

# Manual de usuario

## Check-Direct CPE for BD MAX™

Para la detección e identificación de genes de carbapenemasas en colonias puras de *Enterobacterias*

**Versión 2.0**

**Fecha de publicación: 05.02.2019**

**REF** 18-0055



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 v.4.70 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  $\beta$ -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 (metallobetolactamasas codificadas por el integrón Verona), NDM (metallobetolactamasas 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- $\beta$ -lactámicos, confiriendo multi-resistencia o pan-resistencia a estos aislados.

Check-Direct CPE 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 ha sido diseñado para detectar de forma fiable todas las variantes. Check-Direct CPE 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 CPE (9-0062)	24 tubos sellados (film morado)
Control positivo CPE (9-0060)	1 tubo (tapón morado)
Manual de usuario (9-0128)	Folleto – descargar del sitio web

## Materiales necesarios no suministrados con el kit

Suministros	Equipo
<ul style="list-style-type: none"> <li>Kit de extracción BD MAX™ ExK™ DNA-1 (ref. 442818)</li> <li>Master mix BD MAX™ DNA MMK (ref. 442848)</li> <li>Tarjetas de PCR BD MAX™ (ref. 437519)</li> <li>Guantes de laboratorio (sin talco) desechables y bata de laboratorio</li> <li>Pipetas y puntas (con filtro) desechables para volúmenes de 10 a 1000 <math>\mu</math>l</li> <li>Solución salina (NaCl 150 mM o NaCl 0,9 %, p/v)</li> <li>Agua Milli-Q o agua bidestilada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Instrumento de PCR en tiempo real: sistema BD MAX™, versión de software 4.70 y superior</li> <li>Densitómetro adecuado para suspensiones bacterianas</li> <li>Agitador vórtex</li> </ul>

## Almacenamiento y estabilidad

Los componentes de la prueba Check-Direct CPE for BD MAX™ son estables a una temperatura de entre 2 y 25° C hasta la fecha de caducidad indicada. No utilice componentes caducados.

Los tubos de reactivos Check-Direct CPE for BD MAX™ y el control positivo se suministran en 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 25° C después de la apertura inicial de la bolsa y su cerrado posterior.

## Advertencias y precauciones

- La prueba Check-Direct CPE 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 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 selleven 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 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. Deb 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 M2911o 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 usando bacterias procedentes del cultivo

1. Inocule las placas de agar nutritivo con las muestras clínicas o las cepas bacterianas a analizar e incúbelas durante toda la noche a una temperatura de 37<sup>o</sup> C. Entre los medios de cultivo típicos se encuentran agar sangre, agar MacConkey o agar tripticasa de soya.
2. Prepare una suspensión celular bacteriana en solución salina con una turbidez de entre 0,5 – 1,0 ( $\approx 1 - 2 \times 10^8$  CFU/ml) en la escala de McFarland procedente de una o más colonias de cada placa utilizando un asa de siembra de 1 o 10 $\mu$ l.
3. Pipetee 10 $\mu$ l de la suspensión celular bacteriana ( $\approx 1 - 2 \times 10^6$  CFU/ml) y 500 $\mu$ l de agua Milli-Q o agua bidestilada en un tubo de tampón de muestras de ADN SB-1. (suministrado con el kit de extracción de ADN BD MAX™ ExK DNA-1, consulte la sección *Materiales necesarios no suministrados con el kit*).
4. Tape el tubo de tampón de muestras con un tapón consepto y agite en el vórtex durante 10 segundos a velocidad baja.
5. Traslade los tubos de tampón de muestra con las suspensiones celulares bacterianas a la sala de PCR para su análisis.

### 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. El control positivo se suministra con el kit.

- **Control positivo:**  
Pipetee 10 $\mu$ l del control positivo y 500 $\mu$ l de agua Milli-Q o agua bidestilada en un tubo de tampón de muestras. Agite en vórtex durante 10 segundos.
- **Control negativo:**  
Pipetee 500 $\mu$ l de agua Milli-Q o agua bidestilada en 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

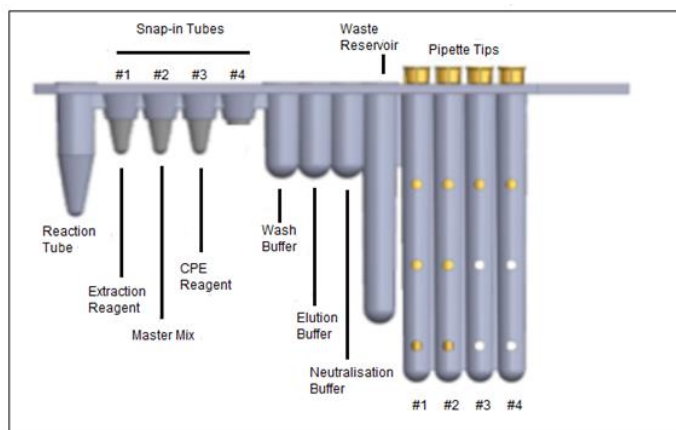
Detector	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Canal	1	2	3	4	5
Diana	KPC	VIM	OXA-48	NDM	SPC*

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

Cuando lleve a cabo la prueba por primera vez deberá programarla prueba por PCR "Check-Direct CPE 4" 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. Inserte un tubo de reactivo de extracción BD ExK-1 (film blanco) en la posición 1 de la tira de reactivos, véase Figura 1.
  - 2.2.b. Inserte un tubo de Master Mix DNAMMK (film verde/amarillo) en la posición 2 de la tira de ADN, véase la Figura 1.
  - 2.2.c. Inserte un tubo de reactivo CPE (film azul/púrpura) en la posición 3 de la tira de ADN, véase la Figura 1.



**Figura 1:** Configuración de la tira de reactivos individual de DNA

### 3. Configuración del instrumento BD MAX™

- 3.1 Abra la pestaña **Serie** del **software v4.70** o posterior del sistema BD MAX™ y rellene la **Lista de trabajo**.
- 3.2 Seleccione **Test** "Check-Direct CPE 4". Consulte el Anexo 1 para crear la prueba "Check-Direct CPE 4" 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 en cuadro **Número de acceso**. 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 de  $C_T$ "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 los métodos de interpretación descritos 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 en el sistema BD MAX™. Si los valores  $C_T$  de los controles no son los previstos, consulte Preguntas Frecuentes y Solución de Problemas "3".

**Tabla 2:** Criterios para una serie válida con la prueba Check-Direct CPE. (NR = no relevante)

Tipo de muestra*	C <sub>T</sub> 475/520 KPC	C <sub>T</sub> 530/565 VIM	C <sub>T</sub> 585/630 OXA-48	C <sub>T</sub> 630/665 NDM	C <sub>T</sub> 680/715 SPC
Controles positivos	32 ±3	30 ± 3	29 ±3	31 ±3	N.R.
Muestra negativa	-1	-1	-1	-1	29 ±3

## 2.2 Interpretación de los resultados

Si la serie ha sido validada, intérprete los resultados como positivo, negativo o sin resolver según los valores C<sub>T</sub> obtenidos para las muestras, siguiéndolas pautas resumidas en la Tabla 3. Las series sin resolver deben ser analizadas de nuevo.

Los valores C<sub>T</sub> obtenidos con células bacterianas estarán generalmente dentro de una ventana C<sub>T</sub> específica para cada diana debido a que se utilizó una cantidad bien definida de células como material de entrada para la prueba. Sin embargo, tenga en cuenta que los valores C<sub>T</sub> pueden variar considerablemente entre las cepas individuales. La **Tabla 3** especifica el umbral superior de esta ventana de C<sub>T</sub>, un valor C<sub>T</sub> más elevado sugiere que la muestra está contaminada o que la cepa no es pura. Por lo tanto, este resultado se considerará como "sin resolver".

**Tabla 3:** Pautas para la interpretación de datos de las células bacterianas (N.R. = no relevante).

C <sub>T</sub> 475/520 KPC	C <sub>T</sub> 530/565 VIM	C <sub>T</sub> 585/630 OXA-48	C <sub>T</sub> 630/665 NDM	C <sub>T</sub> 680/715 SPC	Interpretación
≤ 33	≤ 27	≤ 26	≤ 32	N.R.	Positivo
-1	-1	-1	-1	29 ±3	Negativo
> 33	> 27	> 26	> 32	N.R.	Sin resolver
-1	-1	-1	-1	-1	Sin resolver

### NOTAS IMPORTANTES:

- 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<sub>T</sub> 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.
- La Master Mix BD DNA MMK puede estar caducada.
- 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<sub>T</sub> 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.
- La Master Mix BD DNA MMK puede estar caducada.
- 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 que contienen las sondas fluorescentes y primers pueden haberse degradado. Compruebe la fecha de caducidad y asegúrese de que los tubos CPE 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 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 utiliza un rango de marcadores específicos de ADN para detectar la presencia de los genes de carbapenemasas KPC, NDM, OXA-48 y VIM, que en la actualidad 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 utilizada con células bacterianas puras como material de entrada.

La calidad del ADN de entrada es un factor importante para obtener unos resultados fiables con Check-Direct CPE. Para las suspensiones celulares, las densidades celulares correctas son un factor importante para obtener resultados fiables. El procedimiento descrito en este manual debe seguirse estrictamente. 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 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.

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

## Leyenda de los símbolos utilizados

Símbolo	Definición
	Control CPE
	Solo para uso en investigación (SUI) No utilizar en procedimientos
	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*.

### 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 v.4.70 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 **4.70 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 la prueba:** *Check-Direct CPE 4*.
  - Tipo de extracción:** Seleccione *Exk DNA-1 (Plasma/Serum)[4-snap]*.
  - Formato de mezcla maestra:** seleccione *Tipo 1: BD MMK o MMK(SPC) y sondas y primers desecados*.
  - Ejemplo de parámetros de extracción:** Seleccione *Configuración predeterminada*, véase la Tabla A.
  - Cálculo C<sub>T</sub>:** Seleccione *Cálculo de C<sub>T</sub> en punto de inflexión*.

### Guárdelos 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.

### Guárdelos parámetros

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

### Guárdelos parámetros

**Tabla A:** Parámetros de extracción de muestra.

Parámetros	Valor
Tiempo de calentamiento	10
Temperatura de lisis	37
Altura de punta de	1600
Volumen de muestra	937,5
Volumen de lavado	500
Volumen de neutralización	12,5
Tiempo de	----

**Tabla B:** Parámetros de ganancia.

Detector	Alias	Ganancia	Umbral
475/520	KPC	40	100
530/565	VIM	80	150
585/630	OXA-48	30	150
630/665	NDM	80	150
680/715	SPC	40	150

**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