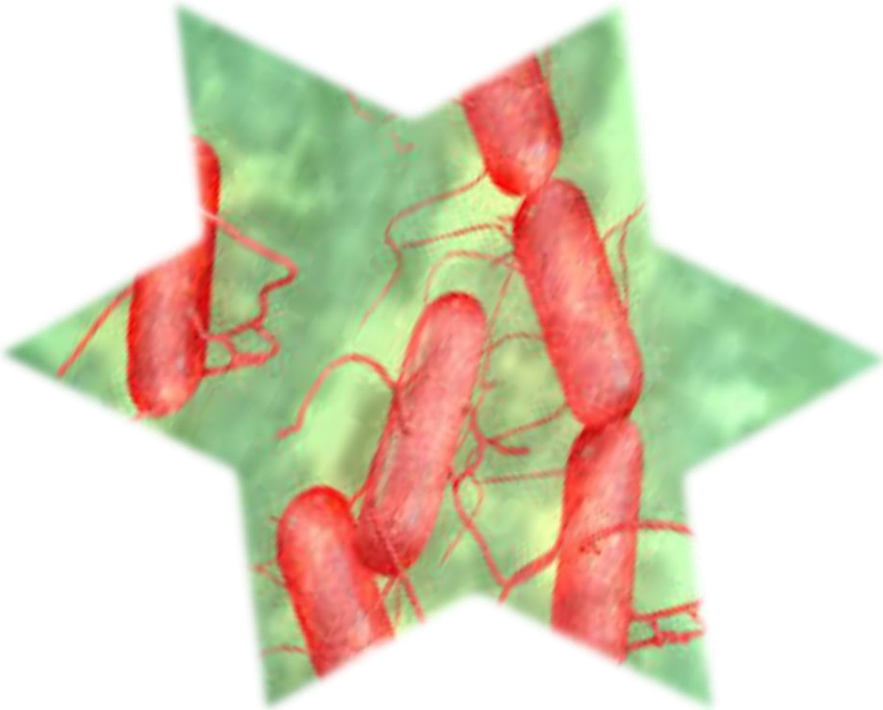


# Multiplex PCR per discriminare *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* 4,[5],12:i: -



## PCR Multiplex per discriminare *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* 4,[5],12:i: -

**S. 4,[5],12:i:-** è la variante monofasica di *S. Typhimurium*;  
è un sierotipo emergente e negli ultimi dieci anni si è  
riscontrato un forte aumento della sua prevalenza.

Questi due sierotipi rilevanti sono antigenicamente simili, ma  
nella variante monofasica manca la seconda fase ciliare.

Questa PCR differenzia *Salmonella* Typhimurium dalla sua  
variante monofasica 4,[5],12:i:-.

# PCR Multiplex per discriminare *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* 4,[5],12:i: -

## TARGET:

-Regione intergenica *fliA-fliB*: PRIMER FFLIB/RFLIA



COMUNE AD  
ENTRAMBI I  
SIEROTIPI

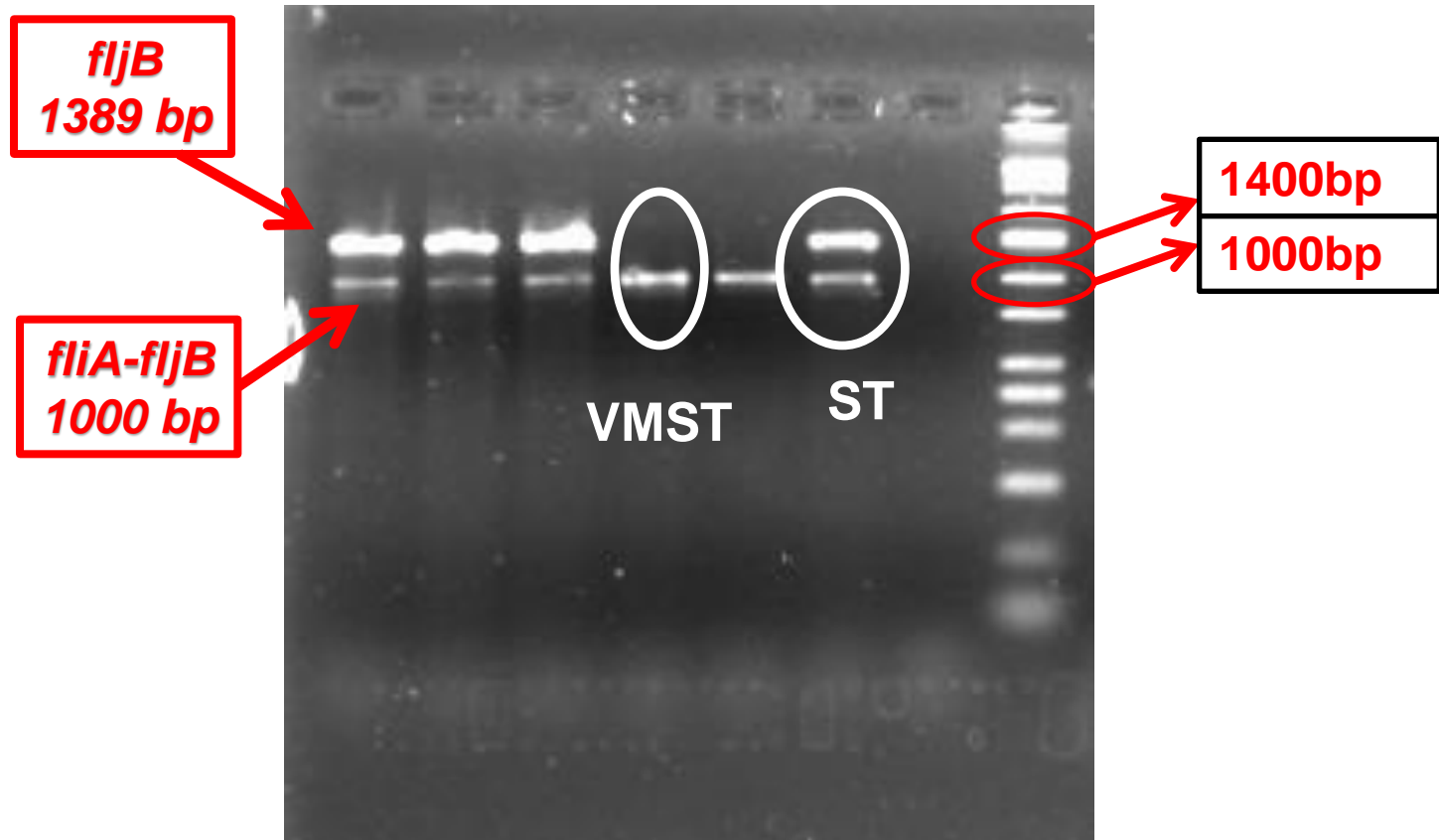
*-fliB* gene: PRIMER Sense-59/Antisense-83



PRESENTE SOLO IN  
S. TYPHIMURIUM

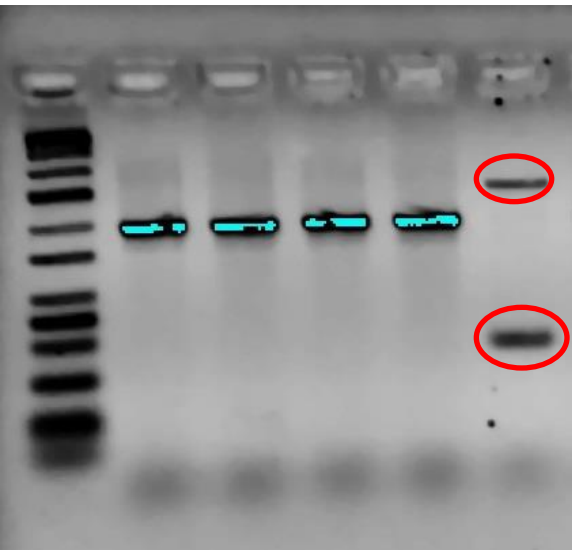
**PHASE 2 – FLAGELLAR ANTIGEN**

# PCR Multiplex per discriminare *Salmonella* Typhimurium (ST) e *Salmonella* 4,[5],12:i: - (VMST)



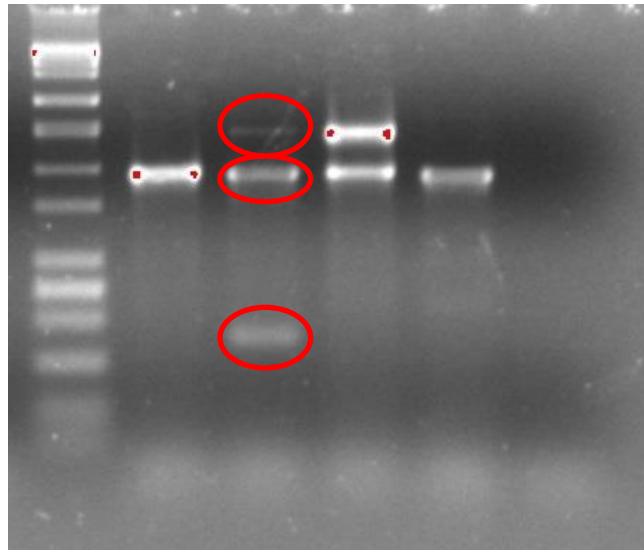
## ALTRI RISULTATI POSSIBILI:

1) Altro sierotipo bifasico

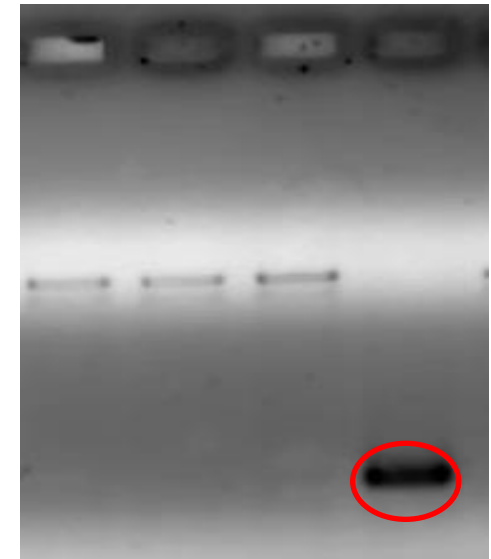


Es: *S. Gloucester* o *S. Agama*

2) Cultura analizzata mista



3) Altro sierotipo monofasico



Es: *S. Enteritidis*

## Protocollo accreditato e in uso presso IZSVE:

(<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1826.pdf>)

## Estrazione di DNA da ceppo batterico puro



LISI TERMICA

- ✓ Incubare per 15' a 99°C
- ✓ Centrifugare per separare la fase solida da quella acquosa dove è solubilizzato il DNA (14000rpm x 15 min)
- ✓ Prelevare il surnatante e raccoglierlo in una nuova provetta opportunamente identificata

## Protocollo accreditato e in uso presso IZSVE:

### Mix:

Tabella 1: Schema miscela di reazione

Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume per singolo campione
Acqua ultrapura per biologia molecolare	-	-	3,8 $\mu$ L
Gold buffer	10X	1X	3 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM	3 $\mu$ L
dNTPs Mix	10 mM	0,6 mM	1,8 $\mu$ L
Primer FFLIB	5 $\mu$ M	0,1 $\mu$ M	0,6 $\mu$ L
Primer RFLIA	5 $\mu$ M	0,1 $\mu$ M	0,6 $\mu$ L
Primer sense-59	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	6 $\mu$ L
Primer antisense-83	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	6 $\mu$ L
Taq Gold	5U/ $\mu$ l	1 U	0,2 $\mu$ L
DNA			5 $\mu$ L
<b>VOLUME TOTALE</b>			30 $\mu$ L

Protocollo accreditato e in uso presso IZSVE:

Ciclo Termico:

**Tabella 2:** Programma PCR per l'amplificazione del DNA

Fase	Temperatura	Tempo	N. cicli
DENATURAZIONE INIZIALE	95°C	2'	1
DENATURAZIONE	95°C	30''	30
ANNEALING	64°C	30''	
ESTENSIONE	72°C	1', 30''	
ESTENSIONE FINALE	72°C	10'	1
RAFFREDDAMENTO	4°C	∞	1



## CRITICITA':

- Purezza del ceppo batterico
  - Lotto di TAQ polimerasi
  - Scala di sintesi primer
  - Come si aliquotano le stock di partenza dei primer:
    - ✓ Preparare poche aliquote per i primer “meno usati” come FFLIB/RFLIA
    - ✓ Aliquotare le stock di partenza (es. 100 $\mu$ M), non preparare più aliquote intermedie già pronte.
- Più diluito è il primer e meno è stabile a -20°C
- Temperature termoblocchi



**La Procedura di prova descritta (PDP BAT154) è disponibile nel sito IZSVE:**

<http://www.izsvenezie.it/temi/malattie-patogeni/salmonella/procedure-di-prova/>

Nel sito è disponibile anche la dichiarazione finale di validazione



**Grazie per l'attenzione!**



[eramon@izsvenezie.it](mailto:eramon@izsvenezie.it)