

## Legiofast<sup>®</sup> SPECIES

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

### INTRODUCCION

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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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 Y/O POCO FIABLES. POR FAVOR, COMPRUEBE LOS REACTIVOS ANTES DE USARLOS.

### PRINCIPIO

Legiofast<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> SPECIES también puede utilizarse para confirmar colonias aisladas en placa.

### COMPONENTES

#### Presentación

Legiofast<sup>®</sup> SPECIES se presenta en cajas de 50, 100 o 500 reacciones.

#### Reactivos incluidos en el kit

##### Mix de reacción

La Mix de Reacción contiene tampón, dNTPs, DNA polimerasa Hot-Start, agua estéril bidestilada libre de ácidos nucleicos y MgCl<sub>2</sub> 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

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 de filtrar las muestras a analizar se debe extraer el ADN del filtro (es aconsejable 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.

##### Amplificación

Pipetas automáticas o de desplazamiento positivo y puntas con filtro

Guantes de un solo uso libres de polvo

Termociclador a tiempo real

Tubos o placas de PCR

### PROTOCOLO

1. Filtrar un volumen de agua determinado y extraer el ADN del filtro con el método de elección.
2. 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.
3. 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.
4. Introducir los tubos o la placa en el bloque del termociclador a tiempo real. Seleccionar la lectura de fluorescencia para el fluorocromo SYBRGreen. Realizar la amplificación según el siguiente programa:

| Paso          | Evento  | Temperatura  | Tiempo                     |
|---------------|---|--------------|----------------------------|
| 1             | Activación de la ADN Polimerasa y desnaturalización del ADN | 95 °C        | 10 min.                    |
| 2 (40 ciclos) | Desnaturalización   | 95 °C        | 15 sec.                    |
|               | Annealing   | 57 °C        | 30 sec.                    |
|               | Extensión   | 72 °C        | 30 sec. *                  |
| 3             | Curva de disociación  | 95 °C        | 1 min.                     |
|               |   | De 55 a 95°C | 30 sec. cada temperatura * |

\*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.

5. Leer resultados.

### CONTROLES DE REACCIÓN

Se recomienda al menos realizar un control blanco (añadiendo 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*) cada vez que se realice una determinación.

### PRECAUCIONES

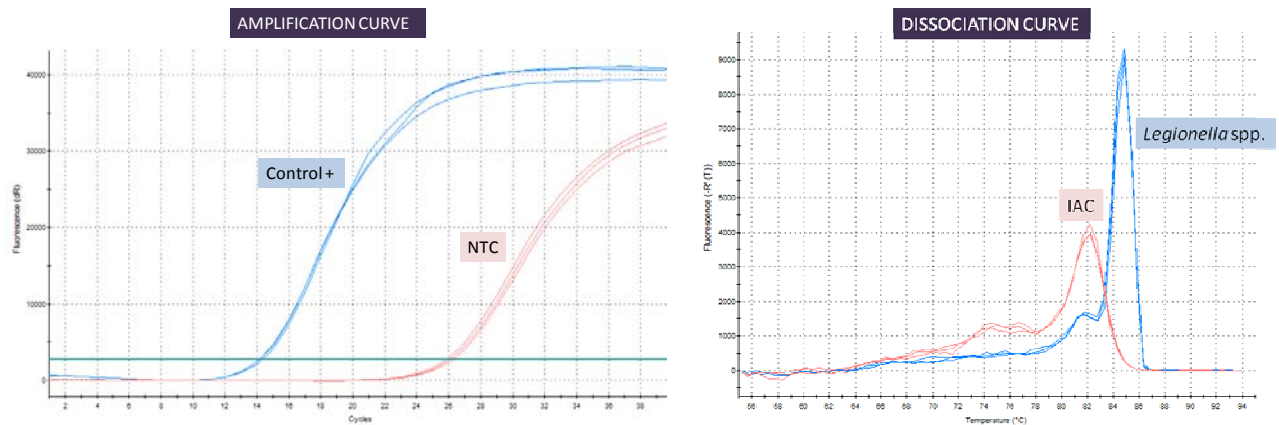
1. Las zonas del laboratorio de extracción y de amplificación del ADN, así como los materiales, instrumentación y reactivos, NO se deben usar para otras actividades y no se deben transferir de una zona a otra. Los guantes usados en una zona no se deben usar en otra zona.

- 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.
- 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.
- 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.
- No usar el producto después de su fecha de caducidad. Conservar los componentes en las condiciones indicadas.
- El uso de este producto está limitado a personal cualificado con experiencia en técnicas de extracción y amplificación de ADN.
- Este test solamente puede ser utilizado para investigar la presencia de *Legionella* spp. en muestras de agua o para otros propósitos relacionados con la I+D. No usarlo en ningún caso para diagnóstico en muestras clínicas.
- Puede presentar algunas reacciones cruzadas con ciertas especies del género *Enterobacter*.

### INTERPRETACIÓN DE 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.



Para más información consultar la *Guía de interpretación de resultados* a [http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia\\_interpretacion\\_resultados\\_SPAv2.pdf](http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia_interpretacion_resultados_SPAv2.pdf)

### 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.<br><br>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.<br><br>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 de material o de los reactivos.  | Repetir el análisis con reactivos frescos y las pipetas limpias. Lavar las superficies con lejía al 10% o equivalente.<br><br>Repetir la extracción y el análisis con un tubo nuevo de Legiofast® SPECIES.<br><br>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.<br><br>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 IAC: mala conservación de la Mix de Reacción.<br><br>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.<br><br>Repetir el análisis asegurando que un control positivo adecuado se añade a los tubos correspondientes.                                     |

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