

para la detección rápida e inequívoca de *Cronobacter* spp. por PCR a tiempo real

## INTRODUCCIÓN

El género *Cronobacter* (antiguamente clasificado como *Enterobacter sakazakii*) pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae* e incluye varias especies de bacilos gramnegativos. Las especies de *Cronobacter* se consideran patógenos emergentes, relacionados con brotes de meningitis, septicemia y enterocolitis necrotizante, especialmente en neonatos y niños. La tasa de mortalidad de estos brotes es alta, entre el 20 y el 80%, pero además los supervivientes suelen sufrir severos trastornos neurológicos. Aunque se encuentra en diversos alimentos, el de mayor riesgo para la salud son las fórmulas infantiles en polvo.

Cronofast COMPLET ofrece una solución integral que permite la detección rápida por PCR a tiempo real de todas las especies del género *Cronobacter* con unos niveles de fiabilidad, sensibilidad y especificidad inmejorables. Cronofast COMPLET se basa en un primer paso de extracción de ADN con el tampón de lisis DNAREady seguida de la detección con Cronofast de una diana genética específica para esta bacteria, cuya elevada conservación a nivel de secuencia la diferencia de otros marcadores comúnmente usados. Esta característica, junto con la inclusión de un control interno de amplificación (IAC), prácticamente elimina la posibilidad de obtener falsos negativos.

EL USO DE REACTIVOS EN MAL ESTADO PUEDE CONDUCIR A RESULTADOS ERRÓNEOS O POCO FIABLES. POR FAVOR, COMPRUEBE LOS REACTIVOS ANTES DE USARLOS.

## PRINCIPIO

DNAREady es un tampón de lisis de nueva generación, desarrollado específicamente para extraer de forma rápida el ADN de una suspensión bacteriana, como por ejemplo un enriquecimiento en Agua de Peptona Tamponada, permitiendo su posterior amplificación por PCR a tiempo real. El protocolo recomendado para DNAREady está optimizado para obtener el mayor rendimiento con el menor número de pasos posible, tanto en bacterias gramnegativas como grampositivas, eliminando la mayor parte de los inhibidores que puedan estar presentes en las suspensiones bacterianas sin la necesidad de realizar largos y tediosos pasos de purificación en columna.

Cronofast se basa en la amplificación por PCR a tiempo real de un gen diana con secuencia específica para detectar todas las especies del género *Cronobacter*. Una amplificación positiva indica la presencia de estas bacterias en la muestra. Cronofast también puede utilizarse para confirmar colonias aisladas en placa.

## COMPONENTES

### DNAREady

El tampón de lisis DNAREady contiene sales y agentes desestabilizadores de membrana necesarios para permitir la disgregación celular y la estabilización del material genético liberado.

### Mix de Reacción Cronofast

La Mix de Reacción contiene tampón, dNTPs, DNA polimerasa Hot-Start, agua estéril bidestilada libre de ácidos nucleicos y MgCl<sub>2</sub> en proporciones y cantidad suficiente para el número de reacciones indicado en la caja. Esta Mix de Reacción incorpora un control interno de amplificación (IAC) cuya detección indicará la ausencia de inhibidores. Los primers y sondas necesarios para la amplificación tanto del IAC como del gen diana de *Cronobacter* spp. están también incorporados en la mezcla de reactivos. La sonda de detección de *Cronobacter* spp. está marcada con el fluorocromo FAM, mientras que la sonda de detección del IAC está marcada con el fluorocromo JOE.

La Mix de Reacción no contiene ROX. Omitir el uso de este fluoróforo en las opciones del software de equipos que habitualmente funcionen con ROX como sistema de referencia pasiva, o bien añadir ROX a la concentración especificada por el equipo.

## CONSERVACIÓN

### DNAREady

Conservar a 4°C o a -20°C indistintamente. Evitar congelar/descongelar repetidamente.

### Mix de Reacción Cronofast

Conservar a -20°C. Para uso frecuente se puede conservar a 4°C durante 4 semanas. Evitar congelar/descongelar repetidamente. Evitar exponer la Mix de Reacción a la luz directa.

## PROTOCOLO

### PREPARACIÓN DE LA MUESTRA CON DNAREADY

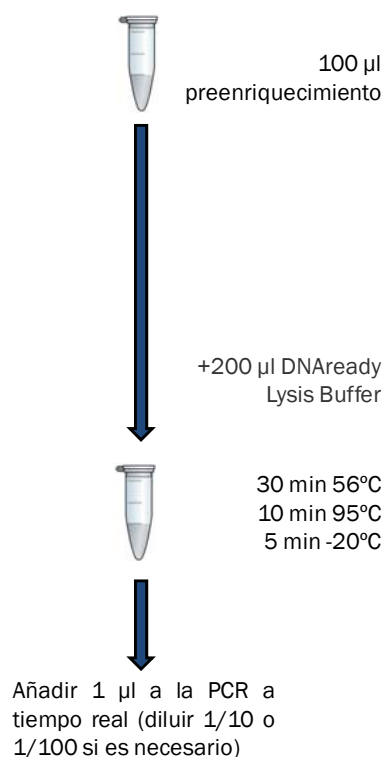
Antes de empezar preparar incubadores de temperatura a 56°C y 95°C. Usar guantes durante todo el proceso.

- Para fórmulas infantiles: Retirar 100 µl del enriquecimiento. Alternativamente, seguir el protocolo estándar y centrifugar 1 ml del enriquecimiento de la muestra durante 5 minutos a 10.000 g, y descartar el sobrenadante.
- Añadir 200 µl de DNAREADY Lysis Buffer. Pipetear o agitar con el vórtex hasta conseguir una mezcla homogénea, o disolver completamente el pellet.
- Incubar 30 minutos a 56°C.
- Incubar 10 minutos a 95°C
- Incubar 5 minutos a -20°C.
- Proceder a realizar la PCR a tiempo real con el kit Cronofast de Microbial usando 1 µl del extracto de ADN resultante. DNAREADY Lysis Buffer se encargará de inactivar los inhibidores de la PCR permitiendo una correcta reacción de amplificación. El ADN extraído puede conservarse a 4°C o -20°C hasta su uso.

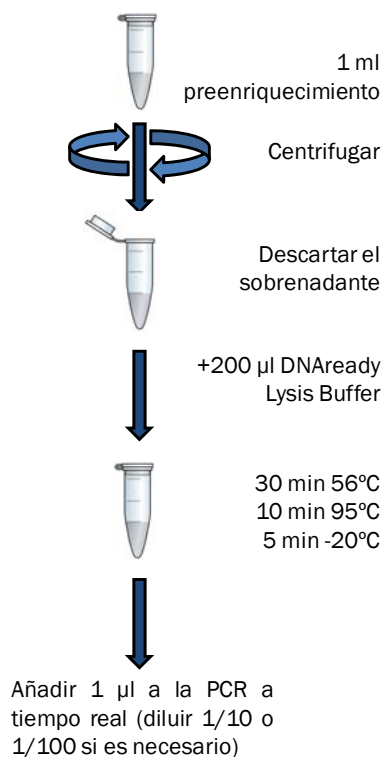
\* En caso de enriquecimientos con gran cantidad de sólidos en suspensión es aconsejable no agitar el extracto final para no resuspender partículas, pues podrían contener inhibidores que dificultarían la reacción de amplificación.

\* Para determinadas muestras es aconsejable realizar una dilución 1/10 o 1/100 antes de la PCR a tiempo real.

#### Protocolo recomendado para fórmulas infantiles



#### Protocolo estándar DNAREADY Lysis Buffer



**Nota:** DNAREADY ha sido testado satisfactoriamente en enriquecimientos bacterianos a partir de un gran número de matrices, como por ejemplo, leche, carne picada, lechuga, mojama, platos precocinados, salmón ahumado, helados, mayonesa, huevos, zumos, frutas, pescados y chocolate. No obstante, ciertas matrices pueden dar algunos problemas. En caso que no se observe amplificación (ni del detector ni del control interno de amplificación) ni diluyendo la muestra, repetir la extracción de ADN con un método que incluya pasos de purificación en columna o similar. DNAREADY no se recomienda para extraer ADN de bacterias sin realizar un paso previo de enriquecimiento.

### RECOMENDACIONES

Como medida preventiva, en caso de enriquecimientos con gran cantidad de sólidos en suspensión, puede ser muy recomendable el uso de bolsas stomacher con filtro a fin de evitar, o al menos reducir, la presencia de partículas que puedan inhibir la PCR.

Las matrices con grasas o con presencia de agentes antimicrobianos suelen ser problemáticas al interferir en el enriquecimiento de las bacterias a detectar. En estas situaciones se puede aumentar el tiempo de crecimiento, realizar un segundo paso de enriquecimiento selectivo o, en el caso específico de matrices con alto contenido en grasa, realizar el enriquecimiento añadiendo Tween 80 al 10%.

## DETECCIÓN POR PCR A TIEMPO REAL CON CRONOFAST

- Pipetear 19 µl de la Mix de Reacción a cada uno de los tubos o pocillos de la placa de PCR. Realizar esta operación preferentemente en un entorno protegido o dentro de una cabina y sin excesiva luz ambiental.
- Añadir a cada tubo o pocillo de la placa 1 µl del extracto de ADN o los controles blanco (también llamado “non template control”, NTC) o positivo según corresponda.
- Introducir los tubos o la placa en el bloque del termociclador a tiempo real. Seleccionar la lectura de fluorescencia para los fluorocromos JOE y FAM. Realizar la amplificación según el siguiente programa:

Paso	Evento	Temperatura	Tiempo
1	Activación de la ADN polimerasa y desnaturalización del ADN	95 °C	10 minutos
2 (35 ciclos)	Desnaturalización Annealing/Extensión	95 °C 60 °C	15 segundos 1 minuto *

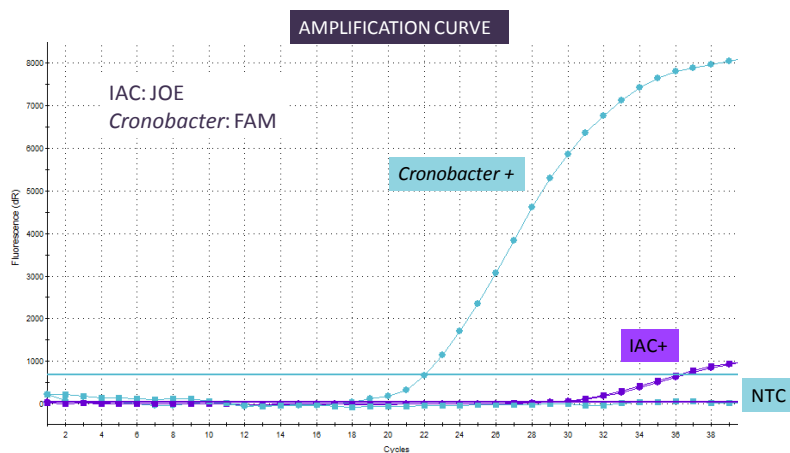
\*Realizar la lectura de fluorescencia en el Paso 2 al final de cada ciclo de Annealing/Extensión a 60°C.

- Leer resultados.

## CONTROL DE REACCIÓN

Se recomienda realizar al menos un control blanco (añadiendo 1 µl de agua estéril libre de ácidos nucleicos en lugar de ADN) y un control positivo (usando el PCR Positive Control SLCC de Microbial o ADN genómico de *Cronobacter*) cada vez que se realice una determinación.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS



Un resultado se considerará positivo cuando la fluorescencia correspondiente a *Cronobacter* (FAM) supere el valor umbral.

Un resultado sólo se considerará negativo cuando la fluorescencia de *Cronobacter* no supere el valor umbral pero sí lo haga la fluorescencia del IAC (JOE).

**Nota:** La cantidad de fluorescencia obtenida depende de cada fluorocromo, siendo generalmente mayor la fluorescencia del FAM y menor la del JOE. Generalmente, la fluorescencia del IAC supera el valor umbral entre los ciclos 28 y 31, en función de las características del software del equipo.

Consultar la *Guía de interpretación de resultados* [http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia\\_interpretacion\\_resultados\\_SPAv2.pdf](http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia_interpretacion_resultados_SPAv2.pdf) para más información

## PRESENTACIÓN

Cronofast COMPLET se presenta en cajas de 50, 100 o 500 reacciones.

## MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS EN EL KIT

- Pipetas automáticas o de desplazamiento positivo y puntas con filtro.
- Guantes de un solo uso libres de polvo.
- Microcentrífuga.
- Estufa o Incubadores de temperatura a 56°C y 95°C.
- Termociclador a tiempo real y tubos o placas de PCR.

## PRECAUCIONES

1. Las zonas del laboratorio de extracción y de amplificación del ADN, así como los materiales, instrumentación y reactivos, NO se deben usar para otras actividades y no se deben transferir de una zona a otra. Los guantes usados en una zona no se deben usar en otra zona.
2. Se deben seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio con el fin de obtener resultados fiables con esta técnica. La elevada sensibilidad de este test requiere un cuidado extremo para mantener la pureza de todos los reactivos. Descartar todos los reactivos sospechosos.
3. Los ácidos nucleicos son muy sensibles a la degradación por nucleasas, que están presentes tanto en la piel humana como en las superficies que han estado en contacto con ella. Limpiar las superficies con los reactivos adecuados, usar guantes de un solo uso sin polvo y una bata de laboratorio mientras se realiza el test. Lavarse las manos después de realizar el test.
4. Este test ha sido validado usando los reactivos proporcionados en Cronofast. El uso de otros métodos de amplificación o cualquier cambio en el protocolo podrían dar lugar a resultados erróneos. NO INTERCAMBIAR LOS COMPONENTES de diferentes lotes.
5. No usar el producto después de su fecha de caducidad. Conservar los componentes en las condiciones indicadas.
6. El uso de este producto está limitado a personal cualificado con experiencia en técnicas de extracción y amplificación de ADN.
7. Este test solamente puede ser utilizado para investigar la presencia de *Cronobacter* spp. en muestras de agua, alimentarias o para otros propósitos relacionados con la I+D. No usarlo en ningún caso para diagnóstico en muestras clínicas.
8. A nivel teórico, los primers y sondas que incluye Cronofast no detectan otras bacterias. Además, se han realizado ensayos con un amplio rango de bacterias y no se han observado reacciones cruzadas. Sin embargo, no se han realizado análisis con todas las bacterias que se pueden encontrar en muestras ambientales.

## SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	CAUSA	SOLUCIÓN
No aparece ninguna señal específica para el IAC ni para <i>Cronobacter</i> .	Inhibición de la PCR.	Realizar una dilución 1:10 y 1:100 de la muestra y repetir el análisis o usar un kit de purificación de ADN para eliminar los inhibidores.
	Mala conservación de la Mix de Reacción.	Conservar la Mix de Reacción a la temperatura recomendada y evitar el contacto directo con la luz. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la caja.
Aparece señal específica para <i>Cronobacter</i> pero no se detecta señal para el IAC.	Amplificación preferencial del ADN de <i>Cronobacter</i> debido a un elevado número de copias de este ADN en la muestra.	La reacción es correcta y positiva para <i>Cronobacter</i> .
Se detecta una señal específica para <i>Cronobacter</i> en los tubos que contienen el control blanco.	Contaminación del material o de los reactivos.	Repetir el análisis con reactivos frescos y las pipetas limpias. Lavar las superficies con lejía al 10% o equivalente.
		Repetir la extracción y el análisis con un tubo nuevo de Cronofast.  Si la contaminación persiste contactar con el Departamento Técnico.
Se detecta una señal específica para <i>Cronobacter</i> en los tubos que contienen el control blanco y no se detecta señal para el IAC.	Contaminación del material o de los reactivos y amplificación preferencial del ADN de <i>Cronobacter</i> debido a la presencia de un elevado número de copias de este ADN o a un problema con la amplificación del IAC.	Si otros tubos presentan una amplificación positiva del IAC, descartar un problema de amplificación del IAC.  Repetir el análisis con reactivos frescos, pipetas limpias y las superficies lavadas con lejía al 10% o equivalente.
No aparece señal específica para <i>Cronobacter</i> ni para el IAC en los tubos de control positivo.	Si no hay señal para el IAC: mala conservación de la Mix de Reacción.	Conservar la Mix de Reacción a la temperatura recomendada y evitar el contacto directo con la luz. Repetir el análisis.
	Si se detecta señal para el IAC: error de pipeteo o degradación del control positivo.	Repetir el análisis asegurando que un control positivo adecuado se añade a los tubos correspondientes.

Para cualquier consulta adicional o problema póngase en contacto con el departamento técnico de Microbial.

<http://www.microbial-systems.com>  
[info@microbial-systems.com](mailto:info@microbial-systems.com)