

Listerfast®

para la detección rápida e inequívoca de *Listeria monocytogenes* mediante PCR a tiempo real

INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es un bacilo grampositivo no formador de esporas que puede causar una amplia variedad de infecciones, incluyendo gastroenteritis, septicemia, abortos y meningitis, tanto en animales como en humanos. *L. monocytogenes* puede ser detectada principalmente en productos lácteos, carnes y verduras crudas. Su capacidad para crecer a bajas temperaturas permite la proliferación de esta bacteria incluso en alimentos refrigerados.

Listerfast® permite la detección rápida por PCR a tiempo real de *Listeria monocytogenes* con unos niveles de fiabilidad, sensibilidad y especificidad inmejorables. Listerfast® se basa en la detección de una diana genética específica para esta bacteria que, con la inclusión de un control interno de amplificación (IAC), 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

Listerfast® se basa en la amplificación por PCR a tiempo real de un gen diana con secuencia específica para detectar *Listeria monocytogenes*. Una amplificación positiva indica la presencia de esta bacteria en la muestra.

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

COMPONENTES

Presentación

Listerfast® se presenta en cajas de 48, 96 ó 480 reacciones.

Supplied reagents

Mix de Reacción

Contiene tampón, dNTPs, DNA polimerasa Hot-Start, agua estéril bidestilada libre de ácidos nucleicos y MgCl₂ 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 *Listeria* están también incorporados en la mezcla de reactivos. Las sondas de detección de *Listeria* y la del IAC están marcadas con los fluoróforos FAM y JOE/HEX, respectivamente. La Mix de Reacción no contiene ROX.

Controles

Se incluye un control positivo (ADN genómico de *Listeria monocytogenes*) y un control blanco (agua libre de ADN) también llamado NTC (Non Template Control).

Conservación

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

Materiales requeridos pero no suministrados

- Pipetas automáticas y puntas con filtro.
- Tubos de microcentrifugadora y de PCR
- Guantes de látex o nitrilo sin polvo.

PROTOCOLO

Extracción de ADN

Centrifugar 1 ml del enriquecimiento en Half Fraser durante 5 minutos a 8000 ×g, descartar el sobrenadante y extraer el ADN del pellet usando DNAready® u otro método de elección. Véase más adelante el protocolo de extracción con DNAready®

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	Temperatura	Tiempo
1	Activación de la ADN polimerasa y desnaturalización de ácidos nucleicos	95 °C	10 minutos
2	Desnaturalización	95 °C	15 segundos
(40 ciclos)	Hibridación/extensión	60 °C	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 *Listeria* incluido en el kit.

IMPORTANTE:

- Seguir las definiciones y requerimientos generales de la norma ISO22174:2005 *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens* --
- 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 Listerfast®. 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 Listerfast® 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 *Listeria monocytogenes* en muestras ambientales y alimentarias o cualquier otro propósito relacionado con la I+D. En ningún caso debe usarse Listerfast® como herramienta diagnóstica en muestras clínicas.

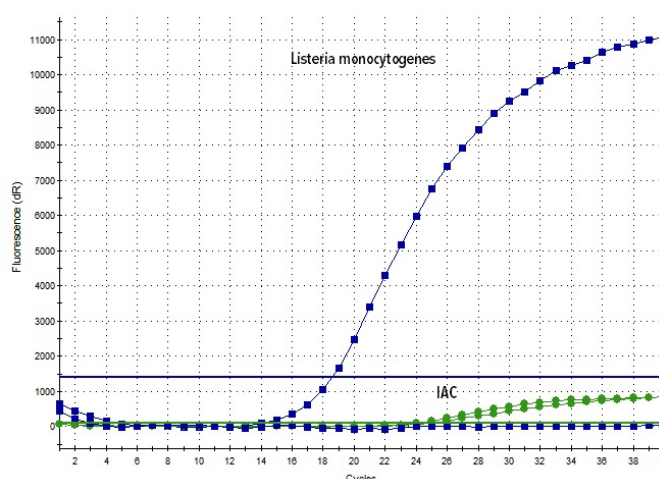
INCLUSIVIDAD Y EXCLUSIVIDAD

La inclusividad de los primers y sondas de Listerfast® se ha ensayado satisfactoriamente con 48 cepas de referencia de *L. monocytogenes* (serovares 1 al 7) provenientes de distintas colecciones de cultivos tipo (Española, Alemana, Francesa e Inglesa) además de aislados de muestras alimentarias, clínicas y ambientales depositados en distintos centros veterinarios y de investigación en seguridad alimentaria. La exclusividad se ha comprobado con 94 cepas no-diana compuestas por 51 cepas de *Listeria no-monoctyogenes* y 43 cepas de otros géneros.

RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

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

El resultado será negativo cuando la fluorescencia de *Listeria* (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

Problema	Causa	Solución
No se detecta señal específica para <i>Listeria</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 inhibitoras. Comprobar la fecha de caducidad.
	Malas condiciones de almacenamiento de la Mix de Reacción.	Almacenar la Mix de reacción a la temperatura recomendada y evitar su exposición a la luz.
Se obtiene señal para <i>Listeria</i> pero no para el IAC.	Amplificación preferente del ADN de <i>Listeria</i> debido a elevada concentración en el extracto.	La reacción es correcta y positiva para <i>Listeria</i> .
Amplificación específica de <i>Listeria</i> 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 Listerfast®. Si la contaminación persiste, contactar con nuestro Departamento Técnico.
No se obtiene amplificación en los tubos con control positivo de <i>Listeria</i> .	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.

PROTOCOLO PROPUESTO

1. Preparación de la muestra

Aplicar especificaciones técnicas de la norma ISO 6887-1 to 5: *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination*.

Procedimiento:

Preparar una suspensión inicial 1/10 del alimento (típicamente 25 g or 25 ml of food + 225 ml de caldo Half Fraser precalentado a 37°C)

Homogeneizar usando el Stomacher o equivalente durante 1 min

2. Cultivo de enriquecimiento

Incubar a 37 °C durante 24 ± 2 h. Inocular 1 ml del enriquecimiento en un tubo conteniendo 9 ml de caldo Fraser.

Tras la incubación, puede mantener el caldo a 4 °C hasta un máximo de 72 h, si el paso 3 no puede realizarse inmediatamente.

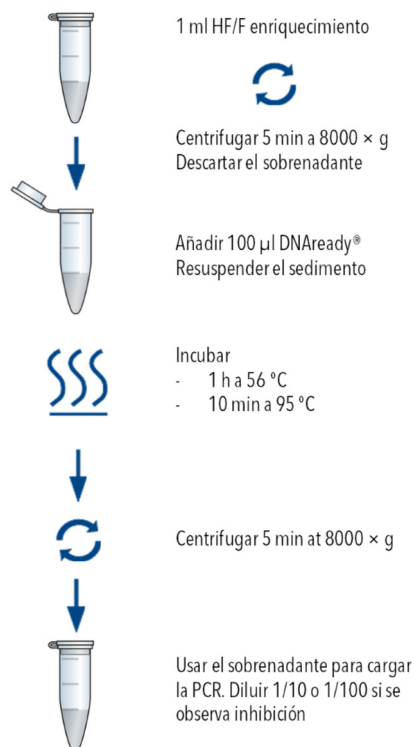
3. Extracción de ADN

Colocar 1 ml de caldo en un tubo de microcentrifuga (Eppendorf) y centrifugar a 8000 × g durante 5 min. Descartar el sobrenadante.

Resuspender el sedimento con 100 µl de DNAREady®.

Seguir las especificaciones para este procedimiento de extracción.

Extracción de ADN con DNAREady® *



* Disponible en la versión "complet"

Microbial SL