

Nombre genérico: KIT DE DETECCIÓN DE ENFERMEDADES VENÉREAS HYBRIDOT-STD
Nombre comercial: HYBRIDOT-STD

Clasificación del producto
México “Para uso exclusivo en Laboratorios Clínicos o Gabinetes”

A. FINALIDAD PREVISTA

Hybridot – STD es un sistema basado en la técnica de blot reverso que permite la detección en muestras de ADN procedentes de frotis uretrales, biopsias cervicouterinas y orina, de los siguientes microorganismos:

- Mycoplasma genitalium*
- Neisseria gonorrhoeae*
- Human herpes virus 2*
- Chlamydia trachomatis*
- Treponema pallidum*
- Ureaplasma urealyticum* y *Ureaplasma parvum*

Ensayo para 50 reacciones.

B. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

El sistema se basa en la amplificación y marcado de fragmentos de ADN de entre 200 y 350 pares de bases, específicos de cada uno de los microorganismos. Los fragmentos son marcados durante la amplificación mediante la sustitución parcial de dTTP por dUTP-digoxigenin.

La detección de los fragmentos amplificados se lleva a cabo mediante el uso de membranas de nylon cargadas positivamente que tienen fijados fragmentos de ADN de entre 140 y 260 pares de bases, que permiten su unión específica a los fragmentos de DNA amplificado de cada uno de los microorganismos.

Los fragmentos amplificados y marcados de cada microorganismo se hibridan con el ADN fijado en la membrana. A continuación se incuban con anticuerpos antidigoxin que se unen a los fragmentos marcados. La señal es amplificada mediante el uso de polímeros conjugados con peroxidasa que reconocen el anticuerpo antidigoxin. El sistema es revelado mediante el uso de una solución que forma precipitados insolubles en la celdilla donde se ha producido la hibridación entre el ADN amplificado y el ADN fijado en la membrana.

El sistema tiene controles internos que permiten comprobar si la amplificación, la extracción del DNA y la hibridación han sido correctos (Fig. 1)

M.G	N.G	HHV2		C	ID. paciente
C.T	T.P	U.P	IC1	IC2	

Fig.1: Membrana Hybridot STD: C- Control PCR. Amplificación control de un gen reportero del DNA del paciente. Control de la extracción de DNA. **IC1, IC2 Control Hibridación.** Deben aparecer siempre en los resultados. Permiten verificar que la hibridación se ha hecho correctamente o que no hay un deterioro de las soluciones de hibridación. IC1-control de señal intensa. IC2-control de señal débil. **M.G-*Mycoplasma genitalium*, N.G-*Neisseria Gonorrhoeae*, HHV2- *Human Herpesvirus 2*, C.T- *Chlamydia Trachomatis*, T.P-*Treponema pallidum*, Up- *Ureaplasma parvum/ Ureaplasma urealyticum*.**
ID. Paciente Espacio para la identificación del paciente

PRESENTACIÓN

El kit Hybridot-STD es un ensayo **para 50 reacciones** y está compuesto por el Hybridot-STD Amplification kit (ref. HD-STD-AK) y el Hybridot-STD Incubation kit (ref. HD-STD-IK).

COMPONENTES Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO

HYBRIDOT-STD AMPLIFICATION KIT

Se debe conservar entre -24°C y -14°C.

Contiene:

Hybridot-STD Premix, Taq Hybridot Polymerase, Hybridot-STD membranes

Hybridot-STD Premix.

Contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación del ADN excepto la *Taq Hybridot Polymerase*, que se incluye en un vial aparte. Una vez descongelados los reactivos para su uso deben mantenerse entre 3°C y 7°C.

Hybridot-STD membranes.

Contiene 3 hojas con las membranas impresas listas para ser usadas, cada membrana debe ser recortada para su uso, utilizando guantes.

HYBRIDOT-STD KIT PARA 50 REACCIONES (REF. HD-STD-50R)

HYBRIDOT-STD INCUBATION KIT

Se debe conservar entre 3°C y 7°C. Contiene material accesorio que a su recepción debe conservarse a temperatura ambiente entre 15°C y 30°C.

Contiene:

PCR Tubes 0.2 mL: conservar a temperatura ambiente 15°C / 30°C
 Hybridot tubes: conservar a temperatura ambiente 15°C / 30°C
 Hybridot tube Caps: conservar a temperatura ambiente 15°C / 30°C
 Hybridot Buffer: conservar a 3°C / 7°C
 Anti-digoxin Antibody: conservar a 3°C / 7°C
 HRP Polymer: conservar a 3°C / 7°C
 Washing Buffer 10X (2 X 125 mL): conservar a 3°C / 7°C

	Componente	Código	Temperatura de Conservación	Cantidad para 50 reacciones
Hybridot-STD Amplification kit (ref. HD-STD-AK)	Hybridot-STD membranes	CBM000088	-24°C / -14°C	50 unidades
	Taq Hybridot polimerase	CBM000087	-24°C / -14°C	12.5 µL
	Hybridot-STD Premix	CBM000085	-24°C / -14°C	2 X 570 µL
Hybridot-STD Incubation kit (ref. HD-STD-IK)	PCR Tubes 0.2mL		15°C / 30°C	50 unidades
	Hybridot tubes		15°C / 30°C	50 unidades
	Hybridot tube Caps		15°C / 30°C	50 unidades
	Hybridot Buffer	CBM000067	3°C / 7°C	50 mL
	Anti-digoxin Antibody	CBM-A-DIG	3°C / 7°C	50 mL
	HRP Polymer	CBM000090	3°C / 7°C	5 mL
	Washing Buffer 10X	CBM000021	3°C / 7°C	2 X 250 mL

Equipamiento, Reactivos y Material no suministrado y requerido.

Equipamiento no suministrado y requerido.

- Horno de hibridación. El producto se ha testado en el horno de hibridación PROBLOT Hybridization Oven (LABNET).
- Termociclador. El producto ha sido testado en termocicladores eppendorf Mastercycler pros.
- Vortex (opcional)
- Centrifuga para tubos de 0.2 MI
- Micropipetas de volumen variable

Reactivos y Material no suministrado y requerido

- Kit de extracción de DNA. El producto ha sido testado usando el kit de extracción QIAamp DNA mini Kit (Qiagen).
- Hybridot Revealing kit (ref. HD-RK, de Cenbimo)
- Agua para la preparación de reactivos.
- Guantes
- Puntas de micropipeta

PRECAUCIONES Y RECOMENDACIONES DURANTE LA MANIPULACIÓN

¡ADVERTENCIA! Antes de utilizar el kit lea detenidamente las instrucciones para asegurarse de que manipula los componentes y reactivos correctamente.

La extracción del DNA problema y la amplificación deben ser llevadas a cabo con el equipamiento necesario para minimizar las posibles contaminaciones derivadas de los procesos descritos. Se recomienda el uso de controles negativos para descartar contaminaciones y falsos positivos.

Debido a las condiciones de conservación se pueden formar precipitados en la solución de lavado *Washing Buffer* 10X. Antes de su uso deben ser eliminados. Para ello calentar la solución en una estufa o baño termostatzado hasta su disolución.

Se recomienda agitar suavemente la solución Hybridot Buffer previamente a su uso.

Todos los reactivos deben ser manipulados con guantes para minimizar las contaminaciones. Las membranas deben ser manipuladas con guantes y deben ser conservadas con su hoja de protección para evitar roces en su superficie.

Durante los procesos de hibridación las membranas no deben ser tocadas con puntas o utensilios con aristas que puedan dañarlas.

Una vez reveladas deben conservarse protegidas de los roces y de la luz utilizando un film adhesivo.

PROTOCOLO

Muestras.

El test ha sido diseñado para su uso en muestras de ADN procedentes de frotis uretrales, biopsias cervicouterinas y orina. El resultado final del test depende de una correcta recogida de la muestra, puesto que la calidad y cantidad de la misma son imprescindibles para el funcionamiento sistema.

Extracción de DNA.

Reactivos no incluidos en el kit. Utilizar un kit comercial de extracción de DNA y seguir las instrucciones del fabricante. El producto ha sido testado con el kit comercial de extracción de DNA QIAamp DNA mini Kit (Qiagen).

Amplificación de ácidos nucleicos (USO DEL HYBRIDOT-STD AMPLIFICATION KIT)

1. Para cada muestra se dispondrán en un tubo de PCR de 0.2 mL (*PCR Tubes 0.2 mL*) 22.75 µL del *Premix Hybridot*, 0.25 µL de *Taq Hybridot polimerase* y 2 µL de DNA extraído anteriormente de la muestra. Se agita con vortex durante 5 s para mezclar el contenido (opcional) y se centrifuga (spin) para arrastrar las posibles gotas que hayan quedado en las paredes del tubo.
2. Los tubos que contengan la mezcla anterior se introducen en el termociclador y se someten al siguiente ciclo:

95°C	7 min	20 ciclos
95°C	30 s	
62°C-52°C con una reducción de 0.5°C por ciclo	1 min	
72°C	1 min 15 s	
95°C	30 s	40 ciclos
52°C	1 min	
72°C	1 min 15 s	
72°C	2 min	
4°C	∞	

El producto ha sido testado en termocicladores eppendorf Mastercycler proS. Es necesario el uso de termocicladores que puedan hacer Touchdown PCR.

Se recomienda conservar el producto de la amplificación entre 3°C y 7°C no más de 24 horas.

Hibridación (USO DEL HYBRIDOT-STD INCUBATION KIT)

1. Se precalienta el horno de hibridación¹ a 66°C. Comprobar mediante un termómetro interior que la temperatura es la correcta.
2. Se recorta una membrana (*Hybridot membranes*) para realizar el ensayo para cada muestra y se identifica con un lápiz en la superficie de la membrana asignada al identificador del paciente (Fig.1).
3. Se introduce la membrana en un tubo de incubación (*Hybridot tubes*) quedando apoyada sobre las paredes del tubo.
4. Se añade 1 mL de *Hybridot Buffer* y a continuación se añaden los 25 µL de PCR procedente de la amplificación de la muestra en el buffer. Se cierra bien el tubo con una rosca (*Hybridot tubes Caps*) para evitar la evaporación durante la incubación.
5. Introducir los tubos en el horno de hibridación (encajarlos en el rotor para tubos de hibridación) e incubar a 66° C² durante 70 minutos con rotación aproximadamente entre 8-12 giros/min³.
6. Preparar la solución de trabajo *Washing Buffer*. Para ello diluir la solución concentrada *Washing Buffer 10X* proporcionada con este kit colocando 100 mL de *Washing Buffer 10X* en una probeta y enrasar hasta 1 L con agua.
7. Decantar o aspirar los líquidos del tubo y lavar con la solución *Washing Buffer* preparada en el paso anterior. Añadir volumen suficiente para cubrir la membrana. Se deberán añadir entre 4 mL y 5 mL, agitar suavemente y decantar, repetir el proceso 2 veces más. Después hacer un último lavado dejando incubar durante 10 minutos con la solución *Washing Buffer* diluida y decantar.
8. Añadir 1 mL de *Anti-digoxin Antibody* e incubar a temperatura ambiente en el horno de hibridación durante 30 minutos con rotación aproximadamente entre 8-12 giros/min.
9. Decantar o aspirar los líquidos del tubo y realizar los lavados con *Washing Buffer* igual que en el paso 7.
10. Añadir 100 µL de *HRP Polymer* y 100 µL de *Washing Buffer*. Incubar a temperatura ambiente en el horno de hibridación durante 30 minutos con rotación aproximadamente entre 8-12 giros/min.
11. Decantar o aspirar los líquidos del tubo y realizar los lavados con *Washing Buffer* igual que en el paso 7.

Revelado (USO DEL HYBRIDOT REVEALING KIT (ref. HD-RK))

1. Preparar la solución de revelado añadiendo proporcionalmente 25 µL de HD-Chromogen por 1 mL de Chromogen Buffer. Una vez preparado usar inmediatamente.
2. Añadir a cada tubo con membrana 2 mL de solución de revelado y agitar inmediatamente. Incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente (15°C a 30°C).
3. Tras la incubación con el Revealing Kit, decantar la solución de revelado y lavar con abundante agua. Dejar secar. El secado de las membranas a 50°C-60°C acelera el proceso y minimiza la tinción del fondo.
4. Interpretar los resultados.

Se recomienda conservar las membranas protegidas de roces y de la luz.

NOTAS

- 1 El horno de hibridación utilizado es un PROBLLOT Hybridization Oven (LABNET).
- 2 El producto debe ser hibridado a 66°C, seleccionar la temperatura deseada en el horno de hibridación. Se recomienda comprobar la temperatura mediante un termómetro debido a que temperaturas superiores a 70°C producen floculación del buffer de hibridación formando agregados e inhibiendo la hibridación.
- 3 La rotación permite mantener la membrana continuamente humedecida y en contacto con las soluciones de incubación. El número de giros 8-12 giros/min corresponde a la posición 2 de velocidad de rotación del horno de hibridación PROBLLOT Hybridization Oven (LABNET).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Como resultado del revelado se producirá un precipitado de color marrón, apareciendo una señal en la celdilla correspondiente al microorganismo presente en la muestra como consecuencia de la amplificación y el marcado del ADN extraído.

Fig. 2 Esquema de la composición de las Hybridot-STD membranas

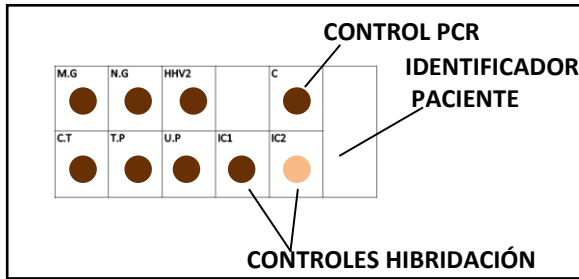


Fig. 2 C- Control PCR. Amplifica un gen *reporter* del ADN extraído de la muestra. Permite comprobar que la amplificación y la extracción han sido correctas. Su señal debe ser similar a IC1

IC1 – IC2. Controles de hibridación. Deben aparecer siempre en los resultados, Permiten verificar que la hibridación se ha hecho correctamente o que no hay un deterioro de las soluciones de hibridación. IC1-control de señal intensa e IC2-control de señal débil.

M.G- *Mycoplasma genitalium*.

N.G- *Neisseria Gonorrhoeae*.

HHV2- *Human Herpesvirus 2*.

C.T- *Chlamydia Trachomatis*.

T.P- *Treponema pallidum*.

Up- *Ureaplasma parvum/ Ureaplasma urealyticum*.

EJEMPLOS DE RESULTADOS VÁLIDOS

Fig. 3 Muestra de paciente positiva para M.G-*Mycoplasma genitalium*

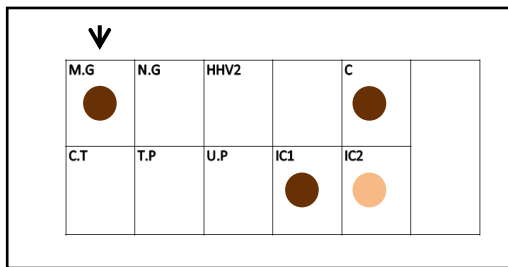
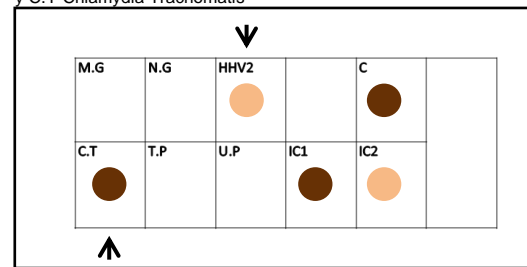


Fig. 4 Muestra de paciente positiva para HHV2- *Human Herpesvirus 2* y C.T-*Chlamydia Trachomatis*



RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

EJEMPLO DE RESULTADO NO VÁLIDO

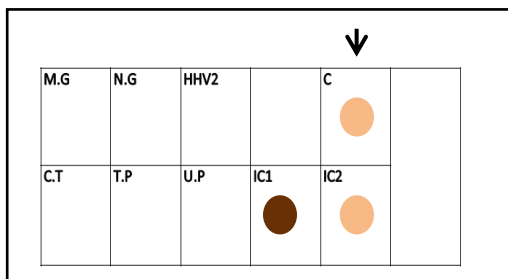


Fig. 5 Si obtiene un resultado similar al de la imagen significa que la muestra del paciente tiene baja concentración de DNA o problemas en la amplificación. Se recomienda repetir la extracción con *mayor cantidad de muestra del paciente* o repetir la extracción y amplificar de nuevo.

EJEMPLO DE RESULTADO NO VÁLIDO

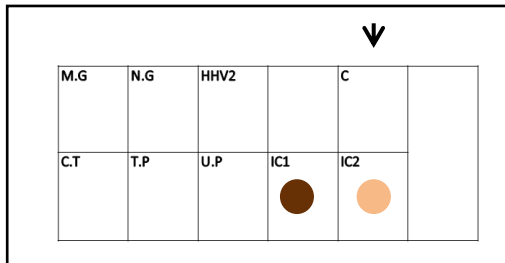


Fig. 6 Si obtiene un resultado similar al de la imagen significa problemas en la amplificación o en la extracción de DNA. La ausencia de control C indica que no se ha extraído DNA o que en la amplificación ha habido un problema. Se recomienda repetir la extracción y amplificar de nuevo.

EJEMPLO DE RESULTADO NO VÁLIDO

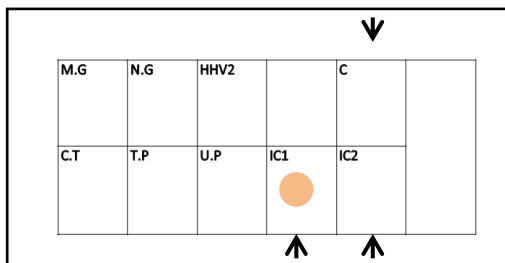


Fig. 7 Si obtiene un resultado similar al de la imagen significa problemas en la amplificación, extracción DNA e hibridación. La ausencia de control C indica que no se ha extraído DNA o que en la amplificación ha habido un problema. La ausencia de control IC2 y la tinción débil de IC1 indica que ha habido un problema en la hibridación o deterioro de los reactivos. Se recomienda repetir la extracción, amplificar e hibridar de nuevo.

EJEMPLO DE RESULTADO NO CONCLUYENTE

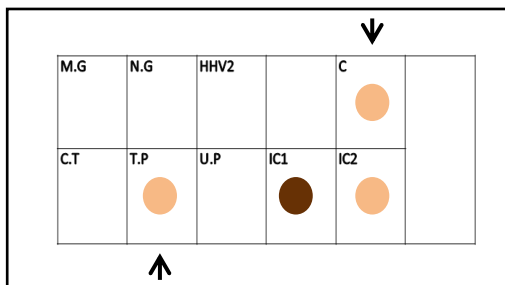


Fig. 8 Muestra de paciente positiva para T.P-*Treponema pallidum*. Baja concentración de DNA o problemas en la amplificación. Se recomienda repetir la extracción con *mayor cantidad de muestra del paciente* o repetir la extracción y amplificar de nuevo, para descartar la presencia de otros patógenos.

EJEMPLO DE RESULTADO NO CONCLUYENTE

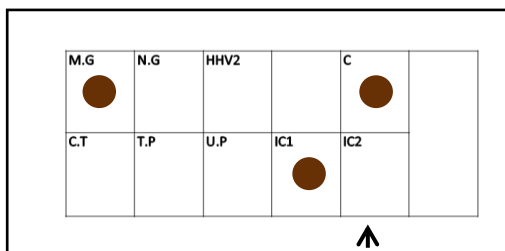


Fig. 9 Ausencia de control IC2. La ausencia de control IC2 es indicativa de problemas durante la hibridación, lavados incorrectos, preparación errónea de reactivos o tiempos de incubación demasiado cortos. Muestra de paciente positiva para M.G-*Mycoplasma genitalium*

PROBLEMAS DE TINCIÓN

Abundante señal de fondo. No se han realizado correctamente los lavados indicados en los puntos 7,9 y 11 del apartado hibridación.

PARÁMETROS ANALÍTICOS

Sensibilidad analítica del sistema

La sensibilidad analítica fue determinada mediante la amplificación específica de fragmentos clonados en plásmidos. El límite de detección (mínima cantidad detectable) en función del patógeno se especifica en la siguiente tabla:

100 Copias
<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Neisseria Gonorrhoeae</i>
<i>Human Herpes virus 2</i>
<i>Chlamydia Trachomatis</i>
<i>Treponema pallidum</i>
<i>Ureaplasma parvum/ Ureaplasma urealyticum</i>

Especificidad analítica del sistema

El sistema ha sido diseñado para la amplificación específica de las secuencias de cada uno de los microorganismos y no de otros.