

Manual de usuario nPLEX Food Total

Número de catálogo #TAGN01001



Fabricado por: TAAG Genetics S.A.
Río Refugio 9641
Núcleo Empresarial ENEA,
Pudahuel - Santiago, Chile

CONTENIDO

1.	DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO Y USO PREVISTO	1
2.	CONTENIDO DEL KIT, ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD	1
3.	EQUIPOS Y REACTIVOS ADICIONALES	2
4.	ANTES DE EMPEZAR.....	2
4.1	Enriquecimiento.....	2
4.2	Extracción de ADN.....	2
5.	PROTOCOLO	2
5.1	Configuración del programa de PCR	2
5.2	Preparación Mix de PCR.....	3
6.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	3
7.	SOLUCIÓN DE PROBLEMAS.....	4

I. DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO Y USO PREVISTO

nPLEX Food Total es un kit de PCR en tiempo real para la detección de microorganismos patógenos de importancia para la industria alimentaria. nPLEX Food Total permite la detección simultánea de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos previamente enriquecidas.

2. CONTENIDO DEL KIT, ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El kit contiene 3 bolsas con los reactivos suficientes para 32 reacciones en cada una. nPLEX Food Total fue diseñado para

96 reacciones, de un volumen final de 20 µl cada una. Es posible analizar hasta 93 muestras (En una sola corrida), más reacciones de control positivas y negativas.

- Almacene el kit a -20 °C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta
- Evite ciclos repetidos de congelación y descongelación
- Evitar la exposición directa de los contenidos del kit a la luz
- Una vez abierto, almacene los componentes del kit como se describe en la tabla 1:

Tabla 1. Contenido nPLEX Food Total

Frasco	Volumen	Descripción
Master mix 5X	140 µl	Listo para el uso. Mix de reacción para PCR "hot start", sin primers. Contiene Taq ADN Polimerasa, buffer de reacción, mezcla de dNTPs y fluoróforos. <ul style="list-style-type: none"> • Almacenar a -20°C • Congelar máx. 2 veces más. • Proteger de la luz
Primers y sondas	420 µl	Listo para el uso. Los primers contenidos son específicos para la amplificación de ADN de <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , además de un plásmido de ADN artificial utilizado como control interno del PCR. <ul style="list-style-type: none"> • Almacenar a -20°C • Congelar máx. 2 veces más. • Proteger de la luz
Control negativo	110 µl	Agua libre de nucleasas, grado de biología molecular <ul style="list-style-type: none"> • Conservar a -20°C.
Control interno	352 µl	Solución estabilizada de ADN plasmidial <ul style="list-style-type: none"> • Almacenar a -20°C • Congelar máx. 2 veces más.
Control positivo	110 µl	Solución estabilizada de ADN plasmidial <ul style="list-style-type: none"> • Almacenar a -20°C • Congelar máx. 2 veces más.

3. EQUIPOS Y REACTIVOS ADICIONALES

- Termociclador para PCR en tiempo real con un canal de detección FAM (e.g., equipo de PCR en tiempo real Open QPCR, Chai Bio).
- Medio de enriquecimiento universal (MultiEbroth FOOD, proporcionado por TAAG Genetics)
- Kit de extracción de ADN bacteriano desde muestras de alimentos previamente enriquecidas (ZyBa, proporcionado por TAAG Genetics)
- Tubos de reacción estériles, para preparación de soluciones y diluciones
- Tubos, tiras o placas de PCR estériles con tapas transparentes
- Micropipetas
- Puntas de micropipeta libres de nucleasas y resistentes a aerosoles
- Microcentrífuga de sobremesa estándar con rotor para tubos de reacción de 2,0 ml.
- Baño termostático o placa calefactora

4. ANTES DE EMPEZAR

Con el fin de obtener resultados fiables, todo el procedimiento de análisis debe realizarse en condiciones libres de nucleasas. Siga las instrucciones a continuación para evitar la contaminación:

- No utilizar el kit si el empaque está dañado
- Mantenga los componentes del kit separados de otros reactivos en el laboratorio.
- Utilice material de laboratorio libre de nucleasas (p. ej., pipetas, puntas de pipeta, viales de reacción).
- Use guantes al realizar el ensayo.
- Para evitar la contaminación cruzada de muestras y reactivos, utilice puntas de pipeta estériles y resistentes a aerosoles.
- Para evitar la contaminación por arrastre, transfiera únicamente la cantidad de reactivo necesaria para una corrida de análisis a un tubo nuevo, en lugar de pipetear directamente desde soluciones de stock.
- Separe físicamente las distintas áreas de trabajo para la preparación del ADN, la preparación de PCR y el área de detección, para minimizar el riesgo de contaminación por arrastre. Utilice un gabinete de PCR para todos los pasos de pipeteo.
- Con el fin de evitar la contaminación cruzada, el pipeteo de controles positivos debe ser el último paso.
- Mantenga el kit nPLEX Food Total alejado de la luz y la humedad.

4.1 Enriquecimiento

Se recomienda que el enriquecimiento de las muestras sea realizado utilizando el medio de cultivo MultiEbroth FOOD, en cuyo caso, 25 gr. de la muestra de alimentos se incuban durante 24±2 horas a 35±2 °C con 225 ml de caldo MultiEbroth FOOD.

Posteriormente, 1 ml de la muestra enriquecida se transfiere a un tubo de 1,5 ml (evitar el arrastre de restos de alimentos o aceites desde el caldo de enriquecimiento hacia el tubo. Para muestras que poseen un sobrenadante graso, asegúrese de tomar el volumen necesario por debajo de esa capa). Esta alícuota de la muestra se utilizará para la extracción de ADN y PCR. Se recomienda guardar otro tubo con 1 ml de la misma muestra enriquecida, como contramuestra.

4.2 Extracción de ADN

Se recomienda que la extracción de ADN desde muestras de alimentos previamente enriquecidas se realice utilizando el kit ZyBa (TAAG Genetics). Para obtener más información sobre el producto, póngase en contacto con TAAG Genetics (www.taag-genetics.com).

5. PROTOCOLO

5.1 Configuración del programa de PCR

El siguiente procedimiento se optimizó para un equipo de PCR en tiempo real con canal de detección FAM. Programe el instrumento PCR antes de preparar las muestras. Utilice el siguiente protocolo PCR en tiempo real para el kit nPLEX Food Total (para detalles sobre cómo programar el protocolo PCR, consulte el Manual del Operador de equipo de su termociclador PCR en tiempo real):

Tabla 2. Configuración del programa PCR

Programa de PCR				
Paso	Temperatura	Hora	Ciclos	Canal de detección
Denaturación	95°C	10 min	1	
Denaturación	95°C	30 seg		
Alineamiento	63°C	30 seg	40	Fam
Extensión	68°C	30 seg		

Curva de disociación

Paso	Temperatura	Hora	Ciclos	Canal de detección
Denaturación	95°C	60 seg	1	
Disociación	72°C	30 seg	1	Fam
	98°C	30 seg		

5.2 Preparación Mix de PCR

Antes de la preparación del Mix de PCR, el ADN extraído desde la muestra enriquecida debe mezclarse con la solución de control interno. Transfiera 10 µl de ADN a un tubo limpio y añada 10 µl de la solución de control interno. Utilice 4 µl de esa solución como ADN de plantilla para las reacciones de PCR.

IMPORTANTE: Antes de utilizar cualquier reactivo del kit nPLEX Food Total, es necesario homogeneizar cada tubo en vortex durante al menos 10 segundos, o en su defecto, homogeneizar con micropipeta tomando aproximadamente el 50% del volumen del tubo, y mezclar cuidadosamente 10 veces por pipeteo. Este paso es clave para garantizar resultados confiables. La homogeneización de los reactivos debe realizarse cada vez que se utilice el kit.

Lejos de la luz, prepare una mezcla final de PCR que contenga Master Mix 5x y Partidores y sonda, según la tabla 3.

Master Mix 4*n*I.I
 Partidores y sonda 12*n*I.I
 n: número de reacciones

Tabla 3. Volumen para mezcla de PCR

Reacciones	Partidores y sonda (uL)	Master Mix (uL)
1	13,2	4,4
2	26,4	8,8
3	39,6	13,2
4	52,8	17,6
5	66	22
6	79,2	26,4
7	92,4	30,8
8	105,6	35,2
9	118,8	39,6
10	132	44
11	145,2	48,4
12	158,4	52,8
13	171,6	57,2
14	184,4	61,6
15	198	66
16	211,2	70,4

Es importante homogeneizar la mezcla final en vortex durante 10 segundos, o en su defecto, homogeneizar con micropipeta tomando aproximadamente el 50% del volumen del tubo, y mezclando cuidadosamente 10 veces por pipeteo. Después de completar la preparación del Mix de PCR, utilizar la solución inmediatamente.

Agregue 16 µl de la solución Mix de PCR en cada tubo de PCR y luego agregue 4 µl del templado de ADN (muestra de ADN con solución de control interno).

Para los controles de PCR positivo y negativo, transfiera 10 µl de control positivo y 10 µl del control negativo, a dos tubos diferentes de PCR. Mezcle cada uno de ellos con 10 µl de control interno. Utilice 4 µl de las soluciones como controles de PCR.

Finalmente, sellar el tubo, tiras o placas PCR con tapas de plástico óptico (no escriba en la parte superior de las tapas del tubo, ya que puede interferir con la lectura de fluorescencia). Evitar la formación de burbujas dentro del tubo de PCR. Para eliminar posibles burbujas, es recomendable concentrar el volumen de los tubos, tiras o placas de PCR al fondo de éstos por centrifugación antes de colocarlos en el equipo de PCR en tiempo real.

Transfiera los tubos PCR al equipo de PCR en tiempo real y programe la corrida como se describe en el punto 5.1.

6. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Cuando el programa de PCR termine, exporte los datos de la corrida de PCR a un archivo de texto separado por comas de extensión CSV.

Los usuarios del equipo de PCR en tiempo real ChaiBio deben proceder como se describe a continuación:

Para exportar los datos de la corrida, haga clic en el botón de menú en la parte superior izquierda de la página. Seleccione "Exportar" para descargar los datos de PCR. Se generará un archivo .zip y se guardará en un directorio predeterminado. Después de extraer el archivo ZIP, encontrará los siguientes archivos .csv:

- Amplificación
- Cq
- temperature_log
- melt_curve_analysis
- melt_curve_data
- temperature_log

7. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Observación	Posible razón	Recomendación
Resultados negativos en controles positivos o control interno	Errores de pipeteo o reactivos omitidos	Compruebe si el esquema de pipeteo realizado es el correcto. Compruebe si la configuración de la corrida de PCR es la correcta. Repita la corrida de PCR.
	Homogenización o concentración ineficiente de los reactivos	Siempre homogenizar todos los reactivos antes de usarlos
	Existe una burbuja de aire en el tubo de PCR	Siempre centrifugar los tubos de PCR antes de cargar en el equipo
	La superficie exterior de la tapa del tubo de PCR está sucia (p. ej., por contacto directo con la piel)	<ul style="list-style-type: none"> • Siempre use guantes cuando manipule los tubos de PCR • No escriba en la tapa del tubo PCR
	Almacenamiento inapropiado de los componentes del kit	Mantenga los componentes del kit a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, alejados de la luz. Evite reiterados ciclos de congelación y descongelación. Sustituya los tubos de control positivo y negativo por tubos nuevos
No hay señal en el control interno (inhibición de PCR)	La solución de control interno no fue mezclada con el ADN extraído desde la muestra	Compruebe si siguió todos los pasos del protocolo de forma correcta y asegúrese de mezclar la solución de control interno con ADN extraído desde la muestra. Repita la corrida de PCR
	Sustancias inhibitoras presentes en la muestra enriquecida	<ul style="list-style-type: none"> • Realizar una extracción de ADN a partir de la contramuestra, utilizando un kit de purificación de ADN bacteriano con columnas de sílice, resinas o partículas magnéticas • Realizar una dilución 1:10 del ADN extraído para disminuir la concentración del inhibidor en la reacción. El inconveniente de diluir la muestra es que el objetivo real puede eliminarse si está presente en un bajo número de copias
	Almacenamiento inapropiado de los componentes del kit	Mantenga los componentes del kit a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, alejados de la luz. Evitar reiterados ciclos de congelación y descongelación. Sustituya los tubos de control positivo y negativo por nuevos tubos
Control negativo arroja señal positiva	Contaminación por arrastre	<ul style="list-style-type: none"> • Renueve todas las soluciones críticas • Repita el experimento completo con alícuotas frescas de todos los reactivos • Manipule muestras, componentes del kit y consumibles de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio para evitar contaminación por arrastre • Añadir controles positivos después de que el ADN de la muestra y los tubos de control negativo hayan sido sellados • Ejecutar procedimientos de descontaminación en la zona de trabajo, ya sea a través de la limpieza con hipoclorito de sodio y/o con algún reactivo comercial para eliminar fragmentos de ADN