

Bactoplex

para la detección rápida, inequívoca y simultánea de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* por PCR a tiempo real

INTRODUCCIÓN

En muchas matrices alimentarias es necesaria la detección tanto de *Salmonella* spp. como de *Listeria monocytogenes*. Hasta la fecha, estas dos bacterias se debían analizar por separado, ya sea por microbiología clásica o por otros métodos existentes de detección, como la PCR o la inmunología. Bactoplex, en cambio, permite la detección simultánea e inequívoca de estas dos bacterias en una sola reacción.

El género *Salmonella* pertenece a la familia de las Enterobacteriaceae y comprende tres especies de bacilos gramnegativos no formadores de esporas: *S. enterica*, *S. bongori* y *S. subterranea*. La más conocida es *S. enterica*, ya que incluye seis subespecies de importancia clínica para los humanos, causantes de entre 2 y 4 millones de intoxicaciones alimentarias al año solamente en Estados Unidos. *Salmonella* puede ser detectada en muestras de multitud de orígenes distintos, como por ejemplo el agua, la tierra, los insectos, las superficies de trabajo de las plantas de producción y las cocinas, las heces de los animales, las carnes y el marisco crudo, los huevos, la leche y los productos lácteos, las salsas y los aliños para ensaladas, etc. *Listeria monocytogenes* es un bacilo grampositivo, flagelado y no formador de esporas que puede causar una amplia variedad de infecciones, incluyendo gastroenteritis, septicemia, abortos y meningitis, tanto en animales como en humanos. *L. monocytogenes* puede ser detectada principalmente en productos lácteos, carnes y verduras crudas. Su capacidad para crecer a bajas temperaturas permite la proliferación de esta bacteria incluso en alimentos refrigerados.

Bactoplex permite la detección rápida por PCR multiplex a tiempo real de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* con unos niveles de fiabilidad, sensibilidad y especificidad inmejorables. Bactoplex se basa en la detección en un mismo tubo de reacción de dos dianas genéticas específicas para estas bacterias que, con la inclusión de un control interno de amplificación (IAC), prácticamente eliminan 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

Bactoplex se basa en la amplificación simultánea mediante una reacción multiplex de PCR a tiempo real de dos genes diana, uno con secuencia específica para detectar todas las especies del género *Salmonella* y otro para detectar *Listeria monocytogenes*. Una amplificación positiva indica la presencia de una o ambas bacterias en la muestra, pudiendo distinguir los niveles de cada una de ellas independientemente de la otra.

Bactoplex también puede utilizarse para confirmar colonias aisladas en placa.

COMPONENTES

Presentación

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

Reactivos incluidos

Mix de Reacción

La Mix de Reacción contiene tampón, dNTPs, DNA polimerasa Hot-Start, agua estéril bidestilada libre de ácidos nucleicos y MgCl₂ 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 de los genes diana de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* están también incorporados a la mezcla de reactivos. La sonda de detección de *Salmonella* está marcada con el fluorocromo JOE, la sonda de detección de *L. monocytogenes* está marcada con el fluorocromo FAM y la sonda del IAC está marcada con el fluorocromo CY5.

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

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

Materiales necesarios no incluidos en el kit

Extracción de ADN

Después del enriquecimiento de las muestras en un medio adecuado (por ejemplo APT para *Salmonella* y caldo Fraser 1/2 para *Listeria*), mezclar los dos enriquecimientos y extraer el ADN de la mezcla (es recomendable realizar una prueba de amplificación sobre este ADN para comprobar la calidad del mismo). Se recomienda el uso de un método de extracción que se adecue a la muestra analizada, de esta forma se aconseja el uso de protocolos que incluyan un paso de purificación para muestras que puedan presentar problemas de inhibición. Para el resto de muestras Microbial recomienda el uso de DNaready, una solución de lisis para la extracción fácil y rápida del ADN.

Amplificación

Pipetas automáticas o de desplazamiento positivo y puntas con filtro.

Guantes de un solo uso libres de polvo.

Termociclador a tiempo real y tubos o placas de PCR.

PROTOCOLO

- En un tubo de 2 ml, mezclar 0,9 ml de muestra enriquecida en el medio de cultivo adecuado de *Salmonella* con 0,9 ml de muestra enriquecida con el medio adecuado para *Listeria*. Centrifugar la mezcla del enriquecimiento durante 5 minutos a 8.000 g. Eliminar el sobrenadante y extraer el ADN del pellet con el método de elección.
- 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, FAM y CY5. 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 (40 ciclos)	Desnaturalización	95 °C	15 segundos
	Annealing/Extensión	60 °C	1 minuto *

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

- Leer resultados.

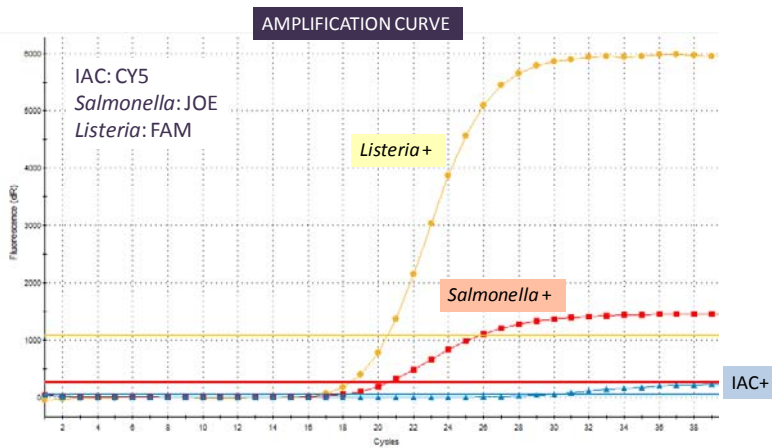
CONTROL DE REACCIÓN

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 *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*) cada vez que se realice una determinación.

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 Bactoplex. 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 *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* 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 Bactoplex 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.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS



Un resultado se considerará positivo cuando la fluorescencia correspondiente a *Salmonella* (JOE) y/o a *Listeria* (FAM) supere el valor umbral determinado para cada fluorocromo, pudiendo distinguir la presencia de una o de ambas bacterias en la muestra.

Un resultado sólo se considerará negativo cuando las fluorescencias de *Salmonella* y de *Listeria* no superen el valor umbral pero sí lo haga la fluorescencia del IAC (CY5).

Nota: La fluorescencia obtenida depende de cada fluorocromo, siendo generalmente mayor la fluorescencia del FAM, intermedia la del JOE y menor la del CY5. Generalmente, la fluorescencia del IAC supera el valor umbral entre los ciclos 28 y 31, en función de las características del software del equipo.

Para más información consultar la Guía de interpretación de resultados a http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia_interpretacion_resultados_SPAv2.pdf

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	CAUSA	SOLUCIÓN
No aparece ninguna señal específica, ni para el IAC ni para <i>Listeria</i> ni para <i>Salmonella</i> .	Inhibición de la PCR. Mala conservación de la Mix de Reacción.	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. 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>Listeria</i> y/o para <i>Salmonella</i> , pero no se detecta señal para el IAC.	Amplificación preferencial del ADN de <i>Salmonella</i> o de <i>Listeria</i> debido a un elevado número de copias de este ADN en la muestra.	La reacción es correcta y positiva para <i>Listeria</i> y/o para <i>Salmonella</i> .
Se detecta una señal específica para <i>Listeria</i> y/o para <i>Salmonella</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 Bactoplex. Si la contaminación persiste contactar con el Departamento Técnico.
Se detecta una señal específica para <i>Listeria</i> y/o para <i>Salmonella</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>Salmonella</i> y/o <i>Listeria</i> debido a la presencia de un elevado número de copias 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 ni para <i>Listeria</i> ni para <i>Salmonella</i> ni para el IAC en los tubos que contienen el control positivo.	Si no hay señal para IAC: mala conservación de la Mix de Reacción. Si se detecta señal para IAC: error de pipeteo o degradación del control positivo.	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. Repetir el análisis asegurando que un control positivo adecuado se añada a los tubos correspondientes.

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