



ESQUEMA SIMPLIFICADO DE TODO EL PROCESO

PASO UNO:

Obtención de la muestra



Ver página 4

PASO DOS:

Extracción del ADN de la muestra



Ver página 4-6

PASO TRES:

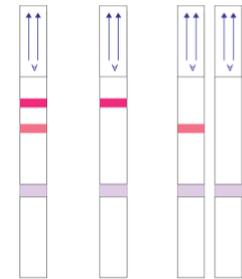
Detección de MTB



Ver página 6-7

PASO CUATRO:

Visualización del resultado



Ver página 7-8



Kit TB-DxNet

REF DLTB02

Versión 3.3

Almacene según su etiqueta individual

***Almacene los controles incluidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ***



Uso deseado

El kit TB-DxNet incluye lo necesario para extraer ADN a partir de muestras de esputo y extrapulmonares usando MagnetiDNA+K, detectar la presencia de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y su posterior visualización de los resultados mediante las tiras de Bionet Multi.

Introducción

MTB es una micobacteria ácido alcohol resistente, que se estima está presente en el 30% de la población mundial, siendo más frecuente en países en vías de desarrollo [1]. Cada año se reportan más de 10 millones de casos en el mundo con una mortalidad del 10%. MTB es altamente mortal en individuos inmunocomprometidos pues fácilmente puede causar tuberculosis (TB) pulmonar o diseminarse a otros órganos, conocido como tuberculosis extrapulmonar (TBE) [2]. El diagnóstico preciso y oportuno de TB tiene un papel fundamental, en especial en los grupos vulnerables. El tratamiento contra este patógeno consiste principalmente en el uso de antibióticos [3,4]. Actualmente el estándar de oro para el diagnóstico de TB es el cultivo, sin embargo, puede tardar más de un mes para un resultado, la microscopía de esputo es otro método de diagnóstico más rápido, no obstante, tiene una baja reproducibilidad y una sensibilidad que oscila entre el 50-70%. Las técnicas moleculares como la qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa/en tiempo real) ofrecen diagnósticos más precisos y rápidos, pero su costo es elevado, requiere de equipo y personal especializado [5]. Existe otra técnica molecular para la detección del ácido nucleico por formación mediada de bucles a temperatura constante (LAMP) y tiene la ventaja de no requerir equipos especializados además de que la OMS recomienda su uso como reemplazo de la microscopía para el diagnóstico de TB en adultos con signos y síntomas, así como para seguimiento cuando la microscopía es negativa en pacientes diagnosticados previamente con TB [6,7].

Principio

Extracción de ADN: Este kit incluye el producto MagnetiDNA+K, el cual tiene la función de obtener ADN aprovechando la carga de este, una propiedad química de los ácidos nucleicos, ya que estos poseen una carga negativa debido a los grupos fosfato presentes en su estructura, lo que permite capturar dicho material utilizando moléculas cargadas positivamente [8]. Las perlas magnéticas consisten en un centro de hierro recubierto por resina que confiere una carga positiva en su superficie, éstas se encuentran suspendidas en un buffer con cierto pH para mantener las cargas tanto de la superficie de las perlas magnéticas como la de los ácidos nucleicos, con ayuda del buffer de lisis celular (contiene agentes desnaturizantes de proteínas y lípidos) tendrá la función de lisis las células presentes en la muestra, de esta forma facilitará a las perlas magnéticas capturar los ácidos nucleicos, una vez realizado dicho proceso con ayuda de un imán o magneto se atraerán los núcleos de hierro permitiendo la separación de las perlas del resto de componentes de la muestra (proteínas, lípidos entre otros) para luego eliminar dichos componentes por pipeteo. Mientras las perlas son retenidas en la pared del microtubo por el imán/magneto se realizará un proceso de lavado con el buffer de lavado, el cual, tiene la función de eliminar todos los componentes no deseados posteriormente se elimina todo el buffer de lavado para finalmente eluir las perlas magnéticas en una solución acuosa con pH básico con el fin de neutralizar el pH de las perlas liberando los ácidos nucleicos capturados [9].

Detección de MTB: El kit TB-DxNet (REF DLTB02), es un ensayo para la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP por sus siglas en inglés) que permiten detectar la presencia del gen 16S de ARN ribosomal para la detección cualitativa de MTB. La reacción de LAMP se realiza mezclando la muestra (ADN purificado) en un tubo con reactivo seco, luego se incuba a 65 °C en condiciones isotérmicas, si la muestra de ADN contiene ADN de MTB en una concentración mayor al límite de detección se llevará a cabo el proceso de amplificación durante el cual se incorporan las marcas biotina-FAM.

En caso contrario, de no estar presente o se encuentre por debajo del límite de detección no se realizará el proceso de amplificación ni tampoco el marcaje (etiquetado).

Visualización del resultado: Una vez concluido la detección, se utiliza el producto Bionet Multi (REF DLBIO01) incluido en este kit. Para ello el producto de la amplificación es diluido en solución de corrimiento en el cual se colocará la prueba para que la muestra migre a través de ésta por acción capilar. Si la muestra contenía ADN de MTB las marcas biotina-FAM reaccionarán con las partículas recubiertas de anticuerpos anti-fluoresceína presentes en el conjugado, luego continuará migrando hasta encontrarse con los anticuerpos anti-biotina en la región de prueba (T), estos reaccionarán formando una línea de color en dicha región T, esto indica un resultado positivo debido a que fue detectado ADN de MTB. Por el contrario, si no hay ADN de MTB no habrá marcas de biotina-FAM y por lo tanto no se formará la línea de color en la región T, esto indica un resultado negativo. La prueba posee un control (C) que indica que se ha agregado la cantidad de muestra correcta y el procedimiento se ha realizado con éxito.

INSTRUCCIONES DE USO

PASO UNO: OBTENCIÓN DE MUESTRA

Obtenga la muestra de esputo o extrapulmonar siguiendo los procedimientos estándar establecidos para muestras presuntas positivas a tuberculosis (TB), luego almacene en un recipiente estéril y ciérrelo perfectamente.



ANTES DE CONTINUAR

Es necesario que asegure la temperatura requerida en cada ensayo antes de emplear el termobloque, baño seco o incubadora, para ello consulte el **inciso n** de la sección 'Consideraciones adicionales' pág. 11.

PASO DOS: EXTRACCIÓN DE ADN DE LA MUESTRA

PRECAUCIÓN: Previo a la realización de este procedimiento es fundamental que la muestra **NO** haya estado por más de 2 horas a temperatura ambiente después de haber sido recolectada o que haya permanecido más de 7 días en refrigeración (2-8 °C), de lo contrario los resultados pueden no ser ciertos.

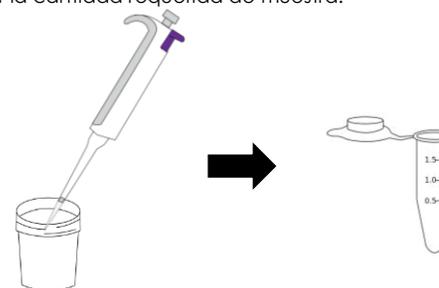
A continuación, siga cada uno de los pasos que se describen, recuerde no modificar y/o alterar ninguno de los pasos o cantidades que se indican.

I. Identifique cada uno de los materiales provistos por el producto MagnetiDNA+K y asegúrese de contar con todo lo necesario, consulte la pág. 8, sección **Contenido**.

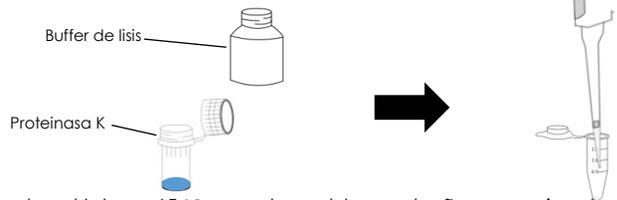
Nota: Permita que el buffer de lisis y de lavado alcancen temperatura ambiente, recuerde mezclar suavemente cada reactivo previo a su uso a excepción de las perlas magnéticas ya que estas requieren de una agitación vigorosa.

II. Tome el recipiente con la muestra, ábralo y recolecte 200 microlitros (µL) de la muestra con ayuda de una micropipeta utilizando puntas (nuevas) y transfírela a un tubo de 1.5-2 mililitros (mL) estéril.

Nota: En caso de que la muestra presente alta viscosidad añada una proporción 1:1 de solución salina isotónica (SSI) 'no incluido' y mezcle hasta obtener una consistencia líquida para poder tomar la cantidad requerida de muestra.

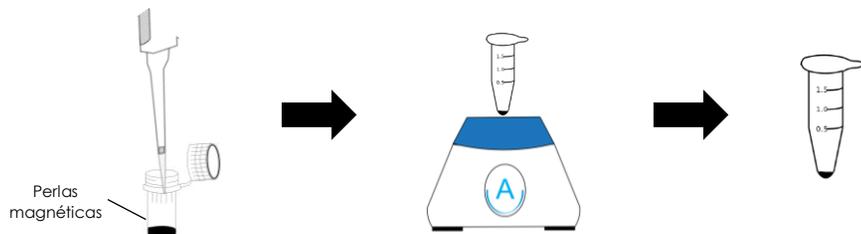


III. Posteriormente adicione 300 µL de buffer de lisis y 10 µL de proteinasa K al tubo de 1.5-2 mL donde previamente colocó la muestra.

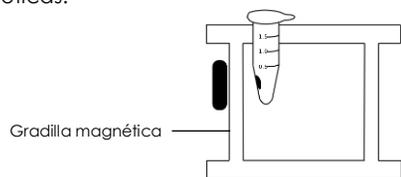


IV. Incube el tubo a 65 °C en un termobloque, baño seco o incubador por 5 a 15 minutos para facilitar el proceso de lisado de la muestra y cuando esta se visualice transparente siga con el paso V. En caso contrario (no transparente), centrifugue el tubo y pase el sobrenadante a un nuevo tubo, incube como se indicó al inicio.

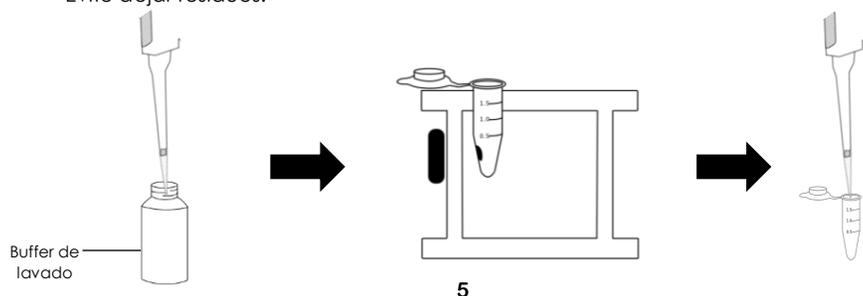
V. Tome y agite el contenedor de perlas magnéticas de forma vertical por 10 segundos o hasta que su contenido sea homogéneo, tome 50 µL de las perlas magnéticas y deposítelas en el tubo con la muestra. Cierre perfectamente y mezcle con ayuda de un vortex durante 1 minuto, al finalizar deje reposar el tubo por 5 minutos a temperatura ambiente.



VI. Coloque el tubo en una gradilla magnética, déjelo en esa posición hasta que la mezcla se aclare (aproximadamente 1-2 minutos), posteriormente retire completamente el sobrenadante sin quitar el tubo de la gradilla y sin llevarse las perlas magnéticas.



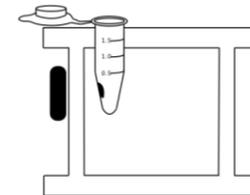
VII. Después agregue 500 µL de buffer de lavado y mezcle por vortex/agitación durante 10 segundos luego regrese el tubo a la gradilla magnética y déjelo hasta que la mezcla se aclare (aproximadamente 1-2 minutos), proceda a remover el sobrenadante sin retirar el tubo de la gradilla y sin llevarse las perlas magnéticas. Evite dejar residuos.



5

VIII. A continuación, deje el tubo abierto en la gradilla para eliminar cualquier residuo del buffer de lavado, esto hasta por 2 minutos y asegúrese de que no existan microgotas en el tubo.

PRECAUCIÓN: Si no se remueve por completo el buffer de lavado puede inhibir las reacciones posteriores.



IX. Agregue 50 µL del buffer de elución al tubo con las perlas magnéticas, después mezcle por vortex durante 10 segundos, posteriormente incube el tubo a 65°C durante 10 minutos. Al finalizar el tiempo coloque el tubo en la gradilla magnética, espere a que las perlas magnéticas se separen del sobrenadante y únicamente recolecte todo el sobrenadante (ADN purificado) después transfíralo a un tubo nuevo y estéril de 1.5-2 mL, rotúelo para identificarlo.



PASO TRES: DETECCIÓN DE MTB

PRECAUCIÓN: El ADN purificado puede ser utilizado inmediatamente luego de su obtención, en caso contrario debe ser almacenado a -20 °C y luego permitir que alcance temperatura ambiente antes de utilizarlo.

A continuación, siga cada uno de los pasos que se describen, recuerde no modificar y/o alterar ninguno de los pasos o cantidades que se indican.

I. Identifique cada uno de los materiales provistos por el producto Kit TB-DxNet y asegúrese de contar con todo lo necesario, consulte la pág. 8, sección **Contenido**.

ANTES DE CONTINUAR

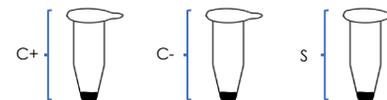
Coloque 50 µL de reactivo diluyente en el control positivo, homogenice por pipeteo y almacene a -20 °C ±5 °C hasta el momento de su uso.

II. Prepare cada tubo por separado según lo descrito.

- **Control positivo (C+) del ensayo:** Tome un tubo con reactivo seco y agregue 20 µL de reactivo diluyente, 5 µL de control positivo y mezcle por pipeteo hasta obtener una consistencia homogénea. Al finalizar cierre el tubo y rotule con C+.
- **Control negativo (C-) del ensayo:** Tome un tubo con reactivo seco y agregue 20 µL de reactivo diluyente, 5 µL de control negativo y mezcle por pipeteo hasta obtener una consistencia homogénea. Al finalizar cierre el tubo y rotule con C-.
- **Muestra (S):** Tome un tubo con reactivo seco y agregue 20 µL de reactivo diluyente, 5 µL de muestra (ADN purificado) y mezcle por pipeteo hasta obtener una consistencia homogénea. Al finalizar cierre el tubo y rotule de tal forma que pueda identificarla.

Nota: se recomienda realizar duplicados por cada muestra a analizar.

ANTES DE CONTINUAR: Visualice que cada uno de los tubos haya sido correctamente homogeneizado, es decir que no se vean zonas secas en el interior de los tubos.



III. Con ayuda del gotero con aceite mineral, coloque una gota de aceite en el interior de cada uno de los tubos, solo sobre su superficie sin mezclar. Coloque los tubos a 65 °C por 30 minutos en un termobloque, baño seco o incubador.

6

Antes de que finalice el tiempo, prepare un recipiente con hielo triturado para que cuando termine el tiempo, saque los tubos del equipo y los coloque en dicho recipiente.



PASO CUATRO: VISUALIZACIÓN DEL RESULTADO

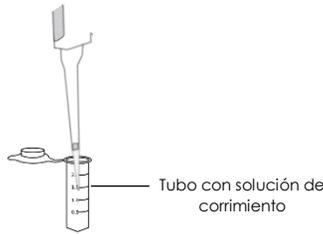
PRECAUCIÓN: Cada uno de los tubos generados del paso tres pueden ser utilizados inmediatamente, en caso contrario deben ser almacenados a -20 °C y luego permitir que alcance temperatura ambiente antes utilizarlos.

A continuación, siga cada uno de los pasos que se describen, recuerde no modificar y/o alterar ninguno de los pasos o cantidades que se indican.

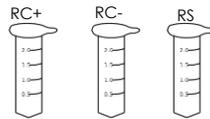
- I. Identifique cada uno de los materiales provistos por el producto Bionet multi y asegúrese de contar con todo lo necesario, consulte la pág. 8, sección **Contenido**.
- II. Tome los tubos con solución de corrimiento y asegure que toda la solución quede en el fondo, realizando movimientos fuertes al tubo.



- III. Recolecte 10 µL del tubo C+ después transfíralos a un tubo con solución de corrimiento y mezcle por pipeteo o agite el tubo por 5 segundos de forma lateral, cierre perfectamente y rotule nuevamente con RC+.



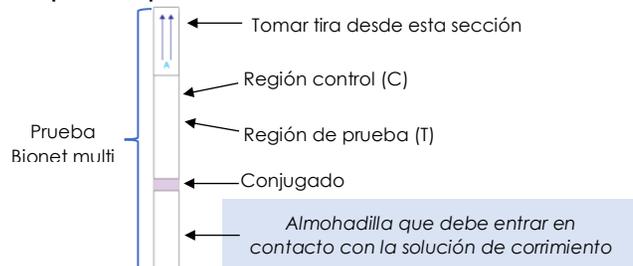
- IV. Repita este mismo procedimiento para cada uno de los tubos generados restantes según corresponde.



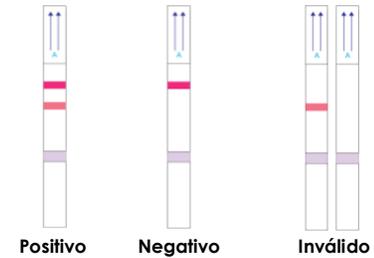
- V. Tome una prueba Bionet multi y rotúlela según el tubo con solución de corrimiento en el que la colocará (tubo elaborado en el paso anterior):

- Tira **S** para el tubo con solución de corrimiento que tiene la **muestra**.
- Tira **C+** para el tubo con solución de corrimiento que tiene el **control positivo**.
- Tira **C-** para el tubo con solución de corrimiento que tiene el **control negativo**.

Programa un temporizador por 3 minutos.



- V. Una vez hayan pasado los 3 minutos, saque la prueba del tubo y colóquela sobre una superficie plana y limpia (limpie el excedente si es necesario), interprete los resultados.



Resultados

Control positivo (C+)	Resultado: Se visualiza una línea de color en la región de control (C) y otra línea de color en la región de prueba (T). Un resultado positivo indica que se siguió de manera correcta el procedimiento.
Control negativo (C-)	Resultado: Únicamente se visualiza una línea de color en la región de control (C). Un resultado negativo indica que se siguió de manera correcta el procedimiento.
Muestra	Positivo: Se visualiza una línea de color en la región de control (C) y otra línea de color en la región de prueba (T). Este resultado indica que se detectó ADN de MTB. Negativo: Se visualiza una línea de color en la región de control (C). No se observa ninguna línea de color en la región de prueba (T). Este resultado indica que no se detectó ADN de MTB.
Inválido	No se visualiza la línea de color en la región control (C).

Contenido

Esta prueba proporciona los reactivos en las cantidades necesarias para procesar un total de 10 muestras con extracción, reacción y revelado. A continuación, se presenta el contenido por separado de los productos:

INCLUIDOS

- **MagnetiDNA+K**
 - Buffer de lisis
 - Perlas magnéticas
 - Buffer de lavado
 - Buffer de elución
 - Tubos de 1.5-2 mL
 - Proteinasa K
- **Kit TB-DxNet**
 - Instructivo de uso
 - Reactivo seco
 - Reactivo diluyente
 - Control negativo (C-)
 - Control positivo (C+)
 - Gotero con aceite mineral
- **Bionet Multi** (Reg. Sanitario 0037R2024 SSA)
 - Prueba en tira
 - Tubos con solución de corrimiento

REQUERIDOS PERO NO INCLUIDOS

- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Guantes de nitrilo
- Vortex
- Soporte magnético o imán de alta potencia
- Contenedor de RPBI
- Termobloque, baño seco o incubadora
- Solución salina isotónica (SSI)
- Vaso recolector para muestras de esputo

NOTA: Algunos de los reactivos/equipos pueden ser adquiridos en conjunto o por separado, para ello visite www.amunet.com.mx

Estabilidad y almacenamiento de los reactivos

- Almacene cada componente según lo indicado su etiqueta impresa.
- La prueba es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la bolsa.
- No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad.

Control de calidad

Un control interno está incluido en cada prueba de Bionet multi. Una línea de color aparece en la región control (C), este es el control interno del procedimiento, su función es confirmar que hubo suficiente cantidad de muestra y el procedimiento fue correcto. Esta prueba incluye controles, por lo que, se recomienda emplearlos en cada análisis de muestra como buena práctica de laboratorio.

Limitaciones

- Este kit no está diseñado para detectar todo el grupo de **Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC)**, principalmente detecta cualitativamente ADN de *Mycobacterium tuberculosis* basados en ensayos con la cepa H37Rv.
- Es posible detectar MTB viables como no viables con este kit.
- El desempeño de este kit puede mejorar en aquellas zonas con mayor prevalencia de MTB aunque es posible que no todas las cepas fármaco-resistentes sean identificadas en su totalidad.
- La ejecución e interpretación de los resultados de este kit deben ser realizados por personal debidamente capacitado.
- Esta prueba cualitativa no puede determinar el valor cuantitativo ni la tasa de aumento en la concentración de ADN de MTB.
- No utilice este kit para la detección de otros tipos de patógenos.
- Los resultados proporcionados por el kit TB-DxNet no deben usarse como único criterio para el diagnóstico o exclusión de la infección por MTB, para informar el estado de la infección, para ello complemente con antecedentes, información clínica y otros análisis.
- Los resultados negativos no descartan la infección por MTB, ya que la mayor sensibilidad esperada es de 120 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonia/mililitro) para MTB.

Características de presentación

Precisión Intra-ensayo

La repetibilidad se determinó empleando un lote del kit TB-DxNet empleando muestras de esputo y extrapulmonares negativas a las que se le añadieron las siguientes concentraciones de MTB: 360, 240 y 0 UFC/mL. Se extrajo el ADN de cada tipo de muestra y se realizaron 20 réplicas por cada concentración preparada, las muestras fueron correctamente identificadas el 99.99% de las veces.

Inter-Ensayo

La reproducibilidad se determinó con tres lotes del kit TB-DxNet empleando muestras de esputo y extrapulmonares negativas a las que se le añadieron las siguientes concentraciones de MTB: 360, 240 y 0 UFC/mL. Se extrajo el ADN de cada tipo de muestra y se realizaron un total de 20 réplicas por cada concentración preparada haciendo corridas de 5 en 4 días diferentes, las muestras fueron correctamente identificadas el 99.99% de las veces.

Reactividad cruzada

Se evaluó el desempeño del kit TB-DxNet con los microorganismos de la siguiente tabla obteniendo un resultado negativo.

Micobacterias		
<ul style="list-style-type: none"> • <i>M. fortuitum</i> • <i>M. kansasii</i> • <i>M. goodii</i> • <i>M. bovis</i> • <i>M. avium</i> • <i>M. avium paratuberculosis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>M. intracellulare</i> • <i>M. marinum</i> • <i>M. scrofulaceum</i> • <i>M. szulgai</i> • <i>M. triviale</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>M. fortuitum peregrinum</i> • <i>M. phlei</i> • <i>Rhodococcus equi</i> • <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> • <i>Nocardia asteroides</i>
Microorganismos de enfermedades respiratorias y otros		
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus pneumoniae</i> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Haemophilus influenzae</i> • <i>Moraxella catarrhalis</i> • <i>Klebsiella pneumoniae</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Legionella pneumophila</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Mycoplasma pneumoniae I y II</i> 	

Sustancias interferentes

Los siguientes compuestos han sido probados usando el kit TB-DxNet con muestras positivas y negativas de esputo y extrapulmonares sin observarse interferencia.

Endógenas	
<ul style="list-style-type: none"> • Sangre (1%) • Cloruro de sodio (5%) • Oximetazolina (15%) • Hemoglobina (100 mg/dL) • Hidróxido de magnesio (20 mg/mL) 	<ul style="list-style-type: none"> • Sorbitol (2.5%) • Glucosa (1%) • Cafeína (20 mg/dL) • Omeprazol (0.2 mg/mL) • ADN humano
Retrovirales y antibióticos	
<ul style="list-style-type: none"> • Emtricitabina • Lamivudina • Abacavir 	<ul style="list-style-type: none"> • Tenofovir • Ampicilina • Eritromicina
<ul style="list-style-type: none"> • Amoxicilina • Tobramicina • Azitromicina 	<ul style="list-style-type: none"> • Doxiciclina • Ertapenem

Desempeño clínico

Un total de 433 muestras fueron evaluadas con TB-DxNet y los resultados fueron confirmados por medio de cultivo, AFB Smear y Xpert (PCR). Al finalizar, ambas pruebas fueron comparadas, los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Prueba	Cultivo, AFB Smear y Xpert (PCR)			Total
	Resultados	Positivo	Negativo	
TB-DxNet	Positivo	249	10	259
	Negativo	6	168	174
	Total	255	178	433

Sensibilidad: 97.64% (IC95: 95.07%-98.86%)

Especificidad: 94.38% (IC95: 90.22%-96.86%)

IC: Intervalo de confianza

Beneficios

- **Rapidez:** Mayor ahorro de tiempo con una alta reproducibilidad.
- **Simple:** Fácil operación con procesos cortos y escalable.
- **Eficiencia:** Una sola metodología que engloba el procesamiento, detección y visualización de los resultados.
- **Seguridad:** Ningún producto químico de este kit es tóxico.
- **Versatilidad:** El ADN purificado con este kit es funcional no solo para su propio ensayo (LAMP) sino también para una gran variedad de aplicaciones como: PCR convencional y variantes, RPA, NGS, secuenciación con bisulfito entre otros.

Consideraciones adicionales

- a) *Inactive la muestra añadiéndole cloro al 3% una vez haya sido procesada.*
Nota: Solo utilice soluciones de cloro recién preparadas y no con anterioridad.
- b) Asegúrese de utilizar la cantidad indicada de muestra para la prueba, demasiada o muy poca muestra puede conducir a una desviación de los resultados.
- c) Al finalizar el procedimiento limpie toda el área con cloro al 3%, en caso de que no se pueda debe colocar toallas desechables previo a la realización del ensayo, luego depositarlas en el contenedor de RPBI al finalizar el ensayo.
- d) No intercambie reactivos de diferentes lotes ni use reactivos de otras pruebas disponibles comercialmente. Los componentes de esta prueba se combinan con precisión para un rendimiento óptimo.
- e) Se recomienda irradiar con luz UV las micropipetas por 15 minutos antes de su uso y si son limpiadas con cloro y etanol asegúrese de no dejar residuos.
- f) Utilice equipo de protección al trabajar las muestras.
- g) PRECAUCIÓN: Permita que los reactivos y las muestras se descongelen completamente antes de su uso. Regrese a su temperatura de almacenamiento después de su uso.
- h) PRECAUCIÓN: No deje abierto el contenedor de las pruebas Bionet multi, solo ábrala hasta su uso, la presencia de humedad puede afectar su desempeño.
- i) Evite interrupciones prolongadas de los pasos del ensayo. Asegure las mismas condiciones de trabajo para todos los tubos.
- j) Calibre las micropipetas con frecuencia para asegurar la precisión de la distribución de muestras/reactivos. Use puntas diferentes de micropipeta en cada muestra y reactivo para evitar contaminación cruzada.
- k) La prueba podría verse afectada por el polvo, reactivos químicos y/o sustancias como hipoclorito de sodio, ácidos, álcalis, etanol, etc. No realice el ensayo en presencia de estas sustancias y utilice puntas nuevas de preferencia con filtro.
- l) Todas las muestras de origen humano deben considerarse potencialmente infecciosas. El cumplimiento estricto de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) puede garantizar la seguridad del personal.
- m) Todos los productos de desecho generados por esta prueba deben disponerse de acuerdo a la NOM-087 vigente sobre el manejo de Residuos Biológico infecciosos.
- n) Coloque un tubo de 1.5-2 mL con 1 mL de agua destilada en el termobloque, baño seco o incubadora con la temperatura deseada a usar, espere 10 minutos y coloque un termómetro en el interior del tubo, si el termómetro indica la temperatura deseada a utilizar proceda a emplearlo para su ensayo. En caso contrario ajuste, espere y vuelva a medir hasta alcanzar la temperatura deseada.

Dudas, preguntas y consejos

- **¿Puedo utilizar muestras de ADN purificado con otros kits? R:** No, el ensayo LAMP puede verse inhibido por determinadas sustancias presentes en algunos buffers de elución incluidos en dichos kits, solo si puede eluir el ADN en el paso final en agua grado biología molecular o Tris-HCl 10 mM pH 8 es que será posible usar ese ADN independientemente del método utilizado.
- **¿Cuánto tiempo es viable si guardo a -20°C el ADN purificado con el producto MagnetiDNA? R:** Puede ser viable hasta dos años como máximo, si desea que sea viable por tiempo indefinido debe almacenarlo a -80°C. Evite realizar muchos ciclos de congelamiento y descongelamiento.
- **¿La toma de muestra (esputo o extrapulmonar) debe realizarse por un profesional de la salud? R:** Sí, el profesional debe estar debidamente capacitado para la toma de este tipo de muestra. De lo contrario los resultados pueden ser falsos negativos.
- **¿Por qué no debo llevarme las perlas magnéticas? R:** Las perlas magnéticas mantienen la unión de forma directa con el ADN que se desea extraer, si durante el proceso se llevan dichas perlas causará que el ADN obtenido sea muy poco y puede no ser funcional para el ensayo.
- **¿Cuándo puedo retirar el tubo de la gradilla magnética durante el proceso de extracción de ADN? R:** El imán de la gradilla magnética tiene la función de aglomerar todas las perlas magnéticas para hacer más sencilla la tarea de retirar el sobrenadante en cada uno de los pasos, por lo tanto, puede retirar el tubo una vez que haya retirado el sobrenadante indicado para agregar el siguiente reactivo.

- **¿Debo incluir controles cada vez que analizó una muestra? R:** Sí, los controles aseguran que el proceso llevado a cabo fue el correcto. Es por ello que puede esperar hasta obtener más muestras e ir extrayendo su ADN para su posterior uso en el ensayo LAMP.
- **¿Cómo puedo ser más eficiente al momento de realizar los ensayos? R:** Puede colocar los reactivos que comparten todos en vez de uno por uno como sucede con el reactivo diluyente del **paso tres**, pero no mezcle ya que eso lo hará cuando al final coloque la muestra o control con su respectivo cambio de punta de micropipeta para evitar reactividad cruzada.
- **¿Qué pasa si dejo mis tubos por más tiempo o temperatura indicada en el termobloque, baño seco o incubador? R:** El ensayo LAMP es sensible, en caso de que esto ocurra, los resultados obtenidos pueden verse afectados y será necesario repetir el ensayo y descartar esos tubos.

Referencias

1. World Health Organization., 2016. Global tuberculosis report.
2. Organización Mundial de la Salud. 2021. Tuberculosis.
3. Gómez-Tangarife, V. J., Gómez-Restrepo, A. J., Robledo-Restrepo, J., & Hernández-Sarmiento, J. M. (2018). Resistencia a Medicamentos en Mycobacterium tuberculosis: contribución de mecanismos constitutivos y adquiridos. Revista de Salud Pública, 20, 491-497.
4. Crofton J, Chaulet P, Maher D. Guidelines for the management of drug-resistant tuberculosis. Geneva, Switzerland. WHO 1997.
5. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. Cochrane Database Syst Rev. 2014 Jan 21;2014(1):CD009593. Doi: 10.1002/14651858.CD009593.pub3.
6. World Health Organization. 2016., The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: policy guidance.
7. R. Yadav, P. Daroch, P. Gupta, P. Agarwal, A.N. Aggarwal, S. Sethi. 2022. Diagnostic accuracy of TB-LAMP assay in patients with pulmonary tuberculosis...a case-control study in northern India. Pulmonology, Volume 28, Issue 6, 449-453.
8. Sambrook J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.
9. Dundass N., N. K. Leos, M. Mitui, P. Revell y B. B. Rogers. 2008. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. Journal of Molecular Diagnostics 10: 311-316.

Índice de símbolos

	Consultar el instructivo de uso
	Solo para evaluación de desempeño <i>in vitro</i>
	Rango de almacenamiento 2 – 8 °C
	No utilizar si el paquete está dañado
UPI	Uso para investigación

	Caducidad
REF	Número de catálogo
LOT	Número de lote
	No reutilizar