

Sólo para uso de diagnóstico in vitro.
Sólo para uso profesional de

Nº de cat: BS-SE-MX30S-100

Panel qPCR de sepsis MX-30S

Prospecto



1. Contenido del kit

Tabla 1: Contenido del kit

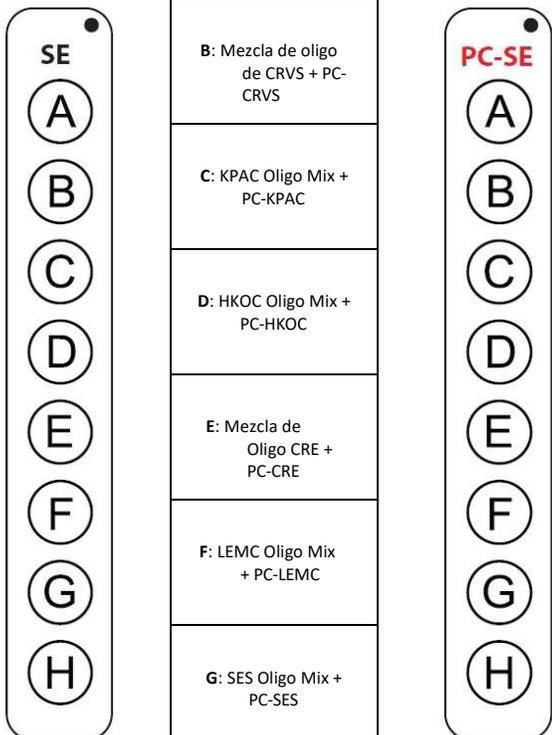
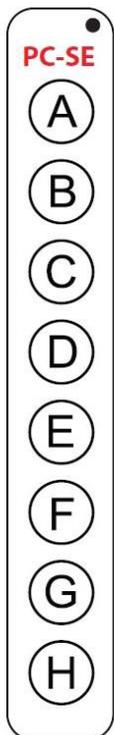
Contenido de la mezcla de oligoelementos				Contenido del control positivo	
Componente	Objetivos	Canal	Tira de mezcla de oligo (120 piezas) 100 Rxns	Componente	Tira de PC (20 piezas) 100 Rxns
A: SPVC Oligo Mix	<i>Staphylococcus aureus</i>	FAM		A: SPVC Oligo Mix + PC- SPVC	
	<i>Pseudomonas spp.</i>	HEX			
	Resistencia a la VanA-Vancomicina	ROX			
	<i>Candida krusei</i>	CY5			
B: CRVS Oligo Mix	<i>Candida glabrata</i>	FAM		B: Mezcla de oligo de CRVS + PC-CRVS	
	Control interno (gen <i>RNasa P</i> humano)	HEX			
	Resistencia a la VanB-Vancomicina	ROX			
	<i>Staphylococcus spp.</i>	CY5			
C: KPAC Oligo Mix	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FAM		C: KPAC Oligo Mix + PC-KPAC	
	<i>Candida albicans</i>	HEX			
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ROX			
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	CY5			
D: HKOC Oligo Mix	<i>Haemophilus influenzae</i>	FAM		D: HKOC Oligo Mix + PC-HKOC	
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	HEX			
	<i>Candida parapsilosis</i>	ROX			
	OXA-48-Resistencia al carbapenem	CY5			
E: CRE Oligo Mix	Resistencia a KPC-Carbapenem	FAM	E: Mezcla de Oligo CRE + PC-CRE		
	Resistencia a NDM-Carbapenem	HEX			
	Resistencia a VIM-Carbapenem	ROX			
	Resistencia a IMP-Carbapenem	CY5			
F: LEMC Oligo Mix	<i>Listeria monocytogenes</i>	FAM	F: LEMC Oligo Mix + PC-LEMC		
	<i>Enterococcus faecalis</i>	HEX			
	MecA+C-Resistencia a la meticilina	ROX			
	<i>Candida tropicalis</i>	CY5			
G: SES Oligo Mix	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	FAM	G: SES Oligo Mix + PC-SES		
	-	HEX			
	Enterobacteriaceae	ROX			
	<i>Streptococcus spp.</i>	CY5			
H: ENES Oligo Mix	<i>Enterococcus faecium</i>	FAM	H: ENES Oligo Mix + PC-ENES		
	<i>Escherichia coli</i>	HEX			
	<i>Neisseria meningitidis</i>	ROX			
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CY5			
2X qPCR Mix	ADN polimerasa, mezcla de dNTPs, tampón de reacción			10 x 1250 µL	
NTC	Control negativo (sin plantilla) (Agua libre de nucleasas)			2 x 1000 µL	

Tabla 2: Requisitos de almacenamiento y vida útil

Componente	Condiciones de transporte y almacenamiento	Vida útil
2X qPCR Mix	-22 -18 °C	12 meses
Tira de mezcla de oligoelementos		
NTC		
Tira de PC		

Cada reactivo almacenado a temperatura de conservación, puede utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada en el tubo tras la primera apertura. La fecha de caducidad del kit viene determinada por la fecha de caducidad de los reactivos.

2. Materiales necesarios pero no proporcionados

Cuadro 3: Componentes necesarios pero no incluidos en la prueba

Componentes necesarios pero no incluidos en la prueba	
1. Instrumento en tiempo real con canales FAM , HEX , ROX y CY5 , velocidad de rampa ≥ 3 °C/seg.	7. Tubos de reacción y sus tapones/sellos compatibles con los instrumentos de qPCR y el volumen de reacción
2. Micropipetas ajustables y puntas de pipeta compatibles (sin nucleasas)	Se recomienda el uso de componentes adicionales:
3. Centrifuga	8. Cabina de bioseguridad para la preparación de la PCR
4. Vórtice	9. Gradilla para tubos fríos (para tubos de microcentrifuga y tubos/tiras de PCR)
5. Agua libre de nucleasas/medio de transporte viral/suero fisiológico	10. EPI (equipos de protección individual)
6. Tubos de microcentrifuga de 1,5 o 2 ml (sin nucleasas)	

3. Uso previsto y principio de prueba

Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S Panel es una prueba de PCR en tiempo real (qPCR) destinada a la detección cualitativa presunta de los agentes bacterianos y fúngicos, así como de los genes de resistencia a los antimicrobianos indicados en la Tabla 1. **El Panel Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S** se aplica a aislados de ácido nucleico obtenidos de sangre total y de muestras de hemocultivos positivos.

La sepsis provoca largas hospitalizaciones y muertes. Un tratamiento adecuado y un proceso de recuperación rápido son posibles con un diagnóstico temprano del agente de la sepsis. La posibilidad de vivir en una sepsis disminuye bruscamente a medida que se retrasa el inicio del tratamiento. Si un paciente recibe el tratamiento antimicrobiano correcto dentro de la primera hora del diagnóstico, la posibilidad de sobrevivir se acerca al 80%; esta tasa disminuye en un 7,6% por cada hora de retraso.

La detección con el kit se logra mediante la extracción rápida de ácido nucleico de muestras de sangre completa y de hemocultivos positivos, seguida de una qPCR multiplex dirigida a las regiones de ADN genómico específicas de los agentes objetivo en instrumentos de PCR en tiempo real que están equipados con canales de detección **FAM**, **HEX**, **ROX** y **CY5**. **El kit permite obtener el resultado de la qPCR en menos de 60 minutos (el tiempo de ejecución puede variar dependiendo del instrumento).**

El conjunto de oligonucleótidos dirigido al gen de **la RNasa P humana** funciona como control de la toma de muestras, la extracción de ácido nucleico y la qPCR. El kit también contiene plantillas de control negativo y positivo para comprobar la contaminación y la estabilidad reactiva de la qPCR, respectivamente.

Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S Panel es una prueba de complejidad moderada. Está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio capacitado en las técnicas de qPCR y procedimientos de diagnóstico in vitro.

4. Especificaciones analíticas

El panel Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S está validado con sistemas de extracción robótica como el **sistema de aislamiento de ácidos nucleicos Zybko EXM3000** (número de catálogo del robot: ZBI-EXM3000) para ácidos nucleicos extraídos de sangre total y muestras de hemocultivos positivos.

La qPCR se realiza en un volumen de reacción de 20 µl utilizando los sistemas de detección de PCR en tiempo real **CFX96 Touch™/CFX96™ Dx/CFX Opus 96™/CFX Opus 96™ Dx (Bio-Rad)** equipados con los canales de detección **FAM**, **HEX**, **ROX** y **CY5**.

El límite de detección (LoD) del **panel Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S** se sitúa entre 100-500 ufc/mL para las muestras de hemocultivo positivas y 500-1000 ufc/mL para las muestras de sangre total extraídas con el **sistema de aislamiento de ácido nucleico Zybko EXM3000**.

La exclusividad del kit se probó con diferentes agentes bacterianos y fúngicos. No se observó ninguna reacción cruzada en los estudios de especificidad analítica realizados con cepas de referencia y aislados de campo. La sensibilidad y la especificidad del kit se determinaron como 97,10% y 99,30% para las muestras de hemocultivo positivas y 82,00% y 98,30% para las muestras de sangre completa, respectivamente.

5. Recogida, almacenamiento y envío de muestras clínicas

Recoger la sangre total en tubos comerciales tratados con anticoagulantes, por ejemplo, tratados con EDTA (tapas de color lavanda) o tratados con citrato (tapas de color azul claro) para las muestras de sangre total. Las muestras de sangre total en tubos se almacenan preferentemente a 2-8°C y se trasladan al laboratorio en un plazo máximo de 24 horas. Para el almacenamiento a largo plazo, las muestras deben guardarse a -20°C. Las muestras de hemocultivo se introducen en frascos de hemocultivo adecuados, se incuban en condiciones apropiadas y se almacenan. Los frascos de hemocultivo deben mantenerse a temperatura ambiente antes de la incubación. El enfriamiento o la congelación de los frascos de hemocultivo puede provocar la muerte de los microorganismos o retrasar el crecimiento y la reproducción del agente.

6. Advertencias



1. El procesamiento de las muestras debe realizarse de acuerdo con las recomendaciones nacionales de seguridad biológica.
2. Limpie inmediatamente cualquier derrame que contenga material potencialmente infeccioso con hipoclorito de sodio al 0,5-1% (p/v) (lejía al 10-20% v/v). Deseche los materiales de limpieza en un depósito de residuos de riesgo biológico.
3. Todo el personal que lleve a cabo aspectos de los procedimientos de prueba deberá estar capacitado para trabajar con la PCR y la microbiología, según corresponda. La toma de muestras debe ser realizada por personal con conocimientos y experiencia suficientes.
4. El kit debe almacenarse lejos de las fuentes de ácido nucleico y de los amplicones de la PCR.
5. Excepto para las transferencias de fluidos, los tubos de ácido nucleico y de control positivo deben mantenerse siempre cerrados.
6. Para evitar la contaminación de la mezcla de reacción por secuencias diana previamente amplificadas, mantenga áreas de trabajo separadas, equipos dedicados.
7. Deben usarse diferentes conjuntos de batas de laboratorio antes y después de la PCR.
8. Las micropipetas utilizadas para pipetear las mezclas de PCR y los ácidos nucleicos molde deben estar separadas. Deben utilizarse puntas filtradas y libres de nucleasas.
9. Los componentes del kit no deben mezclarse con diferentes números de lote o productos químicos del mismo nombre pero de diferentes fabricantes.
10. Los reactivos maestros deben mantenerse en el bloque frío durante la preparación de la PCR.
11. Los componentes del kit deben mezclarse agitando suavemente antes de su uso.
12. El intervalo de mantenimiento/calibración debe determinarse para todos los instrumentos y equipos utilizados con el kit.
13. Para evitar falsos positivos debidos al material amplificado, los tubos de reacción completados por la PCR deben desecharse antes de abrirlos en el laboratorio.
14. Las superficies limpiables de las salas, los bancos y los dispositivos deben limpiarse regularmente con una solución de lejía recién diluida al 10% (0,5% de NaClO).
15. Elimine los residuos en una materia designada de acuerdo con la normativa local, regional y federal.

Sólo para uso de diagnóstico in vitro.
Sólo para uso profesional de

7. Protocolo de aplicación de la qPCR

Añada los reactivos a las tiras de qPCR de la siguiente manera, cierre las tiras, programe el instrumento de qPCR, colóquelas en el instrumento de qPCR e inicie la corrida (Figura 1 y Tabla 4).

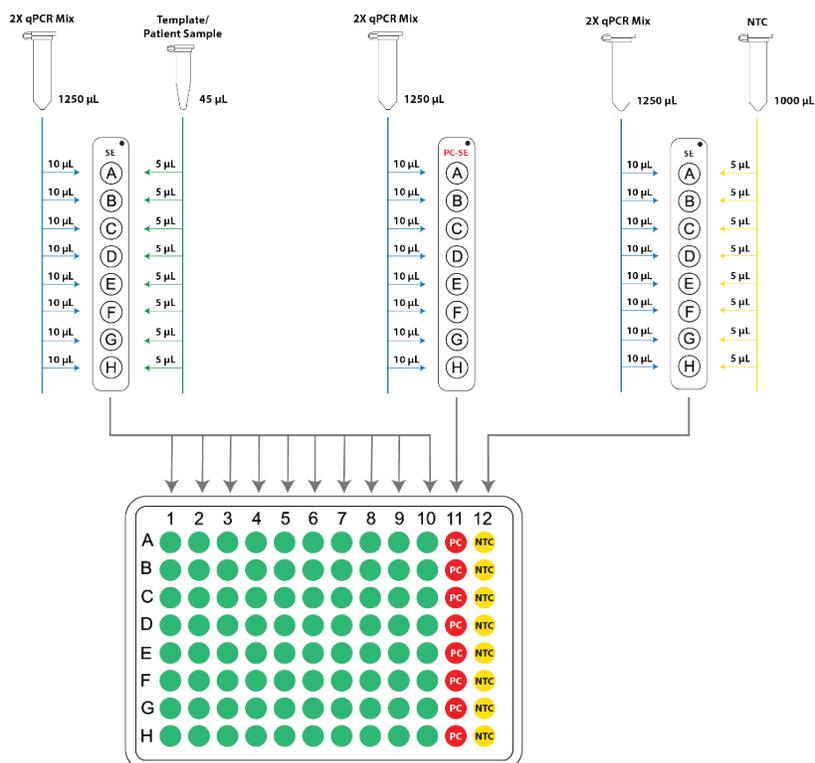


Figura 1: Montaje de la reacción

Tabla 4. Programa de PCR en tiempo real

Pre-Incubación/1 Ciclo	Amplificación/40 ciclos		
	Desnaturalización	Recalentamiento y amplificación	Lectura fluorescente
95°C-3 min	95°C-5 seg.	55°C-30 seg.	FAM/HEX/ROX/CYS

8. Interpretación de los resultados del ensayo

- El nivel de umbral debe establecerse en 200 RFU para los instrumentos CFX96 Touch™/CFX96™ Dx/CFX Opus 96™/CFX Opus 96™ Dx (Bio-Rad) para calcular los valores Cq. Todas las demás opciones de análisis predeterminadas en el software relacionado no deben cambiarse para los instrumentos CFX96 Touch™/CFX96™ Dx/CFX Opus 96™/CFX Opus 96™ Dx (Bio-Rad).
- La forma de las curvas de amplificación obtenidas en los canales FAM/HEX/ROX/CYS debe examinarse para todos los pozos de reacción que devuelvan valores Cq. Los valores Cq deben utilizarse en los pasos posteriores de interpretación si las formas de las curvas de amplificación son sigmoidales. Las curvas **no sigmoidales deben registrarse como negativas**. El resultado se registra como positivo si Cq≤38.
- Para las muestras con un patrón de curva sigmoidal sospechoso por debajo del umbral en el canal de los objetivos, debe examinarse el valor Cq del CI. Si el CI Cq≤34, la muestra se reporta como negativa. Si el Cq>34, la prueba debe repetirse después de congelar y descongelar la muestra. Si el problema continúa después de la congelación y descongelación, se solicita una nueva muestra.

Tabla 5. Rendimiento esperado de los controles del kit

Tipo de control	Nombre del control	Propósito	Resultados esperados y valores Cq	
			RNasa P (HEX)	Objetivo (FAM, HEX, ROX y CYS)
Control negativo	NTC	Control de la contaminación durante la qPCR	No se detecta (No Cq)	No se detecta (No Cq)
No hay adición de plantillas	NRC	Control de la contaminación reactiva	No se detecta (No Cq)	No se detecta (No Cq)
Control positivo	PC	Integridad de los reactivos	Detectado (Cq≤38)	Detectado (Cq≤38)
Control interno/de extracción	IC	Para controlar la integridad de la extracción del ácido nucleico y la qPCR de cada muestra	Detectado (Cq≤38). Si el IC Cq>38,0 comprueba el Cq objetivo	Si el objetivo Cq≤38,0, concluir como IC es válido

Si algún control no se comporta como se ha descrito anteriormente, la ejecución se considera inválida y se repite la prueba.

- PC inválido (Cq>38 en cualquier canal):** Se recomienda contactar con el fabricante, renovar los reactivos y repetir la reacción.
- NTC inválido (Cq≤38 en cualquier canal):** Repite el análisis prestando atención al apartado "Advertencias".
- NRC inválido (Cq≤38 en cualquier canal):** Póngase en contacto con el fabricante, renueve los reactivos y repita la reacción.
- CI inválido (Cq>38 en el canal HEX):** Repita el análisis. Si el problema continúa, concluya que se trata de una plantilla de

PCR no válida. Si todos los controles son válidos, proceda a la interpretación de los resultados.

Sólo para uso de diagnóstico *in vitro*.
Sólo para uso profesional de

Para muestras de sangre completa;

- Si los Cq de las dianas genéticas son ≤ 38 , concluya como **positivo**.
- Si el Cq de las dianas genéticas es > 38 , se concluye

como **negativo**. Si el resultado final es positivo, se informa como

sigue:

1. $32 \leq Cq \leq 38$ = Positivo bajo
2. $25 \leq Cq < 32$ = Positivo
3. $18 \leq Cq < 25$ = Alta positiva
4. $Cq < 18$ = Positivo muy alto

Para las muestras de hemocultivos;

- ❖ Objetivos genéticos de resistencia a fármacos (VanA, VanB-Resistencia a la vancomicina, OXA-48, KPC, NDM, VIM, IMP-Resistencia al carbapenem, MecA+C-Resistencia a la meticilina) y objetivos genéticos de *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*;
 - Si el valor de Cq es ≤ 35 , concluir como **positivo**.
 - Si el valor Cq es > 35 , concluya que **es negativo**.
- ❖ Para todos los demás objetivos genéticos;
 - Si el valor de Cq es ≤ 28 , concluir como **positivo**.
 - Si el valor Cq es > 28 , concluya que **es negativo**.

Si **más de un parámetro** da resultados positivos en la muestra de hemocultivo, el informe final se realiza después del siguiente proceso de evaluación:

1. Se determina el parámetro que da el menor Cq = Min Cq
2. (Valor Cq de otro parámetro) - (Cq mínimo) Si es < 7 , el resultado es **positivo** para el otro parámetro
3. (Valor Cq de otro parámetro) - (Min Cq) Si ≥ 7 , se da un resultado **negativo** para otro parámetro



ADVERTENCIA: En la [página web](#) enlazada con el código QR, se dan ejemplos de las curvas de amplificación sigmoideal. Los resultados obtenidos con este kit **NO** deben interpretarse sin examinar estas muestras.

9. Limitaciones



- **Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S Panel** es una prueba de complejidad moderada. Está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio capacitado en las técnicas de qPCR e *in vitro* procedimientos de diagnóstico.
- Las muestras clínicas serán recogidas por un profesional sanitario de acuerdo con las directrices de recogida de muestras.
- Puede producirse un resultado falso negativo si una muestra se recoge, transporta o manipula incorrectamente.
- Las mutaciones dentro de las regiones objetivo del **panel Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S** podrían afectar a la unión del cebador y/o de la sonda, lo que provocaría un fallo en la detección de la presencia de bacterias y hongos.
- Los inhibidores u otros tipos de interferencia pueden producir un resultado falso negativo. También pueden producirse resultados falsos negativos si hay un número inadecuado de organismos en la muestra.

10. Explicación del símbolo

Símbolo	Significado	Símbolo	Significado	Símbolo	Significado
	Espacio Económico Europeo		Código de lote		No utilizar si el envase está dañado y consultar las instrucciones de uso
	Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>		Número de catálogo		Mantener alejado del agua/humedad
	Fabricante		No estéril		Límite de temperatura (Temperatura de almacenamiento)
	Fecha de caducidad AAAA-MM		Consulte las instrucciones de uso		Manténgalo en posición vertical
	Control negativo		Precaución		Número total de pruebas IVD que pueden realizarse con el dispositivo médico IVD
	Control positivo		Manténgase alejado de la luz		
	Controlar		Proteger del calor y de las fuentes radiactivas		

Distribuye:



Pol. Ind. Las Atalayas
Avda. de la Antigua Peseta, 77
03114 Alicante
Buzón 20212

atencion.clientes@akralab.es
T. 902 222 275 | +34 965 116 521
Fax. 902 154 165 | +34 965 115 762
www.akralab.es

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS