

1 Uso previsto

RealCycler PASM-G es un kit de reactivos que permite la detección cualitativa por PCR a tiempo real del ADN de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* y del gen *mecA* (meticilin-resistente) y *Staphylococcus aureus* en muestras clínicas. El sistema incluye un control interno de amplificación para prevenir los falsos negativos debidos a la inhibición de la reacción.

2 Especificaciones

- **Sensibilidad:** 100 copias/μL *Pseudomonas aeruginosa*, 10 copias/μL *Acinetobacter baumannii*, 1000 copias/μL gen *mecA* y 10 copias/μL *Staphylococcus aureus*.
- **Especificidad:** *Pseudomonas aeruginosa* (gen *hcpC*), *Acinetobacter baumannii* (gen *dnaA*), gen *mecA* y *Staphylococcus aureus* (gen *NUC*).

3 Estabilidad y almacenamiento

Todos los componentes del kit *RealCycler* PASM-G deben ser almacenados a -20°C. El kit es estable a -20°C hasta la fecha de caducidad (ver etiqueta externa del kit).


4 Descripción del método

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está basada en la amplificación de una región específica del genoma del patógeno usando primers y sondas específicos. En la PCR a tiempo real se utilizan sondas marcadas con fluorocromos. Hay una emisión de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de ADN presente en la muestra. El *Cycle threshold* (Ct) es el ciclo de la PCR en el que se detecta inicialmente un aumento en la señal de fluorescencia. En la amplificación de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* se detecta en FAM, *Acinetobacter baumannii* en TxR y el control interno en Alx532. En la amplificación de *Staphylococcus aureus* y gen *mecA* (meticilin-resistente), el gen *mecA* se detecta en FAM, *Staphylococcus aureus* en TxR y el control interno en Alx532.

5 Composición

RealCycler PASM-G incluye la mezcla de reacción **Amplimix PACI** y **Amplimix SAMA**, un **Control Positivo ADN *Pseudomonas***, un **control positivo ADN *Acinetobacter*** y un **Control Positivo MRSA**. Todos los reactivos están listos para su uso sin añadir ni reconstituir ningún componente.

Componente	Viales	Número	Volumen	Conservación
AmpliMix PACI		1	440 μL	-15 /-25 °C
AmpliMix SAMA		1	440 μL	-15 /-25°C
Control Positivo ADN <i>Pseudomonas</i>		1	30 μL	-15 /-25°C
Control Positivo ADN <i>Acinetobacter</i>		1	30 μL	-15 /-25°C

Componente	Viales	Número	Volumen	Conservación
Control Positivo ADN MRSA		1	60 μL	-15 /-25°C

6 Material y equipamiento adicional requerido y no suministrado

- Equipo de PCR a tiempo real
- Kit de extracción de ADN
- Guantes desechables
- Pipetas calibradas
- Puntas de pipeta con filtro
- Congelador (-20°C)

7 Advertencias y precauciones

- Todos los componentes del kit deben mantenerse en frío mientras se están manipulando.
- Después de añadir el ADN, minimizar el tiempo necesario para iniciar el programa de amplificación.
- Los tubos con la mezcla de amplificación no deben exponerse a la luz durante un periodo de tiempo prolongado.
- Descongelar y congelar repetidas veces los reactivos puede disminuir la sensibilidad del kit.
- Usar guantes desechables.
- Usar pipetas calibradas y puntas de pipeta con filtro.
- Los ensayos deben llevarse a cabo por personal cualificado y siguiendo las buenas prácticas de laboratorio.
- No usar el kit después de la fecha de caducidad.
- Uso para diagnóstico *in vitro*.

8 Muestras clínicas

- Recoger las muestras en tubos estériles.
- Almacenarlas y transportarlas congeladas a -20°C hasta su uso.
- Utilizar ADN bien purificado y libre de inhibidores de la PCR.

9 Procedimiento

a) Extracción de ADN

Procedimiento PACI

b) Protocolo

Stage 1				Stage 2			
Hold				Repeat 40 times.			
Temp	Secs	Optics		3-Temperature Cycle			
95.0	900	Off		Deg/Sec	Temp	Secs	Optics
				NA	95.0	15	Off
				NA	65.0	30	On
				NA	72.0	30	Off
<input type="checkbox"/> Advance to Next Stage							

Selección de fluoróforos:

- FAM: detecta *Pseudomonas aeruginosa*
- TxR: detecta *Acinetobacter baumannii*
- Alx532: detecta el control interno.

c) Preparación de la reacción

- Descongelar la **AmpliMix** y los **Controles Positivos ADN *Pseudomonas* y *Acinetobacter***.
- Tomar una alícuota de **17,75 µL** de Amplimix y añadir **7,25 µL** del ADN de cada muestra o control a cada tubo.
- Colocar los tubos en el equipo.
- Seleccionar el protocolo "PACI-G".
- Iniciar el programa de amplificación.

d) Interpretación de los resultados

FAM Std/Res	TxR Std/Res	Alx532 Std/Res	Interpretación
POS	ND	Indiferente	POSITIVO <i>P. aeruginosa</i>
ND	POS	Indiferente	POSITIVO <i>A. baumannii</i>
POS	POS	Indiferente	POSITIVO <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i>
ND	ND	POS	NO SE DETECTA
ND	ND	ND	NO VALORABLE

Procedimiento SAMA

b) Protocolo

Stage 1			Stage 2			
Hold			Repeat 45 times.			
Temp	Secs	Optics	3-Temperature Cycle			
95.0	900	Off	Deg/Sec	Temp	Secs	Optics
			NA	95.0	15	Off
			NA	60.0	30	On
			NA	72.0	30	Off
<input type="checkbox"/> Advance to Next Stage						

Selección de fluoróforos:

- FAM: detecta gen *mecA*
- TxR: detecta *Staphylococcus aureus*
- Alx532: detecta el control interno.

c) Preparación de la reacción

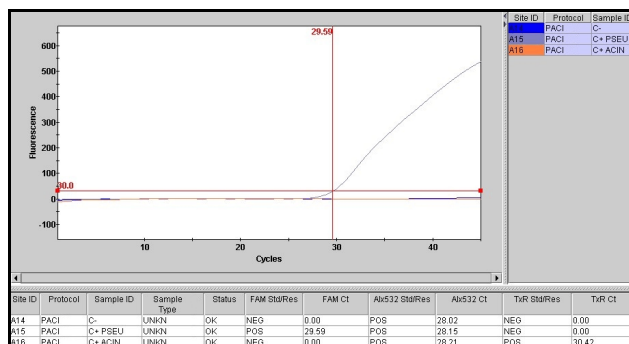
- Descongelar la **AmpliMix** y el **Control Positivo ADN MRSA**.
- Tomar una alícuota de **17,75 µL** de Amplimix y añadir **7,25 µL** del ADN de cada muestra o control a cada tubo.
- Colocar los tubos en el equipo.
- Seleccionar el protocolo "SAMA-G".
- Iniciar el programa de amplificación.

d) Interpretación de los resultados

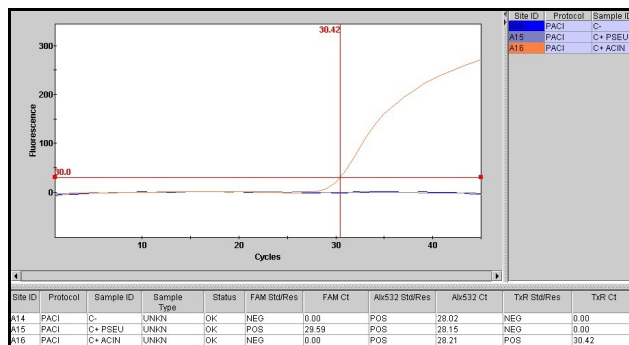
FAM Std/Res	TxR Std/Res	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	Interpretación
<i>mecA</i>	<i>S. aureus</i>	control interno	control interno	
POS	POS	Indiferente	Indiferente	POSITIVO <i>mecA</i> POSITIVO <i>S. aureus</i>
POS	ND	Indiferente	Indiferente	POSITIVO <i>mecA</i> no <i>S. aureus</i>
ND	POS	Indiferente	Indiferente	POSITIVO <i>S. aureus</i>
ND	ND	POS	Ct dentro de rango	NO SE DETECTA
ND	ND	POS	Ct fuera de rango	NO VALORABLE
ND	ND	ND	0,00	NO VALORABLE

e) Ejemplo de resultado

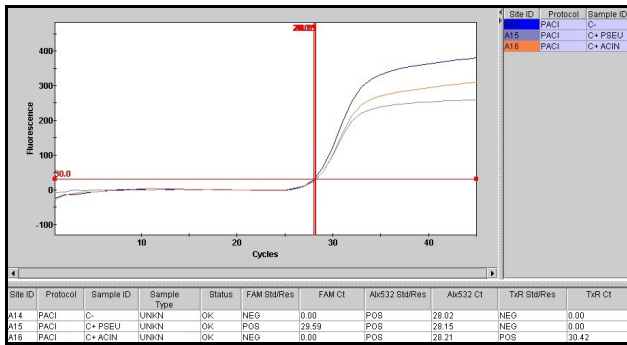
PACI



Gráfica 1 (Canal FAM: *Pseudomonas*): Resultado obtenido al amplificar un control negativo, un control positivo *Pseudomonas* y un control positivo *Acinetobacter*. Control negativo (A14 en azul): ausencia de señal. Control positivo *Pseudomonas* (A15 en gris): se observa señal con Ct=29,59. Control positivo *Acinetobacter* (A16 en naranja): ausencia de señal.

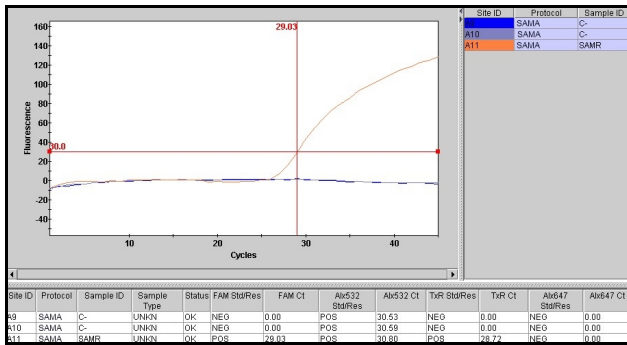


Gráfica 2 (Canal TxR: *Acinetobacter*): Resultado obtenido al amplificar un control negativo, un control positivo *Pseudomonas* y un control positivo *Acinetobacter*. Control negativo (A14 en azul): ausencia de señal. Control positivo *Pseudomonas* (A15 en gris): ausencia de señal. Control positivo *Acinetobacter* (A16 en naranja): se observa señal con Ct=30,42.

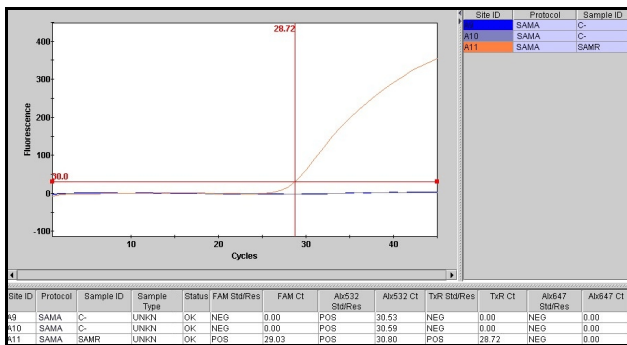


Gráfica 3 (Canal Alx532: control interno): Resultado obtenido al amplificar un control negativo, un control positivo *Pseudomonas* y un control positivo *Acinetobacter*. Control negativo (A14 en azul): se observa señal con Ct=30,0. Control positivo *Pseudomonas* (A15 en gris): se observa señal con Ct=28,15. Control positivo *Acinetobacter* (A16 en naranja): se observa señal con Ct=28,21.

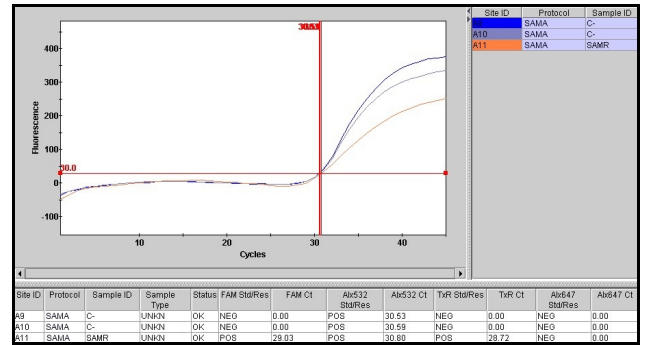
SAMA



Gráfica 1 (Canal FAM: mecA): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos y un control positivo MRSA. Control negativo (A9 en azul): ausencia de señal. Control negativo (A10 en gris): ausencia de señal. Control positivo MRSA (A11 en naranja): se observa señal con Ct=29,03.



Gráfica 2 (Canal TxR: *S.aureus*): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos y un control positivo MRSA. Control negativo (A9 en azul): ausencia de señal. Control negativo (A10 en gris): ausencia de señal. Control positivo MRSA (A11 en naranja): se observa señal con Ct=28,72.



Gráfica 3 (Canal Alx532: control interno): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos y un control positivo MRSA. Control negativo (A9 en azul): se observa señal con Ct=30,53. Control negativo (A10 en gris): se observa señal con Ct=30,59. Control positivo MRSA (A11 en naranja): se observa señal con Ct=30,80.

10 Control de calidad

Se recomienda que se lleven a cabo controles positivos y negativos cada vez que se realice un análisis.

Cada lote del kit *RealCycler* PASM-G ha sido testado según las especificaciones de la PCR a tiempo real utilizando el equipo *SmartCycler*® (*Cepheid*®).

11 Observaciones

Tabla de compatibilidad de fluoróforos.

Fluoróforo	Fluoróforo alternativo
FAM	
TET	CAL Fluor Gold 540
HEX	JOE, VIC, CAL Fluor Orange 560, Alexa 532
Texas Red	ROX, LC Red 610, CAL Fluor Red 610

Fecha de publicación: Marzo 2012.