

BIONET MULTI

BFL 0623/01
REF DLBIO01

Uso deseado

BIONET MULTI es una prueba rápida fundamentada en un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral para la detección cualitativa de analitos (anticuerpos, proteínas o amplificaciones genómicas) marcados simultáneamente con fluoresceína (FITC/FAM) y biotina.

Resumen

El uso de técnicas de biología molecular en el diagnóstico ha permitido obtener resultados más rápidos y precisos, ya que identificar una región de ADN (ácido desoxirribonucleico) o ARN (ácido ribonucleico) resulta más sencillo pues no depende de encontrar al microorganismo en sí, sino más bien sus componentes, por lo mismo no es necesario de transportes especiales o de ciertas condiciones como si pasa en la microbiología tradicional. Además de que dichas técnicas como PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), LAMP (Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle) o RPA (Amplificación de la Polimerasa Recombinasa) ofrecen resultados entre 1 a 4 horas e inclusive detectan algunos tipos de cáncer, sin embargo, estos representan costos elevados por sus equipos sofisticados o reactivos a diferencia de otras pruebas más convencionales, no obstante, con el avance de la tecnología se han vuelto más accesibles [1]. Otro método de diagnóstico es mediante la detección de determinados péptidos/proteínas provenientes de patógenos o condiciones fisiológicas, esto ha permitido identificar una amplia variedad de enfermedades, parásitos, marcadores tumorales, hormonas entre otros, aunque se requiere que los reactivos sean almacenados en ciertas condiciones [2]. Todos los métodos antes mencionados brindan un resultado que requieren de otras técnicas o equipos que no siempre son fácilmente accesibles o toman bastante tiempo, es en este punto que los ensayos de flujo lateral permiten reconocer determinados analitos de forma rápida otorgando un resultado visual, esto ha permitido sustituir algunos equipos de fluorescencia o preparados como los geles de agarosa/poliacrilamida a la hora de revelar el producto de una reacción/amplificación, este procedimiento permite no solo obtener resultados cualitativos si no hasta cuantitativos [3,4].

Principio

La prueba BIONET MULTI para la detección cualitativa de anticuerpos, proteínas o amplificaciones genómicas marcados simultáneamente con fluoresceína (FITC/FAM) y biotina es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral. La prueba BIONET MULTI posee dos regiones: la primera es la región control (C) que tiene impresos anticuerpos anti-ratón, la segunda es la región de prueba (T), en esta se encuentran impresos anticuerpos anti-biotina, también cuenta con un conjugado en el que se encuentran partículas recubiertas con anticuerpos anti-fluoresceína. Una vez que la muestra es obtenida y marcada, ya sea durante la amplificación de ácidos nucleicos o por algún inmunoensayo es diluida con el reactivo de corrimiento, una vez que la prueba es colocada en dicha solución para que la muestra migre a través de esta por acción capilar. Si la muestra contiene el analito marcado simultáneamente con las partículas de fluoresceína (FITC/FAM) y biotina, esta reaccionará con las partículas recubiertas de anticuerpos anti-fluoresceína en el conjugado, continuará migrando hasta reaccionar con los anticuerpos anti-biotina en la región (T) y formaran una línea de color en la región de prueba (T), esto indica un resultado positivo. Por el contrario, si no está el analito de interés o existe algún factor limitante (consulte sección limitaciones) no se formará la línea de color en la región de prueba (T), esto indica un resultado negativo.

Reactivos

La prueba contiene anticuerpos anti-biotina como reactivos de captura y partículas recubiertas con anti-fluoresceína como detección. Un anticuerpo anti-ratón se emplea en la línea control.

Almacenamiento y estabilidad de la prueba

- Almacene la prueba en la bolsa sellada, a temperatura ambiente o refrigerada (2-30°C). Nota: No congele la prueba.
- La prueba es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la bolsa.

Materiales

Materiales incluidos:

- Instructivo de uso
- Prueba BIONET MULTI
- Reactivo de corrimiento

Materiales requeridos, pero no incluidos:

- Temporizador
- Contenedor de RPBI
- Micropipetas
- Puntas para micropipeta
- Guantes de nitrilo
- Equipo de protección personal

Almacenamiento de la muestra

- Mantenga la muestra en condiciones óptimas.
- Tanto los ácidos nucleicos como las proteínas deben almacenarse a -20 °C para su uso a largo plazo.
- Inactive con cloro la muestra una vez procesada.

Precauciones

- Para uso profesional *in vitro*.
- Manipule todas las muestras como si contuvieran agentes infecciosos.
- No utilice la prueba después de la fecha de caducidad.
- No coma, beba ni fume en el área donde se manejan las muestras/pruebas.

- No utilice la prueba si la bolsa está dañada.
- Utilice bata, guantes desechables y protección para los ojos cuando las muestras se estén procesando.
- La prueba utilizada debe desecharse de acuerdo con las regulaciones locales.
- La humedad y la temperatura pueden afectar adversamente los resultados.

Preparación de la muestra

A. Etiqueta/marcaje

El analito a detectar deberá ser etiquetado con ambas moléculas de fluoresceína (FITC/FAM) y biotina, este proceso puede ser durante la amplificación o posteriormente (hibridación) en el caso de anticuerpos/proteínas.

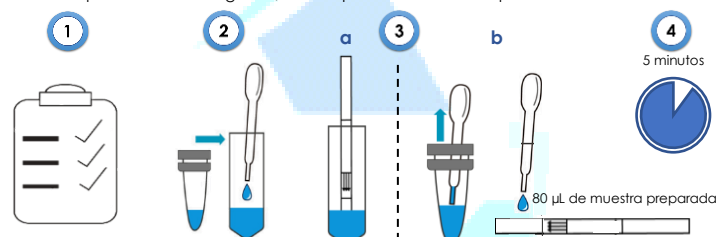
B. Dilución:

Se recomienda una dilución inicial de 1:100 del producto ya etiquetado (PCR, LAMP, RPA o proteína) utilizando el reactivo de corrimiento, sin embargo la dilución puede ser menor o mayor según el ensayo y objetivo.

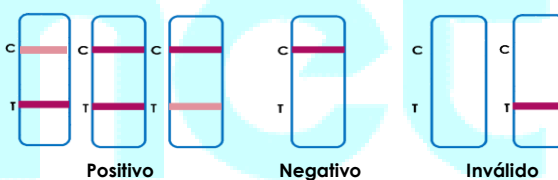
Instrucciones de uso

Permita que la prueba y reactivo de corrimiento alcancen temperatura ambiente (18-30 °C) antes de su uso. Prepare una superficie limpia y nivelada para realizar el procedimiento.

1. Reconozca cada uno de los materiales y asegúrese que cuenta con todo lo necesario.
 2. Tome 5 µL de la muestra y transfírela a un tubo con reactivo de corrimiento, homogenice por vortex o pipeteo.
Nota: La cantidad en microlitros (µL) a tomar de la muestra será en proporción a la dilución a generar.
 3. Saque una prueba de su contenedor y realice cualquiera de los dos pasos:
 - a. Coloque la tira en un tubo con la dilución preparada sumergiendo solo la almohadilla de muestra.
 - b. Coloque la tira en una superficie limpia y plana, luego tome 80 µL de la dilución preparada y colóquela directamente en la almohadilla de muestra.
 4. Inicie un cronómetro y vigile la prueba.
 5. Después de 5 minutos saque la prueba del tubo y colóquela sobre una superficie limpia (si aplica), interprete los resultados.
- NOTA: Dependiendo del tipo de muestra la línea de color en la región de prueba (T) puede aparecer antes de los 5 minutos, por lo que las muestras sobre todo las positivas deben vigilarse, no interprete resultados después de 10 minutos.



Interpretación de resultados



(Refiera a la imagen de arriba)

POSITIVO: Se visualizan dos líneas de color. Una línea coloreada aparece en la región control (C) y otra línea coloreada en la región de prueba (T).

NOTA: La intensidad del color en la región de prueba (T) o control (C) puede variar, por lo tanto, cualquier tonalidad de color en la región de prueba (T) debe considerarse como un resultado positivo pues se detectó las partículas de fluoresceína y biotina de forma simultánea.

NEGATIVO: Una línea de color aparece en la región control (C). Ninguna línea de color aparece en la región de prueba (T).

INVÁLIDO: No se visualiza la línea de color en la región control (C). Este resultado puede ser debido a que la cantidad de muestra empleada fue insuficiente o técnicas de procedimiento incorrectas. Revise el procedimiento y repita la prueba con una nueva. Si el problema persiste suspenda el uso de la prueba inmediatamente y contacte a su distribuidor local.

Control de calidad

Un control interno del procedimiento está incluido en la prueba. Una línea de color aparece en la región control (C) confirmando que el volumen de muestra fue suficiente y

que el procedimiento se realizó exitosamente. No se suministran controles positivos y negativos con esta prueba, utilícelos como parte de las buenas prácticas de laboratorio.

Limitaciones

- 1. No hay un producto específico de amplificación (PCR, LAMP o RPA), anticuerpo o proteína a detectar se puede obtener un resultado negativo, es decir, hay más de un analito a detectar.
- 2. El proceso de marcado simultáneo con las partículas de fluoresceína (FITC/FAM) y biotina no fue exitoso, para ello puede repetir el proceso de marcaje e intentar con una nueva prueba.
- 3. El uso de aceite mineral podría afectar el desempeño del flujo en la prueba, se recomienda obtener el producto de la amplificación (PCR, LAMP o RPA) evitando tomar dicha sustancia.
- 4. Es probable que en muestras con una alta concentración del analito a detectar pueda **evitar** la formación de la línea de color en la región control (C) de la prueba, si ese es el caso se recomienda realizar una nueva dilución de 1:1000 e intentar con una nueva prueba, aunque esto variara según el ensayo.
- 5. Es posible que se puedan emplear otros derivados de fluoresceína aparte de FITC y FAM, sin embargo, no se garantiza que el desempeño de la prueba sea óptimo.
- 6. El desempeño de la prueba se ha evaluado bajo las condiciones y características mencionadas en este instructivo, por lo que, se deben 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 una de las siguientes muestras: sonda marcada con FITC-biotina, sonda marcada con FAM-biotina y reactivo de corrimiento. Las muestras fueron correctamente identificadas el 99% de las veces.

Inter-Ensayo

La reproducibilidad de la prueba se determinó realizando 10 réplicas de 3 lotes diferentes de la prueba en dos días diferentes por cada muestra: sonda marcada con FITC-biotina, sonda marcada con FAM-biotina y reactivo de corrimiento. Las muestras fueron correctamente identificadas el 99% de las veces.

Interferencias

Se evaluaron diferentes concentraciones con sondas con marca simultánea (controles positivos 'C+'), una sola marca y sin marca además del reactivo de corrimiento, a continuación se muestran los resultados obtenidos:

Sondas:	Resultado
• Sonda marcada con FITC-Biotina (C+) • Sonda marcada con FAM-Biotina (C+) • Sonda marcada con biotina • Sonda sin marca de fluoresceína y biotina • Sonda marcada con FITC • Sonda marcada con FAM • Reactivo de corrimiento	No presentó interferencia

Ninguna presentó interferencias.

Interferencia con proporción de marca simultánea y una sola marca:

La presencia de manera significativa de una sola marca más que la marca simultánea puede generar falsos, estás fueron:

Sondas con proporción	Resultado
• 1 sonda marcada con FITC/FAM-Biotina: 5 sondas marcadas con FITC/FAM/Biotina.	≤10% de las réplicas no fueron identificadas correctamente
• 25 sondas marcadas con FITC/FAM-Biotina: 5 sondas marcadas con FITC/FAM/Biotina.	Todas las réplicas se identificaron correctamente.
• 50 sondas marcadas con FITC/FAM-Biotina: 5 sondas marcadas con FITC/FAM/Biotina.	

Desempeño

Se utilizó la prueba BIONET MULTI para analizar diferentes productos caracterizados y marcados siendo: 70 productos de LAMP de tuberculosis marcado con FAM-biotina (24 positivos y 46 negativos), 65 productos de PCR del gen SRY marcado con FITC-biotina (20 positivos y 45 negativos), 80 productos de RPA dirigidos a regiones conservadas de *Salmonella spp.* marcadas con FITC-biotina (30 positivos y 50 negativos) y 82 muestras de anticuerpos policlonales (28 etiquetados con FAM-biotina; 54 sin etiquetar). Los resultados de cada método fueron confirmados por medio de un gel de agarosa para los productos de PCR, LAMP, RPA y una prueba comercial ELISA en el caso de anticuerpos, en las siguientes tablas se muestran los resultados obtenidos:

1) Producto de LAMP marcado simultáneamente con FAM-biotina.

Método	Gel de agarosa			Resultados totales
	Resultado	Positivo	Negativo	
	Positivo	23	2	25
BIONET MULTI	Negativo	1	44	45
	Resultados totales	24	46	70

Sensibilidad Relativa: 95.83% (95% IC: 88.30% - 98.59%)
Especificidad Relativa: 95.65% (95% IC: 88.05% - 98.50%)
Precisión Global: 95.71% (95% IC: 88.14% - 98.53%)
IC: Intervalo de confianza

2) Productos de PCR marcada simultáneamente con FITC-biotina.

Método		Gel de agarosa		Resultados totales
BIONET MULTI	Resultado	Positivo	Negativo	
	Positivo	19	1	20
	Negativo	1	44	45
Resultados totales		20	45	65

Sensibilidad Relativa: 95.00% (95% IC: 86.76% - 98.22%)
Especificidad Relativa: 97.78% (95% IC: 90.73% - 99.50%)
Precisión Global: 96.92% (95% IC: 89.46% - 99.15%)
IC: Intervalo de confianza

3) Productos de RPA marcados simultáneamente con FITC-biotina.

Método		Gel de agarosa		Resultados totales
BIONET MULTI	Resultado	Positivo	Negativo	
	Positivo	28	1	29
	Negativo	1	50	51
Resultados totales		29	51	80

Sensibilidad Relativa: 96.55% (95% IC: 89.97% - 98.87%)
Especificidad Relativa: 98.04% (95% IC: 92.14% - 99.53%)
Precisión Global: 97.50% (95% IC: 91.34% - 99.31%)
IC: Intervalo de confianza

4) Anticuerpo policlonal marcado simultáneamente con FAM-biotina.

Método		ELISA		Resultados totales
BIONET MULTI	Resultado	Positivo	Negativo	
	Positivo	26	2	28
	Negativo	1	53	54
Resultados totales		27	55	82

Sensibilidad Relativa: 96.30% (95% IC: 89.72% - 98.72%)
Especificidad Relativa: 96.36% (95% IC: 89.82% - 98.76%)
Precisión Global: 96.34% (95% IC: 89.79% - 98.75%)
IC: Intervalo de confianza

Consideraciones adicionales

- Asegúrese de utilizar la cantidad indicada de muestra para la prueba según el ensayo, demasiada o poca muestra puede conducir a una desviación de los resultados.
- 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 de los ensayos.
- Las micropipetas y consumibles deben ser estériles. Se recomienda irradiar con luz UV por 15 minutos antes de su uso, si limpia las micropipetas con cloro y etanol asegúrese de no dejar residuos.
- Se recomienda el uso de equipo de protección al manipular las muestras.
- Calibre micropipetas con frecuencia para asegurar la precisión de la distribución de muestras/reactivos. Use puntas nuevas de micropipeta para cada muestra y reactivos 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.
- Todas las muestras 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.

Referencias

- [1]. Farfán, B. M. J. (2015). Biología molecular aplicada al diagnóstico clínico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(6), 788-793.
- [2]. Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15. doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012
- [3]. Lobato I. M, O'Sullivan CK. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *Trends Analyt Chem.* 2018 Jan; 98:19-35. doi: 10.1016/j.trac.2017.10.015. Epub 2017 Oct 26. PMID: 32287544; PMCID: PMC7112910.
- [4]. Cordray, M.S., Richards-Kortum, R.R. A paper and plastic device for the combined isothermal amplification and lateral flow detection of *Plasmodium* DNA. *Malar J* 14, 472 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0995-6>

Índice de símbolos

	Consultar el instructivo de uso
	Solo para evaluación de desempeño <i>in vitro</i>
	Almacenar entre 2 - 30 °C
	No utilizar si el paquete está dañado

	Caducidad
	Número de catálogo
	Número de lote
	No reutilizar