

1. DESCRIPCIÓN DEL PATÓGENO

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria que se encuentra comúnmente en el intestino de los seres humanos y animales de sangre caliente y la mayoría de las cepas son inofensivas. Sin embargo, algunas cepas, como la *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7, pueden causar brotes graves transmitidos por los alimentos que causan diarrea, fiebre y vómitos en los seres humanos.

E. coli O157:H7 se reconoce por su antígeno somático (pared celular) (O157) y su antígeno flagelo (H7). Además, se sabe que *E. coli* O157:H7 produce toxinas similares a Shiga, que causan síntomas graves.

El reservorio de este patógeno parece ser principalmente ganado vacuno, además de otros como rumiantes, mamíferos y aves.

E. coli O157:H7 se transmite a los seres humanos principalmente a través del consumo de alimentos contaminados, como por ejemplo, carnes picadas crudas o poco cocinadas y leche cruda. La contaminación fecal del agua y otros alimentos y la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos (con carne de vacuno y otros productos cárnicos, superficies contaminadas y utensilios de cocina) también provocará infección.

2. USO PREVISTO

Condagene[®] *E. coli* O157:H7 / O157 es un kit para la detección de *E. coli* patógena O157 y permite la detección simultánea del ADN del serotipo O157:H7 en una PCR en tiempo real basada en el uso la tecnología TaqMan proporciona un resultado sencillo, fiable y rápido para la detección de infección por *E. coli* O157:H7 / O157. El kit incluye un Control Interno (IC). El IC se utiliza para la evaluación de los inhibidores de la PCR en la muestra, o para la evaluación de los problemas que se produjeron durante la preparación/amplificación de la PCR. El kit incluye la Master Mix para la diana y el IC, los cebadores y las sondas TaqMan[®], etiquetados con enriadores no fluorescentes. La señal para la detección de los objetivos se detecta en los canales FAM (*E. coli* O157) y HEX / VIC (serotipo H7), y la del IC en el canal ROX. El kit contiene uracilo-ADN glicosilasa (UDG), que previene la contaminación del ADN con productos de PCR. En el kit también se incluye un control positivo, que permite evaluar los cebadores y las sondas utilizados para detectar las dianas, y un control negativo (agua sin nucleasa), para confirmar la integridad de los reactivos del kit.

El kit se validó en los instrumentos ABI PRISM[®] 7500 Fast. El kit es compatible con todos los termocicladores que funcionan en los canales **FAM**, **JOE / VIC** / **HEX** y **ROX**. El kit de detección no debe utilizarse en los procedimientos de diagnóstico. Para uso exclusivo alimentario.



3. MARCAS REGISTRADAS Y DESCARGO DE RESPONSABILIDAD

No debe considerarse que los nombres registrados, las marcas comerciales, etc., utilizados en este documento, incluso cuando no estén específicamente indicados como tales, están desprotegidos por la ley. Se pueden solicitar a Condalab o al distribuidor local los folletos de los kits y los manuales de usuario de Condalab.

4. ACUERDO DE LICENCIA LIMITADA

El uso de este producto significa el acuerdo de los siguientes términos: El kit debe utilizarse únicamente conforme a las instrucciones de uso respectivas. Condalab no concede ninguna licencia sobre su propiedad intelectual para usar o incorporar los componentes incluidos en este kit con componentes que no estén incluidos en este kit, salvo lo descrito en las instrucciones de uso. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no pueden reutilizarse, reacondicionarse ni revenderse.

5. CONTROL DE CALIDAD

De acuerdo con la norma ISO 9001, cada lote del kit se analiza conforme a especificaciones predeterminadas, para garantizar que la calidad del producto sea uniforme.

6. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Los procedimientos de biología molecular, como las extracciones de ADN y la amplificación mediante PCR, requieren que intervenga personal cualificado que evite el riesgo de que se generen resultados erróneos, especialmente a causa de la contaminación de las muestras o la degradación de los ácidos nucleicos presentes en ellas. Es muy aconsejable contar con áreas, materiales y equipos específicos para la extracción de ADN, la preparación de la PCR y los procedimientos posteriores a la PCR. En el laboratorio, el flujo de trabajo debe avanzar de manera unidireccional, comenzando en el área de Extracción y pasando al área de Amplificación y Detección.

- El usuario siempre debe prestar atención a lo siguiente:
- Antes de ejecutar el ensayo, lea todas las instrucciones proporcionadas.
- No mezcle reactivos de diferentes lotes.
- Use un EPP adecuado, incluyendo guantes desechables y batas de laboratorio.
- Conserve y extraiga el material positivo por separado de todos los demás reactivos.

7. CONTENIDOS Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

El kit debe conservarse a entre -20 °C y 5 °C y protegerse de la exposición a la luz. Deben evitarse las descongelaciones y congelaciones repetidas (>5), ya que esto puede reducir la sensibilidad. Considere congelar en alícuotas para mantener la eficacia del ensayo.

El kit contiene reactivos para 100 reacciones.

Contenido	Unidades	Composición
Master Mix (tapón azul)	● 2 tubos (2 x 683 µl)	Tampón, dNTPs, Cebadores y sondas
Enzimas (tapón amarillo)	● 1 tubo (1 x 220 µl)	ADN polimerasa, UDG y tampón de conservación
Control negativo (tapón transparente)	○ 1 tubo (1 x 130 µl)	Agua sin nucleasa
Control positivo (tapón rojo)	● 1 tubo (1 x 130 µl)	ADN diana

8. MATERIALES NECESARIOS Y NO SUMINISTRADOS

- Microcentrífuga
- Cabinas de flujo de aire laminar / cabinas de PCR
- Guantes de nitrilo
- Micropipetas y puntas de filtro sin nucleasa
- Termociclador Real Time
- Tubos/tiras/placas de múltiples pocillos y accesorios específicos de cada instrumento
- Tampón de lisis / kit de extracción de ADN

9. PROCEDIMIENTO

9.1. ENRIQUECIMIENTO / extracción de ADN

Es recomendable realizar un preenriquecimiento según la norma ISO/TS 13136 o las colonias aisladas de *E. coli*.

9.2. Extracción de ADN

Utilice un kit o un protocolo adecuado para extraer el ADN. Como Condagene® Complex Extraction Kit (6500), Condagene® Extraction Rapid (6504-6505) o Condagene® Extraction Column (6506-6507).

9.3. Preparación de la PCR

A: Mezcla para PCR

Siempre use guantes en todos los procedimientos de PCR.

1. Descongele las soluciones del kit. Mezcle bien (no agite con el vórtex las enzimas del tubo) y centrifugue brevemente.
2. Prepare las reacciones como se describe a continuación:

Contenido	N.º de muestras
Reacción qPCR	1 10 (10 + 1)
Master Mix	13 µl 143 µl
Enzimas	2 µl 22 µl
Volumen total	15 µl 198 µl

Nota: Prepare la reacción PCR para cada muestra, o bien, prepare una Master Mix que cubra el número total de reacciones más el 10 % adicional (por ejemplo, si son 10 muestras, prepare un volumen para 11). En este caso, prepare la mezcla en un tubo de 1,5 ml estéril y sin nucleasa. Incluye 2 reacciones PCR para los controles positivos y negativos.

3. Mezcle la mix preparada invirtiendo el tubo y centrifugando brevemente.
4. Vierta alícuotas de 15 µl de la mix preparada en los pocillos de las placas o el tubo de PCR.
5. Para el control negativo, pipetee 5 µl del tubo de Control Negativo (tapón transparente); pipetee 5 µl de la muestra de ADN por cada pocillo; y para el control positivo, pipetee 5 µl del tubo de Control Positivo (tapón rojo). Cada tubo de PCR / pocillo debe tener un volumen de PCR final de 20 µl.
6. Centrifugue brevemente los pocillos de las placas o los tubos de PCR.
7. Coloque las reacciones en el instrumento de PCR en tiempo real.

B: Configuración del programa

Prepare el instrumento de PCR en tiempo real conforme al siguiente programa de temperatura/tiempo:

FASE	TEMPERATURA	CICLOS	TIEMPO
Incubación	37 °C.	1	15 min
Inactivación UDG	95 °C.	1	5 min
Amplificación de ADN	94 °C.	45	15 s
	60 °C.		30 s
	62 °C.		15 s

Volumen de muestra: 20 µl

Formato de detección: Sonda de hidrólisis

Colorante de referencia pasivo: Ninguna

Diana	Canales
Detección de <i>E. coli</i> O157	FAM
Detección de H7	VIC
Detección del control interno (IC) ROX	

10. ANÁLISIS DE DATOS

Para analizar los resultados de la PCR, seleccione las opciones de visualización de la fluorescencia. Las muestras que arrojan valores positivos del umbral de ciclos (Ct) se consideran positivas. Importante: También compruebe las curvas de amplificación, no solo los valores de Ct. Las muestras deben inspeccionarse tanto a escala logarítmica como a escala lineal y compararse con el control negativo. Si es necesario, ajuste el umbral. Los resultados de la muestra deben evaluarse después de que los controles positivos y negativos hayan sido examinados y se haya determinado que son válidos. Si los resultados de los controles no son válidos, los resultados de la muestra no se podrán interpretar. Interpretación de los datos de PCR:

a) Controles

Para validar el ensayo, los controles deben tener los siguientes resultados:

	Detección de <i>E. Coli</i> O157 con FAM	Detección de H7 CON VIC	Detección de IC con ROX
Control negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Control positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Tenga en cuenta que, si los controles no coinciden con estos resultados, el experimento deberá repetirse.

b) Muestras

La interpretación de los resultados de las muestras se resume en la siguiente tabla:

Detección de <i>E. Coli</i> O157 con FAM	Detección de H7 VIC	Detección de IC con ROX	Interpretación
Positivo	Positivo	Positivo/negativo**	Se detectó ADN, muestra positiva en <i>E. coli</i> O157:H7
Negativo	Negativo	Positivo	No se detectó ADN, muestra negativa en <i>E. coli</i> O157:H7
Positivo	Negativo	Positivo/negativo**	Se detectó ADN, muestra positiva en <i>E. coli</i> O157
Negativo	Positivo	Positivo/negativo**	Se detectó ADN, muestra positiva en H7
Negativo	Negativo	Negativo	El resultado no es válido*

*Si la detección de E. coli y del IC son negativas, significa la presencia de inhibidores de PCR en la muestra. Diluya la muestra o realice otra extracción de ADN.

**La alta concentración de ADN diana en la muestra puede provocar Señal de fluorescencia reducida o inexistente del IC.

Cuadro 1 Exclusividad e inclusividad del Condagene® E. coli O157:H7 / O157

Fase	Paso	Temperatura	Resultado temporal del Kit Condagene		Comparación de resultados
			O157	H7	
MB 113	<i>Escherichia coli</i> serotipo O6, biotipo 1		NEG	NEG	Coincidente
MB 132	<i>Escherichia coli</i> O157:H7		POS	POS	Coincidente
MB 189	<i>E. coli</i>		NEG	NEG	Coincidente
MB 190	<i>E. coli</i>		NEG	NEG	Coincidente
MB 239	<i>E. coli</i>		NEG	NEG	Coincidente
MB 240	<i>Escherichia coli</i> O157:H7		POS	POS	Coincidente
MB 260	<i>Escherichia coli</i> O157, stx-		POS	NEG	Coincidente
MB 264	<i>Escherichia coli</i> BLSE+		NEG	NEG	Coincidente
MB 265	<i>Escherichia coli</i> O157		POS	NEG	Coincidente
MB 358	<i>Escherichia coli</i> O157:H7, eae +		POS	POS	Coincidente
MB 607	<i>E. coli</i>		NEG	NEG	Coincidente
MB 619	<i>Escherichia coli</i> O145		NEG	NEG	Coincidente
MB1027_A	<i>Escherichia coli</i> O26		NEG	NEG	Coincidente
MB1027_B	<i>Escherichia coli</i> O11		NEG	NEG	Coincidente
MB1028_A	<i>Escherichia coli</i> O103		NEG	NEG	Coincidente
MB1028_B	<i>Escherichia coli</i> O145		NEG	NEG	Coincidente
SO 673	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	EQC *- PHE	POS	POS	Coincidente
SO 674	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	EQC *- PHE	POS	POS	Coincidente
M223D11A	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	EQC* - FAPAS	POS	POS	Coincidente
M223D11B	<i>E. coli</i> / <i>P. putida</i> / <i>C. freundii</i>	EQC *- FAPAS	NEG	NEG	Coincidente
SO 697	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	EQC* - PHE	POS	POS	Coincidente

11. ESPECIFICIDAD/INCLUSIVIDAD

- a) 100 % de exclusividad, determinada utilizando 13 cepas de organismos estrechamente relacionados o que se encuentran en el mismo hábitat, incluyendo *E. coli* no patógena y otros serotipos de *E. coli* (Tabla 1).
- b) 100 % de inclusividad, determinada en 9 cepas de *E. coli* O157:H7 y *E. coli* O157 (Tabla 1).

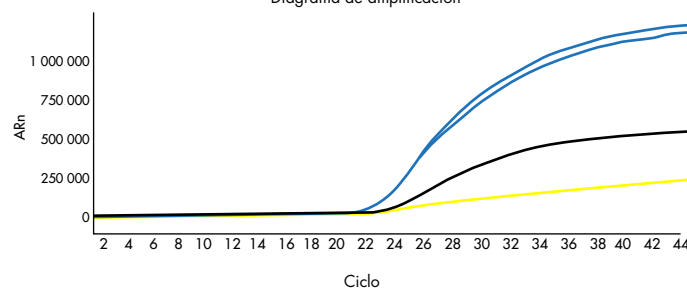
12. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se puede alcanzar un límite de detección de 1 a 10 células por cada 25 g de muestra de alimento, tras el enriquecimiento. El Condagene® *E. coli* O157:H7 / O157 tiene una sensibilidad de reacción de 1 pg de ADN diana.

Condalab
Laboratorios Conda S.A.
C/ Forja, 9. Torrejón de Ardoz
28850 Madrid, España
T. +34 91 761 02 00

Control positivo

Diagrama de amplificación



Control negativo

Diagrama de amplificación

