

## Legiofast® ENVIRON

Para la detección y cuantificación rápida e inequívoca de *Legionella pneumophila* por PCR a tiempo real

### INTRODUCCION

*Legionella pneumophila*, una bacteria gramnegativa con forma de bacilo, es el principal agente causante de la legionelosis o enfermedad del legionario. Se halla fundamentalmente en ambientes acuáticos, incluyendo aquellos más directamente relacionados con las actividades humanas, como las torres de refrigeración y los sistemas de distribución de aguas domésticas.

Legiofast® ENVIRON permite la detección rápida por PCR a tiempo real de *Legionella pneumophila*, cualquiera que sea su serogrupo, con unos niveles de fiabilidad, sensibilidad y especificidad inmejorables. Legiofast® ENVIRON se basa en la detección de una diana genética específica para esta bacteria, cuya elevada conservación a nivel de secuencia la diferencia de otros marcadores comúnmente usados. Esta característica, junto 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

Legiofast® ENVIRON se basa en la amplificación por PCR a tiempo real de un gen diana con secuencia específica para detectar todos los serogrupos de *Legionella pneumophila*. Una amplificación positiva indica la presencia de esta bacteria en la muestra.

Legiofast® ENVIRON también puede utilizarse para confirmar colonias aisladas en placa.

### COMPONENTES

#### Presentación

Legiofast® ENVIRON se presenta en viales que contienen reactivos suficientes para realizar 48, 96 ó 480 reacciones.

#### Reactivos suministrados

##### 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 de amplificación (IAC) cuya detección indicará la ausencia de inhibidores. Los primers y sondas necesarios para la amplificación tanto del IAC como del gen diana de *Legionella pneumophila* están también incorporados en la mezcla de reactivos. La sonda de detección de *Legionella* está marcada con el fluorocromo FAM, mientras que la sonda de detección del IAC está marcada con el fluorocromo JOE/HEX. La mix de reacción no contiene ROX.

##### Extracción de ADN

Se incluye DNAready®, un tampón de lisis con proteinasa K para la extracción del ADN directamente del filtro o de cualquier otro concentrado de células.

##### Conservación

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

**Controles:** Además del control interno de amplificación, (IAC) se incluye un control positivo correspondiente a ca. 10<sup>5</sup> genomas/μL de *Legionella pneumophila* spp (ATCC) y un control sin ADN molde (non-template control, agua estéril grado de biología molecular).

##### Almacenamiento

Evitar la exposición directa a la luz. Almacenar a -20 °C para su conservación durante un período prolongado. Evitar ciclos repetidos de congelación/descongelación. En caso de uso frecuente puede mantenerse a 4°C durante un máximo de 4 semanas.

#### Material necesario no suministrado

- Pipetas automáticas de desplazamiento positivo y puntas con filtro.
- Tubos de microcentrífuga
- Guantes desechables de latex sin polvo o nitrilo

### PROTOCOLO PCR

- Pipetear 15 μl de la Mix de Reacción en cada tubo de PCR o pocillo de la placa. Realizar esta operación en una cabina o en un ambiente limpio y bajo luz tenue.
- Cargar 5 μl del extracto de ADN o de una dilución 1/10 del mismo en cada tubo de PCR o pocillo de la placa. Cargar también 5 μl del control positivo o del control blanco (NTC) en los tubos o pocillos correspondientes.
- Colocar los tubos de PCR o la placa en el termociclador. Programar la lectura de fluorescencia en los canales correspondientes a los fluoróforos FAM y JOE/HEX. Usar el siguiente programa de amplificación:

Paso	Evento	Temp.	Tiempo
1	Activación de la ADN polimerasa y desnaturalización de ácidos nucleicos	95 °C	10 minutos
2 (x 40 ciclos)	Desnaturalización Hibridación/Extensión	95 °C 60 °C	15 segundos 1 minuto *

\*La lectura de la fluorescencia debe realizarse durante el paso 2, al final de cada etapa de Hibridación/Extensión a 60°C.

### REACCIONES DE CONTROL

Para cada tanda de termociclador, se recomienda realizar al menos un control blanco (NTC) con 5 μl de agua libre de ADN (incluida en el kit) en lugar de extracto de ADN y un control positivo usando el ADN genómico de *Legionella pneumophila* incluido en el kit.

### PRECAUCIONES

- Deben observarse las Buenas Prácticas de Laboratorio para obtener resultados fiables con esta técnica. La alta sensibilidad del test requiere un cuidado extremo para mantener la pureza de origen de todos los reactivos. Descarten cualquier reactivo que sea sospechoso de estar contaminado.
- Los ácidos nucleicos son muy sensibles a la degradación por parte de las nucleasas. Estas están presentes en la piel y en las superficies en contacto con ella que no se han limpiado debidamente. Limpiar las superficies con los productos adecuados. Usar guantes de un solo uso sin polvo y bata durante todo el procedimiento. Lavarse las manos profusamente al finalizar.
- Este ensayo ha sido validado usando los reactivos suministrados con Legiofast® ENVIRON. El uso de otros métodos de amplificación o cualquier cambio en el protocolo puede producir resultados falsos. NO INTERCAMBIEN COMPONENTES de distintos lotes.
- No usar Legiofast ENVIRON® después de su fecha de caducidad. Almacenar el producto bajo las condiciones indicadas en la caja y en estas instrucciones.
- El uso de este producto está indicado para personal cualificado con experiencia en extracción y amplificación de ADN.
- Esta prueba ha sido diseñada para investigar la presencia de *Legionella pneumophila* en muestras ambientales y alimentarias o cualquier otro propósito relacionado con la I+D. En ningún caso debe usarse Legiofast ENVIRON® como herramienta diagnóstica en muestras clínicas.

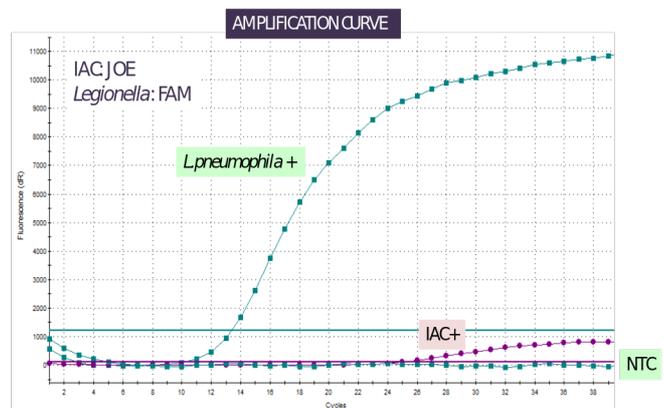
### INCLUSIVIDAD Y EXCLUSIVIDAD

La inclusividad de los primers y sondas de Legiofast® ENVIRON se ha ensayado satisfactoriamente con los 15 serogrupos de *Legionella pneumophila*. La exclusividad se ha comprobado con 44 cepas no-diana entre las que se encuentran 23 *Legionella* spp (no-pneumophila) y una representación de los principales grupos filogenéticos bacterianos conocidos.

### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Una reacción se considerará positiva cuando la fluorescencia correspondiente a *L. pneumophila* (FAM) resulte mayor que el valor umbral determinado por el control positivo. Las amplificaciones de ADN tanto de *L. pneumophila* y del control interno (IAC) pueden distinguirse fácilmente seleccionando el canal de fluorescencia apropiado.

El resultado será negativo cuando la fluorescencia de *L. pneumophila* (FAM) se mantenga por debajo del valor umbral y la del IAC (JOE/HEX) cruce el valor umbral correspondiente.



**Nota:** El valor de Ct de referencia para el IAC es el del NTC y puede depender del software de cada equipo.

Para más información leer la guía de interpretación de resultados:  
[http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia\\_resultados\\_PCR\\_20131205.pdf](http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia_resultados_PCR_20131205.pdf)

## RESOLUCION DE PROBLEMAS

PROBLEMA	CAUSA	SOLUCION
No se detecta señal específica para <i>L. pneumophila</i> ni para IAC	Inhibición de la PCR	Diluir el extracto de ADN 1/10 o 1/10 (dependiendo de la matriz) y repetir el análisis o usar un kit de extracción que incluya un paso de purificación del ADN para eliminar las sustancias inhibidoras. Comprobar la fecha de caducidad.
	Malas condiciones de almacenamiento de la Mix de Reacción.	Guardar la Mix de reacción a la temperatura recomendada y evitar el contacto con la luz directa.
Se obtiene señal para <i>L. pneumophila</i> pero no para el IAC.	Amplificación preferente del ADN de <i>L. pneumophila</i> debido a elevada concentración en el extracto.	La reacción es correcta y positiva para <i>L. pneumophila</i> .
Amplificación específica de <i>L. pneumophila</i> en controles blancos (NTC).	Contaminación de materiales o reactivos.	<p>Repetir el análisis con reactivos nuevos y pipetas limpias. Limpiar las superficies con hipoclorito o lejía diluida (10%) o un producto similar.</p> <p>Repetir el análisis con un tubo nuevo de Legiofast®.</p> <p>Si la contaminación persiste, contactar con nuestro Departamento Técnico.</p>
No se obtiene amplificación en los tubos con control positivo de <i>L. pneumophila</i> .	<p>Sin amplificación del IAC: mal almacenamiento de la Mix de Reacción.</p> <p>Con amplificación del IAC: error de pipeteo o degradación del ADN del control positivo.</p>	<p>Almacenar la Mix de Reacción y los controles en las condiciones indicadas. Repetir el análisis.</p> <p>Usar un Control positivo nuevo y asegurarse que la cantidad pipeteada entra en la reacción. Repetir el análisis.</p>

## PROTOCOLO RECOMENDADO

