

# **BIOTOOLS**

BIOTOOLS B&M LABS.S.A.

*Fabricado por:*

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

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

## **BIOTUB Kit**

***Kit para la detección de ADN de Mycobacterium tuberculosis en muestras clínicas***

### **Manual de Uso**

**Ref. 90.073**

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

# BIOTUB 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.

**POR FAVOR, COMPRUEBE LA INTEGRIDAD DEL KIT Y SUS COMPONENTES ANTES DE USARLO. EL USO DE KITS DETERIORADOS PUEDE CONLLEVAR LA FALTA DE RESULTADOS Y/O RESULTADOS INCORRECTOS.**

## USO PREVISTO

BIOTUB Kit es un método para la determinación cualitativa de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas. La detección se lleva a cabo en dos pasos. El primer paso consiste en una amplificación que detecta secuencias específicas de *Mycobacterium tuberculosis*. El segundo paso es optativo y consiste en una amplificación "nested" o anidada, que puede ser llevada a cabo según la voluntad del usuario, con el fin de lograr mayor sensibilidad y especificidad del test.

Este kit se utiliza con los siguientes tipos de muestra:

- Muestras con EDTA. Las muestras con heparina o ácido cítrico no han sido testadas, su uso puede causar una disminución en la eficiencia de la reacción.
- Biopsias de pulmón. Para el uso del Kit los tejidos no deben haber sido tratados con 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.
- Espustos. El rendimiento de la reacción dependerá de la cantidad y calidad del ADN presente en el esputo, y por tanto, muestras de esputo de mala calidad pueden dar lugar a resultados equívocos.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

La tuberculosis (TB), en la mayoría de los casos causada por *Mycobacterium tuberculosis*, es una de las principales causas de mortalidad por enfermedades infecciosas a nivel mundial. El número de casos ha aumentado dramáticamente en las últimas décadas, con alrededor de 8 nuevos casos y 3 millones de muertes reportados anualmente<sup>1</sup>. Aunque la incidencia de TB ha comenzado a mostrar una disminución en los casos en los últimos años en países desarrollados, la aparición de cepas resistentes ha planteado un serio problema para la gestión sanitaria.

*M. tuberculosis* se expande por vía aérea e infecta el pulmón y otros tejidos. Aunque la mera presencia de *M. tuberculosis* en un individuo no está siempre asociada con el desarrollo de TB, o incluso con la capacidad de contagiar a otros individuos, una indicación temprana de la infección es fundamental para una gestión adecuada del paciente. Se ha observado que la inmunodepresión puede llevar al desarrollo de TB aguda en individuos que habían sido infectados hace meses, o incluso años, sin presentar ningún síntoma.

Las técnicas tradicionales para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* incluyen cultivo bacteriano en medios diferenciales, que puede llevar hasta 4-8 semanas hasta que se observa crecimiento<sup>2</sup>. En contraste a la detección de *Mycobacterium tuberculosis* por métodos de cultivo, las técnicas de amplificación de ADN pueden acortar el tiempo de detección de semanas a menos de un día<sup>3</sup>. Sin embargo, y asociado con el aumento en casos de TB, los fenómenos de resistencia en cepas de *M. tuberculosis* ha demostrado ser un problema importante, ya que lleva a diferencias genéticas que pueden afectar el diagnóstico por métodos moleculares<sup>4</sup>, especialmente en lo que a resistencia a rifampicina se refiere<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> Yuen *et al.* (1999). J Clin Microbiol, 37 (12): 3844-3850.

<sup>2</sup> Fukushima *et al.* (2003). J Clin Microbiol, 41 (6): 2605-2615.

<sup>3</sup> Down *et al.* (1996). J Clin Microbiol, 34 (4): 860-865.

<sup>4</sup> Quan *et al.* (1999). Antimicrob Agents Chemother, 43 (1): 181-184.

<sup>5</sup> Heep *et al.* (2001). J Clin Microbiol, 39 (1): 107-110.

BIOTUB Kit es un test de amplificación para la detección cualitativa del ADN de *Mycobacterium tuberculosis*, y ha sido desarrollado para utilizar con diferentes muestras clínicas.

## PRINCIPIOS DEL ENSAYO

BIOTUB Kit es un test para análisis cualitativo, utilizando técnicas de amplificación de ADN para la detección directa de ADN mediante electroforesis en agarosa y tinción con bromuro de etidio. El ADN bacteriano presente en muestras positivas es amplificado específicamente mediante el uso de primers específicos, que hibridan en secuencias homólogas del genoma bacteriano.

El kit consiste en dos reacciones de amplificación, utilizando dos parejas de primers. La primera reacción utiliza una pareja de primers (Pareja 1 – MT1 y MT2), que hibridan con secuencias conservadas específicas de *Mycobacterium tuberculosis* y no homólogas a otras especies de *Mycobacterium* (región IS6110), y por tanto, indica la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*. El uso de regiones conservadas se indica para evitar variabilidades genéticas asociadas con resistencia a antibióticos. El fragmento amplificado está ampliamente conservado entre los diferentes aislados de *M. tuberculosis* conocidos hasta la fecha. La Pareja 1 de primers tiene una alta Tm, lo que permite que los pasos de anillamiento y elongación se realicen simultáneamente a 72 °C, aumentando la especificidad de la reacción. La utilización de primers de alta Tm también permite la realización de rondas de amplificación con un alto número de ciclos (55-70 ciclos).

La segunda reacción es una amplificación anidada o “nested”, que usa como molde el producto de la primera amplificación. Mediante el uso de una segunda pareja de primers (Pareja 2 – MT3 y MT4), la sensibilidad de la detección aumenta en varios órdenes.

La primera amplificación rinde una banda de aproximadamente 219 bp, mientras que la segunda rinde un producto de 123 bp. Para análisis de las bandas, debe llevarse a cabo una electroforesis en agarosa, seguida por tinción con bromuro de etidio.

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

## Preparación de la muestra

La prueba BIOTUB Kit se usa con ADN purificado a partir de muestras clínicas.

### AVISO IMPORTANTE

**Para la purificación del ADN bacteriano, se recomienda el uso de SPEEDTOOLS DNA EXTRACTION KIT (Ref. 21.130,21.131, 21.132) o SPEEDTOOLS TISSUE DNA EXTRACTION KIT (Ref. 21.135, 21.136, 21.137). La utilización de otros métodos es posible. Sin embargo, el usuario ha de confirmar que el ADN purificado mediante otros métodos es utilizable con el BIOTUB Kit (concentración 50-100 ng / µl, A<sub>260/280</sub>=1.8 – 2.0, ausencia de inhibidores que puedan afectar al resultado de la reacción de amplificación, etc.). Se recomienda comprobar 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@biotools.eu).**

## Amplificación y detección

### Selección de secuencias objetivo

La selección de secuencias objetivo de *Mycobacterium tuberculosis* se ha basado en el estudio de regiones altamente conservadas en el genoma de *M. tuberculosis* (primers MT1 y MT2). La región seleccionada dentro del genoma bacteriano (IS6110) tiene un alto grado de conservación entre los aislados de *Mycobacterium tuberculosis* estudiados hasta la fecha. La pareja 1 (MT1 y MT2) define un segmento de aproximadamente 219 bp, mientras que la pareja 2 (MT3 y MT4) define una secuencia de aproximadamente 123 bp en *Mycobacterium tuberculosis*.

### Amplificación

La reacción de amplificación de ADN se realiza con la enzima recombinante termoestable polimerasa de ADN de *Thermus*. 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.

El ADN purificado de la muestra a analizar es añadido a la mezcla de reacción en el tubo de amplificación correspondiente, donde tiene lugar la amplificación. El tubo de amplificación contiene todos los reactivos necesarios para llevar a cabo esta reacción, y por tanto sólo es necesario añadir el ADN purificado, así como agua bidestilada estéril para llevar a cabo la reacción. La mezcla de reacción, que ya contiene el ADN, es incubada a diferentes temperaturas, para permitir la hibridación de las Pares de *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.

#### 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 *Mycobacterium tuberculosis* está indicada por una banda de aproximadamente 219 bp. Si se realiza la segunda amplificación para aumentar la sensibilidad del test, aparecerá una banda de 123 bp.

### **REACTIVOS**

El kit contiene los reactivos de amplificación en formato líquido en la cantidad necesaria para poder realizar 96 reacciones de amplificación (Ref. 90.073). 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.

- **Amplification Mixture:** Tres viales: 3 x 1470 µl  
Solución Tris-HCl, contiene: <10 % glicerol, KCl, <0,001 % dATP, dCTP, dGTP, dTTP y primers. Amplification mixture incluye todos los reactivos de amplificación para la detección del ADN de *Mycobacterium tuberculosis*, excepto MgCl<sub>2</sub> y ADN polimerasa, en las proporciones adecuadas. Almacenar a -15±8°C. Descongelar y manipular en hielo. No congelar/descongelar repetidamente. Para uso frecuente, recomendamos distribuir el contenido del vial en alícuotas.
- **Nested Mixture:** Tres viales: 3 x 1470 µl  
Solución Tris-HCl, contiene: <10 % glicerol, KCl, <0,001 % dATP, dCTP, dGTP, dTTP y primers. Nested mixture incluye todos los reactivos de amplificación para la detección del ADN de *Mycobacterium tuberculosis*, excepto MgCl<sub>2</sub> y ADN polimerasa, en las proporciones adecuadas. Almacenar a -15±8°C. Descongelar y manipular en hielo. No congelar/descongelar repetidamente. Para uso frecuente, recomendamos distribuir el contenido del vial en alícuotas.
- **50 mM MgCl<sub>2</sub> Solution:** Vial: 1.8 ml  
Almacenar a -15±8°C. Descongelar en hielo. Mezclar bien antes de su uso.
- **Biotoools DNA Polymerase (1 U/µl):** Vial: 210 µl  
Almacenar a -15±8°C. Añadir a las mezclas de reacción justo antes de introducirlas en el termociclador.
- **Positive Control:** Vial: 300 µl  
Control positivo no infeccioso de *Mycobacterium tuberculosis*. Producto de amplificación de ADN que contiene una secuencia genérica de *Mycobacterium tuberculosis*, flanqueada por los primers de amplificación (10<sup>5</sup> copias/µl). El control positivo puede ser utilizado como control intra-tubo. Almacenar a -15±8°C. Descongelar y manipular en hielo. Evitar ciclos repetidos de congelación /descongelación. Para uso frecuente, distribuya el contenido del vial en alícuotas.

**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

- Instrumentos, reactivos y material fungible requeridos por el método de purificación de ADN que vaya a ser utilizado (ver instrucciones del fabricante)
- Cronómetro
- Pipetas<sup>6</sup> (capacidad 10, 20 y 200 µl) con puntas con filtro para aerosol o desplazamiento positivo, sin RNasa<sup>7</sup>
- Guantes de examen desechables, sin polvo
- Agua calidad bidestilada estéril
- Tubos de polipropileno con cierre de rosca, capacidad para 1,5 ml, no siliconizados, cónicos, estériles, libres de RNasa. Se recomienda el uso de tubos con cierre de rosca, para evitar la contaminación potencial de muestras y controles
- 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-Tor<sup>8</sup> 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 calidad 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

**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](http://www.biotools.eu/msds.htm)), o mediante petición a nuestro Dpto. Técnico (info@biotools.eu).

<sup>6</sup> 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.

<sup>7</sup> 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.

<sup>8</sup> Disponible en el catálogo de BIOTOOLS (Ref. 40.201).

- A. Producto para uso exclusivo en investigación. Este producto no puede ser utilizado para diagnóstico, terapia u otros usos no específicamente contemplados.
- 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 *Mycobacterium tuberculosis*, y no detecta otras especies de *Mycobacterium* (especialmente, se ha testado que no haya reacciones cruzadas con *Mycobacterium avium*). Aunque el kit está basado en el uso de regiones altamente conservadas (*IS6110*), donde no se han descrito, en nuestro conocimiento, mutaciones asociadas a resistencia, pueden aparecer nuevos mutantes en esta región, y por tanto, la eficacia del kit se vería afectada.
- 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 sódico<sup>9</sup> 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 alicuotear 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 reusar 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.

## 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.

<sup>9</sup> 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.



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.

## RECOLECCIÓN, TRANSPORTE, ALMACENAMIENTO Y COLECCIÓN DE MUESTRAS

Los tipos de muestras de sangre recomendados para su uso con el BIOTUB 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 pueden ser almacenadas hasta 3 días a temperatura ambiente (máximo 25 °C), y enviadas sin refrigeración al laboratorio de análisis. Para almacenamientos prolongados, recomendamos temperaturas de 2-8° C, o 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. 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.

### Espustos

Las muestras deben ser almacenadas a 2-8° C, o congelación, y enviadas al laboratorio por mensajero (máximo 24 horas). 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. 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 pulmón

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 de pulmón 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](http://www.biotoools.eu/esp/productos/pdf/parafinados.pdf)).

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.

## PROTOCOLO DE USO

### AMPLIFICACIÓN DE ADN

#### AVISO IMPORTANTE

*Descongele todos los reactivos en hielo. Mantener en hielo mientras dure su manipulación.*

*La amplificación debe iniciarse dentro de los 10 minutos posteriores de añadir las muestras y controles a la mezcla de amplificación.*

*Compruebe el funcionamiento del termociclador de forma regular. La no calibración o calibración deficiente del instrumento puede conllevar la aparición de resultados inexactos.*

1.- El volumen final de la reacción es de 50 µl. Determine el volumen adecuado de **Amplification Mixture**, **MgCl<sub>2</sub>**, **Biotoools DNA Polymerase** y **Positive Control** necesarios para el análisis de las muestras y los controles. Se recomienda llevar a cabo un (1) Control Positivo y un (1) Control Negativo en cada ronda de análisis (lo que habrá de ser tenido en cuenta a la hora de calcular el volumen total necesario para llevar a cabo todas las reacciones).

2.- Mezclar el volumen necesario de **Amplification Mixture, MgCl<sub>2</sub>** y **Biotools DNA Polymerase** según el número de reacciones a llevar a cabo en un tubo de 1.5 ml. **Llevar a cabo este proceso en la campana de flujo laminar.** Mantenga la mezcla de reacción (mezcla de reacción = Amplification Mixture + MgCl<sub>2</sub> + Biotools DNA Polymerase) en hielo:

Reactivo	Para 3 reacciones	Para 10 reacciones	Para n reacciones
Amplification Mixture	126 µl	420 µl	42 * n µl
50 mM MgCl <sub>2</sub> Solution	6 µl	20 µl	2 * n µl
Biotools DNA Polymerase (1U/µl)	3 µl	10 µl	1 * n µl

3.- Alicuotear 45 µl de mezcla de reacción en cada tubo de reacción de amplificación, **en la campana de flujo laminar.**

4.- Sacar los tubos de la campana de flujo laminar. Añadir 50-100 ng de ADN procedente de las muestras purificadas y/o controles a cada tubo de reacción de amplificación. Completar hasta 50 µl de volumen final con agua bidestilada estéril.

### AVISO IMPORTANTE

*Para el control positivo, utilice 5 µl del vial Positive Control. Para Controles Negativos, utilice 5 µl de agua bidestilada estéril.*

*Las muestras clínicas, dependiendo de su naturaleza y niveles de infección, pueden tener diferentes concentraciones de ADN, y por tanto la cantidad de molde a añadir a la reacción se expresa en ng, en lugar de indicar el volumen de muestra. La cantidad y pureza del molde debe ser calculada, por ej. midiendo los valores de A<sub>260/280</sub>.*

5.- Cerrar los tubos de reacción de amplificación. Colocar los viales en el termociclador. Almacenar el remanente de todos los reactivos a -15±8°C.

Llevar a cabo la reacción de amplificación utilizando el siguiente programa:

94 °C	3 min	} 55-60 ciclos
94 °C	30 seg	
72 °C	30 seg	
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.- Almacenar las reacciones de amplificación a 2-8 °C. Almacenar a temperatura ambiente sólo si la siguiente amplificación / electroforesis se realiza en las siguientes 1-2 horas.

### NESTED AMPLIFICATION

Para aquellas muestras que han resultado negativas tras la primera amplificación, puede llevarse a cabo una segunda ronda de amplificación para aumentar la sensibilidad del test.

1.- El volumen final de la reacción es de 50 µl. Determine el volumen adecuado de **Nested Mixture, MgCl<sub>2</sub>, Biotools DNA Polymerase** y **Positive Control** necesarios para el análisis de las muestras y los controles. Se recomienda llevar a cabo un (1) Control Positivo y un (1) Control Negativo en cada ronda de análisis (lo que habrá de ser tenido en cuenta a la hora de calcular el volumen total necesario para llevar a cabo todas las reacciones).

2.- Mezclar el volumen necesario de **Nested Mixture, MgCl<sub>2</sub>** y **Biotools DNA Polymerase** según el número de reacciones a llevar a cabo en un tubo de 1,5 ml. **Llevar a cabo este proceso en la campana de flujo laminar.** Mantenga la mezcla de reacción (mezcla de reacción = Nested Mixture + MgCl<sub>2</sub> + Biotools DNA Polymerase) en hielo.



Reactivo	Para 3 reacciones	Para 10 reacciones	Para n reacciones
Nested Mixture	126 µl	420 µl	42 * n µl
50 mM MgCl <sub>2</sub> Solution	6 µl	20 µl	2 * n µl
Biotools DNA Polymerase (1U/µl)	3 µl	10 µl	1 * n µl

3.- Alicuotear 45 µl de mezcla de reacción en cada tubo de reacción de amplificación, **en la campana de flujo laminar.**

4.- Sacar los tubos de la campana de flujo laminar. Añadir 5 µl del producto obtenido de la primera amplificación y/o controles a cada tubo de reacción de amplificación.

#### AVISO IMPORTANTE

*Para control positivo puede utilizar 5 µl del producto obtenido tras la amplificación del control positivo o 5 µl del vial Positive Control. Para Controles Negativos utilice 5 µl de agua bidestilada estéril.*

5.- Cerrar los tubos de reacción de amplificación. Colocar los viales en el termociclador. Almacenar el remanente de todos los reactivos a -15±8°C.

Llevar a cabo la reacción de amplificación utilizando el siguiente programa:

94 °C	3 min		
94 °C	30 seg	}	40 ciclos
63 °C	30 seg		
72 °C	30 seg		
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.- Almacenar las reacciones de amplificación a 2-8 °C. Almacenar a temperatura ambiente sólo si la electroforesis se realiza en las siguientes 1-2 horas.

#### 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 *Mycobacterium tuberculosis* deben rendir una banda de 219 bp (o de 123 bp si se ha llevado a cabo la reacción "nested").

## 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.

Los viales de amplificación con el control positivo deben rendir una banda de 219 bp (o de 123 bp para la segunda reacción). 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 *Mycobacterium tuberculosis*, y el nivel de este control debe ser un múltiplo del valor límite del sistema de prueba.

## 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.

## 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](mailto: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 *Mycobacterium tuberculosis* depende del número de bacterias 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.

#### **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.

BIOTUB™ 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.