

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

INTRODUCCIÓN

El género *Legionella* incluye al menos 50 especies y 78 serotipos conocidos de bacterias gramnegativas aerobias que pueden producir graves afecciones pulmonares, entre las cuales destacan la legionelosis y las fiebres de Pontiac. Se hallan fundamentalmente en ambientes acuáticos, incluyendo aquellos más directamente relacionados con las actividades humanas, como son las torres de refrigeración y los sistemas de distribución de aguas domésticas.

Legiofast® SPECIES permite la detección rápida por PCR a tiempo real de todas las especies del género *Legionella* con unos niveles de fiabilidad, sensibilidad y especificidad muy elevados. Legiofast® SPECIES se basa en la detección de una diana genética específica para estas bacterias que, 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 muestras ambientales de aguas después de su filtración, 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.

Legiofast® SPECIES se basa en la amplificación por PCR a tiempo real de un gen diana con secuencia específica para detectar todas las especies del género *Legionella*. La detección de esta secuencia diana indica la presencia de bacterias de este género en la muestra.

Legiofast® SPECIES 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 Legiofast® SPECIES

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 (IAC) cuya amplificación indicará la ausencia de inhibidores. Los primers necesarios para la amplificación tanto del IAC como del gen diana de *Legionella* están también incorporados en la mezcla de reactivos. El fluorocromo utilizado para la detección tanto de *Legionella* como del IAC es el SYBRGreen. 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 Legiofast® SPECIES

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

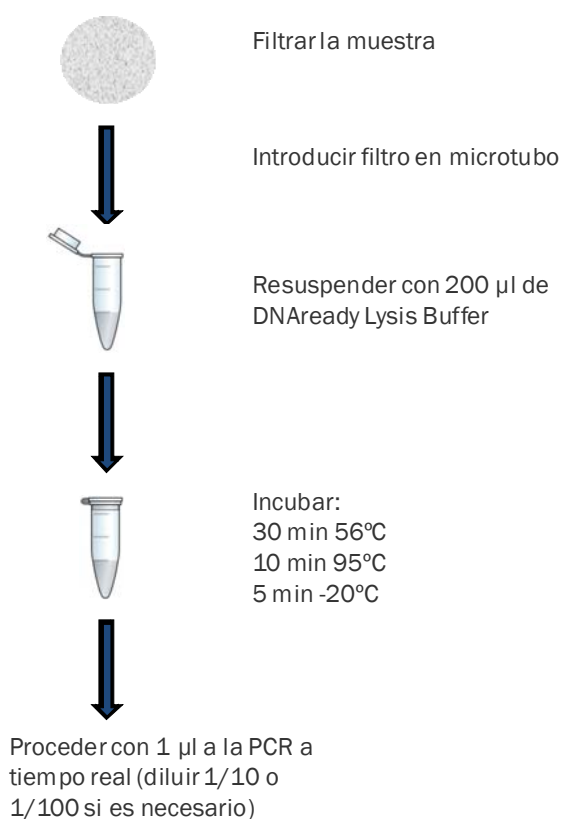
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA CON DNAREADY

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

- Filtrar el volumen de agua a analizar con membranas de 0,45 µm de policarbonato u otro compuesto capaz de retener proteínas y ADN. Recuperar el filtro, o bien raspar el contenido adherido a su superficie estérilmente (p.e. con un asa o espátula), e introducirlo en un microtubo de centrifuga.
- Resuspender el filtro con 200 µl de DNAREADY Lysis Buffer. Pipetear o agitar con el vórtex hasta disolver completamente las partículas adheridas al filtro (en algunos casos puede ser necesario usar un mayor volumen de DNAREADY Lysis Buffer para conseguir una correcta disolución del filtro).
- 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 Legiofast® SPECIES 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 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.



Nota: DNAREADY ha sido testado satisfactoriamente en muestras de aguas ambientales, y enriquecimientos bacterianos a partir de un gran número de matrices (leche, carne picada, lechuga, mojama, platos precocinados, salmón ahumado, helados, mayonesa, huevos, zumos, frutas, pescados y chocolate). No obstante, ciertas muestras 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 concentración o enriquecimiento.

DETECCIÓN POR PCR A TIEMPO REAL CON LEGIOFAST®

- 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 (40 ciclos)	Desnaturalización	95 °C	15 segundos
	Annealing	57 °C	30 segundos
	Extensión	72 °C	30 segundos*
3	Curva de disociación	95 °C	1 minuto
		De 55 a 95 °C	30 s cada T° *

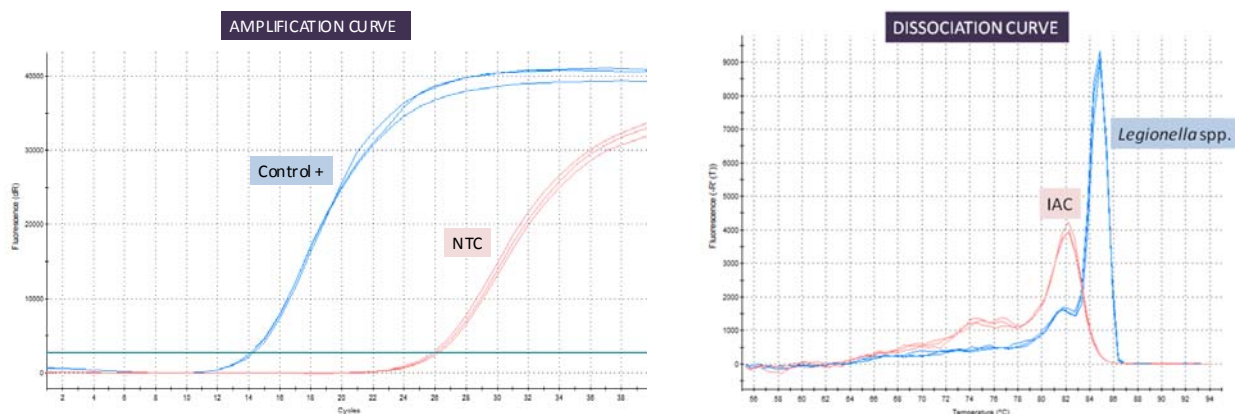
*Realizar la lectura de fluorescencia en el Paso 2 al final de cada ciclo de Extensión a 60°C y en el Paso 3 en cada temperatura durante la Curva de disociación.

- 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 LEG de Microbial o ADN genómico de *Legionella* spp.) cada vez que se realice una determinación.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS



Un resultado se considerará positivo cuando en la curva de amplificación el valor de fluorescencia supere el valor umbral y se observe claramente el pico correspondiente a *Legionella* en la curva de disociación, independientemente de que se observe o no el pico correspondiente al IAC. Un resultado se considerará negativo sólo cuando en la curva de amplificación el valor de fluorescencia sea superior al umbral pero en la curva de disociación se observe solo el pico correspondiente al IAC.

Nota: En la curva de disociación del control blanco (NTC) o en las muestras sin ADN de *Legionella* sólo debe observarse un pico correspondiente a la amplificación del IAC. En cambio, en los controles positivos o en las muestras con ADN de *Legionella* debe observarse un pico correspondiente a *Legionella*, aunque si la cantidad de ADN no es muy elevada puede observarse también el pico correspondiente al IAC.

Consultar la *Guía de interpretación de resultados* http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia_interpretacion_resultados_SPAv2.pdf para más información

PRESENTACIÓN

Legiofast® SPECIES 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 Legiofast® SPECIES. 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 *Legionella* 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. Puede presentar algunas reacciones cruzadas con ciertas especies del género *Enterobacter*.

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	CAUSA	SOLUCIÓN
La señal de fluorescencia es muy baja y no supera el valor umbral (no hay amplificación del IAC ni de <i>Legionella</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.
En la curva de disociación aparece el pico específico de <i>Legionella</i> , pero no se detecta el del IAC.	Amplificación preferencial del ADN de <i>Legionella</i> debido a un elevado número de copias de este ADN en la muestra.	La reacción es correcta y positiva para <i>Legionella</i> .
Se detecta el pico específico de <i>Legionella</i> en la curva de disociación de 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 Legiofast® SPECIES. Si la contaminación persiste contactar con el Departamento Técnico.
Se detecta el pico específico de <i>Legionella</i> en la curva de disociación de los tubos que contienen el control blanco pero no se detecta el pico del IAC.	Contaminación del material o de los reactivos y amplificación preferencial del ADN de <i>Legionella</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.
La señal de fluorescencia es muy baja y no supera el valor umbral (no hay amplificación del IAC ni de <i>Legionella</i>) en los tubos que contienen el 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