

VetMAX™ M. tuberculosis Complex Kit

Detección mediante PCR en tiempo real de las micobacterias responsables de la tuberculosis bovina

Número de catálogo MTBC

N.º de documento 100041126 N.º de pub. MAN0016438 Rev. B.0

Tecnología	Especie	Matrices de muestras	Tipo de ensayo
PCR en tiempo real (ADN) <ul style="list-style-type: none"> • Ensayo doble • IPC exógeno 	<ul style="list-style-type: none"> • Bovino • Tejón • Jabalí • Cérvido 	Nódulo linfático y tejido circundante (excepto cáseum, piel y capa adiposa)	Individual

¡ADVERTENCIA! Lea las hojas de datos de seguridad (HDS o SDS) y siga las instrucciones de manipulación. Lleve el equipo de protección individual (EPI) adecuado (gafas, ropa, y guantes). Las hojas de datos de seguridad (HDS o SDS) se encuentran disponibles en thermofisher.com/support.

Descripción del producto

El VetMAX™ M. tuberculosis Complex Kit permite la detección mediante PCR en tiempo real de Mycobacterium tuberculosis Complex, un grupo de micobacterias relacionadas genéticamente que pueden ser causa de tuberculosis en bovinos y otras especies. El ensayo va dirigido a la secuencia de inserción IS6110 que está presente en los genomas de M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. microti, M. canetti, M. caprae y M. pinnipedii.

El kit se ha validado para utilizar con ADN extraído de nódulo linfático o tejido circundante en especies de bovinos, cérvidos, tejones y jabalíes. El informe de validación está disponible previa solicitud a nuestro representante de ventas o especialista técnico. El cliente es responsable de la validación del kit con tejidos no incluidos en el informe.

El kit proporciona los ensayos y reactivos para llevar a cabo la PCR en tiempo real en monopocillo en la que se amplifican y detectan las dianas de M. tuberculosis Complex y de control positivo interno (IPC) mediante química de la sonda de hidrólisis fluorescente. En este documento se utiliza el término TUB para designar la secuencia de la diana IS6110, indicativo de los organismos de M. tuberculosis Complex.

El kit incluye:

- 3 – Mix MTBC: Contiene primers, sondas, tampón y enzimas para la amplificación por PCR en tiempo real dúplex optimizada de dianas TUB e IPC.
- 4a – EPC MTBC: Plantilla de ADN cuantificado (consulte el certificado de análisis) que incluye la secuencia de la diana M. tuberculosis Complex (control positivo externo). Sirve como control positivo de los componentes de la PCR en tiempo real y se utiliza para definir los criterios de validación de la prueba para los resultados de las pruebas.
- 5 – IPC MTBC: Se añade a todas las muestras de las pruebas y a las muestras de control en el paso de la lisis del procedimiento de aislamiento del ADN (IPC exógeno). Sirve como control para el procedimiento de aislamiento del ADN y se utiliza para vigilar la presencia de inhibidores de la PCR.

Componentes y almacenamiento

Componente	Cantidad	Almacenamiento
3 – Mix MTBC	2 × 500 µl	Desde -30 °C hasta -10 °C
4a – EPC MTBC	2 × 90 µl	
5 – IPC MTBC	1 × 550 µl	

Materiales necesarios no suministrados

A menos que se indique lo contrario, todos los materiales están disponibles en thermofisher.com. «MLS» indica que el material está disponible en fisherscientific.com u otro proveedor general de productos de laboratorio. Los números de catálogo que aparecen como vínculos abren las páginas web de esos productos.

Artículo	Origen
Instrumento de PCR en tiempo real, uno de los siguientes:	
Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System <ul style="list-style-type: none"> • Precision Plate Holder for 7500 Real-Time PCR Systems (A24820) • Precision Plate Holder for 0.2 mL Tubes and Strips (4367033) 	Póngase en contacto con su oficina de ventas local.
Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System <ul style="list-style-type: none"> • Precision Plate Holder for 7500 Fast Real-Time PCR Systems (4359652) • 7500 Fast Precision Plate Holder, for 0.1 mL Tube Strips (A29252) 	
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	
Equipo	
Pipetas libre de nucleasas	MLS
Dos cestillos con hielo o racks refrigerados: <ul style="list-style-type: none"> • Uno para la zona de preparación de la PCR en la que se prepara la master mix para la PCR • Otro para la zona donde se preparan las muestras de ADN y los controles 	MLS
Tubos, placas y otros consumibles	
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	4316813
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	4311971
MicroAmp™ Optical 8-Tube Strip, 0.2 mL	4316567
MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips	4323032
Reactivos	
Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated) (agua sin nucleasas [no tratada con DEPC])	AM9939
Tampón TE 1X	MLS

Artículo	Origen
Otros consumibles	
Tubos de reactivos libre de nucleasas para la preparación de mezclas de reacción	MLS
Puntas de pipeta, resistentes a aerosoles	MLS

Directrices de procedimiento

- En cada proceso de PCR en tiempo real, incluya los siguientes controles:
 - Reacciones de control positivo: utilice 4a – EPC MTBC.
 - Reacciones de control de extracción: utilice, como mínimo, 1 muestra de control de purificación que se haya preparado en el mismo procedimiento de aislamiento de ADN como muestras de la prueba.
 - Reacciones de control sin plantilla (NTC): utilice agua libre de nucleasas.
- Siga las “Buenas prácticas de laboratorio para PCR y RT-PCR” en la página 3 para evitar falsos positivos y la contaminación de muestras de prueba con productos de PCR.

Requisitos para el ADN de entrada

Tabla 1 Recomendaciones para aislar el ADN

Paso, proceso o parámetro	Recomendación
Cantidad de material de partida para aislar el ADN	Extirpe 5 g de tejido, como máximo, que presente lesiones características de la tuberculosis.
Método de aislamiento de ADN	Puede solicitar al Soporte Técnico métodos que estén validados para utilizar con el VetMAX™ M. tuberculosis Complex Kit .
Modificación del método de aislamiento de ADN para muestras de la prueba y la muestra de control de purificación	Añada 5 µl de 5 - IPC MTBC a la solución de lisis empleada para aislar el ADN.
Preparación de la muestra de control de purificación para su uso en las PCR de control de la extracción	Prepare, como mínimo, 1 muestra de control de purificación por duplicado, usando agua libre de nucleasas como material de partida. Procese la muestra de control de purificación al mismo tiempo en el mismo procedimiento de aislamiento de ADN que se utiliza para las muestras de prueba.

Antes de empezar

- Descongele los reactivos y las muestras:
 - Descongele 3 – Mix MTBC en un cestillo de hielo o un rack refrigerado.
 - Descongele 4a – EPC MTBC, 5 – IPC MTBC y las muestras de ADN en un cestillo de hielo o rack refrigerado aparte.
- Mezcle completamente el contenido de cada tubo agitando y centrifugue un momento.

Directrices para el análisis de datos

- Siga la guía de usuario del instrumento para realizar los análisis de datos brutos.
- Defina los umbrales para cada diana por separado.
- Consulte el certificado de análisis para conocer el lote de fabricación del kit para validar el proceso e interpretar los resultados.

Conserve los reactivos y muestras congeladas a 2-8 °C hasta su uso.

Preparación de las reacciones de la PCR

- Dispense 10 µL de 3 – Mix MTBC en el número necesario de pocillos o tubos de la placa.
- Añada el componente indicado a cada tipo de reacción.

Tipo de reacción	Componente	Volumen por reacción
Muestra a analizar	ADN de muestra	5,0 µl
Control positivo	4a – EPC MTBC	5,0 µl
Control de extracción	Muestra de control de purificación	5,0 µl
Control sin plantilla (NTC)	Agua libre de nucleasas	5,0 µl

- Selle cada placa o tubo, mezcle y, a continuación, centrifugue brevemente para que el contenido llegue al fondo de los pocillos de la placa o los tubos.

Preparar e iniciar el instrumento de PCR en tiempo real

- Siguiendo las instrucciones del fabricante, configure el proceso de PCR en tiempo real utilizando los siguientes parámetros:
 - Volumen de reacción: 15 µl
 - Referencia pasiva: Colorante ROX™ (incluido en 3 – Mix MTBC)

Nota: El colorante ROX™ debe seleccionarse en el instrumento si consigue detectarlo. Pueden usarse instrumentos de PCR en tiempo real que no detecten el colorante ROX™ sin que esto afecte a la lectura.

 - Programa del termociclador:

Tabla 2 Programa del termociclador: modo estándar o rápido

Etapas	Repeticiones	Temperatura	Tiempo
1	1	50 °C	2 minutos
2	1	95 °C	5 minutos
3	40	95 °C	10 segundos
		60 °C	30 segundos ^[1]

^[1] Si su termociclador no puede programarse en 30 segundos, la etapa 3 a 60 °C (el paso de elongación) puede ampliarse de 1 a 3 segundos.

- Seleccione o cree detectores de colorante y, a continuación, asígnelos a cada pocillo o tubo.

Diana	Indicador	Inhibidor
TUB ^[1]	Colorante FAM™	Inhibidor no fluorescente (NFQ)
IPC ^[1]	Colorante VIC™	

^[1] TUB: Diana M. tuberculosis Complex. IPC: Diana 5 – IPC MTBC.

- Ejecute el programa de termociclador adecuado, recopilando datos de amplificación en tiempo real durante la etapa 3.

Criterio de validación

Consulte los valores C_{tQC} en el certificado de análisis para conocer el lote de fabricación del kit. La validación de la prueba está sujeta a los siguientes criterios:

Tipo de reacción	Diana de TUB (colorante FAM™)	Diana del IPC (colorante VIC™)	Interpretación
Control positivo	$C_t = C_{tQC} \text{ TUB} \pm 3 C_t^{[1]}$	N/A ^[2]	La PCR se valida.
Control de extracción	$C_t > 40$	$C_t = C_{tQC} \text{ IPC} \pm 4 C_t^{[3]}$	Se valida el aislamiento del ADN.
Control sin plantilla	$C_t > 40$	$C_t > 40$	Se validan los reactivos de la PCR.

^[1] Consulte la tabla EPC en el certificado de análisis.

^[2] N/A: no aplicable; el valor IPC C_t de la reacción del control positivo no se usa para la validación.

^[3] Consulte la tabla IPC en el certificado de análisis.

Interpretación de los resultados

Diana de TUB (colorante FAM™)	Diana del IPC (colorante VIC™)	Interpretación
$C_t < 40$	Cualquier valor	Se detecta M. tuberculosis Complex.
$C_t > 40$	$C_t \leq C_t \text{ de control de extracción} + 4 C_t^{[1]}$	No se detecta M. tuberculosis Complex.
$C_t > 40$	$C_t > C_t \text{ de control de extracción} + 4 C_t^{[1]}$	Resultado no válido.

^[1] El control de extracción de C_t debe validarse del modo descrito en "Criterio de validación" en la página 3.

Repetición de los análisis de muestras con resultados no válidos

- Diluya las muestras de ADN no válidas al 1:10 en buffer TE 1X.
- Repita el procedimiento de PCR en tiempo real con 5 μ L de ADN diluido e interprete los resultados como se indica a continuación.

Resultado	Interpretación
El ADN diluido da positivo para M. tuberculosis Complex.	El resultado se valida.
El ADN diluido da negativo para M. tuberculosis Complex y el resultado del IPC es conforme.	
El ADN diluido da negativo para M. tuberculosis Complex pero el resultado del IPC no es conforme.	El resultado no es válido.

- Para las muestras diluidas con resultados no válidos, repita el procedimiento de aislamiento de ADN con una nueva alícuota del lisado original de la muestra.

Buenas prácticas de laboratorio para PCR y RT-PCR

- Ponerse guantes limpios y una bata de laboratorio limpia.
 - No ponerse los mismos guantes ni la misma bata de laboratorio que se haya utilizado al manipular productos amplificados o preparar muestras.
- Cambiarse de guantes si se sospecha que están contaminados.
- Utilizar zonas separadas y equipo y suministros exclusivos para:
 - La preparación de la muestra y la preparación de la reacción.
 - La amplificación y el análisis de los productos.
- No llevar los productos amplificados a la zona de preparación de la reacción.
- Abrir y cerrar todos los tubos de muestras con cuidado. Evitar salpicar o rociar las muestras.
- Mantener las reacciones y los componentes tapados tanto tiempo como sea posible.
- Utilizar una pipeta de desplazamiento de aire positivo o puntas de pipeta con filtro resistentes a los aerosoles.
- Limpiar las mesas de laboratorio y el equipo periódicamente con una solución blanqueadora al 10 % o solución de descontaminación de ADN.

Garantía limitada del producto

Life Technologies Corporation y/o sus filiales garantizan sus productos tal y como se establece en los términos y condiciones de venta de Life Technologies en www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. Si tiene cualquier duda, póngase en contacto con Life Technologies en www.thermofisher.com/support.

La información incluida en esta guía está sujeta a cambios sin previo aviso.

EXENCIÓN DE RESPONSABILIDAD: EN LA MEDIDA DE LO ESTIPULADO POR LA LEY, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. Y/O SUS AFILIADOS NO SE HACEN RESPONSABLES POR DAÑOS ESPECIALES, INCIDENTALES, INDIRECTOS, PUNITIVOS, MÚLTIPLES O CONSIGUIENTES EN RELACIÓN CON O DERIVADOS DE ESTE DOCUMENTO, INCLUYENDO EL USO DEL MISMO.

Traducido del inglés, del número de publicación MAN0015857 Revisión C.0.

Historial de revisiones: N.º de pub. MAN0015857 (inglés)

Revisión	Fecha	Descripción
C.0	4 de enero de 2022	<ul style="list-style-type: none">Se ha añadido la cuantificación de 4a-EPC MTBC a la descripción del producto ("Descripción del producto" en la página 1).Se ha actualizado la cantidad de 3 – Mix MTBC y 5 – IPC MTBC en "Componentes y almacenamiento" en la página 1.Se ha actualizado el volumen de reacción y el programa del termociclador en "Preparar e iniciar el instrumento de PCR en tiempo real" en la página 2.Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System y QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System se han añadido a los materiales necesarios no suministrados (consulte "Materiales necesarios no suministrados" en la página 1).
B.0	28 de abril de 2017	<ul style="list-style-type: none">Se ha aclarado la cantidad de tejido de partida: máximo de 5 g.Se ha cambiado el número necesario de muestras de control de purificación: 1 como mínimo.Se ha aclarado que el valor de diana del IPC C₁ de la reacción del control positivo no se usa para la validación.
A.0	5 de octubre de 2016	Documento nuevo.

Información importante sobre licencias: Este producto puede estar cubierto por una o más licencias de etiquetado de uso limitado. Mediante el uso de este producto, acepta los términos y condiciones de todas las licencias de etiquetado de uso limitado aplicables.

©2022 Thermo Fisher Scientific Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales son propiedad de Thermo Fisher Scientific y sus subsidiarias a menos que se especifique lo contrario.