

'Para muestra de saliva'

LHP 0124/01

REF DLHPY01

Uso deseado

La prueba PLYORINET-ADN es un ensayo basado en la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) que permite detectar cualitativamente ADN bacteriano de *Helicobacter pylori* en muestras de saliva.

Resumen

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria gramnegativa, patógena en humanos y comúnmente relacionada con enfermedades gastroduodenales, incluidas la gastritis activa crónica, úlceras pépticas, gastritis atrófica, linfoma del tejido linfóide asociado a mucosas y cáncer gástrico entre otras. La infección por *H. pylori* afecta a más de la mitad de la población adulta en todo el mundo, pero la prevalencia de la infección por *H. pylori* varía ampliamente según el área geográfica, la edad, la raza y el nivel socioeconómico [1]. El cáncer gástrico y la úlcera péptica juntos causan más de un millón de muertes por año en el mundo, siendo así la infección por *H. pylori* un problema de salud importante [2]. Se han desarrollado varios métodos de diagnóstico que utilizan técnicas invasivas o no invasivas con diferentes niveles de sensibilidad y especificidad, como la endoscopia con biopsia de tejidos gástricos para histología, cultivo *in vivo* o *in vitro*, prueba rápida de ureasa, prueba de aliento con urea, pruebas de antígenos fecales y prueba de PCR. A pesar de la disponibilidad de múltiples métodos de diagnóstico, no existe un método como estándar de oro para detectar la infección por *H. pylori* [3]. Las técnicas moleculares que requieren de tomas de muestra no invasivas como la saliva han demostrado una alta sensibilidad y especificidad para la detección de este patógeno [4].

Principio

La prueba PLYORINET -ADN se basa en la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) empleando sets de primers dirigidos a determinadas regiones del ADN bacteriano correspondiente al genoma de *Helicobacter pylori* para su detección cualitativa en muestras de saliva. Una vez extraído el ADN de la muestra se procede con el ensayo LAMP. La reacción LAMP se realiza mezclando la muestra (ADN purificado) con el reactivo seco y se incuba a 65 °C en condiciones isotérmicas, si la muestra contiene ADN de *Helicobacter pylori* en una concentración mayor al límite de detección se llevará a cabo el proceso de amplificación y al mismo tiempo se incorporarán etiquetas biotina-FAM. En caso contrario, de no estar presente dicho ADN o se encuentre por debajo del límite de detección no se realizará el proceso de amplificación ni tampoco el etiquetado. Para poder revelar el resultado es necesario utilizar el producto **BIONET MULTI** (REF DLBIO01) **producto vendido por separado**.

Materiales

Incluidos (según presentación):

Presentación	10 reacciones/ cantidad	20 reacciones/ cantidad	30 reacciones/ cantidad
Material			
Instructivo de uso	1 pieza	1 pieza	1 pieza
Reactivo seco	10 tubos	20 tubos	30 tubos
Reactivo diluyente	1 tubo/ 250 µL	1 tubo/ 500 µL	1 tubo/ 750 µL
Control negativo	1 tubo/ 25 µL	1 tubo/ 50 µL	1 tubo/ 75 µL
Control positivo	1 tubo/ 25 µL	1 tubo/ 50 µL	1 tubo/ 75 µL

No incluidos:

- Kit de purificación de ADN
- Cronómetro
- Contenedor de RPBI
- Micropipetas
- Puntas nuevas y estériles para micropipeta.
- Termobloque, baño seco o incubador
- Guantes de nitrilo
- Equipo de protección personal
- Material para toma de muestra

Almacenamiento y estabilidad de la prueba

- Almacene la prueba de acuerdo con las indicaciones de cada componente impresos en su etiqueta individual.
- La prueba es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la bolsa.
- No utilice la prueba después de la fecha de caducidad.

Recolección de la muestra

- Coloque un paño que cubra nariz y boca, y sin abrir la boca tosa con fuerza y retenga la mayor cantidad de saliva generada.
- Retire la envoltura protectora del hisopo para saliva y tómelolo desde el extremo del mango de plástico.
- Abra la boca e introduzca el hisopo, frote 10 veces contra la mejilla derecha, repita el proceso con la mejilla izquierda.
- Coloque el hisopo por 10 segundos en el surco inferior derecho cerca de las glándulas salivales mayores a un lado de los dientes (donde se concentra más saliva). Repita el proceso con el surco del lado de la mejilla izquierda con el mismo hisopo.
- Levante la lengua, recoja la mayor cantidad de saliva del piso sublingual.

Almacenamiento de la muestra

- Una vez recolectada la muestra solo puede almacenarse hasta por dos horas a temperatura ambiente y hasta por 5 días en refrigeración (4 °C).
- Para un mejor desempeño, analice las muestras inmediatamente después de su recolección, una manipulación, almacenamiento o transporte incorrecto puede generar desviaciones en los resultados.

Preparación de la muestra

• Purificación de ADN:

Se sugiere purificar el ADN de la muestra, de acuerdo con las instrucciones del kit de purificación, al final eluya el ADN purificado (preferentemente) en H₂O grado biología molecular o Tris-HCl 10 mM pH 8.

• Sin purificación de ADN:

- Inactive la muestra a 95 °C por 5 minutos.
- Diluya la muestra 1:10 en H₂O grado biología molecular o Tris-HCl 10 mM pH 8 para su uso en la reacción.

Nota: si la muestra contiene restos sólidos, se recomienda permitir que sedimenten o centrifugar para obtener una muestra líquida

Instrucciones de uso

Permita que los componentes se atemperen o alcancen temperatura ambiente (18-30 °C) antes de su uso. Prepare una superficie limpia y nivelada para realizar el procedimiento.

- Reconozca cada uno de los materiales y asegúrese que cuenta con todo lo necesario.
- Recolecte la muestra cómo se menciona en la sección 'recolección de la muestra'.
- Prepare la muestra cómo se indica en la sección 'preparación de la muestra'.
- Para la reacción LAMP prepare de forma independiente cada tubo:

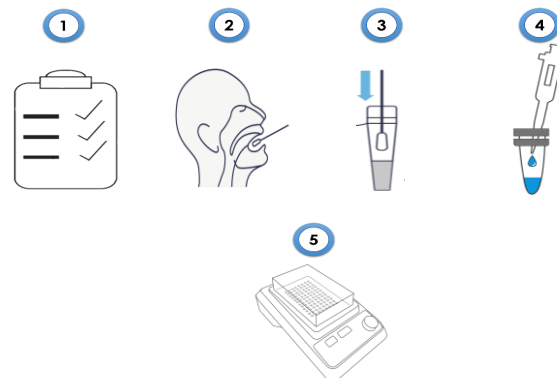
- **Control positivo (C+):** Coloque 20 µL de reactivo diluyente a un tubo de reactivo seco, luego 5 µL de control positivo y mezcle por pipeteo, al finalizar cierre el tubo y rotule con C+.

- **Control negativo (C-):** Coloque 20 µL de reactivo diluyente a un tubo de reactivo seco, luego 5 µL de control negativo y mezcle por pipeteo, al finalizar cierre el tubo y rotule con C-.

- **Muestra:** Coloque 20 µL de reactivo diluyente a un tubo de reactivo seco, luego 5 µL de muestra y mezcle por pipeteo, al finalizar cierre el tubo y rotule con M1.

Nota: se recomienda realizar duplicados (dos tubos de cada uno) por cada muestra a analizar. Cualquier cambio en el volumen de los reactivos, muestras o controles puede generar resultados erróneos.

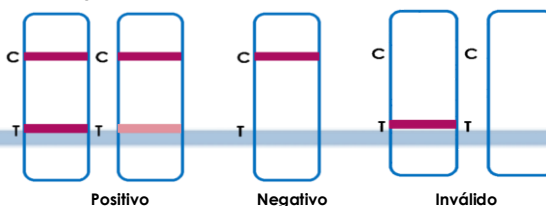
- Coloque los tubos generados a 65 °C por 30 minutos en alguno de los siguientes equipos: termobloque, baño seco o incubador. Al finalizar saque los tubos del equipo.
- Siga las instrucciones descritas en el instructivo de uso de **BIONET MULTI**.



ATENCIÓN: Un esquema simplificado de las instrucciones de uso se encuentran detallados e ilustrados en la página 3 de 3 de este instructivo.

Interpretación de resultados

• Identifique según lo proporcionado por BIONET MULTI



Emita un dictamen en función de la siguiente tabla:

Control positivo	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	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 el ADN bacteriano de <i>H. pylori</i> . 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). Un resultado negativo indica que no se detectó el ADN bacteriano de <i>H. pylori</i> .
Inválido	No se visualiza la línea de color en la región control (C).

Control de calidad

Un control interno está incluido en el producto 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

- Los resultados deben ser interpretados por personal calificado.
- Esta prueba depende completamente del producto **BIONET MULTI**, por lo que solo con se obtendrá el mejor desempeño.

- La prueba PYLORINET-ADN es solo para uso profesional *in vitro*. Esta prueba cualitativa no puede determinar el valor cuantitativo ni la tasa de aumento en la concentración de ADN de *H. pylori*.
- Esta prueba ha sido evaluada para la detección de ADN bacteriano de *H. pylori* y solo debe ser usada para su detección y no para otros tipos de patógenos.
- La prueba PYLORINET-ADN sólo indica la presencia del genoma de *H. pylori* en la muestra y no debe usarse como único criterio para el diagnóstico o exclusión de la infección por *H. pylori* o para informar el estado de la infección.
- Como con todas las pruebas de tamizaje, los resultados deben considerarse con toda información clínica disponible para el médico o personal calificado.
- Si el resultado de la prueba es negativo y los síntomas clínicos persisten se sugieren pruebas de seguimiento adicionales con otros métodos clínicos como las pruebas de cultivo, los resultados deben ser interpretados por un médico.
- La tonalidad que adquiera la membrana no interfiere en el resultado. Mientras la línea control se visualice, el resultado es válido.
- Los resultados negativos descartan la infección por *H. pylori*, ya que la mayor sensibilidad esperada es 100 UFC (Unidad Formadora de Colonias) por prueba.
- Particularmente en aquellos pacientes que han estado en contacto con la bacteria. Las pruebas de diagnóstico molecular o prueba de cultivo microbiológico deben usarse para descartar la infección en estos individuos.
- Las pruebas no están autorizadas para vigilancia epidemiológica.
- El desempeño de la prueba se ha evaluado bajo las condiciones y características mencionadas en este manual. Se recomienda seguir las instrucciones para asegurar la precisión de los resultados.

Características de presentación

Precisión Intra-Ensayo

La repetibilidad de la prueba se determinó realizando 20 réplicas por cada concentración incluyendo una libre de ADN bacteriano de *H. pylori*, se utilizó reactivo de corrimiento como muestra. Las muestras fueron correctamente identificadas el 99% de las veces.

Inter-Ensayo

La reproducibilidad de la prueba se determinó realizando 20 réplicas de 3 lotes diferentes de la prueba en dos días diferentes por cada concentración incluyendo una libre de ADN bacteriano de *H. pylori* de, se utilizó reactivo de corrimiento como muestra. Las muestras fueron correctamente identificadas el 99% de las veces.

Reactividad cruzada

La prueba PYLORINET-ADN se ha probado con muestras positivas con el siguiente panel. Los resultados no mostraron reacción cruzada.

- | | |
|---|--|
| • <i>Campylobacter jejuni</i> | • <i>Shigella boydii</i> |
| • <i>Campylobacter coli</i> | • <i>Shigella flexneri</i> |
| • <i>Campylobacter lari</i> | • <i>Aeromonas hydrophila</i> |
| • <i>Streptococcus mutans</i> DMST 1877 | • <i>Salmonella Paratyphi</i> |
| • <i>Staphylococcus aureus</i> DMST 20654 | • <i>Salmonella Enteritidis</i> |
| • <i>Neisseria meningitidis</i> | • <i>Vibrio parahaemolyticus</i> |
| • <i>Klebsiella pneumoniae</i> | • <i>Vibrio cholerae</i> ATCC 39315 |
| • <i>Proteus mirabilis</i> | • <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 |
| • <i>Providencia rettgeri</i> | • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 |

Sustancias interferentes

Los siguientes compuestos han sido probados usando la prueba PYLORINET-ADN con muestras de saliva, no se observó interferencia.

- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| Sangre (1%) | Fluconazol (5%) |
| Cloruro de sodio (5%) | Oseltamivir (0.5%) |
| Oximetazolina (15%) | Tobramicina (0.0004%) |

Desempeño

La prueba PYLORINET-ADN se evaluó con muestras de saliva. Todos los resultados fueron comparados con qPCR. A continuación, se reportan:

Se usaron los resultados obtenidos de 407 pacientes de los cuales 215 se encontraban sanos a diferencia de los 192 pacientes que presentaron una evolución de sintomatología a infección por *H. pylori*, con presencia de dos o más de los siguientes datos clínicos: dolor estomacal agudo, dolor urente o ardor en el estómago, náuseas, pérdida del apetito, eructos frecuentes y otros síntomas relacionados.

Tabla 1. Tabla de contingencia de muestras clínicas (saliva) en pacientes con infección por *H. pylori*.

Método	qPCR		Resultados totales
	Positivo	Negativo	
Prueba PYLORINET-ADN	Positivo	188	198
	Negativo	4	209
Resultados totales		192	407

Sensibilidad Relativa: 97.92% (95% IC*: 96.02% - 98.92%)

Especificidad Relativa: 95.35% (95% IC*: 92.84% - 97.00%)

Precisión Global: 96.56% (95% IC*: 94.31% - 97.94%)

*Intervalo de confianza

Consideraciones adicionales

- Asegúrese de utilizar la cantidad indicada de muestra para la prueba, ya que demasiada o muy poca muestra puede conducir a una desviación de los resultados.
- Se recomienda realizar una purificación de ADN bacteriano previo al análisis para obtener mejores resultados.
- La reacción LAMP es sensible al tiempo y la temperatura. Para evitar resultados incorrectos, se recomienda seguir los pasos del procedimiento de ensayo.
- No intercambie reactivos de diferentes lotes ni use reactivos de otros kits disponibles comercialmente. Los componentes del kit se combinan con precisión para un rendimiento óptimo.
- Las micropipetas y consumibles deben ser estériles. Se recomienda irradiar con luz UV por 15 minutos antes de su uso, si limpió las micropipetas previamente con cloro y etanol asegúrese de no dejar residuos.
- Se recomienda el uso de gabinetes de bioseguridad para la preparación de la reacción LAMP.
- PRECAUCIÓN: Permita que los reactivos y las muestras se descongelen completamente antes de su uso. Mezcle el reactivo suavemente antes de usar teniendo la precaución de no generar espuma. Regrese el reactivo a su temperatura de almacenamiento después de su uso.
- PRECAUCIÓN: No deje abierto el contenedor de la prueba, solo ábrala hasta su uso, la presencia de humedad puede afectar el desempeño de la prueba.
- Evite interrupciones prolongadas de los pasos del ensayo. Asegure las mismas condiciones de trabajo para todos los tubos.
- Calibre micropipetas con frecuencia para asegurar la precisión de la distribución de muestras/reactivos. Use puntas para micropipeta diferentes para cada muestra y reactivo para evitar contaminación cruzada.
- La prueba podría verse afectada por el polvo y los reactivos químicos y/o sustancias como hipoclorito de sodio, ácidos, álcalis, etanol, etc. No realice el ensayo en presencia de estas sustancias y utilice siempre puntas nuevas con filtro.
- 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.
- Todos los productos de desecho generados por este Kit deben disponerse de acuerdo a la NOM-087 vigente sobre el manejo de Residuos Biológico infecciosos.
- Se recomienda utilizar equipo de protección personal al momento de manipular las muestras.

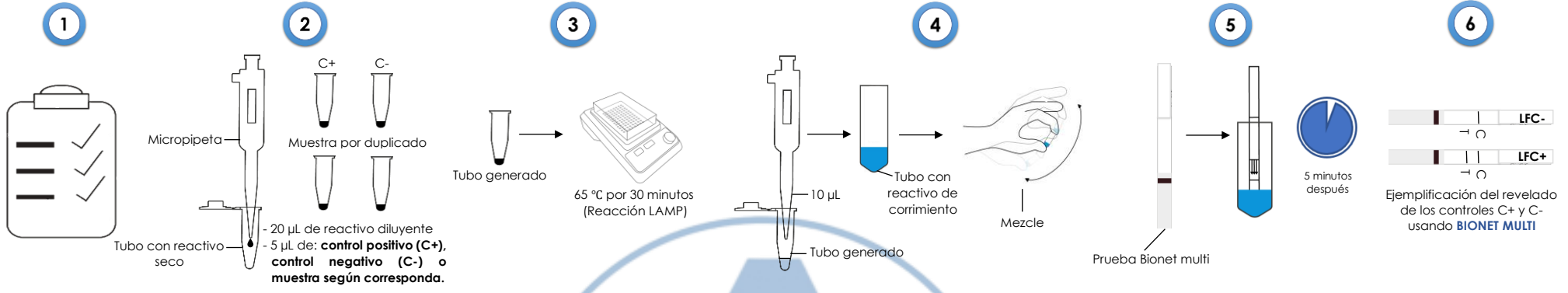
Referencias

- [1]. Peleteiro B, Bastos A, Ferro A, Lunet N. Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en todo el mundo: una revisión sistemática de estudios con cobertura nacional. *Dig Dis Sci*. 2014; 59 :1698–1709 Han P, Ivanovski S. Saliva—Friend and Foe in the COVID-19 Outbreak. *Diagnostics*. 2020; 10(5):290.
- [2]. Axón A. *Helicobacter pylori* y salud pública. *Helicobacter*. 2014; 19 Suplemento 1 :68–73.
- [3]. Sabbagh, P., Mohammadnia-Afrouzi, M., Javanian, M. et al. Diagnostic methods for *Helicobacter pylori* infection: ideals, options, and limitations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 38, 55–66 (2019).
- [4]. Bangpanwimon K, Mittraparp-arthorn P, Srinitiwawong K, Tansila N. Non-Invasive Colorimetric Magneto Loop-Mediated Isothermal Amplification (CM-LAMP) Method for *Helicobacter pylori* Detection. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2021; 31:501-509 Influenza Virus: A Brief Overview Tanushree Dangi & Amita Jain Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences volume 82, pages 111–121

Índice de símbolos

	Consultar el instructivo de uso		Caducidad
	Solo para evaluación de desempeño <i>in vitro</i>		Número de catálogo
	Almacenar entre 2–30 °C		Número de lote
	No utilizar si el paquete está dañado		No reutilizar

Esquema de instrucciones de uso completo



• Identifique cada material y asegúrese de tener todo lo necesario.

Preparación de muestra:

- Tome un tubo con reactivo seco.
- Agregue 20 µL de reactivo diluyente al tubo.
- Agregue 5 µL de muestra (se recomienda hacer duplicado por cada muestra a analizar).

Preparación de controles:

- Tome un tubo con reactivo seco y agregue 5 µL del control positivo (C+).
- Tome un tubo con reactivo seco y agregue 5 µL del control negativo (C-).

• Tome cada tubo generado (C+, C- y muestra) y colóquelos en cualquiera de los siguientes equipos: termobloque, baño seco o incubador.

• Programe el equipo para que alcance una temperatura de 65 °C y déjelos por 30 minutos.

• Tome uno de los tubos generados (C+, C- o muestra) y con ayuda de una micropipeta recolecte 10 µL después transfíralos a un tubo con reactivo de corrimiento, cierre perfectamente y rotule.

• Mezcle por medio de pipeteo o agite el tubo 5 segundos.

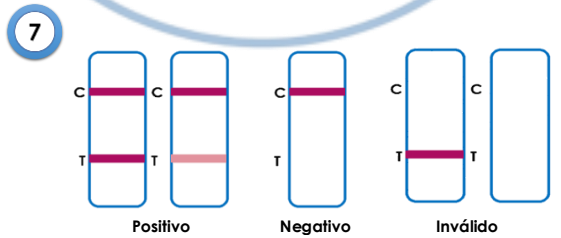
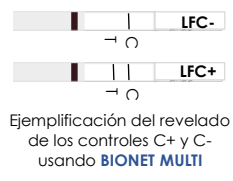
• Repita este paso para cada uno de los tubos generados restantes.

Tome una prueba Bionet multi y rotúlela según el tubo con reactivo de corrimiento con **muestra**.

- Tira LFC+ en el tubo con reactivo de corrimiento con **C+**.
- Tira LFC- en el tubo con reactivo de corrimiento con **C-**.

Inicie un cronómetro.

• Una vez hayan pasado 5 minutos saque la prueba del tubo, colóquela sobre una superficie plana y limpia



• Interprete los resultados conforme a la imagen superior.
Nota: No interprete los resultados después de 10 minutos.

