

Interpretación de las curvas de fusión y los valores Tm

En el análisis de la curva de fusión se pueden obtener 3 picos con distintos valores de Tm

Organismo	Tm (°C)*
Salmonella spp	79
Salmonella. (Enteritidis)	84,8 – 84,9
Salmonella. (Typhimurium)	88,7 - 88,9

*Estos valores pueden oscilar ligeramente dependiendo del termociclador usado y del software para el análisis de curvas de fusión y la cantidad de producto.

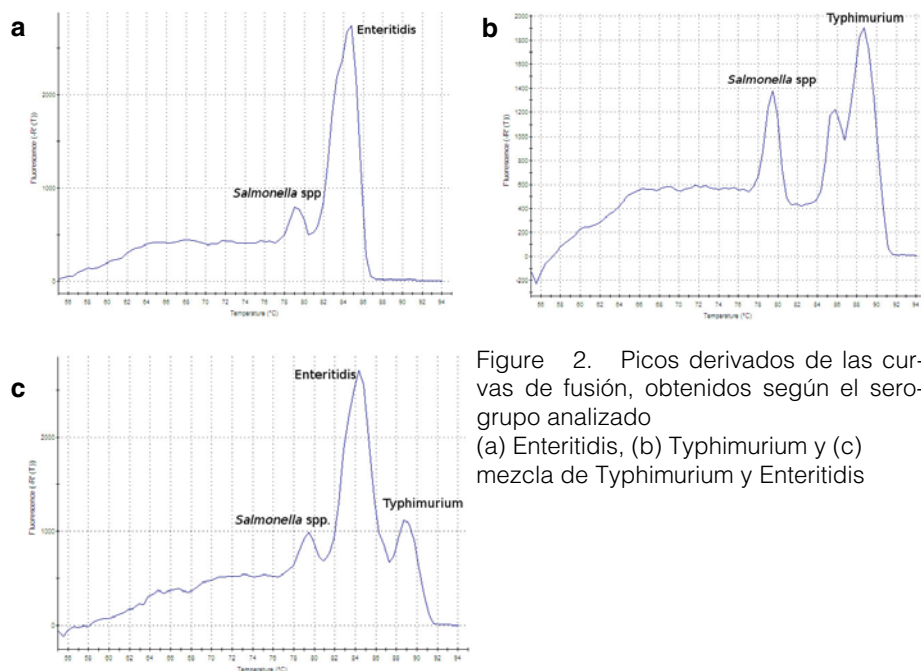


Figure 2. Picos derivados de las curvas de fusión, obtenidos según el serogrupo analizado (a) Enteritidis, (b) Typhimurium y (c) mezcla de Typhimurium y Enteritidis

Salmofast® TE mc

Detección de *Salmonella* spp, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* mediante PCR a tiempo real multiplexada.

Introducción

Salmonella es el principal agente implicado en brotes de toxiinfecciones alimentarias en todo el mundo. En la actualidad se conocen más de 2.500 serotipos de *Salmonella*. Los serotipos más frecuentes aislados de humanos son *S. typhimurium* y *S. enteritidis*. Estas toxiinfecciones son por lo general debido al consumo de carne de pollo o de huevos o derivados. Los resultados de la Encuesta de referencia Europea sobre la prevalencia de *Salmonella* en pollos de engorde en el período 2005-2006 indicaron un 23.7% de positivos en el conjunto de la UE.

Los métodos tradicionales utilizados para la detección de *Salmonella* a partir de productos alimenticios contaminados requieren mucho tiempo y mucha mano de obra. Los métodos de PCR ya están siendo ampliamente utilizados en laboratorios agroalimentarios, debido a su alta especificidad, robustez y simplicidad. Además, la PCR multiplexada permite detectar simultáneamente varios organismos en una sola reacción.

Salmofast® TE se basa en la amplificación específica y simultánea de tres fragmentos de genes diferentes de cada organismo diana, usando PCR a tiempo real con análisis del pico de la curva de fusión (Tm).

Presentación

Salmofast® TE se presenta en una caja con 2 pre-mezclas que contienen todos los reactivos necesarios para 48 ó 96 determinaciones.

- Premix A: Test de Salmonella multiplexado
- Premix B: Test con control interno
- Controles positivos (*Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*)

La versión "Completo" incluye DNaready®, un tampón de lisis con proteinasa K diseñado específicamente para una extracción limpia, rápida y eficiente de ADN a partir de suspensiones bacterianas.

Especificaciones técnicas

Salmofast® TE es un kit de PCR a tiempo real basado en un reporter fluorescente tipo SybrGreen y está indicado para detectar la presencia de ADN, tanto de cualquier *Salmonella* spp como de los serogrupos *S. enteritidis* y *S. typhimurium* en alimentos. Puede también usarse para propósitos cuantitativos en un rango lineal que va de los 100 ng a los 0,0001 ng de ADN genómico. Este kit puede usarse para la detección de *Salmonella* spp en alimentos, al margen de los serogrupos.

Sensibilidad: 100%

Especificidad: 95 %

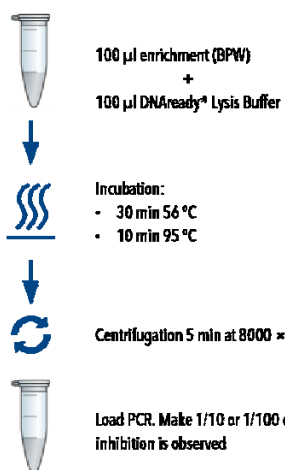
Los distintos sistemas de PCR que incluye el kit apunta a los genes *invA*¹ de *Salmonella enterica* (spp), *sdf*² de *S. enteritidis* y STM4492³ de *S. typhimurium* produciendo 3 fragmentos de ADN de 119, 299 y 759 pb de longitud, respectivamente.

La validación de los juegos de oligonucleótidos incluidos en el test (especificidad, inclusividad y exclusividad, etc..) han sido publicados (veáanse informes referenciados)

Uso

Extracción y purificación de ADN con DNAready®

PCR



- Tras el enriquecimiento pipetear 100 µL de agua de peptona tamponada (APT) en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml tipo "eppendorf" que contenga 100 µl de tampón de lisis DNAready® y homogenizar con vórtex.
- Incubar durante 30 min a 56 °C seguido de 10 min at 95 °C
- Centrifugar a 8000 × g ó 10000 rpm durante 5 minutos
- Usar el sobrenadante claro, que contendrá el ADN, para cargar la PCR

Para cada muestra, preparar 2 tubos de reacción añadiendo 16 µl de las premix A y B de Salmofast® TE, respectivamente. Añadir 4 µl del extracto de ADN a ambos tubos. Trabajar con diluciones 1/10 del extracto de ADN si se observan inhibiciones (Premix B sin producto de PCR). Una amplificación positiva del tubo que contiene la Premix B, indica la ausencia de sustancias inhibitoras en el extracto de ADN y por tanto valida cualquier resultado negativo en el tubo paralelo con Premix A.

1. Hoorfar, J., Ahrens, P., & Rådström, P. (2000). Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3429–35.
2. O'Regan, E., McCabe, E., Burgess, C., McGuinness, S., Barry, T., Duffy, G., ... Fanning, S. (2008). Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. *BMC Microbiology*, 8, 156.
3. McCarthy, N., Reen, F. J., Buckley, J. F., Frye, J. G., Boyd, E. F., & Gilroy, D. (2009). Sensitive and rapid molecular detection assays for *Salmonella enterica* serovars *Typhimurium* and *Heidelberg*. *Journal of Food Protection*, 72(11), 2350–2357.

Microbial SL. Parc Científic i Tecnològic de Girona. Ed. J. Casademont porta E. Pic de Peguera 15. E17003 Girona. www.microbial-systems.com

Para cada juego de muestras, realizar un control positivo (puede ser la Premix B sola) y un control sin ADN muestra (Non Template Control) con la Premix A sin ADN añadiendo 16 µl a los tubos respectivos. Un control negativo de extracción también debería incluirse para controlar la posibilidad de contaminaciones cruzadas durante el proceso de extracción de ADN, en particular cuando se procesa un elevado número de muestras

Programa de termociclador

Ciclos	Paso	Temperatura	Tiempo
1	Activación de la polimerasa	95 °C	10 min
35	Desnaturalización	95 °C	1 min
	Hibridación	60 °C	1 min
	Extensión	72 °C	1,5 min
1	Extensión final	72 °C	10 min

Una vez finalizada la PCR realizar un análisis de la curva de fusión (*melting curve*) enfriando a 55 °C, y aumentando la temperatura progresivamente a razón de 0,05 °C/seg desde 55 °C hasta 95 °C con monitoreo continuo de la fluorescencia. Debido a los diferentes tamaños de los productos, cada diana produce un valor de Tm distinto y reconocible a partir del patrón incluido en el kit (ver más abajo)

Interpretación de los resultados

Ct Muestra (A)	Ct Muestra (B)	Resultado
< 35	25 < 30 o No Ct	Positivo
No Ct	25 < 30	Negativo
No Ct	No Ct	Inhibición*

* diluir el extracto de DNA 1/5 o 1/10 y repetir.

Tanto *Typhimurium* como *Enteritidis* producen dos amplicones de tamaño distinto. Uno de 119 pb, común a todas las *Salmonellas* y otro específico del serotipo.

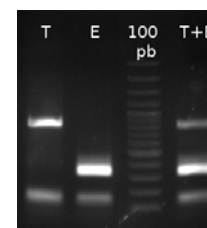


Figura 1. Perfil de bandas típico obtenido con Salmofast® TE.

Líneas

- 1: T; *Salmonella Typhimurium*
- 2: E; *Salmonella Enteritidis*
- 3: 100 pb ladder
- 4: T+E; Mezcla de moldes ADN: *Typhimurium* + *Enteritidis*

Microbial SL. Parc Científic i Tecnològic de Girona. Ed. J. Casademont porta E. Pic de Peguera 15. E17003 Girona. www.microbial-