

BIOTOOLS

BIOTOOLS B&M LABS.S.A.

Fabricado por:

BIOTOOLS B&M Labs, S.A.
Valle de Tobalina - 52 - Nave 39
28021 Madrid
Spain

Tel. (34) 91 710 00 74
Fax (34) 91 505 31 18
e-mail: info@biotools.eu
www.biotools.eu

BIOHBV Kit

***Kit para la detección de ADN de Virus de
Hepatitis B (HBV) en muestras clínicas***

Manual de Uso

Ref. 90.053

**ANTES DE USAR ESTE KIT LEA EN SU TOTALIDAD LAS INSTRUCCIONES DE USO
ESPECIALMENTE SI NO ESTÁ FAMILIARIZADO CON EL PROTOCOLO**

BIOHBV Kit

**Uso exclusivo en investigación
No para procedimientos diagnósticos
Los resultados del test sólo pueden ser utilizados para análisis preliminar**

Algunas de las aplicaciones que pueden ser llevadas a cabo por este producto pueden estar cubiertas por patentes aplicables en determinados países. La compra de este producto no incluye o proporciona una licencia para llevar a cabo aplicaciones patentadas. Los usuarios podrían tener que obtener una licencia según el país y/o la aplicación. BIOTOOLS no apoya el uso sin licencia de aplicaciones patentadas.

COMPRUEBE LA INTEGRIDAD DEL KIT Y SUS COMPONENTES ANTES DE USARLO. EL USO DE KITS DETERIORADOS PUEDE INDUCIR A RESULTADOS INCORRECTOS.

1. USO PREVISTO

El BIOHBV Kit es un método para la determinación cualitativa de virus Hepatitis B (HBV) en muestras clínicas mediante amplificación de ADN. El kit se basa en una única reacción de amplificación semi-nested, alcanzando una alta sensibilidad y especificidad. El kit ha sido testado con muestras de diverso origen (europeo, africano, asiático y de Medio Oriente).

BIOHBV Kit se utiliza con los siguientes tipos de muestra:

- Muestras de sangre con EDTA. Las muestras con heparina o ácido cítrico no han sido testadas, su uso podría causar una disminución en la eficiencia del Kit.
- Muestras de plasma / suero con heparina. Las muestras almacenadas en otras condiciones no han sido testadas y su uso puede causar una disminución en la eficiencia del Kit.
- Biopsias de hígado. Los tejidos a analizar con el kit no deben haberse tratado con ácido acético o yodo. Pueden emplearse tejidos embebidos en parafina siempre y cuando los tejidos hayan sido fijados con sustancias fijadoras que no degraden ni reaccionen con el ADN. El ADN de este tipo de muestras se deberá extraer utilizando métodos específicos de desparafinización.
- PBMC (células mononucleares de sangre periférica) almacenadas a temperaturas iguales o inferiores a -20°C . Se recomienda el almacenamiento de PBMC a -70°C o en nitrógeno líquido para periodos largos de almacenamiento.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El virus de la Hepatitis B (HBV) es uno de los principales agentes causantes de la hepatitis en humanos, siendo un serio problema de salud a nivel mundial. Se estima que existen 350 millones de infectados crónicos, de los cuales del 1 al 2 % fallecen anualmente debido a complicaciones asociadas con la infección, en la mayoría de los casos debido a cirrosis o a carcinoma hepatocelular¹.

Los métodos tradicionales de diagnóstico se basan en la serología, utilizando métodos inmunológicos. El diagnóstico basado en anticuerpos no diferencia, en general, entre infecciones pasadas y presentes. Los métodos basados en detección de antígenos virales son ampliamente utilizados en fases de screening. Sin embargo, los pacientes en estadios tempranos de la infección, o infectados por serotipos mutantes, pueden rendir resultados falsos negativos, debido a la ausencia de antígeno detectable en la muestra analizada².

Las técnicas basadas en ADN permiten la detección temprana de la presencia del virus en el paciente, así como la detección de la mayoría de los serotipos mutantes. Estas técnicas pueden detectar la presencia del virus en el periodo ventana, o en cantidades mínimas de viremia, y por tanto pueden ser utilizadas tanto para diagnóstico temprano como para monitorización de tratamiento.

BIOHBV Kit permite la detección de ADN del HBV en una amplia variedad de muestras clínicas (sangre, suero, plasma, PBMCs, tejidos hepáticos, etc.).

¹ Allen *et al* (1999). J Clin Microbiol, 37 (10): 3338-3347.

² Van Deursen *et al.* (1998). J Clin Pathol, 51: 149-153.

3. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

BIOHBV Kit es un test cualitativo que utilizando técnicas de amplificación de ADN detecta mediante electroforesis en agarosa y tinción con bromuro de etidio la presencia de ácidos nucleicos del HBV. El ADN viral presente en muestras positivas es amplificado específicamente mediante el uso de primers específicos, que hibridan con secuencias homólogas del genoma viral.

El kit consiste en una reacción de amplificación semi-nested, que utiliza tres primers. Una pareja de primers (Pareja 1 – S1/S2) hibrida con secuencias comunes a aislados de HBV conocidos y testados hasta la fecha. Un tercer primer (S3) hibrida con el producto de amplificación obtenido a partir de los primers S1/S2, permitiendo un aumento en la sensibilidad y especificidad de la reacción de amplificación.

La primera pareja de primers no rinde un producto detectable, salvo en muestras con una alta viremia. El producto final de amplificación debe rendir un tamaño de 186 bp. Para análisis de las bandas, se realiza una electroforesis en agarosa, seguida de tinción con bromuro de etidio.

El proceso de detección utilizando el BIOHBV Kit consta de tres pasos principales: preparación de la muestra y amplificación del ADN viral y detección mediante electroforesis de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

A) Preparación de la Muestra

La prueba BIOHBV Kit se usa con ADN purificado a partir de muestras clínicas. Para la purificación del ADN viral **Biotoools recomienda el uso de Speedtools DNA Extraction Kit** (Ref. 21.130/1/2) o **Speedtools Tissue DNA Extraction Kit** (Ref. 21.135/6/7). Cualquier método de purificación de ADN que garantice una concentración de 50-100 ng/µl con ratios de $A_{260/280} = 1.8 - 2.0$ y total ausencia de inhibidores de la reacción de amplificación puede ser empleado.

Compruebe la calidad e idoneidad del ADN purificado para reacciones de amplificación, por ejemplo, realizando amplificaciones control en paralelo. Para más información, puede contactar con nuestro Dpto. Técnico (info@biotoools.eu).

B) Amplificación

Selección de secuencias objetivo

La selección de secuencias objetivo de HBV se ha basado en el estudio de regiones altamente conservadas en el genoma viral (región pre-S). Las regiones seleccionadas tienen un alto grado de conservación entre las variantes de HBV ensayadas.

Amplificación

La reacción de amplificación de ADN se realiza con una polimerasa recombinante termoestable procedente de *Thermus spp.* En presencia de magnesio, y con las condiciones salinas y de fuerza iónica adecuadas, esta enzima exhibe actividad de polimerización de ADN a partir de un *primer*, usando como molde una molécula de ADN.

Una vez preparada la mezcla de reacción con los reactivos provistos por el Kit se añade el ADN purificado procedente de la muestra a analizar al vial de amplificación. La mezcla de reacción con el ADN molde se incuba a diferentes temperaturas, para permitir la hibridación de los *primers* al ADN de la muestra. Una vez tiene lugar la hibridación de los *primers*, y en presencia de deoxinucleótidos trifosfato, la polimerasa extiende el *primer* formando una cadena complementaria al ADN objetivo. La repetición cíclica de este proceso da lugar a una amplificación exponencial de las secuencias específicas del ADN inicialmente presente en la muestra limitadas por cada pareja de primers.

C) Detección

La detección de los productos amplificados se realiza mediante electroforesis en agarosa y posterior tinción con bromuro de etidio.

AVISO IMPORTANTE

El bromuro de etidio es un agente intercalante altamente mutagénico. Recomendamos el uso de guantes y las máximas precauciones a la hora de manejarlo.

La presencia de HBV está indicada por una banda de aproximadamente 186 bp. Para muestras con una alta viremia, puede aparecer una banda adicional de 275 bp. Esta banda no interfiere con el resultado final.

4. REACTIVOS

El kit contiene los reactivos de amplificación en formato líquido en la cantidad necesaria para poder realizar 96 reacciones de amplificación (Ref. 90.053). Los reactivos se encuentran en formato líquido y deben **almacenarse a -15±8°C**. Descongele y manipule los reactivos en hielo. Evite congelar y descongelar los reactivos repetidamente. Para uso frecuente distribuya el contenido de los viales en alícuotas.

- **HBV Mixture:** Dos viales: 2 x 1980 µl
Solución Tris-HCl, contiene: <10 % glicerol, KCl, <0,001 % dATP, dCTP, dGTP, Dtt y primers. HBV Mixture incluye todos los reactivos de amplificación para la detección de HBVs, excepto el MgCl₂ y la ADN polimerasa, en las proporciones adecuadas.
- **50 mM MgCl₂ Solution:** Vial: 1.8 ml
Mezclar bien antes de su uso.
- **Biotools DNA Polymerase (1 U/µl):** Vial: 105 µl
Añadir a las mezclas de reacción justo antes de introducir las en el termociclador.
- **Positive Control:** Vial: 300 µl
Control positivo no infectivo de HBV. Producto de amplificación de ADN, contiene una secuencia genérica de HBV, flanqueada por los primers. A analizar en una reacción de amplificación independiente de las muestras. También puede utilizarse como control interno intra-tubo.

5. PROTOCOLO DE USO

AVISO IMPORTANTE

Descongele y mantenga en hielo los reactivos durante su manipulación. Para la obtención de óptimos resultados, es esencial mantener refrigerados los viales de reacción hasta su introducción en el termociclador.

Trabaje en el Área de Pre-amplificación en una cabina de flujo laminar

1.- El volumen final de la reacción es de 50 µl. Prepare en un vial de 1.5 ml la **Mezcla de Reacción** siguiendo las instrucciones de la Tabla 1, según el número de muestras que vaya a analizar (mezcla de reacción = HBV Mixture + MgCl₂ + Biotools DNA Polymerase). Por cada ronda de análisis incluya al menos un control positivo y un control negativo (lo que habrá de ser tenido en cuenta a la hora de calcular el volumen total necesario para llevar a cabo todas las reacciones). Se recomienda preparar una reacción más de las necesarias para asegurarse suficiente volumen para todas las reacciones.

Tabla 1. Mezcla de Reacción

REACTIVO	Para 1 Reacción
HBV Mixture	37.5 µl
50 mM MgCl ₂ Solution	1.5 µl
Biotools DNA Polymerase (1U/µl)	1 µl

2.- Alicuotear 40 µl de mezcla de reacción en cada tubo de amplificación.

Saque los tubos de la campana de flujo laminar. Añada el ADN procedente de las muestras y/o de los controles positivos a las mezclas de reacción en la zona de purificación de ADN del Área de Pre-amplificación para evitar contaminaciones (nunca introduzca ADN en la campana de flujo laminar de la zona de preparación de reactivos). La reacción de amplificación debe iniciarse en un tiempo máximo de 10 minutos desde que se añade ADN a la mezcla de reacción.

3.- Añada **50-100 ng de ADN** procedente de las muestras purificadas a cada tubo de amplificación. **Completar hasta 50 µl de volumen final con agua bidestilada estéril.**

AVISO IMPORTANTE

Como la concentración de ADN en diferentes muestras clínicas varía en función de su naturaleza y nivel de infección, la cantidad de ADN molde a añadir a la reacción se expresa en ng, en lugar de indicar un volumen de muestra. Calcule la cantidad y pureza del ADN molde ej. midiendo los valores de A_{260/280}.

4.- Los **Controles Positivos** se preparan añadiendo **5 µl del vial Positive Control** del Kit + 5 µl de agua bidestilada estéril a un vial de amplificación con 40 µl de la mezcla de reacción. Para los **Controles Negativos** añada **10 µl de agua bidestilada estéril** a un vial de amplificación con 40 µl de la mezcla de reacción.

Proceda a trabajar en el Área de Amplificación

5.- Cerrar los tubos de amplificación y colocarlos en el termociclador. Almacenar el remanente de todos los reactivos a $-15\pm 8^{\circ}\text{C}$.

6. Lleve a cabo la amplificación según el siguiente programa:

Programa de Amplificación	
DESNATURALIZACIÓN INICIAL	94°C / 5 min
AMPLIFICACIÓN CÍCLICA	94°C / 30 sec
	55°C / 30 sec
	72°C / 30 sec
NÚMERO DE CICLOS	50
ELONGACIÓN FINAL	72°C / 7 min
	4 °C / ∞

AVISO IMPORTANTE

Este protocolo ha sido adaptado para equipos de amplificación Eppendorf, MJ Research y Applied Biosystems GeneAmp™. Para otros termocicladores, puede ser necesario optimizar los parámetros de la reacción. Para cualquier duda en este aspecto, consulte con nuestro Dpto. Técnico (info@biotools.eu).

6. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

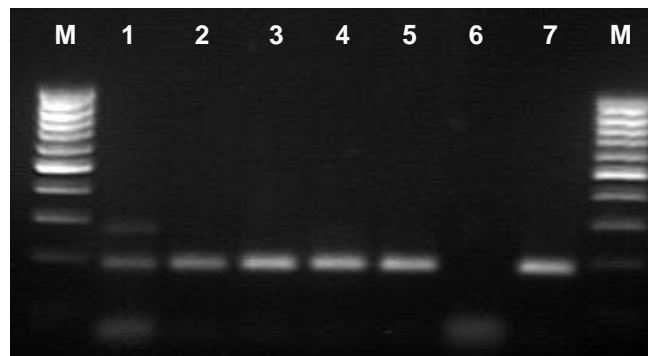
El análisis de los productos de amplificación se lleva a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa de baja EEO (por ejemplo, MB Agarosa, Ref. 20.011). La visualización de las bandas de amplificación es mejor con geles al 1,5 – 2 % utilizando como buffer TAE 1X o TBE 0.5X. Se recomienda añadir el bromuro de etidio dentro de la agarosa para una mejor visualización y resolución.

AVISO IMPORTANTE

El bromuro de etidio es un agente intercalante altamente mutagénico. Recomendamos el uso de guantes y las máximas precauciones a la hora de manejarlo.

Las muestras que contienen ADN de HBV deben rendir una banda de 186 bp. Para muestras con una alta viremia, puede aparecer una banda adicional de aproximadamente 275 bp. Esto no interfiere con los resultados.

Figura 1: Screening de muestras de suero correspondientes a pacientes con hepatitis. Paciente positivo a HBV con una alta viremia (Carril 1); pacientes positivos a HBV (Carriles 2 al 5); control negativo (Carril 6); control positivo a HBV (Carril 7); M: 100 bp Ladder (Ref. 31.006).



7. MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

AVISO IMPORTANTE

Para todos los equipos, el mantenimiento y calibración regular es necesario. Siga las instrucciones del fabricante, y revise los parámetros de funcionamiento de forma regular, especialmente para termocicladores y pipetas. La revisión y calibración continuada de los equipos facilita su funcionamiento correcto, y ayuda a detectar problemas que podrían dar lugar a un resultado incorrecto del análisis.

Área de pre-amplificación (Área de purificación de ADN y Área de preparación de reactivos)

- Instrumentos, reactivos y material fungible requeridos por el método de purificación de ADN que vaya a ser utilizado (ver instrucciones del fabricante)
- Cronómetro
- Pipetas³ (capacidad 10, 20 y 200 µl) con puntas con filtro para aerosol o desplazamiento positivo, sin RNasa⁴
- Guantes de examen desechables, sin polvo
- Agua bidestilada estéril
- Gradillas para tubos de 1,5 ml
- Contenedores para material desechable potencialmente infeccioso
- Papel de filtro para superficie de trabajo desechable, papel de limpieza para derrames accidentales
- Termi-DNA-Tor⁵ o sustancia equivalente para eliminar ADN de superficies de trabajo

Área de amplificación

- Termociclador en tiempo final Eppendorf MasterCycler™ Personal, MJ Research MiniCycler™ o Applied Biosystems GeneAmp™ 2700. El uso de este kit en otros equipos no ha sido testado. Para más información, contacte con nuestro Dpto. Técnico (info@biotools.eu)
- Cabina de flujo laminar
- Gradillas para tubos de 0,2 ml
- Tubos de reacción (0,2 ml, pared fina)
- Agua bidestilada estéril
- Pipetas (capacidad 2, 10, 20 y 200 µl) con puntas con filtro para aerosol o desplazamiento positivo, sin RNasa
- Guantes de examen desechables, sin polvo
- Contenedores para material desechable potencialmente infeccioso
- Papel de filtro para superficie de trabajo desechable, papel de limpieza para derrames accidentales
- Termi-DNA-Tor (Ref. 22.001, 22.002) o equivalente

Área de post-amplificación

- Cubetas y fuentes de electroforesis
- Sistema de fotografía o fotodocumentación
- Transiluminador con luz UV
- Bromuro de etidio
- Agarosa de baja EEO (Ref. 20.011) o equivalente
- TAE o TBE
- Marcador de ADN de 150 a 700 bp mínimo (Ref. 31.006) o equivalente
- Buffer de carga de electroforesis
- Pipetas (capacidad 10 y 20 µl) con puntas con o sin filtro
- Guantes de examen desechables
- Mascarilla / gafas protectoras UV
- Microondas

8. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES DE USO

A continuación, se citan una serie de advertencias y precauciones de uso. Para una información más completa, recomendamos leer la Hoja de Seguridad (MSDS), disponible en nuestra página Web (www.biotools.eu/msds.htm), o mediante petición a nuestro Dpto. Técnico (info@biotools.eu).

- A. Producto para uso exclusivo en investigación. Este producto no puede ser utilizado para diagnóstico, terapia u otros usos no específicamente contemplados.

³ La precisión de las pipetas debe estar dentro del 3 % del volumen indicado. Si es necesario, calibrar y revisar de forma regular, según las instrucciones del fabricante. Se recomienda el uso de puntas con filtro sin RNasa para aerosol y desplazamiento positivo, con el fin de evitar contaminaciones cruzadas de muestras y amplicones.

⁴ Se recomienda el uso de juegos de pipetas diferentes para cada paso de la reacción (pre-amplificación, amplificación, post-amplificación), con el fin de evitar contaminaciones que podrían dar lugar a falsos positivos.

⁵ Disponible en el catálogo de BIOTOOLS (Ref. 40.201).

- B. Esta prueba debe usarse con muestras clínicas recogidas y conservadas según indica el apartado correspondiente. La eficacia del método en otro tipo de muestras no ha sido testada.
- C. El kit detecta ADN de HBV, y ha sido testado con muestras de diferentes orígenes geográficos (Europa, Medio Oriente, África, Asia). Las muestras de otras áreas geográficas no han sido testadas en los laboratorios de la empresa. Algunos aislados de HBV pueden presentar mutaciones en los sitios de hibridación de los primers, y por tanto, afectar la calidad del resultado. Esto aplica tanto para muestras de origen geográfico no ensayado en nuestro laboratorio, así como a muestras del mismo origen geográfico que los testados, pero con mutaciones en el sitio de hibridación de los primers. El kit únicamente detecta presencia / ausencia de ADN de HBV, y no está destinado a diagnóstico ni a cuantificación de carga viral.
- D. Maneje todas las muestras y materiales desechados como infecciosos o potencialmente infecciosos.
- E. Utilice guantes de examen desechables libres de polvo mientras maneje reactivos o muestras, así como bata de laboratorio. Lave sus manos concienzudamente después de haber llevado a cabo el test.
- F. Abrir y cerrar los tubos de los reactivos con cuidado. Respetar las condiciones de temperatura y exposición a la luz indicadas en el apartado correspondiente. Tras el uso, cerrar bien los materiales contenidos en el kit, cuando proceda, y almacenarlos a las temperaturas indicadas.
- G. Todos los materiales utilizados en este ensayo, incluyendo reactivos y muestras, han de ser desechados de forma que se inactiven los posibles agentes infecciosos
 1. **Sólidos:** autoclave
 2. **Líquidos:** añadir hipoclorito sódico⁶ a una concentración final de 1 %, e incube 30 minutos a temperatura ambiente antes de desechar el material
- H. Derrames: lavar los posibles derrames accidentales con una solución de hipoclorito sódico al 5 %. Cubrir la superficie con material absorbente, saturado con una solución de hipoclorito sódico al 5 %. Dejar durante al menos 10 minutos. Para evitar exposición a humos, se puede utilizar una cubierta de plástico o cristal. Todos los materiales utilizados para limpiar derrames deben tratarse como material infeccioso o potencialmente infeccioso.
- I. No utilizar el producto más allá de la fecha preferente de uso.
- J. Los componentes del kit han sido testados como una unidad. **No intercambie componentes** de otros kits, o componentes de diferentes lotes.
- K. Los ácidos nucleicos son muy sensibles a degradación por nucleasas. Las nucleasas están presentes en la piel humana o superficies que han estado en contacto con humanos. Lave con Termi-DNA-Tor y cubra las superficies de trabajo con papel adecuado. A lo largo de todo el proceso utilice guantes de examen libres de polvo y desechables.
- L. Debe extremarse el cuidado a la hora de alicuotar los diferentes volúmenes en cada paso de la reacción. Mezcle bien tras la adición de cada reactivo, salvo que se indique expresamente lo contrario. Lea las instrucciones de uso de las pipetas para un uso adecuado.
- M. No pipetear con la boca.
- N. El material de acondicionamiento del kit es resistente en las condiciones de almacenamiento indicadas. El almacenamiento en condiciones diferentes a las indicadas puede conllevar la rotura del material de acondicionamiento, y la posible contaminación del kit.
- O. El material de plástico incluido en el kit es resistente en las condiciones normales de uso. El uso del material plástico en condiciones extremas puede conllevar su rotura, y por tanto, la inutilización del kit.
- P. Los reactivos del kit, una vez utilizados, han de ser descartados. No se pueden reutilizar reactivos ya utilizados para el análisis de muestras clínicas, ya que ello podría conllevar resultados falsos positivos o falsos negativos.
- Q. Las tareas de laboratorio deben realizarse de forma unidireccional, desde la zona de pre-amplificación hacia la zona de amplificación. Deben utilizarse equipos específicos para cada zona de trabajo, con el fin de evitar posibles contaminaciones cruzadas. Los equipos utilizados para amplificación deben permanecer en esta zona en todo momento.

9. INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

1. Tras la recepción, almacene los diferentes reactivos del kit a las temperaturas indicadas (a $-15\pm 8^{\circ}\text{C}$). Utilice congeladores no *frost-free*. Para uso frecuente de los reactivos (superior a 1 vez por semana), alicuotee el contenido del vial en diferentes tubos, con el fin de evitar ciclos de congelación / descongelación repetidos.

2. No utilice el kit después de su fecha preferente de uso. El kit cerrado es estable hasta la fecha indicada, si se siguen correctamente las instrucciones de almacenamiento. No mezcle reactivos de otros kits y/o de otros lotes. Si quedan cantidades residuales de reactivo, deben desecharse.

⁶ La lejía doméstica líquida comercial contiene, normalmente, hipoclorito sódico a una concentración aproximada del 5%. Puede utilizarse lejía doméstica, realizando los cálculos pertinentes para lograr la concentración indicada.

10. RECOLECCIÓN, TRANSPORTE, ALMACENAMIENTO Y COLECCIÓN DE MUESTRAS

Los tipos de muestras clínicas recomendados para su uso con el BIOHBV Kit se indican al principio de este Manual de Uso. Las muestras tomadas con otros métodos o transportadas con otras especificaciones no han sido testadas para su uso con este kit.

Muestras almacenadas en EDTA

Las muestras deben ser almacenadas a 2-8 °C y enviadas a esta temperatura al laboratorio de análisis. Para almacenamientos prolongados, recomendamos congelación. Una vez en el laboratorio, pueden ser almacenadas a 2-8 °C si el análisis se va a llevar a cabo en una semana. Si el análisis se va a realizar más tarde, almacenar las muestras a -15±8°C o -70 °C. Las muestras deben mantenerse alejadas de fuentes de calor y aisladas de la humedad ambiental. El crecimiento bacteriano debe ser evitado, y la integridad del ADN mantenida.

Muestras almacenadas en heparina

Las muestras pueden ser almacenadas a 2-8 °C hasta 3 días, y enviadas con refrigeración al laboratorio de análisis. Para almacenamientos prolongados, recomendamos congelación. Una vez en el laboratorio, almacenar las muestras a -15±8°C o -70 °C. Las muestras deben mantenerse alejadas de fuentes de calor y aisladas de la humedad ambiental. El crecimiento bacteriano debe ser evitado, y la integridad del ADN mantenida.

Biopsias de hígado

Deben utilizarse biopsias frescas de hasta 5 mm. La biopsia ha de colocarse inmediatamente en un medio conservante y almacenada a -15±8°C. Las biopsias pueden ser transportadas mediante transporte urgente (24 horas máximo) a una temperatura máxima de 25 °C, y almacenadas a -15±8°C en el laboratorio de análisis hasta la realización del test. No deben usarse biopsias de diámetro menor a 2 mm.

El uso de biopsias en parafina es posible, siempre que el sistema de fijación empleado no degrade ni reaccione con el ADN, y la extracción de ADN se realice con métodos específicos para este tipo de muestras. A efectos informativos, se incluye un protocolo en nuestra página web (www.biotoools.eu/esp/productos/pdf/parafinados.pdf).

PBMCs

Estas muestras deben ser almacenadas y transportadas a -15±8°C. Para almacenamientos prolongados (más de una semana), se recomienda almacenamiento a -70 °C o nitrógeno líquido.

Para evitar accidentes o aperturas accidentales del contenedor de muestras, se recomienda sellar el tapón con Parafilm® o equivalente antes de congelar.

El transporte de muestras ha de cumplir las legislaciones y normativas locales, regionales, nacionales e internacionales para el transporte de agentes etiológicos.

11. CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda que se lleve a cabo un (1) Control Positivo y un (1) Control Negativo cada vez que se realice un análisis. Al igual que con otras técnicas de laboratorio nuevas, los usuarios noveles deberían considerar llevar a cabo controles adicionales (tanto positivos como negativos) hasta lograr un grado de confiabilidad alto.

El Control Positivo debe rendir una banda de 186 bp. Los viales que contienen el control negativo (agua bidestilada estéril) no deben rendir banda alguna. Cualquier análisis que no cumpla estos criterios debe ser totalmente invalidado y descartado. Es necesario repetir el proceso desde el principio, incluyendo la purificación del ADN, y procesar otra alícuota de la muestra original. Un fallo de los equipos durante el test, indicado por mensajes de error, también significa que el test no ha sido válido. Repetir todo el proceso para cada muestra a partir del paso de amplificación.

En el caso de que el laboratorio requiera un control externo, éste debe contener un número definido de copias de la secuencia objetivo para HBV, y los niveles de viremia de este control deben ser un múltiplo del valor límite del sistema de prueba (por ej. estándares OMS para ADN de HBV).

12. PRECAUCIONES

1. Las tareas de laboratorio han de llevarse a cabo de modo unidireccional, desde la zona de pre-amplificación a la zona de post-amplificación. Las actividades de pre-amplificación deben iniciarse con la preparación del reactivo y proceder a la preparación de la muestra. Los materiales y equipos deben estar dedicados a cada actividad de pre-amplificación y no usarse para otras actividades ni transferirse de un área a otra. En cada área deben usarse guantes que deben cambiarse antes de dejar el área. El equipo y los materiales usados para la preparación de reactivos no deben usarse para actividades de preparación de la muestra ni para pipetear o procesar ADN amplificado u otras fuentes de ADN objetivo.
2. Como es el caso con cualquier procedimiento analítico, es indispensable utilizar una buena técnica de laboratorio para obtener un rendimiento apropiado de esta prueba. Debido a la gran sensibilidad analítica de esta prueba, se debe proceder con extrema cautela a fin de conservar la pureza de todos los reactivos del kit o de las mezclas de amplificación. Todos los reactivos deben ser vigilados estrechamente para verificar su pureza. Deseche todos los reactivos sospechosos.

13. LIMITACIONES

1. Producto para uso exclusivo en investigación.
2. Deben seguirse las instrucciones fielmente con el fin de obtener resultados correctos. En caso de duda, consulte con nuestro Dpto. Técnico (info@biotools.eu).
3. Esta prueba ha sido validada únicamente para usar con los reactivos incluidos en el kit. El uso de otros métodos de amplificación, o el uso de aparatos e instrumentos que no cumplan las especificaciones indicadas puede dar resultados incorrectos. El usuario es responsable de validar las modificaciones que se hagan a la prueba propuesta, en cualquiera de los parámetros indicados.
4. Esta prueba ha sido validada con muestras recogidas y transportadas según las indicaciones del apartado "Recogida de muestras". Cualquier modificación no ha sido validada, y por tanto, los resultados obtenidos pueden no ser correctos.
5. La detección del ADN de HBV depende del número de partículas virales presentes en la muestra, y puede ser afectada por los métodos de toma de la muestra, factores relacionados con el paciente (por ejemplo, edad, síntomas), o por la etapa de la infección y tamaño de la muestra.
6. Pueden obtenerse resultados negativos falsos debido a inhibición de la polimerasa. Se recomienda llevar a cabo controles que discriminen entre inhibición y un resultado negativo.
7. La contaminación cruzada entre muestras y con ADN exógeno sólo puede ser evitada mediante las buenas prácticas de laboratorio. Deben seguirse las indicaciones de este folleto de forma fiel.
8. El uso de este producto está limitado únicamente a personal profesional cualificado en el manejo de técnicas de purificación de ADN y amplificación de ADN.
9. Es importante pipetear las cantidades exactas indicadas en las instrucciones de uso, y mezclar bien tras cada adición de reactivo cuando así lo indiquen las instrucciones. Compruebe de forma regular el funcionamiento de sus pipetas.

14. GARANTÍA

Los productos están garantizados para estar conformes con la cantidad y contenido indicado en el vial y etiquetas exteriores durante su periodo de vida media. La obligación de BIOTOOLS y los derechos del comprador bajo esta garantía están limitados bien al reemplazo por parte de BIOTOOLS de cualquier producto que sea deficiente en fabricación, y que deberá ser retornado a BIOTOOLS, portes pagados, o a opción de BIOTOOLS, devolución del precio de adquisición.

Las reclamaciones por mercancía dañada durante el transporte han de ser dirigidas al transportista.

Producto para uso exclusivo en investigación. Este producto debe ser utilizado únicamente por profesionales cualificados. Es la responsabilidad del usuario asegurarse que un producto determinado es adecuado para una aplicación determinada. Cualquier producto que no cumpla con las especificaciones indicadas en la hoja informativa de producto será reemplazado. Esta garantía limita nuestra responsabilidad al reemplazo del producto. Ninguna otra garantía, de ningún tipo, expresa o implícita, incluyendo, sin limitación, garantías implícitas de capacidad de comercialización o adecuación para un propósito determinado, son dadas por BIOTOOLS. BIOTOOLS no tendrá responsabilidad sobre ningún daño directo, indirecto, consecuencia o incidental resultante del uso, mal uso, los resultados del uso o la incapacidad de uso de ningún producto.

Fabricado por:

BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. han sido evaluados y certificados en cuanto al cumplimiento de los requisitos de ISO 9001:2008 para las siguientes actividades: investigación y desarrollo de productos de biotecnología, fabricación de productos de biotecnología y fabricación de productos para diagnóstico in vitro (IVDs). Valle de Tobalina – 52 – Nave 39, 28021 Madrid – España.

BIOTOOLS® es marca registrada de BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A.

SPEEDTOOLS DNA/ISSUE DNA EXTRACTION KIT™ es marca comercial de BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A.

BIOHBV™ es marca comercial de BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A.

Termi-DNA-Tor™ es marca comercial de BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A.

Parafilm® es marca registrada de Pechiney Plastic Packaging, Inc.

MasterCycler™ es marca comercial de Eppendorf GmbH

MiniCycler™ es marca comercial de MJ Research Inc.

GeneAmp™ es marca comercial de Applied Biosystems Inc.



© 2007 BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. Todos los derechos reservados.