

Condaene®

**Condagene® Listeria
monocytogenes (CAT. 6516)**

Propósito, características y contexto

Propósito

Este kit ha sido diseñado para la detección del microorganismo patógeno *Listeria monocytogenes* en porciones de alimentos sometidas a enriquecimiento conforme los procedimientos estándar de microbiología. 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.
- Conforme a Norma ISO 20837:2007. Incorporando 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 de detección de *Listeria monocytogenes*, está basado en las especificaciones técnicas del método **FDA, BAM Protocol Simultaneous Confirmation of *Listeria* species and *L. monocytogenes* isolates by real-time PCR (26/03/2018)**.

Por otro lado, cumple con los preceptos de los estándar ISO en materia de PCR que le aplican:

- **ISO 20837:2006** *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos. Requisitos para la preparación de las muestras para la detección cualitativa.* En especial al referir como método de enriquecimiento lo indicado en la norma **ISO 11290-1:2017** (*Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y de *Listeria* spp. Parte 1: Método de detección*).
- **ISO 20838:2006** *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos. Requisitos para la amplificación y la detección para los métodos cualitativos.* En especial en lo que refiere a la verificación de la especificidad de los cebadores de PCR, que empíricamente queda demostrada, también, por el propio desarrollo del BAM de la FDA.
- **ISO 22174:2005** *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos. Requisitos generales y definiciones.* En especial a los controles recomendados conforme su punto 9.3 y la tabla 1.

Por otro lado, ver referencias al estudio de validación complementario realizado por Condalab, basado en:

- **ISO 22118:2011** *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección y cuantificación de patógenos en los alimentos. Características de funcionamiento.*
- **ISO 16140-2:2016** *Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Parte 2: Protocolo para la validación de métodos alternativos (registrados) frente a los métodos de referencia.* En lo que refiere al límite de detección relativo.

En este estudio el fabricante, garantiza que el uso del Kit de PCR junto con reactivo de extracción de ácidos nucleicos (Cat. 6500 Kit de Extracción Condagene® Complex) es apto las categorías que alimentos que pueden contener este microorganismo cuando el enriquecimiento se lleva conforme a la **ISO 11290-1**.

- **ISO 11290-1:2017** *Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de Listeria monocytogenes y de Listeria spp. Parte 1: Método de detección.* (ISO 11290-1:2017).

En lo que refiere al uso de este kit como herramienta de confirmación de colonias, este uso queda amparado por la **Norma ISO 7218: A1 2013** *Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico*, en el punto 12.5.

A) Método de ensayo

1. Incubación de una porción de muestra (25g o 25mL) en caldo Fraser ½ a 30±1°C, 26-28 h. La preparación de la muestra debe seguir lo indicado en las normas **ISO 6887** que le aplicara.

Nota: Para un límite de detección operativo de 5 UG reacción y conforme a este método de ensayo, los niveles necesarios totales de *Listeria monocytogenes* a las 26 horas deberían llegar a 1.75×10⁵ ufc en 225mL de caldo Fraser ½. En la literatura científica se ha estimado que la tasa de crecimiento en estas condiciones [1] oscila entre de 0,3 h⁻¹ hasta 0,91 h⁻¹. Suponiendo que inicialmente la contaminación fuera de 1 ufc en 25 gr de alimento y considerando una tasa de división de 1 hora, serían suficientes 18,5 horas para llegar superar el umbral de detección. Incluso superando un largo periodo de aclimatación, 26 horas deberían ser suficientes para detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* y así se ha verificado en el estudio de validación para la inmensa mayoría de matrices.

Nota: El enriquecimiento secundario se puede omitir si se ha demostrado que para el examen de un grupo de matrices el enriquecimiento primario logra al menos la misma sensibilidad. En caso contrario, transferir 0,1 mL de Enriquecimiento Primario a 10 mL de caldo Fraser precalentado e incubar a 37±1 °C, 24±2h.

2. Recuperar 1 mL del caldo de enriquecimiento para realizar la purificación de ácidos nucleicos. Recomendamos como uso general el Cat. 6500 Kit de Extracción Condagene Complex.
3. Realización de la PCR conforme a este kit. En caso de positivo, si no se aplica un protocolo de vPCR, confirmar por aislamiento conforme lo indicado en la norma **ISO 11290-1** vigente.

B) 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 [2], la aplicación de un procedimiento de vPCR puede ser una ventaja en términos de evaluación de riesgo:

- Confirma que las células detectadas son viables.
- En situaciones de niveles bajos de *Listeria*, no se cuestiona que el positivo sea debido DNA residual.

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

¹ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27554154/>

² <https://aem.asm.org/content/aem/75/7/2132.full.pdf>

Instrucciones de uso del kit

Contenidos

El kit de detección de *Listeria monocytogenes* por qPCR contiene todos los reactivos para realizar la detección del ADN de este microorganismo en alícuotas del caldo de preenriquecimiento, y previa purificación de este.

Tabla 1. Contenido de Condagene® *Listeria monocytogenes*

REACTIVOS	COLOR	CONTENIDO
5x Reagent mix*	1. Verde	1 x 440µl
Sondas-cebadores qPCR	2. Azul	1 x 100 reacciones
Standard DNA (<i>L.monocytogenes</i>)	3. Amarillo	1x (1x10 ⁷ 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 (*Listeria monocytogenes* & control interno) y DNA del control interno.

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

Equipamiento adicional requerido

- Kit purificación ácidos nucleicos (p.e. Cat. 6500 Kit de Extracción Condagene® Complex).
- Pipetas de volumen variable.
- Puntas de micropipeta estériles, con barrera.
- Termociclador PCR.
- Tubos de PCR.
- Rack para tubos de PCR.
- Microcentrífuga.
- Vórtex.

Almacenamiento y conservación

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. El fabricante no se hace responsable de ningún daño resultante de la manipulación o el contacto con el producto.

Procedimiento operativo

Acciones para realizar antes de empezar

- Reconstituir el Standard DNA, tapón Amarillo.

Añadir 100-250 μ l de agua grado PCR, (tapón Blanco) y mezclar con la propia pipeta presionando hacia arriba y abajo suavemente, al menos 5 veces. Este reactivo es el control + de PCR, cuando sea necesario añada 5 μ l en la mezcla de reacción del tubo con el control positivo de PCR. 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 DNA si es posible. Una vez reconstituido se debe conservar a -20°C.

- Reconstituir las Sondas-cebadores qPCR, tapón Azul.

Añadir el volumen completo (440 μ l) 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 reposar la mezcla unos minutos y vuelva a homogenizar. 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 DNA 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 2. Si su equipo necesita de ROX como normalizador siga lo indicado en la Tabla 3. 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 2. Volúmenes recomendados para una sola mezcla de reacción de qPCR. Para cada lote, multiplique x1,1 y por el total de muestras para asegurar que no falten reactivos.

COMPONENTES (X1 REACCIÓN)	VOLUMEN
Tubo 2 (Azul) 5x Solis Fast Probe® qPCR (qPCR Cebadores/Sondas, Ci)	4 µl
	x µl , ver Tabla 3
ROX (opcional pero no suministrado) Agua grado PCR, Tubo 4 (Blanco)	hasta 11 µl
VOLÚMENES REACTIVOS	15 µL
Muestra DNA o Control + o Blanco de PCR*	5 µl
VOLUMEN TOTAL DE REACCIÓN	20 µL

*Ver punto Procedimientos

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 3. Concentración de ROX recomendada para las diferentes plataformas de PCR (producto no incluido en este kit). Puede comprar este producto en Sigma-Aldrich (Ref. R4526.)

EQUIPO DE QPCR	CONCENTRACIÓN ROX RECOMENDADA	VOLUMEN 10X ROX / 20 µL REACCIÓN
Applied Biosystems: ViiA™ 7, 7500, 7700	0.1x final	0.20 µl de 10x ROX
Agilent: AriaMx, MX3000P™, MX3005P™, MX4000P™		
Applied Biosystems: 7900HT, QuantStudio™ qPCR Systems, StepOne™ & StepOnePlus™	1x final	2.0 µl de 10x ROX

Tabla 4. Protocolo PCR

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO	COMENTARIOS
Activación inicial	95°C	3 min (180 s)	
Amplificación (2 pasos)			
Desnaturalización	95°C	15 s	
Annealing/Extensión	60°C	60 s	Lectura de fluorescencia
Total ciclos	45		

Análisis de resultados

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

Tabla 5. 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. En caso de ausencia de señal en el canal FAM, revise el flujo de trabajo seguido y considere repetir la PCR con un extracto de DNA 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.

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 μ L 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 y/o cruzadas.

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.

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 Condalab 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 calificada 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.

El fabricante no se hace responsable de ningún daño resultante de la manipulación o el contacto con el este producto.

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.