

Salmofast®

Para la detección rápida e inequívoca de *Salmonella* spp. por PCR a tiempo real

INTRODUCCION

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae y comprende dos especies de bacilos Gram-negativos, no formadores de esporas: *S. enterica* y *S. bongori*. La especie más conocida es *S. enterica*, todo lo cual incluye seis subespecies de importancia clínica. Entre los reservorios ambientales de *Salmonella* destacan el agua, el suelo, los insectos, las superficies industriales y de cocina, las heces de animales, carnes, pescados y mariscos crudos, las aves crudas, los huevos, la leche y los productos lácteos, las salsas y los aderezos para ensaladas, etc.

Salmofast® proporciona un método rápido, fiable, sensible y altamente específico para detectar todas las especies de *Salmonella* mediante la realización de una PCR en tiempo real basada en la amplificación de un marcador genético específico. La inclusión de un control interno de amplificación (IAC) descarta los resultados falsos negativos

EL USO DE REACTIVOS EN MAL ESTADO PUEDE CONDUCIR A RESULTADOS ERRÓNEOS O POCO FIABLES. POR FAVOR, COMPRUEBE LOS REACTIVOS ANTES DE USARLOS.

PRINCIPIO

Salmofast® se basa en la detección mediante PCR a tiempo real de un gen diana que contiene una secuencia específica para todas las especies de *Salmonella*. Una amplificación positiva indica la presencia de este microorganismo en la muestra.

Salmofast® también puede ser usado para confirmar colonias crecidas en placa.

COMPONENTES

Presentación

Salmofast® se presenta en viales que contienen reactivos suficientes para realizar 48, 96 o 480 reacciones.

Reactivos suministrados

Mix de Reacción: contiene tampón, dNTPs, DNA polimerasa Hot-Start, agua estéril bidestilada libre de ácidos nucleicos y MgCl₂ en proporciones y cantidad suficiente para el número de reacciones indicado en la caja. Esta Mix de Reacción incorpora un control interno de amplificación (IAC) cuya detección indicará la ausencia de inhibidores. Los primers y sondas necesarios para la amplificación tanto del IAC como del gen diana de *Salmonella* están también incorporados en la mezcla de reactivos. La sonda de detección de *Salmonella* está marcada con el fluorocromo FAM, mientras que la sonda de detección del IAC está marcada con el fluorocromo JOE/HEX. La mix de reacción no contiene ROX

Controles: Se incluye un control positivo correspondiente a ca. 10⁵ genomas/μL de *Salmonella* spp LT2 (ATCC 19585) y un control sin ADN molde (non-template control, agua estéril grado de biología molecular).

Almacenamiento

Evitar la exposición directa a la luz. Almacenar a -20 °C para su conservación. Evitar ciclos repetidos de congelación/descongelación. En caso de uso frecuente puede mantenerse a 4°C durante un máximo de 4 semanas.

Material necesario no suministrado

- Pipetas automáticas de desplazamiento positivo y puntas con filtro.
- Tubos de microcentrifuga
- Guantes desechables de latex sin polvo o nitrilo

PROTOCOLO PCR

- Pipetear 15 μl de la Mix de Reacción en cada tubo de PCR o pocillo de la placa. Realizar esta operación en una cabina o en un ambiente limpio y bajo luz tenue.
- Cargar 5 μl del extracto de ADN o de una dilución 1/10 del mismo en cada tubo de PCR o pocillo de la placa. Cargar también 5 μl del control positivo o del control blanco (NTC) en los tubos o pocillos correspondientes.
- Colocar los tubos de PCR o la placa en el termociclador. Programar la lectura de fluorescencia en los canales correspondientes a los fluoróforos FAM y JOE/HEX. Usar el siguiente programa de amplificación:

Paso	Evento	Temperatura	Tiempo
1	Activación de la ADN polimerasa y desnaturalización de ácidos nucleicos	95 °C	10 minutos
2 (× 40 ciclos)	Desnaturalización Hibridación/Extensión	95 °C 60 °C	15 segundos 1 minuto *

*La lectura de la fluorescencia debe realizarse durante el paso 2, al final de cada etapa de Hibridación/Extensión a 60°C.

REACCIONES DE CONTROL

Para cada tanda de termociclador, se recomienda realizar al menos un control blanco (NTC) con 5 μl de agua libre de ADN (incluida en el kit) en lugar de extracto de ADN y un control positivo usando el ADN genómico de *Salmonella* incluido en el kit.

PRECAUCIONES

- Seguir las definiciones y requerimientos generales de la norma ISO22174:2005 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens --
- Deben observarse las Buenas Prácticas de Laboratorio para obtener resultados fiables con esta técnica. La alta sensibilidad del test requiere un cuidado extremo para mantener la pureza de origen de todos los reactivos. Descarten cualquier reactivo que sea sospechoso de estar contaminado.
- Los ácidos nucleicos son muy sensibles a la degradación por parte de las nucleasas. Éstas están presentes en la piel y en las superficies en contacto con ella que no se han limpiado debidamente. Limpiar las superficies con los productos adecuados. Usar guantes de un solo uso sin polvo y bata durante todo el procedimiento. Lavarse las manos profusamente al finalizar.
- Este ensayo ha sido validado usando los reactivos suministrados con Salmofast®. El uso de otros métodos de amplificación o cualquier cambio en el protocolo puede producir resultados falsos. NO INTERCAMBIEN COMPONENTES de distintos lotes.
- No usar Salmofast® después de su fecha de caducidad. Almacenar el producto bajo las condiciones indicadas en la caja y en estas instrucciones.
- El uso de este producto está indicado para personal cualificado con experiencia en extracción y amplificación de ADN.
- Esta prueba ha sido diseñada para investigar la presencia de *Salmonella* spp. En muestras ambientales y alimentarias o cualquier otro propósito relacionado con la I+D. En ningún caso debe usarse Salmofast® como herramienta diagnóstica en muestras clínicas.

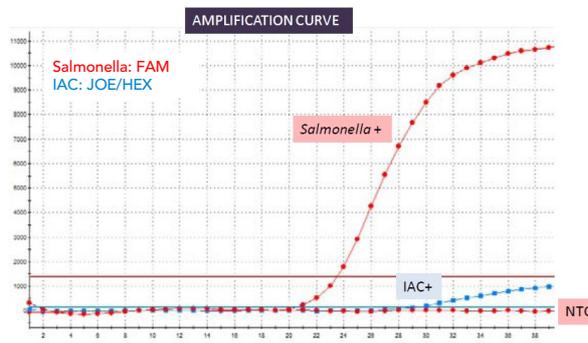
INCLUSIVIDAD Y EXCLUSIVIDAD

La inclusividad de los primers y sondas de Salmofast® se ha ensayado satisfactoriamente con 30 cepas de referencia de *Salmonella* provenientes de la Colección Española de Cultivos Tipo, la mayoría de las cuales son de origen alimentario y ambiental. La exclusividad se ha comprobado con 29 cepas no-diana.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Una reacción se considerará positiva cuando la fluorescencia correspondiente a *Salmonella* (FAM) resulte mayor que el valor umbral determinado por el control positivo. Las amplificaciones de ADN tanto de *Salmonella* y del control interno (IAC) pueden distinguirse fácilmente seleccionando el canal de fluorescencia apropiado.

El resultado será negativo cuando la fluorescencia de *Salmonella* (FAM) se mantenga por debajo del valor umbral y la del IAC (JOE/HEX) cruce el valor umbral correspondiente.



Nota: El valor de Ct de referencia para el IAC es el del NTC y puede depender del software de cada equipo.

Para más información leer la guía de interpretación de resultados:
http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia_resultados_PCR_20131205.pdf

RESOLUCION DE PROBLEMAS

PROBLEMA	CAUSA	SOLUCION
No se detecta señal específica para <i>Salmonella</i> ni para el IAC	Inhibición de la PCR Malas condiciones de almacenamiento de la Mix de Reacción.	Diluir el extracto de ADN 1/10 o 1/10 (dependiendo de la matriz) y repetir el análisis o usar un kit de extracción que incluya un paso de purificación del ADN para eliminar las sustancias inhibidoras. Comprobar la fecha de caducidad. Store the Reaction Mix at the recommended temperature and avoid contact with light.
Se obtiene señal para <i>Salmonella</i> pero no para el IAC.	Amplificación preferente del ADN de <i>Salmonella</i> debido a elevada concentración en el extracto.	La reacción es correcta y positiva para <i>Salmonella</i> .
Amplificación específica de <i>Salmonella</i> en controles blancos (NTC).	Contaminación de materiales o reactivos.	Repetir el análisis con reactivos nuevos y pipetas limpias. Limpiar las superficies con hipoclorito o lejía diluida (10%) o un producto similar. Repetir el análisis con un tubo nuevo de Salmofast®. Si la contaminación persiste, contactar con nuestro Departamento Técnico.
No se obtiene amplificación en los tubos con control positivo de <i>Salmonella</i> .	Sin amplificación del IAC: mal almacenamiento de la Mix de Reacción. Con amplificación del IAC: error de pipeteo o degradación del ADN del control positivo.	Almacenar la Mix de Reacción y los controles en las condiciones indicadas. Repetir el análisis. Usar un Control positivo nuevo y asegurarse que la cantidad pipeteada entra en la reacción. Repetir el análisis.

PROCEDIMIENTO PROPUESTO

1. Preparación de la muestra

Las especificaciones técnicas son las mismas recogidas en la ISO 6887-1 to 5: *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico y la ISO 6579:2002.*

Procedimiento normal:

- Preparar una suspensión inicial 1/10 del alimento, típicamente 25 g ó 25 ml de alimento + 225 ml of Agua de Peptona Tamponada (APT)
- Homogeneizar con un Stomacher o similar durante 1 min

2. Enriquecimiento

- Incubar a 37 °C durante 18 ± 2 h
- Tras la incubación mantener las bolsas refrigeradas (4 °C) si no puede iniciarse inmediatamente el paso 3. Tiempo máximo de almacenaje a 4°C: 72 horas.

3. Extracción de ADN (DNAready)

- Mezclar 0,1 ml del APT enriquecido libre de partículas con 0,1 ml de DNAready en un tubo de microcentrifuga tipo Eppendorf.
- Incubar 30 minutos a 56 °C seguido de 10 minutos a 95 °C.
- Centrifugar el extracto a 8000 × g durante 5 minutos

EXTRACCIÓN DE ADN CON DNAready



100 µl enriquecimiento APT
+
100 µl de DNAready® Lysis Buffer



Incubar:
• 30 min 56 °C
• 10 min 95 °C



Centrifugar 5 min a 8000 × g



Cargar PCR. Diluir el extracto 1/10 o 1/100 si se observa inhibición