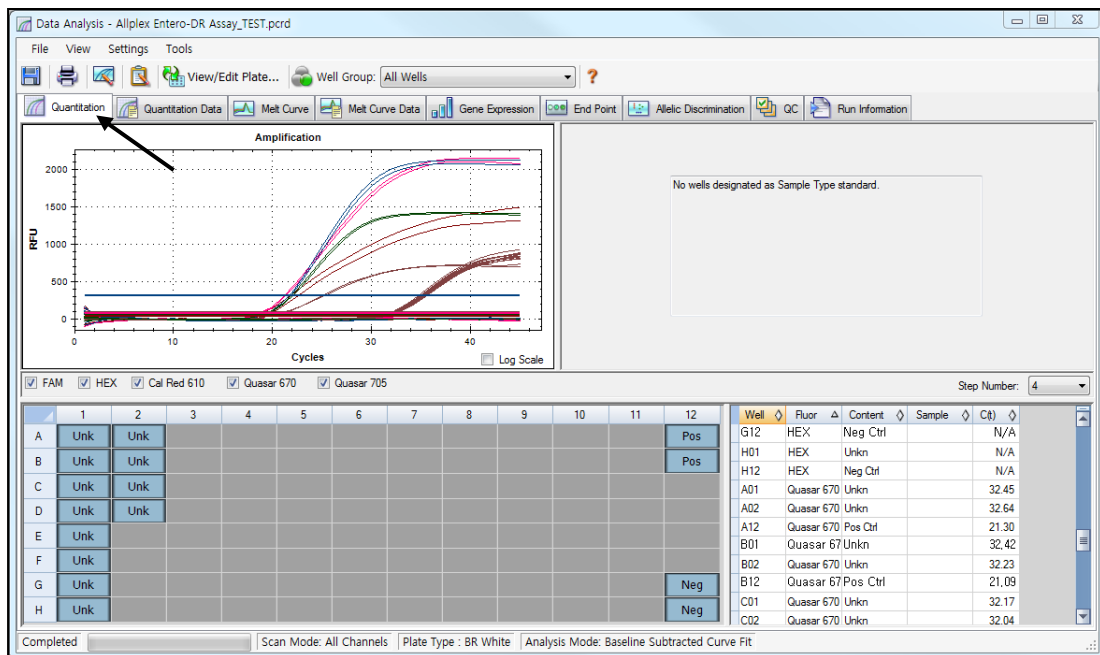


Fig. 9. Resultados de la curva de amplificación

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

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

- 2) Seleccione **No Baseline Subtraction (No sustraer línea base)** en el **Analysis Mode (modo Análisis)** del menú **Settings (Configuración)**.

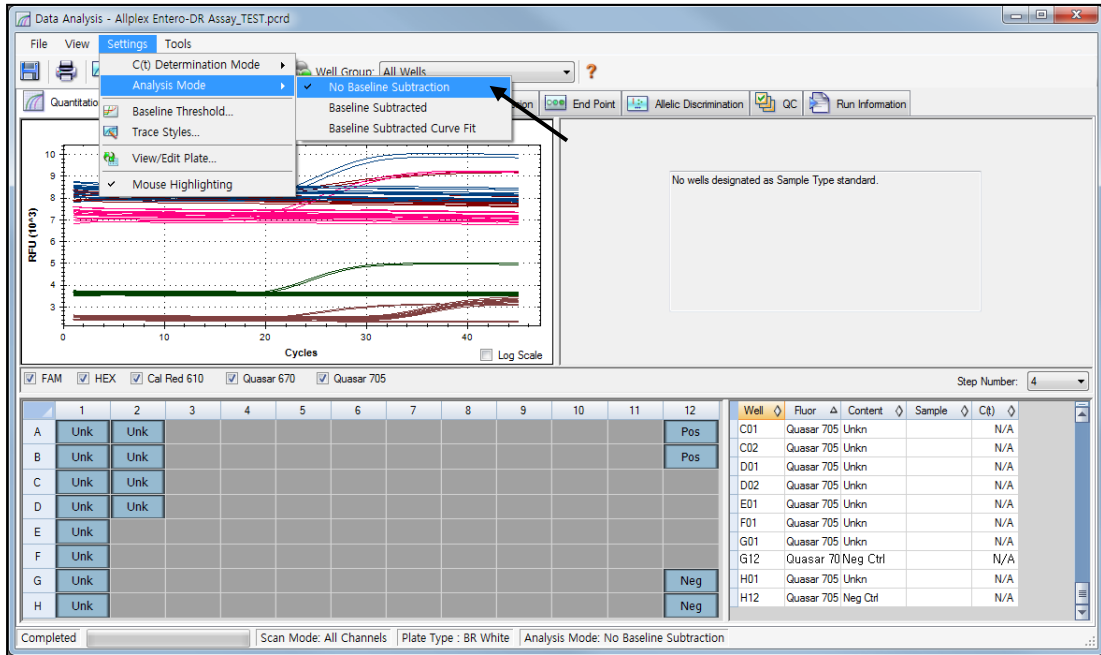


Fig. 10. No Baseline Subtraction (No sustraer línea base)

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

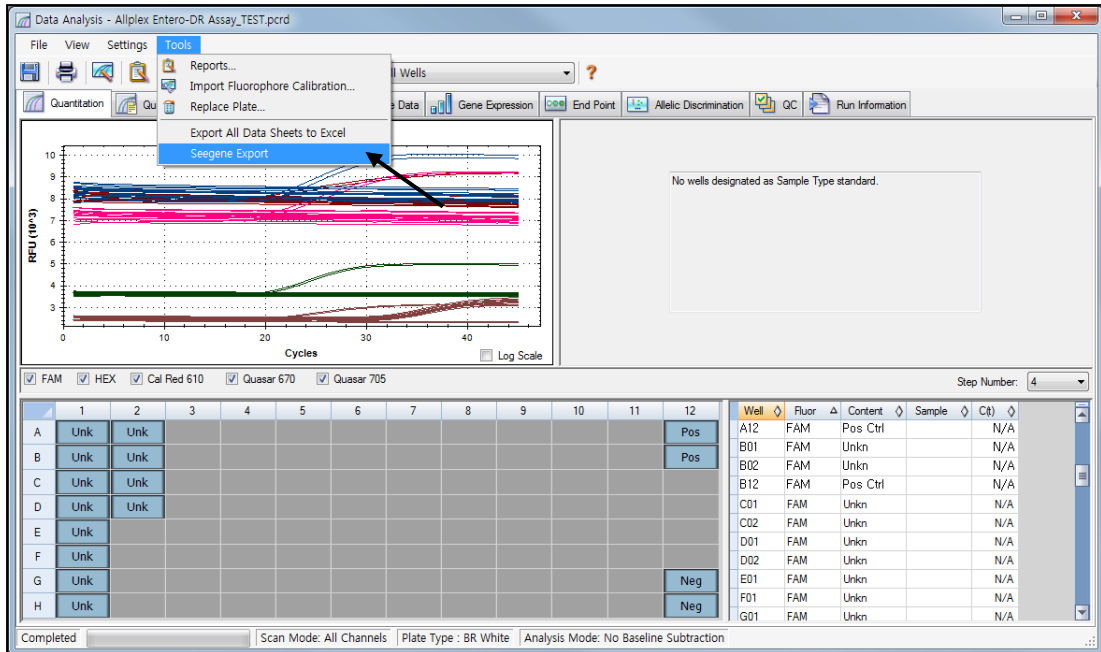


Fig. 11. Seegene Export (Exportación de Seegene)

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

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

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

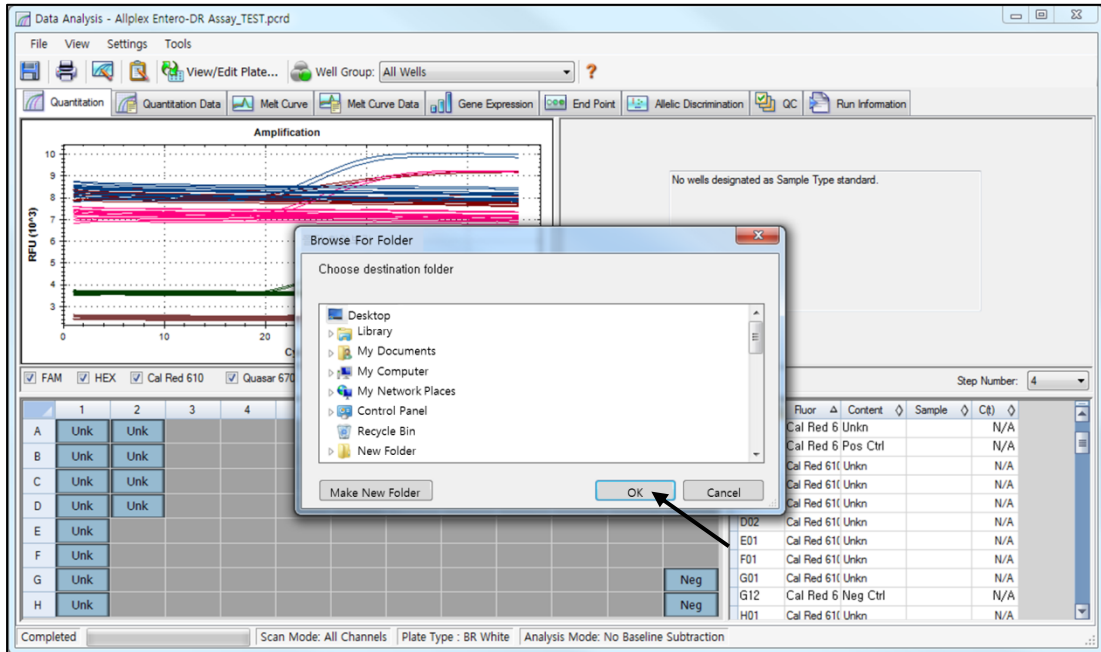


Fig. 12. Seegene Export (Exportación de Seegene) a la carpeta indicada

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

Dr. MARIANA VILA PEREZ
 APODERADA
 BioSystems S.A.

C. Configuración del análisis de datos en Seegene Viewer

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

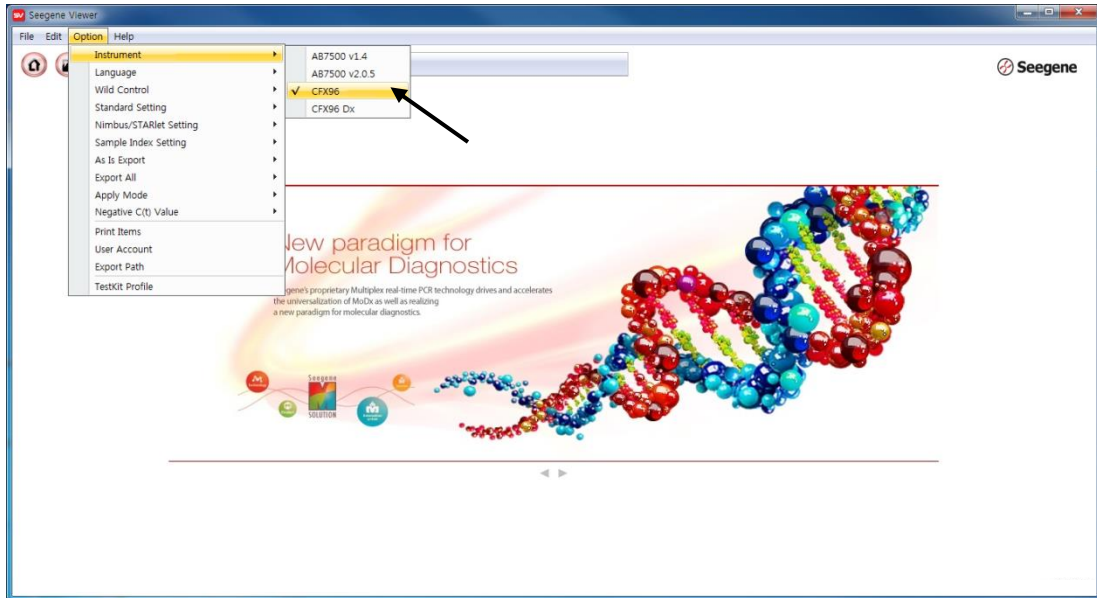


Fig. 13. Seegene Viewer

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

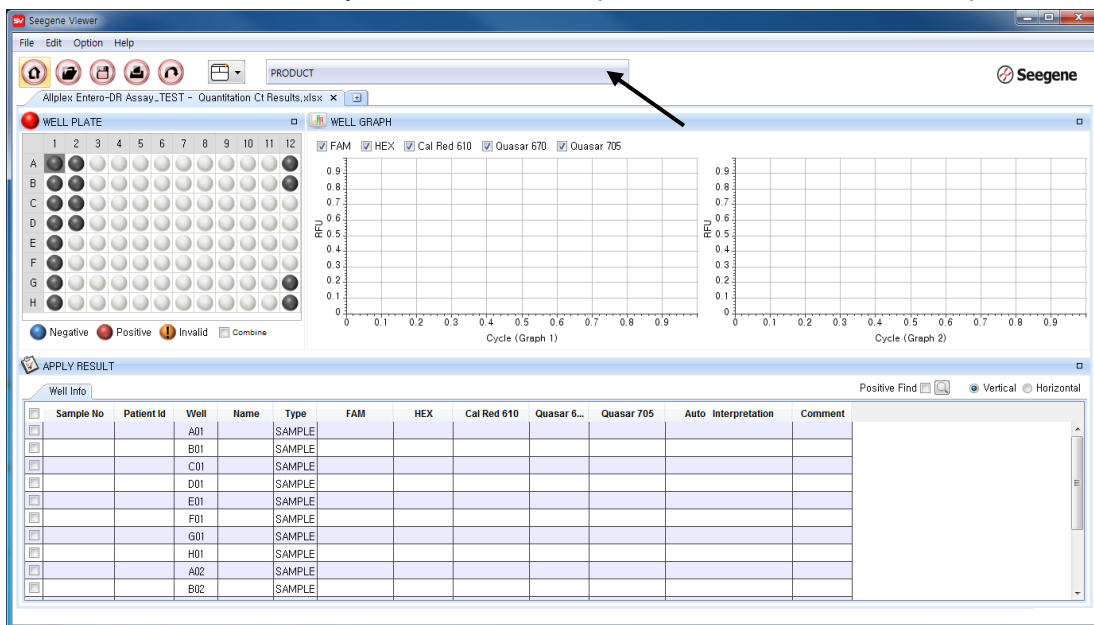


Fig. 14. Configuración del análisis de datos en Seegene Viewer

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17583

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

3) Compruebe el resultado de cada pocillo.

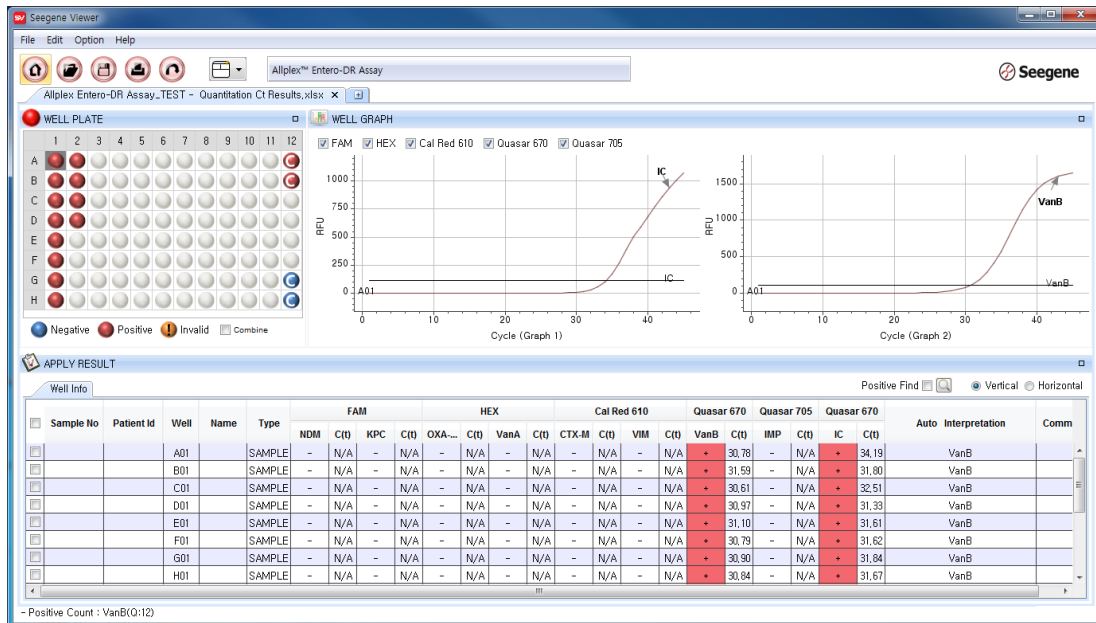


Fig. 15. Resultado de la prueba en Seegene Viewer

4) Criterios de validación de los resultados del control

a. Inicio del ensayo válido

Para confirmar la validez del experimento, la reacción de PCR incluye PC (Control Positivo) y NC (Control Negativo). Se determina que el ciclo de ensayo es válido cuando se cumplen los siguientes criterios:

| Control | Resultado de Seegene Viewer | | | | | | | | | | Interpretación automática | |
|----------------------------|-----------------------------|------|----------|------|------------------|------|----------------|------|----------------|------|---------------------------|--|
| | FAM (Ct) | | HEX (Ct) | | Cal Red 610 (Ct) | | Quasar670 (Ct) | | Quasar705 (Ct) | | | |
| | NDM | KPC | OXA-48 | VanA | CTX-M | VIM | IC | VanB | IMP | | | |
| Entero-DR Control Positivo | ≤ 37 | ≤ 37 | ≤ 37 | ≤ 37 | ≤ 37 | ≤ 37 | ≤ 37 | ≤ 37 | ≤ 37 | ≤ 37 | Control Positivo (+) | |
| Control Negativo | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | Control Negativo (-) | |

b. Inicio de ensayo no válido

En los casos de falla en la validación, los resultados no se deben interpretar ni notificar. Y se debe repetir la reacción del PCR.

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

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

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

2.1. Configuración de los instrumentos de PCR en tiempo real

Nota: La configuración del experimento en el CFX96™ Dx System (Bio-Rad) puede dividirse en tres pasos: Protocol Setup (configuración del protocolo), Plate Setup (configuración de la placa) e Start run (inicio del ciclo).

A. Protocol Setup (Configuración del protocolo)

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

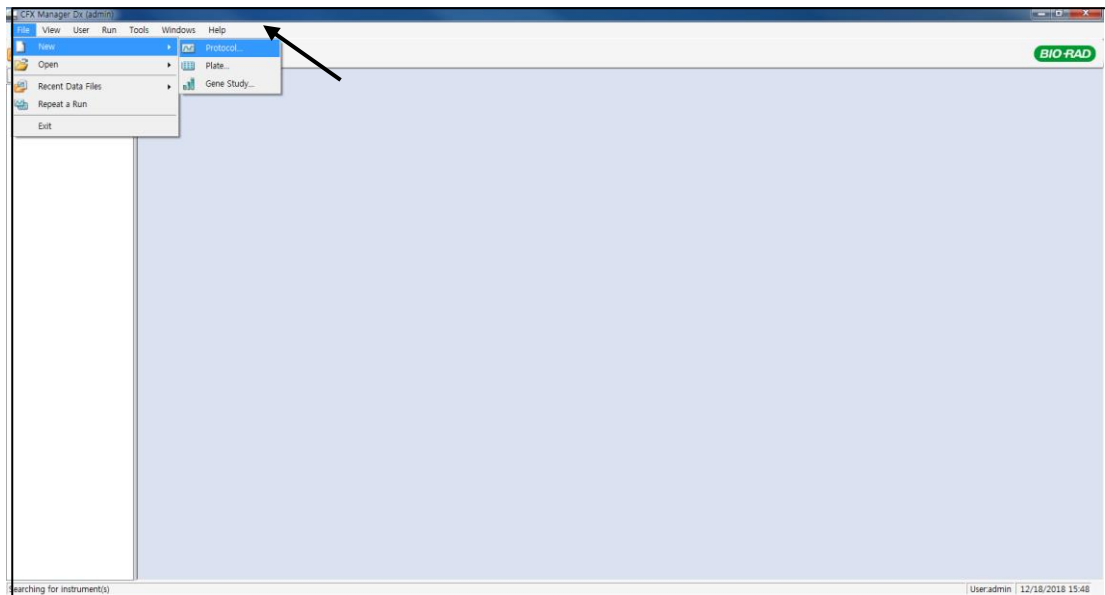


Fig. 1. Protocol Setup (Configuración del protocolo)

- 2) En **Protocol Editor (Editor de protocolo)**, defina el perfil térmico como sigue:

| Paso | Nº. de ciclos | Temperatura | Duración |
|------|-------------------------------------|-------------|----------|
| 1 | 1 | 95°C | 15 min |
| 2 | | 95°C | 10 seg |
| 3* | 45 | 60°C | 15 seg |
| 4* | | 72°C | 10 seg |
| 5 | GOTO (VAYA AL) Paso 2, 44 veces más | | |

Nota*: Lectura de placa en el paso 3 y 4. La fluorescencia se detecta a 60°C y 72°C.

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

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

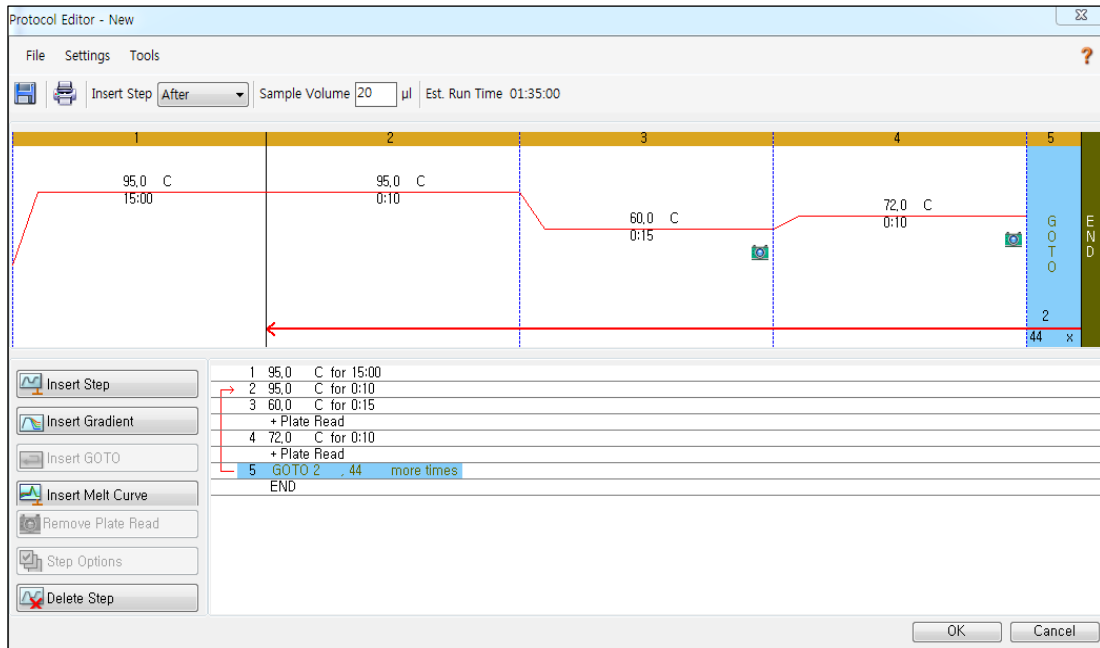


Fig. 2. Protocol Editor (Editor de protocolo)

- 3) Haga clic en el cuadro al lado de **Sample Volume (Volumen de la muestra)** para añadir directamente 20 µL.
- 4) Haga clic en **OK (Aceptar)** y guarde el protocolo para abrir la ventana **Run Setup (Configuración del Ejecutar)**.

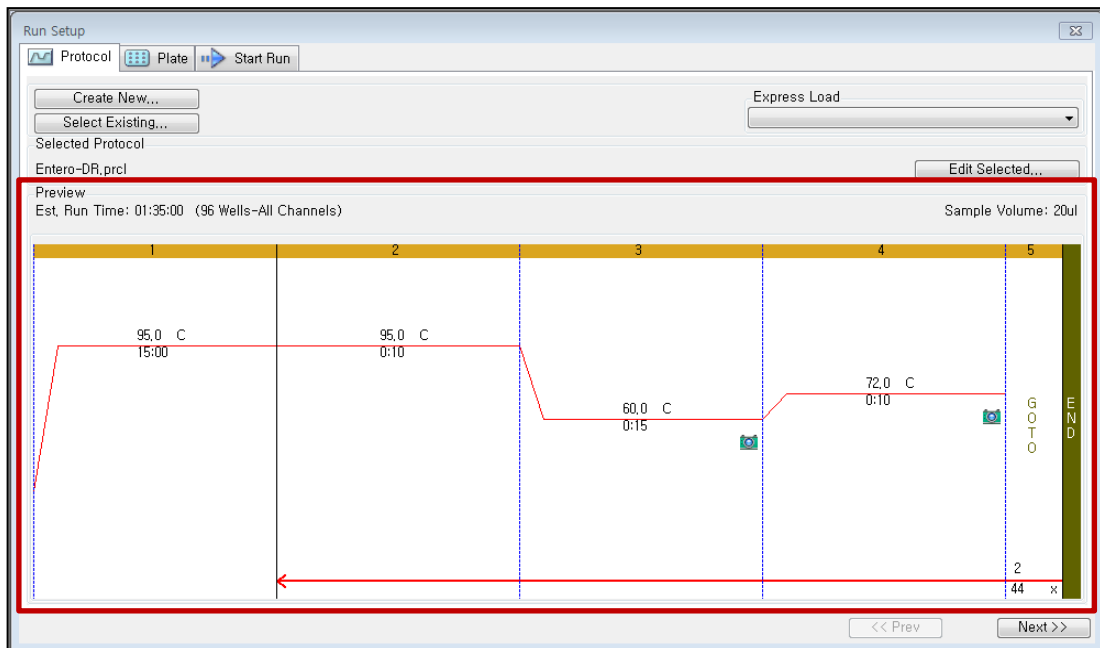


Fig. 3. Run Setup (Configuración del Ejecutar): Protocol (Protocolo)

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

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

B. Plate Setup (Configuración de la placa)

- 1) En la pestaña **Plate (Placa)** en **Run Setup (Configuración del Ejecutar)**, haga clic en **Create New (Crear nuevo)** para abrir la ventana **Plate Editor (Editor de placa)**.

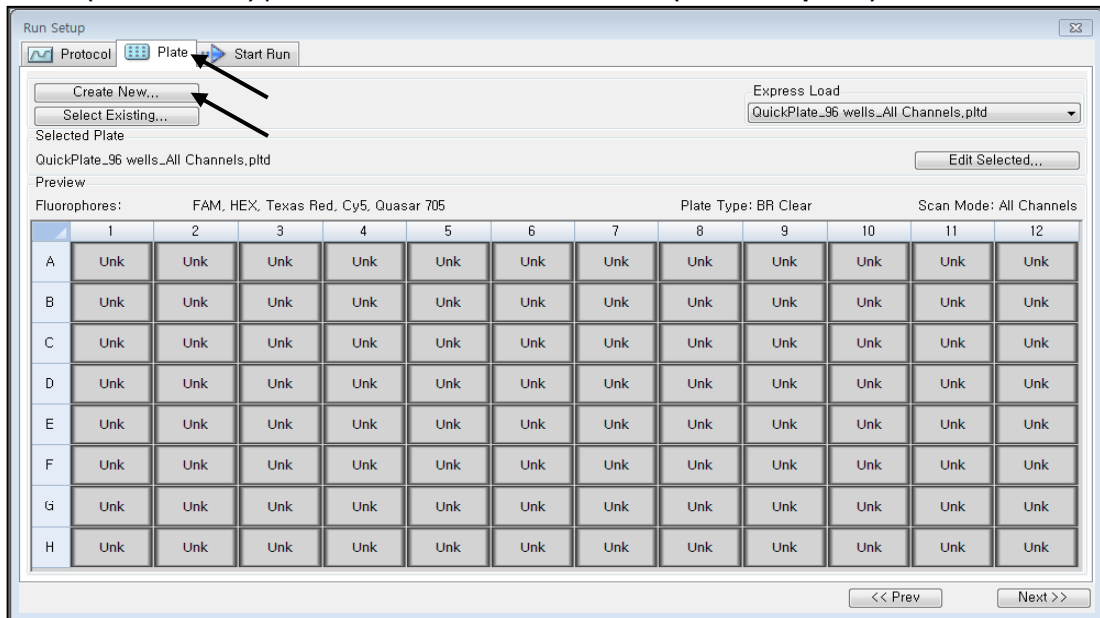


Fig. 4. Plate Editor (Editor de placa)

- 2) Haga clic en **Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos)** para indicar los fluoróforos (**FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 y Quasar 705**) que se van a usar y haga clic en **OK (Aceptar)**.

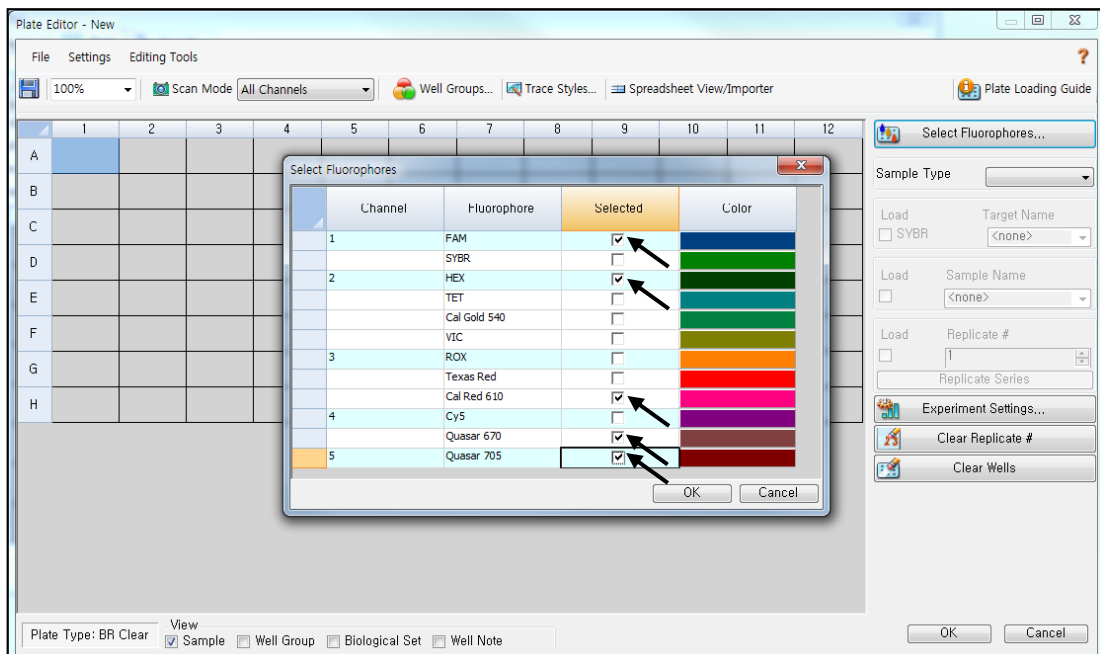


Fig. 5. Select Fluorophores (Seleccionar fluoróforos) (FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 y Quasar 705)

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

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

3) Seleccione los pocillos donde se colocará el tubo de PCR y seleccione sus tipos de muestra en el menú desplegable **Sample Type (Tipo de muestra)**.

- **Unknown (Desconocidos):** muestras clínicas
- **Negative Control (Control negativo)**
- **Positive Control (Control positivo)**

4) Haga clic en las casillas de verificación adecuadas (**FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670, y Quasar 705**) para especificar los fluoróforos que se van a detectar en los pocillos seleccionados.

5) Escriba el **Sample Name (Nombre de la muestra)** y presione la tecla Intro.

6) En **Settings (Configuración)** del menú principal de **Plate Editor (Editor de placa)**, escoja **Plate Size (96 wells) (Tamaño de la placa (96 pocillos))** y **Plate Type (BR White) (Tipo placa (Blanco BR))**.

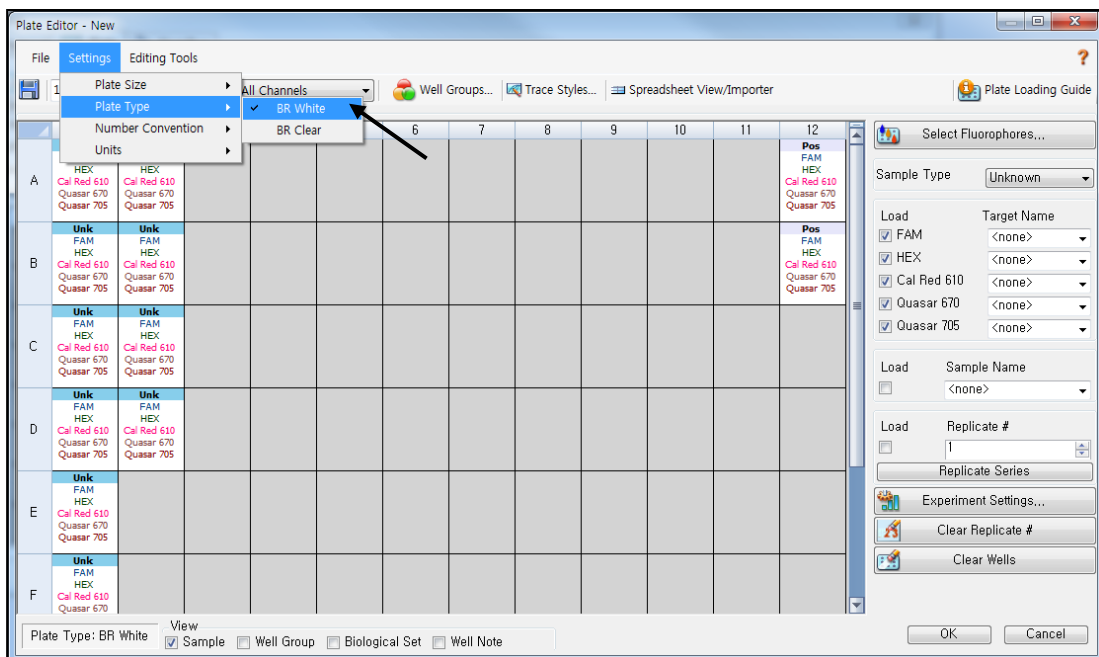


Fig. 6. Plate Setup (Configuración de la placa)

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

8) Regresará a la ventana **Run Setup (Configuración del Ejecutar)**.

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

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

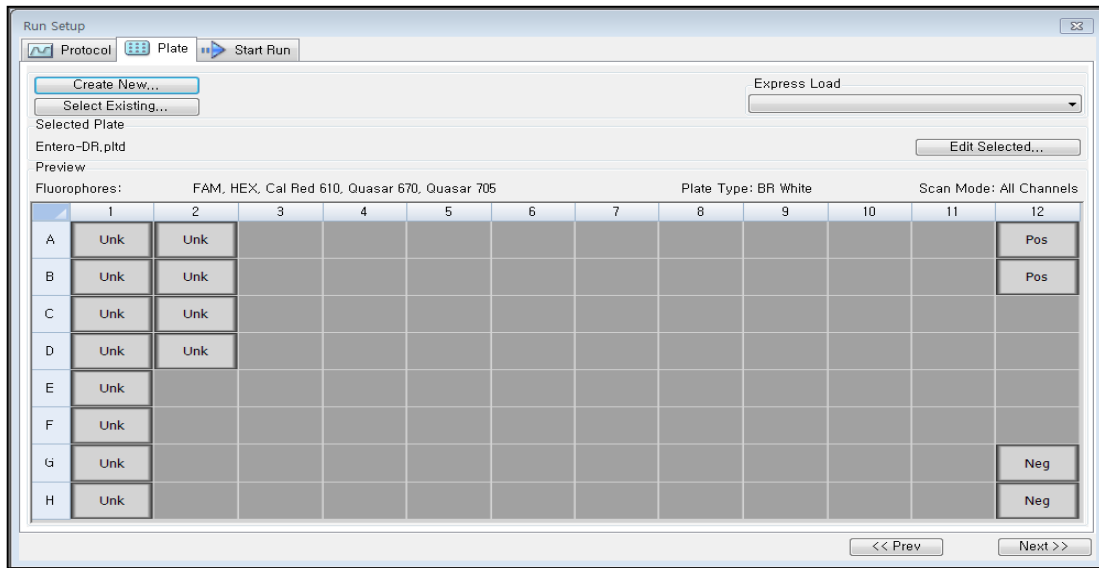


Fig. 7. Run Setup (Configuración del Ejecutar): Plate (Placa)

9) Haga clic en **Next (Siguiente)** para iniciar la ejecución.

C. Start Run (Inicio del ciclo)

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

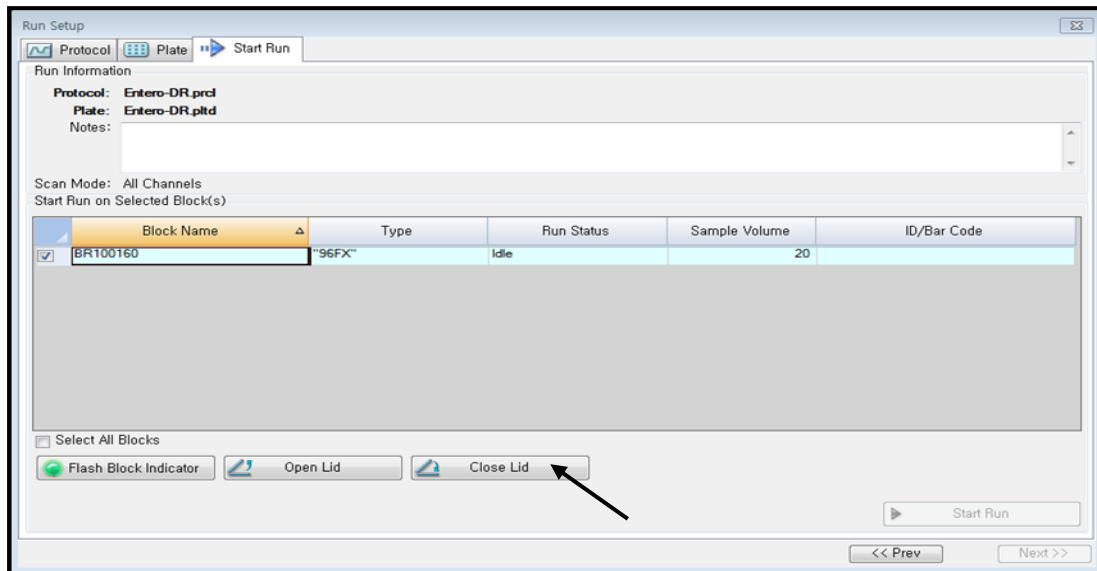


Fig. 8. Close Lid (Cerrar tapa)

2) Haga clic en **Start Run (Inicio de ejecución)**.

3) Almacene el archivo del ensayo en Mis documentos o en una carpeta que especifique.

Introduzca el nombre del archivo, haga clic en **SAVE (GUARDAR)** y se iniciará el ciclo.

2.2 Análisis de datos

A. Crear carpetas para exportar datos

- 1) Cree una carpeta para guardar los datos de todos los pasos de detección de las curvas de amplificación a partir del archivo de resultados.
- 2) El nombre de la carpeta puede ser la que desee el usuario (para la función 'Seegene Export' (Exportación de Seegene), se crearán automáticamente las carpetas "QuantStep3" y "QuantStep4" para guardar los datos de cada curva de amplificación dentro de la carpeta que creó el usuario).

B. Configuración previa para el análisis CFX Manager™

- 1) Después del test, haga clic en la pestaña Quantitation (Cuantificación) para confirmar los resultados de la curva de amplificación.

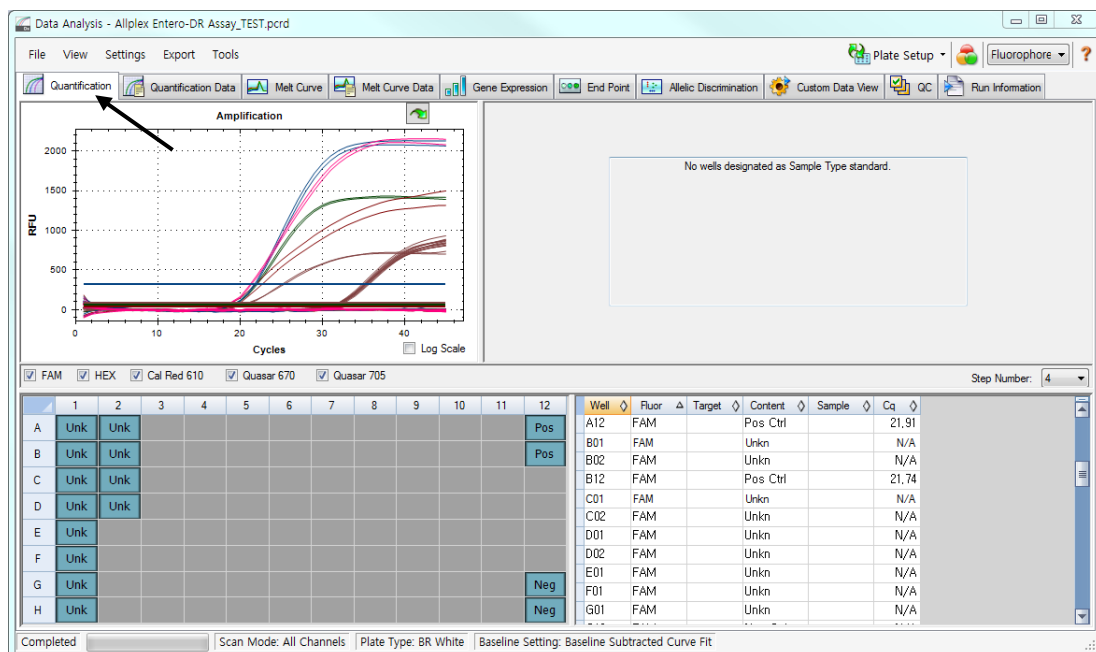


Fig. 9. Resultados de la curva de amplificación

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

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

2) Seleccione **No Baseline Subtraction (No sustraer línea base)** de **Baseline Setting (Configuración de la línea de base)** del Menú de **Settings (Configuración)**.

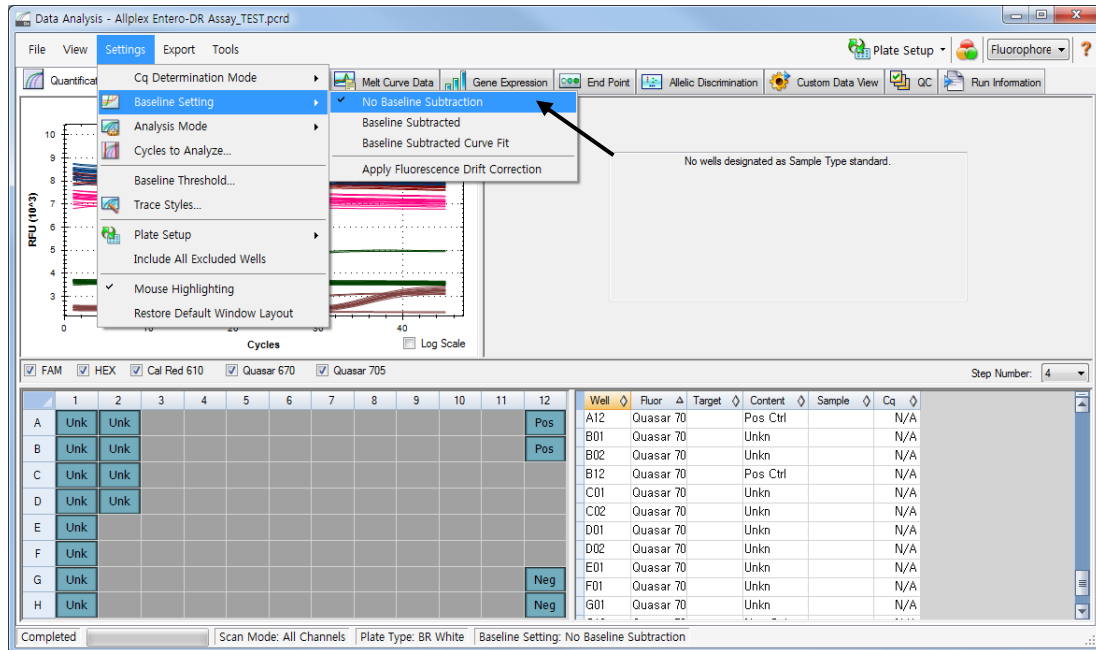


Fig. 10. No Baseline Subtraction (No sustraer línea base)

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

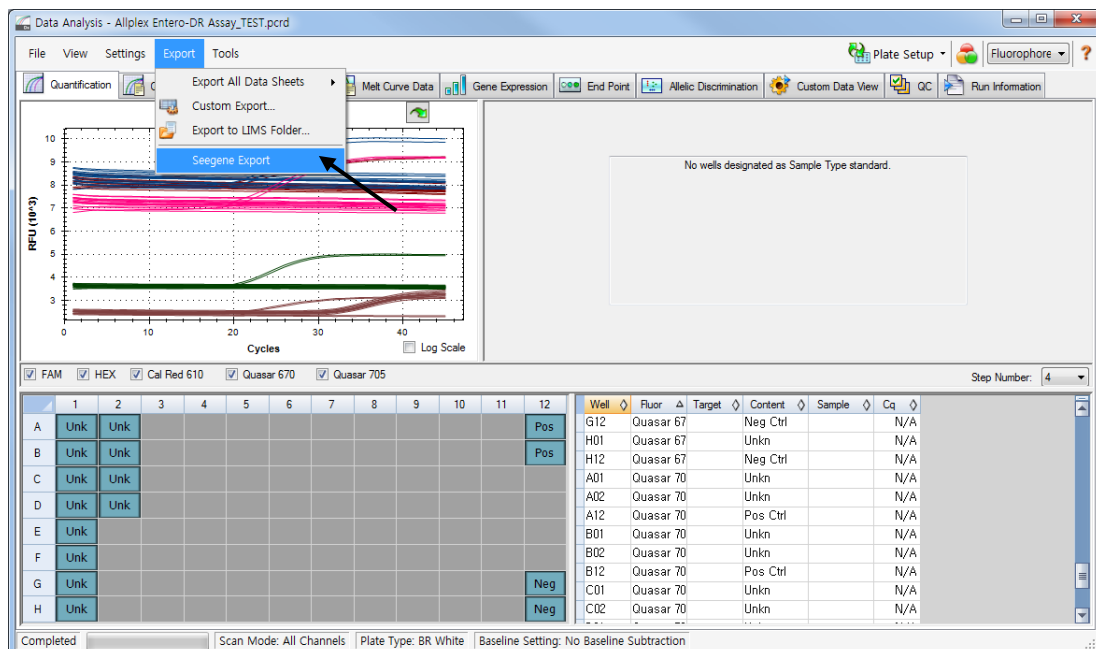


Fig. 11. Seegene Export (Exportación de Seegene)

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

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

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

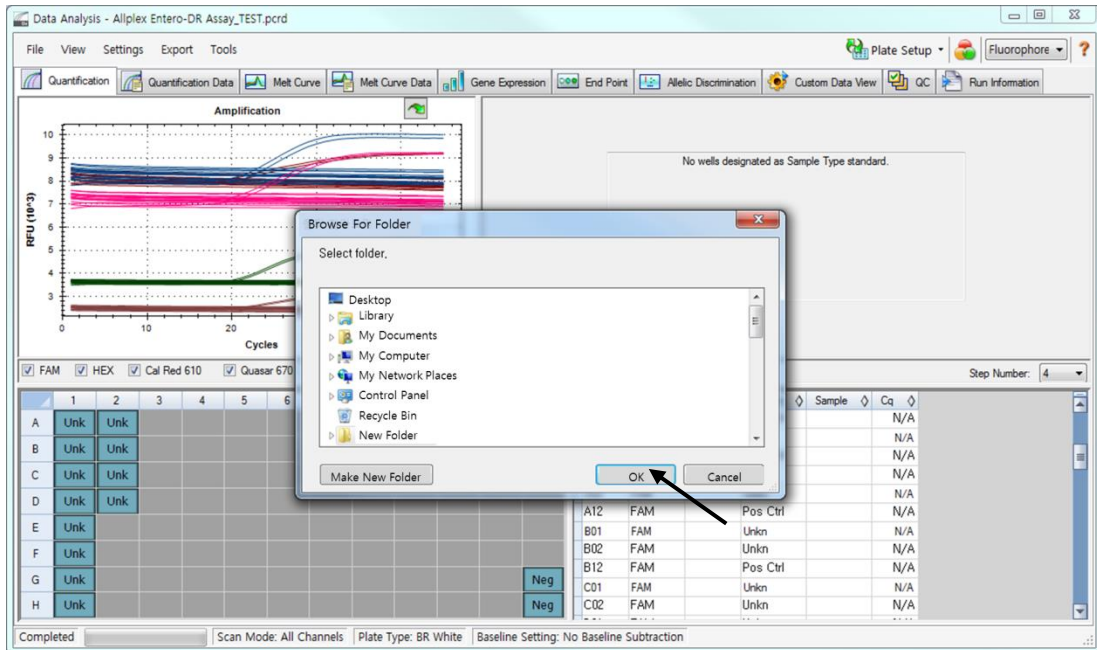


Fig. 12. **Seegene Export (Exportación de Seegene) a la carpeta indicada**

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

Dr. MARIANA VILA PEREZ
 APODERADA
 BioSystems S.A.

C. Configuración del análisis de datos en Seegene Viewer

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

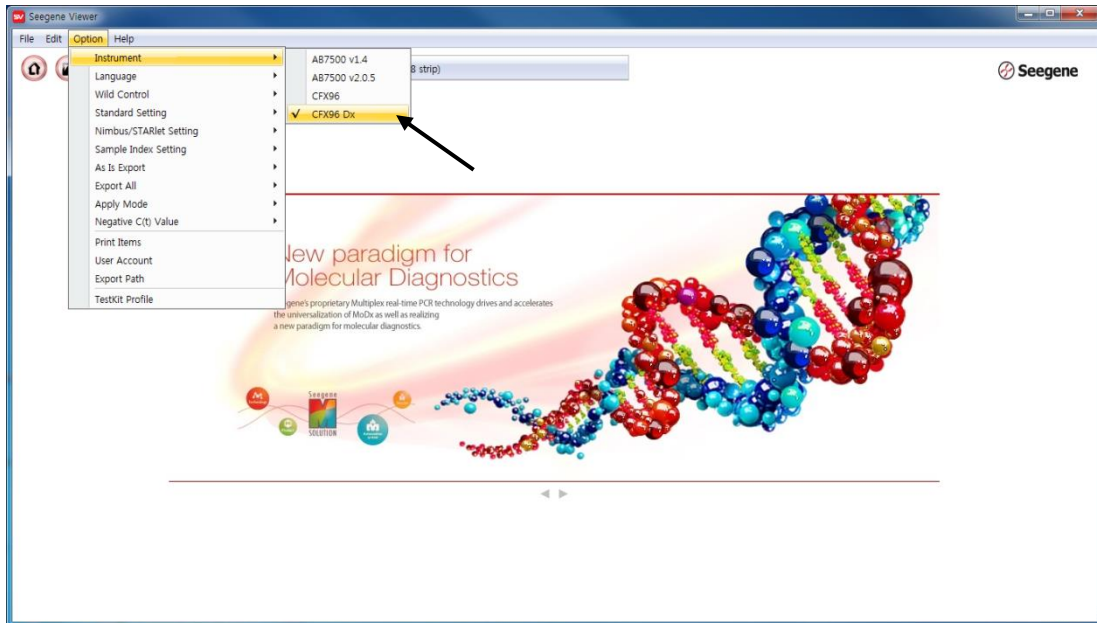


Fig. 13. Seegene Viewer

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

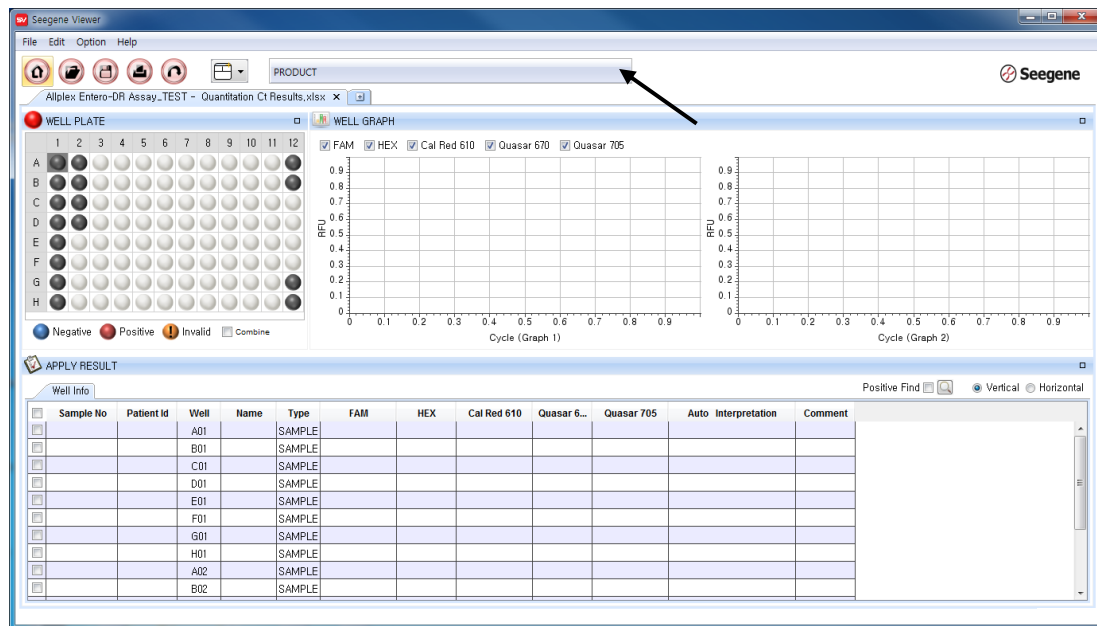


Fig. 14. Configuración del análisis de datos en Seegene Viewer

3) Compruebe el resultado de cada pocillo.

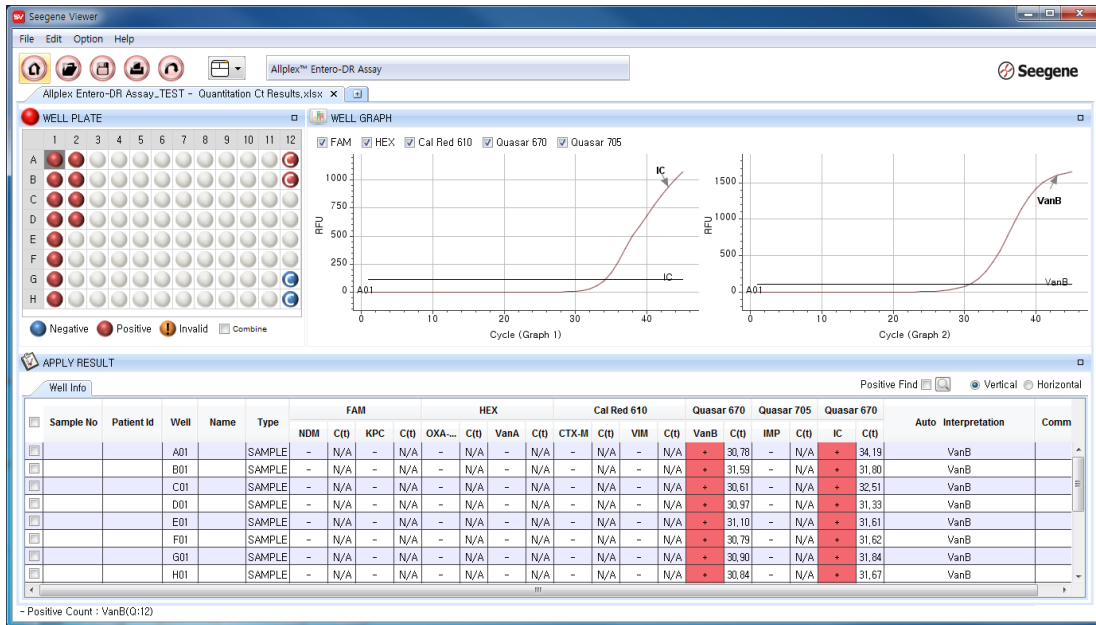


Fig. 15. Resultado de la prueba en Seegene Viewer

4) Criterios de validación de los resultados del control

a. Inicio del ensayo válido

Para confirmar la validez del experimento, la reacción de PCR incluye PC (Control Positivo) y NC (Control Negativo). Se determina que el ciclo de ensayo es válido cuando se cumplen los siguientes criterios:

| Control | Resultado de Seegene Viewer | | | | | | | | | | Interpretación automática |
|----------------------------|-----------------------------|------|----------|------|------------------|------|----------------|------|----------------|------|---------------------------|
| | FAM (Ct) | | HEX (Ct) | | Cal Red 610 (Ct) | | Quasar670 (Ct) | | Quasar705 (Ct) | | |
| | NDM | KPC | OXA-48 | VanA | CTX-M | VIM | IC | VanB | IMP | | |
| Entero-DR Control Positivo | ≤ 37 | ≤ 37 | ≤ 37 | ≤ 37 | ≤ 37 | ≤ 37 | ≤ 37 | ≤ 37 | ≤ 37 | ≤ 37 | Control Positivo (+) |
| Control Negativo | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | Control Negativo (-) |

b. Inicio de ensayo no válido

En los casos de falla en la validación, los resultados no se deben interpretar ni notificar. Y se debe repetir la reacción del PCR.

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

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

RESULTADOS
1. Información de los analitos

| Fluoróforo | Analito | |
|-------------|----------------------|-----------|
| | Gráfico 1 | Gráfico 2 |
| FAM | NDM | KPC |
| HEX | OXA-48 | VanA |
| Cal Red 610 | CTX-M | VIM |
| Quasar 670 | Control Interno (IC) | VanB |
| Quasar 705 | IMP | - |

2. Interpretación de los resultados

| Analito | Valor C _t | Resultado |
|---------|----------------------|------------------|
| Diana | ≤ 37 | Detectado (+) |
| | > 37 o N/A | No detectado (-) |
| IC | ≤ 37 | Detectado (+) |
| | > 37 o N/A | No detectado (-) |

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

Dr. MARINA VILA PEREZ
 APODERADA
 BioSystems S.A.

| Resultado diana | | Resultado IC | Interpretación |
|-----------------|-----------|--------------|--|
| Gráfico 1 | Gráfico 2 | | |
| + | - | + | Ácido nucleico diana, detectado |
| - | + | | |
| + | + | | |
| + | - | - | Ácido nucleico diana, detectado* - Puede(n) estar presente(s) analito(s) adicionales que no se detectaron. |
| - | + | | |
| + | + | | |
| - | - | + | Ácido nucleico diana, no detectado |
| - | - | - | No válido** - Los resultados sugieren una recolección de muestras inadecuada, procesos (es decir, sin agregado de IC exógeno) o presencia de inhibidores. - Repita el test desde la extracción de ácido nucleico usando otra parte alícuota de la muestra original. - Si se muestra el mismo resultado en el ácido nucleico diluido, recoja las muestras nuevamente. |

* El alto nivel de ácidos nucleicos diana puede causar interferencia en la detección y lectura del control interno. La señal IC no válida no indica que los resultados positivos para los objetivos son inválidos.

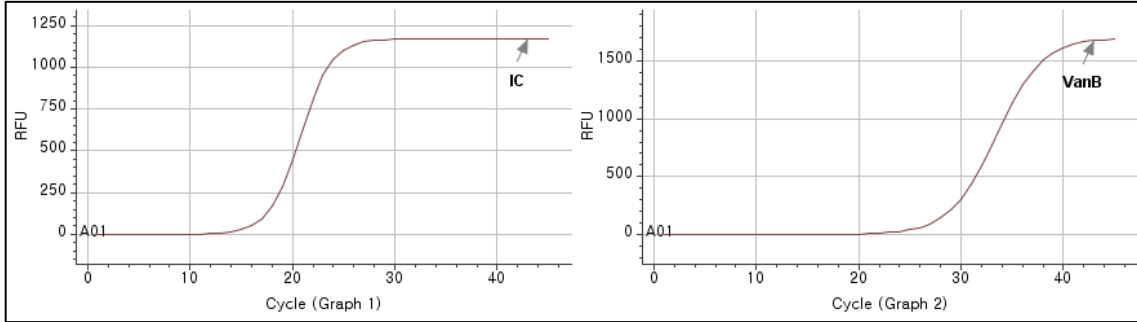
** Consulte la sección de resolución de problemas para obtener instrucciones detalladas.

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

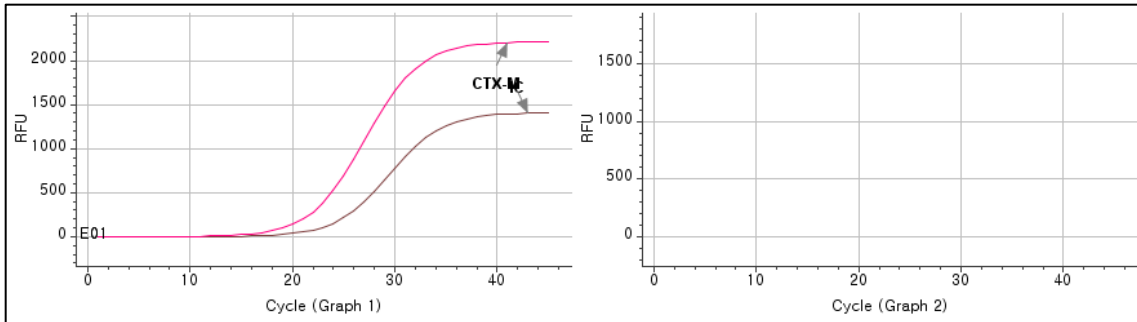
Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

3. Aplicación a muestras clínicas

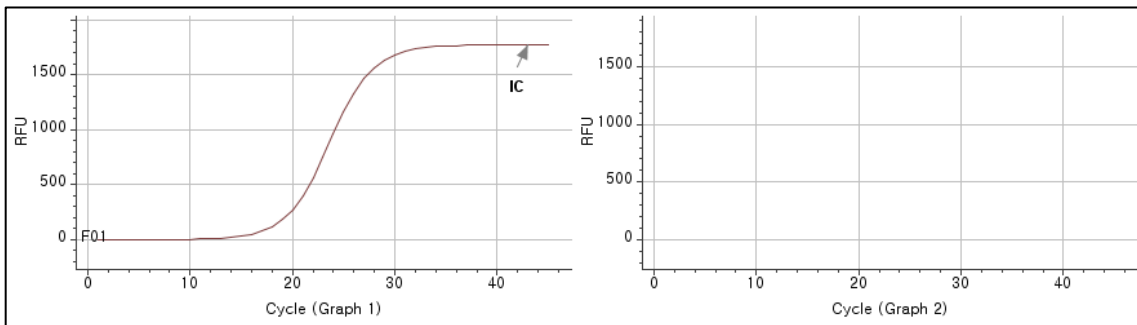
Muestra 1



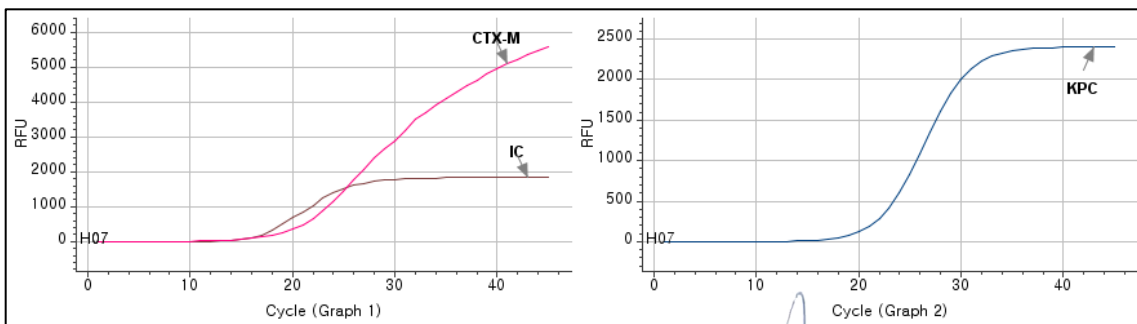
Muestra 2



Muestra 3



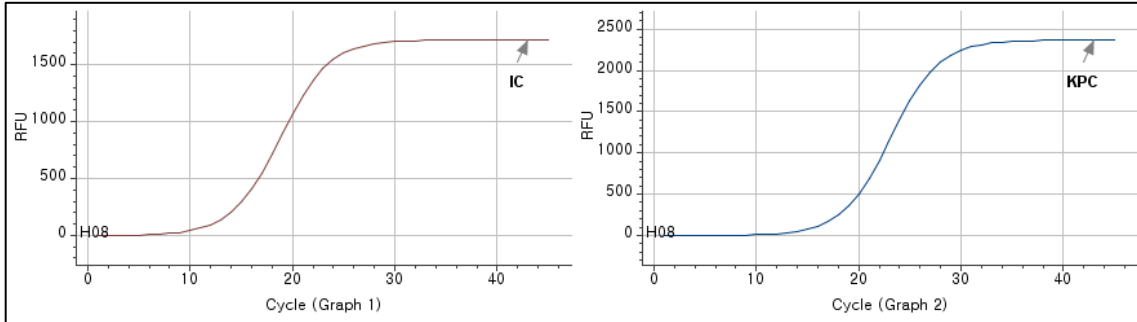
Muestra 4



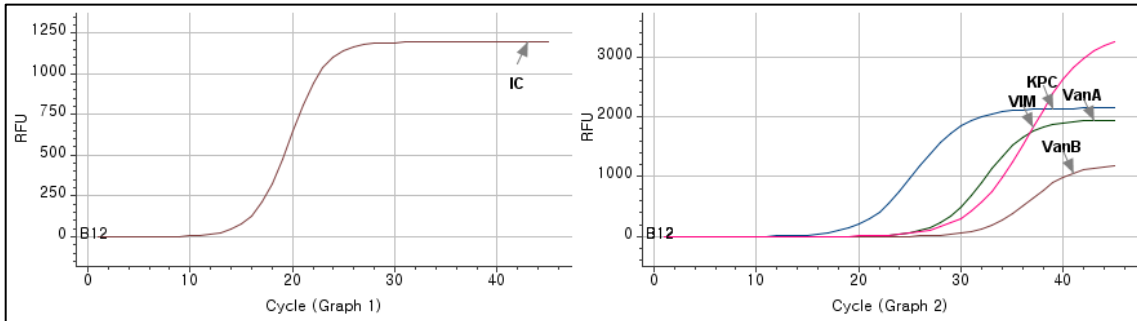
Firma Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17503

Dr. MARINA MILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A. 04/2022 V1.17

Muestra 5



Muestra 6



| Muestra | FAM | | | | HEX | | | | Cal Red 610 | | | | Quasar 670 | | Quasar 705 | | Quasar 670 | | Interpretación Automática |
|---------|-----|-----|-----|-------|--------|-----|------|-------|-------------|-------|-----|-------|------------|-------|------------|-----|------------|-------|---------------------------|
| | NDM | Ct | KPC | Ct | OXA-48 | Ct | VanA | Ct | CTX-M | Ct | VIM | Ct | VanB | Ct | IMP | Ct | IC | Ct | |
| 1 | - | N/A | - | N/A | - | N/A | - | N/A | - | N/A | - | N/A | + | 27.44 | - | N/A | + | 17.28 | VanB |
| 2 | - | N/A | - | N/A | - | N/A | - | N/A | + | 18.43 | - | N/A | - | N/A | - | N/A | + | 23.09 | CTX-M |
| 3 | - | N/A | - | N/A | - | N/A | - | N/A | - | N/A | - | N/A | - | N/A | - | N/A | + | 17.83 | - |
| 4 | - | N/A | + | 19.78 | - | N/A | - | N/A | + | 15.67 | - | N/A | - | N/A | - | N/A | + | 16.02 | KPC,CTX-M |
| 5 | - | N/A | + | 15.95 | - | N/A | - | N/A | - | N/A | - | N/A | - | N/A | - | N/A | + | 12.44 | KPC |
| 6 | - | N/A | + | 18.33 | - | N/A | + | 26.25 | - | N/A | + | 26.85 | + | 31.46 | - | N/A | + | 15.69 | KPC, VanA, VIM, VanB |

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

Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

| Allplex™ Entero-DR Assay | | |
|---|--|--|
| OBSERVACIONES | POSIBLES CAUSAS | SOLUCIÓN |
| No se observa señal | Los fluoróforos del análisis de datos no cumplen con el protocolo | Seleccione los fluoróforos correctos para el análisis de datos. |
| | Configuración incorrecta del termociclador en tiempo real | Compruebe las condiciones del ciclo térmico y repita el test con la configuración adecuada. |
| | Almacenamiento incorrecto o expiración de la fecha de caducidad del kit de la prueba | Compruebe las condiciones de almacenamiento (véase página 9) y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta) del kit de la prueba y use un nuevo kit si fuese necesario. |
| | Fallo en la extracción de ácido nucleico | Si se añadió el IC de forma exógena a la muestra antes de la extracción, la ausencia de señal de IC puede indicar una pérdida de ácido nucleico durante la extracción. Asegúrese de utilizar el método de extracción recomendado. Si es debido a los inhibidores, vuelva a extraer la muestra original o puede diluir la muestra en un tampón de solución salina 1/3 a 1/10 veces y luego añadir Entero-DR IC a la muestra diluida. |
| No se observa señal de Control Interno | Error de muestreo o alta carga de ácido nucleico del patógeno | Si no se observan la señal del patógeno diana ni la de IC, recolecte de nuevo las muestras. Si se observa la señal del patógeno diana, pero no la del IC, entonces la amplificación del IC pudo haberse inhibido por una alta carga del patógeno diana. Para confirmar la señal del IC, diluya la muestra (1/3 a 1/10) en un tampón de solución salina y repita el test desde el paso de extracción. |
| | Presencia de inhibidor PCR | Diluya la muestra (1/3 a 1/10) en un tampón de solución salina y repita el test desde el paso de la extracción. |
| Picos en los ciclos de la curva de amplificación | Burbujas en el tubo de PCR | Centrifugue el tubo de PCR antes del inicio. |

Farm. Eduardo Omar Miguez
BioSystems S.A.
Director Técnico
M.N. 17582

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

| Allplex™ Entero-DR Assay | | |
|--|--|---|
| OBSERVACIONES | POSIBLES CAUSAS | SOLUCIÓN |
| Se observan supuestos falsos positivos o señal(es) diana en el Control Negativo | Contaminación | Descontamine todas las superficies e instrumentos con hipoclorito de sodio y etanol. Use solo puntas de filtro durante el procedimiento y cámbielas entre cada tubo. Repita el procedimiento entero desde la extracción de ácido nucleico con el nuevo conjunto de reactivos. |
| No se observan señales ni supuestos falsos negativos en el Control Positivo | Error en la recogida de muestras | Compruebe el método de recogida de la muestra y vuelva a recogerla. |
| | Almacenamiento incorrecto de la muestra | Vuelva a recoger la muestra y repita todo el procedimiento. Asegúrese de que la muestra se almacena de la manera recomendada. |
| | Error en la extracción de ácido nucleico | Compruebe el procedimiento de extracción del ácido nucleico, así como la concentración de ácido nucleico y vuelva a extraerlo. |
| | Error al añadir ácido nucleico a los tubos de PCR correspondientes | Compruebe los números de muestra de los tubos que contienen el ácido nucleico y asegúrese de añadir ácido nucleico a los tubos de PCR adecuados. Repita cuidadosamente la prueba si fuese necesario. |
| | Presencia de inhibidor | Diluya la muestra (1/3 a 1/10) en un tampón de solución salina y repita el test desde el paso de la extracción. |
| | Mezcla de PCR incorrecta | Confirme que todos los componentes se añadan a la mezcla de PCR (la sensibilidad puede verse afectada por las premezclas anteriormente realizadas). Deben homogeneizarse todos los reactivos y centrifugarse antes de usar. |

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

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

RENDIMIENTO
1. Especificidad

Se probó la reactividad cruzada de Allplex™ Entero-DR Assay utilizando 61 materiales y organismos estándar, como se indica a continuación. Allplex™ Entero-DR Assay identificó dianas específicas, diseñadas para la detección.

| N°. | Organismo | Fuente | Aislado N°. | Resultado [†] |
|-----|---|--------|-------------|-------------------------|
| 1 | <i>Escherichia coli</i> | NCTC | 13461 | CTX-M Detectado |
| 2 | <i>Escherichia coli</i> | NCTC | 13462 | CTX-M Detectado |
| 3 | <i>Escherichia coli</i> | NCTC | 13463 | CTX-M Detectado |
| 4 | <i>Enterobacter cloacae</i> | NCTC | 13464 | CTX-M Detectado |
| 5 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | NCTC | 13465 | CTX-M Detectado |
| 6 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | NCTC | 13438 | KPC Detectado |
| 7 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | NCTC | 13437 | VIM Detectado |
| 8 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | NCTC | 13439 | VIM Detectado |
| 9 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | NCTC | 13442 | OXA-48 Detectado |
| 10 | <i>Escherichia coli</i> | NCTC | 13476 | IMP Detectado |
| 11 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ATCC | BAA-1705 | KPC Detectado |
| 12 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ATCC | BAA-2146 | NDM, CTX-M Detectado |
| 13 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Pneumoniae</i> | ATCC | BAA-2524 | OXA-48 Detectado |
| 14 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ATCC | BAA-1706 | KPC, VanA Detectado |
| 15 | <i>Escherichia coli</i> | ATCC | BAA-2523 | OXA-48, CTX-M Detectado |
| 16 | <i>Enterococcus faecium</i> | ATCC | 700221 | VanA Detectado |
| 17 | <i>Enterococcus faecalis</i> | KCCM | 41578 | VanB Detectado |
| 18 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | KCCM | 35401 | Not Detectado |
| 19 | Adenovirus type 1 | ATCC | VR-1 | No detectado |
| 20 | Adenovirus type 40 | ATCC | VR-931 | No detectado |
| 21 | Adenovirus type 41 (Tak) | ATCC | VR-930 | No detectado |
| 22 | <i>Campylobacter jejuni</i> | ZMC | 0801650 | No detectado |

| N°. | Organismo | Fuente | Aislado N°. | Resultado [†] |
|-----|--|--------|-------------|------------------------|
| 23 | <i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar E) | ATCC | VR-348B | No detectado |
| 24 | <i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar F) | ATCC | VR-346 | No detectado |
| 25 | <i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar G) | ATCC | VR-878 | No detectado |
| 26 | <i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar H) | ATCC | VR-879 | No detectado |
| 27 | <i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar I) | ATCC | VR-880 | No detectado |
| 28 | <i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar J) | ATCC | VR-886 | No detectado |
| 29 | <i>Chlamydia trachomatis</i> (serovar K) | ATCC | VR-887 | No detectado |
| 30 | <i>Citrobacter freundii</i> | KCCM | 11931 | No detectado |
| 31 | <i>Clostridium difficile</i> | KCTC | 5009 | No detectado |
| 32 | <i>Clostridium perfringens</i> | KCTC | 3269 | No detectado |
| 33 | <i>Enterobacter aerogenes</i> | KCCM | 12177 | No detectado |
| 34 | <i>Enterobacter cloacae</i> | KACC | 11403 | No detectado |
| 35 | <i>Enterobacter gergoviae</i> | KCTC | 12555 | No detectado |
| 36 | <i>Enterobacter sakazakii</i> | KCTC | 2949 | No detectado |
| 37 | <i>Enterococcus faecalis</i> | KCTC | 3511 | No detectado |
| 38 | <i>Enterococcus faecium</i> | KCCM | 12118 | No detectado |
| 39 | <i>Enterococcus gallinarum</i> | ATCC | BAA-748 | No detectado |
| 40 | <i>Escherichia coli</i> O157 | ZMC | 801622 | No detectado |
| 41 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | KCTC | 2952 | No detectado |
| 42 | <i>Morganella morganii</i> | KCCM | 11497 | No detectado |
| 43 | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | ZMC | 801482 | No detectado |
| 44 | Norovirus Group 1 | ZMC | 0810086CF | No detectado |
| 45 | Norovirus Group 2 | ZMC | 0810087CF | No detectado |
| 46 | <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> | KCTC | 5182 | No detectado |
| 47 | <i>Proteus rettgeri</i> | KCCM | 41092 | No detectado |
| 48 | <i>Providencia alcalifaciens</i> | KCCM | 40889 | No detectado |
| 49 | <i>Providencia rettgeri</i> | KCCM | 40131 | No detectado |

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

Dr. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

| N°. | Organismo | Fuente | Aislado N°. | Resultado [†] |
|-----|--------------------------------|--------|-------------|------------------------|
| 50 | <i>Providencia stuartii</i> | KCCM | 41091 | No detectado |
| 51 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | KCTC | 2004 | No detectado |
| 52 | Rotavirus | ATCC | VR-47 | No detectado |
| 53 | <i>Salmonella enterica</i> | ZMC | 801437 | No detectado |
| 54 | <i>Shigella flexnri Z046</i> | ZMC | 801757 | No detectado |
| 55 | <i>Shigella sonnei Z004</i> | ZMC | 801627 | No detectado |
| 56 | <i>Ureaplasma urealyticum</i> | ATCC | 27618 | No detectado |
| 57 | <i>Vibrio cholera</i> | ZMC | 801901 | No detectado |
| 58 | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | KCTC | 2729 | No detectado |
| 59 | <i>Yersinia bercovieri</i> | ATCC | 43970 | No detectado |
| 60 | <i>Yersinia enterocolitica</i> | KCCM | 41657 | No detectado |
| 61 | <i>Yersinia rohdei</i> | ATCC | 43380 | No detectado |

[†] Los tests especificados se repitieron 3 veces.

- ※ ATCC: American Type Culture Collection
- KACC: Korean Agricultural Culture Collection
- KCTC: Korean Collection for Type Culture
- KCCM: Korean Culture Center of Microorganisms
- ZMC: ZeptoMetrix Corporation
- NCTC: National Collection of Type Cultures

2. Sensibilidad

La sensibilidad se define como la concentración más baja de organismo que se puede detectar consistentemente ($\geq 95\%$ de los resultados positivos entre todas las muestras analizadas). Se confirmó cuando se obtuvieron los resultados correctos de organismo/ensayo de al menos 24 de las 24 muestras (24/24 = 100%) evaluadas.

La sensibilidad de Allplex™ Entero-DR Assay se determinó utilizando muestras adulteradas de DNA plasmídico diana (de 10^7 a 10^0 copias/reacción). El límite de detección para el Allplex™ Entero-DR Assay fue de 100 copias/reacción.

3. Reproducibilidad

Se preparó el panel de reproducibilidad de 24 analitos simulados que incluía muestras muy negativas (0,1X LoD), poco positivas (1X LoD) y ligeramente positivas (3X LoD). En cada centro de pruebas se analizó el panel durante cinco días, dos operadores diferentes llevaron a cabo dos ciclos cada día y triplicaron el ciclo de cada panel a partir de una extracción. Se analizó con un único lote de Allplex™ Entero-DR Assay en tres centros diferentes y con tres lotes en un centro interno. Se observaron tasas positivas de cada analito para el estudio de reproducibilidad: 100,0% de muestras ligeramente positivas, $\geq 100\%$ de muestras poco positivas y $\geq 4,4\%$ de muestras muy negativas.

La reproducibilidad del ensayo Allplex™ Entero-DR Assay se evaluó entre corridas, sitios y lotes de productos. Las tasas positivas para todas las concentraciones y valores CV cumplieron los criterios de menos de 10 (<10).

Los resultados se cumplieron con los criterios establecidos anteriormente, confirmando así los rendimientos reproducibles del Allplex™ Entero-DR Assay.

4. Sustancias interferentes

Esta prueba se llevó a cabo usando sustancias interferentes compuestas por 9 sustancias para confirmar el rendimiento de Allplex™ Entero-DR Assay en la presencia de potenciales sustancias interferentes. El resultado no se vio afectado al añadir las sustancias: ni detección no específica ni inhibición en la amplificación objetiva. Teniendo en cuenta los resultados, las 9 sustancias interferentes no afectaron los resultados de Allplex™ Entero-DR Assay.

| N°. | Sustancias interferentes | Concentration |
|-----|----------------------------|-----------------|
| 1 | Hemoglobin human | 2 g/L |
| 2 | Triglyceride (Intralípido) | 37 mmol/L |
| 3 | Conjugated Bilirubin | 342 μ mol/L |
| 4 | Mucin | 3 mg/mL |
| 5 | barium sulfate | 5 mg/mL |
| 6 | Mineral oil | 2% (v/v) |
| 7 | Loperamide | 0.005 mg/mL |
| 8 | Pepto-Bismol | 0.175 mg/mL |
| 9 | metronidazole | 701 μ mol/L |

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

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

REFERENCIAS




















1. A. Antonelli, F. Arena, T. Giani, O. L. Colavecchio, S. V. Valeva, S. Paule, P. Boleij, G. M. Rossolini. [Performance of the BD MAX™ instrument with Check-Direct CPE real-time PCR for the detection of carbapenemase genes from rectal swabs, in a setting with endemic dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae] *Diagn Microbiol Infect Dis.* (2016) 86(1):30-34
2. Antibiotic Resistant Organisms Prevention and Control Guidelines for Healthcare Facilities. PICNet. (2013)
3. B. Li. [A New Lab Developed Real Time PCR Assay for Direct Detection of C. Difficile from Stool Sample without DNA Extraction] *Int J Biomed Sci.* (2016) 12(3):83-88
4. R. Cantón, M. Akóva, Y. Carmeli, C. G. Giske, Y. Glupczynski, M. Gniadkowski, D. M. Livermore, V. Miriagou, T. Naas, G. M. Rossolini, Ø. Samuelsen, H. Seifert, N. Woodford, P. Nordmann. [Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe] *Clin. Microbiol. Infect.* (2012) 18(5):413–431
5. H. E. Sidjabat, W. Kamolvit, A. Wailan, D. L. Paterson. [Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria] *MICROBIOLOGY AUSTRALIA.* (2013) 34(1):43-46
6. D. M. Livermore, R. Canton, M. Gniadkowski, P. Nordmann, G. M. Rossolini, G. Arlet, J. Ayala, T. M. Coque, I. Kern-Zdanowicz, F. Luzzaro, L. Poirel, N. Woodford. [CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe] *J. Antimicrob. Chemother.* (2007) 59(2):165-174
7. M. I. Hassan, K. R. Alkharsah, A. J. Alzahrani, O. E. Obeid, A. H. Khamis, A. Diab. [Detection of extended spectrum beta-lactamases-producing isolates and effect of AmpC overlapping] *J Infect Dev Ctries.* (2013) 7(8):618-629
8. P. Nordmann, T. Naas, L. Poirel. [Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae] *Emerg. Infect. Dis.* (2011) 17(10):1791–1798
9. P. Nordmann, L. Dortet, L. Poirel. [Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm] *Trends Mol Med.* (2012) 18(5):263-272
10. S. Glisovic, S. Eintracht, Y. Longtin, M. Oughton, I. Brukner. [Rectal swab screening assays of public health importance in molecular diagnostics: Sample adequacy control] *J Infect Public Health.* (2018) 11(2):234-237
11. J. Kim, H. S. Kim, H. Kim, J. Kim, W. Song, K. M. Lee, S. Lee, K. U. Park, W. Lee, Y. J. Hong. [Evaluation of an Immunochromatographic Assay for the Rapid and Simultaneous Detection of Rotavirus and Adenovirus in Stool Samples] *Ann Lab Med* (2014) 34(3):216-222
12. J. E. Koenig, A. Spor, N. Scalfone, A. D. Fricker, J. Stombaugh, R. Knight, L. T. Angenent, R. E. Ley. [Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome] *PNAS* (2011) 108(Suppl 1):4578–4585
13. J. S. Ko. [The intestinal microbiota and human disease] *The Korean Journal of Gastroenterology* (2013) 62(2):85-91

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

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

SÍMBOLOS

Clave sobre los símbolos que se han usado en el manual y las etiquetas

| Símbolo | Explicación |
|---|--|
|  | Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i> |
|  | Código de lote |
|  | Número de catálogo |
|  | Utilizar por fecha |
|  | Límite superior de temperatura |
|  | Mezcla de oligonucleotidos para amplificación y detección |
|  | Mezcla de enzimas |
|  | Tampón |
|  | RNase-free Water |
|  | Control Positivo (PC) |
|  | Control Interno (IC) |
|  | Consulte las instrucciones de uso |
|  | Fabricante |
|  | Fecha de fabricación |
|  | Representante autorizado en la Comunidad Europea |
|  | Precaución |
|  | Contiene suficiente para <n> pruebas |
|  | Identificador único del dispositivo |
|  | Código de barras de reacción para sistema de extracción automatizada |

INFORMACIÓN DE PEDIDO

| Cat. N°. | Producto | Tamaño |
|--|--|-----------------|
| Allplex™ series | | |
| CR9700Y | Allplex™ Entero-DR Assay | 50 rxns |
| CR9700X | Allplex™ Entero-DR Assay | 100 rxns |
| CR10384Z | Allplex™ Entero-DR Assay | 25 rxns |
| Productos accesorios | | |
| SG1701 | Ribo_spin vRD (Viral RNA/DNA Extraction Kit) | 50 preps |
| 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 |
| SG72100 | AIOS | EA |
| 744300.4.UC384 | STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit | 384T / 1box |
| EX00013C | STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit | 384T / 1box |
| SG71100 | SEEPREP32 | EA |
| EX00009P | STARMag 96 ProPrep (Plate Type) | 96T / 1box |
| EX00009T | STARMag 96 ProPrep (Tube Type) | 96T / 1box |
| EX00017P | STARMag 96 ProPrep C (Plate Type) | 96T / 1box |
| EX00017T | STARMag 96 ProPrep C (Tube Type) | 96T / 1box |
| 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 |

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

Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

ROTULOS "Allplex™ Entero-DR Assay"

Rotulo Externo: Allplex™ Entero-DR Assay (CR10384Z) x 25 determinaciones:


UDI

Allplex™ **CE 2797** **IVD**

Entero-DR Assay

REF CR10384Z **Σ** 25

LOT CR0121A01

    -20°C

2021-12-31 2021-01-01

EC REP **MT Promedt Consulting GmbH**
Altenhofstrasse 80, D-66386
St. Ingbert, Germany

Allplex™
Entero-DR Assay

(01) 08809240101063 (11) 210101
(17) 211231 (10) CR0121A01

Information of components included in kit

- 1 vial of Entero-DR MOM
- 1 vial of EM4
- 1 vial of EM4 Buffer
- 1 vial of Entero-DR PC
- 1 vial of Entero-DR IC
- 1 vial of RNase-free Water



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-626-213

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

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Rótulos Internos

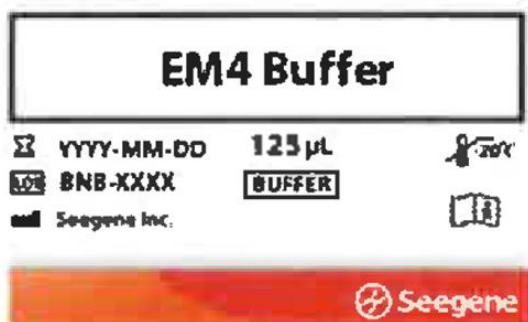
1) Entero-DR MOM



2) EM4



3) EM4 Buffer



4) Entero-DR PC



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

Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

5) Entero-DR IC

Allplex™

Entero-DR Assay

Entero-DR IC CONTROL IC

YYYY-MM-DD 1,000 µL

CR9700X IC-XXXX

Seegene Inc.

MT Promedix



6) RNase-free Water

RNase-free Water WATER

YYYY-MM-DD 1 mL

RWA-XXXX

Seegene Inc.



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

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Rotulo Externo: Allplex™ Entero-DR Assay (CR9700X) x 100 determinaciones:

Allplex™ CE IVD

Entero-DR Assay

REF CR9700X Σ 100

LOT CR0221A01

2021-12-31 2021-01-01

EC REP MT Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80, D-66386
St. Ingbert, Germany

Allplex™
Entero-DR Assay
(only for NIMBUS, STARlet)

UDI
(01) 08808240101070 (11) 210101
(17) 211231 (10) CR0221A01

Information of components included in kit

- 1 vial of Entero-DR MOM
- 1 vial of EM4
- 1 vial of EM4 Buffer
- 1 vial of Entero-DR PC
- 1 vial of Entero-DR IC
- 1 vial of RNase-free Water



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-626-213

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

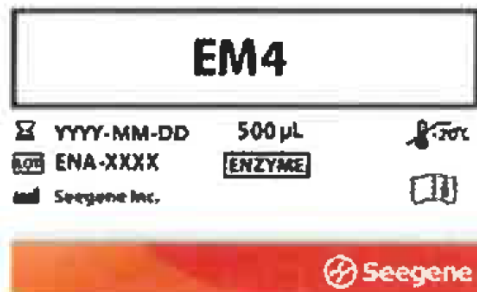
Dra. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

Rótulos Internos

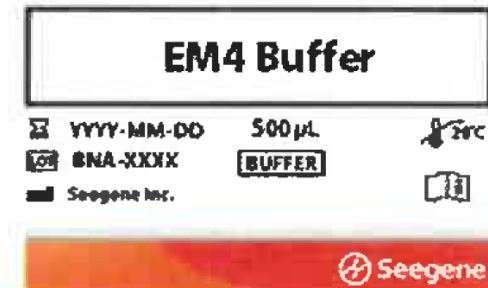
1) Entero-DR MOM



2) EM4



3) EM4 Buffer



4) Entero-DR PC



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

Dra. MARINA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.

5) Entero-DR IC

Allplex™

Entero-DR Assay

Entero-DR IC **CONTROL IC**

📅 YYYY-MM-DD 1,000 µL 📖 🚫

📦 CR9700X IC-XXXX

🏢 Seegene Inc.

📄 MT Promedix



6) RNase-free Water

RNase-free Water **WATER**

📅 YYYY-MM-DD 1 mL 🚫

📦 RWA-XXXX

🏢 Seegene Inc.



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

Dr. MARIANA VILA PEREZ
APODERADA
BioSystems S.A.



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: BIOSYSTEMS S.A.

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 56 pagina/s.

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.04.15 10:57:40 -03:00

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.04.15 10:57:41 -03:00



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Certificado - Redacción libre

Número:

Referencia: 1-0047-3110-000649-24-5

**CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN
PRODUCTO MÉDICO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO**

Expediente N° 1-0047-3110-000649-24-5

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que de acuerdo con lo solicitado por BioSystems S.A. ; se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), de un nuevo producto con los siguientes datos identificatorios característicos:

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

Nombre Descriptivo: Allplex™ Entero-DR Assay

Marca comercial: Seegene

Modelos:

- 1) Allplex™ Entero-DR Assay (CR10384Z) x 25 determinaciones.
- 2) Allplex™ Entero-DR Assay (CR9700X) x 100 determinaciones.

Indicación/es de uso:

Allplex™ Entero-DR Assay es una prueba de diagnóstico cualitativa in vitro que utiliza la reacción en cadena de

la polimerasa múltiplex en tiempo real (múltiplex PCR en tiempo real).

Esta prueba permite la detección única o múltiple de genes carbapenemasas (NDM, KPC, OXA-48, VIM, IMP), gen (CTX-M) de Beta-Lactamasa de espectro extendido (ESBL) y genes de resistencia a la vancomicina (VanA, VanB) en hisopos rectales o colonias bacterianas.

Allplex™ Entero-DR Assay es un ensayo de PCR en tiempo real

Forma de presentación: 1) Allplex™ Entero-DR Assay (CR10384Z) x 25 determinaciones:

- Entero-DR MOM (Mezcla de oligos de MuDT (MOM): Reactivos de amplificación y detección) 1 x 125 µL
- EM4 (Polimerasa de DNA; Uracil-DNA glicosilasa (UDG); Tampón que contiene dNTPs) 1 x 125 µL.
- EM4 Buffer (Tampón para PCR en tiempo real: Tampón que contiene BSA y glicerol) 1 x 125 µL.
- Entero-DR PC (Control Positivo (PC): Mezcla de patógenos y clones IC) 1 x 50 µL.
- Entero-DR IC (Control Interno (IC) exógeno para muestras de colonias bacterianas) 1 x 1000 µL.
- RNase-free Water (Calidad ultrapura, grado PCR) 1 x 1000 µL.

2) Allplex™ Entero-DR Assay (CR9700X) x 100 determinaciones:

- Entero-DR MOM (Mezcla de oligos de MuDT (MOM): Reactivos de amplificación y detección) 1 x 500 µL
- EM4 (Polimerasa de DNA; Uracil-DNA glicosilasa (UDG); Tampón que contiene dNTPs) 1 x 500 µL.
- EM4 Buffer (Tampón para PCR en tiempo real: Tampón que contiene BSA y glicerol) 1 x 500 µL.
- Entero-DR PC (Control Positivo (PC): Mezcla de patógenos y clones IC) 1 x 50 µL.
- Entero-DR IC (Control Interno (IC) exógeno para muestras de colonias bacterianas) 1 x 1000 µL.
- RNase-free Water (Calidad ultrapura, grado PCR) 1 x 1000 µL.

Período de vida útil: 12 meses de vida útil, desde su fabricación, cuando se almacena a =-20°C.

Nombre del fabricante:

Seegene Inc.

Lugar de elaboración:

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

Grupo de Riesgo: Grupo C

Condición de uso: Uso profesional exclusivo

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del PRODUCTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO PM 626-213 , con una vigencia de cinco (5) años a partir de la fecha de la Disposición autorizante.

N° 1-0047-3110-000649-24-5

N° Identificador Trámite: 56229

AM

Digitally signed by PEARSON Enriqueta María
Date: 2024.04.18 14:39:03 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.04.18 14:39:05 -03:00