

Condaene®

**Condagene® *Legionella* spp
(CAT. 6517)**

Propósito, características y contexto

Propósito

Este kit ha sido diseñado para la detección y cuantificación de *Legionella* spp en muestras de aguas de consumo y todo tipo de aguas continentales (tratadas y no tratadas).

También puede ser usado para la confirmación de colonias sospechosas aisladas en los medios de cultivo selectivo.

Características

Este kit ha sido desarrollado para satisfacer las máximas expectativas de nuestros clientes, en lo que refiere a su desempeño, robustez y es compatible con los recientes avances en PCR.

- Contiene UDG para poder eliminar contaminación por productos de otras PCR (una de las principales fuentes de contaminación).
- La Taq polimerasa contenida:
 - Acepta ciclos rápidos de PCR, por lo que es compatible con los termocicladores de última generación.
 - Es térmicamente muy estable, puede soportar semanas en la nevera o soportar hasta 20 ciclos congelación-descongelación.
- El set de cebadores/sondas es compatible con un protocolo de PCR de viabilidad.
- Incorpora un control interno en concentración estandarizada para poder monitorizar posibles inhibiciones totales o parciales.
- Las sondas incorporan Quenchers de elevada eficiencia.

Contexto técnico y reglamentarios

En lo que refiere al uso de este kit como sistema detección y cuantificación de *Legionella* spp en muestras de aguas, este cumple en con las especificaciones técnicas del documento ISO/TS 12869 *Water quality – Detection and quantification of Legionella spp. and/or Legionella pneumophila by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)*. Las sondas y los cebadores de PCR, son los recomendados en la especificación técnica para *Legionella* spp.

El funcionamiento del kit ha sido verificado conforme a las especificaciones del ISO/TS 12869 y los resultados están a disposición del usuario bajo petición a su distribuidor. La fiabilidad de los resultados y la adecuación del fin previsto, están condicionados por una buena recuperación durante la fase de concentración elución. Esta fase no está dentro del ámbito de este kit, y depende únicamente de las buenas prácticas de cada laboratorio. Recomendamos seguir lo indicado en la norma ISO 11731 de Recuento de *Legionella*, vigente.

Compatibilidad con PCR de viabilidad

Este set de cebadores y sondas es compatible con un procedimiento de PCR de viabilidad.

Dado que, en determinadas muestras, pueden existir células viables, pero no cultivables la aplicación de este tratamiento puede ser una ventaja en términos de evaluación de riesgo.

Para saber más sobre la PCR de viabilidad solicite información adicional su distribuidor.

Instrucciones de uso del kit

Contenidos

Este kit contiene todos los reactivos para realizar la detección del ADN *Legionella* en muestras de aguas concentradas 1:100 o 1:200, y previa purificación de este.

Tabla 1. Contenido de Condagene® *Legionella* spp. (Cat. 6517) , contenido.

REACTIVOS	COLOR	CONTENIDO
5x Reagent mix*	1. Verde	1 x 440µl
Sondas-cebadores qPCR	2. Azul	1 x 100 reacciones
Standard DNA (<i>L.pneumophila</i> ATCC 33152)	3. Amarillo	1x (1x10exp7 UG)
Agua grado PCR	4. Blanco	2 x 1500 µl

*Reagent mix: **Solis Fast Probe® qPCR Mix with UNG (no Rox)** (contiene HOT FIREPol® DNA Polimerasa, UNG, qPCR buffer, dNTP mix -dATP, dCTP, dGTP, dUTP).

Contiene Sondas-cebadores específicos (*Legionella* spp & control interno) y ADN del control interno.

Solis Fast Probe y Hot Firepol® son marcas de Solis Biodyne, de estos reactivos se hace bajo licencia.

Equipamiento adicional requerido

- Kit de purificación de ácidos nucleicos (p.e. Cat. 6501 Kit de Extracción Condagene® Quick).
- Pipetas de volumen variable.
- Puntas de micropipeta estériles, con barrera.
- Termociclador de PCR.
- Tubos de PCR.
- Rack para tubos de PCR.
- Microcentrífuga.
- Vórtex.

Almacenamiento y conservación

En rutina: -20°C

Este Kit es enviado a temperatura ambiente, su conservación a temperatura ambiente no afecta al rendimiento de la 5x HOT FIREPol® qPCR Mastermix debido a que la polimerasa es térmicamente muy estable debido a la tecnología TAG desarrollada por Solis BioDyne.

Una vez recibido se aconseja conservarlo a -20°C, bajo estas condiciones y con un manejo adecuado el rendimiento de kit queda garantizado al menos hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta en la caja. Una vez superado este plazo, y mientras la señal del control positivo este en un rango de $\pm 1,5$ Ct, que en el de series de PCR anteriores, se considera apto para su uso.

El conjunto de reactivos, especialmente el correspondiente a sondas y cebadores (tapón azul no deberían ser sometidos a más de 5 ciclos de congelación-descongelación. Si usted cree que va a ser así, considere fraccionar en diferentes alícuotas.

Estado microbiológico

Productos estériles.

Preparación de los reactivos

Consultar el procedimiento, en la sección 2 (procedimiento operativo).

Reglas Generales

Lea atentamente las hojas de seguridad de este y de todos los productos que va a usar durante todo el ensayo.

Este producto es fabricado y vendido para el control de calidad en alimentos, no ha sido diseñado para ningún otro uso, en especial para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Su uso debe ser llevado a cabo por personal experimentado, y cualificado en el manejo de productos químicos potencialmente peligrosos.

Los usuarios deben tomar decisiones independientes sobre la integridad de la información en función de todas las fuentes disponibles.

Procedimiento operativo

Acciones para realizar antes de empezar

- Reconstituir el ADN Estándar, tapón Amarillo.

Añadir 100 µl de agua grado PCR, (tapón Blanco) y mezclar con la propia pipeta presionando hacia arriba y abajo suavemente, al menos 5 veces. Deje el tubo 15 minutos a temperatura ambiente, y centrifugar 30 segundos a x5000g. Este reactivo es el control + de PCR, con una concentración ajustada a $1,0 \times 10^5$ UG /µl. Para realizar una recta patrón siga las instrucciones de la tabla 2, usando tubos de baja adherencia al ADN. No someta este tubo a más de 2 procesos de congelación-descongelación, si cree que va a tener que usarlo más de 2 veces realice varias alícuotas en tubos de baja retención de ADN. Una vez reconstituido se debe conservar a -20°C.

Tabla 2. Recta patrón para cuantificación.

PATRÓN	DILUCIONES	COPIAS / REACCIÓN (5µl)
1	Estándar (tapón amarillo)	500,000
2	5 µl Estándar 1 + 45 µl Agua grado PCR o TE buffer	50,000
3	5 µl Estándar 2 + 45 µl Agua grado PCR o TE buffer	5,000
4	5 µl Estándar 3 + 45 µl Agua grado PCR o TE buffer	500
5	5 µl Estándar 4 + 45 µ Agua grado PCR o TE buffer	50

El buffer TE da mayor estabilidad del estándar a niveles bajos.

- Reconstituir las Sondas-cebadores qPCR, tapón Azul.

Añadir el volumen completo (440µl) de 5x HOT FIREPol® qPCR Mastermix (tapón Verde) al tubo de Sondas-cebadores qPCR (tapón Azul) y mezclar con la propia pipeta presionando hacia arriba y abajo suavemente, al menos 5 veces. Deje el tubo 15 minutos a temperatura ambiente, y centrifugar 30 segundos a x5000g. Descarte el tubo 1 (tapón Verde), una vez usado. No someta este tubo a más de 5 procesos de congelación-descongelación, si cree que va a tener que usarlo más de 5 veces realice varias alícuotas en tubos de baja retención de ADN si es posible. Una vez reconstituido se debe conservar a -20°C.

- Antes de cada uso, debe asegurarse que los reactivos están completamente descongelados, y le recomendamos hacer un pulso de microcentrifuga (spin) antes de abrirlos.

Procedimiento

1. Prepare la mezcla de reacción, para las muestras y controles conforme a lo especificado en la Tabla 3. Si su equipo necesita de Rox como normalizador siga lo indicado en la Tabla 4. Realice todas las operaciones a temperatura ambiente, de esta manera la UNG podrá estar activa y descontaminar cualquier contaminación cruzada por producto de PCR. Un correcto flujo de trabajo requiere de varios controles, en lo que refiere a la PCR un control positivo y uno de negativo. En lo que refiere al control de la serie analítica se recomienda procesar blanco de muestra también.

Tabla 3. Volúmenes recomendados para una única reacción de qPCR. En cada tanda, multiplique el número total de tubos por 1,1 para asegurar que no faltaran reactivos al dispensar.

COMPONENTES (x1 REACCIÓN)	VOLUMEN
Tubo 2 (Azul) 5x Solis Fast Probe® qPCR (qPCR Cebadores/Sondas, Ci)	4 µl
ROX (opcional pero no suministrado)	x µl ver Tabla 3
Agua grado PCR, Tubo 4 (Blanco)	hasta 11 µl
VOLUMEN REACTIVOS	15 µl
Muestra ADN o Control + o Blanco de PCR*	5 µl
VOLUMEN TOTAL DE REACCIÓN	20 µl

*Ver punto Interpretación de los controles.

Nota: el volumen de muestra inoculado puede variar en función de los intereses del laboratorio, el kit de purificación de ácidos nucleicos y el contexto reglamentario. Si usted está usando nuestro producto Kit de Extracción Condaene® Quick, y partiendo de 1 L de muestra, si necesita que el límite de detección teórico esté en 100 UG/L debe cargar 7,5 µl de ADN. En caso contrario el LD será de 160 UG/L.

2. Cierre los tubos o tiras de PCR y cárguelos en el termociclador siguiendo las instrucciones de este.
3. Programe el termociclador conforme a la Tabla 4, asegúrese que la detección está activa para los canales FAM y HEX.
4. Ponga en marcha el programa de PCR.
5. Proceda con el análisis de resultados.

Tabla 4. Concentración de ROX recomendada para las diferentes plataformas de PCR (producto no incluido en este kit).

PLATAFORMA DE PCR	CONCENTRACIÓN ROX RECOMENDADA	VOLUMEN 10x ROX / 20 µL REACCIÓN
Bio-Rad: CFX96™ & CFX348™, iQ™5 & MyiQ™, Chromo4™, Opticon® 2 & MiniOpticon®		
Qiagen: Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000		
Eppendorf: Mastercycler®: ep realplex2 & ep realplex4	No ROX	No se precisa
Roche: LightCycler® 480 ,LightCycler® 1, 5, 2		
illumina: The Eco™		
Cepheid: SmartCycler® II		
Applied Biosystems: ViiA™ 7, 7500, 7700	0.1x final	0.20 µl of 10xROX
Stratagene: MX3000PTM, MX3005PTM, MX4000PTM		
Applied Biosystems: 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT Fast, StepOne™ & StepOnePlus™	1x final	2.0 µl of 10x ROX

Tabla 5. Protocolo PCR.

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO	COMENTARIOS
Activación inicial	95°C	3 min (180s)	
Ciclo (2 pasos):			
- Desnaturalización	95°C	5s	
- Annealing/Extensión	60°C	40s	Lectura de Fluorescencia
Ciclos	40		

Análisis de resultados

El resultado de la PCR debería de tener un aspecto similar a la gráfica que sigue, en las que las muestras dan señal en función de su concentración y los controles internos de amplificación se agrupan a ciclos elevados, pues este se añade a bajas concentraciones para no interferir en la detección de nuestro analito.

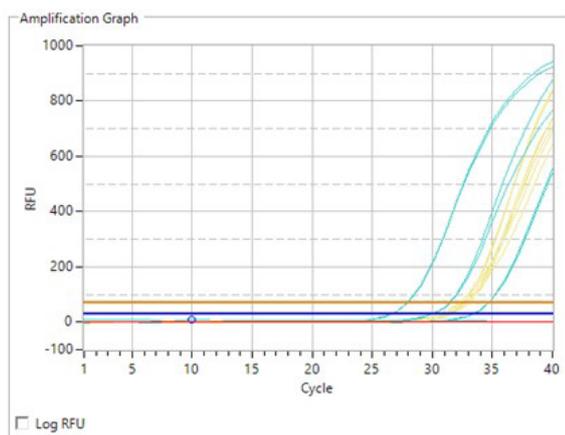


Figura 1. Ejemplo de curva de amplificación, con 5000-500-50 UG de *Legionella* spp por reacción y por duplicado (turquesa). Los controles internos de amplificación aparecen en amarillo.

La interpretación de los resultados debe ser realizada por personal entrenado en el manejo del software del termociclador.

Tabla 6. Posibles resultados de PCR.

CHANNEL FAM	CHANNEL HEX	RESULTADO
+	+	Muestra positiva
+	-	
-	+	Muestra negativa*
-	-	Inhibición de la PCR

*El control interno (canal HEX) tendría que salir en un Ct alrededor de ± 3 Ct con respecto al CI del blanco de PCR, en caso contrario puede ser debido a alguna inhibición parcial por la presencia en la muestra de inhibidores de PCR. Revise el flujo de trabajo seguido y considere repetir la PCR con un extracto de ADN diluido 1/10.

En algunos casos, en las muestras positivas, el control interno puede no dar señal o verse alterado su Ct, esto no supone ninguna caída del rendimiento de Kit, simplemente indica que la amplificación de la diana ha limitado la del CI.

En el caso que el ciclo de PCR contenga una recta de calibración, esta debe ser evaluada conforme a los criterios de la propia **ISO/TS 12869**, por lo que debe presentar una eficiencia de entre 75 y 125%, lo que es lo mismo que una pendiente entre -4.115 y -2.839.

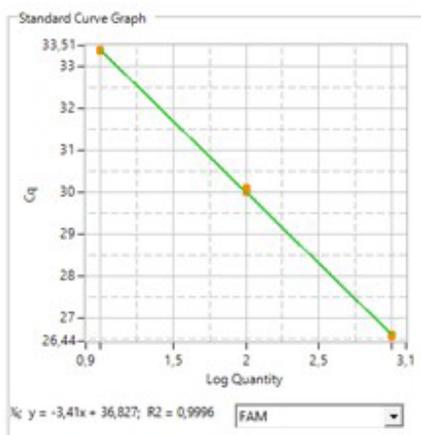


Figura 2. Ejemplo de recta de calibración, en este caso con 5000-500-50 UG reacción por duplicado.

Para calcular la eficiencia en % aplique la siguiente fórmula $e = (10^{-1/a} - 1) \times 100$ donde a es el pendiente de la recta.

El criterio de 75 y 125%, es bastante laxo y en sus extremos, puede dar lugar a sesgos importantes cuando se pretenda dar un resultado cuantitativo. Para aprender algo más sobre ello recomendamos la lectura del siguiente artículo:

www.ncbi.nlm.nih.gov

Interpretación de los controles

Unas buenas prácticas analíticas en PCR conforme a **ISO 22174**, requieren el uso de varios tipos de control. Los de la propia PCR y los de proceso.

Controles de PCR:

- Blanco de PCR, en lugar de muestra se debe cargar con agua PCR.
- Control positivo de PCR, cargar con 5 µL de control positivo (Tapón amarillo).

Si el blanco de PCR da positivo o el control positivo da negativo, revise todos los registros primarios del ensayo para detectar fuentes de error, en caso contrario tome las decisiones oportunas en base a la una fiabilidad analítica comprometida.

Deberían incluirse controles adicionales suplementarios a intervalos regulares de tiempo y sistemáticamente cuando algunos de los controles de PCR no dan los resultados esperados.

Como control de serie analítica, se recomienda como buena práctica, que en cada tanda de trabajo procese una muestra sin contaminar, en paralelo con las otras muestras a ensayar. Por defecto con agua destilada estéril. De esta manera tendrá un control sobre posibles contaminaciones ambientales i/o cruzadas.

En referencia a la recta patrón, en rangos bajos, se debe tener presente la gran dispersión de los resultados, y que incluso en algunas ocasiones puede no haber señal, por simple probabilidad, en el último punto. Una buena práctica analítica es considerar la técnica como cuantitativa en rangos de hasta 10-25 copias reacción, y meramente cualitativa por debajo de este rango.

La fiabilidad de los resultados puede depender del número de réplicas de cada punto de la recta patrón, si se usa una recta robusta o si se usa un único punto de referencia y se normaliza con una recta externa. Es responsabilidad del laboratorio una correcta verificación de la contribución de estos aspectos en el sesgo de los resultados, y la estimación de la incertidumbre global de todo el proceso analítico.

Marcas y licencias

El uso de este producto puede estar cubierto por Licencias, patentes o solicitud de patente pendiente. Los clientes que recibieron este producto pueden usarlo con fines de investigación y evaluación de la calidad en alimentos sin infringir los derechos de propiedad intelectual.

Solis Fast Probe® qPCR, es una marca registrada de Solis BioDyne. Este producto se vende bajo acuerdo entre Conda-lab y Solis BioDyne.

El uso de este producto no está destinado con fines terapéuticos, uso doméstico, agrícola o cosmético. Su uso debe ser supervisado por una persona técnicamente cualificada con experiencia en el manejo de productos químicos potencialmente peligrosos. Los usuarios deben tomar decisiones independientes sobre la integridad de la información en función de todas las fuentes disponibles.

Garantía y descargo de responsabilidad

Condalab garantiza que este producto está libre de defectos en materiales y de mano de obra hasta la fecha de vencimiento impresa en la etiqueta, siempre que se cumpla lo siguiente:

1. El producto se utiliza según las pautas e instrucciones establecidas.
2. Condalab no garantiza su producto contra ninguno y todos los defectos cuando: el defecto aparece como resultado de material o mano de obra no proporcionada por Condalab; defectos causados por mal uso o uso contrario a las Instrucciones suministradas, o si el producto está contaminado por un manejo o almacenamiento incorrecto.
3. Todas las garantías de comerciabilidad e idoneidad para un propósito particular, escrito, oral, expreso o implícito, se extenderán solo por un período de un año a partir de la fecha de fabricación. No hay otras garantías que se extiendan más allá de las descritas en este documento.
4. Condalab no asume ninguna responsabilidad ante ningún comprador de su producto por ningún compromiso, representación o garantía realizada por distribuidores o distribuidores que vendan sus productos más allá de los aquí expresamente expresados, a menos que lo exprese por escrito un representante de Condalab.
5. Condalab no asume responsabilidad por daños incidentales o consecuentes, incluidos, entre otros, la responsabilidad por la pérdida del uso de este producto, la eliminación o el reemplazo de mano de obra, pérdida de tiempo, inconvenientes y gastos por llamadas telefónicas, gastos de envío, pérdida o daños a la propiedad o pérdida de ingresos, lesiones personales o muerte injusta.
6. Condalab se reserva el derecho de reemplazar o abonar el importe de cualquier kit devuelto bajo esta garantía.

Contacto y soporte

Si tiene preguntas o tiene problemas con este o cualquier otro producto de Condalab, comuníquese con nuestro personal de soporte técnico (consulte los detalles en www.condalab.com). Nuestros científicos están comprometidos a brindar asistencia de manera rápida y efectiva. También le recomendamos que se comunique con nosotros si tiene alguna sugerencia para mejorar el rendimiento de nuestro producto o el uso de nuestros productos en nuevos formularios o aplicaciones.



comercial@condalab.com | www.condalab.com

Si necesitas ampliar la información sobre los productos y técnicas qPCR para detección de patógenos, no dudes en contactar con nosotros.