

TABLA DE CONTENIDO

- 1 descripción del producto
- 2 Descripción de la tecnología
- 3 Descripción del patógeno
- 4 Control interno (IC)
- 5 Aplicación
- 6 Contenido y almacenamiento
- 7 Material necesario y no suministrado
- 8 Precauciones y recomendaciones
- 9 Procedimiento
- 10 Especificidad
- 11 Sensibilidad
- 12 Referencias
- 13 Información Adicional

KIT DETECCIÓN EN TIEMPO REAL *Legionella* spp.

1. DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

Los kits de detección ambiental proporcionan un procedimiento simple, confiable y rápido para detectar la presencia de una especie animal. El ensayo se basa en reacciones de PCR en tiempo real de nucleasa 5' para amplificar una secuencia genómica única en el organismo objetivo.

2. DESCRIPCIÓN DE LA TECNOLOGÍA

La PCR es un método utilizado para amplificar una secuencia de ADN específica que típicamente se amplifica en una reacción que contiene una ADN polimerasa termoestable, nucleótidos y cebadores complementarios a la secuencia diana. Cuando esta solución se calienta, la molécula de ADN se desnatura y se separa en dos hebras. A medida que la solución se enfría, los cebadores se aparean con las secuencias diana en las cadenas de ADN separadas y la ADN polimerasa sintetiza una nueva cadena al extender los cebadores con nucleótidos, creando una copia de la secuencia de ADN (amplicones). Cuando se repite, este ciclo de desnaturalización, recocido y extensión aumenta exponencialmente el número de amplicones objetivo. En la PCR en tiempo real, se utilizan sondas fluorescentes específicas para detectar el ADN amplificado mediante la hibridación con amplicones. Estas sondas están unidas a un fluoróforo en un extremo y a un extintor que suprime la fluorescencia en el otro. Si la secuencia diana está presente durante la PCR, se produce la amplificación y la sonda se degrada, lo que provoca un aumento de la fluorescencia. La fluorescencia se mide mediante un detector y el software asociado traza la intensidad de la fluorescencia frente al número de ciclos, lo que permite determinar la presencia o ausencia del organismo objetivo.

3. DESCRIPCIÓN DEL PATÓGENO

Actualmente, 47 especies y más de 60 serogrupos de *Legionella* spp. han sido reconocidos. La enfermedad del legionario es la forma más grave de infección, que incluye neumonía, y la tasa de mortalidad puede acercarse al 50% en pacientes inmunodeprimidos (Yu, 2002). Los brotes de la enfermedad del legionario en todo el mundo se han atribuido a una amplia variedad de fuentes de agua ambiental, como torres de refrigeración, jacuzzis, duchas, hidromasajes, spas y fuentes públicas (Atlas, 1999). En los últimos años, la incidencia notificada de legionelosis ha aumentado de manera constante. Método comúnmente utilizado para la vigilancia ambiental de *Legionella* spp. es la técnica de cultivo estándar, pero tiene varias limitaciones, ya que requiere medios selectivos y períodos de incubación prolongados. Recientemente, se ha descubierto que los métodos alternativos rápidos y sensibles son alternativas atractivas al método de cultivo convencional para la detección de bacterias exigentes y de crecimiento lento como *Legionella* spp. Estos métodos son métodos basados en PCR, en particular basados en PCR en tiempo real, que permiten la detección rápida de *Legionella* spp. en muestras de agua.

4. CONTROL INTERNO (IC)

Los kits de detección ambiental incluyen un ADN de control interno (IC) en la mezcla maestra utilizada en los ensayos de nucleasa 5'. Este control se amplifica al mismo tiempo que la secuencia de ADN diana, pero utilizando un conjunto diferente de cebadores y una sonda marcada con un segundo fluoróforo. La inclusión del CI en cada reacción evita falsos negativos por presencia de sustancias inhibitorias de la PCR y valida cualquier resultado negativo.

5. APLICACIÓN

Esta prueba permite la detección de *Legionella* spp. en muestras de agua después de la concentración por filtración de membrana y extracción de ADN. También se puede utilizar con otras muestras ambientales. La sonda de ADN específica está etiquetada con FAM. Todo el procedimiento incluye los siguientes pasos principales:



Concentración muestra

Extracción ADN

Configurar y ejecutar PCR

Resultados e interpretación

6. CONTENIDO Y ALMACENAJE

El kit contiene reactivos para 100 ensayos y la muestra contiene reactivos para 10 ensayos.

VIAL	DESCRIPCIÓN	Volumen KIT	Volumen de muestra
A ●	Master Mix V	2 x 840 µl	168 µl
B ●	10x <i>Legionella</i> spp. Assay Mix	210 µl	21 µl
C ●	Control Positivo	70 µl	10 µl
D ○	Control Negativo	70 µl	10 µl

Almacene todo el contenido a -20°C y protéjalo de la luz ya que una exposición excesiva a la luz puede afectar las sondas fluorescentes. Minimice los ciclos de congelación-descongelación. Los reactivos almacenados según las recomendaciones se pueden utilizar hasta la fecha de caducidad indicada en el tubo.

7. MATERIAL NECESARIO Y NO SUMINISTRADO

- Microcentrífuga
- Bloque de calor
- Micropipetas
- Puntas de pipeta resistentes a aerosoles y sin nucleasas
- Tubos de microcentrífuga estériles de 1,5 ml con tapón de rosca adjunto
- Instrumentos en tiempo real equipados con canales de detección FAM y ROX
- Tubos, tiras o placas de PCR en tiempo real con tapa óptica o lámina compatible con el termociclador de PCR en uso
- Solución de lisis (Expl: BIOPREMIER Lysis Buffer Rapid-ref: BIOPEXT-0400)

8. PRECAUCIONES Y RECOMENDACIONES

El uso del KIT DE DETECCIÓN EN TIEMPO REAL *Legionella* spp. implica amplificación por PCR. El kit proporciona todos los reactivos necesarios para la PCR. Para obtener resultados fiables, todo el ensayo se realizará en condiciones que eviten el traspaso de nucleasas o la contaminación cruzada del ADN:

- Prepare alícuotas adecuadas de las soluciones, manténgalas separadas de otros reactivos en el laboratorio y utilice estas alícuotas en lugar de pipetear directamente de las soluciones madre.
- 10. Utilice material de laboratorio sin nucleasas (por ejemplo, pipetas, puntas de pipeta, viales de reacción).
- 11. Use guantes cuando realice el ensayo.
- 12. Para evitar la contaminación cruzada de muestras y reactivos, utilice puntas de pipeta nuevas para prevenir aerosoles.
- 13. Agregue el control positivo después de cerrar todos los tubos.
- Si es posible, separe físicamente los lugares de trabajo para la preparación del ADN.

9. PROCEDIMIENTO

9.1. Preparación de la muestra

Las muestras de agua se concentrarán de acuerdo con la norma ISO 11731: 1998. También se pueden usar otros procedimientos de concentración adecuados.

9.2. Extracción ADN

1. Resuspender el filtrado en 1 ml de agua y centrifugar a 10.000 - 12.000 g durante minutos.
2. Deseche todo el sobrenadante.
3. Añada 200 µl de solución de lisis al sedimento.
- 4 Resuspenda el sedimento agitando con vórtex o pipeteando el reactivo hacia arriba y hacia abajo en el tubo. Asegúrese de que el gránulo esté completamente resuspendido.

5. Coloque el tubo en el bloque de calor a 95 ° C - 100 ° C durante 10 a 15 minutos.
6. Centrifugar a 10.000 - 12.000 g durante 2 minutos.
7. Recupere el sobrenadante en un tubo limpio. Conservar a -20°C si desea reutilizar. Homogeneizar y centrifugar 10,000 - 12,000 g durante 2 minutos antes de volver a usar.

9.3. Preparación de PCR (para PikoReal, Thermo Scientific)

A - mezcla de PCR

Utilice siempre guantes para todos los procedimientos de PCR.

- a) Descongele las soluciones del kit y centrifugue brevemente los viales antes de abrirlos para asegurar la recuperación completa de los volúmenes. Mezcle con cuidado pero a fondo pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- b) Para preparar reacciones estándar de 11 µl, prepare la mezcla de PCR agregando los siguientes volúmenes de componentes del kit:

Nota: los volúmenes indicados a continuación se basan en una única reacción estándar. Prepare el volumen de mezcla adecuado multiplicando las cantidades indicadas por el número de reacciones a realizar (incluido un control positivo y uno negativo) más una o dos reacciones para cubrir las pérdidas por pipeteo.

DESCRIPCIÓN	VIAL	VOLUMEN MUESTRA
Master Mix V	A	8 µl
10x <i>Legionella</i> spp. Assay Mix	B	1 µl
Total Volume		9 µl

- c) Mezcle con cuidado pero minuciosamente pipeteando hacia arriba y hacia abajo (no agite en vórtex). Transfiera 9 µl de PCR Mix a cada tubo de PCR.
- d) Girar brevemente los tubos de muestra antes de abrirlos para evitar contaminaciones cruzadas.
- e) En tubos separados agregue:
2 µl de cada muestra de ADN
2 µl del vial D para el control negativo
2 µl del vial C para el control positivo
- f) Cerrar los tubos de PCR y centrifugar brevemente en una centrifuga adecuada.
- g) Coloque las reacciones en el instrumento de PCR en tiempo real.

B - Configuración del programa, para PikoReal - Thermo Scientific

Prepare el instrumento de PCR en tiempo real de acuerdo con el siguiente programa de temperatura / tiempo:

FASE	PASO	TEMPERATURA	TIEMPO	ADQUISICIÓN
Etapa de espera	Paso 1	95°C	10 min.	No
Amplificación - 40 ciclos	Paso 1	95°C	5 s	No
	Paso 2	56°C	15 s	No
	Paso 3	72°C	15 s	Yes

9.4. INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS

Sonda para *Legionella* spp. La detección de ADN está marcada con FAM y debe analizarse en el canal de fluorescencia correspondiente. La sonda para detectar la amplificación específica del Control Interno (IC) se analiza en el canal ROX. Para cada muestra, compare los resultados obtenidos en cada canal e interprete los resultados como se describe en las siguientes tablas:

a) Controles

Para validar el ensayo, los controles deben tener los siguientes resultados:

	<i>Legionella</i> spp. DETECCIÓN FAM	IC DETECCIÓN ROX
Control Negativo	Ct = NA	Positivo
Control Positivo	Positivo	No significativo

NA: No aplica. Corresponde a la señal que no cruza el umbral.

Tenga en cuenta que si los controles no coinciden con estos resultados, el experimento debe repetirse.

b) Muestras

La interpretación de los resultados de las muestras se resume en la siguiente tabla:

<i>Legionella</i> spp. DETECCIÓN FAM	IC DETECCIÓN ROX	INTERPRETACIÓN
Positivo	No Significativo	Positivo
Ct = NA	Positivo	Negativo
Ct = NA	Ct = NA	Inhibición**

** Cuando tanto *Legionella* spp. y la detección de CI es NA, la muestra debe analizarse nuevamente después de una dilución 1/10.

Nota: Un requisito previo para la discriminación inequívoca de *Legionella* spp. El ADN y el ADN de IC en este experimento son una calibración adecuada de los canales del instrumento de PCR. Consulte el manual de funcionamiento de su cicladora de PCR en tiempo real.

10. ESPECIFICIDAD

Exclusividad del 100%, determinada utilizando 30 cepas de organismos estrechamente relacionados o que se encuentran en el mismo hábitat.

11. SENSIBILIDAD

Este kit detecta 10³ - 10⁴ células / L de agua después de la concentración. Se puede alcanzar un límite de detección de 500 fg de ADN diana con el KIT DE DETECCIÓN EN TIEMPO REAL *Legionella* spp.

REFERENCIAS

Atlas RM (1999). *Legionella*: de los hábitats ambientales a la patología, detección y control de enfermedades. Reinar. Microbiol., 1: 283-293.

Yu VL y col. (2002). Distribución de especies y serogrupos de *Legionella* aislados por cultivo en pacientes con legionelosis adquirida en la comunidad esporádica: una encuesta colaborativa internacional. J. Infect. Enfermedad, 186: 127-128.

13. INFORMACIÓN ADICIONAL

Para cualquier cuestión contacte con: sales.support@biopremier.com

BPMPR está Certificado ISO 9001:2015