

Instrucciones de uso

# Wipe test

## Control de Contaminación

“Kit” de pruebas para la detección de contaminaciones  
basado en genética molecular

REF 7091

40 Reacciones

### 1. Descripción del Producto

El uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en el tipaje HLA se ha convertido en rutinario. Dado que la PCR es un método muy sensible es esencial tomar precauciones para evitar contaminaciones que condujeran a reacciones falsas positivas. Para prevenir contaminaciones y asegurar la calidad, los materiales del laboratorio, las áreas del laboratorio y reactivos individuales (p.ej.: Taq-Polimerasa) deberían ser monitorizados regularmente para presencia de ADN o amplificadas (cada 2 meses según el estándar EFI L1.2200).

El “kit” **Wipe test** es muy adecuado para la detección de contaminaciones con ADN genómico o amplificadas de los genes HLA de clase I y II. El procedimiento de la prueba está realizado usando la PCR con “Primers” Específicos de Secuencia (SSP), ver Figura 1 [2, 3]. Este método está basado en el hecho que la extensión del “primer” y por tanto la PCR exitosa depende de un ajuste perfecto en los extremos 3' de ambos “primers”. Por tanto, sólo si los “primers” ajustan completamente con la secuencia diana se obtendrá amplificación la cual se visualizará posteriormente usando electroforesis en gel de agarosa.

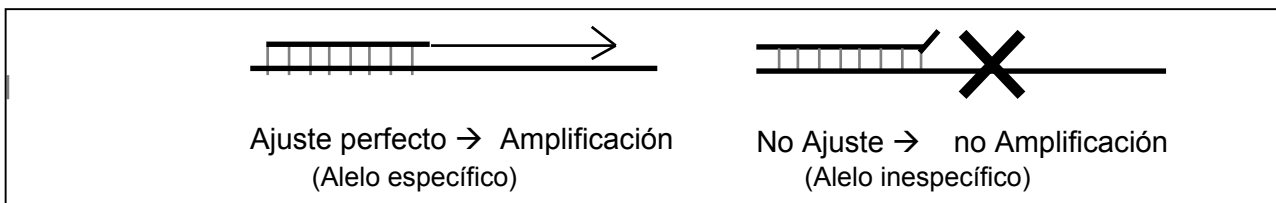


Fig. 1: Principio de una PCR-SSP

## 2. Material

### 2.1 Contendos del “kit” Wipe test

- ◆ 5 tiras de PCR (de 8 tubos de PCR de pared fina) suficiente para 40 reacciones (13 pruebas de limpieza). Las mezclas prealiquotadas y secas están formadas por “primers” específicos de alelo, “primers” para el control interno (específicos para el gen humano de la G3PDH) y nucleótidos.
- ◆ 1 vial de 1,1 ml de Tampón de PCR 10x
- ◆ 5 tiras de 8 tapones de PCR
- ◆ Instrucciones de uso

### 2.2 Material adicional

- ◆ Taq Polimerasa (5 U/μl), (p.ej.: HISTO TAQ, [REF](#) 70975)  
**!!! No usar una Taq Polimerasa “Hot-start” !!!**
- ◆ “Kit” **BAG EXTRA-GENE I** ([REF](#) 7059, opcional) para la extracción de ADN de sangre, linfocitos, leucocitos o material para otros métodos de extracción de ADN.
- ◆ Pipetas automáticas (0,5-250 μl)
- ◆ Puntas estériles con filtro integrado
- ◆ Papel de lana
- ◆ Termociclador para ADN (p.ej. PTC 200 con tapa ajustable y calentada, MJ Research / BioRad; listado de los termocicladores validados en la página 4)

### Dispositivos y materiales para electroforesis en gel

- ◆ Agarosa para ADN
- ◆ 0,5x tampón TBE (45 mM de Tris base, 45 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA)
- ◆ Bromuro de Etidio (EtBr)
- ◆ Unidad de electroforesis
- ◆ Fuente de Alimentación (200 - 300 V, 200 mA)
- ◆ Estándar de longitudes de ADN (DNA-length standard [REF](#) 7097)

### Dispositivos para interpretación y fotodocumentación

- ◆ Fuente UV (220 - 310 nm)
- ◆ Cámara (p.ej.: sistema Polaroid) con película (Polaroid tipo 667) o sistema de vídeo con papel térmico (p.ej.: Typ KP65HM-CE)

### 2.3. Almacenamiento y estabilidad

El “kit” se entrega a temperatura ambiente. almacenar todos los reactivos a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  o  $2 - 8^{\circ}\text{C}$ , en oscuridad y en dispositivos con temperatura monitorizada (**¡Evitar cambios frecuentes de temperatura de almacenamiento!**). La fecha de caducidad está indicada en la etiqueta de cada reactivo y es válida también para reactivos una vez abiertos. La fecha de caducidad indicada en la etiqueta exterior hace referencia al reactivo con la estabilidad más corta contenido en el “kit”.

### 3. Procedimiento de la Prueba

#### 3.1 Condiciones de Seguridad

La PCR es un método particularmente sensible. Se deben tener condiciones especiales de seguridad para evitar contaminación y, por tanto, falsas reacciones:

- Use guantes durante el trabajo (sin polvo, si es posible).
- Utilizar puntas nuevas en cada paso de pipeteo (con filtro integrado).
- Utilizar áreas de trabajo diferentes para la preamplificación (purificación de ADN y preparación de las reacciones) y postamplificación (electroforesis en gel y documentación). Preferiblemente utilice dos habitaciones separadas.

Utilizar los dispositivos y otros materiales sólo en los lugares respectivos y no intercambiarlos.

#### 3.2 Extracción de ADN

Se requiere ADN de leucocitos para el control positivo. El “kit” **BAG EXTRA-GENE I**, p.ej., es el más adecuado para la extracción de ADN dado que se puede obtener AND purificado de sangre total en poco tiempo sin usar químicos tóxicos o disolventes. Además métodos comerciales basados en columnas o partículas magnéticas u otros métodos descritos en la literatura son también adecuados para obtener ADN con suficiente pureza. La heparina potencialmente inhibe la PCR [6]. Por lo que se recomienda el uso de sangre EDTA o Citrato para tipificación.

El ADN debería tener los siguientes índices de pureza:

- $DO_{260}/DO_{280} = >1.5$  y  $<2.0$  (indicador de contaminación con ARN/proteínas)
- $DO_{260}/DO_{230} = >1.8$  (indicador de contaminación con sales, carbohidratos o solventes orgánicos)

La evaluación y el control de calidad del “kit” Wipe test se llevaron a cabo con ADN, que fue extraído con EXTRA GENE I o con “kits” de Qiagen.

#### 3.3 Amplificación

Las mezclas de reacción prealiquotadas y secas ya contienen un juego de “primers” específicos de alelo, “primers” del control interno y nucleótidos. Los parámetros de amplificación están optimizados para un volumen final de 20 µl. Para cada prueba se usan tres reacciones.

La evaluación y el control de calidad del “kit” Wipe test se llevaron a cabo con HISTO TAQ (REF 70975) o Taq polimerasa de Qiagen.

##### 3.3.1 Procedimiento de la prueba “wipe test”

1. Se rotulan tubos de reacción de 1,5 ml con el nombre de las áreas examinadas (p.ej.: bancada de trabajo, pomo de la puerta, ...) y se rellenan con **200 µl de agua destilada estéril**.
2. Para cada área de prueba se sumerge un trozo de lana en el tubo de reacción respectivo, y esa área de prueba es limpiada con la lana húmeda.

- Poner la lana en el tubo de reacción respectivo e incubar durante 2h a temperatura ambiente en los 200µl de agua destilada. Pasado este tiempo la lana se desecha.
- Sacar del “kit” el número requerido de tubos de PCR y de tampón de PCR 10x. Etiquetar un tubo como “área de prueba”, otro como “control positivo” y el tercero como “control de inhibición”.
- Preparar la **predilución de la Taq** (mínimo 5 reacciones) y agitar la mezcla con vortex brevemente. Preparación de la predilución de la Taq para n° reacciones + 2:

	para 1 reacción	5 reacciones	8 reacciones
Tampón de PCR 10x	2 µl	10.0 µl	16 µl
Taq Polimerasa (5 U/µl)	0.12 µl	0.60 µl	0.96 µl

- Pipetear las siguientes mezclas de reacción en los tubos de PCR etiquetados:

	área de prueba	control positivo	control de inhibición
agua destilada estéril	14 µl	17 µl	13 µl
muestra de área de prueba	4 µl	-	4 µl
ADN genómico (40ng/µl)	-	1 µl	1 µl
predilución de Taq	2 µl	2 µl	2 µl

- Cerrar los tubos fuerte con sus respectivos tapones. Asegurarse de no tocar con los dedos la parte interior de los tapones o los bordes superiores de los tubos para evitar contaminaciones. El talco de los guantes es un fuerte inhibidor de la PCR! Agitar ligeramente la placa para disolver el pellet azul del fondo del tubo. Toda la solución de PCR debe quedarse en el fondo.
- Colocar los tubos de reacción con firmeza en el termociclador y apretar bien la tapa para que no se deformen. Iniciar el programa de PCR. ¡¡**No** es necesario recubrir las mezclas de reacción con aceite mineral si se usa una tapa caliente y ajustada!!

#### Parámetros de amplification:

Programa-Paso	Tiempo	Temp.	Nº de Ciclos
Desnat. Inicial	5 Min	96°C	1 Ciclo
Desnaturalización	20 Seg	96°C	5 Ciclos
Anillamiento+Extensión	60 Seg	68°C	
Desnaturalización	20 Seg	96°C	10 Ciclos
Anillamiento	50 Seg	64°C	
Extensión	45 Seg	72°C	
Desnaturalización	20 Seg	96°C	15 Ciclos
Anillamiento	50 Seg	61°C	
Extensión	45 Seg	72°C	
Extensión Final	5 Min	72°C	1 Ciclo

#### Termocicladores Validados:

PTC 100 / 200 / C1000  
(MJ Research/ BioRad),  
GeneAmp PCR-System 9600 /  
9700 (usar tasa de  
calentamiento del 9600) (ABI),  
Mastercycler epGradient S  
(usar la función “simular  
gradiente de Mastercycler”)  
(Eppendorf),  
Tprofessional (Biometra)

**Cuando se usen termocicladores con tasas muy rápidas de calentamiento y enfriamiento, se recomienda usar una rampa térmica reducida (~ 2.5°C/seg).**

**Dado que los termocicladores de diferentes fabricantes rinden de manera distinta e incluso máquinas individuales de un tipo pueden estar calibradas diferentemente, puede ser necesario optimizar los parámetros de amplificación.**

Para optimizar un termociclador usar la siguiente guía:

Si hay reacciones **falsas positivas** (bandas inespecíficas, tipos adicionales), aumentar la temperatura de anillamiento en pasos de 1°C.

Si hay reacciones **falsas negativas** (bandas desaparecidas), disminuir la temperatura de anillamiento en pasos de 1°C y/o aumentar los tiempos de anillamiento en pasos de 5 segundos y/o aumentar los tiempos de desnaturalización en pasos de 5 segundos.

**Se recomienda usar exclusivamente termocicladores calibrados con regularidad. El “kit” BAG-CYCLER CHECK (REF 7104) es muy adecuado para este fin.**

**Las pruebas de Control de Calidad se llevaron a cabo en un PTC-200 resp. C1000 (MJ Research / BioRad), 9700 (ABI), Mastercycler epGradient S (Eppendorf) y Tprofessional (Biometra).**

### **3.4 Electroforesis en Gel**

La separación de los productos de amplificación se realiza usando un gel (horizontal) de agarosa. Como tampón para la electroforesis, se recomienda TBE 0,5x (45 mM de tris, 45 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA). La concentración del gel debe ser del 2,0 – 2,5% de agarosa. Dejar polimerizar el gel al menos 30 minutos antes de cargar las muestras. Al terminar la amplificación, sacar las muestras del termociclador y cargar cuidadosamente todas las muestras de reacción completas en cada pocillo del gel. Además, aplicar 10µl de un estándar de longitud de ADN para comparar los tamaños. La separación electroforética se hace a 10 - 12 V/cm (con una distancia de unos 20 cm entre los electrodos, aprox. 200 - 240V), durante 20 - 40 minutos. Tras finalizar, se tiñe el gel completo en una solución de Bromuro de Etidio (EtBr) (aprox. 0,5 µg/ml de EtBr en H<sub>2</sub>O o tampón TBE) durante 30 - 40 minutos. Como alternativa, el EtBr (0,5 µg/ml) se puede añadir al tampón de electroforesis o al gel de agarose. Si fuese necesario, se puede eliminar el exceso de EtBr empapando el gel en H<sub>2</sub>O o en tampón TBE 0,5x durante 20 - 30 minutos.

### **3.5 Fotodocumentación e Interpretación**

Para fotodocumentación, visualizar el amplificado de la PCR usando un transiluminador UV (220 - 310nm) y fotografiarlo con una cámara adecuada, película y filtros (p.ej.: Polaroid, película tipo 667 o sistema de vídeo, y papel térmico KP65HM-CE). Elegir el tiempo de exposición y la apertura de forma que las bandas se vean nítidas y destaquen frente al fondo oscuro (apertura aproximada 11, tiempo de exposición 1 segundo).

Si el área examinada no está contaminada ninguna banda debería ser visible en la prueba muestra de área. Las contaminaciones están indicadas por las siguientes bandas:

Contaminación con amplificados: **78 bp y/o 104 bp y/o 282 bp**

Contaminación con ADN genómico: **282 bp** y posiblemente **78 bp, 104 bp, 176 bp, ca. 580 bp**

El control positivo y el control de inhibición deberían mostrar un patrón de bandas según lo esperado para ADN genómico. Si no hay ningún amplificado en el control positivo, implicará que ninguna reacción de PCR ha tenido lugar y que la prueba completa no podrá ser interpretada. Si el control positivo muestra un patrón de bandas correcto, pero no hay ninguna banda visible en el control de inhibición, deben existir inhibidores en el área evaluada. En este caso una muestra limpia de “área examinada” no prueba que realmente no haya contaminaciones presentes en dicha área.

#### **4. Avisos y Precauciones**

El Bromuro de Etidio es una sustancia mutagénica potente. ¡Usar guantes cuando se manejen geles o soluciones que contengan EtBr! ¡Tenga en cuenta las instrucciones de uso, avisos y precauciones del fabricante! El transiluminador emite ondas muy cortas de luz UV que puede causar quemaduras en piel y retina. ¡Usar una máscara de seguridad!

El material biológico que se utiliza para la extracción de ADN, p. ej., sangre o tejidos humanos, se deben tratar como potencialmente infecciosos. Cuando se manipula material biológico se recomienda observar las debidas medidas de seguridad (no pipetear con la boca; usar guantes desechables durante la manipulación material biológico y la realización de la prueba; desinfectar las manos cuando haya terminado la prueba).





El material biológico se debe desactivar antes de desechar (por ejemplo en un autoclave). Los materiales desechables se deben esterilizar o incinerar después de utilizarlos.

Los derrames de materiales potencialmente infecciosos se deben eliminar inmediatamente con papel absorbente y limpiar las zonas contaminadas con un desinfectante estándar adecuado o de alcohol al 70%. Los materiales que se usan para limpiar derrames, incluyendo guantes, se deben desactivar antes de desecharlos (p. ej. en una autoclave).

## 5. Bibliografía

1. Bodmer, J., 1993. Immunogenetics **37**:79-94
2. Olerup, O., Zetterquist H., 1992. Tissue Antigens **39**:225-235
3. Olerup, O., Zetterquist H., 1993. Tissue Antigens **41**:55-56
4. Lu, Y.H. and Négre, S., 1993. Trends in Genetics **9**:297
5. Green and Sambrook, 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory
6. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques **9**:166
7. Bunce, M., 1995. Tissue Antigens **46**:355-367

## 6. Explicación de los símbolos usados en el Etiquetado

	Temperatura de almacenamiento
	Usar antes de
	Consultar las Instrucciones de uso
	Suficiente para "n" pruebas
<b>CONT</b>	Contenido, contiene
<b>CONTROL CC</b>	Control de Contaminación
<b>IFU</b>	Instrucciones de uso
<b>LOT</b>	Código de Sublote
<b>OR</b>	ó
<b>PCRBUF 10x</b>	Tampón de PCR, concentrado 10x
<b>PCRCAP</b>	Tapones de PCR
<b>PCRSTRIP</b>	Tiras de PCR
<b>REACTIONMIX</b>	Mezclas de Reacción
<b>REF</b>	Referencia
<b>RTU</b>	Listo para usar

Instrucciones de uso en otros idiomas, consultar:

<http://www.bag-healthcare.com>

<http://service.bag-healthcare.com>

Teléfono: +49 (0)6404-925-125



BAG Health Care GmbH

Amtsgerichtsstraße 1-5  
35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 0

Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 250

[www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com)

[info@bag-healthcare.com](mailto:info@bag-healthcare.com)

Auftragsannahme/Ordering:

Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 450

Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 460

[verkauf@bag-healthcare.com](mailto:verkauf@bag-healthcare.com)

Customer Service:

Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 125

Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 421

[service@bag-healthcare.com](mailto:service@bag-healthcare.com)