Microbial

Legioplex®

Detección y cuantificación rápida e inequívoca de *Legionella* spp.y *Legionella pneumophila* 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.

Cada vez es más frecuente la necesidad de descartar o confirmar la presencia de la especie *L. pneumophila* en aquellas muestras que resultan positivas para *Legionella* spp, por lo que una herramienta que permita la detección simultánea de ambos puede resultar de gran utilidad.

Legioplex® permite la detección rápida y simultánea, en una sola reacción de PCR a tiempo real de todas las especies del género *Legionella* y de *Legionella pneumophila* de forma específica con unos niveles de fiabilidad, sensibilidad y especificidad muy elevados. Legioplex® es una combinación multiplexada en una sola reacción de los detectores base en nuestros kits Legiofast SPECIES y Legiofast ENVIRON. Ambos sistemas contienen primers y sondas de hidrólisis recomendados por la norma ISO/TS:12869:2012 cumpliendo con las especificacines técnicas, que incluyen la incorporación de un control interno de amplificación (IAC), que 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

Legioplex® se basa en la amplificación por PCR a tiempo real de secuencias conservadas de los gene 16S rRNA y mip de *Legionella* spp y *L. pneumophila*, respectivamente. La detección de esta secuencias diana indica la presencia de bacterias de este género y/o de la especie *L. pneumophila* en la muestra.

Legioplex® también puede utilizarse para confirmar colonias aisladas en placa.

COMPONENTES

Presentación

Legioplex® se presenta en viales con reactivos suficientes para realizar 48 o 96 reacciones.

Reactivos incluidos en el kit

Mix de Reacción: contiene tampón, dNTPs, DNA polimerasa Hot-Start, agua estéril bidestilada libre de ácidos nucleicos y $MgCl_2$ 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 amplificación indicará la ausencia de inhibidores. Los primers y sondas necesarios para la amplificación tanto del IAC como de los gene diana están también incorporados en la mezcla de reactivos. La sonda de detección de *Legionella* spp. está marcada con el fluorocromo FAM, la de Legionella pneumophila con el fluorocromo HEX y la sonda de detección del IAC está marcada con el fluorocromo CY5. La mix de reacción no contiene ROX

Controles:

Se suministra un control positivo de *Legionella pneumophila* LPN457 a ca. 10^4 copias/µl y H_2O grado Biología Molecular (sin nucleasas) para los controles negativos (NTC).

Almacenamiento

Evitar la exposición directa a la luz. Conservar a -20 ºC. Evitar ciclos repetidos de congelación/descongelación. En caso de uso frecuente puede mantenerse a 4ºC 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 látex sin polvo o nitrilo
- Tubos de PCR con tapón óptico.

PROCEDIMIENTO

Filtrar un volumen conocido de agua y extraer el ADN del filtro o de las células recuperadas del mismo con el método de elección. Siempre que sea posible, se recomienda trabajar con extractos de ADN purificados.

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	Temperatura	Tiempo
1	Activación de la ADN polimerasa y desnaturalización de los ácidos nucleicos	95 ºC	10 min
2	Desnaturalización	95 ºC	15 sec
(40 ×)	Hibridación/extensión	60 ºC	1 min*

*Lectura de la fluorescencia recomendada tras el paso 2

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* incluido en el kit.

OBSERVACIONES Y PRECAUCIONES

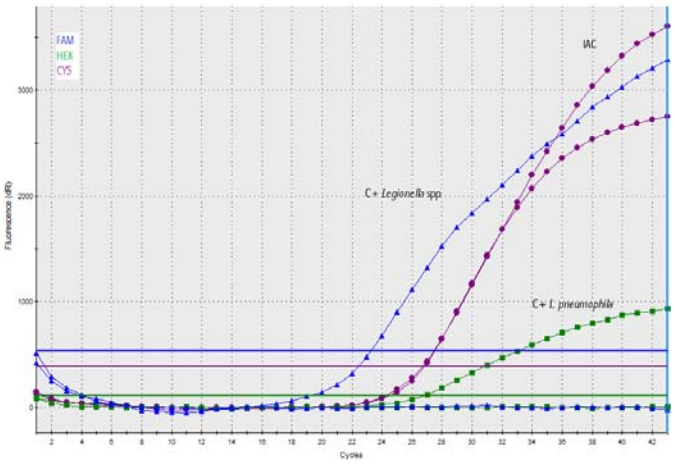
- Deben observarse las Buenas Prácticas de Laboratorio para obtener resultados fiables con esta técnica. La alta sensibilidad del test requiere un cuidado extremo para mantener la pureza de origen de todos los reactivos. Descarten cualquier reactivo que sea sospechoso de estar contaminado.
- Los ácidos nucleicos son muy sensibles a la degradación por parte de las nucleasas. Éstas 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 **Legioplex®**. 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 **Legioplex®** 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* spp. en muestras ambientales y alimentarias o cualquier otro propósito relacionado con la I+D. En ningún caso debe usarse **Legioplex®** como herramienta diagnóstica en muestras clínicas.

INCLUSIVIDAD Y EXCLUSIVIDAD

La inclusividad de los primers y sondas de **Legioplex®** se ha ensayado satisfactoriamente en 14 cepas de *L. pneumophila* y 30 especies del género *Legionella* (Jonas 1995. Wellinghausen et al 2001)

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Una reacción se considerará positiva cuando la fluorescencia correspondiente a los organismos diana (FAM y/o HEX) resulte mayor que el valor umbral determinado por el



control positivo. Las amplificaciones de ADN tanto de los organismos diana como del control interno (IAC) pueden distinguirse fácilmente seleccionando el canal de fluorescencia apropiado.

El resultado será negativo cuando la fluorescencia del organismo diana (FAM o HEX) se mantenga por debajo del valor umbral y la del IAC (CY5) 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.

Jonas, D., Rosenbaum, A., Weyrich, S., & Bhakdi, S. (1995). Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of legionellae in bronchoalveolar fluid. J Clin Microbiol, 33(5), 1247–1252.
Wellinghausen, N., Frost, C., & Marre, R. (2001). Detection of Legionellae in Hospital Water Samples by Quantitative Real-Time LightCycler PCR. Appl. Environ. Microbiol., 67(9), 3985–3993.

Problema	Causa	Solución
No se detecta señal específica para ninguna de las dos dianas de *Legionella* 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 una o ambas Legionellas pero no para el IAC.	Amplificación preferente del ADN de *Legionella* debido a elevada concentración en el extracto.	La reacción es correcta y positiva para *Legionella*.
Amplificación específica de *Legionella* en controles blancos (NTC).	Contaminación de materiales o reactivos.	Repetir el análisis con reactivos nuevos y pipetas limpias. Limpiar las superficies con hipoclorito o lejía diluida (10%) o un producto similar. Repetir el análisis con un tubo nuevo de **Legioplex**®. Si la contaminación persiste, contactar con nuestro Departamento Técnico.
No se obtiene amplificación en los tubos con control positivo de *Legionella*.	Sin amplificación del IAC: mal almacenamiento de la Mix de Reacción. Con amplificación del IAC: error de pipeteo o degradación del ADN del control positivo.	Almacenar la Mix de Reacción y los controles en las condiciones indicadas. Repetir el análisis. Usar un Control positivo nuevo y asegurarse que la cantidad pipeteada entra en la reacción. Repetir el análisis.

Para más información consulten la guía de interpretación de resultados:
http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia_resultados_PCR_20131205.pdf

Protocolo recomendado para la detección y cuantificación de *Legionella* spp por qPCR

Screening:

1. Filtrar 1L con filtro de policarbonato de 0,45 um de diámetro de poro según especificaciones ISO 11731. En caso de muestras que saturan el filtro rápidamente, filtrar el máximo posible usando, si es preciso, más de un filtro y anotar el volumen.
2. Resuspender el filtrado en 5 a 10 ml de agua destilada estéril o Ringer
3. Centrifugar un volumen de 2,5 a 5 ml a 8000 × g durante 10 minutos. Descartar el sobrenadante
   (Si el objetivo del análisis es la cuantificación de viables, aplicar el PMA tras este paso y antes de la extracción y purificación de ADN)
4. Proceder a la extracción de ADN del sedimento con el método de elección
5. En caso de usar sistema de purificación del ADN con columna de sílica o bolas magnéticas (por exemplo Maxwell RSC de Promega) eluir en 50 ul

Cuantificación:

1. Realizar una curva patrón siguiendo las especificaciones de la norma ISO/TS:12869:2012. De forma breve
   1.1. Preparar una suspensión de un cultivo activo de *Legionella pneumophila* (máximo 3 días de crecimiento)
   1.2. Concentrar o diluir la suspensión hasta que alcance una densidad óptica de 0,5 a 600 nm, euivalente a 10^9 ufc/ml
4. Extraer el ADN con el mismo procedimiento que se usará para las muestras.
5. Determinar la concentración de ADN del extracto
6. Calcular el número de unidades genómicas a partir del peso medio del genoma de *Legionella pneumophila* (3,5 MB)
7. Preparar un banco de diluciones decimales con un rango dinámico de 5 logs a partir de 10 UG/µl
8. Expresar los resultados en Unidades Genómicas por litro de agua filtrada. Para los cálculos tener en cuenta el volumen filtrado, la porción de filtro o volumen de resuspensión analizado, el volumen de carga en la PCR y la dilución del extracto en su caso.