

Conda[®]ene[®]

**Condagene[®] Salmonella spp
(CAT. 6515)**

Propósito, características y contexto

Propósito

Este kit ha sido diseñado para la detección de *Salmonella* spp en porciones de alimentos sometidas a enriquecimiento conforme los procedimientos estándar de microbiología. También puede ser usado para la confirmación de colonias sospechosas aisladas en los medios de cultivo selectivo.

El género *Salmonella* incluye las dos especies *Salmonella enterica* con seis subespecies conocidas y *Salmonella bongori*.

Características

Este kit ha sido desarrollado para satisfacer las máximas expectativas de nuestros clientes, en lo que refiere a su desempeño, robustez y es compatible con los recientes avances en PCR.

- Contiene UDG para poder eliminar contaminación por productos de otras PCR (una de las principales fuentes de contaminación).
- La Taq polimerasa contenida:
 - Acepta ciclos rápidos de PCR, por lo que es compatible con los termocicladores de última generación.
 - Es térmicamente muy estable, puede soportar semanas en la nevera o soportar hasta 20 ciclos de congelación-descongelación.
- El set de cebadores / sondas es compatible con un protocolo de PCR de viabilidad.
- Conforme a la Norma ISO 20837:2007. Incorporando un control interno en concentración estandarizada para poder monitorizar posibles inhibiciones totales o parciales.
- Las sondas incorporan Quenchers de elevada eficiencia.

Contexto técnico y reglamentarios

En lo que refiere al uso de este kit como sistema de detección de *Salmonella* en muestras de alimentos, este cumple en con las especificaciones técnicas del método [§ 64 LFGB BVL 00.0098](#) desarrollado por el grupo " Microbiología de métodos biológicos moleculares" de la Oficina Federal Alemana de Protección al Consumidor y de Seguridad Alimentaria, y evaluado en un ensayo inter laboratorio con 13 participantes. Las sondas y los cebadores de PCR contenidos en este kit también son conformes con la [DIN 10135:2013-05](#) (Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Method for the detection of *Salmonella*).

Si bien en el método original se validó con leche en polvo, es plenamente aplicable a otras matrices alimentarias que pudieran contener *Salmonella* spp. Este kit cumple con los preceptos de los estándares ISO en materia de PCR que le aplican:

- [ISO 20837:2006](#) *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos. Requisitos para la preparación de las muestras para la detección cualitativa.* En especial al referir como método de enriquecimiento lo indicado en la norma [ISO 6579-1](#). *Método horizontal para la detección, recuento y serotipado de Salmonella. Parte 1: Método de detección.*
- [ISO 20838:2007](#) *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos. Requisitos para la amplificación y la detección para los*

métodos cualitativos. En especial en lo que refiere a la verificación de la especificidad de los cebadores de PCR, que empíricamente queda demostrada por el propio desarrollo de la **§ 64 LFGB BVL 00.00988** o la **DIN 10135_2013-05** (tabla D4, Anexo D) y las múltiples publicaciones basadas en la detección del gen *invA* usando el mismo set de cebadores y sondas.

- **ISO 22174:2005** *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos. Requisitos generales y definiciones*. En especial a los controles recomendados conforme su punto 9.3 y la tabla 1.

En lo que refiere al uso de este kit como herramienta de confirmación de colonias, este uso queda amparado por la **Norma ISO 7218: A1 2013** *Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico*, en el punto 12.5.

A) Método de ensayo conforme § 64 LFGB BVL 00.00988.

El enriquecimiento de *Salmonella* spp. se lleva a cabo conforme a la norma **ISO 6579-1**.

1. Incubación de una porción de muestra (25 g o 25 mL) en Agua Peptonada Tamponada a $37\pm 1^\circ\text{C}$, 18-22 h. La preparación de la muestra debe seguir lo indicado en las normas ISO 6887 que le aplicara.
2. Transferir 0,1 mL de cultivo a un tubo con 10 mL de caldo RV precalentado a $37\pm 1^\circ\text{C}$ y incubar $41,5\pm 1^\circ\text{C}$, durante al menos 5h.

Nota: El enriquecimiento microbiano selectivo puede omitirse si se ha demostrado que, para examinar la matriz, el enriquecimiento no selectivo logra al menos la misma sensibilidad.

3. Recuperar 1 mL del caldo de enriquecimiento secundario, realizar la purificación de ácidos nucleicos conforme al punto 7.4 de la norma de referencia.

Nota: la propia norma acepta otras aproximaciones comerciales si consideran el fin previsto y obtienen resultados comparables. Recomendamos como uso general el **Kit de Extracción Condagene® Quick (Cat. 6501)**.

4. Realización de la PCR conforme a este kit. En caso de PCR positiva la norma no indica la conveniencia de hacer confirmación por cultivo.

B) Compatibilidad con PCR de viabilidad

Este set de cebadores y sondas es compatible con un procedimiento de PCR de viabilidad.

Dado que, en determinadas muestras, pueden existir células viables, pero no cultivables la aplicación de este tratamiento puede ser una ventaja en términos de evaluación de riesgo.

Para saber más sobre la PCR de viabilidad solicite información adicional a su distribuidor.

Instrucciones de uso del kit

Contenidos

El kit de detección de *Salmonella* spp por qPCR contiene todos los reactivos para realizar la detección del ADN de este microorganismo en alícuotas del caldo de pre-enriquecimiento, y previa purificación del mismo.

Tabla 1. Contenido de Condagene® *Salmonella* spp.

REACTIVOS	COLOR	CONTENIDO
5x Reagent mix*	1. Verde	1 x 440µl
Sondas-cebadores qPCR ¶	2. Azul	1 x 100 reacciones
Estándar ADN (<i>S.enterica</i> ATCC 13076)	3. Amarillo	1x (1x10exp7 UG)
Agua grado PCR	4. Blanco	2 x 1500 µl

*Reagent mix: **Solis Fast Probe® qPCR Mix with UNG (no Rox)** (contiene HOT FIREPol® DNA Polimerasa, UDG, qPCR buffer, dNTP mix -dATP, dCTP, dGTP, dUTP).

¶ Contiene Sondas-cebadores específicos (*Salmonella* spp (FAM) & control interno (HEX)) y ADN del control interno.

Solis Fast Probe y Hot Firepol® son marcas de Solis Biodyne, el uso de estos reactivos se hace bajo licencia.

Equipamiento adicional requerido

- Kit de purificación de ácidos nucleicos (p.e. Cat. 6501 Kit de Extracción Condagene® Quick).
- Pipetas de volumen variable.
- Puntas de micropipeta, con barrera.
- Termociclador de PCR.
- Tubos de PCR.
- Rack para tubos de PCR.
- Microcentrífuga.
- Vórtex.

Almacenamiento y conservación

Este kit es enviado a temperatura ambiente. Su conservación a temperatura ambiente no afecta al rendimiento de la 5x HOT FIREPo® qPCR Mastermix debido a que la polimerasa es térmicamente muy estable debido a la tecnología TAG desarrollada por Solis BioDyne.

Una vez recibido se aconseja conservarlo a -20°C, bajo estas condiciones y con un manejo adecuado el rendimiento de kit queda garantizado al menos hasta la data de caducidad impresa en la etiqueta en la caja. Una vez superado este plazo, y mientras la señal del control positivo esté en un rango de $\pm 1,5$ Ct, que en el de series de PCR anteriores, se considera apto para su uso.

Una vez reconstituido, el conjunto de reactivos, especialmente el correspondiente a sondas y cebadores (tapón Azul) no deberían ser sometidos a más de 5 ciclos de congelación-descongelación. Si usted cree que va a ser así, considere fraccionar en diferentes alícuotas.

Estado microbiológico

Productos estériles.

Preparación de los reactivos

Consultar el procedimiento, en la sección 2 (procedimiento operativo).

Reglas Generales

Lea atentamente las hojas de seguridad de este y de todos los productos que va a usar durante todo el ensayo.

Este producto es fabricado y vendido para el control de calidad en alimentos, no ha sido diseñado para ningún otro uso, en especial para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Su uso debe ser llevado a cabo por personal experimentado, y cualificado en el manejo de productos químicos potencialmente peligrosos.

Los usuarios deben tomar decisiones independientes sobre la integridad de la información en función de todas las fuentes disponibles. El fabricante no se hace responsable de ningún daño resultante de la manipulación o el contacto con el producto.

Procedimiento operativo

Acciones para realizar antes de empezar

- Reconstituir el Estándar ADN, tapón Amarillo.

Añadir 100-250 µl de agua grado PCR, (tapón Blanco) y mezclar con la propia pipeta presionando hacia arriba y abajo suavemente, al menos 5 veces. Este reactivo es el control + de PCR, cuando sea necesario añada 5 µl en la mezcla de reacción del tubo de control positivo de PCR. No someta este tubo a más de 2 procesos de congelación-descongelación, si cree que va a tener que usarlo más de 2 veces realice varias alícuotas en tubos de baja retención de ADN si es posible. Una vez reconstituido se debe conservar a -20°C.

- Reconstituir las Sondas-cebadores qPCR, tapón Azul.

Añadir el volumen completo (440µl) de 5x HOT FIREPol® qPCR Mastermix (tapón Verde) al tubo de Sondas-cebadores qPCR (tapón Azul) y mezclar con la propia pipeta presionando hacia arriba y abajo suavemente, al menos 5 veces. Descarte el tubo 1 (tapón Verde), una vez usado. No someta este tubo a más de 5 procesos de congelación-descongelación, si cree que va a tener que usarlo más de 5 veces realice varias alícuotas en tubos de baja retención de ADN si es posible. Una vez reconstituido se debe conservar a -20°C.

- Antes de cada uso, debe asegurarse que los reactivos están completamente descongelados, y le recomendamos hacer un pulso de microcentrifuga (spin) antes de abrirlos.

Procedimiento

1. Prepare la mezcla de reacción, para las muestras y controles conforme a lo especificado en la Tabla 2. Si su equipo necesita de ROX como normalizador siga lo indicado en la Tabla 3. Realice todas las operaciones a temperatura ambiente, de esta manera la UNG podrá estar activa y descontaminar cualquier contaminación cruzada por producto de PCR. Un correcto flujo de trabajo requiere de varios controles, en lo que refiere a la PCR un control positivo y uno de negativo. En lo que refiere al control de la serie analítica se recomienda procesar blanco de muestra también.

Tabla 2. Volúmenes recomendados para una sola mezcla de reacción de qPCR. Para cada lote, multiplique x1,1 y por el total de muestras para asegurar que no falten reactivos.

COMPONENTES (x1 REACCIÓN)	VOLUMEN
Tubo 2 (Azul) 5x Solis Fast Probe ® qPCR (qPCR Cebadores/Sondas, Ci)	4 µl
ROX (opcional pero no suministrado)	x µl ver Tabla 3
Agua grado PCR, Tubo 4 (Blanco)	hasta 11 µl
VOLUMEN REACTIVOS	15 µl
Muestra ADN o Control + o Blanco de PCR*	5 µl
VOLUMEN TOTAL DE REACCIÓN	20 µl

*Ver punto Procedimientos.

2. Cierre los tubos o tiras de PCR y cárguelos en el termociclador siguiendo las instrucciones de este.
3. Programe el termociclador conforme a la Tabla 4, asegúrese que la detección está activa para los canales FAM y HEX.
4. Ponga en marcha el programa de PCR.
5. Proceda con el análisis de resultados.

Tabla 3. Concentración de ROX recomendada para las diferentes plataformas de PCR (producto no incluido en este kit). Puede comprar este producto en Sigma-Aldrich (Ref. R4526).

EQUIPO DE QPCR	CONCENTRACIÓN ROX RECOMENDADA	VOLUMEN 10x ROX / 20 µL REACCIÓN
Bio-Rad: CFX96TM & CFX348TM, iQTM5 & MyiQTM, Chromo4TM, Opticon® 2 & MiniOpticon®	No ROX	-
Qiagen: Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000		
Eppendorf: Mastercycler®: ep realplex2 & ep realplex4		
Roche: LightCycler® 480 ,LightCycler® 1,5, 2		
Illumina: The EcoTM		
Cepheid: SmartCycler® II		
Applied Biosystems: ViiATM 7, 7500, 7700	0.1x final	0.20 µl of 10xROX
Stratagene: MX3000PTM, MX3005PTM, MX4000PTM		
Applied Biosystems: 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT Fast, StepOneTM & StepOnePlusTM	1x final	2.0 µl of 10x ROX

Tabla 4. Protocolo PCR.

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO	COMENTARIOS
Activación inicial	95°C	3 min (180s)	
Amplificación (2 pasos):			
- Desnaturalización	95°C	5s	
- Annealing/Extensión	60°C	40s	Lectura de Fluorescencia
Total ciclos	45		

Análisis de resultados

La interpretación de los resultados debe ser realizada por personal entrenado en el manejo del software del termociclador.

Tabla 5. Posibles resultados de PCR.

CANAL FAM	CANAL HEX	RESULTADO
+	+	Muestra positiva
+	-	
-	+	Muestra negativa*
-	-	Inhibición de la PCR

*El control interno (canal HEX) tendría que salir en un Ct alrededor de ± 3 Ct con respecto al CI del blanco de PCR, en caso contrario puede ser debido a alguna inhibición parcial por la presencia en la muestra de inhibidores de PCR. Revise el flujo de trabajo seguido y considere repetir la PCR con un extracto de DNA diluido 1/10.

En algunos casos, en las muestras positivas, el control interno puede no dar señal o verse alterado su Ct, esto no supone ninguna caída del rendimiento de Kit, simplemente indica que la amplificación de la diana ha limitado la del CI.

Interpretación de los controles

Unas buenas prácticas analíticas en PCR conforme a **ISO 22174**, requieren el uso de varios tipos de control. Los de la propia PCR y los de proceso.

Controles de PCR:

- Blanco de PCR, en lugar de muestra se debe cargar con agua PCR.
- Control positivo de PCR, cargar con 5 μ L de control positivo (Tapón amarillo).

Si el blanco de PCR da positivo o el control positivo da negativo, revise todos los registros primarios del ensayo para detectar fuentes de error, en caso contrario tome las decisiones oportunas en base a una fiabilidad analítica comprometida.

Deberían incluirse controles adicionales suplementarios a intervalos regulares de tiempo y sistemáticamente cuando algunos de los controles de PCR no dan los resultados esperados.

Como control de serie analítica, se recomienda como buena práctica, que en cada tanda de trabajo procese una muestra sin contaminar, en paralelo con las otras muestras a ensayar. Por defecto con agua destilada estéril. De esta manera tendrá un control sobre posibles contaminaciones ambientales y/o cruzadas.

Marcas y licencias

El uso de este producto puede estar cubierto por Licencias, patentes o solicitud de patente pendiente. Los clientes que recibieron este producto pueden usarlo con fines de investigación y evaluación de la calidad en alimentos sin infringir los derechos de propiedad intelectual.

Solis Fast Probe® qPCR, es una marca registrada de Solis BioDyne. Este producto se vende bajo acuerdo entre Conda-lab y Solis BioDyne.

El uso de este producto no está destinado con fines terapéuticos, uso doméstico, agrícola o cosmético. Su uso debe ser supervisado por una persona técnicamente cualificada con experiencia en el manejo de productos químicos potencialmente peligrosos. Los usuarios deben tomar decisiones independientes sobre la integridad de la información en función de todas las fuentes disponibles.

El fabricante no se hace responsable de ningún daño resultante de la manipulación o el contacto con el este producto.

Garantía y descargo de responsabilidad

Condalab garantiza que este producto está libre de defectos en materiales y de mano de obra hasta la fecha de vencimiento impresa en la etiqueta, siempre que se cumpla lo siguiente:

1. El producto se utiliza según las pautas e instrucciones establecidas.
2. Condalab no garantiza su producto contra ninguno y todos los defectos cuando: el defecto aparece como resultado de material o mano de obra no proporcionada por Condalab; defectos causados por mal uso o uso contrario a las Instrucciones suministradas, o si el producto está contaminado por un manejo o almacenamiento incorrecto.
3. Todas las garantías de comerciabilidad e idoneidad para un propósito particular, escrito, oral, expreso o implícito, se extenderán solo por un período de un año a partir de la fecha de fabricación. No hay otras garantías que se extiendan más allá de las descritas en este documento.
4. Condalab no asume ninguna responsabilidad ante ningún comprador de su producto por ningún compromiso, representación o garantía realizada por distribuidores o distribuidores que vendan sus productos más allá de los aquí expresamente expresados, a menos que lo exprese por escrito un representante de Condalab.
5. Condalab no asume responsabilidad por daños incidentales o consecuentes, incluidos, entre otros, la responsabilidad por la pérdida del uso de este producto, la eliminación o el reemplazo de mano de obra, pérdida de tiempo, inconvenientes y gastos por llamadas telefónicas, gastos de envío, pérdida o daños a la propiedad o pérdida de ingresos, lesiones personales o muerte injusta.
6. Condalab se reserva el derecho de reemplazar o abonar el importe de cualquier kit devuelto bajo esta garantía.

Contacto y soporte

Si tiene preguntas o tiene problemas con este o cualquier otro producto de Condalab, comuníquese con nuestro personal de soporte técnico (consulte los detalles en www.condalab.com). Nuestros científicos están comprometidos a brindar asistencia de manera rápida y efectiva. También le recomendamos que se comunique con nosotros si tiene alguna sugerencia para mejorar el rendimiento de nuestro producto o el uso de nuestros productos en nuevos formularios o aplicaciones.



comercial@condalab.com | www.condalab.com

Si necesitas ampliar la información sobre los productos y técnicas qPCR para detección de patógenos, no dudes en contactar con nosotros.