

Manual de usuario

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™

Para la detección y diferenciación a partir de frotis rectales
de genes de carbapenemasas de *Enterobacterias*

Versión 1.1

Fecha de publicación: 10.03.2017

REF

18-0057



24

Solo para uso en investigación (SUI)
No utilizar en procedimientos diagnósticos

Contenido

Introducción y principio del método	2
Contenido del kit (para 24 reacciones).....	2
Materiales necesarios no suministrados con el kit	2
Almacenamiento y estabilidad	2
Advertencias y precauciones.....	3
Instrucciones de uso	4
Procedimientos de preparación de muestras.....	4
Uso de del sistema BD MAX™	4
Interpretación de los resultados	5
Preguntas más frecuentes (FAQ) y solución de problemas.....	6
Limitaciones	7
Leyenda de los símbolos utilizados.....	7
Asistencia técnica.....	7
Anexo 1: Programación de la prueba Check-Direct CPE Screen v.4.30B o superior ...	8

Introducción y principio del método

La aparición y difusión a nivel mundial de la resistencia a carbapenems entre *Enterobacterias* representa una grave amenaza para la salud pública. Estos organismos están asociados con altas tasas de mortalidad y tienen el potencial de extenderse ampliamente. La causa más común de resistencia a carbapenems en *Enterobacterias* es la expresión de carbapenemasas, es decir, *Enterobacterias* productoras de carbapenemasas o CPE, por sus siglas en inglés. Las CPE tienen una resistencia elevada o completa a carbapenems y a la mayoría de otros antibióticos β -lactámicos. En la actualidad, la gran mayoría de CPE están asociadas con la presencia de una de las siguientes carbapenemasas codificadas por plásmidos: KPC (carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae*), VIM (metalo- β -lactamasas codificadas por el integrón Verona), NDM (metalo- β -lactamasas Nueva Delhi) o OXA-48 (Oxacilinasas-48 y otras variantes OXA-48). Por otra parte, las CPE tienen a menudo otros determinantes de resistencia a antibióticos no- β -lactámicos, confiriendo multi-resistencia o pan-resistencia a estos aislados

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ es una prueba multiplex de PCR en tiempo real para la detección de los genes de carbapenemasas KPC, OXA-48, NDM y VIM. La prueba está basada en el reconocimiento específico y la amplificación de secuencias diana mediante PCR, y la detección simultánea de los productos de amplificación acumulados mediante sondas fluorescentes de ADN. Existen muchas variantes de genes para KPC, VIM, OXA-48 y NDM; Check-Direct CPE Screen ha sido diseñado para detectar de forma fiable la mayoría de variantes. Las variantes detectadas y previstas a ser detectadas para cada gen de resistencia se presentan en el párrafo específico *in silico* del Anexo 2. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ utiliza cinco sondas fluorescentes diferentes y permite la detección y diferenciación de los cuatro genes de carbapenemasas más un control interno SPC, que controla la extracción del ADN y la amplificación por PCR.

Contenido del kit (para 24 reacciones)

Componentes (nº. mat.)	Descripción
Tubos de reactivos para prueba CPE (9-0121)	24 tubos sellados (film azul)
Control positivo CPE (9-0061)	1 tubo (tapón morado)
CP Mastermix (9-0122)	1 tubo (tapón verde) 330 μ l
Manual de usuario (9-0126)	Folleto - descargar del sitio web

Materiales necesarios no suministrados con el kit

Suministros	Equipo
<ul style="list-style-type: none"> Kit de extracción BD MAX™ ExK™ DNA-1 (ref. 442818) Tarjetas de PCR BD MAX™ (ref. 437519) Guantes de laboratorio (sin talco) desechables Pipetas y puntas desechables (con filtro) para volúmenes de 10 y 25 μl Agua de grado PCR (por ejemplo, Milli-Q o agua bidestilada) Frotis y medios de transporte compatibles con la recogida de muestras rectales. Cat. Dispositivo de recogida de frotis recomendado: Copan ESwab, Nº. cat. 480CE 	<ul style="list-style-type: none"> Instrumento de PCR en tiempo real: sistema BD MAX™, versión de software 4.30B o superior Agitador vórtex

Almacenamiento y estabilidad

El kit de la prueba Check-Direct Screen for BD MAX™ se envía a temperatura ambiente, pero en el momento de su recepción se debe almacenar en un lugar oscuro y a una temperatura de entre 2 y 8º C. Los reactivos son estables a una temperatura de entre 2 y 8º C hasta la fecha de caducidad indicada. No utilice componentes caducados.

Los tubos de reactivos, PCR Mastermix y el control positivo de Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ se suministran dentro de una bolsa sellada. Para proteger los reactivos de la humedad, cierre de inmediato la bolsa después de abrirla. Los tubos de reactivos son estables durante un máximo de 14 días a una temperatura de entre 2 y 25º C después de la apertura inicial de la bolsa y su cerrado posterior.

Advertencias y precauciones

- La prueba Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ es para uso solo en investigación. No utilizar en procedimientos diagnósticos. No se han determinado las características de rendimiento ni se han evaluado las sustancias que potencialmente pueden interferir.
- Este producto sólo se puede utilizar en el sistema BD MAX™.
- No utilice el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota.
- No utilice los reactivos si en su recepción las bolsas protectoras están abiertas o rotas.
- Cierre las bolsas protectoras de los reactivos con el cierre zip inmediatamente después de cada uso. Antes de cerrar las bolsas quite el exceso de aire.
- Compruebe que las tiras de reactivo tengan la cantidad de líquido suficiente (asegúrese de que el líquido se encuentre en el fondo de los tubos).
- Compruebe las tiras de reactivo para asegurarse de que no falta ninguna punta de pipeta.
- No retire el desecante de las bolsas de reactivos.
- No utilice los reactivos si el desecante no está o está roto dentro de las bolsas de reactivos.
- No utilice los reactivos si el film está roto o dañado.
- No mezcle reactivos de diferentes bolsas y/o kits y/o lotes.
- No intercambie ni reutilice los tapones, ya que se puede producir contaminación y se pueden comprometer los resultados de la prueba.
- Actúe con cautela al utilizar soluciones químicas ya que se puede alterar la legibilidad del código de barras del tubo de extracción y del Master Mix.
- No utilice reactivos ni materiales caducados.
- Es fundamental una buena técnica de laboratorio para realizar correctamente esta prueba. Debido a la alta sensibilidad analítica de esta prueba, se debe tener extremo cuidado para conservar la pureza de todos los materiales y reactivos.
- Para evitar la contaminación por amplicones, no rompa la tarjeta de PCR BD MAX™ después de su uso. Los films de las tarjetas de PCR BD MAX™ están diseñados para impedir la contaminación.
- Las tarjetas de PCR BD MAX™ se pueden utilizar un máximo de dos veces.
- Se pueden producir resultados no válidos si no se respetan los intervalos de tiempo recomendados para la prueba Check-Direct CPE Screen for BD MAX™. Las pruebas no realizadas dentro de los intervalos de tiempo especificados se deberán repetir con una nueva muestra.
- Pueden realizarse controles adicionales de acuerdo con las directrices o requisitos de los reglamentos locales, estatales, provinciales y/o federales o de los organismos acreditados.
- Cuando se lleven a cabo en el laboratorio cultivos u otras pruebas de PCR, se debe tener cuidado para asegurar que los componentes de la prueba Check-Direct CPE Screen for BD MAX™, los reactivos adicionales necesarios para la prueba y el sistema BD MAX™ no se contaminen. Evite en todo momento la contaminación microbiana y por desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Debe cambiarse de guantes antes de manipular reactivos y tarjetas.
- Siempre manipule las muestras como si fueran infecciosas y siguiendo procedimientos de seguridad del laboratorio, como los descritos en el Documento CLSI M2911 o en Biosafety in Microbial and Biomedical Laboratories.
- Utilice ropa protectora y guantes desechables cuando manipule los reactivos.
- Lávese completamente las manos después de realizar la prueba.
- No fume, beba, mastique ni coma en zonas en las que se manipulan muestras o los reactivos del kit.
- Elimine los reactivos no utilizados en conformidad con los reglamentos locales, estatales, provinciales y/o federales.
- Consulte el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener información sobre advertencias, precauciones y procedimientos adicionales.

Por favor, lea el protocolo completo antes de iniciar la prueba

Instrucciones de uso

Procedimientos de preparación de muestras

Preparación de la prueba para frotis rectales

Nota: Debe seguirse cuidadosamente el procedimiento para la recogida y almacenamiento de muestras mediante el uso de dispositivos de recogida de muestras adecuados (véase la sección *Materiales necesarios no suministrados con el kit*). Los frotis rectales contendrán cantidades variables de materia fecal dependiendo del procedimiento de recogida de muestras.

1. Recoja las muestras rectales siguiendo las directrices locales y las recomendaciones del fabricante del dispositivo de toma de muestras.
2. Transfiera los frotis a los tubos que contienen el medio de transporte.
3. Para su análisis, transfiera los frotis rectales recogidos a la sala de PCR o de almacenamiento hasta su uso posterior de acuerdo con las recomendaciones del fabricante del dispositivo de toma de muestras y/o la normativa local.
4. Mezcle ligeramente cada tubo con muestra rectal y transfiera con una pipeta 25 µl del medio de transporte a un tubo de tampón de muestra de ADN SB-1.
5. Cierre el tubo de tampón de muestras con un tapón de septo y agite en vórtex durante 10 segundos a velocidad media.

Preparación de los controles

Para validar la prueba, realice un control positivo y un control negativo para cada serie de análisis por PCR con la prueba Check-Direct CPE Screen for BD MAX™. El control positivo se suministra con el kit.

- **Control positivo:**
Transfiera con una pipeta 10 µL del control positivo a un tubo de tampón de muestras. Agite en vórtex durante 10 segundos.
- **Control negativo:**
Transfiera con una pipeta 10 µL de agua grado PCR a un tubo de tampón de muestras. Agite en vórtex durante 10 segundos.

Uso de del sistema BD MAX™

1. Configuración de la prueba multiplex de PCR en tiempo real

La Tabla 1 muestra la configuración de la prueba multiplex de PCR en tiempo real con las dianas detectadas en cada canal de detección del sistema BD MAX™.

Tabla 1: Configuración de la prueba multiplex qPCR

Detector	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Canal	1	2	3	4	5
Diana	KPC	VIM	OXA-48	NDM	SPC*

*SPC: Sample Processing Control, control de procesamiento de muestras

Cuando lleve a cabo la prueba por primera vez deberá crear el programa de prueba PCR "C-D CPE Screen" tal como se explica en el Anexo 1.

2. Configuración de la gradilla BD MAX™

- 2.1. Cargue las gradillas del sistema BD MAX™ con el número de tiras de reactivo de ADN necesarias para el número de muestras para analizar. Golpee suavemente cada tira para asegurarse de que los líquidos estén en el fondo de su recipiente.
- 2.2. Preparación de las tiras de reactivos individuales:
 - 2.2.a. Ponga las tiras de reactivo en sus posiciones dentro de la gradilla BD MAX™. Todavía no "encaje" las tiras.
 - 2.2.b. Inserte un tubo BD ExK-1 de reactivo de extracción (film blanco) en la posición 1 de la tira de reactivos de ADN, véase Figura 1.
 - 2.2.c. Inserte un tubo de reactivo CPE Screen (film azul) en la posición 3 de la tira de reactivos de ADN, véase la Figura 1.
 - 2.2.d. Perfore el film azul del tubo de reactivo CPE Screen en la posición 3, *por ejemplo*, con la punta de una pipeta desechable. A continuación, añada cuidadosamente 12,5 µl del reactivo CP MasterMix en el fondo del tubo y asegúrese de no crear burbujas de aire.
 - 2.2.e. Encaje las tiras de reactivo en sus posiciones de la gradilla cuando haya terminado de prepararlas.

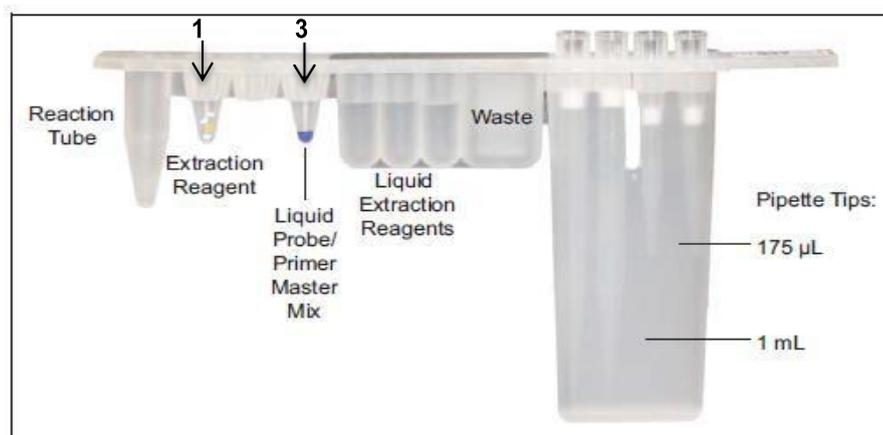


Figura 1: Configuración de la tira de reactivos de ADN

3. Configuración del instrumento BD MAX™

- 3.1 Abra la pestaña **Serie** del **software v4.30B** o posterior del sistema BD MAX™ y rellene la **Lista de trabajo**.
- 3.2 Seleccione el **Test "C-D CPE Screen"**. Consulte el Anexo 1 para crear la prueba "C-D CPE Screen" si todavía no está en el menú Test.
- 3.3 Introduzca el código de barras del **tubo de tampón de muestras** utilizando el escáner de códigos de barras (también puede introducir el código de barras manualmente). Comience con la posición 1 de la gradilla A. Coloque cada uno de los tubos de tampón de muestra (con el tapón de septo) en su posición correspondiente de la gradilla BD MAX™.
- 3.4 Introduzca la información de identificación de la muestra en la línea **Nº de acceso** de la lista de trabajo. Compruebe que la información de cada muestra corresponde a sus tubos de tampón de muestra en la gradilla.
- 3.5 Cargue las gradillas en el sistema BD MAX™. (La gradilla A está situada a la izquierda del instrumento y la gradilla B a la derecha).
- 3.6 Cargue las tarjetas de PCR BD MAX™.
- 3.7 Cierre la puerta del instrumento y seleccione **Iniciar**.

Interpretación de los resultados

Puntos importantes antes de empezar: Para obtener una descripción detallada sobre cómo analizar los datos, consulte el *Manual de usuario del sistema BD MAX™*.

Realizar una inspección visual de las curvas de amplificación de cada muestra analizada frente a los valores C_T obtenidos mediante el software.

1. Resultados informados

El software BD MAX™ informa los valores C_T y las curvas de amplificación de cada canal de detección para cada muestra analizada de la siguiente forma:

- Un valor C_T de **0** indica que el software no calculó ningún valor C_T con el umbral especificado (véase Anexo 1). Si la curva de amplificación muestra un valor C_T "0", la curva debe analizarse manualmente.
- Un valor C_T de **-1** indica que no se ha obtenido un proceso de amplificación válido. Compruebe en los resultados gráficos que no haya ninguna curva de amplificación para la muestra con un valor C_T de -1
- Cualquier otro valor C_T debe ser interpretado en relación con la curva de amplificación y según las pautas de interpretación descritas en las Tablas 2 y 3.

2. Interpretación

2.1 Validación de la serie

Compruebe que la serie de PCR en tiempo real es válida antes de interpretar los datos de los resultados. Compruebe que no haya ningún informe de fallo del sistema BD MAX™. Si procede, compruebe las curvas de amplificación del control positivo y negativo. La Tabla 2 muestra los criterios para una serie válida de la prueba Check-Direct CPE Screen en el sistema BD MAX™. Si los valores C_T de los controles no son los previstos, consulte Preguntas más frecuentes (FAQ) y solución de Problemas "3".

Tabla 2: Criterios para una serie válida con la prueba Check-Direct CPE Screen for BD MAX™.

Tipo de muestra*	C_T 475/520 KPC	C_T 530/565 VIM	C_T 585/630 OXA-48	C_T 630/665 NDM	C_T 680/715 SPC
Controles positivos	32 ±3	29 ±3	28 ±3	31 ±3	28 ±3
Muestra negativa	-1	-1	-1	-1	28 ±3

2.2 Interpretación de los resultados

Si la serie ha sido validada, interprete los resultados como positivo, negativo o sin resolver según los valores C_T obtenidos para las muestras, siguiendo las pautas resumidas en la Tabla 3. Compruebe siempre que la curva de amplificación de cada muestra está en consonancia con los valores C_T y la interpretación de resultados proporcionada por el software. Las series sin resolver deben ser analizadas de nuevo.

Tabla 3: Pautas de interpretación de datos para los frotis rectales.

KPC, VIM, OXA, NDM Valores C_T	SPC Valores C_T	Interpretación
SI	SI	Muestra positiva
-1	28 ± 3	Muestra negativa
-1	< 25 o > 32	Sin resolver
-1 o SI	-1	Sin resolver

NOTAS IMPORTANTES:

- SI significa que se ha observado un valor C_T mostrado en la tabla de resultados.
- Un resultado positivo de la prueba no indica necesariamente la presencia de organismos viables en la muestra analizada.
- Los valores C_T de los frotis rectales pueden variar ampliamente debido a diferencias en la materia fecal y a la "carga bacteriana" de las muestras rectales en el medio de transporte.
- Si el sistema BD MAX™ produce un resultado Indeterminado o Incompleto (IND o INC) debido a un fallo del sistema, deberá ponerse en contacto con su representante local de BD.

Preguntas más frecuentes (FAQ) y Solución de problemas

Consulte la sección "Solución de problemas" del manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener información adicional.

- 1. Los resultados en tiempo real no muestran valores C_T o la interpretación indica que la muestra está sin resolver.** Posibles causas y solución del problema:
 - La reacción PCR ha sido inhibida por sustancias exógenas o endógenas. Vuelva a analizar la muestra. Cuando continúa inhibida, una cantidad menor de la muestra añadida puede mejorar el resultado.
 - La extracción de ADN falló debido a que no se pudo detectar el SPC.
 - El reactivo CPE Screen o CP MasterMix puede estar caducado.
 - Se produjo un error en el manejo del líquido: compruebe las tiras de reactivo y las tarjetas de PCR para determinar dónde se produjo el problema de manejo del líquido (por ejemplo: burbuja de aire en el cartucho) y vuelva a analizar la muestra. Si el problema persiste, póngase en contacto con su representante local de BD.
- 2. Solución de problemas para resultados sin resolver.**
Para resultados sin resolver: repita la prueba con la muestra original preparando un nuevo tubo de tampón de muestras. Como alternativa, analice una muestra recién recogida o utilice una cantidad menor de la muestra.
- 3. Los resultados en tiempo real no muestran valores C_T para el control positivo o la interpretación indica que la muestra está sin resolver?**
Posibles causas y solución del problema:
 - No se añadió la solución de control positivo.
 - El reactivo CPE Screen o CP MasterMix puede estar caducado.
 - Se han producido burbujas de aire en la cámara de reacción de PCR del control positivo.
- 4. Los resultados en tiempo real muestran señales fluorescentes muy bajas en todas las muestras y canales de detección incluyendo la señal SPC.**
Posibles causas y solución del problema:
 - Los tubos de reactivo CPE Screen que contienen las sondas fluorescentes y primers pueden haberse degradado. Compruebe la fecha de caducidad y asegúrese de que los tubos CPE Screen estaban almacenados correctamente.
 - El sistema BD MAX™ puede ser el responsable de estos resultados. Consulte el manual de usuario de BD MAX™ o póngase en contacto con su representante local de BD.
- 5. El sistema BD MAX™ indica un error o fallo.**
Consulte el manual de usuario del instrumento BD MAX™ o póngase en contacto con su representante local de BD.
- 6. Las muestras duplicadas analizadas con la prueba Check-Direct CPE Screen no producen resultados idénticos.**
Los valores C_T de muestras idénticas pueden variar entre las reacciones individuales. Grandes variaciones, $> 2 C_T$, sugieren errores de pipeteo o la existencia de otras diferencias entre las muestras duplicadas.

Limitaciones

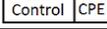
Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ utiliza un rango de marcadores específicos de ADN para detectar la presencia de los genes de carbapenemasas KPC, NDM, OXA-48 y VIM, que actualmente representan las carbapenemasas clínicamente más frecuentes. La prueba detecta todas las variantes conocidas actualmente de KPC, NDM, OXA-48 y VIM, salvo VIM-7, una variante rara que únicamente se encuentra en *Pseudomonas aeruginosa*. Debe señalarse que otras familias de genes de carbapenemasas no se detectan. La prueba está diseñada para ser usada con frotis rectales en un medio de transporte como material de análisis.

La calidad del ADN de entrada es un factor importante para obtener unos resultados fiables con Check-Direct CPE Screen for BD MAX™. Se debe extraer el ADN de los frotis rectales utilizando los dispositivos y procedimientos descritos en este manual. La prueba ha sido analizada extensamente con ADN purificado procedente de bacterias Gram negativas tales como *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Pseudomonas* con excelentes resultados. Sin embargo, nunca debe descartarse que otras bacterias o determinadas cepas de bacterias Gram negativas de las especies anteriormente mencionadas arrojen unos resultados deficientes. Check-Direct CPE Screen no puede ni hace ninguna declaración o garantía de que sea capaz de detectar correctamente los genes de carbapenemasas en todas las especies, subespecies o tipos de bacterias Gram negativas o en todas las muestras clínicas. En casos específicos, los resultados pueden necesitar ser confirmados mediante metodologías adicionales (por ejemplo, para las muestras normativas). Debido a la alta variabilidad de los genomas bacterianos, podrían no detectarse determinados subtipos. La prueba refleja el estado del conocimiento de Check-Points Health B.V.

Un resultado positivo de la prueba no indica necesariamente la presencia de organismos viables en la muestra analizada. Puede haberse detectado ADN de carbapenemasas de organismos no viables.

La presencia de múltiples especies de bacterias en una muestra puede dificultar la interpretación de la prueba.

Leyenda de los símbolos utilizados

Símbolo	Definición
	CP Mastermix
	Control CPE
	Solo para uso en investigación (SUI) No utilizar en procedimientos diagnósticos
	Número de catálogo
	Código de lote
	Usar antes de AAAA-MM
	Consulte las instrucciones de uso
	Fabricante
	Limitación de temperatura
	Contenido suficiente para <n> pruebas

Asistencia técnica

support@check-points.com

+31 317 453 908

A pesar de que se utilizó muchísimo cuidado en el desarrollo y preparación del protocolo, Check-Points no se hace responsable por los errores, omisiones y/o modificaciones futuras en este documento.

Citas para publicación: Cuando describa un procedimiento para su publicación utilizando este producto, refiérase a éste como *Check-Direct CPE Screen*.

Aviso al comprador:

Este producto se vende bajo licencia de PHRI Properties y puede ser utilizado bajo los derechos de patente de PHRI Properties únicamente para uso en investigación.

Marcas comerciales

BD, BD MAX™ son marcas comerciales de Becton Dickinson GmbH

Check-Points Health BV
 Binnenhaven 5
 6709 PD Wageningen
 Países Bajos

Tel: +31 317 453 908
 Fax: +31 317 210 147
 info@check-points.com
 www.check-points.com



Anexo 1: Programación de la prueba Check-Direct CPE Screen v.4.30B o superior

Puntos importantes antes de empezar: Consulte el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener instrucciones detalladas sobre cómo manejar el sistema BD MAX™ y la **versión de software 4.30B o superior**.

Para crear una nueva prueba, en la pestaña **Editor de test**, seleccione **Crear** y siga las siguientes instrucciones:

- En la pestaña **Información básica** introduzca los siguientes parámetros:
 - Nombre de prueba:** *C-D CPE Screen*.
 - Tipo de extracción:** *Seleccione Exk DNA-1 (Plasma/Serum)*.
 - Formato de Master Mix:** Seleccione Tipo 3: MM líquida con primers y sondas.
 - Parámetros de extracción de muestra:** Seleccione *Definido por usuario y ajuste el volumen de muestra a 600 µL*, véase la Tabla A.
 - Cálculo Ct:** Seleccione *Cálculo de Ct en punto de inflexión*

Guarde los parámetros

- En la pestaña **Configuración de PCR** introduzca los siguientes parámetros:
 - Alias, Ganancia y Umbral (Threshold):** Para cada canal de detección introduzca los parámetros correctos especificados en la Tabla B.
 - Compensación de color:** Introduzca los parámetros correctos especificados en la Tabla C.

Guarde los parámetros

- En las **Etapas del test** introduzca las etapas de PCR tal como están especificados en la Tabla D:

Guarde los parámetros

Tabla A: Parámetros de extracción de muestra.

Parámetros	Valor
Tiempo de calentamiento de lisis	10
Temperatura de lisis	37
Altura de punta de muestra	1600
Volumen de muestra	600
Volumen de lavado	500
Volumen de neutralización	----
Tiempo de calentamiento DNase	----

Tabla B: Parámetros de Alias, Ganancia y Umbral. (Threshold)

Detector	Alias	Ganancia	Umbral
475/520	KPC	80	100
530/565	VIM	80	100
585/630	OXA-48	30	100
630/665	NDM	80	100
680/715	SPC	40	100

Tabla C: Parámetros de compensación

	Canal de recepción falsa					
		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Canal de excitación	475/520		0,0	0,0	0,0	0,0
	530/565	0,0		0,0	0,0	0,0
	585/630	0,0	0,0		7,4	0,0
	630/665	0,0	0,0	0,0		0,0
	680/715	0,0	0,0	0,0	4,4	

Tabla D: Parámetros para las etapas de PCR.

Nombre de la etapa	Tipo de perfil	Ciclos	Tiempo (s)	Temperatura (° C)	Detección
Desnaturalización	Mantener	1	600	98	NO
Amplificación y detección	2 - temperatura	50	15	98	NO
			62	60	SI