

PrimeDetect™ Salmonella TE II_{96 rxn}**Detección de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium mediante PCR a tiempo real multiplex.****Cat No. FP0111****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. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis y *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium incluyendo su variante monofásica con la serofórmula 4,[5],12:i:-. Estas toxiinfecciones son, por lo general, debidas al consumo de carne de pollo o de huevos o derivados.

Los procedimientos analíticos clásicos incluyen el cultivo según la ISO 6579:2002 seguido de serotipado por aglutinación y necesitan varios días para emitir resultados, lo que en ocasiones puede ser demasiado largo, sobre todo en productos cárnicos que se ponen a la venta en un día o dos tras el sacrificio.

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.

PrimeDetect™ *Salmonella* TE II se basa en la amplificación específica y simultánea de dos fragmentos de ADN codificante para las proteínas que actúan de antígenos flagelares empleados para la distinción de los serogrupos indicados.

Presentación

PrimeDetect™ se presenta en un packaging que contiene todos los reactivos necesarios para 96 determinaciones.

- Mastermix: Test para la detección/identificación de los serotipos. Contiene tampón, dNTPs, ADN polimerasa HotStart, agua estéril bidestilada libre de ácidos nucleicos y MgCl₂ en proporciones y cantidad suficientes para el número de reacciones indicadas en el envase.
- Control positivo: una mezcla isomolar de las dianas correspondientes a *S. Typhimurium* bifásica y *S. Enteritidis*
- H₂O grado Biología Molecular
- DNAREady Lysis Buffer, 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

PrimeDetect™ es un kit de PCR a tiempo real 4-plex que incorpora sistemas de PCR a tiempo real con sondas de hidrólisis marcados con fluoróforos de distinta longitud de onda de emisión, lo que permite el seguimiento del resultado de la PCR de los distintos organismos diana de forma simultánea y separada. Las dianas genéticas son *safA* para *Salmonella* Enteritidis y *fliA*, para *S. Typhimurium*

Inclusividad y exclusividad

Probado con 105 cepas de *Salmonella* Enteritidis y 60 cepas de *S. Typhimurium* bifásica.

Serotipo	n	Sensibilidad	Especificidad
<i>Salmonella</i> Enteritidis	105	100 %	99 %
<i>Salmonella</i> Typhimurium bifásica	60	99,4 %	99,4 %



DATA SHEET

Version: 2
Revision date: 20/05/2025

La exclusividad se ha probado con 42 cepas similares a *S. Typhimurium* (representando a 16 serovares), 37 cepas similares a *S. Enteritidis* (representando a 16 serovares), 61 cepas de otras *Salmonellas* de relevancia epidemiológica (representando a 19 serovares) y 40 cepas de la familia *Enterobacteriaceae* (representando a 26 especies)

Límite de detección

El sistema permite amplificar entre 13 unidades genómicas por reacción con una probabilidad del 95%.

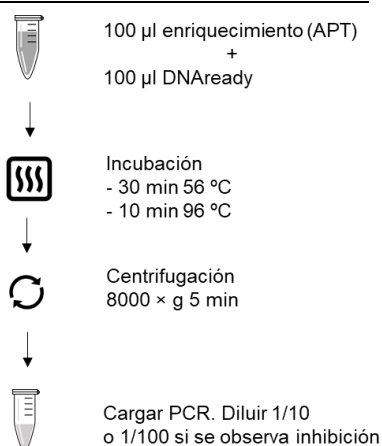
En muestras, ofrece un 100% de probabilidad de detección en 3 UFC/25 g y 5 UFC/25 g para *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, respectivamente.

Conservación

Para evitar repetidos ciclos de congelación y descongelación, a la recepción del kit dispensar 15 µl de la Mix de Reacción en tubos de PCR, tiras de 8 tubos (*strips*) o placa. Realizar esta operación en una cabina de PCR o en un ambiente limpio y bajo luz tenue.

Procedimiento

Extracción de ácidos nucleicos



- Si se parte de aislados en placa (colonias) picar una porción de la colonia y resuspender en 100 µl de agua de grado molecular.
 - Incubar a 95 °C durante 5 min
 - Dejar enfriar
 - Cargar la PCR
- Si se parte de un caldo de enriquecimiento, mezclar 100 µl con 100 µl del DNAready Buffer incluido en el kit.
 - Incubar a 56 °C durante 30 min y 95 °C durante otros 10 minutos y dejar enfriar
 - Centrifugar 5 min a 8000 x g
 - Emplear el sobrenadante para cargar la PCR.

PCR

- Preparar tantos tubos de reacción como muestras a analizar, más uno para el control positivo (verificación del funcionamiento de todos canales de la PCR) y otro para el control negativo (verificación de la ausencia de contaminación en los reactivos).
- 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.
- Usar el siguiente programa de termociclador.

Ciclos	Evento	Temperatura	Tiempo
1	Activación de la ADN polimerasa	95 °C	10 min
40	Desnaturalización	95 °C	15 seg
	Hibridación y extensión	60 °C	1min «

«: lectura de fluorescencia en los canales correspondientes a los fluoróforos FAM, HEX, ROX y Cy5 o equivalentes.

La denominación del canal correspondiente a los fluoróforos que equipa este kit puede variar en función del termociclador. Los valores de emisión y excitación de los fluoróforos incorporados son:



DATA SHEET

Version: 2
Revision date: 20/05/2025

Canal	Diana	Excitación	Emisión
FAM	<i>Salmonella</i> Enteritidis	493 nm	517 nm
HEX	<i>Salmonella</i> Typhimurium	535 nm	550 nm
Cy5	IAC (Control interno de amplificación)	646 nm	669 nm

Interpretación de los resultados

Visualizar la gráfica de amplificación seleccionando los canales de fluorescencia de forma individual y anotar el resultado. Una curva cuya fluorescencia cruza el umbral establecido por el software del equipo indica una amplificación positiva.

La amplificación en el canal FAM indica la presencia de ADN de *S. Enteritidis* mientras que si se produce en el canal HEX el ADN corresponde a *S. Typhimurium* según la siguiente tabla-guía.

Para que un negativo se pueda considerar como tal, debe existir

PCR			Resultado
FAM	HEX	Cy5	
+	–	+/-	<i>S. Enteritidis</i>
–	+	+/-	<i>S. Typhimurium</i>
–	–	+	Negativo para ambos serogrupos
–	–	–	Reaccion inhibida