

Salmofast: Detección de *Salmonella* spp en alimentos

Salmofast es un kit para la detección de *Salmonella* spp por PCR a tiempo real

PROTOCOLO

1. Preparación de la muestra y enriquecimiento

- Seguir las indicaciones ISO 6579-1:2017 a excepción de leche cruda y carnes de ave frescas (pollo). En estos casos emplear como diluyente APT con 20 mg/L de novobiocina

- Incubar el pre-enriquecimiento en APT durante 18-22h a $36 \pm 2^\circ\text{C}$

1.1. Segundo enriquecimiento (sólo si se realiza extracción de ADN sin purificación: TE. Apartado 3.3)

- Transferir 0,1 ml a 10 ml del medio RVS (precalentado a 37°C).
- Incubar a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ durante un mínimo de 5h

NOTA: Si se tuviera que confirmar el resultado de PCR para cultivo se puede continuar con la incubación hasta las 24 ± 2 horas antes de sembrar en XLD.

Continuar con la extracción de ADN.

2. Extracción de ADN

Se proponen 3 protocolos distintos:

2.1. Maxwell(R) RSC Cell DNA: Sistema automatizado de alto rendimiento. Requiere equipo automático.

- Tomar 0,2 ml de la parte superior del enriquecimiento y llevar al pozo de muestra del cartucho de RSC Cell DNA
- Preparar tubos de elución con 50 μl de tampón de elución
- Poner en marcha la extracción siguiendo las instrucciones del fabricante

2.2. WizPrep™ gDNA Mini Kit (Cell/Tissue): Sistema de minicolumnas de sílice con paso de purificación

- Kit basado en extracción y purificación en columna de sílice:
- Tomar 1 ml de la parte superior del enriquecimiento
- Centrifugar a $8000 \times g$ durante 5 minutos
- Retirar sobrenadante
- Seguir instrucciones del fabricante

2.3. Tampón TE (TRIS-EDTA pH 8,1): Extracción térmica con tampón de lisis.

Componentes (para 50 ml)	Cantidad
EDTA 0,5 M	11 μl
Tris/HCl 10 mM a pH 8.1	5 ml
Agua de grado Biol. molecular	45 m

- Transferir 1mL del enriquecimiento (RVS o APT)

- Centrifugar entre 10.000 y 13.000 × g durante 10 min. y descartar el sobrenadante
- Resuspender el pellet con 1 ml de tampón TE 0,1×
- Centrifugar a entre 10.000 y 13.000 × g durante 10 min y descartar el sobrenadante
- Resuspender el pellet con 200 µL de tampón TE 0,1× (IT-R-026)
- Incubar a 95 ± 3°C durante 15 min
- Homogenizar al vórtex, centrifugar entre 10000 y 13.000 × g durante 3 min y transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio si no se carga la PCR inmediatamente

3. Amplificación (PCR)

- 3.1. En la cabina asignada, preparar tantos tubos de PCR¹ como muestras a analizar, más uno para el control positivo y otro para el control sin muestra (Non-template control o NTC).
- 3.2. Cargar 5 µl del extracto de ADN a cada tubo.
- 3.3. Programar el termociclador con las siguientes condiciones

Ciclos	Paso	Temperatura	Tiempo
1 x	Activación polimerasa	95 °C	10 min
40 x	Desnaturalización	95 °C	15 segundos
	Hibridación + extensión*	60 °C	1 minuto

*Lectura de fluorescencia al final de este paso

- 3.4. Revisar las curvas de amplificación para cada fluoróforo de forma independiente según el siguiente cuadro

Organismo/diana	Fluoróforo
<i>Salmonella</i> spp*	Cy5
IAC (control interno de amplificación)	HEX

4. Interpretación de resultados

- 4.1. Revisar el canal HEX y comprobar que se produce amplificación en todas las muestras². Esto confirmará la ausencia de inhibición en la reacción. En caso contrario los resultados negativos se deben interpretar como falsos negativos. En estos casos debería repetirse la PCR con una dilución del extracto para disminuir la concentración de posibles inhibidores.
- 4.2. Un resultado será positivo (detectado) para *Salmonella* cuando la curva de amplificación correspondiente al canal Cy5 supere el umbral de fluorescencia (*threshold*) indicado por el termociclador.

¹ Preparar las reacciones de PCR a la recepción del kit repartiendo 15 µl por tubo y mantener a -20°C hasta su uso.

² En el tubo que contiene el control positivo es posible que el IAC no se amplifique debido a la elevada cantidad de ADN molde. Lo mismo aplica para muestras positivas.

Esquema protocolo.

