

### <u>Introducción</u>

Edwardsiella tarda, es un agente bacteriano Gram (-) que ha sido reportado y aislado en especies de tilapia, híbridos y algunos siluriformes, en estado silvestre y sistemas de producción en diferentes regiones, como: África, Asia, Estados Unidos y Sudamérica. En los casos donde la presencia de la bacteria está asociada con la enfermedad, los signos clínicos usualmente incluyen septicemia, razón por la cual la infección es conocida como edwarsiellosis o edwardsiella septicémica. La infección se manifiesta por pequeñas lesiones cutáneas que progresan a abscesos dentro del músculo, internamente es evidente una congestión generalizada similar a otras septicemias bacterianas, hemorragias, necrosis e inflamación de órganos en la forma aguda. Mientras en la fase crónica es más evidente una dermatitis necrótica-ulcerativa y hemorrágica severa.

Las infecciones de origen bacteriano en organismos acuáticos, usualmente involucran diferentes agentes, es común evidenciar co-infecciones que involucran diferentes agentes (*Aeromonas hydrophila, Streptococcus agalactiae, S. iniae*), usualmente por la diferencias metabólicas entre los agentes, es complejo el aislamiento e identificación por métodos microbiológicos convencionales, donde prevalece la de mayor crecimiento. La identificación precisa del agente requiere de métodos de detección específica, libre de cultivo como la Reacción de la cadena de la Polimerasa (PCR o qPCR)

Es considerado un problema zoonótico causando enfermedad entérica compleja en humanos, por ello, el monitoreo de las condiciones de salud de los animales y el producto final es clave para garantizar un producto sin riesgos para el consumidor final

### <u>Principio</u>

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) funciona permitiendo la amplificación de un fragmento de interés del ADN total de un microorganismo o patógeno particular. Inicialmente se parte de una muestra de ADN y posteriormente es amplificada sucesivamente en una reacción de PCR.

En el caso de este kit, la amplificación es detectada mediante el uso de sondas que reportan dicha amplificación. Estas sondas se basan en la tecnología de un fluoróforo emisor y un tinte represor o *quencher*.

En este kit, usted cuenta con todos los componentes necesarios para llevar a cabo las reacciones. Adicionalmente, cuenta con un control positivo (CP) que permite comprobar el funcionamiento de las reacciones de PCR.

Este kit emplea una combinación de sonda que reportan en el canal verde de detección en su termociclador. A saber, estas sondas son:

| Canal Detección        |                 |  |
|------------------------|-----------------|--|
| Verde                  | FAM             |  |
|                        | Fluorescein     |  |
| Excitación (nM) 470±10 | EvaGreen®       |  |
| Detección (nM) 510±5   | Alexa Fluor 488 |  |

El presente kit fue validado en la plataforma Rotor-Gene Q (Qiagen), pero su desempeño ha sido confirmado en los sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus<sup>TM</sup> y ABI 7500 (Applied Biosystem)





#### Extracción de ADN

Este kit permite la detección del patógeno previsto en ADN genómico extraído a partir diferentes tipos de matrices biológicas. Algunos ejemplos de estas matrices son: sangre total, suero, tejidos, mucus, aislado de bacterias, sobrenadantes de cultivo celular, células en suspensión. La matriz más adecuada para su aplicación debe ser determinada por el investigador. Si tiene dudas sobre la mejor aproximación, consulte con su distribuidor local o escríbanos a supportvetdx@gentechbio.com.

Para realizar la extracción de ADN sugerimos el kit DNeasy Blood & Tissues kit (QIAGEN®) plataforma con la cual se realizó la extracción de ADN para la validación de la prueba. Sin embargo, el procedimiento de extracción se puede adelantar con diferentes plataformas comerciales que garanticen la extracción del ADN de bacterias Gram (-), a continuación señalamos algunas alternativas de extracción que han sido verificadas con nuestro sistema de detección, pero no pretende limitar sus opciones de extracción de ácidos nucleicos:

- EZ-10 Spin Column Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit (BioBasic ®)
- HiPurA® Bacterial Genomic DNA Purification Kit MB505 (HiMedia ®)

### Contenidos del Kit

| Componente                       | Cantidad (Cat. No. PF003) |
|----------------------------------|---------------------------|
| Solución A*                      | 1 vial (1.3 ml)           |
| Solución B <sup>+</sup>          | 1 vial (100 ul)           |
| Solución C <sup>‡</sup>          | 1 vial (100 ul)           |
| Agua Libre de Nucleasas<br>(NTC) | 1 vial (1.2 ml)           |

<sup>\*</sup> Master Mix: Contiene los componentes para adelantar la qPCR (Taq polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>)

Si va a realizar alícuotas del sistema Pathogen Mix, asegúrese de evitar la exposición prolongada a la luz y disponga la alícuota en viales color ámbar para evitar alteraciones en la sonda, como desacople del sistema sonda – quencher, que termine afectando el sistema de emisión de la mezcla. Evite ciclos de congelación y descongelación (>8) tanto para la solución stock o alícuotas de este componente.



<sup>+</sup>Pathogen Mix: primers y sondas dirigidos al gen ETW12 proteína fimbrial putativa (fimA

<sup>&</sup>lt;sup>‡</sup> Control positivo: ADN genómico bacteriano de la cepa de *Edwardsiella tarda* ATCC<sup>®</sup> 15947<sup>™</sup> (Ewing and McWhorter) del bio-banco American Type Culture Collection (ATCC)



### Materiales a ser proporcionados por el usuario

Adicional a los materiales proporcionados en el kit, usted necesitará los siguientes materiales que no se encuentran incluidos. Algunos de estos insumos pueden ser adquiridos a través de nuestra compañía. Conste la sección de Información sobre órdenes al final de este manual. Para facilitar su gestión de aprovisi onamiento, marque las casillas que se muestran al lado de cada insumo necesario.

Usted requerirá de: micropipetas, puntas para micropipeta con barrera, vórtex, termociclador en tiempo real, mini centrífuga, estación de PCR o área para trabajo de PCR, baño de hielo o estación de frío, gradillas, tubos de 1,5-2,0 mL.

Adicionalmente, usted requerirá realizar extracción de ADN a partir de sus muestras, considere un sistema de extracción por columnas, perlas magnéticas o a partir de tarjetas FTA.

Por su parte, todo trabajo en el laboratorio implica que el personal operativo debe contar con implementos de protección personal como: bata, guantes y lentes protectores.

### Protocolo de Uso

#### Puntos Importantes antes de Empezar

- Lea por completo las notas importantes mencionadas en este manual
- Realice el protocolo tan rápido como sea posible. El ADN es una molécula inestable y puede ser susceptible a degradación o alteraciones en el tiempo
- Siempre descontamine sus superficies antes de iniciar el protocolo
- Asegúrese de que los productos se encuentren en buen estado antes de empezar.

#### **Procedimiento**

1. Pipetee los siguientes reactivos en un tubo de 1,5mL. El volumen será correspondiente al número de reacciones que utilizará, se recomienda considerar una reacción adicional al número de pruebas a analizar:

| Componente                 | 1 reacción    | 10 reacciones |
|----------------------------|---------------|---------------|
| Solución A                 | 13 <b>µ</b> l | 130 <b>µl</b> |
| Solución B                 | 1 μl          | 1ΟμΙ          |
| Agua Libre Nucleasas (NTC) | 1ΟμΙ          | 100μΙ         |
| Volumen Total              | 24 <b>µ</b> l | 240 <b>µl</b> |

- 2. Dispense la mezcla  $(24\mu l)$  en los tubos o platos de reacción (grado óptico). Utilice un tubo por cada muestra a procesar e incluya un tubo para cada control: positivo y negativo.
- 3. Dispense en cada uno de los tubos  $1\,\mu\text{L}$  de la muestra de ADN a probar. En el caso de los controles incluya  $1\,\mu\text{L}$  del Control Positivo (Solución C) y  $1\,\mu\text{L}$  Agua Libre de Nucleasas (NTC) al control negativo, respectivamente.
- 4. Cierre los tubos con sus tapas o película grado óptico en el caso de emplear platos.
- 5. Configure su termociclador con los canales correspondientes a la sonda de este kit y la etapa donde tendrá lugar la detección :





6. Configure el termociclador de acuerdo con las condiciones mostradas a continuación:

| Etapa                      | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|----------------------------|-------------|--------|--------|
| Initial Hold               | 95° C       | 10 Min | 1      |
| Hold                       | 95° C       | 30 Seg | 35     |
| Alineamiento/<br>Extension | 58° C       | 40 Seg |        |

### Análisis de datos e Interpretación de resultados

Para que el ensayo sea válido, el control positivo debe mostrar una señal con un  $C_T$  entre 18 y 26 ciclos. Adicionalmente, el control negativo, no deberá registrar amplificación o un valor de Ct > 33 en caso de presentarse, en algunas plataformas pueden evidenciarse un curva atípica sobrepasando en el ciclo umbral de detección (Ct)

Comportamiento de los controles de la prueba:

| Rango de Ct (Cycle Thershold)*                    |                          |  |
|---|--------------------------|--|
| Control Positivo (CP) 18 – 26  Edwardsiella tarda |                          |  |
| Control Negativo                                  | No amplificación o Ct>33 |  |
| Muestras positivas                                | Ct≤32                    |  |

 $<sup>^{*}</sup>$  Los valores de Ct pueden variar por  $\pm$  2 ciclos al ser empleados en diferentes instrumentos de PCR en tiempo real

Los resultados y su interpretación son mostrados a continuación:

| Resultado     | Sonda        | Control Positivo | Control Negativo |
|---------------|--------------|------------------|------------------|
| Positivo      | +            | +                | <del>-</del>     |
| Negativo      | <del>-</del> | +                | -                |
|               | +/-          | <del>-</del>     | <del>-</del>     |
|               | +/-          | <del>-</del>     | +                |
| Indeterminado | +            | +                | +                |
|               | +/-          | +                | -                |





### Notas importantes

Para el uso adecuado de este kit, los usuarios deben tener en cuenta: usar siempre consumibles y plásticos libres de nucleasas, almacenar y manipular separadamente muestras y materiales que puedan contener material genético del patógeno a ser detectado, descongelar siempre sobre hielo o en una estación de frío los reactivos a ser utilizados, homogeneizar bien los reactivos a ser utilizados luego de descongelarse por completo y no utilizar los componentes del kit luego de su fecha de vencimiento/expiración.

Asegúrese de dispensar las muestras en tubos con componentes de calidad óptica según su termociclador.

Por su parte, tenga en cuenta las siguientes recomendaciones sobre el uso de los controles:

#### Control Positivo

Incluya siempre al menos una reacción de control positivo en su conjunto de PCR. Este control permite comprobar la funcionalidad de los reactivos de detección y la correcta manipulación de los reactivos empleados.

#### Control Negativo

Incluya siempre al menos una reacción de control negativo sin plantilla (*Non Template Control* -NTC- por sus siglas en inglés) en su conjunto de PCR. Este control permite determinar que no haya ocurrido contaminación de los reactivos o de la reacción de PCR.

### <u>Uso previsto</u>

El kit permite la detección del agente *Edwardsiella tarda* a partir de diferentes matrices biológicas. El protocolo de extracción de ácidos nucleicos a ser empleado debe ser determinado por el investigador de acuerdo con el tipo de matriz. El objetivo de este ensayo molecular no es prevenir, curar, tratar o coadyuvar en el tratamiento de ninguna enfermedad animal o humana. Este kit tampoco tiene el objetivo de dar un diagnóstico sobre una enfermedad. Se define para **Uso exclusivo para Investigación** (RUO por siglas en inglés *Research Use Only*).





### Almacenamiento

Los kits de la línea PathogenFish de Gentech Biosciences deben ser transportados en hielo seco. Al llegar a su institución o centro de investigación, deben ser almacenados entre -35°C y -18°C, serán estables a dicha temperatura hasta la fecha de vencimiento/expiración del kit.

Evite ciclos de congelación y descongelado de los reactivos del kit (>8). Estos ciclos pueden perjudicar la integridad de los componentes. Si no utilizará el kit de inmediato o bajo número de muestras serán procesadas, realice alícuotas de los reactivos conforme sea necesario y preserve las alícuotas en las condiciones anteriormente mencionadas y características particulares de cada componente.

#### Control de Calidad

La fabricación de nuestros reactivos se realiza en instalaciones adecuadas para el procesamiento de insumos en biología molecular. Las bodegas de almacenamiento se encuentran certificadas por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos de Colombia – INVIMA y nuestros laboratorios de servicio han sido reconocidos por el Instituto Colombiano Agropecuario de Colombia (ICA). El personal involucrado en producción se encuentra certificado en Buenas Prácticas de Laboratorio y Norma ISO 17025.

### Información de Seguridad

Cuando trabaje con reactivos químicos o sustancias biológicas debe contar siempre con protección adecuada. Utilice siempre y adecuadamente sus elementos de protección personal. Para más información sobre elementos de protección personal, puede consultar información en inglés y español proporcionada por la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional de Estados Unidos en el siguiente enlace: <a href="https://www.osha.gov/personal-protective-equipment">www.osha.gov/personal-protective-equipment</a>

Para consultar fichas de seguridad sobre los contenidos de este y otros kits, consulte con su distribuidor local o escríbanos a safety@gentechbio.com





### Definición de Símbolos

Para su referencia, a continuación, encontrará la definición de los símbolos contenidos en los diferentes componentes del kit y en el contenido de este manual:

\*\*\*

Fabricante del kit

LOT

Número de Lote



Fecha de Vencimiento/Expiración



Temperatura de Preservación

li

Manual del Usuario

REF

Número de Catálogo (Cat. No.)

MAT

Número de parte/material



Proteger de la luz solar

## Registro de cambios

| Cambio          | Fecha   |
|-----------------|---------|
| Versión Inicial | 12/2020 |





### Información sobre órdenes

En Colombia, Gentech Biosciences es también un distribuidor de diversas marcas en biología molecular reconocidas en el mundo. Nuestro equipo y profesionales recomiendan varias referencias que pueden apoyar sus tareas del día a día en su laboratorio y el uso de este kit. Consulte con nosotros para más información escribiendo a sales@gentechbio.com.

A continuación, encontrará una lista de referencias que pueden serle útiles en sus procesos de orden:

|   | İtem   | Fabricante            | Cat. No.    |
|---|--|-----------------------|-------------|
| Accesorios  | Accesorios Pipetas Nichipet Premium 0,5 – 10 μL  |                       | 00-NLTW-10  |
| y plásticos   | Pipetas Nichipet Premium 20 – 200 µL   | Nichiryo              | 00-NLTW-200 |
| útiles  | Estación de Frío para PCR CoolCaddy  | MTC Bio               | R4015       |
|   | Tubos 1,5 – 1,7 mL codificados por color SureSeal  | MTC Bio               | C2000-AST   |
|   | Descontaminador UV de Pipetas nUVaClean  | MTC Bio               | P5590       |
| Extracción HiPurA® Bacterial Genomic DNA Purification de Ácidos Kit |  | HiMedia ®             | MB505       |
| Nucleicos   | IndiSpin Pathogen Kit – Extracción mediante columnas de ácidos nucleicos de forma manual | Indical<br>Bioscience | SP54106     |

Este producto puede ser empleado únicamente de acuerdo con los protocolos provistos y con los componentes incluídos. Gentech Biosciences no da licencia sobre el uso de su propiedad intelectual para usar o incorporar este producto o sus componentes con componentes no incluidos en el kit a excepción de lo descrito en los protocolos provistos, en este manual y en los protocolos oficiales disponibles. Los protocolos de otros usuarios no han sido validados por Gentech Biosciences y este no asume garantía sobre el uso del producto con estos protocolos. Adicionalmente, Gentech Biosciences no asegura que estos protocolos no infrinjan condicion es de propiedad intelectual de otros fabricantes o terceros.

Este kit y sus componentes son entregados para uso en una única ocasión y no pueden ser reutilizados, reempacados, o revendidos. Gentech Biosciences no toma partida de ninguna licencia no mencionada. El comprador y usuario de este kit acuerda no favorecer ni tomar acciones que favorezcan el uso no permitido del producto.

Las sondas empleadas en este kit son fabricadas por Macrogen Inc. Los nombres y marcas registrados usados en este documento, incluso cuando no se haga explícito, no deben considerarse desprotegidas por la ley. Todas las marcas y sellos comerciales mencionados son propiedad de sus respectivos autores.

