

bactotype[®] C. burnetii PCR Kit Manual

Para la detección de ADN de *Coxiella burnetii*

Certificado conforme al artículo 11 (2) de la ley alemana de sanidad animal, n.º MA: FLI-C 071



96 reacciones (n.º de catálogo BT285885)



INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b,
04103 Leipzig, Alemania

Contenido

Contenido del kit	3
Uso previsto	3
Símbolos	4
Control de calidad.....	4
Almacenamiento	5
Información de seguridad	5
Introducción	6
Principio	6
Extracción del ADN.....	7
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario.....	9
Notas importantes.....	10
Precauciones generales	10
Protocolo: PCR en tiempo real para detectar el ADN de <i>Coxiella burnetii</i>	12
Cuestiones importantes antes de comenzar	12
Antes de comenzar	13
Procedimiento	13
Análisis e interpretación de los datos	16
Interpretación de los resultados (análisis cualitativo)	16
Interpretación de los resultados (análisis cuantitativo).....	18
Índice de cambios	20

Contenido del kit

bactotype <i>C. burnetii</i> PCR Kit	(96)
N.º de catálogo	BT285885
Número de reacciones	96
Master Mix (mezcla maestra) (tubo con tapón naranja); incluye primers, sondas y enzimas	2 × 980 µl
Positive Control (control positivo) (tubo con tapón rojo)	1 × 150 µl
Negative Control (control negativo) (tubo con tapón azul)	1 × 150 µl
Cox Standard (patrón Cox) (tubo con tapón transparente)	1 × 50 µl
Manual	1










Uso previsto

El bactotype *C. burnetii* PCR Kit se ha diseñado para detectar y cuantificar el ADN de *Coxiella burnetii* en la leche (muestras de leche de cuarto, leche a granel), exudados individuales o agrupados (vaginales, cervicouterinos, placentarios), heces, tejido fetal y moco vaginal de ganado vacuno, ovino y caprino. Se pueden analizar hasta 3 muestras de exudado individuales de manera agrupada.

Este kit está autorizado por el Friedrich-Loeffler-Institut y ha sido certificado conforme al artículo 11 (2) de la ley alemana de sanidad animal (FLI-C 071) para su uso en Alemania en procedimientos de diagnóstico veterinario.

Para uso exclusivo en el ámbito veterinario.

Símbolos

	Fabricante legal
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	Límites de temperatura para almacenamiento
	Manual
	Número de catálogo
	Número de material
	Proteger de la luz
	Para muestras de ganado vacuno, ovino y caprino

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de INDICAL, cada lote del bactotype *C. burnetii* PCR Kit se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad del producto.

Almacenamiento

Los componentes del bactotype *C. burnetii* PCR Kit deben almacenarse a una temperatura comprendida entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Evite repetir el ciclo de descongelación-congelación (>2 veces), ya que esta práctica reduce la sensibilidad del ensayo. Congele los componentes en alícuotas únicamente si van a utilizarse de forma intermitente.

Información de seguridad

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes. Puede solicitarlas a su representante de ventas local o por correo electrónico a **compliance@indical.com**.

Todos los residuos de muestras y los objetos que han estado en contacto con las mismas deben descontaminarse o eliminarse como material potencialmente infeccioso.

Introducción

El bactotype *C. burnetii* PCR Kit es una solución muy sensible y específica para detectar y cuantificar el ADN de *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) en muestras de leche de rumiante (muestras de leche de cuarto, leche a granel), exudados individuales o agrupados (vaginales, cervicouterinos, placentarios), heces, tejido fetal y moco vaginal de ganado vacuno, ovino y caprino.

La fiebre Q es una zoonosis mundial causada por *C. burnetii*. Esta bacteria gramnegativa intracelular puede infectar a una gran variedad de anfitriones (p. ej., ganado vacuno, bovino y caprino).

Las infecciones causadas por *C. burnetii* con frecuencia son infecciones subclínicas en los rumiantes, pero también pueden causar abortos y la disminución del rendimiento reproductivo.

En humanos, *C. burnetii* puede causar síndrome seudogripal, pero también neumonía atípica o hepatitis. Se cree que se produce una infección principalmente a causa de los aerosoles que generan animales o productos animales infectados.

Principio

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en la amplificación de regiones específicas del genoma de un patógeno. En la PCR en tiempo real, el producto amplificado se identifica mediante marcadores de fluorescencia. Estos suelen estar ligados a sondas oligonucleotídicas que se unen específicamente al producto amplificado. La supervisión de las intensidades de la fluorescencia durante la serie de PCR (es decir, en tiempo real) permite detectar el producto acumulado sin necesidad de volver a abrir los tubos de reacción posteriormente.

El bactotype *C. burnetii* PCR Kit contiene todos los reactivos necesarios para detectar y cuantificar el ADN de *Coxiella burnetii*, incluido un control positivo y negativo, así como un control interno y un patrón de ADN.

El control interno reduce el riesgo de resultados negativos falsos debido a la inhibición de la PCR o a la extracción insuficiente de la muestra.

El kit utiliza dos combinaciones específicas de primer/sonda:

- Fluorescencia FAM™ para ADN de *Coxiella burnetii*
- Fluorescencia HEX™ para el control interno (ADN de la β -actina, presente en la muestra)

El Positive Control sirve para verificar la funcionalidad del ensayo; p. ej., que la mezcla de reacción se ha configurado correctamente.

Extracción del ADN

El bactotype *C. burnetii* PCR Kit se puede utilizar para detectar y cuantificar el ADN de *Coxiella burnetii* de ganado vacuno, bovino y caprino en:

- leche (muestras de leche de cuarto, leche a granel)
- exudados individuales o agrupados (vaginales, cervicouterinos, placentarios)
- heces
- tejido fetal
- moco vaginal

Se pueden analizar hasta 3 muestras de exudado individuales de manera agrupada.

Antes de realizar la PCR en tiempo real, debe extraerse ADN bacteriano del material de partida. INDICAL ofrece una variedad de kits validados para la extracción de ADN de muestras animales.

Nota: Puede ser necesario efectuar un pretratamiento específico en las muestras.

Extracción basada en microesferas magnéticas:

- **IndiMag® Mastitis Kit** (para la extracción de muestras de leche; SP947757; anteriormente llamado MagAttract® Mastitis Kit)
- **IndiMag Pathogen Kit** (SP947457; anteriormente llamado MagAttract 96 cador® Pathogen Kit)
- **IndiMag Pathogen Kit w/o plastics** (SP947257; anteriormente llamado MagAttract 96 cador Pathogen Kit w/o Plastics)

Extracción basada en columnas de centrifugado:

- **IndiSpin® Mastitis Kit** (para la extracción de muestras de leche; SP69805; anteriormente llamado DNeasy® Mastitis Mini Kit)
- **IndiSpin Pathogen Kit** (SP54104, SP54106; anteriormente llamado QIAamp® cador Pathogen Mini Kit)
- **IndiSpin QIAcube® HT Pathogen Kit** (SP54161; anteriormente llamado cador Pathogen 96 QIAcube HT Kit)

Si la PCR en tiempo real no se realiza inmediatamente después de la extracción, almacene el ADN a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o bien a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para un almacenamiento más prolongado.

Para obtener más información sobre la extracción automática y manual de ADN de *Coxiella burnetii* de diferentes tipos de muestras, consulte el manual respectivo o póngase en contacto con el servicio de asistencia de INDICAL a través de support@indical.com.

Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

- Pipetas
- Puntas de pipeta exentas de nucleasas, resistentes a aerosoles y con filtros
- Tubos Eppendorf® de 1,5 ml estériles
- Consumibles exentas de nucleasas (sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa). Debe prestarse especial atención para evitar la contaminación con nucleasas de todos los reactivos y consumibles utilizados para configurar la PCR a fin de realizar una identificación sensible de los ácidos nucleicos víricos
- Dispositivo para enfriamiento o hielo
- Centrífuga de mesa con rotor para tubos de 1,5 ml
- Termociclador en tiempo real con canales de fluorescencia adecuados
- Software adecuado para el termociclador en tiempo real elegido
- Tubos y tapones de tiras adecuados o microplaca óptica de 96 pocillos con película adhesiva óptica o tapa para el termociclador en tiempo real elegido
- Opcional (para análisis cuantitativo): 0,1x de tampón de TE (pH 7-8) o agua sin desoxirribonucleasa/ribonucleasa

Notas importantes

Precauciones generales

El usuario debe proceder siempre de acuerdo a las siguientes recomendaciones:

- Utilice puntas de pipeta exentas de nucleasas con filtros.
- Almacene y extraiga el material positivo (muestras, controles positivos y amplicones) en procedimientos independientes con respecto al resto de reactivos y añádalos a la mezcla de reacción en una sala separada físicamente.
- Descongele todos los componentes en hielo antes de iniciar un ensayo.
- Cuando se hayan descongelado, mezcle los componentes mediante inversión y centrifúgelos brevemente.
- No utilice los componentes del kit de prueba si están caducados.
- Conserve las muestras y los controles en hielo o en un bloque de enfriamiento durante la configuración de las reacciones.

Control negativo

Como mínimo debe incluirse una reacción de control negativo en cada serie de PCR, que contenga todos los componentes de la reacción, excepto la secuencia del patógeno. Esta acción permite evaluar la contaminación de la reacción.

Control positivo

Si el procedimiento de la PCR se realiza en muestras no conocidas, se recomienda efectuar una reacción de control positivo en la serie de PCR que contenga una muestra que se sepa que incluye el ADN bacteriano diana. Un control positivo permite demostrar la funcionalidad del ensayo del patógeno, p. ej., que la mezcla de reacción se ha configurado correctamente. Utilice 5 µl del Positive Control suministrado con el bactotype *C. burnetii* PCR Kit para probar que la diana se ha amplificado correctamente.

Control de la extracción y la amplificación

Para mayor seguridad y comodidad, se incluye un ensayo de control de la extracción y la amplificación en forma de juego de primer/sonda adicional que detecta un gen constitutivo (ADN de la β -actina) presente en la muestra.

Patrón

El bactotype *C. burnetii* PCR Kit contiene un patrón de ADN que permite el análisis cuantitativo. Una serie de dilución del patrón proporcionado, seguida por amplificación en PCR en tiempo real, permite cuantificar una muestra no conocida.

Protocolo: PCR en tiempo real para detectar el ADN de *Coxiella burnetii*

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Lea el apartado “Notas importantes”, en la página 10, antes de comenzar.
- Incluya como mínimo un control positivo (Positive Control) y un control negativo (Negative Control) para cada serie de PCR.
- Antes de comenzar el procedimiento, lea detenidamente el protocolo y familiarícese con el funcionamiento del termociclador para PCR en tiempo real elegido.
- Lleve a cabo el protocolo sin interrupción.

Preparación del patrón para el análisis cuantitativo (opcional)

Diluya el Cox Standard en una serie antes de la configuración de la PCR. Siga el diagrama proporcionado en la tabla 1, preferentemente utilizando 0,1x de tampón de TE, pH 7-8 o agua sin desoxirribonucleasa/ribonucleasa. Congele la serie de dilución a una temperatura comprendida entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ (en alícuotas si se usa de forma intermitente). Evite repetir el ciclo de descongelación-congelación (>2 veces), ya que esta práctica puede reducir la reactividad.

Tabla 1. Serie de dilución de Cox Standard

	Dilución	Copias/ml	Preparación de la serie de dilución
1	sin diluir	2×10^7 cp/ml	
2	10^{-1}	2×10^6 cp/ml	10 μ l de patrón _{sin diluir} + 90 μ l 0,1x de TE
3	10^{-2}	2×10^5 cp/ml	10 μ l de patrón 10^{-1} + 90 μ l 0,1x de TE
4	10^{-3}	2×10^4 cp/ml	10 μ l de patrón 10^{-2} + 90 μ l 0,1x de TE
5	10^{-4}	2×10^3 cp/ml	10 μ l de patrón 10^{-3} + 90 μ l 0,1x de TE

* cp = copias

Antes de comenzar

- Descongele todos los reactivos en hielo y protéjalos de la luz.
- Conserve los reactivos en hielo durante la configuración de la PCR.
- Antes de utilizarlos, centrifugue brevemente los reactivos.

Procedimiento

1. Pipetee 20 μ l de la Master Mix en cada tubo de reacción. A continuación, añada 5 μ l de ADN de muestra (tabla 2).

Incluya reacciones de control positivo y negativo.

Positive Control: utilice 5 μ l del control positivo (Positive Control) en lugar de ADN de muestra.

Negative Control: utilice 5 μ l del control negativo (Negative Control) en vez de ADN de muestra.

Opcional (análisis cuantitativo): utilice 5 μ l de cada paso de dilución del Cox Standard preparado.

Tabla 2. Preparación de la mezcla de reacción

Componente	Volumen
Master Mix	20 µl
Muestra	5 µl
Volumen total	25 µl

2. Cierre los tubos de reacción con los tapones correspondientes.
3. Defina los filtros para los marcadores indicador en el software del termociclador de acuerdo con la tabla 3.

Tabla 3. Configuración de los filtros para el indicador

Patógeno/control interno	Indicador
<i>Coxiella burnetii</i>	FAM
Control interno	HEX/JOE™ ¹
Referencia pasiva ²	ROX™

¹ Utilice la opción apropiada para su termociclador.

² Referencia interna para el uso en instrumentos ABI (Applied Biosystems®)

4. Ejecute el protocolo de PCR en tiempo real de acuerdo con la tabla 4.

Nota: Este protocolo también se puede utilizar si se realizan ensayos bactotype Mastitis simultáneamente en el mismo termociclador de PCR (es decir, bactotype Mastitis HP3, bactotype Mastitis HP2+, bactotype Mastitis Screening, bactotype Mastitis Env).

Tabla 4. Protocolo de PCR en tiempo real

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Activación inicial	95°C	5 min	1
Ciclado en 2 pasos			
Desnaturalización	95°C	10 s	40
Hibridación/extensión*	57°C	30 s	

* Recopilación de datos de fluorescencia.

Tiempo de análisis aproximado 58 min (sistema de PCR en tiempo real AriaMx de Agilent)

Análisis e interpretación de los datos

Interpretación de los resultados (análisis cualitativo)

Para que el ensayo sea válido, la fluorescencia FAM y HEX del Positive Control deben emitir una señal con un $C_T^1 < 35$. El Negative Control no debe emitir una señal de fluorescencia.

Los resultados siguientes pueden obtenerse si se trabaja con muestras no conocidas. Los resultados posibles de las muestras también se resumen en la tabla 5 de la página 17.

Para que la muestra se considere positiva para *Coxiella burnetii* y el ensayo sea válido, deben reunirse los criterios siguientes:

- La muestra emite una señal en los canales FAM y HEX.
- El Positive Control emite una señal en los canales FAM y HEX.
- El Negative Control no emite una señal en los canales FAM y HEX.

Tenga en cuenta que unas concentraciones muy elevadas de ADN de *Coxiella burnetii* en la muestra pueden reducir la señal HEX o incluso suprimirla debido a la competición con el control interno.

Para que la muestra se considere negativa para *Coxiella burnetii* y el ensayo sea válido, deben reunirse los criterios siguientes:

- La muestra emite una señal únicamente en el canal HEX.
- El Positive Control emite una señal en los canales FAM y HEX.
- El Negative Control no emite una señal en los canales FAM y HEX.

Una señal HEX positiva significa que la extracción y la amplificación

¹ C_T , Ciclo umbral (C_T): ciclo en que el gráfico de amplificación cruza el umbral, es decir, cuando aparece el primer aumento claramente detectable de la fluorescencia

se han realizado correctamente puesto que el gen constitutivo de la muestra se ha amplificado.

Para que los resultados de la muestra se consideren no concluyentes y el ensayo no sea válido, debe ocurrir la circunstancia siguiente:

- La muestra no emite ninguna señal en los canales FAM y HEX.

Si no se detecta una señal en los canales FAM (patógeno) y HEX (control interno), el resultado es no concluyente. La ausencia de señal para el gen constitutivo indica la inhibición de la PCR u otro error.

Para realizar una comprobación de inhibición, recomendamos una dilución 1:5 del ADN de muestra en agua sin nucleasa, para repetir la extracción del ADN, o repetir todo el procedimiento de prueba comenzando con nuevo material de muestra.

Compruebe que no haya una señal de fluorescencia en el capan FAM para la reacción del control positivo (Positive Control). La ausencia de señal para el Positive Control indica que se ha producido un error, que podría deberse a una configuración incorrecta de la mezcla de reacción o a condiciones inadecuadas de los ciclos.

Tabla 5. Tabla de interpretación de resultados¹

FAM	HEX	Resultado de la muestra
X	X	positivo para <i>Coxiella burnetii</i>
X		positivo alto para <i>Coxiella burnetii</i>
	X	Negativo
		No concluyente

¹ La interpretación de los resultados de las muestras puede determinarse siempre que se realicen reacciones de control positivo y negativo. El Positive Control debe emitir una señal en los canales FAM y HEX. El Negative Control no debe emitir ninguna señal en los canales FAM y HEX. Para obtener una explicación detallada de los resultados posibles de las muestras, consulte el apartado "Análisis e interpretación de los datos" en la página 16.

Interpretación de los resultados (análisis cuantitativo)

Asigne valores de cuantificación (copias/ml) a cada punto de dilución del Cox Standard en el software del termociclador. Para que la prueba cuantitativa sea válida, se deben cumplir los criterios del análisis cualitativo y los criterios adicionales siguientes para el análisis cuantitativo:

- al menos 4 de 5 pasos de solución del Cox Standard deben emitir una señal en el canal FAM,
- coeficiente de correlación de PCR: $R^2 > 0,96$ y
- eficacia de la PCR: 85 %-115 % (consulte Análisis del software del termociclador).

Cálculo de la concentración en la muestra

Utilice el software del termociclador en tiempo real para calcular la cantidad de cantidad de *C. burnetii* diana de cada muestra utilizando los valores de cuantificación de cada punto de dilución del Cox Standard (tabla 6).

Tabla 6: Valores de cuantificación del Cox Standard

N.º de	copias/ml	GE*/ml
1	2×10^7 cp/ml	10^6 GE/ml
2	2×10^6 cp/ml	10^5 GE/ml
3	2×10^5 cp/ml	10^4 GE/ml
4	2×10^4 cp/ml	10^3 GE/ml
5	2×10^3 cp/ml	10^2 GE/ml

* GE = equivalente genómico (20 copias = 1 GE); cp = copias

Ecuación para la conversión del número de copias diana en unidades de GE

$$\text{GE/ml} = \text{copias diana por ml}/20$$

Ejemplo para el cálculo de la concentración en la muestra original (muestra líquida)

El cálculo se basa en la cuantificación de la muestra de ADN de *C. burnetii* (copias/ ml), el volumen de la muestra para la extracción (SV) expresado en μl y el volumen de elución del método extraído (EV) expresado en μl .

$$\text{Copias/ml} = \text{cuantificación de PCR [copias/ml]} \times (\text{EV } [\mu\text{l}]/\text{SV } [\mu\text{l}])$$

INDICAL ofrece una amplia gama de kits para ELISA así como kits para PCR en tiempo real y RT-PCR en tiempo real para la detección de patógenos de animales.

Visite **www.indical.com** para obtener más información sobre productos bactotype, cador, cattletype, flocktype, pigtype y virotype.

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o el manual del usuario del kit de INDICAL correspondiente.

Acuerdo de licencia limitada para el bactotype C. burnetii PCR Kit

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este manual, así como con los componentes contenidos en el kit. INDICAL no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para incorporar o utilizar los componentes contenidos en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, en este manual y en los protocolos adicionales disponibles en www.indical.com. Algunos de estos protocolos adicionales los han proporcionado usuarios de INDICAL para usuarios de INDICAL. INDICAL no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, INDICAL no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, INDICAL no garantiza que este kit y/o su uso no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. INDICAL niega específicamente cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no llevar a cabo ni permitir que otros lleven a cabo medidas que puedan conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que puedan facilitarlas. INDICAL se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los gastos judiciales, incluidos los costes procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y/o con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite www.indical.com.

Marcas comerciales: bactotype®, cador®, cattletype®, flocktype®, IndiMag®, IndiSpin®, pigtype®, virotype® (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); MagAttract®, QIAamp®, QIAcube® (QIAGEN GmbH); Applied Biosystems® (Applied Biosystems); FAM™, HEX™, JOE™, ROX™ (Life Technologies Corporation); Eppendorf® (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH). Las sondas de las que se ha obtenido licencia han sido fabricadas por Integrated DNA Technologies, Inc. Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación.

HB-2510-ES-001 © 2019 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, todos los derechos reservados.

Índice de cambios

Manual	Versión	Cambio
HB-2510-EN-001	Mayo 2019	Lanzamiento de producto