

INgene q Brucella Sondas Typing

R.10.BRM.K.5TC/Q

Kit qPCR para la detección y tipaje de *Brucella* (BRM) en muestras biológicas. / qPCR kit for the detection and typing of *Brucella* (BRM) in Biological samples.

PCR Real-time. 100 Reacciones / 100 Reactions

Producto fabricado en Eurofins Ingenasa



Índice de Contenidos (ESPAÑOL)

1.	INTRODUCCIÓN.....	2
2.	COMPOSICIÓN DEL KIT.....	2
3.	CONSERVACIÓN DEL KIT.....	2
4.	MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.....	2
5.	NORMAS BÁSICAS PARA EVITAR CONTAMINACIONES.....	3
6.	RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS.....	3
7.	EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO.....	3
8.	AMPLIFICACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO.....	4
9.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	5
10.	LOCALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS.....	7
11.	CONTROL DE CALIDAD.....	7
12.	ASISTENCIA TÉCNICA.....	7

Table of Contents (ENGLISH)

1.	INTRODUCTION.....	8
2.	KIT COMPOSITION.....	8
3.	GUIDELINES FOR THE CORRECT CONSERVATION OF THE KIT COMPONENTS.....	8
4.	MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED.....	8
5.	PRECAUTIONS TO AVOID CONTAMINATION.....	8
6.	SAMPLES COLLECTION AND TRANSPORT.....	9
7.	DNA EXTRACTION.....	9
8.	AMPLIFICATION OF THE GENETIC MATERIAL.....	10
9.	ANALYSIS AND INTERPRETATION OF RESULTS.....	11
10.	TROUBLESHOOTING.....	12
11.	QUALITY CONTROL.....	13
12.	TECHNICAL ASSISTANCE.....	13

1. INTRODUCCIÓN

INgene q Brucella Sondas Typing es un ensayo diseñado para la detección y tipificación de ADN de *Brucella* (BRM) en muestras biológicas de un modo sencillo y con unos niveles de sensibilidad y especificidad extremadamente altos.

El kit posee los reactivos y enzimas necesarios en dos mezclas que una vez unidas en un único envase (Máster mix) se encuentran en concentraciones idóneas para detectar (opcionalmente cuantificar) BRU, de forma que sólo sea necesaria la adición del ADN de la muestra problema para detectar y tipificar *Brucellas*. El kit amplifica varias regiones del genoma de *Brucella*, diferentes según la especie. Se utilizan tres sondas TaqMan-MGB-NFQ, marcadas con FAM, VIC y TEXAS RED.

El kit incluye un control positivo BRM. Bajo pedido se puede suministrar un control positivo Standard. A partir de este control, puede ser generada la curva estándar que relaciona el nº de copias del patógeno con el valor del ciclo umbral (Ct, cycle threshold).

El kit ha sido probado en LC480 de ROCHE. Es posible su uso en otros equipos, aunque los valores de Ct pueden variar en función del equipo utilizado.

ATENCIÓN: seguir instrucciones específicas de programación de cada equipo

2. COMPOSICIÓN DEL KIT

COMPONENTES (100 reacciones)	Nº VIALES	VOLUMEN/VIAL
Mezcla A: Oligonucleótidos y sondas específicos para BRM	2	600 µl
Mezcla B: Mezcla de enzimas	2	600 µl
Control Positivo A1- Control de amplificación BRM	1	60 µl

3. CONSERVACIÓN DEL KIT

Una vez recibido el kit sus componentes se deben mantener a -20°C y son estables durante 1 año desde la fecha de fabricación (mirar fecha de caducidad en el envase).

4. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Guantes desechables libres de polvo (sin talco),
- Microcentrífuga,
- Agitador de tubos,
- Termociclador de tiempo real,
- Micropipetas (0,5-1000 µl),
- Puntas de pipeta estériles con filtro,
- Agua estéril libre de DNAsas / RNAsas.

5. NORMAS BÁSICAS PARA EVITAR CONTAMINACIONES

En general deben mantenerse las siguientes precauciones:

- Ausencia de DNAsas/RNAsas en el material fungible a utilizar.
- Uso de agua destilada autoclavada (25 min., 120°C) libre de DNasa/RNAsas.
- Uso de puntas estériles con filtro.
- Buena homogeneización de los componentes del kit una vez descongelados.
- Mantener en todo momento las mezclas en hielo.
- Repetidos ciclos de congelación y descongelación podrían reducir la sensibilidad de los reactivos y con ello la sensibilidad del método, por lo que es conveniente dispensar los reactivos en alícuotas de un solo uso, manteniéndolas a -20°C y protegidas de la luz hasta su utilización.

Para evitar contaminaciones que generen falsos positivos, es importante:

- Separar físicamente el control positivo de PCR del resto de reactivos del kit.
- La manipulación de las muestras a testar se debe realizar en un espacio físico diferente de donde se realizan los análisis de productos amplificados.
- El control positivo de PCR debe ser añadido en un espacio físico diferente de donde se añade la mezcla y de donde se manipulan las muestras a testar.

6. RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

INgene q Brucella Sondas Typing está indicado para la detección y tipificación (opcionalmente cuantificación) de ADN de *Brucella* (BRM) a partir de diferentes muestras biológicas.

El ensayo ha sido optimizado para su utilización con muestras de cultivo o colonia aislada, sangre, suero, ganglio, y leche, por ser estas las muestras de mayor interés desde el punto de vista clínico.

El transporte al laboratorio se realizará en frío dentro de las primeras 24 horas. Si bien, es posible el almacenamiento de las muestras a -20°C hasta su extracción.

7. EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

Una vez aislado el ADN, se recomienda chequear la calidad y cantidad del ADN aislado realizando una medida de absorbancia. Se utilizará cualquier procedimiento disponible en el laboratorio con el que se obtenga una buena calidad de material genético a partir de las muestras. INGENASA puede suministrar un protocolo y buffer de extracción bajo pedido.

Ingenasa ha realizado este ensayo con los métodos de extracción basados en:

- Método de Chomczynski and Sacchi de extracción fenólica.
- Métodos automáticos con uso de bolas magnéticas (Mag MAX™ Total NA isolation kit, Ref AM1840).
- Métodos de purificación por columna: The QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). High Pure PCR Template Preparation kit (ROCHE)

Existen varias casas comerciales con productos para extracción que dan una calidad óptima de ácido nucleico, siguiendo las indicaciones del fabricante, entre ellas: Life-technologies, ROCHE, Qiagen, Marchery-Nalgene, otras.

PROCEDIMIENTOS SUGERIDOS

- a) DNA purificado por el método “NucleoSpin Tissue” (Marchery-Nalgen) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- b) Se debe de partir de bacterias recién crecidas en medio sólido (placas de agar). Resuspender con un asa de siembra una colonia bacteriana en 200 µl de agua ultra pura estéril. Incubar la suspensión en un baño a 100°C durante 10 min. Enfriar en hielo picado durante 5 min. Emplear 1 µl de dicha suspensión en la mezcla de amplificación para PCR.
- c) Alternativamente, se puede partir de un cultivo en medio líquido (10 mL de TBS en matraz de 100 mL de capacidad, a 37°C, 24-48 horas, con agitación constante). Centrifugar (12.000 rpm, 5 min) 1 ml del cultivo en un tubo tipo Eppendorf, retirar el sobrenadante y resuspender por agitación el sedimento con las bacterias en 1 ml de agua ultra pura estéril. Volver a centrifugar, retirar el sobrenadante y resuspender de nuevo el sedimento en 1 ml de agua ultrapura estéril. Incubar la suspensión en un baño a 100°C durante 10 min. Enfriar en hielo picado durante 5 min. Emplear 1 µl de dicha suspensión en la mezcla de amplificación para PCR.

PRECAUCIÓN: si la amplificación no es inmediata, conservar el DNA a -20°C.

8. AMPLIFICACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

MATERIALES NECESARIOS

- Hielo picado.
- ADN extraído de las muestras.
- Mezclas A y B – MANTENER EN HIELO PICADO SIEMPRE QUE ESTÉ FUERA DEL REFRIGERADOR.
- Control positivo de amplificación A1 (BRM.)
- Agua libre de DNAsas y RNAsas.

PROCEDIMIENTO

1. Preparar y marcar convenientemente, tantos tubos para la amplificación como muestras vayan a procesarse, añadir un tubo adicional para el control positivo de amplificación, y otro para el control negativo.
2. Sacar las mezclas A y B. Mantener en hielo picado hasta la total descongelación de la mezcla A. Agitarlas ligeramente para su correcta homogenización y preparar la mezcla de amplificación en volumen necesario para el número de muestras que vayan a procesarse. Tener en cuenta en los controles que se van a introducir en el ensayo, que serán al menos un control positivo y un control negativo.

El volumen a mezclar de cada reactivo por cada una de las muestras será:

	Volumen Mezcla A	Volumen Mezcla B	Volumen de Master Mix Final
Por muestra a procesar	10 µl	10 µl	20 µl
Para un total de 10 muestras	100 µl	100 µl	200 µl

El tubo donde vaya a realizarse la mezcla, es conveniente que se mantenga en todo momento en hielo picado. Se recomienda preparar la mezcla en exceso (calcular un 10% adicional de todos los reactivos) a fin de compensar las posibles pérdidas de volumen durante los pipeteos. Una vez preparada la mezcla homogeneizar correctamente.

3. Disponer los tubos previamente etiquetados en hielo picado y añadir a cada uno 20 µl de la mezcla así preparada.
4. Añadir a cada uno de los tubos 1 µl de la muestra de ADN extraído previamente. Añadir 1 µl del control positivo de amplificación A1 al tubo de control positivo y 1 µl de agua al tubo marcado como control negativo. Mezclar suavemente el contenido de cada tubo y asegurarse de que todo el líquido se encuentra depositado en el fondo del tubo. Si no fuera así, centrifugar ligeramente hasta conseguirlo.
5. Siguiendo el manual de instrucciones de uso del termociclador a tiempo real, la reacción se coloca en el termociclador y se programa con arreglo a las siguientes condiciones:

	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95	10 min	1
Amplificación	95	15 sg	40
	60 *	60 sg	

6. La lectura de la fluorescencia se realiza en el paso de elongación (señalado en la tabla)* y los canales por los que se recogen los datos relativos a las fluorescencias se detallan en la tabla siguiente:

	Reporter	Quencher
BRM	FAM	NFQ
	VIC	NFQ
	TEXAS RED	NFQ
Referencia Pasiva	Ninguna	

9. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

De cada muestra problema analizada se obtienen datos relativos a la fluorescencia proveniente de los canales FAM, VIC y TEXAS RED; elegir para el análisis la selección automática del umbral.

En el caso de que esta opción no sea viable, el análisis podría desarrollarse de forma manual siguiendo las instrucciones de uso del termociclador.

Canales FAM, VIC y TEXAS RED: Detección del patógeno

Un resultado positivo en la amplificación implica la obtención de una curva de fluorescencia típica con un valor del ciclo umbral Ct <40.

Serán muestras dudosas aquellas con Ct's que se encuentren entre 38-40, para estos casos recomendamos:

- Repetir el análisis.
- Secuenciar el producto amplificado.

Análisis cualitativo

Los posibles resultados se resumen en la tabla.

Tabla. Validación de los resultados

Sonda	B.suis	B. melitensis	B.abortus	B.ovis
FAM	+	-	-	-
VIC	+	+	-	+
TEXAS RED	+	+	+	-

Caso 1. Si existe señal en los tres canales de lectura.

Resultado: **La muestra contiene *Brucella suis*.**

Caso 2. Si existe señal en los canales de lectura VIC y TEXAS RED, siendo FAM negativo.

Resultado: **La muestra contiene *Brucella melitensis*.**

Caso 3. Si sólo hay señal en el canal TEXAS RED.

Resultado: **La muestra contiene *Brucella abortus*.**

Caso 4. Si sólo hay señal en el canal VIC.

Resultado: **La muestra contiene *Brucella ovis*.**

10. LOCALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Detección de señal de fluorescencia en alguno de los canales de lectura en el control negativo de extracción.

Posible causa	Solución
Contaminación ocurrida durante el proceso de extracción	<ul style="list-style-type: none"> Repetir el proceso de extracción del ADN y el desarrollo de la PCR usando nuevos reactivos. Asegurarse de que el espacio de trabajo, equipos y los diferentes instrumentos necesarios para la elaboración de la PCR están descontaminados, libres de ácidos nucleicos.

Detección de señal de fluorescencia en alguno de los canales de lectura en los controles negativos de PCR.

Posible causa	Solución
Contaminación ocurrida durante la preparación de la PCR.	<ul style="list-style-type: none"> Repetir la reacción de PCR con nuevos reactivos y si es posible varias réplicas de cada muestra. Si se utilizan tubos, cerrar cada uno de ellos directamente después de la adición de la muestra. Como norma estricta el control positivo se debe añadir el último y en un espacio físico distinto de dónde se añaden las muestras problema. Asegurarse de que el espacio de trabajo, equipos y los diferentes instrumentos necesarios para la elaboración de la PCR están descontaminados, libres de ácidos nucleicos.

Ausencia de señal de fluorescencia en alguno de los canales de lectura en los controles positivos de PCR.

Posible causa	Solución
Selección incorrecta del canal del fluorocromo.	<ul style="list-style-type: none"> Selección de los canales FAM, VIC y TEXAS RED para todas las muestras y controles a analizar

11. CONTROL DE CALIDAD

Cada lote de producción ha sido contrastado con arreglo a nuestra certificación ISO de Sistema de Gestión de Calidad.

12. ASISTENCIA TÉCNICA

Para disponer de más información o realizar cualquier consulta relativa al producto, contactar con:

INGENASA
C/ Hnos. García Noblejas, 41 – 28037 MADRID
Tel (+34) 91 368 0501
e-mail: biologiamolecular@ingenasa.com

1. INTRODUCTION

INgene q Brucella Typing is a real-time PCR kit suited for the detection and typing of DNA of *Brucella* (BRM) in biological samples in a simple way, with high levels of sensitivity and specificity.

The kit contains all necessary reagents and enzymes in two mixes. Once mixed, they are at the required concentrations to detect and type (and optionally quantify) BRM, simply by adding the DNA of the problem sample. The kit amplifies several parts of the genome, which differ according to species. This kit makes use of three TaqMan-MGB-NFQ probes marked with FAM, VIC and TEXAS RED.

The kit includes a BRM positive control for detection. The kit does not include a standard positive control with a known number of BRM copies (ask our commercial department for standard control). This control allows generating a standard curve which links the number of pathogen copies with the cycle threshold (Ct) value.

The kit has been tested for ROCHE LC480. It is possible to work with other thermocyclers from other commercial brands, but Ct values may vary among them.

CAUTION: follow specific software of each system.

2. KIT COMPOSITION

COMPONENTS	Nº VIALS	VOLUMEN/VIAL
Mixture A (BRM specific primers and probes)	2	600 µl
Mixture B (enzyme mixture)	2	600µl
Positive Control A1 – BRM Amplification control	1	60 µl

3. GUIDELINES FOR THE CORRECT CONSERVATION OF THE KIT COMPONENTS

On receiving the kit, keep it at -20°C until use, except mixture B, which must be kept at 4°C. The components of the kit are stable for 1 year from the manufacturing date (see expiry date on packaging).

4. MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Dust-free disposable gloves (without talcum powder).
- Microcentrifuge.
- Tube shaker.
- Real-time thermocycler.
- Micropipettes (0.5-1000 µl).
- Sterile pipette tips (with filter).
- Sterile DNAses / RNAses free water.

5. PRECAUTIONS TO AVOID CONTAMINATION

The following points should be read with care:

- Disposable items must be DNase and RNase-free.
- Use DNase and RNase-free distilled, autoclaved water (25 min., 120°C).
- Use sterile filtered tips.
- Ensure good homogenisation of the kit components once defrosted.
- Maintain the A and B mixes stored in ice at all times.
- Repeated cycles of freezing and defrosting may reduce the sensitivity of the reagents. Protect them from exposure to light until use.

To avoid contaminations giving rise to false positives it is important to:

- Physically separate the positive PCR control from the remaining reagents of the kit.
- To carry out any handling of samples to be tested in a different location/room from the one where the amplified products are being analyzed.
- Add the positive PCR control in a different location/room from the one where the mix is added and where the samples to be tested are being handled.

6. SAMPLES COLLECTION AND TRANSPORT

The assay could be performed using any biological sample considered of interest by the clinician. Our technique has been standardised and contrasted with a considerable number of liquid or colony culture, blood, sera, lymph node and milk. Samples must be cooled from the moment they are obtained until they are processed. Processing needs to occur within 24 hours after obtaining the samples. In case a longer time is envisaged, we recommend freezing the samples.

7. DNA EXTRACTION

Any extraction procedure should be used which yields good-quality of the extracted material.

In case you have no optimized extraction procedures, INGENASA could provide extraction protocol and buffer under request.

Ingenasa has tested the following methods for the DNA extraction:

- Method of Chomczynski and Sacchi (Phenol extraction).
- Automatic magnetic methods (Mag MAX™ Total NA isolation kit, Ref AM1840).
- Colum purification methods: QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), High Pure PCR Template Preparation kit (ROCHE).

There are several commercial houses that provide high quality extraction kits that could be used following the manufacturer instructions, like: Life-technologies, ROCHE, Qiagen, Marchery-Nalgene, others.

SUGGESTED PROCEDURES

a) DNA purified by " NucleoSpin Tissue" , Marchery-Nalgen. Follow commercial house instructions.

b) Bacteria that have been grown in solid media (agar plates) must be used as starting material. Resuspend a bacterial colony with a seeding inoculation loop in 200 µl of sterile ultra-pure water. Incubate the suspension in a bath at 100°C for 10 min. Cool in crushed ice for 5 min. Use 1 µl of this suspension in the amplification mixture for PCR.

c) Alternatively, starting from a culture in liquid media is possible (10ml TBS culture growing with aeration at 37°C during 24-48 hours). Centrifuge (12,000 rpm, 5 min) 1 ml of the culture in an Eppendorf-type tube, remove the supernatant and resuspend the pellet again by means of stirring with the bacteria in 1 ml of sterile ultra-pure water. Centrifuge again, remove the supernatant and resuspend the pellet again in 1 ml of sterile ultra-pure water. Incubate the suspension in a bath at 100°C for 10 min. Cool in crushed ice for 5 min. Use 1 µl of this suspension in the amplification mixture for PCR.

CAUTION: If amplification is not going to be done immediately, preserve the DNA at -20 ° C.

8. AMPLIFICATION OF THE GENETIC MATERIAL

REQUIRED MATERIALS

- Crushed ice.
- DNA extracted from the samples.
- Mixtures A and B – **KEEP IN CRUSHED ICE AT ALL TIMES.**
- Positive amplification control A1 (BRM).
- DNase-RNase-free water.

PROCEDURE

1. Prepare and identify as many tubes for the amplification as samples to be processed, adding an additional tube for the positive amplification control, and another one for the negative control.
2. Take mixtures A and B out, keeping them in crushed ice, until complete thawing of mixture A. Make sure that they are correctly homogenised before taking out the required volume for the assay.
3. Prepare an appropriate amount of amplification mixture for the number of samples to be processed. The volume of each reagent to be mixed for each of the samples is:

	Mixture A	Mixture B	Final Master Mix Volume
Per sample	10 µl	10 µl	20 µl
For 10 samples	100 µl	100 µl	200 µl

The tube used for mixing should be kept in crushed ice at all times. Likewise, it is recommendable to prepare an excess amount of mixture (calculate an extra 10% for all reagents) in order to compensate for possible losses of volume during pipetting.

4. Once mixture is prepared, homogenise correctly. Place the tubes previously labelled in crushed ice and add 20 µl of the mixture prepared in this way to each tube.

Add 1 µl of previously extracted DNA samples to each tube, 1 µl of positive control A1 (amplification control for BRU), to the corresponding tube and 1 µl of water to the tube labelled as negative control. Carefully mix the contents of each tube and ensure that all the liquid has been deposited at the bottom of the tube. If not, tubes may be centrifuged lightly until this occurs.

5. Set the thermocycler to the following conditions:

	Temperature (°C)	Time	Cycles
Denaturation	95	10 min	1
Amplification	95	15 s	40
	60 *	60 s	

6. Reading the fluorescence takes place during the elongation step (marked in the table)*, and the channels through which the fluorescence data are collected are detailed in table:

	Reporter	Quencher
BRM	FAM	NFQ
	VIC	NFQ
	TEXAS RED	NFQ
Passive reference	None	

9. ANALYSIS AND INTERPRETATION OF RESULTS

Analysis of results

Each problem sample analyzed yields data regarding the fluorescence originated from channels FAM, VIC and TEXAS RED. Automatic threshold analysis (threshold and baseline) is recommended.

If this option is not viable, the analysis can be carried out manually following the thermocycler instructions.

FAM, VIC and TEXAS RED channels: pathogen detection

A positive result during amplification implies a typical fluorescence curve with a Ct value <40.

Samples with Ct's comprised between 38 and 40 should be regarded as doubtful. In that case we recommend:

- Repeating the analysis.
- Sequencing the amplified product.

Qualitative analysis:

Possible results are summarised in the table:

Table: Results validation

Probe	B.suis	B. melitensis	B.abortus	B.ovis
FAM	+	-	-	-
VIC	+	+	-	+
TEXAS RED	+	+	+	-

Case 1: there is amplification signal in all the possible channels.

Result: **the sample contains *Brucella suis*.**

Case 2: there is signal in channels VIC and TEXAS RED, but not in FAM.

Result: **the sample contains *Brucella melitensis*.**

Case 3: there is signal in channel TEXAS RED only.

Result: **contains *Brucella abortus*.**

Case 4: there is signal in channel VIC only.

Result: **contains *Brucella ovis*.**

10. TROUBLESHOOTING

Detection of fluorescence signal on any channel in the negative extraction control.

Possible cause	Solution
Contamination during extraction process	<ul style="list-style-type: none"> Repeat the DNA extraction process and PCR using new reagents. Ensure that the workplace, equipment and all instruments used for performing the PCR are decontaminated, i.e. free from nucleic acids.

Detection of fluorescence signal on any channel in the negative PCR control.

Possible cause	Solution
Contamination during PCR preparation.	<ul style="list-style-type: none"> Repeat PCR reaction with new reagents and, if possible, various replicates of each sample. If tubes are being used, close each one immediately after adding the sample. As a strict rule, the positive control must be added last and in a separate physical location from where the problem samples are added. Ensure that the workplace, equipment and all instruments used for performing the PCR are decontaminated, i.e. free of nucleic acids.

Absence of fluorescence signal on any channel in the positive PCR controls.

Possible cause	Solution
Wrong fluorochrome channels selected	<ul style="list-style-type: none"> Check that you select the FAM, VIC and TEXAS RED channels for all samples and controls to be analyzed.

11. QUALITY CONTROL

Each production batch of this kit has been checked under our ISO-certified Quality Management System.

12. TECHNICAL ASSISTANCE

For further information concerning the assay and its performance, please contact:

India Contact:
Life Technologies (India) Pvt. Ltd.
Ph: +91-11-42208000, 42208111, 42208222, Mobile: +91-9810521400, Fax: +91-11-42208444
Email: customerservice@lifetechindia.com Website: www.lifetechindia.com