

Fabricado por:



3B BlackBio Dx Ltd.

7-C Industrial Area, Govindpura, Bhopal- 462 023 (M.P.) INDIA



Wellkang Ltd

Enterprise Hub, Complejo Empresarial NW,
1 Beraghmore Rd. Derry, BT48 8SE, Irlanda del Norte, Reino Unido

Distribuye:

atencion.clientes@akralab.es
+36 965 116 521
www.akralab.es



Kit Panel Meningitis TRUPCR®

(Detección Multiplex Basada en PCR en Tiempo Real)

Versión 1.0

Ref	Formato	Descripción
3B353	48 Reacciones	Kit de Panel de Meningitis TRUPCR®
3B354	96 Reacciones	Kit de Panel de Meningitis TRUPCR®

Almacenar a -20°C



1. DESCRIPCIÓN

TRUPCR® Meningitis Panel Kit es un ensayo de amplificación de ácidos nucleicos in vitro para la detección cualitativa y diferenciación de enterovirus, virus de Epstein-Barr, virus del herpes simple 1 y 2, adenovirus humano, citomegalovirus humano, herpesvirus humano 6 y 7, parechovirus humano, parvovirus humano B19 7, parechovirus humano, parvovirus humano B19, virus de las paperas, virus de la varicela zoster, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC), *Non-tuberculosis Mycobacterium* (NTM) y *Cryptococcus neoformans/gattii* Real-Time PCR. Este kit también incluye un control interno endógeno. Los resultados del **TRUPCR® Meningitis Panel Kit** deben interpretarse en el contexto de todos los hallazgos clínicos y de laboratorio relevantes.

2. REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

Reactivo	Descripción	Volumen en µL	
		48 reacciones	96 reacciones
Mezcla maestra multiplex	<ul style="list-style-type: none"> ADN polimerasa de arranque en caliente Tampón de reacción dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) MgCl₂ y estabilizadores 	840µl x 4	840µl x 8
Primer Sonda Mix-1	Mezcla de cebadores para la detección de Adenovirus humano, Enterovirus, Virus Parecho humano y control interno endógeno	240 µL x 2	240 µL x 4
Primer Sonda Mix-2	Mezcla de cebadores para la detección del VHS 1 y 2, el virus de las paperas y el control interno endógeno	240 µL x 2	240 µL x 4
Primer Sonda Mix-3	Mezcla de cebadores para la detección del parvovirus humano B19, humano, EBV, VZV y control interno endógeno	240 µL x 2	240 µL x 4
Primer Sonda Mix-4	Mezcla de cebadores para la detección de CMV, HHV 6, HHV 7 y control interno endógeno	240 µL x 2	240 µL x 4
Primer Sonda Mix-5	Mezcla de cebadores y sondas para <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Escherichia coli</i> y detección de controles internos endógenos	240 µL x 2	240 µL x 4
Primer Sonda Mix-6	Mezcla de cebadores para la detección de <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> y control interno endógeno.	240 µL x 2	240 µL x 4
Primer Sonda Mix-7	Mezcla de cebadores para la detección de MTBC, NTM, <i>Cryptococcus neoformans/gattii</i> y control interno endógeno	240 µL x 2	240 µL x 4
Control positivo	Control positivo para los 7 tubos	350 µL x 2	350 µL x 4
Control negativo	Agua esterilizada	500 µL x 2	500 µL x 4

3. TIPO DE MUESTRA

Ácido nucleico total extraído de muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de origen humano utilizadas como muestra para esta prueba.

4. PROTOCOLO PCR EN TIEMPO REAL

I. Preparación de la reacción

NOTA: Para una sola muestra/Control Positivo (CP)/Control Sin Plantilla (CNP) deben utilizarse siete tubos distintos.

Tubo-1	Tubo-2	Tubo-3	Tubo-4	Tubo-5	Tubo-6	Tubo 7
Adenovirus humano + Enterovirus + parechovirus humano + Control interno	Herpes simplex virus 1 + Herpes simplex virus 2+ virus de las paperas + Control interno	Parvovirus B19 humano + virus de Epstein-Barr + virus de la varicela zoster + Control interno	Citomegalovirus humano + herpes virus humano 6 y 7 + Control interno	<i>Haemophilus Haemophilus + Neisseria meningitidis + Escherichia coli + Control interno</i>	<i>Streptococcus agalactiae + Streptococcus pneumoniae + Listeria monocytogenes + Control interno</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) + Non-tuberculosis Mycobacterium (NTM) + Cryptococcus neoformans/gattii + Control interno</i>

Prepare la PCR Mix como se indica a continuación:

Nombre del reactivo	Para 1 reacción						
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7
Mezcla maestra multiplex	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Primer Probe Mix -1	10 µl	-	-	-	-	-	-
Primer Probe Mix -2	-	10 µl	-	-	-	-	-
Primer Probe Mix -3	-	-	10 µl	-	-	-	-
Primer Probe Mix -4	-	-	-	10 µl	-	-	-
Primer Probe Mix -5	-	-	-	-	10 µl	-	-
Primer Probe Mix -6	-	-	-	-	-	10 µl	-
Primer Probe Mix -7	-	-	-	-	-	-	10 µl
Volumen total de reacción	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

- a) Transfiera **20 µl** de la mezcla de reacción preparada anteriormente en tubos PCR de 0,2 ml y cierre los tubos.
b) Para **20 µl** de la mezcla de reacción anterior, añada **5 µl** de muestras de ácido nucleico extraído o control positivo o control negativo y complete el volumen final con **25 µl**.

NOTA:

- I. Descongelar todos los reactivos a temperatura ambiente (15-25°C).
- II. No agitar los reactivos en vórtex, sino mezclar el contenido mediante golpecitos suaves.
- III. Centrifugar todos los viales de reactivos antes de utilizarlos.
- IV. No agitar la mezcla de reacción precargada.
- V. Después de añadir las muestras de ADN o el control positivo o el control negativo a los tubos de PCR, la mezcla de reacción debe mezclarse mediante suaves golpecitos/pipeteo.

II. Puesta en marcha del programa

Defina el siguiente ajuste para el Perfil de Temperatura y la Adquisición de Colorante

Paso	Temperatura, °C	Tiempo	Adquisición de tintes	Ciclos
1	50	15 minutos	-	1
2	94	10 minutos	-	1
3	94	15 segundos	-	7
4	62	30 segundos	-	
5	72	15 segundos	-	
6	94	15 segundos	-	32
7	60	45 segundos	Sí	
8	72	15 segundos	-	

Tinte pasivo de referencia - Ninguno

III. Selección de canales

Defina la siguiente configuración para la selección de canales

Nº de tubo	Detección	Nº de tubo	Detección	Reportero
1	Adenovirus humano	5	<i>Haemophilus influenzae</i>	FAM/Verde
	Enterovirus		<i>Neisseria meningitidis</i>	HEX/VIC/Amarillo
	Parechovirus humano		<i>Escherichia coli</i>	Rojo Texas/ROJO/Naranja
	Control interno endógeno		Control interno endógeno	Cy5/Rojo
2	Virus del herpes simple 1	6	<i>Streptococcus agalactiae</i>	FAM/Verde
	Virus del herpes simple 2		<i>Neumonía por Streptococcus</i>	HEX/VIC/Amarillo
	Virus de las paperas		<i>Listeria monocytogenes</i>	Rojo Texas/ROJO/Naranja
	Control interno endógeno		Control interno endógeno	Cy5/Rojo
3	Parvovirus humano B19	7	Micobacterias no tuberculosas	FAM/Verde
	Virus de Epstein-Barr		Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	HEX/VIC/Amarillo
	Virus varicela-zóster		<i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>	Rojo Texas/ROJO/Naranja
	Control interno endógeno		Control interno endógeno	Cy5/Rojo
4	Citomegalovirus humano	-	-	FAM/Verde
	Herpesvirus humano 6		-	HEX/VIC/Amarillo
	Herpesvirus humano 7		-	Rojo Texas/ROJO/Naranja
	Control interno endógeno		-	Cy5/Rojo

IV. VALOR UMBRAL PARA ALGUNAS CICLADORAS POPULARES

Para este TRUPCR® Meningitis Panel Kit, los valores umbral son diferentes en los distintos instrumentos de PCR en tiempo real, como se indica a continuación:

Nº de sl.	Instrumental en tiempo real	Rango del valor umbral*
1	Applied Biosystems® 7500 Fast	1,0e+004 - 2,0e+004
2	Applied Biosystems QuantStudio 5	5000 - 40000
3	Bio-Rad CFX-96	200-600

*Rango del umbral: El valor absoluto del umbral varía entre el rango mencionado en la tabla anterior. El valor absoluto varía de un instrumento a otro en función de su antigüedad, modelo y calibración. Para cualquier consulta, póngase en contacto con nuestro equipo de asistencia técnica.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Las reacciones de control negativo de los conjuntos sonda/primer no deben presentar curvas de crecimiento de fluorescencia que crucen la línea de umbral. Si se produce un falso positivo con una o más de las reacciones NTC de cebadores y sondas, es posible que se haya producido una contaminación de la muestra.
2. Todas las muestras clínicas deben presentar curvas de reacción de control interno endógeno que crucen la línea de umbral a los 28 ciclos o antes, indicando así la presencia de suficiente ácido nucleico del gen de control interno endógeno que indica que la muestra es de calidad aceptable. Sin embargo, es posible que algunas muestras no den reacciones positivas debido al bajo número de células en la muestra clínica original. La no detección del gen de control interno endógeno en cualquiera de las muestras clínicas puede indicar:

- (a) Extracción incorrecta del ácido nucleico de los materiales clínicos, con la consiguiente pérdida de ADN/ARN o arrastre de inhibidores de la RT-PCR de las muestras clínicas.
- (b) Ausencia de suficiente material celular humano en la muestra para permitir la detección
- (c) Montaje y ejecución inadecuados de los ensayos
- (d) Mal funcionamiento del reactivo o del equipo

3. Las reacciones de control positivo para cada reacción de sonda/primer deben dar los siguientes valores de Ct:

Nº de tubo	Control positivo	Valores Ct esperados	Nº de tubo	Control positivo	Valores Ct esperados
1.	Adenovirus humano	20±4	5.	<i>Haemophilus influenzae</i>	20±4
	Enterovirus	20±4		<i>Neisseria meningitidis</i>	20±4
	Parechovirus humano	20±4		<i>Escherichia coli</i>	20±4
	Control interno endógeno	20±4		Control interno endógeno	20±4
2.	Virus del herpes simple 1	20±4	6.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	20±4
	Virus del herpes simple 2	20±4		<i>Neumonía por Streptococcus</i>	20±4
	Virus de las paperas	20±4		<i>Listeria monocytogenes</i>	20±4
	Control interno endógeno	20±4		Control interno endógeno	20±4
3.	Parvovirus humano B19	20±4	7.	Micobacterias no tuberculosas	20±4
	Virus de Epstein-Barr	20±4		Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20±4
	Virus varicela-zóster	20±4		<i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>	20±4
	Control interno endógeno	20±4		Control interno endógeno	20±4
4.	Citomegalovirus humano	20±4	-	-	-
	Herpesvirus humano 6	20±4	-	-	-
	Herpesvirus humano 7	20±4	-	-	-
	Control interno endógeno	20±4	-	-	-

4. Cutoff- Este ensayo se ejecuta durante 32 ciclos, sin embargo ninguna amplificación más allá de 30 ciclos debe ser considerada para cualquier interpretación, por lo tanto el cutoff es 30 Ct.

5. Cuando todos los controles cumplen los requisitos establecidos, se considera que un espécimen sigue las siguientes interpretaciones

Tubo no.	Señal	Organismo	Tubo no.	Señal	Organismo	Canales
Tubo-1	Presente	Adenovirus humano	Tubo-5	Presente	<i>Haemophilus influenzae</i>	Verde /FAM
	Presente	Enterovirus		Presente	<i>Neisseria meningitidis</i>	Amarillo /HEX/VIC
	Presente	Parechovirus humano		Presente	<i>Escherichia coli</i>	Naranja /Rojo Texas/ROX
	Presente	Control interno endógeno		Presente	Control interno endógeno	Cy5/Rojo
Tubo-2	Presente	Virus del herpes simple 1	Tubo-6	Presente	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Verde /FAM
	Presente	Virus del herpes simple 2		Presente	<i>Neumonía por Streptococcus</i>	Amarillo /HEX/VIC
	Presente	Virus de las paperas		Presente	<i>Listeria monocytogenes</i>	Naranja /Rojo Texas/ROX
	Presente	Control interno endógeno		Presente	Control interno endógeno	Cy5/Rojo
Tubo-3	Presente	Parvovirus humano B19	Tubo 7	Presente	<i>Micobacterias no tuberculosas</i>	Verde /FAM
	Presente	Virus de Epstein-Barr		Presente	<i>Mycobacterium tuberculosis complejo</i>	Amarillo /HEX/VIC
	Presente	Virus varicela-zóster		Presente	<i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>	Naranja /Rojo Texas/ROX
	Presente	Control interno endógeno		Presente	Control interno endógeno	Cy5/Rojo
Tubo-4	Presente	Citomegalovirus humano	-	-	-	Verde /FAM
	Presente	Herpesvirus humano 6	-	-	-	Amarillo /HEX/VIC
	Presente	Herpesvirus humano 7	-	-	-	Naranja /Rojo Texas/ROX
	Presente	Control interno endógeno	-	-	-	Cy5/Rojo

NOTA:

- I. Si es necesario, inspeccione manualmente las curvas de amplificación de todas las muestras. Asigne un valor Ct para verificar la amplificación positiva.
- II. Si el control interno endógeno está ausente, es necesario volver a extraer la muestra o recoger una muestra nueva.
- III. Si el no es concluyente, vuelva a extraer la muestra y analice el ácido nucleico total recién extraído (recomendado) o vuelva a analizar el ácido nucleico total extraído.

6. SENSIBILIDAD

Nº de tubo	Control positivo	Límite de detección	Nº de tubo	Control positivo	Límite de detección
1.	Adenovirus humano	700 UI/ML	5.	<i>Haemophilus influenzae</i>	500 UFC/ML
	Enterovirus	700 UI/ML		<i>Neisseria meningitidis</i>	500 UFC/ML
	Parechovirus humano	700 UI/ML		<i>Escherichia coli</i>	500 UFC/ML
2.	Virus del herpes simple 1	200 UI/ML	6.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	250 UFC/ML
	Virus del herpes simple 2	200 UI/ML		<i>Neumonía por Streptococcus</i>	500 UFC/ML
	Virus de las paperas	700 UI/ML		<i>Listeria monocytogenes</i>	500 UFC/ML
3.	Parvovirus humano B19	700 UI/ML	7.	Micobacterias no tuberculosas	150 UFC/ML
	Virus de Epstein-Barr	100 UI/ML		Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15 UFC/ML
	Virus varicela-zóster	100 UI/ML		<i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>	500 UFC/ML
4.	Citomegalovirus humano	500 UI/ML	-	-	-
	Herpesvirus humano 6	700 UI/ML	-	-	-
	Herpesvirus humano 7	700 UI/ML	-	-	-

7. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS DE PCR EN TIEMPO REAL

No.	Observación	Causas probables	Comentarios
1	Señal de amplificación en el control negativo	La contaminación cruzada se produjo durante la preparación de la PCR o durante la extracción.	<ul style="list-style-type: none"> Repita la PCR con nuevos reactivos en repeticiones. Pipetear por fin los controles positivos. El espacio de trabajo y los instrumentos deben descontaminarse a intervalos regulares.
2	No hay señal de amplificación con los controles positivos	Manipulación incorrecta de los controles positivos.	<ul style="list-style-type: none"> Insuficiente o nulo vórtex y descongelación a temperatura ambiente
		Falta o insuficiencia de la muestra de control positivo durante Además.	<ul style="list-style-type: none"> Compruebe sus pasos de trabajo mediante la lista de comprobación de pipeteo.
		Las condiciones de almacenamiento del control positivo no se ajustaban a las instrucciones o el kit ha caducado.	<ul style="list-style-type: none"> Por favor, compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (véase la etiqueta del producto) de los reactivos y utilice una nueva prueba, si necesario.
		Programación incorrecta del perfil de temperatura del termociclador.	<ul style="list-style-type: none"> Compare el perfil de temperatura con el manual.
3	Señal débil o nula del Control Interno	El reactivo se ha descongelado y congelado con demasiada frecuencia o expuestos a condiciones de almacenamiento inadecuadas.	<ul style="list-style-type: none"> Compruebe las condiciones de almacenamiento indicadas en el manual.
		La PCR se inhibió o no se añadió / se añadió demasiado poco control interno durante la mezcla de la PCR.	<ul style="list-style-type: none"> NA de mala calidad puede interferir con la reacción PCR, utilice un método de aislamiento recomendado que sea compatible con el kit. Una señal positiva fuerte de un patógeno puede inhibir ocasionalmente la fluorescencia de un control interno.

8. MATERIAL Y DISPOSITIVOS NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Pipetas ajustables con filtro estéril o puntas de desplazamiento positivo
- Guantes desechables sin polvo
- Viales PCR (0,2 ml, paredes finas)
- Tubos de microcentrífuga estériles de 1,5 ml y 2 ml
- Mezclador vórtex
- PCR en tiempo real
- 96 - 100% etanol
- Equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes, gafas)
- Agua bidestilada estéril
- Cabina de flujo de aire laminar
- Kit de extracción de ácido nucleico total

9. PRECAUCIONES GENERALES

El usuario siempre debe prestar atención a lo siguiente:

- El producto debe entregarse con hielo seco. Compruebe la presencia de hielo seco a su llegada.
- No utilice productos o componentes caducados.
- Deben utilizarse micropipetas calibradas o verificadas, puntas de micropipeta libres de DNasa, RNasa y pirógenos con filtros, y tubos de microcentrífuga libres de DNasa, RNasa y pirógenos para preparar la mezcla de reacción de PCR y alícuotas de los tubos de reactivos para evitar resultados de PCR inusuales, así como la contaminación microbiana de los reactivos.
- Asegúrese de que los instrumentos de PCR en tiempo real están aprobados para su uso en diagnóstico in vitro, y de que han sido instalados, calibrados, comprobados y mantenidos de acuerdo con las instrucciones y recomendaciones del fabricante.
- Descongele bien todos los componentes a temperatura ambiente antes de iniciar la detección.
- Una vez descongelados, mezclar los componentes y centrifugar brevemente.
- Utilizar guantes desechables, batas de laboratorio y proteger los ojos durante la manipulación de muestras y reactivos. Lávese bien las manos después.
- No coma, beba, fume, se aplique cosméticos ni manipule lentes de contacto en las áreas de trabajo del laboratorio.
- Elimine todas las muestras y los reactivos no utilizados de conformidad con los requisitos de las autoridades locales.
- Las muestras deben considerarse potencialmente infecciosas y manipularse en una cabina biológica siguiendo las prácticas de bioseguridad adecuadas. El material infectado y los utensilios de plástico desechables que hayan estado en contacto con material infectado deben tratarse con soluciones que contengan cloro.
- Almacene las muestras de ácido nucleico extraídas a -20°C hasta que estén listas para su uso y manténgalas en hielo durante su utilización.
- Limpie y desinfecte todos los derrames de muestras o reactivos y todas las superficies de trabajo con un desinfectante, como hipoclorito sódico al 0,5 % en agua desionizada o destilada u otro desinfectante adecuado.
- Evitar el contacto con la piel, ojos y mucosas. En caso de contacto con la piel, ojos y mucosas, lavar inmediatamente con agua y al médico.
- Las fichas de datos de seguridad de los materiales (MSDS) están disponibles previa solicitud.
- El uso de este producto debe limitarse a personal formado en las técnicas de amplificación de ARN/ADN.
- El proceso del laboratorio debe ser unidireccional; debe comenzar en el Área de Extracción y luego pasar a las Áreas de Amplificación y Detección. No devuelva las muestras, el equipo y los reactivos al área en la que se realizó el paso anterior.

10. ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

Todos los componentes de TRUPCR® Meningitis Panel Kit deben conservarse a -20°C y mantenerse estables hasta la fecha de caducidad indicada. Descongelar y manipular los reactivos en hielo. No congelar/descongelar los viales del Kit repetidamente. En caso de uso frecuente, se recomienda que los reactivos puedan ser alícuotados y almacenados a -20°C con el fin de mantener la estabilidad y sensibilidad. Se ha demostrado que los componentes de este kit mantienen la estabilidad durante 3 ciclos de congelación-descongelación. Deben evitarse más de 3 ciclos de congelación-descongelación de los reactivos. El kit no debe utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta exterior de la caja.

11. ASISTENCIA TÉCNICA

Para obtener asistencia al cliente, póngase en contacto con nuestro Servicio de Asistencia Técnica:

Correo electrónico: info@3blackbio.com, techsupport@3blackbio.com;

12. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

Ref	Formato	Descripción
3B353	48 Reacciones	Kit de Panel de Meningitis TRUPCR®
3B354	96 Reacciones	Kit de Panel de Meningitis TRUPCR®