



GENES2LIFE

AdenoDetect 40-41

Kit para la detección de los adenovirus 40-41 mediante qPCR

RUO

Uso exclusivo en investigación científica

CATALOGO G2LAD40-01

M2IG2LA4

1. INDICACIÓN DE USO

AdenoDetect 40-41 es un kit para la detección de los adenovirus pertenecientes a los serotipos 40 y 41, a partir de ADN que puede ser extraído tanto de exudado faríngeo como de heces fecales humanas, obtenidas de acuerdo con los lineamientos establecidos por el InDRE en su documento “Lineamientos para la toma, manejo y envío de muestras para diagnóstico a la red nacional de laboratorios de salud pública”, “Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de la gastroenteritis viral: Rotavirus, Norovirus, Astrovirus y Adenovirus entéricos” o “Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de virus respiratorios”, según corresponda a la muestra.

Esta prueba está destinada para uso exclusivo en investigación científica.

VENTAJAS

- Cuenta con un control endógeno (RNAsa P) que permite evaluar la calidad de la muestra.
- Con este kit se pueden analizar muestras de ADN extraídas con todos los kits de extracción de ADN comerciales.
- Es compatible con todos los termocicladores para PCR tiempo real de 1 canal (FAM) disponibles en el mercado.
- No requiere de software adicional para la interpretación de los resultados.

2. INTRODUCCIÓN

Los Adenovirus son virus de ADN de doble cadena, con un tamaño alrededor de 90 – 100 nm. Existen más de 50 serotipos diferentes, capaces de generar enfermedades en los humanos. Los serotipos de adenovirus 40 y 41, pertenecientes al grupo de Mastadenovirus F, generalmente causan cuadros gástricos, con una sintomatología que incluye fiebre, diarrea, dolor abdominal y vómito; aunque también se pueden presentar síntomas respiratorios, estos suelen ser poco frecuentes.

Entre los métodos de detección para adenovirus empleados en muestras humanas podemos encontrar tinción mediante inmunofluorescencia (IF). Esta técnica está sujeta al espectro de detección de los anticuerpos y a la diversidad genética circulante en la región, por lo que este método puede generar resultados falsos negativos. Por otro lado, la detección mediante PCR permite el diseño de un método de detección específico contra las regiones más conservadas del genoma, lo que disminuye el riesgo de falsos negativos originados por las variaciones en la superficie viral.

Los adenovirus pertenecientes a los serotipos 40 y 41 comúnmente causan afectaciones gástricas. Aunque la enfermedad suele remitir alrededor de 10 días después del inicio de los síntomas, existen reportes de complicaciones fatales en algunos pacientes. La infección también puede presentarse asintómicamente.

3. PRINCIPIOS DE LA PRUEBA

AdenoDetect 40-41 ha sido diseñado para la detección y semi cuantificación *in vitro* del genoma de adenovirus pertenecientes a los serotipos 40 y 41. Los oligonucleótidos y sondas han sido diseñados para una hibridación y amplificación específicas de las secuencias genéticas de un fragmento de la región codificante para la proteína hexón.

AdenoDetect 40-41 aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa para hidrolizar la sonda unida a la secuencia de ADN complementaria durante la amplificación del ADN. El fluoróforo se separa entonces de la molécula atenuadora (*quencher*), provocando un aumento en el nivel de fluorescencia que es proporcional a la cantidad del ADN diana, el cual puede ser detectado por equipos de PCR tiempo real.

AdenoDetect 40-41 contiene todos los elementos (sondas, cebadores, dNTPS, solución tampón) para la detección de los marcadores de los virus en una reacción mediante qPCR, utilizando muestras de ADN humano. Las secuencias diana se detectan haciendo uso de los canales FAM (Adenovirus 40 y 41) en la Reacción 1 y FAM (RNAsaP humana) en la Reacción 2.

4. CONTENIDO

Cada kit incluye los reactivos necesarios para 120 pruebas, detallados en la Tabla 1.

Tabla 1. Reactivos proporcionados con el kit **AdenoDetect 40-41**.

Numero de Viales	Reactivos	Contenido por vial
1	ADetect 40-41 Primer Mix	500 µL
1	RNAsaP Primer Mix	500 µL
1	Buffer StarQ 5X	1 mL
1	Control sintético positivo C-ADetect 40-41	160 µL
2	Agua libre de nucleasas	1.5 mL

5. MATERIAL Y EQUIPO NO SUMINISTRADO

A continuación, se enlistan los materiales y equipos requeridos, pero no suministrados con el kit **AdenoDetect 40-41**.

- Equipo de PCR tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de ADN.
- Centrífuga para tubos de 1.5 ml.
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µl, 20-200 µl).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Tubos o placas para PCR tiempo real

6. INSTALACIÓN

Este producto no requiere instalación.

7. CONDICIONES DE TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO

Las condiciones de temperatura para transporte y almacenamiento del kit **AdenoDetect 40-41** son las siguientes:

- Evitar los ciclos de congelamiento descongelamiento.
- -20 °C durante el transporte.
- 2 a 4 °C cuando su uso es continuo durante un mismo día.
- -20 °C si el almacenaje es por periodos prolongados.

Importante. El control sintético positivo **C-ADetect 40-41** se puede almacenar a -20°C o a 4°C, perfectamente cerrado y etiquetado, en un área apartada de los reactivos para el montaje de la reacción de PCR. Evitar ciclos de congelamiento-descongelamiento.

8. PRECAUCIONES DE USO

- No utilizar el kit posterior a su fecha de caducidad.
- El flujo de trabajo debe ser unidireccional, iniciando siempre en el área de extracción y posteriormente pasar al área de amplificación y detección.
- Seguir las buenas prácticas de laboratorio, utilizando ropa protectora, guantes desechables, protectores de ojos y mascarilla o cubrebocas.
- Posterior a realizarse la prueba, lavar perfectamente las manos.

- Se recomienda descontaminar periódicamente los equipos utilizados habitualmente, especialmente las micropipetas, y las superficies de trabajo.
- La concentración del control sintético **C-ADetect 40-41** es considerablemente alta, por lo que se recomienda un manejo extremadamente cuidadoso para evitar la contaminación de los reactivos y áreas de trabajo. El control puede ser diluido en agua para obtener un mayor número de reacciones.
- Se recomienda emplear 5 µL de control por reacción.

9. PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

9.1. Pretratamiento

9.1.1. Extracción de ADN

Realizar la preparación de la muestra de heces fecales o de exudado faríngeo de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones del kit de extracción utilizado. **AdenoDetect 40-41** es compatible con la mayoría de los kits de obtención de ADN. Sin embargo, el rendimiento de los ensayos basados en la amplificación de qPCR depende de la cantidad y calidad de la muestra de ADN extraída. Los procedimientos de extracción de ADN deben estar calificados y validados para su recuperación y pureza antes de analizar las muestras. Una vez extraído el material, conserve la muestra residual y el extracto nucleico y almacénelos inmediatamente a -20 ° C, teniendo especial cuidado de no congelar / descongelar los extractos más de una vez antes de la prueba.

Algunos de los sistemas de extracción disponibles comercialmente que han demostrado generar ADN altamente purificado, cuando se siguen los procedimientos recomendados por el fabricante se encuentran enlistados en el apartado 11 de este manual.

9.2. Tratamiento

9.2.1. Protocolo PCR

9.2.1.1. Descongelar el primer mix **ADetect 40-41 Primer Mix**, RNAsaP Primer Mix, el Buffer StarQ 5X y homogenizarlos por inversión previo a su uso.

9.2.1.2. Mantener los reactivos en una gradilla fría (2 - 8 °C).

9.2.1.3. Realizar los cálculos correspondientes al número de reacciones necesarias, incluyendo el número total de muestras y controles positivos y negativos, para preparar una mezcla maestra (Master Mix) tomando como referencia la Tabla 2. En esta etapa sólo se mezclarán el **ADetect 40-41 Primer Mix**, Buffer StarQ 5X y Agua libre de nucleasas.

Tabla 2. Componentes del Master Mix por reacción de **AdenoDetect 40-41**

Componente	Volumen 1 rxn
ADetect 40-41 Primer Mix	4 µL
Buffer StarQ 5X	4 µL
Agua libre de nucleasas	7 µL
Templado	5 µL
Volumen total	20 µL

9.2.1.4. Una vez preparado el Master Mix de AdenoDetect 40-41 Primer Mix, preparar las reacciones para el control endógeno usando RNAsaP Primer Mix. Para ello, utilizar los mismos cálculos empleando ahora el RNAsaP Primer Mix en lugar de AdenoDetect 40-41 Primer Mix.

9.2.1.5. Dispensar 15 µL del Master Mix en los tubos o placas a utilizar. Al finalizar, añadir 5 µL de Agua libre de nucleasas a las reacciones previstas como control negativo (NTC). Se requieren al menos dos reacciones como control negativo (NTC), una que contenga AdenoDetect 40-41Primer Mix y otra con RNAsaP Primer Mix.

9.2.1.6. Llevar los tubos o placas al área asignada para agregar muestras. Agregar 5 µL de muestra por reacción. Cada muestra debe tener una reacción preparada con AdenoDetect 40-41 Primer Mix y otra preparada con RNAsaP Primer Mix. Al finalizar, llevar la placa o tubos al área asignada para la adición de controles sintéticos.

9.2.1.7. Añadir 5 µL de Control sintético positivo C-ADetect 40-41 a las dos reacciones destinadas como controles positivos, una con reacción preparada con AdenoDetect 40-41 Primer Mix y otra preparada con RNAsaP Primer Mix. Se debe incluir un control positivo y uno negativo en cada corrida.

9.2.1.8. Una vez preparadas las reacciones, programar en el termociclador el protocolo indicado en la Tabla 3

Tabla 3. Protocolo de qPCR para **AdenoDetect 40-41**

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización inicial	2 minutos	95 °C
45	Desnaturalización	10 segundos	95 °C
	Alineamiento y extensión (lectura de datos)	30 segundos	63 °C

La toma de datos debe ser llevada a cabo durante el paso de extensión (63°C) en el canal FAM. El protocolo es el mismo para ambas reacciones.

10. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Es indispensable el uso de controles positivo y negativo en cada ronda para validar los resultados obtenidos, comprobando la ausencia de señal en el control negativo y la correcta amplificación del control positivo. De igual manera, es importante verificar la correcta amplificación del marcador endógeno humano RNAsa P en cada una de las muestras con un Ct \leq 37, permitiendo validar de esta manera la calidad de la muestra. El análisis e interpretación de resultados de las muestras debe de realizarse con el software propio del equipo de qPCR en conjunto con la Tabla 4.

Tabla 4. Tabla de interpretación de datos.

Reacción 1 Adenovirus 40 y 41	Reacción 2 RNAsaP (Marcador endógeno)	Interpretación
FAM	FAM	
+	+	Control sintético positivo C-ADetect 40-41
+	+	Positivo a Adenovirus 40 o 41
(Ct \leq 39)	(Ct \leq 37)	
-	+	Negativo a Adenovirus 41
	(Ct \leq 37)	
±	-	Resultado no válido. La extracción no se realizó de forma correcta o el material genético se ha degradado
±	+	Resultado no válido. La extracción no se realizó de forma correcta o el material genético se ha degradado
	(Ct > 37)	

Si usted tiene preguntas acerca de la interpretación de los resultados del kit, por favor contáctenos mediante el correo ventas@genes2life.com

Importante: La amplificación se considera positiva si el valor de Ct es menor a 39 en el canal FAM (Adenovirus 40 y 41) en la Reacción 1 y un Ct menor a 37 en el canal FAM (RNAsaP humana) de la Reacción 2.

El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico realizadas por un profesional de la salud. Como ya se mencionó anteriormente, el correcto funcionamiento de la prueba depende de la cantidad y calidad de la muestra de ADN extraída. Una forma inadecuada de recolección, transporte y/o almacenaje de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.

11. EQUIPOS Y KITS COMPATIBLES

TERMOCICLADORES	MODELO
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep well Real-Time PCR Detection System
Blackstar 96	Q2000C

NOMBRE DE KIT	CATÁLOGO	MARCA
QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit	51604	QIAGEN
QIAamp DNA Mini Kit	51304	QIAGEN
Stool DNA Isolation Kit	27600	NORGEN BIOTEK
Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Microprep	D6012	ZYMO RESEARCH

12. REFERENCIAS

- Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de virus respiratorios. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE), 2021. Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/647390/LVL_Virus_respiratorios.pdf
- Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de la gastroenteritis viral: Rotavirus, Norovirus, Astrovirus y Adenovirus entéricos. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE), 2020. Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/538724/Lineamientos_Rotavirus_270220.pdf
- Lineamientos para la toma, manejo y envío de muestras para diagnóstico a la red nacional de laboratorios de salud pública. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE), 2020. Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/558702/Lineamientos_TM_EM_2020_180620.pdf
- Weidner, A. S., Panarelli, N. C., Rennert, H., Jessurun, J., & Yantiss, R. K. (2016). Immunohistochemistry Improves the Detection of Adenovirus in Gastrointestinal Biopsy Specimens From Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *American journal of clinical pathology*, 146(5), 627–631.
- Bowles, N. E., Ni, J., Kearney, D. L., Pauschinger, M., Schultheiss, H. P., McCarthy, R., Hare, J., Bricker, J. T., Bowles, K. R., & Towbin, J. A. (2003). Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. Evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(3), 466–472.
- Adenoviruses – Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 15 de Mayo del 2022. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/adenovirus/index.html>
- Brown, M., Petric, M., & Middleton, P. J. (1984). Diagnosis of fastidious enteric adenoviruses 40 and 41 in stool specimens. *Journal of clinical microbiology*, 20(3), 334–338.
- Calicó Bosch, I. Diagnóstico de las infecciones por adenovirus. Control Calidad SEIMC. Recuperado de: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/viromicromol/adenovirus.pdf>

13. SIMBOLOGÍA

RUO

Uso exclusivo en
investigación
científica

LOT

Lote



Caducidad



Instructivo de
uso



Rango de
temperatura

REF

Número de
catálogo



Hecho en México por Genes2Life S.A.P.I de C.V.
Boulevard Euquerio Guerrero N° 278,
Colonia Tabachines, C.P. 36615
Irapuato, Guanajuato, México.
Tel. (462) 635 2718



M2IG2LA4