
EZ-Check™ *Salmonella* spp. Kit

User Guide

Test for the real-time PCR detection of *Salmonella* spp. in food, animal feed, and environmental samples

Catalog #12018082

For In-Vitro Laboratory Use Only



Table of Contents

Section 1 Revision History	3
Section 2 Introduction	3
Section 3 The EZ-Check <i>Salmonella</i> spp. Technology	4
Section 4 Kit Components	5
Section 5 Shelf Life and Storage	5
Section 6 Materials Required but Not Supplied	5
Section 7 Safety Precautions and Recommendations for Best Results	6
Section 8 Protocol	7
A. Sample Enrichment	7
B. Free DNA Removal Treatment (optional step)	9
C. iQ-Check Prep System (optional)	10
D. DNA Extraction	10
E. Real-Time PCR.....	11
F. Data Analysis.....	12
Section 9 Confirmation of Positive Results	14
Section 10 Confirmation of Single Colonies Using EZ-Check Kit	14
Section 11 Test Performance and Validations	15
Section 12 References	16

Section 1 Revision History

Release date	Document/version number	Change
July 2025	Bulletin 5145 Ver A	New document
August 2025	Bulletin 5145 Ver B	- AOAC approval - Content edits
October 2025	Bulletin 5145 Ver C	- NF Validation extension: Cocoa and chocolate products up to 375 g, iQ-Check Prep System - Content edits
April 2026	Bulletin 5145 Ver D	- NF Validation extension: Infant formula and cereals with/without probiotics and related ingredients up to 375 g, heat processed dairy products up to 375 g, raw meat and poultry products up to 375 g - NF Validation confirmation protocol correction: Volume of enrichment modified to 0.1 mL in RVS for secondary enrichment - Content edits

Section 2 Introduction

Salmonellae are the most frequent causes of food poisoning in the world, despite the many preventive measures taken to control these organisms. Eggs, dairy products, meat, and poultry are the foods most commonly associated with the transmission of *Salmonella* (65% of cases). More than 2,500 serotypes have been identified, all of which are potentially pathogenic to humans. Due to the low infective dose and the serious threat posed to producers and consumers of food, several countries now require total absence of *Salmonella* in food products.

Classical culture methods are often long and tedious. The EZ-Check *Salmonella* spp. Kit, in comparison, is a simple and rapid qualitative test allowing the detection of DNA sequences specific to *Salmonella* spp. found in food products, animal feed, and environmental samples. Using real-time PCR, *Salmonella* spp.-specific DNA sequences are amplified and detected simultaneously by means of fluorescent probes. 96 tests can be processed at one time, with a minimal risk of contamination and an easy-to-use procedure. The intended users of this kit are trained laboratory personnel who are performing tests to detect *Salmonella* spp. The use of this test allows results to be obtained within a few hours following enrichment of a sample.

Section 3

The EZ-Check *Salmonella* spp. Technology

The EZ-Check *Salmonella* spp. Kit must be used with EZ-Check Lysis Kit (catalog #12018075).

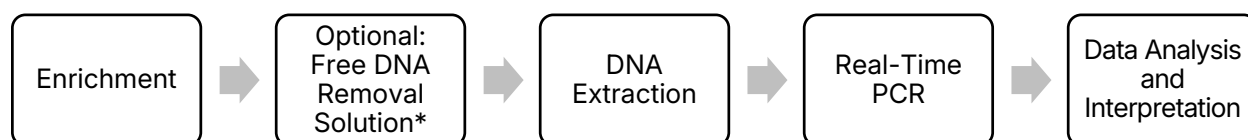
The EZ-Check *Salmonella* spp. Kit is based on gene amplification and detection by real-time PCR. The kit's ready-to-use lyophilized PCR reagents contain oligonucleotides (primers and probes) specific for *Salmonella* spp., as well as DNA polymerase and nucleotides. Detection and data analysis are optimized for use with a Bio-Rad real-time PCR instrument, such as the CFX Opus 96, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well and CFX Duet Real Time PCR Detection systems.

PCR is a powerful technique used to generate many copies of target DNA. During the PCR reaction, several cycles of heating and cooling allow DNA denaturation by heat followed by primers annealing to the target region. The DNA polymerase then uses these primers and deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) to extend the DNA, creating copies of the target DNA. These copies are called amplicons.

In real-time PCR, specific probes are used to detect the DNA during the amplification step by hybridizing to the amplicons. These probes are linked to a fluorophore that fluoresces only when hybridized to the target sequence. FAM is the fluorophore linked to the probe hybridizing to the *Salmonella* spp. specific DNA sequence. In the absence of target DNA, no fluorescence will be detected. As the number of amplicons increases with each round of amplification, fluorescence intensity also increases. The optical module measures this fluorescence at the annealing step during each PCR cycle while the associated software plots the fluorescence intensity versus number of cycles.

A synthetic DNA internal control is included in the reaction mix to validate any possible negative results. This control is amplified with a specific probe at the same time as the *Salmonella* target DNA sequence and is detected by a second fluorophore.

This test allows the qualitative detection of *Salmonella* spp. in broad range of food products, animal feed, and environmental samples after an enrichment step. It includes the following five main steps:



* Please refer to the user guide of the iQ-Check Free DNA Removal Solution (document #10000253856) for conditions of use.

Section 4 Kit Components

The EZ-Check *Salmonella* spp. Kit contains sufficient reagents for 96 tests.

Reagent ID	Item	Description	Quantity
RPS	EZ-Check <i>Salmonella</i> spp. ReadyPCR Strips*	Ready-to-use PCR reagent	12 strips of 8 wells
CAP	EZ-Check Optical Caps	Optical caps	12 strips of 8 caps
NC	EZ-Check Negative Control	PCR negative control	1 tube, 1.0 ml
PC	EZ-Check <i>Salmonella</i> spp. Positive Control	PCR positive control	1 tube, 0.6 ml

*EZ-Check *Salmonella* spp. ReadyPCR strips can be identified by purple tabs on each side of the PCR strips. *Salmonella* purple color indicators are also visible on the kit box packaging and the CFX Maestro IDE software.

Section 5 Shelf Life and Storage

- The kit is shipped cold
- Store kits at 2–8°C
- Do not freeze
- Do not use reagents beyond the expiration date printed on the labels
- After first opening, ReadyPCR Strips sealed in the pouch with desiccant and stored at 2–8°C remain usable for up to 5 months. The pouch can be reopened up to 5 times during this period

Section 6 Materials Required but Not Supplied

Equipment and Software

- Specific for DNA extraction: Heater-shaker* capable of maintaining 95–100°C and/or 37 ± 2°C, with a mixing speed of at least 1,300 rpm (for example, catalog #3594995 and catalog# 12022466)
- Bio-Rad real-time PCR system* for example, the CFX Opus 96 (catalog #17007991) or CFX Opus Deepwell (catalog #17007992) or CFX Duet (catalog #17010275) Real-Time PCR Systems
- CFX Maestro Software, Industrial Diagnostic Edition, version 4.0 (catalog #3593893)
- iQ-Check Prep System* (catalog #3594911)
- Adjustable multichannel pipette 20–200 µL (catalog # 17010702) and/or single pipette 20–200 µL (catalog #17010259)
- EZ-Check Lysis Rack (catalog #12019781)
- EZ-Check PCR Frame (catalog #12019771)
- Lab paddle blender for homogenizing test samples
- Incubator for sample microbiological enrichment

Note: We recommend using an uninterrupted power supply (UPS) with the thermal cycler and iQ-Check Prep Systems.

*Contact Bio-Rad Technical Support for information on recommended instruments.

Supplies

- EZ-Check Lysis Kit (catalog #12018075, 96 tests)
- Enrichment medium: Buffered Peptone Water, for example
BPW Plus
catalog #3564684, dehydrated, 500 g
catalog #3554179, 225 mL x 6 bottles
catalog #3555795, 3 L x 4 bags
catalog #3555790, 5 L x 2 bags
BPW Standard
catalog #12013259, dehydrated, 500 g
catalog #12013258, dehydrated, 5 kg
catalog #12013260, 5 L x 2 bags
- RAPID'*Salmonella* Agar (catalog #3563961, 90 mm x 20 dishes; catalog #3563963 90 mm x 120 dishes; catalog #3564705, dehydrated, 500 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalog #3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (catalog #12012383)
- PIF Supplement (catalog #12013322, 2 g)
- Deep well microplate (catalog #3594900)
- Compatible sterile filter pipette tips adaptable to 5–50 μ L or 20–200 μ L pipettes (for example, catalog # 17010688)
- EZ-Check Lysis Storage Caps (catalog #12022880)
- PCR capping tool (catalog #ECT2000)
- Filter bags
- Distilled sterile water
- Bleach, 5% and surface decontaminant
- Powder-free gloves

Supplies for iQ-Check Prep System

- 2 mL tubes for Free DNA Removal Solution (catalog #17010255)
- iQ-Check Deep Well Microplates (catalog #3594900)
- Conductive filter tips (catalog #12022468, 300 μ L x 5760)
- 60 mL dilution container (catalog #12014473)

Section 7 Safety Precautions and Recommendations for Best Results

- Disclaimer: For our standard terms and conditions of sale, including any disclaimers, please visit <https://www.bio-rad.com/en-us/terms-conditions>
- This User Guide and, the ones of associated reagents, instruments and software, must be entirely read prior to using the method
- This test must be performed by trained personnel
- Samples and enrichment cultures must be handled as potentially infectious material and discarded according to local rules and regulations
- All potentially infectious material should be autoclaved before disposal
- The quality of results depends on strict compliance with Good Laboratory Practices (for example, the EN ISO 7218 standard), especially concerning microbiology and PCR:
 - Never circulate laboratory equipment (pipets, tubes, etc.) from one workstation to another
 - Always use a positive control and a negative control for each series of amplification reactions
 - Do not use reagents after their expiration date

- Vortex and spin down positive and negative controls from the kit before using them to ensure homogeneity
 - Periodically verify the accuracy and precision of pipets, as well as correct functioning of the instruments
 - Change gloves often, especially if you suspect they are contaminated
 - Clean workspaces periodically with 5% bleach and other decontaminating agents
 - Use powder-free gloves and avoid fingerprints and writing on tube caps. Both will interfere with data acquisition
- It is strongly advised to follow the general requirements described in the standard EN ISO 22174 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food pathogens — General requirements and definitions
 - Consult the Safety Data Sheet for additional information and local regulations for disposal
 - For environmental samples, sample collection devices should be hydrated with a sterile diluent (e.g., buffered peptone water), and if necessary, a neutralizing solution (e.g., HiCap Neutralizing Broth, Dey-Engley Neutralizing Broth, Lethen Broth) to inactivate the effects of sanitizer. It is recommended to avoid neutralizing buffers that contain aryl sulfonate complex in the hydrating solution
 - After unsealing the ReadyPCR strips, ensure that the strips are placed in the CFX instrument within 4 hr. Once the lyophilized PCR reagent is hydrated, the resulting PCR mix is stable at 18-25°C
 - When running the CFX Real time PCR system, always balance the tube strips to ensure the heated lid applies even pressure across the block.
 - It is always recommended to perform fit-for-purpose or matrix verification studies prior to using this method
 - Handle EZ-Check reagents as potentially biohazardous material under at least Biosafety Level 2 containment

Section 8 Protocol

It is strongly recommended to read the entire protocol before starting the test.

A. Sample Enrichment

Equilibrate the enrichment broths to room temperature (20–25°C) before use.

For enrichment times 10 hr or less, warm enrichment broth to the sample incubation temperature before use. Short enrichment times are sensitive to incubation conditions and temperatures indicated must be strictly respected. The duration of the sample preparation (time between preheating of the enrichment broth and the beginning of the food sample incubation) must not exceed 45 min. The use of a ventilated incubator is recommended.

Thaw frozen samples completely before use.

The use of an enrichment bag with incorporated filter is highly recommended.

Section 8
Protocol

The use of alpha-amylase is recommended for cereals or starch product enrichment as described in the ISO 6887-4 standard.

Within the scope of the NF VALIDATION Certification, sample preparation can be performed with or without respect to ISO 6887-2 to -6. If not indicated, test portions weighing more than 25 g have not been tested. Incubate without shaking according to the times and temperatures indicated in the table.

The following table outlines the different protocols that can be used, depending on the application and the scope of the validation.

Enriched samples can be stored at 2-8°C for 72 hr before performing the EZ-Check lysis step.

AOAC		
Scope (Matrices) ^{1,2}	Sample Preparation	Enrichment
Deli salad	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize 25 g or 25 mL of sample 1 min in 225 mL BPW 	Incubate 18–26 hr at 37 ± 1°C
Romaine lettuce	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize 375 g of sample 1 min in 1,125 mL prewarmed (42 ± 1°C) BPW 	Incubate 10–24 hr at 42 ± 1°C
Frozen vegetable blend, bean sprouts, fresh cut cantaloupe	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize 375 g of sample 1 min in 1,125 mL prewarmed (37 ± 1°C) BPW 	Incubate 18–22 hr at 37 ± 1°C
Cheddar cheese, cocoa powder	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize 375 g of sample 1 min in 1,125 mL BPW 	Incubate 18–22 hr at 37 ± 1°C
Nonfat dry milk, whey protein powder, all-purpose flour, infant formula with probiotics	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize 375 g of sample 1 min in 1,125 mL BPW with PIF Supplement 	Incubate 18–26 hr at 37 ± 1°C
Creamy peanut butter	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize 375 g of sample 1 min in 1,125 mL prewarmed (42 ± 1°C) BPW 	Incubate 18–24 hr at 42 ± 1°C
Garlic powder	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize 375 g of sample 1 min in prewarmed (37 ± 1°C) 3,000 mL BPW + K₂SO₃ 0.5 % 	Incubate 18–26 hr at 37 ± 1°C
Raw ground turkey, raw chicken breast	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize 375 g of sample 1 min in 1,125 mL prewarmed (42 ± 1°C) BPW 	Incubate 8–22 hr at 42 ± 1°C
	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize 325 g of sample 1 min in 1,625 mL BPW 	Incubate 20–24 hr at 35 ± 2°C
Raw ground beef, raw ground pork	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize 375 g of sample 1 min in 1,125 mL prewarmed (42 ± 1°C) BPW 	Incubate 8–22 hr at 42 ± 1°C (375 g)
	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize 325 g of sample 1 min in 975 mL mTSB 	Incubate 15–24 hr at 42 ± 1°C (325 g)
Chicken carcass rinses	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize 30 mL carcass rinse in 30 mL prewarmed (37 ± 1°C) BPW 	Incubate 18–22 hr at 37 ± 1°C
	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize 30 mL carcass rinse in 30 mL BPW 	Incubate 20–24 hr at 35 ± 2°C
Raw beef sampling cloth, sampling cloths	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize 1 min in 200 mL prewarmed (42 ± 1°C) BPW or mTSB 	Incubate 8–22 hr at 42 ± 1°C (BPW)
		Incubate 15–24 hr at 42 ± 1°C (mTSB)
Dry dog food	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize 375 g of sample 30 sec in 1,125 mL BPW 	Incubate 18–26 hr at 37 ± 1°C
Stainless steel, sealed concrete, rubber environmental surfaces	<ul style="list-style-type: none"> Moisten swabs and sponges with HiCap Neutralizing Broth Homogenize swabs 30 sec by hand 10 mL BPW Homogenize sponges 30 sec by hand 60 mL BPW 	Incubate 18–24 hr at 37 ± 1°C

¹ Validation includes direct streak to RAPID[®] *Salmonella* plates.

² If the sample exhibit PCR inhibition, proceed with a retest or a 1 in 10 dilution in sterile distilled water. If PCR inhibition is still present, use the iQ-Check Purification Reagent Treatment or a 1 in 50 dilution sterile distilled water (additional verification testing required).

NF Validation		
Scope (Matrices) ¹	Sample Preparation	Enrichment
All human food, animal feed, environmental samples	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize 25 g or 25 mL of sample 1 min in 225 mL BPW 	Incubate 18–26 hr at 37 ± 1°C
Environmental surfaces	<ul style="list-style-type: none"> Moisten swabs and sponges with a neutralizing broth that does not contain aryl sulfonate complex Homogenize swabs 30 sec by hand 10 mL BPW Homogenize sponges 30 sec by hand 60 mL BPW 	Incubate 18–26 hr at 37 ± 1°C
Cocoa and chocolate products ²	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize n g sample in 9 x n mL of prewarmed (41.5 ± 1°C) BPW 	Incubate 18–26 hr at 41.5 ± 1°C
Infant formula & cereal with/without probiotics, ingredients ³ (up to 375 g)	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize n g sample in 3 x n mL of prewarmed (37 ± 1°C) BPW supplemented with PIF Supplement (375 g in 1,125 mL) 	Incubate 18–26 hr at 37 ± 1°C
Heat processed dairy products ³ (up to 375 g)	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize n g sample in 9 x n mL of prewarmed (37 ± 1°C) BPW (375 g in 3,375 mL) 	Incubate 18–26 hr at 37 ± 1°C
Raw meat & poultry products (up to 375 g)	<ul style="list-style-type: none"> Homogenize n g sample in 3 x n mL of prewarmed (41.5 ± 1°C) BPW (375 g in 1,125 mL) 	Incubate 8–26 hr at 41.5 ± 1°C

¹If the sample exhibit PCR inhibition, proceed with a retest or a 1 in 10 dilution in sterile distilled water. If PCR inhibition is still present, use the iQ-Check Purification Reagent Treatment or a 1 in 50 dilution sterile distilled water (additional verification testing required).

²Perform a mandatory 1 in 10 dilution on the enriched sample with tryptone salt after incubation before proceeding to the DNA extraction step. If the DNA extract exhibit PCR inhibition, proceed with a retest or use the iQ-Check Purification Reagent Treatment or a 1 in 10 dilution (within the scope of the NF VALIDATION Certification). The iQ-Check Free DNA Removal Solution was not evaluated for this category.

³To reduce PCR inhibition for the ingredient food type, dilute the DNA extract 1 in 10 in sterile distilled water. If PCR inhibition is still present, use a higher dilution ratio (e.g. 1 in 50 dilution in sterile distilled water, additional verification testing required).

B. Free DNA Removal Treatment (optional step)

The iQ-Check Free DNA Removal Solution provides an ideal way to remove free DNA.

1. Dispense 10 µL of activated Free DNA Removal Solution into as many wells of an empty deep well microplate as there are samples to be analyzed.
2. Add 100 µL of decanted enriched sample per well.

Note: To avoid matrix debris or fat layers, pipette just below the fat layer and above any debris at the bottom of the tube.

3. Incubate the deep well microplate in the heater-shaker WITHOUT shaking at 37 ± 2°C for 15-30 min
4. Proceed to the EZ-Check Lysis protocol using 25 µL of treated enriched sample with the EZ-Check Lysis Kit.

For more information, refer to the iQ-Check Free DNA Removal User Guide (document #100000253856).

C. iQ-Check Prep System (optional)

The iQ-Check Prep System is used to automate the EZ-Check workflow including optional Free DNA Removal Treatment, DNA extraction and real-time PCR plate setup.

1. Open CFX Maestro IDE software and select the "EZ Salmo" assay protocol from the menu.
2. Assign sample types to each well of the plate view by selecting Unknown, Positive Control, or Negative Control.
3. Configure the required options for each well (eg: FDRS, dilution).
4. Click "Send to the iQ-Check Prep" to export the worklist.
5. Transfer a minimum of 500 μ L of enriched sample into the appropriate well of a deep well plate or into tubes according to the plate layout.
6. Open the iQ-Check Prep Software on the instrument computer.
7. Load the worklist transferred in step 4.
8. Follow instructions to manually load consumables (tips, plates), reagents, and prepared samples.
9. Start the run.
10. After the run is complete, remove the PCR plate and hermetically seal the strips with the EZ-Check Optical Caps.
11. Place the EZ-Check PCR Frame in the thermal cycler. Be sure to place the plate with well A1 in the upper left corner and close the instrument lid.

For more information, refer to the CFX Maestro Industrial Diagnostic Edition and iQ-Check Prep System User Guides.

D. DNA Extraction

General recommendations:

Use a dedicated area, equipment and consumables to perform this step.

Turn on the heater-shaker to preheat before starting the test. Set it to 95–100°C.

In general, avoid shaking the enrichment bag and collecting large fragments of food debris. For food samples with a fatty layer, collect the sample just below this layer.

For best results, allow the lysis strips to cool undisturbed before pipetting the DNA extract.

EZ-Check Lysis Protocol

1. Place the appropriate number of EZ-Check Lysis tubes (8 tubes/strip) in the EZ-Check Lysis Rack. Ensure the tubes are fully inserted in the EZ-Check Lysis Rack.
2. Gently tap the EZ-Check Lysis Rack on the bench to draw down the lysis reagent.

3. Peel off carefully the foil seal from the lysis tubes.

Note: The EZ-Check Lysis reagent may show droplets on the inner side of the well. This has no effect on extraction quality.

4. Add 25 μ L of enriched sample to the lysis tubes. If Free DNA Removal Solution is used, add 25 μ L of treated enriched samples to the lysis tubes.
5. Incubate lysis strips in the heater-shaker under agitation at 1,300 rpm for 15–20 min at 95–100°C.
6. Cool the lysis tubes by placing the EZ-Check Lysis Rack on the bench at room temperature undisturbed for 10–30 min.

At this step the protocol can be paused and resumed later.

- The DNA extract can be stored sealed for 7 days at 2–8°C directly in the EZ-Check Lysis tubes using the EZ-Check Lysis Storage Caps
- For frozen storage (-25°C, -15°C), the DNA extract must be transferred to a separate tube and can be stored sealed for up to 30 days (outside the scope of AOAC validation and NF Validation)

E. Real-Time PCR

Instrument and Software Setup

For instrument and software setup, follow instructions in the CFX Maestro, Industrial Diagnostic Edition (IDE) software user guide.

PCR Detection Preparation

1. Open the EZ-Check *Salmonella* spp. ReadyPCR Strips pouch.
2. Remove the required total number of strips (number of samples plus two controls) from the foil pouch.

Note: Properly reseal unused strips in the pouch with the desiccant inside.

3. Place the ReadyPCR Strips on the EZ-Check PCR Frame making sure the strips are securely clipped to the frame. It is recommended to gently tap the EZ-Check PCR Frame on the counter to ensure beads are at the bottom of the PCR wells.
4. Carefully peel off the foil seal from each individual strip and visually check for the presence of one PCR bead per well. Once open, the ReadyPCR strips are stable up to 4 hr before being rehydrated.
5. Transfer 25 μ L of DNA extract carefully along the inside wall of each well of the ReadyPCR Strips according to the plate setup. Do not aspirate the DNA extract from the bottom of the lysis tube to avoid transferring PCR inhibitors in the PCR well.

Note: An effervescence reaction will indicate that the sample has been properly added to the PCR reagent.

6. For negative and positive controls, transfer 25 μ L of the EZ-Check Negative Control (NC) and EZ-Check *Salmonella* spp. Positive Control (PC) carefully along the inside wall of the corresponding ReadyPCR wells.

Note: The PCR run must be started within the 4 hr following the Ready PCR strip opening.

7. Optional: To purify DNA, combine 50 μL of DNA extracted from each sample with 200 μL of iQ-Check Purification Reagent. Pipette up and down 5 times to homogenize. Alternatively, a 1 in 10 dilution of extracted DNA can be made using sterile water. This step was not tested during the NF VALIDATION Certification.
8. Hermetically seal the wells of the PCR strips with the EZ-Check Optical Caps.
9. Place the EZ-Check PCR Frame in the thermal cycler. Be sure to place the plate with the A1 well at the upper left corner and close the instrument lid.

Laboratory Control Preparation (optional step)

Laboratory controls are treated as food samples. They are used to validate the full EZ-Check workflow. Extracted DNA from the laboratory controls is placed on the PCR plate and used as PCR plate controls as a replacement of the EZ-Check Negative and Positive Controls.

To be valid, the laboratory negative control must not contain *Salmonella* spp. DNA. To be valid the laboratory positive control must contain *Salmonella* spp. DNA amplified with Cq values between 26 and 36. See CFX Maestro Industrial Diagnostic Edition (IDE) Software User Guide (document #10000241897).

The end-user is responsible for establishing and implementing appropriate laboratory controls. The validity and reliability of EZ-Check *Salmonella* spp. results are dependent on the correct verification, validation and preparation of these user-prepared controls.

Run PCR

To start the PCR run, follow instructions CFX Maestro, IDE Software User Guide (DIR 10000241897).

F. Data Analysis

Data can be analyzed directly at the end of the PCR run or later by opening the stored data file. Follow instructions in the CFX Maestro, IDE software user manual for opening data files and setting the data analysis parameters.

Interpreting Results

Once the data analysis parameters have been set, results are interpreted by analyzing the Cq values of each sample (the cycle at which the amplification curve crosses the threshold).

CFX Maestro IDE software allows complete automated analysis for Bio-Rad real-time PCR detection systems. A verification of the typical characteristics of the amplification curves should be performed prior to releasing results. Contact your Bio-Rad technical support team if additional support is required.

Controls

Verify the positive and negative controls before interpreting sample results.

For the experiment to be valid, the controls must have the following results, as summarized in the table below. Otherwise, the PCR reaction must be repeated.

	<i>Salmonella</i> spp. Detection (FAM channel)	Internal Control Detection (HEX channel)
Negative control	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Positive control	26 ≤ Cq ≤ 36	Not relevant

* The software indicates a Cq value of N/A (not applicable) when the fluorescence of a sample does not rise significantly above the background noise and hence does not cross the threshold.

If results of negative and positive controls differ from those in the table above (invalid control), repeat the run and analysis described in D. Real-Time PCR and E. Data Analysis in Section 7 Protocol.

Samples

A **positive** EZ-Check *Salmonella* spp. PCR test must show a typical amplification curve and a Cq value ≥10 for the FAM fluorophore.

- If the Cq value for both channels is below 10, verify that the raw data curve is a regular amplification curve (with a flat baseline followed by a rapid exponential increase of fluorescence and then a flattening out). If the curve seems correct, it may be considered a positive *Salmonella* spp. test

If there is no Cq value (Cq = N/A) for FAM, or if the curve is not a typical amplification curve, the internal control for that sample must be analyzed.

- This sample is considered a **negative** *Salmonella* spp. sample if there is no Cq value in the FAM channel and the internal control has a Cq value ≥28
- Should the internal control also not have a Cq value (Cq = N/A), this probably indicates an inhibition of the PCR reaction. The sample needs to be diluted (using 10 µL of DNA extract, perform a 1 in 10 dilution in distilled sterile water, and then test 25 µL of the dilution) and the PCR repeated
- Should the Cq value for the internal control be <28, it is not possible to interpret the result. Verify that the threshold was correctly placed or that the curve as raw data is a regular amplification curve. If the curve does not have a characteristic shape, it will be necessary to repeat the PCR test

Interpretation of test results is summarized in the following table:

<i>Salmonella</i> spp. Detection (FAM channel)	Internal Control Detection (HEX channel)	Interpretation
Cq ≥ 10	N/A*	Positive
Cq = N/A*	Cq ≥ 28	Negative
Cq = N/A*	Cq = N/A*	Inhibition**

* The software indicates a Cq value of N/A (not applicable) when the fluorescence of a sample does not rise significantly above the background noise and hence does not cross the threshold.

** When both target and internal control detection give a Cq value = N/A, the DNA extract must be diluted 1 in 10 and tested again.

An invalid interpretation can be given when validation criteria are not met. Check the raw data and proceed as if the sample was inhibited.

Section 9

Confirmation of Positive Results

In the context of AOAC validation, a positive EZ-Check *Salmonella* spp. result should be considered presumptive positive and confirmed according to an appropriate reference method (for example, USDA MLG, FDA BAM, ISO, MFHPB, AOAC SMPR, etc.). Alternatively, streak 10 µL of enrichment broth directly to RAPID'*Salmonella* Agar and incubate for 24 ± 2 hr at 37 ± 1°C. When interfering flora could be high, transfer 0.5 mL pre-enriched culture to 10 mL Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) broth and incubate for 24 ± 3 hr at 41.5 ± 1°C. Proceed with streaking 10 µL enriched RVS to RAPID'*Salmonella* Agar. Refer to the confirmation method described in the RAPID'*Salmonella* Agar user guide (document #10000126748).

In the context of the NF VALIDATION certified method, all positive EZ-Check Kit results must be confirmed in the following ways:

1. Using classical tests described in the standardized CEN or ISO methods (including the purification) directly from the BPW enrichment broth after the 18-26 hr enrichment at 37°C.
2. By streaking 10 µL enriched BPW directly to RAPID'*Salmonella* Agar and incubating for 24 ± 2 hr at 37 ± 1°C. When interfering flora could be high, transfer 0.1 mL enriched BPW to 10 mL Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) broth and incubate for 24 ± 3 hr at 41.5 ± 1°C then proceed with streaking 10 µL enriched RVS to RAPID'*Salmonella* Agar. The typical colonies are confirmed as described in the RAPID'*Salmonella* User Guide.
3. Using any other method certified by NF VALIDATION based on a principle different from that used in the EZ-Check *Salmonella* spp. Kit. The validated protocol of this second method must be followed entirely, including RVS selective enrichment, when needed. Confirmation is carried out from the BPW enrichment broth if this step is common to both methods.

In the context of the NF VALIDATION, the enriched BPW may be stored at 2-8°C for 72 hr maximum following the incubation at 37°C before carrying out the confirmation.

In the case of discrepant results between the EZ-Check *Salmonella* spp. Kit and any of the confirmation options listed above, follow the necessary steps to ensure valid results.

Section 10

Confirmation of Single Colonies Using EZ-Check Kit

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit may also be used for confirming single isolated *Salmonella* spp. colonies on agar plates (outside the scope of AOAC Validation). Please refer to the user guide of the RAPID'*Salmonella* Agar User (document #10000126748) for conditions of use.

1. Pick an isolated colony from a selective or nonselective agar plate with a toothpick, sterile loop, or other adapted consumable (for example, a pipet tip).
2. Resuspend the colony in 100 µL distilled sterile water in a microcentrifuge tube. Homogenize using a vortexer.
3. Add 25 µL of the suspension directly to the PCR reagent or to the EZ-Check Lysis solution and follow the EZ-Check *Salmonella* spp. protocol for data and result interpretation.

Section 11 Test Performance and Validations

The EZ-Check *Salmonella* spp. Kit is specific for the detection of *Salmonella* genus.



BRD 07/27-07/25

ALTERNATIVE ANALYTICAL
METHODS FOR AGRIBUSINESS

<http://nf-validation.afnor.org>

NF Validation

The EZ-Check *Salmonella* spp. Kit is certified by NF VALIDATION as an alternative to the reference method ISO 6579 -1 (2017) for the detection of *Salmonella* spp. in all products for human and animal consumption, as well as environmental samples. The validation followed the protocol of the ISO 16140-2: 2016 standard and includes the use of the CFX Opus 96, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well and CFX Duet Real-Time PCR Systems. The use of the iQ-Check Free DNA Removal Solution is included in the scope of the validation for all validated categories except for cocoa and chocolate products. The use of the iQ-Check Prep System v5 is included in the scope of the validation for all validated categories. The associated software is CFX Maestro Software IDE V4.0. The "EZ Salmo" APF is validated for all samples. Certificate number: BRD 07/27-07/25. Refer to the certificate available on the website <http://nf-validation.afnor.org/en> for validity information.



AOAC Validation

The EZ-Check *Salmonella* spp.Kit is validated by the AOAC Research Institute under PTM 082501 for the detection of *Salmonella* spp. in deli salad¹ (25g), raw ground beef² (375 g), raw ground turkey² (375 g), raw chicken breasts² (375 g), chicken carcass rinse² (30 mL), raw ground pork² (375 g), nonfat dry milk¹ (375 g), whey protein powder¹ (375 g), all-purpose flour¹ (375 g), cheddar cheese¹ (375 g), romaine lettuce¹ (375 g), frozen vegetable blend¹ (375 g), fresh cut cantaloupe¹ (375 g), cocoa powder¹ (375 g), creamy peanut butter¹ (375 g), dry dog food¹ (375 g), infant formula with probiotics¹ (375 g), garlic powder¹ (375 g), bean sprouts¹ (375 g), raw beef sampling cloth², stainless steel surface¹ (4" x 4", sponge), rubber surface¹ (1" x 1", swab), sealed concrete surface¹ (4" x 4", sponge). A positive result with the EZ-Check Kit is considered presumptive, and it is recommended it be confirmed following the recommendation in Section 9 above. The "EZ Salmo" APF, the use of the iQ-Check Free DNA Removal Solution, and the use of the CFX Opus Standard, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well, and CFX Duet Real-Time PCR Systems are validated for all samples. The associated software is CFX Maestro IDE Software (version 4.0 and later).

¹ Tested against FDA BAM Ch. 5 reference method

² Tested against USDA MLG 4.15 reference method

Section 12

References

ISO 7218. Microbiology of the food chain - General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 6887. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1 – 6.

ISO 6579-1. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp.

ISO 16140-2. Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2024). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 4.15: Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Siluriformes (Fish) Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2024). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 5: *Salmonella*.

Visit bio-rad.com/EZCheck for more information.

Bio-Rad and EZ-Check are trademarks of Bio-Rad Laboratories, Inc. in certain jurisdictions.
All trademarks used herein are the property of their respective owner.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website *bio-rad.com* **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

EZ-Check™ *Salmonella* spp. Kit

Guide d'utilisation

Test pour la détection par PCR en temps réel de *Salmonella* spp. dans les échantillons de produits alimentaires destinés à la consommation humaine et animale et les échantillons environnementaux

N° de référence 12018082

Uniquement pour une utilisation en laboratoire (diagnostic *in vitro*)



Sommaire

Section 1 Historique des révisions	3
Section 2 Introduction	3
Section 3 Technologie EZ-Check <i>Salmonella</i> spp.	4
Section 4 Composants du kit	5
Section 5 Durée de conservation et stockage	5
Section 6 Matériel requis non fourni	5
Section 7 Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux	7
Section 8 Protocole	9
A. Enrichissement de l'échantillon	9
B. Traitement de l'ADN libre (étape facultative)	11
C. iQ-Check Prep System (option).....	12
D. Extraction de l'ADN.....	12
E. PCR en temps réel	13
F. Analyse des données	15
Section 9 Confirmation des résultats positifs	16
Section 10 Confirmation de colonies isolées à l'aide du kit EZ-Check	17
Section 11 Performances du test et validations	18
Section 12 Références	19

Section 1 Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document/version	Modification
Juillet 2025	Bulletin 5145 Ver A	Nouveau document
Août 2025	Bulletin 5145 Ver B	- Validation AOAC - Modifications du contenu
Octobre 2025	Bulletin 5145 Ver C	- Extension de NF Validation : produits cacaotés et chocolatés jusqu'à 375 g, iQ-Check Prep System - Modifications du contenu
Avril 2026	Bulletin 5145 Ver A	- Extension de NF Validation : Substituts de lait maternel et céréales avec/sans probiotiques et leurs ingrédients jusqu'à 375 g, produits laitiers transformés thermiquement jusqu'à 375 g, produits à base de viande et de volaille crues jusqu'à 375 g - Correction du protocole de confirmation de NF Validation : Volume d'enrichissement modifié à 0,1 mL dans RVS pour l'enrichissement secondaire - Modifications du contenu

Section 2 Introduction

Les salmonelles représentent la cause la plus fréquente d'intoxication alimentaire dans le monde, malgré les nombreuses mesures préventives en vigueur. Les œufs, les produits laitiers, la viande et la volaille sont les produits alimentaires les plus couramment associés à la transmission de *Salmonella* (65 % des cas). Plus de 2 500 sérotypes ont été identifiés, tous étant potentiellement pathogènes pour l'être humain. Compte tenu de la faible dose infectieuse et du risque élevé auquel doivent faire face les producteurs et les consommateurs, plusieurs pays exigent désormais une absence totale de *Salmonella* dans les produits alimentaires.

Les méthodes traditionnelles de culture bactérienne sont souvent chronophages et fastidieuses. Par comparaison, EZ-Check *Salmonella* spp. Kit constitue un test qualitatif rapide et simple permettant de détecter des séquences d'ADN spécifiques de *Salmonella* spp. dans les échantillons de produits alimentaires destinés à la consommation humaine et animale et les échantillons environnementaux. Grâce à la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel, la séquence d'ADN spécifique de *Salmonella* spp. est amplifiée et détectée simultanément au moyen d'une sonde fluorescente. Il est possible de traiter 96 tests en une fois, avec un risque minimum de contamination et une procédure d'utilisation simple. Ce kit est destiné au personnel de laboratoire qualifié, qui réalise des tests de détection de *Salmonella* spp. La mise en œuvre de ce test permet l'obtention de résultats en quelques heures après l'enrichissement d'un échantillon.

Section 3

Technologie EZ-Check *Salmonella* spp.

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit doit être utilisé avec EZ-Check Lysis Kit (n° de référence 12018075).

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit repose sur l'amplification et la détection des gènes par PCR en temps réel.

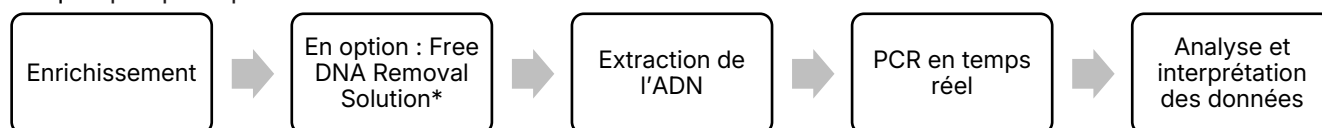
Les réactifs PCR lyophilisés et prêts à l'emploi de ce kit contiennent des oligonucléotides (amorces et sondes) spécifiques de *Salmonella* spp., ainsi que de l'ADN polymérase et des nucléotides. La détection et l'analyse des données sont optimisées pour l'utilisation avec un instrument de PCR en temps réel Bio-Rad, comme les systèmes CFX Opus 96, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well et CFX Duet Real Time PCR Detection System.

La PCR (amplification en chaîne par polymérase) est une technique puissante utilisée pour générer de nombreuses copies d'ADN cible. Durant la réaction de PCR, la succession de cycles de chauffage et de refroidissement permet une dénaturation de l'ADN, suivie d'une hybridation des amorces à la région cible, puis un allongement de l'ADN par action de l'ADN polymérase à partir de ces amorces et des désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP), créant ainsi des copies de l'ADN cible. Ces copies sont appelées amplicons.

Au cours de la PCR en temps réel, des sondes spécifiques détectent l'ADN en s'hybridant avec les amplicons. Ces sondes sont liées à un fluorophore qui produit une fluorescence uniquement lors d'une hybridation avec la séquence cible. FAM est le fluorophore lié à la sonde qui s'hybride à la séquence d'ADN spécifique de *Salmonella* spp. En l'absence d'ADN cible, aucune fluorescence ne sera détectée. Étant donné que le nombre d'amplicons augmente avec chaque cycle d'amplification, l'intensité de la fluorescence augmente également. Le module optique mesure cette fluorescence à l'étape d'hybridation pour chaque cycle de PCR tandis que le logiciel associé enregistre l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles.

Le mélange réactif comprend un contrôle interne d'ADN synthétique afin de valider tout résultat négatif éventuel. Ce contrôle est amplifié avec une sonde spécifique en même temps que la séquence d'ADN cible de *Salmonella* et est détecté par un second fluorophore.

Ce test permet la détection qualitative de *Salmonella* spp. dans les échantillons issus d'une large gamme de produits alimentaires destinés à la consommation humaine et animale, ainsi que dans les échantillons environnementaux, à la suite d'une étape d'enrichissement. Il comprend les cinq étapes principales suivantes :



* Se référer au guide d'utilisation Free DNA Removal Solution (n° de document 10000253856) pour les conditions d'utilisation.

Section 4

Composants du kit

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit contient suffisamment de réactifs pour 96 tests.

ID réactif	Article	Description	Quantité
RPS	EZ-Check <i>Salmonella</i> spp. ReadyPCR Strips*	Réactif PCR prêt à l'emploi	12 barrettes de 8 puits
CAP	EZ-Check Optical Caps	Capuchons optiques	12 barrettes de 8 capuchons
NC	EZ-Check Negative Control	Contrôle négatif PCR	1 tube, 1,0 mL
PC	EZ-Check <i>Salmonella</i> spp. Positive Control	Contrôle positif PCR	1 tube, 0,6 mL

* Il est possible d'identifier les barrettes EZ-Check *Salmonella* spp. ReadyPCR strips grâce au marquage violet apposé de chaque côté du produit. Les indicateurs de couleur (violet) *Salmonella* sont également visibles sur l'emballage du kit et au sein du logiciel CFX Maestro IDE.

Section 5

Durée de conservation et stockage

- Le kit est livré réfrigéré
- Stocker le kit à 2–8 °C
- Ne pas congeler
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur les étiquettes
- Après ouverture, les barrettes ReadyPCR Strips sont utilisables jusqu'à 5 mois à condition de les conserver dans leur sachet d'origine refermé contenant l'agent dessiccant et de les stocker à 2–8 °C. Il est possible de rouvrir le sachet jusqu'à 5 fois au cours de cette période

Section 6

Matériel requis non fourni

Matériel et logiciel

- Pour l'extraction d'ADN : Agitateur thermique* capable de maintenir une température de 95–100 °C et/ou 37 ± 2 °C, avec une vitesse d'agitation d'au moins 1 300 rpm (par exemple, n° de référence 3594995 et 12022466)
- Système de PCR en temps réel de Bio-Rad*, par exemple CFX Opus 96 (n° de référence 17007991) ou CFX Opus Deepwell (n° de référence 17007992) ou CFX Duet (n° de référence 17010275) Real-Time PCR System
- iQ-Check Prep System* (n° de référence 3594911)
- Pipette multicanal réglable 20–200 µL (n° de référence 17010702) et/ou pipette monocanal 20–200 µL (n° de référence 17010259)
- EZ-Check Lysis Rack (n° de référence 12019781)
- EZ-Check PCR Frame (n° de référence 12019771)

Section 6

Matériel requis non fourni

- CFX Maestro Software, Industrial Diagnostic Edition, version 4.0 (n° de référence 3593893)
- Mélangeur à palettes type Stomacher pour homogénéiser les échantillons de test
- Incubateur pour l'enrichissement microbiologique des échantillons

Remarque : nous recommandons d'utiliser une alimentation sans interruption (ASI ou UPS) avec le thermocycleur et les systèmes de préparation iQ-Check Prep System.

* Contacter l'assistance technique de Bio-Rad pour de plus amples informations sur les instruments recommandés.

Fournitures

- EZ-Check Lysis Kit (n° de référence 12018075, 96 tests)
- Milieu d'enrichissement : eau peptonée tamponnée, par exemple
BPW Plus
n° de référence 3564684, base déshydratée, 500 g
n° de référence 3554179, 225 mL x 6 flacons
n° de référence 3555795, 3 L x 4 poches
n° de référence 3555790, 5 L x 2 poches
BPW Standard
n° de référence 12013259, base déshydratée, 500 g
n° de référence 12013258, base déshydratée, 5 kg
n° de référence 12013260, 5 L x 2 poches
- RAPID'*Salmonella* Agar (n° de référence 3563961, 90 mm x 20 boîtes ; n° de référence 3563963, 90 mm x 120 boîtes ; n° de référence 3564705, base déshydratée, 500 g)
- Free DNA Removal Solution (n° de référence 3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (n° de référence 12012383)
- PIF Supplement (n° de référence 12013322, 2 g)
- Deep Well Microplate (n° de référence 3594900)
- Embouts stériles adaptables à filtre pour pipettes 5-50 µL ou 20-200 µL (par exemple, n° de référence 17010688)
- EZ-Check Lysis Storage Caps (n° de référence 12022880)
- Outil de fermeture des capuchons de PCR (n° de référence ECT2000)
- Poches à filtre
- Eau distillée stérile
- Eau de javel à 5 % et décontaminant de surface
- Gants non poudrés

Produits spécifiques pour iQ-Check Prep System

- Tubes 2 mL pour Free DNA Removal Solution (n° de référence 17010255)
- Deep Well Microplate (n° de référence 3594900)
- Embouts de pipette conducteurs à filtre (n° de référence 12022468, 300 µL x 5 760)
- Récipient de dilution 60 mL (n° de référence 12014473)

Section 7

Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux

- Clause de non-responsabilité : pour consulter nos conditions générales de vente, y compris les clauses de non-responsabilité, visiter la page <https://www.bio-rad.com/fr-fr/terms-conditions>
- Il est fortement recommandé de lire le présent guide d'utilisation dans son intégralité, ainsi que les guides relatifs aux réactifs, aux instruments et au logiciel associés
- Ce test doit être réalisé par du personnel formé
- Les échantillons et cultures d'enrichissement doivent être manipulés comme des substances potentiellement infectieuses et éliminés conformément aux règles et réglementations locales
- Tous les matériels potentiellement infectieux doivent être soumis à l'autoclave avant élimination
- La qualité des résultats dépend du strict respect des bonnes pratiques de laboratoire (par exemple, la norme EN ISO 7218), particulièrement en ce qui concerne la microbiologie et la PCR :
 - Ne jamais transférer du matériel de laboratoire (pipettes, tubes, etc.) d'un poste de travail à un autre
 - Toujours utiliser un contrôle positif et un contrôle négatif pour chaque série de réactions d'amplification
 - Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption
 - Avant de les utiliser et en vue de les homogénéiser, agiter et retourner les contrôles positif et négatif issus du kit
 - Vérifier périodiquement l'exactitude et la précision des pipettes, ainsi que le fonctionnement correct des instruments
 - Changer de gants fréquemment, surtout si une contamination est suspectée
 - Nettoyer les postes de travail périodiquement avec de l'eau de Javel à 5 % et d'autres agents de décontamination
 - Utiliser des gants non poudrés et éviter les empreintes digitales et l'écriture sur les bouchons des tubes. En effet, l'acquisition des données peut en être affectée
- Il est fortement recommandé de respecter les exigences générales décrites dans la norme EN ISO 22174 (Microbiologie de la chaîne alimentaire — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche et la quantification de micro-organismes — Exigences générales et définitions)
 - Consulter la fiche de données de sécurité pour obtenir des informations supplémentaires, ainsi que les réglementations locales relatives à l'élimination

Section 7

Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux

- Pour les échantillons environnementaux, il convient d'humidifier les dispositifs de prélèvement d'échantillons à l'aide d'un diluant stérile (par exemple, de l'eau peptonée tamponnée) et si nécessaire, d'une solution de neutralisation (par exemple HiCap Neutralizing Broth, Dey-Engley Neutralizing Broth, Lethen Broth) pour neutraliser les effets des agents assainissants. Il est recommandé d'éviter, dans la solution d'humidification, les tampons neutralisants qui contiennent un complexe aryle-sulfonate
- Après ouverture, veiller à placer les barrettes ReadyPCR strips dans l'instrument CFX dans les 4 hr. Une fois que le réactif PCR lyophilisé est réhydraté, le mélange est stable à une température de 18–25 °C
- Lors de l'utilisation du système CFX Real Time PCR System, équilibrer systématiquement les barrettes de tubes afin de garantir que le couvercle chauffé applique une pression uniforme dans le bloc
- Avant d'utiliser cette méthode, il est recommandé de toujours vérifier si elle est adaptée à l'usage prévu ou à la matrice concernée
- Manipuler les réactifs EZ-Check comme un produit biologiquement dangereux, au minimum de niveau de biosécurité 2

Section 8 Protocole

Il est fortement recommandé de lire le protocole dans son intégralité avant de commencer le test.

A. Enrichissement de l'échantillon

Porter les bouillons d'enrichissement à température ambiante (20–25 °C) avant utilisation.

Pour une durée d'enrichissement de 10 hr ou une durée inférieure, porter le bouillon d'enrichissement à la température d'incubation de l'échantillon, avant utilisation. Les courtes durées d'enrichissement sont sensibles aux conditions d'incubation et les températures indiquées doivent être strictement respectées. La durée de préparation de l'échantillon (du préchauffage du bouillon d'enrichissement au début de l'incubation de l'échantillon alimentaire) ne doit pas dépasser 45 min. Il est recommandé d'utiliser un incubateur ventilé.

Les échantillons congelés doivent être complètement décongelés avant utilisation.

L'utilisation d'une poche d'enrichissement à filtre incorporé est fortement recommandée.

L'utilisation d'alpha-amylase est recommandée pour l'enrichissement des céréales et des produits amylicés, conformément à la norme ISO 6887-4.

Dans le cadre de la certification NF VALIDATION, il est possible de préparer les échantillons avec ou sans référence aux normes ISO 6887-2 à 6887-6. En l'absence d'indication, les prises d'essai supérieures à 25 g n'ont pas été testées. Incuber, sans agiter, conformément aux durées et températures indiquées dans le tableau.

Le tableau suivant détaille les différents protocoles utilisables, en fonction de l'application et du domaine de la validation.

Il est possible de stocker les échantillons enrichis à 2–8 °C pendant 72 hr avant de réaliser l'étape de lyse EZ-Check.

Section 8
Protocole

AOAC		
Domaine (matrices) ^{1,2}	Préparation des échantillons	Enrichissement
Salade traiteur	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser 25 g ou 25 mL d'échantillon dans 225 mL d'eau peptonée tamponnée, pendant 1 min 	Incuber pendant 18–26 hr à 37 ± 1 °C
Laitue romaine	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser 375 g d'échantillon dans 1 125 mL d'eau peptonée tamponnée préchauffée (42 ± 1 °C), pendant 1 min 	Incuber pendant 10–24 hr à 42 ± 1 °C
Mélange de légumes surgelés, germes de haricot, melon cantaloup frais coupé	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser 375 g d'échantillon dans 1 125 mL d'eau peptonée tamponnée préchauffée (37 ± 1 °C), pendant 1 min 	Incuber pendant 18–22 hr à 37 ± 1 °C
Fromage cheddar, poudre de cacao	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser 375 g d'échantillon dans 1 125 mL d'eau peptonée tamponnée, pendant 1 min 	Incuber pendant 18–22 hr à 37 ± 1 °C
Lait en poudre non gras, protéine de lactosérum en poudre, farine tout usage, préparation en poudre destinée à l'alimentation des nourrissons (avec probiotiques)	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser 375 g d'échantillon dans 1 125 mL d'eau peptonée tamponnée avec PIF Supplement, pendant 1 min 	Incuber pendant 18–26 hr à 37 ± 1 °C
Beurre d'arachide crémeux	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser 375 g d'échantillon dans 1 125 mL d'eau peptonée tamponnée préchauffée (42 ± 1 °C), pendant 1 min 	Incuber pendant 18–24 hr à 42 ± 1 °C
Ail en poudre	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser 375 g d'échantillon dans 3 000 mL d'eau peptonée tamponnée préchauffée (37 ± 1 °C) + K₂SO₃ 0,5 %, pendant 1 min 	Incuber pendant 18–26 hr à 37 ± 1 °C
Dinde crue hachée, poitrine de poulet cru	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser 375 g d'échantillon dans 1 125 mL d'eau peptonée tamponnée préchauffée (42 ± 1 °C), pendant 1 min 	Incuber pendant 8–22 hr à 42 ± 1 °C
	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser 325 g d'échantillon dans 1 625 mL d'eau peptonée tamponnée, pendant 1 min 	Incuber pendant 20–24 hr à 35 ± 2 °C
Bœuf cru haché, porc cru haché	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser 375 g d'échantillon dans 1 125 mL d'eau peptonée tamponnée préchauffée (42 ± 1 °C), pendant 1 min 	Incuber pendant 8–22 hr à 42 ± 1 °C (375 g)
	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser 325 g d'échantillon dans 975 mL de bouillon mTSB, pendant 1 min 	Incuber pendant 15–24 hr à 42 ± 1 °C (325 g)
Rinçage de carcasse de poulet	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser 30 mL de rinçage de carcasse dans 30 mL d'eau peptonée tamponnée préchauffée (37 ± 1 °C) 	Incuber pendant 18–22 hr à 37 ± 1 °C
	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser 30 mL de rinçage de carcasse dans 30 mL d'eau peptonée tamponnée 	Incuber pendant 20–24 hr à 35 ± 2 °C
Chiffonnette de prélèvement/bœuf cru, chiffonnettes de prélèvement	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser dans 200 mL d'eau peptonée tamponnée ou de bouillon mTSB préchauffé (42 ± 1 °C), pendant 1 min 	Incuber pendant 8–22 hr à 42 ± 1 °C (eau peptonée tamponnée)
		Incuber pendant 15–24 hr à 42 ± 1 °C (mTSB)
Aliments secs pour chiens	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser 375 g d'échantillon dans 1 125 mL d'eau peptonée tamponnée, pendant 30 sec 	Incuber pendant 18–26 hr à 37 ± 1 °C
Surfaces environnementales en acier inoxydable, en béton verni, en caoutchouc	<ul style="list-style-type: none"> Humidifier les écouvillons et éponges avec HiCap Neutralizing Broth Homogénéiser les écouvillons pendant 30 sec à la main dans 10 mL d'eau peptonée tamponnée Homogénéiser les éponges pendant 30 sec à la main dans 60 mL d'eau peptonée tamponnée 	Incuber pendant 18–24 hr à 37 ± 1 °C

¹ La validation inclut l'ensemencement direct par stries sur les boîtes RAPID'*Salmonella*.

² Si l'échantillon présente une inhibition de la réaction de PCR, réaliser un nouveau test ou procéder à une dilution au 1:10 avec de l'eau distillée stérile. Si l'inhibition persiste, utiliser iQ-Check Purification Reagent Treatment ou une dilution au 1:50 avec de l'eau distillée stérile (un test de vérification supplémentaire est nécessaire).

NF Validation		
Domaine (matrices) ¹	Préparation des échantillons	Enrichissement
Tous les échantillons de produits alimentaires destinés à la consommation humaine et animale et les échantillons environnementaux	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser 25 g ou 25 mL d'échantillon dans 225 mL d'eau peptonée tamponnée, pendant 1 min 	Incuber pendant 18–26 hr à 37 ± 1 °C
Surfaces environnementales	<ul style="list-style-type: none"> Humidifier les écouvillons et éponges avec un bouillon neutralisant qui ne contient pas de complexe aryle-sulfonate Homogénéiser les écouvillons pendant 30 sec à la main dans 10 mL d'eau peptonée tamponnée Homogénéiser les éponges pendant 30 sec à la main dans 60 mL d'eau peptonée tamponnée 	Incuber pendant 18–26 hr à 37 ± 1 °C
Produits cacaotés et chocolatés ² (jusqu'à 375 g)	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser n g d'échantillon dans 9 x n mL d'eau peptonée tamponnée préchauffée (41,5 ± 1 °C) (375 g dans 1 125 ml) 	Incuber pendant 18–26 hr à 41,5 ± 1 °C
Produits laitiers transformés thermiquement ³ (jusqu'à 375 g)	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser n g d'échantillon dans 9 x n mL d'eau peptonée tamponnée préchauffée (37 ± 1 °C) (375 g dans 3 375 ml) 	Incuber pendant 18–26 hr à 37 ± 1 °C
Produits à base de viande et de volaille crues (jusqu'à 375 g)	<ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser n g d'échantillon dans 3 x n mL d'eau peptonée tamponnée préchauffée (41,5 ± 1 °C) (375 g dans 1 125 ml) 	Incuber pendant 8–26 hr à 41,5 ± 1 °C

¹ Si l'échantillon présente une inhibition de la réaction de PCR, réaliser un nouveau test ou procéder à une dilution au 1:10 avec de l'eau distillée stérile. Si l'inhibition persiste, utiliser iQ-Check Purification Reagent Treatment ou une dilution au 1:50 avec de l'eau distillée stérile (un test de vérification supplémentaire est nécessaire).

² Procéder à une dilution impérative au 1:10 de l'échantillon enrichi avec un diluant tryptone-sel après incubation, avant de passer à l'étape d'extraction d'ADN. Si l'extraction d'ADN présente une inhibition de la réaction de PCR, réaliser un nouveau test ou utiliser iQ-Check Purification Reagent Treatment, ou une dilution au 1:10 (dans le cadre de la certification NF VALIDATION). Le produit Free DNA Removal Solution n'a pas été évalué pour cette catégorie.

³ Pour réduire l'inhibition de la réaction de PCR pour le type d'ingrédient alimentaire, procéder à une dilution de l'extrait d'ADN au 1:10 dans de l'eau distillée stérile. Si l'inhibition de la réaction de PCR persiste, utiliser un ratio de dilution supérieur (par exemple, dilution au 1:50 dans de l'eau distillée stérile, un test de vérification supplémentaire est nécessaire).

B. Traitement de l'ADN libre (étape facultative)

Free DNA Removal Solution est un moyen idéal d'éliminer l'ADN libre.

1. Distribuer 10 µL de Free DNA Removal Solution activée dans autant de puits d'une microplaque Deep Well vide qu'il existe d'échantillons à analyser.
2. Ajouter 100 µL d'échantillon enrichi décanté dans chaque puits.

Remarque : pour éviter les débris de matrice ou les couches graisseuses, prélever juste en dessous de la couche et au-dessus des débris du fond du tube.

3. Incuber la microplaque dans l'agitateur thermique, SANS agiter, à 37 ± 2 °C pendant 15–30 min
4. Poursuivre avec le protocole EZ-Check Lysis, en utilisant 25 µL d'échantillon enrichi traité et EZ-Check Lysis Kit.

Pour plus d'informations, consulter le guide d'utilisation Free DNA Removal (document n° 100000253856).

C. iQ-Check Prep System (option)

iQ-Check Prep System est utilisé pour automatiser le flux EZ-Check, y compris le traitement d'élimination de l'ADN libre en option, l'extraction de l'ADN et la préparation des plaques de PCR en temps réel.

1. Ouvrir le logiciel CFX Maestro IDE et sélectionner le protocole de test « EZ Salmo » dans le menu.
2. Attribuer des types d'échantillons à chaque puits de la vue de la plaque en sélectionnant Inconnu, Contrôle positif ou Contrôle négatif.
3. Configurer les options requises pour chaque puits (par exemple : FDRS, dilution).
4. Cliquer sur « Envoyer à l'iQ-Check Prep » pour exporter la liste de travail.
5. Transférer un minimum de 500 µL d'échantillon enrichi dans le puits approprié d'une plaque Deep Well ou dans des tubes selon la disposition de la plaque.
6. Ouvrir le logiciel iQ-Check Prep sur l'ordinateur de l'instrument.
7. Charger la liste de travail transférée à l'étape 4.
8. Suivre les instructions pour charger manuellement les consommables (embouts, plaques), les réactifs et les échantillons préparés.
9. Lancer la série.
10. Une fois la série terminée, retirer la plaque PCR et sceller hermétiquement les barrettes avec les capuchons optiques EZ-Check.
11. Placer le cadre support PCR Frame EZ-Check dans le thermocycleur. Veiller à placer la plaque avec le puits A1 dans le coin supérieur gauche, et fermer le couvercle de l'instrument.

Pour plus d'informations, consulter les guides d'utilisation de CFX Maestro Industrial Diagnostic Edition et iQ-Check Prep System.

D. Extraction de l'ADN

Recommandations générales :

Utiliser une zone, du matériel et des consommables dédiés pour réaliser cette étape.

Avant de commencer le test, allumer l'agitateur thermique en vue du préchauffage. Le régler à une température de 95–100 °C.

De façon générale, éviter d'agiter la poche d'enrichissement et de prélever de gros fragments d'aliments. Pour les échantillons alimentaires présentant une couche grasse, prélever juste en dessous de cette couche.

Pour obtenir des résultats optimaux, laisser refroidir les barrettes de tubes de lyse avant de prélever l'extrait d'ADN à l'aide d'une pipette.

Protocole EZ-Check Lysis

1. Placer le nombre approprié de tubes de lyse EZ-Check (8 tubes/barrette) dans le porte-tubes EZ-Check Lysis Rack. Vérifier que les tubes sont complètement insérés dans le porte-tubes EZ-Check Lysis Rack.
2. Tapoter doucement le porte-tubes EZ-Check Lysis Rack sur la pailleasse pour faire descendre le réactif de lyse.
3. Retirer soigneusement l'opercule des tubes de lyse.

Remarque : le réactif de lyse EZ-Check pourrait produire des gouttelettes sur la face interne de la cupule. Elles n'ont toutefois aucune incidence sur la qualité de l'extraction.

4. Ajouter 25 µL d'échantillon enrichi dans chaque tube. Si Free DNA Removal Solution est utilisée, ajouter 25 µL d'échantillons enrichis traités dans les tubes de lyse.
5. Incuber les barrettes de tubes de lyse dans l'agitateur thermique à 1 300 rpm, pendant 15–20 min et à une température de 95–100 °C.
6. Laisser refroidir les tubes de lyse en laissant reposer le porte-tubes EZ-Check Lysis Rack sur la pailleasse, à température ambiante pendant 10 à 30 min.

À ce stade, il est possible d'interrompre le protocole et de le reprendre ultérieurement.

- L'extrait d'ADN peut être stocké directement dans les tubes de lyse EZ-Check scellés pendant 7 jours à 2–8 °C en utilisant les EZ-Check Lysis Storage Caps
- Dans le cas d'une congélation (-25 °C, -15 °C), l'extrait d'ADN doit être transféré dans un tube distinct ; il peut alors être stocké dans le tube scellé jusqu'à 30 jours (en dehors du champ de validation AOAC et NF Validation)

E. PCR en temps réel

Configuration de l'instrument et du logiciel

Pour la configuration de l'instrument et du logiciel, suivre les instructions du manuel d'utilisation de CFX Maestro, Industrial Diagnostic Edition (IDE).

Préparation de la détection par PCR

1. Ouvrir le sachet en aluminium EZ-Check *Salmonella* spp. ReadyPCR Strips.
2. Extraire le nombre total de barrettes nécessaires (nombre d'échantillons plus deux contrôles).

Remarque : remettre dans le sachet toutes les barrettes inutilisées, avec l'agent dessiccateur, puis refermer soigneusement.

3. Placer les barrettes ReadyPCR Strips sur le cadre support PCR EZ-Check PCR Frame, en veillant à ce qu'elles soient fermement fixées. Il est recommandé de tapoter doucement le cadre EZ-Check PCR Frame sur la paillasse de façon à faire descendre les billes au fond des puits PCR.
4. Retirer soigneusement l'opercule de chaque barrette et contrôler visuellement la présence d'une bille PCR dans chaque puits. Une fois ouvertes, les barrettes ReadyPCR strips sont stables jusqu'à 4 hr avant réhydratation.
5. Transférer soigneusement 25 µL d'extrait d'ADN le long de la paroi interne de chaque puits des barrettes ReadyPCR Strips, conformément à la configuration de la plaque. Ne pas aspirer l'extrait d'ADN depuis le fond du tube de lyse afin d'éviter le transfert d'inhibiteurs de PCR dans les puits.

Remarque : une réaction effervescente indique que l'échantillon a été correctement ajouté au réactif PCR.

6. Pour les contrôles négatif et positif, transférer soigneusement 25 µL du contrôle négatif (NC) EZ-Check et du contrôle positif (PC) *Salmonella* spp. EZ-Check le long de la paroi interne des puits ReadyPCR correspondants.

Remarque : après ouverture des barrettes ReadyPCR strip, la PCR doit être lancée dans les 4 hr.

7. En option : pour purifier l'ADN, combiner 50 µL d'ADN extrait de chaque échantillon, à 200 µL du produit iQ-Check Purification Reagent. Pipetter par aspiration/refoulement 5 fois pour homogénéiser. Il est également possible de préparer une dilution au 1:10 d'ADN extrait, avec de l'eau stérile. Cette étape n'a pas été testée au cours de la certification NF VALIDATION.
8. Sceller hermétiquement les puits des barrettes PCR avec les capuchons optiques EZ-Check.
9. Placer le cadre support EZ-Check PCR Frame dans le thermocycleur. Veiller à le placer correctement, le puits A1 dans le coin supérieur gauche, et fermer le couvercle de l'instrument.

Préparation des contrôles de laboratoire (étape facultative)

Les contrôles de laboratoire sont traités comme des échantillons alimentaires. Ils permettent de valider l'intégralité du processus EZ-Check. L'ADN extrait des contrôles de laboratoire est placé sur la plaque de PCR, puis utilisé en tant que contrôle PCR remplaçant les contrôles négatif et positif EZ-Check.

Pour être valide, le contrôle négatif de laboratoire ne doit pas contenir d'ADN de *Salmonella* spp. Pour être valide, le contrôle positif de laboratoire doit contenir de l'ADN de *Salmonella* spp. amplifié, avec des valeurs Cq comprises entre 26 et 36. Consulter le manuel d'utilisation de CFX Maestro Industrial Diagnostic Edition (IDE) (document n° 10000241897).

Il incombe à l'utilisateur final d'établir et de mettre en œuvre les contrôles de laboratoire appropriés. La validité et la fiabilité des résultats du produit EZ-Check *Salmonella* spp. dépendent de la vérification, de la validation et de la préparation adéquates, par l'utilisateur final, de ces contrôles.

Lancement de la PCR

Pour lancer la PCR, suivre les instructions du manuel d'utilisation du logiciel CFX Maestro, IDE (DIR 10000241897).

F. Analyse des données

Les données peuvent être analysées directement à la fin de la PCR ou ultérieurement en ouvrant le fichier de données enregistré. Suivre les instructions du manuel d'utilisation du logiciel CFX Maestro IDE pour ouvrir les fichiers de données et régler les paramètres d'analyse des données.

Interprétation des résultats

Une fois que les paramètres d'analyse des données ont été définis, les résultats sont interprétés en analysant les valeurs Cq de chaque échantillon (le cycle auquel la courbe d'amplification croise le seuil).

Le logiciel CFX Maestro IDE assure une analyse automatisée complète des systèmes de détection par PCR en temps réel de Bio-Rad. Une vérification des caractéristiques typiques des courbes d'amplification doit être réalisée avant la publication des résultats. Contacter l'équipe d'assistance technique de Bio-Rad en cas de besoin.

Contrôles

Vérifier les contrôles positif et négatif avant d'interpréter les résultats de l'échantillon.

Pour que l'expérience soit valide, les contrôles doivent présenter les résultats du tableau ci-dessous. Dans le cas contraire, il faut répéter la réaction de PCR.

	Détection de <i>Salmonella</i> spp. (canal FAM)	Détection de contrôle interne (canal HEX)
Contrôle négatif	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Contrôle positif	$26 \leq Cq \leq 36$	Non pertinent

* Le logiciel indique une valeur Cq N/A (non applicable) lorsque la fluorescence d'un échantillon ne dépasse pas significativement le bruit de fond et par conséquent ne dépasse pas le seuil.

Si les résultats des contrôles négatif et positif diffèrent des résultats indiqués dans le tableau ci-dessus (contrôle non valide), répéter la PCR et l'analyse décrites dans D. PCR en temps réel et E. Analyse des données de la Section 7 Protocole.

Échantillons

Un test PCR EZ-Check *Salmonella* spp. **positif** doit présenter une courbe d'amplification typique et une valeur Cq ≥ 10 pour le fluorophore FAM.

- Si la valeur Cq des deux canaux est inférieure à 10, vérifier que la courbe, en tant que données brutes, montre un aspect caractéristique d'amplification exponentielle (une ligne de départ plane, avec une augmentation rapide de la fluorescence, puis une stabilisation). Si la courbe semble correcte, le test peut être considéré comme positif pour la présence de *Salmonella* spp.

S'il n'y a pas de valeur Cq (Cq = N/A) pour FAM, ou si la courbe n'est pas une courbe d'amplification typique, le contrôle interne de cet échantillon doit être analysé.

- Si aucune valeur Cq n'est obtenue pour FAM et si le contrôle interne présente une valeur Cq ≥ 28 , l'échantillon est considéré **négatif** pour *Salmonella* spp.
- Un contrôle interne qui n'a pas non plus de valeur Cq (Cq = N/A) indique probablement un phénomène d'inhibition de la réaction de PCR. L'échantillon doit être dilué et la PCR répétée (réaliser une dilution au 1:10 dans de l'eau distillée stérile avec 10 μ L d'extrait d'ADN, et utiliser 25 μ L de la dilution pour le test PCR)
- Si la valeur Cq pour le contrôle interne est < 28 , il n'est pas possible d'interpréter le résultat. Vérifier que le seuil a été placé correctement ou que la courbe de données brutes est une courbe d'amplification normale. Si la courbe n'a pas de forme caractéristique, répéter le test de PCR

L'interprétation des résultats du test est résumée dans le tableau suivant :

Détection de <i>Salmonella</i> spp. (canal FAM)	Détection de contrôle interne (canal HEX)	Interprétation
Cq ≥ 10	N/A*	Positif
Cq = N/A*	Cq ≥ 28	Négatif
Cq = N/A*	Cq = N/A*	Inhibition**

* Le logiciel indique une valeur Cq N/A (non applicable) lorsque la fluorescence d'un échantillon ne dépasse pas significativement le bruit de fond et par conséquent ne dépasse pas le seuil.

** Lorsque la détection pour la cible et le contrôle interne donne une valeur Cq = N/A, l'extrait d'ADN doit être dilué au 1:10 et testé à nouveau.

Un non-respect des critères de validation peut entraîner une interprétation non valide. Vérifier les données brutes et continuer de la même façon que pour un cas d'inhibition de l'échantillon.

Section 9

Confirmation des résultats positifs

Dans le contexte de la validation AOAC, un résultat EZ-Check *Salmonella* spp. positif est supposé être positif et il convient de procéder à une confirmation avec une méthode de référence appropriée (par exemple, USDA MLG, FDA BAM, ISO, MFHPB, AOAC SMPR, etc.). Il est également possible de strier 10 μ L de bouillon d'enrichissement directement sur le milieu RAPID'*Salmonella* Agar et d'incuber pendant 24 ± 2 hr à 37 ± 1 °C. Si le niveau de flore interférente est susceptible d'être élevé, transférer 0,5 mL de culture pré-enrichie à 10 mL de bouillon Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) et incuber pendant 24 ± 3 hr à $41,5 \pm 1$ °C. Poursuivre avec l'ensemencement par stries de 10 μ L de bouillon RVS enrichi sur le milieu RAPID'*Salmonella* Agar. Se reporter à la méthode de confirmation décrite dans le guide d'utilisation RAPID'*Salmonella* Agar (document n° 10000126748).

Section 10

Confirmation de colonies isolées à l'aide du kit EZ-Check

Dans le contexte de la méthode certifiée NF VALIDATION, tous les résultats positifs du kit EZ-Check doivent être confirmés de l'une des façons suivantes :

1. Mise en œuvre des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées CEN ou ISO (y compris la purification), directement à partir du bouillon d'enrichissement EPT, après un enrichissement de 18–26 hr à 37 °C.
2. Ensemencement par stries de 10 µL d'EPT enrichie directement sur le milieu RAPID'*Salmonella* Agar puis incubation pendant 24 ± 2 hr à 37 ± 1 °C. Si le niveau de flore interférente est susceptible d'être élevé, transférer 0,1 mL d'EPT enrichie à 10 mL de bouillon Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) et incubé pendant 24 ± 3 hr à 41,5 ± 1 °C. Poursuivre avec l'ensemencement par stries de 10 µL de bouillon RVS enrichi sur le milieu RAPID'*Salmonella* Agar. Les colonies typiques sont confirmées conformément à la description du guide d'utilisation RAPID'*Salmonella*.
3. Utilisation de toute autre méthode certifiée par NF VALIDATION et fondée sur un principe différent de celui utilisé dans le produit EZ-Check *Salmonella* spp. Kit. Le protocole validé de cette seconde méthode doit être suivi dans son intégralité, y compris l'enrichissement sélectif RVS, selon le cas. La confirmation est mise en œuvre à partir du bouillon d'enrichissement EPT, si cette étape est commune aux deux méthodes.

Dans le contexte de NF VALIDATION, avant de procéder à la confirmation, il est possible de stocker l'EPT enrichie à 2–8 °C pendant 72 hr maximum, à la suite de l'incubation à 37 °C.

En cas de résultats discordants entre EZ-Check *Salmonella* spp. Kit et l'une des options de confirmation énumérées ci-dessus, mettre en œuvre les étapes nécessaires pour garantir la validité des résultats.

Section 10

Confirmation de colonies isolées à l'aide du kit EZ-Check

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit EZ-Check *Salmonella* spp. Kit peut également être utilisé pour confirmer des colonies isolées de *Salmonella* spp. sur des milieux de culture gélosés (en dehors du domaine de validation AOAC). Se référer au guide d'utilisation RAPID'*Salmonella* Agar (n° de document 10000126748) pour les conditions d'utilisation.

1. Choisir une colonie isolée sur un milieu de culture gélosé sélectif ou non sélectif, avec un cure-dent, une anse stérile ou un autre consommable adapté (par exemple, un embout de pipette).
2. Remettre la colonie en suspension dans 100 µL d'eau distillée stérile, dans un microtube à centrifuger. Agiter (vortex) pour homogénéiser.
3. Ajouter 25 µL de la suspension directement au réactif de PCR ou à la solution EZ-Check Lysis et suivre le protocole EZ-Check *Salmonella* spp. pour l'interprétation des données et des résultats.

Section 11 Performances du test et validations

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit est spécifiquement destiné à la détection du genre *Salmonella*.



BRD 07/27-07/25

MÉTHODES ALTERNATIVES
D'ANALYSE POUR
L'AGROALIMENTAIRE

<http://nf-validation.afnor.org>

NF Validation

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit est certifié NF VALIDATION comme méthode alternative à la méthode de référence ISO 6579-1 (2017) pour la détection de *Salmonella* spp. dans tous les produits destinés à la consommation humaine et animale, ainsi que dans les échantillons environnementaux. La validation respecte le protocole de la norme ISO 16140-2:2016 et inclut l'utilisation des systèmes CFX Opus 96, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well et CFX Duet Real-Time PCR System. L'utilisation d'iQ-Check Free DNA Removal Solution est incluse dans le domaine de la validation pour toutes les catégories validées, à l'exception des produits cacao et chocolats. L'utilisation d'iQ-Check Prep System v5 est incluse dans le domaine de la validation pour toutes les catégories validées. Le logiciel associé est CFX Maestro Software IDE V4.0. Le fichier de protocole d'application « EZ Salmo » est validé pour tous les échantillons. Numéro de certificat : BRD 07/27-07/25. Se reporter au certificat disponible sur le site Web <http://nf-validation.afnor.org> pour toutes les informations de validité.



Validation AOAC

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit est validé par AOAC Research Institute dans le cadre du programme « Performance Tested Methods » 082501 pour la détection de *Salmonella* spp. dans les éléments suivants : salade traiteur¹ (25 g), bœuf cru haché² (375 g), dinde crue hachée² (375 g), poitrine de poulet cru² (375 g), rinçage de carcasse de poulet² (30 mL), porc cru haché (375 g), lait en poudre non gras¹ (375 g), protéine de lactosérum en poudre¹ (375 g), farine tout usage¹ (375 g), fromage cheddar¹ (375 g), laitue romaine¹ (375 g), mélange de légumes surgelés¹ (375 g), melon cantaloup frais coupé¹ (375 g), poudre de cacao¹ (375 g), beurre d'arachide crémeux¹ (375 g), aliments secs pour chiens¹ (375 g), préparation en poudre destinée à l'alimentation des nourrissons (avec probiotiques)¹ (375 g), ail en poudre¹ (375 g), germes de haricot¹ (375 g), chiffonnette de prélèvement/bœuf cru², surface en acier inoxydable¹ (4" x 4", éponge), surface en caoutchouc¹ (1" x 1", éponge), surface en béton verni¹ (4" x 4", éponge). Il convient de considérer un résultat positif avec le kit EZ-Check comme étant présumé et il est recommandé de le confirmer en suivant les recommandations de la Section 9. Le fichier de protocole d'application « EZ Salmo », l'utilisation d'Free DNA Removal Solution et l'utilisation des systèmes CFX Opus Standard, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well et CFX Duet Real-Time PCR System sont validés pour tous les échantillons. Le logiciel associé est CFX Maestro IDE Software (version 4.0 et ultérieure).

¹ Test avec la méthode de référence FDA BAM Ch. 5

² Test avec la méthode de référence USDA MLG 4.15

Section 12

Références

ISO 7218. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Exigences générales et recommandations pour les examens microbiologiques.

ISO 6887. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique Parties 1-6.

ISO 6579-1. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des *Salmonella* — Partie 1 : Recherche des *Salmonella* spp.

ISO 16140-2. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Validation des méthodes — Partie 2 : Protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2024). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 4.15: Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Siluriformes (Fish) Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2024). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 5: *Salmonella*.

Visiter [bio-rad.com/EZcheck](https://www.bio-rad.com/EZcheck) pour plus d'informations.

Bio-Rad et EZ-Check sont des marques déposées de Bio-Rad Laboratories Inc. dans certaines juridictions.
Toutes les marques déposées utilisées dans ce document appartiennent à leur propriétaire respectif.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website [bio-rad.com](https://www.bio-rad.com) **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

EZ-Check™ *Salmonella* spp. Kit

Anwenderhandbuch

Test zum Nachweis von *Salmonella* spp. in Lebensmittel-, Futtermittel- und Umweltproben durch Real-Time PCR

Katalog-Nr. 12018082

Nur für den *In-vitro*-Gebrauch im Labor



Inhaltsverzeichnis

Abschnitt 1 Revisionshistorie	3
Abschnitt 2 Einleitung	3
Abschnitt 3 Die EZ-Check <i>Salmonella</i> spp. Technologie	4
Abschnitt 4 Zusammensetzung des Kits	5
Abschnitt 5 Haltbarkeit und Lagerung	5
Abschnitt 6 Zusätzlich benötigtes Material	6
Abschnitt 7 Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse	7
Abschnitt 8 Protokoll	9
A. Probenanreicherung.....	9
B. Behandlung zur Entfernung freier DNA (optionaler Schritt)	11
C. iQ-Check Prep System (optional)	11
D. DNA-Extraktion.....	12
E. Real-Time PCR.....	13
F. Datenanalyse.....	14
Abschnitt 9 Bestätigung positiver Ergebnisse	16
Abschnitt 10 Bestätigung von Einzelkolonien mit dem EZ-Check Kit	17
Abschnitt 11 Testleistung und Testvalidierung	17
Abschnitt 12 Literatur	18

Abschnitt 1 Revisionshistorie

Freigabedatum	Dokument-/Versionsnummer	Änderung
Juli 2025	Bulletin 5145 Ver A	Neues Dokument
August 2025	Bulletin 5145 Ver B	- AOAC-Zulassung - Inhaltliche Änderungen
Oktober 2025	Bulletin 5145 Ver C	- Erweiterung der NF-Validierung: Kakao und Schokoladenerzeugnisse bis zu 375 g, iQ-Check Prep System - Inhaltliche Änderungen
April 2026	Bulletin 5145 Ver D	- Erweiterung der NF-Validierung: Säuglingsnahrung und Getreide mit/ohne Probiotika und verwandte Inhaltsstoffe bis 375 g, wärmebehandelte Milcherzeugnisse bis 375 g, rohes Fleisch und Geflügelprodukte bis 375 g - Korrektur des Protokolls zur Bestätigung der NF-Validierung: Anreicherungsvolumen geändert zu 0,1 mL in RVS für die Sekundäranreicherung - Inhaltliche Änderungen

Abschnitt 2 Einleitung

Salmonellen sind weltweit die häufigste Ursache von Lebensmittelvergiftungen, obwohl zahlreiche Vorbeugungsmaßnahmen zur Eindämmung dieser Erregergruppe getroffen werden. Eier, Milcherzeugnisse, Fleisch und Geflügel werden am häufigsten mit der Übertragung von *Salmonella* in Verbindung gebracht (in 65 % der Fälle). Es sind mehr als 2.500 Serotypen bekannt, von denen alle potenziell humanpathogen sind. Da bereits eine geringe Dosis für eine Infektion ausreicht und eine ernste Gefahr für Lebensmittelerzeuger und -verbraucher besteht, ist in mehreren Ländern inzwischen vorgeschrieben, dass Lebensmittelerzeugnisse gänzlich frei von *Salmonella* sein müssen.

Klassische Anzuchtmethoden sind oftmals langwierig und mühsam. Bei dem EZ-Check *Salmonella* spp. Kit dagegen handelt es sich um einen einfachen und schnellen qualitativen Test zum Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen von *Salmonella* spp. in Lebensmittelerzeugnissen, Futtermitteln und Umweltproben. Mithilfe der Real-Time PCR werden *Salmonella* spp.-spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert und mittels fluoreszierender Sonden gleichzeitig nachgewiesen. In einem einfach durchzuführenden Verfahren können bei minimalem Kontaminationsrisiko bis zu 96 Tests auf einmal ausgeführt werden. Dieses Kit ist zur Verwendung durch geschultes Laborpersonal bestimmt, das Tests zum Nachweis von *Salmonella* spp. durchführt. Durch die Verwendung dieses Tests werden Ergebnisse bereits innerhalb weniger Stunden nach der Anreicherung einer Probe ermöglicht.

Abschnitt 3

Die EZ-Check *Salmonella* spp. Technologie

Das EZ-Check *Salmonella* spp. Kit darf nur mit EZ-Check Lysis Kit (Katalog-Nr. 12018075) verwendet werden.

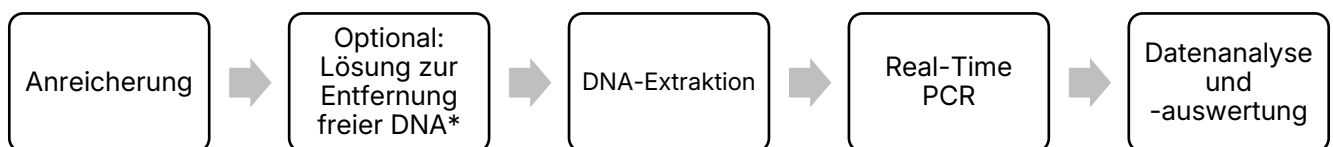
Das EZ-Check *Salmonella* spp. Kit beruht auf der Amplifizierung und dem Nachweis von Genen mittels Real-Time PCR. Die gebrauchsfertigen lyophilisierten PCR-Reagenzien im Kit enthalten *Salmonella* spp.-spezifische Oligonukleotide (Primer und Sonden) sowie DNA-Polymerase und Nukleotide. Der Nachweis und die Datenanalyse sind für die Verwendung mit einem Real-Time PCR Gerät von Bio-Rad, z. B. die CFX Opus 96, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well und CFX Duet Real-Time PCR Nachweissysteme, optimiert.

Die PCR ist eine leistungsstarke Technik, mit der viele Kopien der Ziel-DNA erzeugt werden können. Während der PCR-Reaktion wird die DNA in mehreren Erwärmungs- und Abkühlzyklen durch Hitze denaturiert, um es den Primern zu ermöglichen, sich an die Zielregion anzulagern. Die DNA-Polymerase verwendet diese Primer und die Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) zur Verlängerung der DNA, wodurch Kopien der Ziel-DNA erzeugt werden. Diese Kopien werden als Amplikons bezeichnet.

Bei der Real-Time PCR beruht der DNA-Nachweis auf der Hybridisierung spezifischer Sonden an die Amplikons während der Amplifikation. An diese Sonden ist ein Fluorophor gebunden, der nur fluoresziert, wenn die Sonde an die Zielsequenz hybridisiert. Bei dem Fluorophor, das an die Sonde gebunden ist, die mit der *Salmonella* spp.-spezifischen DNA-Sequenz hybridisiert, handelt es sich um FAM. Wenn keine Ziel-DNA vorhanden ist, ist keine Fluoreszenz nachweisbar. Da sich die Zahl der Amplikons mit jeder Amplifizierungsrunde erhöht, verstärkt sich auch die Fluoreszenzintensität. Beim Annealing-Schritt jedes PCR-Zyklus misst das optische Modul diese Fluoreszenz, während die zugehörige Software die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zyklen aufträgt.

Das Reaktionsgemisch enthält eine synthetische interne DNA-Kontrolle, um jedes etwaige negative Ergebnis zu validieren. Diese Kontrolle wird gleichzeitig mit der *Salmonella*-DNA-Zielsequenz mit einer spezifischen Sonde amplifiziert und durch einen zweiten Fluorophor nachgewiesen.

Dieser Test ermöglicht nach einem Anreicherungsschritt den Nachweis von *Salmonella* spp. In einem breiten Spektrum von Lebensmittelerzeugnissen, Tierfuttermitteln und Umweltproben. Er umfasst die folgenden fünf Hauptschritte:



* Die Verwendungsbedingungen sind dem Anwenderhandbuch für die Free DNA Removal Solution (Katalog-Nr.10000253856) zu entnehmen.

Abschnitt 4

Zusammensetzung des Kits

Das EZ-Check *Salmonella* spp. Kit enthält ausreichend Reagenzien für 96 Tests.

Reagenz ID	Gegenstand	Beschreibung	Menge
RPS	EZ-Check <i>Salmonella</i> spp. ReadyPCR Strips*	Gebrauchsfertiges PCR-Reagenz	12 Streifen mit 8 Wells
CAP	EZ-Check Optische Deckel	Optische Deckel	12 Streifen mit 8 Deckel
NC	EZ-Check Negativkontrolle	PCR-Negativkontrolle	1 Röhrchen, 1,0 ml
PC	EZ-Check <i>Salmonella</i> spp. Positivkontrolle	PCR-Positivkontrolle	1 Röhrchen, 0,6 ml

*EZ-Check *Salmonella* spp. ReadyPCR strips können durch die violetten Laschen an jeder Seite des PCR-Streifens identifiziert werden. Bei *Salmonella* sind violettfarbene Indikatoren ebenfalls auf der Kitverpackung und in der CFX Maestro IDE-Software sichtbar.

Abschnitt 5

Haltbarkeit und Lagerung

- Das Kit wird gekühlt versendet
- Kits bei 2–8°C lagern
- Nicht einfrieren
- Reagenzien nicht nach dem auf den Etiketten angegebenen Verfallsdatum verwenden
- Nach dem ersten Öffnen sind ReadyPCR Strips – verschlossen in dem Trockenmittel enthaltenden Beutel und bei einer Lagerung bei 2-8°C – für bis zu 5 Monate verwendbar. Der Beutel kann während dieses Zeitraums bis zu 5 Mal wieder geöffnet werden

Abschnitt 6

Zusätzlich benötigtes Material

Geräte und Software

- Speziell für die DNA-Extraktion: Heizschüttler*, der eine Temperatur von 95–100°C und/oder $37 \pm 2^\circ\text{C}$ aufrecht erhalten kann, mit einer Mischgeschwindigkeit von mindestens 1.300 U/min (z. B. Katalog-Nr. 3594995 und Katalog-Nr. 12022466)
- Bio-Rad Real-Time PCR System* zum Beispiel das CFX Opus 96 (Katalog-Nr. 17007991) oder CFX Opus Deepwell (Katalog-Nr. 17007992) bzw. CFX Duet (Katalog-Nr. 17010275) Real-Time PCR Systeme
- CFX Maestro Software, Industrial Diagnostic Edition, Version 4.0 (Katalog-Nr. 3593893)
- iQ-Check Prep System* (Katalog-Nr. 3594911)
- Verstellbare Multikanalpipette 20-200 µL (Katalog-Nr. 17010702) und/oder einzelne Pipette 20-200 µL (Katalog-Nr. 17010259)
- EZ-Check Lysis Rack (Katalog-Nr. 12019781)
- EZ-Check PCR Frame (Katalog-Nr. 12019771)
- Labor-Paddel-Blender zum Homogenisieren von Testproben
- Inkubator zur mikrobiologischen Anreicherung der Proben

Hinweis: Wir empfehlen die Verwendung einer unterbrechungsfreien Stromversorgung (USV) für den Thermocycler und die iQ-Check Prep Systeme.

* Informationen zu empfohlenen Geräten erhalten Sie vom technischen Kundendienst von Bio-Rad.

Zubehör

- EZ-Check Lysis Kit (Katalog-Nr. 12018075, 96 Tests)
- Anreicherungsmedium: Gepuffertes Peptonwasser (GPW), zum Beispiel
BPW Plus
Katalog-Nr. 3564684, dehydriert, 500 g
Katalog-Nr. 3554179, 6 Flaschen x 225 mL
Katalog-Nr. 3555795, 4 Beutel mit je 3 L
Katalog-Nr. 3555790, 2 Beutel mit je 5 L
BPW Standard
Katalog-Nr. 12013259, dehydriert, 500 g
Katalog-Nr. 12013258, dehydriert, 5 kg
Katalog-Nr. 12013260, 2 Beutel mit je 5 L
- RAPID'*Salmonella* Agar (Katalog-Nr. 3563961, 20 Platten x 90 mm; Katalog-Nr. 3563963 120 Platten x 90 mm; Katalog-Nr. 3564705, dehydriert, 500 g)
- Free DNA Removal Solution (Katalog-Nr. 3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (Katalog-Nr. 12012383)
- PIF Supplement (Katalog-Nr. 12013322, 2 g)
- Deep Well Mikrotiterplatte (Katalog-Nr. 3594900)
- Kompatible sterile Filterpipettenspitzen, passend für 5-50 µL oder 20-200 µL-Pipetten (z. B. Katalog-Nr. 17010688)
- EZ-Check Lysis Storage Caps (Katalog-Nr. 12022880)
- PCR-Deckelwerkzeug (Katalog-Nr. ECT2000)
- Filterbeutel
- Destilliertes steriles Wasser
- 5%iger Bleichlösung und Oberflächen-Dekontaminationsmittel
- Puderfreie Handschuhe

Zubehör für das iQ-Check Prep System

- 2 mL Röhren für Free DNA Removal Solution (Katalog-Nr. 17010255)
- Deep Well Mikrotiterplatten (Katalog-Nr. 3594900)
- Leitfähige Filterspitzen (Katalog-Nr. 12022468, 300 µL x 5760)
- 60 mL Verdünnungsbehälter (Katalog-Nr. 12014473)

Abschnitt 7 Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse

- Haftungsausschluss: Unsere allgemeinen Verkaufsbedingungen, einschließlich der Haftungsausschlüsse, sind unter <https://www.bio-rad.com/en-us/terms-conditions> einsehbar.
- Vor Anwendung dieser Methode müssen dieses und sonstige Anwenderhandbücher der zugehörigen Reagenzien, Geräte und Software vollständig durchgelesen werden.
- Dieser Test muss von geschultem Personal durchgeführt werden.
- Proben und Anreicherungskulturen sind bei der Handhabung als potenziell infektiös zu betrachten und im Einklang mit vor Ort geltenden Verordnungen und Bestimmungen zu entsorgen.
- Alle potenziell infektiösen Materialien müssen vor dem Entsorgen autoklaviert werden.
- Die Ergebnisqualität hängt von der strikten Einhaltung der guten Laborpraxis ab (zum Beispiel der Norm EN ISO 7218), speziell in Bezug auf Mikrobiologie und PCR:
 - Laborgeräte (Pipetten, Röhren usw.) nie von einem Arbeitsplatz zu einem anderen bringen.
 - Bei jeder Serie von Amplifikationsreaktionen eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle verwenden.
 - Die Reagenzien nach Ablauf ihres Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
 - Positiv- und Negativkontrollen aus dem Kit vor der Anwendung vortexen und herunterzentrifugieren, um die Homogenität sicherzustellen.
 - Regelmäßig die Genauigkeit und Präzision der Pipetten sowie die ordnungsgemäße Funktion der Geräte überprüfen.
 - Handschuhe häufig wechseln, vor allem dann, wenn vermutet wird, dass sie kontaminiert sein könnten.
 - Die Arbeitsplätze regelmäßig mit 5%iger Bleichlösung und anderen Dekontaminationsmitteln reinigen.
 - Ungepuderte Handschuhe verwenden, und Fingerabdrücke und Beschriftungen auf Röhrendeckeln vermeiden. Beide würden die Datenerfassung beeinträchtigen.
- Es wird dringend empfohlen, die in der Norm EN ISO 22174 (Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen

Mikroorganismen in Lebensmitteln — Allgemeine Anforderungen und Begriffe) beschriebenen Anforderungen einzuhalten.

- Weitere Informationen und vor Ort geltende Entsorgungsvorschriften sind im Sicherheitsdatenblatt aufgeführt.
- Für Umgebungsproben müssen die Vorrichtungen zur Probenahme mit einem sterilen Verdünnungsmittel (z. B. gepuffertes Peptonwasser), und erforderlichenfalls mit einer neutralisierenden Lösung (z.B. HiCap Neutralizing Broth, Dey-Engley Neutralizing Broth, Lethen Broth) hydratisiert werden, um die Effekte des Desinfektionsmittels zu inaktivieren. Es wird empfohlen, in der Hydratisierungslösung neutralisierende Puffer zu vermeiden, die einen Arylsulfonatkomplex enthalten
- Nach dem Entfernen des Sealing Films der ReadyPCR strips sicherstellen, dass die Streifen innerhalb von 4 hr in das CFX-Gerät gebracht werden. Sobald das lyophilisierte PCR-Reagenz hydratisiert wurde, ist das daraus resultierende PCR-Gemisch bei 18-25°C stabil.
- Beim Durchlauf des CFX Real-Time PCR Systems stets die Röhrchenstreifen ausgleichen, um sicherzustellen, dass der beheizte Deckel gleichmäßigen Druck über den Block ausübt.
- Es ist immer empfehlenswert, vor Anwendung dieser Methode die Gebrauchstauglichkeit bzw. Untersuchungen zur Matrixüberprüfung durchzuführen.
- EZ-Check Reagenzien sind stets als potenziell biogefährdendes Material zur Eindämmung entsprechend der Biosicherheitsstufe 2 handzuhaben.

Abschnitt 8

Protokoll

Es wird dringend empfohlen, vor Beginn des Tests das gesamte Protokoll durchzulesen.

A. Probenanreicherung

Anreicherungsbouillons vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20–25°C) bringen.

Bei einer Anreicherungszeit von höchstens 10 hr die Anreicherungsbouillon vor der Verwendung auf die Inkubationstemperatur der Probe erwärmen. Bei kurzen Anreicherungszeiten müssen die Inkubationsbedingungen und die angegebenen Temperaturen strikt eingehalten werden. Die Dauer der Probenvorbereitung (Zeit zwischen dem Vorheizen der Anreicherungsbouillon und dem Beginn der Inkubation der Lebensmittelprobe) darf 45 min nicht überschreiten. Es wird empfohlen, einen belüfteten Inkubator zu verwenden.

Gefrorene Proben vor der Verwendung vollständig auftauen.

Die Verwendung eines Anreicherungsbeutels mit integriertem Filter wird dringend empfohlen.

Für die Anreicherung von Getreide oder Stärkeerzeugnissen wird den Angaben in der Norm ISO 6887-4 entsprechend die Verwendung von Alpha-Amylase empfohlen.

Im Rahmen der NF VALIDATION-Zertifizierung kann die Probenvorbereitung mit oder ohne Erfüllung der ISO 6887-2 bis -6 durchgeführt werden. Sofern nichts anderes angegeben ist, wurden keine Mengen über 25 g getestet. Bei der Inkubation sind die in der Tabelle angegebenen Zeiten und Temperaturen einzuhalten und die Proben dürfen dabei nicht geschüttelt werden.

In der folgenden Tabelle sind die verschiedenen Protokolle angeführt, die je nach Anwendung und Umfang der Validierung verwendet werden können.

Vor Durchführung des EZ-Check Lyseschrittes können angereicherte Proben für 72 hr bei 2-8°C gelagert werden.

AOAC		
Umfang (Matrizes) ^{1,2}	Probenvorbereitung	Anreicherung
Feinkostsalat	<ul style="list-style-type: none"> 25 g oder 25 mL der Probe 1 min in 225 mL GPW homogenisieren 	Für 18–26 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren
Römersalat	<ul style="list-style-type: none"> 375 g der Probe 1 min in 1.125 mL vorgewärmten (42 ± 1°C) GPW homogenisieren 	Für 10 – 24 hr bei 42 ± 1 °C inkubieren
Gefrorene Gemüse-mischungen, Bohnensprossen, frisch geschnittene Cantaloupe-Melone	<ul style="list-style-type: none"> 375 g der Probe 1 min in 1.125 mL vorgewärmten (37 ± 1°C) GPW homogenisieren 	Für 18 – 22 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren
Cheddarkäse, Kakaopulver	<ul style="list-style-type: none"> 375 g der Probe 1 min in 1.125 mL GPW homogenisieren 	Für 18 – 22 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren
Magermilchpulver, Molkeeiweißpulver, Allzweckmehl, Säuglingsnahrung mit Probiotika	<ul style="list-style-type: none"> 375 g der Probe 1 min in 1.125 mL GPW mit PIF Supplement homogenisieren 	Für 18–26 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren
Cremige Erdnussbutter	<ul style="list-style-type: none"> 375 g der Probe 1 min in 1.125 mL vorgewärmten (42 ± 1°C) GPW homogenisieren 	Für 18 – 24 hr bei 42 ± 1 °C inkubieren
Knoblauchpulver	<ul style="list-style-type: none"> 375 g der Probe 1 min in vorgewärmtem (37 ± 1°C) 3.000 mL GPW + K₂SO₃ 0,5 % homogenisieren 	Für 18–26 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren
Rohes Putenhackfleisch, rohe Hühnerbrust	<ul style="list-style-type: none"> 375 g der Probe 1 min in 1.125 mL vorgewärmten (42 ± 1°C) GPW homogenisieren 325 g der Probe 1 min in 1.625 mL GPW homogenisieren 	Für 8 – 22 hr bei 42 ± 1 °C inkubieren Für 20 – 24 hr bei 35 ± 2 °C inkubieren
Rohes Rinderhackfleisch, rohes Schweinehackfleisch	<ul style="list-style-type: none"> 375 g der Probe 1 min in 1.125 mL vorgewärmten (42 ± 1°C) GPW homogenisieren 325 g der Probe 1 min in 975 mL mTSB homogenisieren 	8-22 hr bei 42 ± 1°C (375 g) inkubieren 15-24 hr bei 42 ± 1°C (325 g) inkubieren
Spülung der Schlachtkörper von Hühnern	<ul style="list-style-type: none"> 30 mL der Schlachtkörperspülung in 30 mL vorgewärmten (37 ± 1°C) GPW homogenisieren 30 mL der Schlachtkörperspülung in 30 mL GPW homogenisieren 	Für 18 – 22 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren Für 20 – 24 hr bei 35 ± 2 °C inkubieren
Kleidung bei der Probennahme von rohem Rindfleisch; Kleidung bei der Probennahme	<ul style="list-style-type: none"> 1 min in 200 mL vorgewärmten (42 ± 1°C) GPW oder mTSB homogenisieren 	8-22 hr bei 42 ± 1°C (GPW) inkubieren 15-24 hr bei 42 ± 1°C (mTSB) inkubieren
Trockenfutter für Hunde	<ul style="list-style-type: none"> 375 g der Probe 30 sec in 1.125 mL GPW homogenisieren 	Für 18–26 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren
Umgebungsflächen aus Edelstahl, versiegeltem Beton, Gummi	<ul style="list-style-type: none"> Tupfer und Schwämme mit HiCap Neutralizing Broth befeuchten Tupfer 30 sec von Hand in 10 mL GPW homogenisieren Schwämme 30 sec von Hand in 60 mL GPW homogenisieren 	Für 18 – 24 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren

¹Validierung umfasst das direkte Ausstreichen auf RAPID'*Salmonella*-Platten.

²Weist die Probe eine PCR-Hemmung auf, mit einem erneuten Test oder einer 1:10-Verdünnung in sterilem destilliertem Wasser fortfahren. Ist weiterhin eine PCR-Hemmung vorhanden, die iQ-Check Purification Reagent -Behandlung anwenden oder eine 1:50 Verdünnung in sterilem destilliertem Wasser verwenden (zusätzliches Testen zur Überprüfung erforderlich).

NF Validation		
Umfang (Matrizes) ¹	Probenvorbereitung	Anreicherung
Sämtliche Produkte des menschlichen Verzehr, Tierfuttermittel, Umgebungsproben	<ul style="list-style-type: none"> 25 g oder 25 mL der Probe 1 min in 225 mL GPW homogenisieren 	Für 18–26 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren

Umgebungsflächen	<ul style="list-style-type: none"> • Tupfer und Schwämme mit einer neutralisierenden Nährlösung befeuchten, die keinen Arylsulfonatkomplex enthält • Tupfer 30 sec von Hand in 10 mL GPW homogenisieren • Schwämme 30 sec von Hand in 60 mL GPW homogenisieren 	Für 18–26 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren
Kakao und Schokoladenerzeugnisse ² (bis 375 g)	<ul style="list-style-type: none"> • N g Probe in 9 x n ml vorgewärmtem (41,5 ± 1°C) GPW homogenisieren (375 g in 1.125 mL) 	Für 18 – 26 hr bei 41,5 ± 1 °C inkubieren
Wärmebehandelte Milcherzeugnisse ³ (bis 375 g)	<ul style="list-style-type: none"> • n g der Probe in 9 x n mL vorgewärmtem (37 ± 1 °C) GPW homogenisieren (375 g in 3.375 mL) 	18-26 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren
Rohes Fleisch & Geflügelprodukte (bis 375 g)	<ul style="list-style-type: none"> • n g der Probe in 3 x n mL vorgewärmtem (41,5 ± 1 °C) GPW homogenisieren (375 g in 1.125 mL) 	8-26 hr bei 41,5 ± 1 °C inkubieren

¹Weist die Probe eine PCR-Inhibition auf, mit einem erneuten Test oder einer 1:10-Verdünnung in sterilem destilliertem Wasser fortfahren. Ist weiterhin eine PCR-Hemmung vorhanden, die iQ-Check Purification Reagent -Behandlung anwenden oder eine 1:50 Verdünnung in sterilem destilliertem Wasser verwenden (zusätzliches Testen zur Überprüfung erforderlich).

²Vor Beginn der DNA-Extraktion ist nach der Inkubation eine obligatorische 1:10-Verdünnung der mit Tryptonsalz angereicherten Probe durchzuführen. Weist der DNA-Extrakt eine PCR-Hemmung auf, mit einem erneuten Test fortfahren oder die iQ-Check Purification Reagent -Behandlung bzw. eine 1:10-Verdünnung anwenden (im Rahmen der NF VALIDATION-Zertifizierung). Die Free DNA Removal Solution wurde für diese Kategorie nicht bewertet.

³Um die PCR-Hemmung für den Lebensmittelzusatztyp zu verringern, den DNA-Extrakt 1 zu 10 in sterilem, destilliertem Wasser verdünnen. Ist weiterhin eine PCR-Hemmung vorhanden, ein höheres Verdünnungsverhältnis verwenden (z. B. 1:50-Verdünnung in sterilem destilliertem Wasser, zusätzliches Testen zur Überprüfung erforderlich).

B. Behandlung zur Entfernung freier DNA (optionaler Schritt)

Das Free DNA Removal Solution ist eine ideale Methode zur Entfernung freier DNA.

1. 10 µL der aktivierten Free DNA Removal Solution in so viele Wells einer leeren Deep Well Mikrotiterplatte geben, wie zu analysierende Proben vorhanden sind.
2. In jedes Well 100 µL dekantierte angereicherte Probe geben.

Hinweis: Um Matrixtrümmer oder Fettschichten zu vermeiden, direkt unterhalb der Fettschicht und oberhalb der Trümmer am Röhrchenboden pipettieren.

3. Die Deep Well Mikrotiterplatte im Heizschüttler OHNE Schütteln 15–30 min lang bei 37 ± 2 °C inkubieren.
4. Mit dem EZ-Check Lysis-Protokoll unter Verwendung von 25 µL der mit dem EZ-Check Lysis Kit behandelten angereicherten Probe fortfahren.

Weitere Informationen entnehmen Sie bitte dem Anwenderhandbuch zur Entfernung freier DNA (Dokument-Nr. 100000253856).

C. iQ-Check Prep System (optional)

Das iQ-Check Prep System dient zur Automatisierung des EZ-Check-Workflows, einschließlich der optionalen Behandlung zur Entfernung freier DNA, der DNA-Extraktion und der Plattenkonfiguration für Real-Time PCR.

1. Die Software CFX Maestro IDE öffnen und im Menü das Testprotokoll "EZ Salmo" auswählen.
2. Jedem Well in der Plattenansicht durch Auswahl von "Unbekannt", "Positivkontrolle" oder "Negativkontrolle" einen Probenotyp zuweisen.

3. Für jedes Well die erforderlichen Optionen konfigurieren (z. B.: FDRS, Verdünnung).
4. Zum Exportieren der Arbeitsliste auf "An iQ-Check Prep senden" klicken.
5. Je nach Plattenlayout mindestens 500 µL angereicherte Probe in das entsprechende Well einer Deep Well-Platte oder in Röhrchen überführen.
6. Auf dem Gerätecomputer die iQ-Check Prep Software öffnen.
7. Die in Schritt 4 übertragene Arbeitsliste laden.
8. Die Anweisungen zum manuellen Laden von Verbrauchsmaterialien (Spitzen, Platten), Reagenzien und vorbereiteten Proben befolgen.
9. Den Test starten.
10. Nach Beendigung des Testdurchlaufs die PCR-Platte entnehmen und die Streifen mit den EZ-Check optischen Deckeln hermetisch verschließen.
11. Den EZ-Check PCR Frame in den Thermocycler stellen. Die Platte so positionieren, dass sich das Well A1 in der Ecke oben links befindet, und den Gerätedeckel schließen.

Weitere Informationen finden Sie in den Benutzerhandbüchern CFX Maestro Industrial Diagnostic Edition und iQ-Check Prep System.

D. DNA-Extraktion

Allgemeine Empfehlungen:

Für die Durchführung dieses Schritts einen speziell dafür vorgesehenen Bereich, Geräte und Verbrauchsartikel verwenden.

Vor Testbeginn den Heizschüttler einschalten, um ihn vorzuheizen. Auf 95–100°C einstellen.

Generell sollte vermieden werden, den Anreicherungsbeutel zu schütteln und große Lebensmittelfragmente in der Probe zu entnehmen. Bei Lebensmittelproben mit fettiger Schicht die Probe knapp unterhalb dieser Schicht entnehmen.

Für optimale Ergebnisse vor dem Pipettieren die Lyse-Streifen ungestört abkühlen lassen.

EZ-Check Lyseprotokoll

1. Die passende Anzahl an EZ-Check Lyse-Röhrchen (8 Röhrchen/Streifen) in das EZ-Check Lysis Rack setzen. Sicherstellen, dass die Röhrchen vollständig in das EZ-Check Lysis Rack eingeführt sind.
2. Sanft das EZ-Check Lysis Rack auf die Arbeitsfläche klopfen, damit sich das Lyse reagenz absetzt.
3. Die Folienversiegelung vorsichtig von den Lyse-Röhrchen abziehen.

Hinweis: Das EZ-Check Lyse reagenz kann Tröpfchen auf der Innenseite des Wells aufweisen. Dies hat keine Auswirkungen auf die Extraktionsqualität.

4. 25 µL der angereicherten Probe in die Lyse-Röhrchen geben. Bei Verwendung von Free DNA Removal Solution 25 µL angereicherte Proben in die Lyse-Röhrchen geben.
5. Die Lyse-Streifen im Heizschüttler bei einer Bewegung von 1.300 U/min bei 95–100°C für 15–20 min inkubieren.
6. Das EZ-Check Lysis Rack auf die Arbeitsfläche setzen und die Lyse-Röhrchen bei Raumtemperatur ungestört mindestens 10-30 min lang abkühlen lassen.

Bei diesem Schritt kann das Protokoll unterbrochen und später fortgesetzt werden.

- Der DNA-Extrakt kann verschlossen für 7 Tage bei 2-8°C direkt in den EZ-Check Lyse-Röhrchen mit den EZ-Check Lysis Storage Caps verschlossen gelagert werden
- Für die Gefrierlagerung (-25°C, -15°C) muss der DNA-Extrakt in ein separates Röhrchen überführt und kann verschlossen für bis zu 30 Tage gelagert werden (außerhalb des Rahmens der AOAC-Validierung und NF-Validierung).

E. Real-Time PCR

Konfiguration des Geräts und der Software

Zur Konfiguration des Geräts und der Software die Anweisungen im Anwenderhandbuch der Software CFX Maestro, Industrial Diagnostic Edition (IDE) befolgen.

Vorbereitung des PCR Nachweises

1. Den EZ-Check *Salmonella* spp. ReadyPCR Strips Beutel öffnen.
2. Die erforderliche Gesamtanzahl an Streifen (Probenanzahl plus zwei Kontrollen) aus dem Folienbeutel nehmen.

Hinweis: Unbenutzte Streifen wieder in dem, das Trockenmittel enthaltenden Beutel ordnungsgemäß verschließen.

3. Die ReadyPCR Strips in den EZ-Check PCR Frame setzen und dabei sicherstellen, dass die Streifen sicher am Rahmen befestigt sind. Es ist empfehlenswert, sanft den EZ-Check PCR Frame auf den Arbeitstisch zu klopfen, um sicherzustellen, dass die Beads auf dem Boden der PCR Wells sind.
4. Vorsichtig die Folienversiegelung von jedem einzelnen Streifen abziehen und visuell überprüfen, dass sich in jedem Well ein PCR-Bead befindet. Nach dem Öffnen sind die ReadyPCR strips vor ihrer Rehydrierung bis zu 4 hr stabil.
5. Je nach Plattenkonfiguration vorsichtig 25 µL des DNA-Extrakts entlang der Innenwand jedes Wells der ReadyPCR Strips überführen. Den DNA-Extrakt nicht vom Boden des Lyse-Röhrchens aufnehmen, um eine Überführung von PCR-Inhibitoren in das PCR Well zu vermeiden.

Hinweis: Eine sprudelnde Reaktion zeigt an, dass die Probe dem PCR-Reagenz korrekt zugesetzt wurde.

6. Für Negativ- und Positivkontrolle 25 µL der EZ-Check Negativkontrolle (NC) und EZ-Check *Salmonella* spp. Positivkontrolle (PC) vorsichtig entlang der Innenwand der entsprechenden ReadyPCR Wells überführen.

Hinweis: Der PCR-Lauf muss innerhalb von 4 hr nach dem Öffnen der ReadyPCR strip gestartet werden.

7. Optional: Zum Aufreinigen der DNA 50 µL der aus jeder Probe extrahierten DNA mit 200 µL des iQ-Check Purification Reagent. kombinieren. Zum Homogenisieren 5 Mal Auf- und Abpipettieren. Alternativ kann eine 1:10-Verdünnung der extrahierten DNA mit sterilem Wasser hergestellt werden. Dieser Schritt wurde bei der NF VALIDATION-Zertifizierung nicht getestet.
8. Die Wells der PCR Streifen mit EZ-Check optischen Deckeln hermetisch verschließen.
9. Den EZ-Check PCR Frame in den Thermocycler stellen. Die Platte so positionieren, dass sich das Well A1 in der Ecke oben links befindet und den Gerätedeckel schließen.

Vorbereitung der Laborkontrolle (optionaler Schritt)

Laborkontrollen werden als Lebensmittelproben behandelt werden. Sie dienen der Bewertung des gesamten EZ-Check-Arbeitsablaufs. Die extrahierte DNA aus den Laborkontrollen wird auf die PCR Platte gegeben und als PCR-Plattenkontrolle als Ersatz der EZ-Check Negativ- und Positivkontrollen verwendet.

Damit sie gültig ist, darf die Labor-Negativkontrolle keine *Salmonella* spp.-DNA enthalten. Damit sie gültig ist, muss die Labor-Positivkontrolle *Salmonella* spp.-DNA enthalten, die mit C_q-Werten zwischen 26 und 36 amplifiziert wurde. Siehe Anwenderhandbuch der CFX Maestro Industrial Diagnostic Edition (IDE)-Software (Dokumentnr. 10000241897).

Der Endanwender ist für die Erstellung und Umsetzung der angemessenen Laborkontrollen verantwortlich. Die Gültigkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse aus EZ-Check *Salmonella* spp. hängen von der korrekten Überprüfung, Bewertung und Vorbereitung dieser vom Anwender vorbereiteten Kontrollen ab.

PCR-Lauf

Zum Starten des PCR-Laufs die Anweisungen im Anwenderhandbuch der CFX Maestro, IDE-Software befolgen (DIR 10000241897).

F. Datenanalyse

Die Datenanalyse kann direkt am Ende des PCR-Laufs oder später durch Öffnen der gespeicherten Datendatei durchgeführt werden. Für das Öffnen von Datendateien und die Festlegung der Datenanalyseparameter die Anweisungen im Anwenderhandbuch der Software CFX Maestro IDE befolgen.

Ergebnisinterpretation

Nach Festlegung der Datenanalyseparameter werden die Ergebnisse durch Analyse der C_q-Werte jeder Probe (des Zyklus, in dem die Amplifikationskurve den Schwellenwert übersteigt) interpretiert.

Die CFX Maestro IDE-Software ermöglicht eine vollständig automatisierte Analyse für Real-Time PCR Nachweissysteme von Bio-Rad. Vor der Freigabe der Ergebnisse sollten die typischen

Charakteristika der Amplifikationskurven verifiziert werden. Wenn zusätzlicher Support gewünscht wird, ist der technische Kundendienst von Bio-Rad zu kontaktieren.

Kontrollen

Vor der Interpretation der Probenergebnisse sind die Positiv- und Negativkontrollen zu verifizieren.

Damit die Untersuchung gültig ist, müssen die Kontrollergebnisse den Werten entsprechen, die in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst sind. Andernfalls muss die PCR-Reaktion wiederholt werden.

	Nachweis von <i>Salmonella</i> spp. (FAM-Kanal)	Nachweis der internen Kontrolle (HEX-Kanal)
Negativkontrolle	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Positivkontrolle	$26 \leq Cq \leq 36$	Nicht relevant

* Die Software gibt als Cq-Wert (der Zyklus, in dem die Amplifikationskurve den Schwellenwert schneidet) das Ergebnis N/A (Not Applicable; nicht zutreffend) an, wenn die Fluoreszenz der Probe nicht signifikant höher ist als die des Leerwerts und daher den Schwellenwert nicht übersteigt.

Wenn sich die Ergebnisse der Negativ- und der Positivkontrolle von denen in der vorstehenden Tabelle unterscheiden (ungültige Kontrolle), sind der in „D. Real-Time PCR“ und „E. Datenanalyse“ in Abschnitt 7 „Protokoll“ beschriebene Lauf und die Analyse zu wiederholen.

Proben

Ein **positiver** EZ-Check *Salmonella* spp. PCR-Test muss eine typische Amplifikationskurve und für den FAM-Fluorophor einen Cq-Wert von ≥ 10 ergeben.

- Liegt der Cq-Wert für beide Kanäle unter 10, muss in den Rohdaten überprüft werden, ob es sich bei der Kurve um eine normale Amplifikationskurve handelt (d. h. um eine Kurve mit flacher Basislinie, gefolgt von einem raschen exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz und anschließender Abflachung). Wenn die Kurve korrekt aussieht, kann der Test als positiv auf *Salmonella* spp betrachtet werden.

Wenn kein Cq-Wert für FAM vorliegt (Cq = N/A) oder es sich bei der Kurve nicht um eine typische Amplifikationskurve handelt, muss die interne Kontrolle für die entsprechende Probe analysiert werden.

- Die Probe gilt als **negativ** auf *Salmonella* spp., wenn kein Cq-Wert für FAM vorliegt und die interne Kontrolle einen Cq-Wert ≥ 28 aufweist.
- Falls auch für die interne Kontrolle kein Cq-Wert vorliegt (Cq = N/A), bedeutet dies, dass die PCR-Reaktion vermutlich gehemmt war. Die Probe muss verdünnt (mit 10 μ L DNA-Extrakt eine 1:10-Verdünnung in destilliertem sterilem Wasser herstellen und anschließend 25 μ L der Verdünnung testen) und die PCR wiederholt werden.
- Falls der Cq-Wert für die interne Kontrolle < 28 liegt, ist keine Interpretation des Ergebnisses möglich. Es ist zu überprüfen ob der Schwellenwert korrekt platziert wurde oder ob es sich bei der Kurve aus den Rohdaten um eine normale Amplifikationskurve handelt. Wenn die Kurve keine charakteristische Form aufweist, muss der PCR-Test wiederholt werden.

Die Interpretation der Testergebnisse ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Nachweis von <i>Salmonella</i> spp. (FAM-Kanal)	Nachweis der internen Kontrolle (HEX-Kanal)	Auswertung
Cq \geq 10	N/A*	Positiv
Cq = N/A*	Cq \geq 28	Negativ
Cq = N/A*	Cq = N/A*	Hemmung**

* Die Software gibt als Cq-Wert (der Zyklus, in dem die Amplifikationskurve den Schwellenwert schneidet) das Ergebnis N/A (Not Applicable; nicht zutreffend) an, wenn die Fluoreszenz der Probe nicht signifikant höher ist als die des Leerwerts und daher den Schwellenwert nicht übersteigt.

** Wird sowohl beim Ziel-Nachweis als auch beim Nachweis der internen Kontrolle ein Cq-Wert = N/A erhalten, muss der DNA-Extrakt erneut getestet werden, jedoch im verdünnten Zustand (1:10).

Wenn die Validierungskriterien nicht erfüllt sind, wird das Ergebnis unter Umständen als ungültig bezeichnet. Die Rohdaten überprüfen und wie bei einer gehemmten Probe weiter verfahren.

Abschnitt 9 Bestätigung positiver Ergebnisse

Im Rahmen der AOAC-Validierung ist ein positives EZ-Check *Salmonella* spp. Ergebnis als vermutlich positiv zu betrachten und mit einer geeigneten Referenzmethode (z. B. USDA MLG, FDA BAM, ISO, MFHPB, AOAC SMPR etc.) zu bestätigen. Alternativ 10 μ L Anreicherungsbouillon direkt auf RAPID'*Salmonella* Agar ausstreichen und für 24 \pm 2 hr bei 37 \pm 1°C inkubieren. Wenn die störende Begleitflora hoch sein könnte, 0,5 mL vorangereicherte Kultur in 10 mL Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) Nährbouillon überführen und für 24 \pm 3 hr bei 41,5 \pm 1°C inkubieren. Mit dem Ausstreichen von 10 μ L angereicherter RVS auf RAPID'*Salmonella* Agar fortfahren. Es ist die im Anwenderhandbuch von RAPID'*Salmonella* Agar Bestätigungsmethode zu beachten (Dokument-Nr. 10000126748).

Im Rahmen der NF VALIDATION-zertifizierten Methode müssen alle positiven EZ-Check Kit-Ergebnisse bestätigt werden. Dazu gibt es folgende Möglichkeiten:

1. Verwendung der in den standardisierten CEN- oder ISO-Methoden beschriebenen klassischen Tests (einschließlich Aufreinigung) direkt aus der GPW-Anreicherungsbouillon nach einer Anreicherung über 18-26 hr bei 37 °C.
2. Durch Ausstreichen von 10 μ L angereichertem GPW direkt auf RAPID'*Salmonella* Agar und Inkubieren für 24 \pm 2 hr bei 37 \pm 1°C. Wenn störende Flora hoch sein könnte, 0,1 mL angereichertem GPW in 10 mL Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) Nährbouillon überführen und für 24 \pm 3 hr bei 41,5 \pm 1°C inkubieren, dann mit dem Ausstreichen von 10 μ L angereicherter RVS auf RAPID'*Salmonella* Agar fortfahren. Die typischen Kolonien werden wie im Anwenderhandbuch von RAPID'*Salmonella* beschrieben bestätigt.
3. Verwendung einer anderen von NF VALIDATION zertifizierten Methode, die auf einem anderen Prinzip als dem EZ-Check *Salmonella* spp. Kit beruht. Das validierte Protokoll dieser zweiten Methode muss genau befolgt werden, einschließlich gegebenenfalls der selektiven Anreicherung in RVS-Medium. Die Bestätigung wird ab dem Schritt der Anreicherung in GPW-Anreicherungsbouillon durchgeführt, falls dieser Schritt beiden Methoden gemeinsam ist.

Im Rahmen der NF VALIDATION kann vor Durchführung der Bestätigung angereichertes GPW bei 2-8°C für maximal 72 hr nach der Inkubation bei 37°C gelagert werden.

Bei abweichenden Ergebnissen zwischen dem EZ-Check *Salmonella* spp. Kit und einer der oben aufgeführten Bestätigungsmethoden sind die erforderlichen Schritte zu befolgen, um gültige Ergebnisse sicherzustellen.

Abschnitt 10

Bestätigung von Einzelkolonien mit dem EZ-Check Kit

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit kann auch zur Bestätigung einzelner isolierter *Salmonella* spp. Kolonien auf Agarplatten verwendet werden (außerhalb des Rahmens der AOAC-Validierung). Die Verwendungsbedingungen sind dem Anwenderhandbuch für RAPID¹ *Salmonella* Agar (Dokument-Nr. 10000126748) zu entnehmen.

1. Mit einem Zahnstocher, einer sterilen Impföse oder einem anderen geeigneten Verbrauchsartikel (z. B. einer Pipettenspitze) eine isolierte Kolonie aus einer selektiven oder nicht-selektiven Agarplatte aufnehmen.
2. Die Kolonie in 100 µL destilliertem sterilem Wasser in einem Mikrozentrifugenröhrchen resuspendieren. Auf dem Vortex homogenisieren.
3. 25 µL der Suspension direkt zu dem PCR-Reagenz oder der EZ-Check Lyselösung geben und zur Daten- und Ergebnisinterpretation das EZ-Check *Salmonella* spp.-Protokoll befolgen.

Abschnitt 11

Testleistung und Testvalidierung

Das EZ-Check *Salmonella* II Kit ist spezifisch für den Nachweis der Gattung *Salmonella*.



BRD 07/27-07/25

ALTERNATIVE ANALYTICAL
METHODS FOR AGRIBUSINESS

<http://nf-validation.afnor.org>

NF Validation

Das EZ-Check *Salmonella* spp. Kit ist von NF VALIDATION als alternative Methode zur Referenzmethode ISO 6579 -1 (2017) zum Nachweis von *Salmonella* spp. in allen Erzeugnissen für den menschlichen und tierischen Verzehr sowie von Umweltproben zertifiziert. Die Validierung erfolgte nach dem Protokoll der Norm ISO 16140-2: 2016 und umfasste die Verwendung des CFX Opus 96, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well und der CFX Duet Real-Time-PCR Systeme. Die Verwendung der iQ-Check-Lösung zur Entfernung freier DNA ist im Validierungsumfang für alle validierten Kategorien mit der Ausnahme von Kakao und Schokoladeerzeugnisse eingeschlossen. Die Verwendung des iQ-Check Prep System v5 ist im Validierungsumfang für alle validierten Kategorien eingeschlossen. Die zugehörige Software ist CFX Maestro Software IDE V4.0. Die „EZ Salmo“ APF ist für alle Proben validiert. Zertifikatnummer: BRD 07/27-07/25. Für Angaben zur Validität ist das Zertifikat auf der Website <http://nf-validation.afnor.org/en> verfügbar.



AOAC-Validierung

Das EZ-Check *Salmonella* spp.Kit ist durch das AOAC Research Institute unter PTM 082501 für den Nachweis von *Salmonella* spp. in Feinkostsalat¹ (25g), rohes Rinderhackfleisch² (375 g), rohes Putenhackfleisch² (375 g), rohe Hühnerbrust² (375 g), Spülung der S² Schlachtkörper von Hühnern (30 mL), rohes Schweinehackfleisch² (375 g), Magermilchpulver¹ (375 g), Molkeeiweißpulver¹ (375 g), Allzweckmehl¹ (375 g), Cheddarkäse¹ (375 g), Römersalat¹ (375 g), gefrorene Gemüse-mischungen¹ (375 g), frisch geschnittene Cantaloupe-Melone¹ (375 g), Kakaopulver¹ (375 g), cremige Erdnussbutter¹ (375 g), Trockenfutter für Hunde¹ (375 g), Säuglingsnahrung mit Probiotika¹ (375 g), Knoblauchpulver¹ (375 g), Bohnensprossen¹ (375 g), Kleidung bei der Probennahme von rohem Rindfleisch², Edelstahloberfläche¹ (4" x 4", Schwamm), Gummioberfläche¹ (1" x 1", Tupfer), versiegelte Betonoberfläche¹ (4" x 4", Schwamm) validiert. Ein positives Ergebnis mit dem EZ-Check Kit ist als vorläufig positiv zu betrachten und sollte nach der Empfehlung im obenstehenden Abschnitt 9 bestätigt werden. Die „EZ Salmo“ APF, die Verwendung von Free DNA Removal Solution, die Verwendung von CFX Opus Standard, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well sowie CFX Duet Real-Time-PCR Systeme sind für alle Proben validiert. Die zugehörige Software ist die CFX Maestro IDE Software (ab Version 4.0).

¹ Getestet gegen Referenzmethode FDA BAM Ch. 5

² Getestet gegen Referenzmethode USDA MLG 4.15

Abschnitt 12 Literatur

ISO 7218. Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen.

ISO 6887. Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 1 – 6.

ISO 6579-1. Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von *Salmonellen* — Teil 1: Nachweis von *Salmonella* spp.

ISO 16140-2. Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Validierung — Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines Referenzverfahrens.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2024). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 4.15: Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Siluriformes (Fish) Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2024). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 5: *Salmonella*.

Weitere Informationen sind auf bio-rad.com/EZCheck verfügbar.

Bio-Rad und EZ-Check sind in bestimmten Ländern Marken von Bio-Rad Laboratories, Inc.
Alle hier genannten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

EZ-Check™ *Salmonella* spp. Kit

Manuale utente

Test per la rilevazione mediante PCR real-time di *Salmonella* spp. in prodotti alimentari, mangimi per animali e campioni ambientali

Catalogo #12018082

Esclusivamente per uso laboratorio *in - vitro*



Indice

Sezione 1 Cronologia delle revisioni	3
Sezione 2 Introduzione	3
Sezione 3 Tecnologia EZ-Check <i>Salmonella</i> spp.	4
Sezione 4 Componenti del kit	5
Sezione 5 Durata e conservazione	5
Sezione 6 Materiali necessari ma non forniti	5
Sezione 7 Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali	7
Sezione 8 Protocollo	9
A. Arricchimento del campione.....	9
B. Trattamento per la rimozione del DNA libero (fase opzionale)	11
C. Sistema iQ-Check Prep (opzionale)	12
D. Estrazione del DNA	12
E. PCR real-time	13
F. Analisi dei dati	14
Sezione 9 Conferma dei risultati positivi	16
Sezione 10 Conferma di singole colonie tramite il Kit EZ-Check	17
Sezione 11 Performance del test e validazioni	18
Sezione 12 Riferimenti	19

Sezione 1 Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero di documento	Modifica
Luglio 2025	Bulletin 5145 Ver A	Nuovo documento
Agosto 2025	Bulletin 5145 Ver B	- Approvazione AOAC - Modifiche al contenuto
Ottobre 2025	Bulletin 5145 Ver C	- Estensione Certificazione NF: Cacao e prodotti al cioccolato fino a 375 g, sistema di preparazione iQ-Check - Modifiche al contenuto
Aprile 2026	Bollettino 5145 Ver D	- Estensione NF Validation: Formula per neonati e cereali con/senza probiotici e ingredienti associati fino a 375 g, latticini trasformati a caldo fino a 375 g, carne cruda e prodotti a base di pollame fino a 375 g - Correzione del protocollo di conferma NF Validation: Volume di arricchimento modificato a 0,1 mL in RVS per l'arricchimento secondario - Modifiche al contenuto

Sezione 2 Introduzione

Le salmonelle rappresentano la causa più frequente di intossicazione alimentare nel mondo, nonostante le numerose misure preventive adottate per tenere sotto controllo tali organismi. Uova, prodotti lattiero-caseari, carne e pollame sono gli alimenti più comunemente associati alla trasmissione di *Salmonella* (65% dei casi). Sono stati identificati più di 2.500 sierotipi, tutti potenzialmente patogeni per l'uomo. A causa della bassa dose infettiva e della grave minaccia posta a produttori e consumatori di alimenti, attualmente diversi paesi richiedono la totale assenza di *Salmonella* nei prodotti alimentari.

I metodi di coltura convenzionali sono spesso lunghi e noiosi. Il kit EZ-Check *Salmonella* spp, in confronto, è un test qualitativo semplice e rapido che consente la rilevazione di sequenze di DNA specifiche di *Salmonella* spp. ritrovate in prodotti alimentari, mangimi per animali e campioni ambientali. Mediante la PCR real-time, le sequenze specifiche di DNA di *Salmonella* spp. vengono amplificate e rilevate simultaneamente tramite sonde fluorescenti. Si possono processare contemporaneamente fino a 96 campioni, con un rischio minimo di contaminazione e una procedura intuitiva. Questo kit è destinato al personale di laboratorio qualificato, incaricato di eseguire test per la rilevazione di *Salmonella* spp. I risultati del test si ottengono entro poche ore dall'arricchimento del campione.

Sezione 3

Tecnologia EZ-Check *Salmonella* spp.

Il EZ-Check *Salmonella* spp. Kit deve essere utilizzato con EZ-Check Lysis Kit (catalogo #12018075).

Il EZ-Check *Salmonella* spp. Kit è un test basato sull'amplificazione e sulla rilevazione genica mediante PCR real-time.

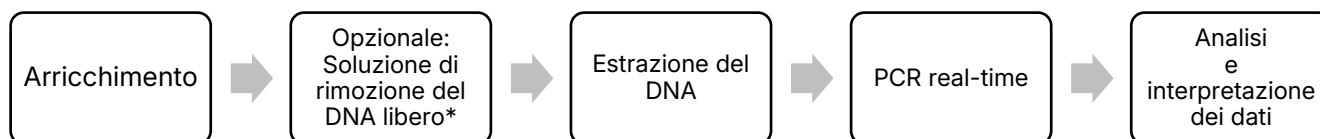
I reagenti liofilizzati PCR pronti all'uso inclusi nel kit contengono oligonucleotidi (primer e sonde) specifici per *Salmonella* spp., oltre a DNA polimerasi e nucleotidi. La rilevazione e l'analisi dei dati vengono ottimizzate per l'utilizzo tramite uno strumento PCR real-time di Bio-Rad, come il sistema di rilevazione mediante CFX Opus 96, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well e CFX Duet.

La PCR è una tecnica di grande efficacia impiegata per generare molteplici copie di DNA target. Durante la reazione PCR, diversi cicli di riscaldamento e raffreddamento consentono la denaturazione del DNA per mezzo del calore, con successivo appaiamento dei primer ad una regione target specifica. La DNA polimerasi si serve di tali primer e deossinucleosidi trifosfati (dNTP) per estendere il DNA, creando copie del DNA target. Queste copie vengono denominate ampliconi.

Nella PCR real-time, vengono utilizzate specifiche sonde per rilevare il DNA durante la fase di amplificazione tramite ibridazione degli ampliconi. Queste sonde sono legate a un fluoroforo che emette fluorescenza solo se ibridato alla sequenza target. FAM è il fluoroforo legato alla sonda ibridata alla sequenza specifica di DNA di *Salmonella* spp. In assenza di DNA target, non viene rilevata alcuna fluorescenza. Man mano che il numero di ampliconi cresce ad ogni ciclo di amplificazione, l'intensità della fluorescenza aumenta a sua volta. Il modulo ottico misura questa fluorescenza nella fase di appaiamento durante ogni ciclo PCR, mentre il software associato traccia l'intensità della fluorescenza rispetto al numero di cicli.

Nella miscela di reazione è incluso un DNA sintetico come controllo interno per la convalida degli eventuali risultati negativi. Il controllo viene amplificato con una sonda specifica simultaneamente rispetto alla sequenza di DNA target di *Salmonella* e viene rilevato da un secondo fluoroforo.

Questo test consente la rilevazione qualitativa di *Salmonella* spp. in un'ampia gamma di prodotti alimentari, mangimi per animali e campioni ambientali dopo una fase di arricchimento. Prevede le cinque fasi principali seguenti:



* Per le condizioni d'uso, fare riferimento al manuale utente di Free DNA Removal Solution (documento n. 10000253856).

Sezione 4

Componenti del kit

Il EZ-Check *Salmonella* spp. Kit contiene reagenti a sufficienza per l'esecuzione di 96 test.

ID reagente	Elemento	Descrizione	Quantità
RPS	EZ-Check <i>Salmonella</i> spp. ReadyPCR Strips*	Reagenti PCR pronti all'uso	12 strisce da 8 pozzetti
CAP	EZ-Check Tappi ottici	Tappi ottici	12 strisce da 8 tappi
NC	EZ-Check Controllo negativo	Controllo negativo PCR	1 provetta, 1,0 ml
PC	EZ-Check <i>Salmonella</i> spp. Controllo positivo	Controllo positivo PCR	1 provetta, 0,6 ml

*EZ-Check *Salmonella* spp. ReadyPCR strips Può essere identificato da linguette viola su ciascun lato delle strisce PCR. Gli indicatori di colore viola *Salmonella* sono visibili anche sulla confezione del kit e sul software IDE CFX Maestro.

Sezione 5

Durata e conservazione

- Il kit viene spedito a freddo
- Conservare i kit a 2-8°C
- Non congelare
- Non utilizzare reagenti oltre la data di scadenza indicata sulle etichette
- Dopo la prima apertura, ReadyPCR Strips sigillato nella busta con sostanza igroscopica e conservato a 2-8°C, rimane utilizzabile per un massimo di 5 mesi. La custodia può essere riaperta fino a 5 volte durante questo lasso di tempo

Sezione 6

Materiali necessari ma non forniti

Apparecchiatura e software

- Specifico per l'estrazione del DNA: Riscaldatore-agitatore* in grado di mantenere una temperatura di 95–100°C e/o $37 \pm 2^\circ\text{C}$, con una velocità di miscelazione di almeno 1.300 rpm (ad esempio, catalogo #3594995 e catalogo #12022466)
- Sistema PCR real-time di Bio-Rad*, ad esempio i sistemi PCR real-time CFX Opus 96 (catalogo #17007991) o CFX Opus Deepwell (catalogo #17007992) o CFX Duet (catalogo #17010275)
- iQ-Check Prep System* (catalogo #3594911)
- Pipetta multicanale regolabile da 20–200 µL (catalogo #17010702) e/o pipetta singola da 20–200 µL (catalogo #17010259)
- EZ-Check Lysis Rack (catalogo #12019781)
- EZ-Check Telaio PCR (n. catalogo 12019771)

Sezione 6

Materiali necessari ma non forniti

- CFX Maestro Software, Industrial Diagnostic Edition, versione 4.0 (catalogo n. 3593893)
- Omogeneizzatore da laboratorio per i campioni dei test
- Incubatore per l'arricchimento microbiologico dei campioni

Nota: Con il termociclatore e i sistemi iQ-Check Prep si consiglia di utilizzare un gruppo di continuità (UPS).

* Per informazioni sugli strumenti raccomandati, contattare il Supporto Tecnico di Bio-Rad.

Materiali

- EZ-Check Lysis Kit (n. catalogo 12018075, 96 test)
- Terreno di arricchimento: Acqua peptonata tamponata, ad esempio
BPW Plus
catalogo 3564684, disidratato, 500 g
catalogo 3554179, flaconi da 225 ml x 6
catalogo 3555795, 3 L x 4 sacchi
Catalogo 3555790, 5 L x 2 sacche
BPW Standard
Catalogo 12013259, disidratato, 500 g
Catalogo 12013258, disidratato, 5 kg
Catalogo 12013260, 5 L x 2 sacche
- RAPID'Salmonella Agar (catalogo #3563961, 90 mm x 20 piastre petri; 3563963 90 mm x 120 piastre petri; 3564705, in forma disidratata, 500 g)
- Free DNA Removal Solution (catalogo #3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (catalogo #12012383)
- PIF Supplement (catalogo #12013322, 2 g)
- Micropiastra a pozzetti profondi da (catalogo #3594900)
- Puntali per pipette sterili compatibili con filtro adattabili a pipette da 5-50 µL o 20-200 µL (ad esempio, catalogo #17010688)
- Tappi di conservazione per lisi EZ-Check (catalogo #12022880)
- Strumento di chiusura PCR (catalogo #ECT2000)
- Sacchetti filtranti
- Acqua distillata sterile
- Candeggina, 5% e decontaminante superficiale
- Guanti senza polvere

Forniture per il sistema iQ-Check Prep

- Provette da 2 ml per Free DNA Removal Solution (catalogo #17010255)
- Micropiastra a pozzetti profondi da (catalogo #3594900)
- Puntali con filtro conduttivo (catalogo #12022468, 300 µL x 5760)
- Contenitore per la diluizione da 60 mL (catalogo #12014473)

Sezione 7

Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali

- Esclusione di responsabilità: Per i nostri termini e condizioni di vendita standard, incluse eventuali esclusioni di responsabilità, visitare il sito Web <https://www.bio-rad.com/en-us/terms-conditions>
- Prima di utilizzare il metodo, leggere interamente la presente guida utente e i relativi reagenti, strumenti e software
- Il presente test deve essere eseguito da personale addestrato
- I campioni e le colture di arricchimento devono essere manipolate come materiali potenzialmente infetti ed eliminati nel rispetto delle direttive e normative locali
- Tutti i materiali potenzialmente infettivi devono essere collocati in autoclave prima dello smaltimento e sterilizzati
- La qualità dei risultati si basa sulla rigorosa osservanza della buona pratica di laboratorio (ad esempio, la norma EN ISO 7218), soprattutto in materia di microbiologia e PCR:
 - Non spostare mai apparecchiature da laboratorio (pipette, provette, ecc.) da una postazione di lavoro all'altra
 - Utilizzare sempre un controllo positivo e un controllo negativo per ogni serie di reazioni di amplificazione
 - Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza
 - Agitare e centrifugare i controlli positivi e negativi del kit prima di utilizzarli per garantire l'omogeneità
 - Verificare periodicamente l'accuratezza e la precisione delle pipette, nonché il corretto funzionamento degli strumenti
 - Cambiare i guanti di frequente, in particolare se si sospetta contaminazione
 - Pulire gli spazi di lavoro periodicamente con candeggina al 5% e altri prodotti decontaminanti
 - Utilizzare guanti senza polvere e non lasciare impronte digitali e scritte sui tappi delle provette. Entrambi interferiscono con l'acquisizione dei dati
- Si consiglia vivamente di osservare i requisiti generali illustrati nella norma EN ISO 22174 (Microbiologia di alimenti e mangimi per animali — Reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca dei microrganismi patogeni degli alimenti — Requisiti generali e definizioni)
 - Per maggiori informazioni relative alle normative locali in materia di smaltimento, consultare la scheda di sicurezza

Sezione 7

Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali

- Per i campioni ambientali, i dispositivi di raccolta dei campioni devono essere idratati con un diluente sterile (ad esempio, acqua peptonata tamponata) e, se necessario, con una soluzione neutralizzante (ad esempio, HiCap Neutralizing Broth, Dey-Engley Neutralizing Broth, Lethen Broth) per inattivare gli effetti del disinfettante. Si consiglia di evitare tamponi neutralizzanti contenenti complesso di solfonato di arile nella soluzione idratante
- Dopo aver rimosso la sigillatura del ReadyPCR strips, assicurarsi che le provette siano posizionate nello strumento CFX entro 4 hr. Una volta che il reagente PCR liofilizzato è idratato, la miscela PCR risultante è stabile a 18-25°C
- Quando si utilizza il sistema per PCR in tempo reale CFX, bilanciare sempre le strisce di provette per garantire che il coperchio riscaldato applichi una pressione uniforme sul blocco
- Si consiglia sempre di eseguire studi di verifica dell'idoneità allo scopo o della matrice prima di utilizzare questo metodo
- Maneggiare i reagenti EZ-Check come materiale potenzialmente pericoloso sotto almeno il livello di biosicurezza 2

Sezione 8 Protocollo

Si raccomanda vivamente di leggere l'intero protocollo prima di iniziare il test.

A. Arricchimento del campione

Equilibrare i brodi di arricchimento a temperatura ambiente (20–25°C) prima dell'uso.

Per tempi di arricchimento pari o inferiori a 10 hr, riscaldare il brodo di arricchimento alla temperatura di incubazione del campione prima dell'uso. I tempi di arricchimento breve sono sensibili alle condizioni di incubazione, pertanto è necessario rispettare rigorosamente le temperature indicate. La durata della preparazione del campione (tempo intercorrente tra il preriscaldamento del brodo di arricchimento e l'inizio dell'incubazione del campione alimentare) non deve superare i 45 min. Si consiglia l'uso di un incubatore ventilato.

Scongelare completamente i campioni congelati prima dell'uso.

Si consiglia vivamente di utilizzare un sacco di arricchimento con filtro incorporato.

L'uso dell'alfa-amilasi è raccomandato per l'arricchimento di cereali e prodotti a base di amido come descritto nello standard ISO 6887-4.

Nell'ambito della certificazione NF VALIDATION, la preparazione dei campioni può essere effettuata con o senza il rispetto delle norme ISO 6887-2 fino a -6. Se non indicato, le aliquote di peso superiore a 25 g non sono state analizzate. Incubare senza agitare rispettando i tempi e le temperature indicati nella tabella.

La tabella seguente riporta i diversi protocolli utilizzabili, a seconda dell'applicazione e dell'oggetto della validazione.

I campioni arricchiti possono essere conservati a 2-8°C per 72 hr prima di eseguire la fase di lisi EZ-Check.

AOAC		
Oggetto (matrici) ^{1,2}	Preparazione dei campioni	Arricchimento
Insalata gastronomica	<ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare 25 g o 25 ml di campione 1 min in 225 ml di BPW 	Incubare per 18–26 hr a 37 ± 1°C
Lattuga romana	<ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare 375 g di campione 1 min in 1.125 ml di BPW preriscaldato (42 ± 1°C) 	Incubare per 10–24 hr a 42 ± 1°C
Miscela di verdure surgelate, germogli di soia, melone cantalupo tagliato fresco	<ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare 375 g di campione 1 min in 1.125 ml di BPW preriscaldato (37 ± 1°C) 	Incubare per 18–22 hr a 37 ± 1°C
Formaggio Cheddar, cacao in polvere	<ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare 375 g di campione 1 min in 1.125 ml di BPW 	Incubare per 18–22 hr a 37 ± 1°C
Latte secco non grasso, proteine del siero di latte in polvere, farina multiuso, latte in polvere per neonati con probiotici	<ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare 375 g di campione 1 min in 1.125 ml di BPW con PIF Supplement 	Incubare per 18–26 hr a 37 ± 1°C
Burro di arachidi cremoso	<ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare 375 g di campione 1 min in 1.125 ml di BPW preriscaldato (42 ± 1°C) 	Incubare per 18–24 hr a 42 ± 1°C
Aglione in polvere	<ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare 375 g di campione 1 min in preriscaldato (37 ± 1°C) 3.000 ml di BPW + K₂SO₃ 0,5 % 	Incubare per 18–26 hr a 37 ± 1°C
Tacchino crudo macinato, petto di pollo crudo	<ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare 375 g di campione 1 min in 1.125 ml di BPW preriscaldato (42 ± 1°C) Omogeneizzare 325 g di campione 1 min in 1.625 ml di BPW 	Incubare per 8–22 hr a 42 ± 1°C Incubare per 20–24 hr a 35 ± 2°C
Carne cruda macinata, carne di maiale cruda macinata	<ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare 375 g di campione 1 min in 1.125 ml di BPW preriscaldato (42 ± 1°C) Omogeneizzare 325 g di campione 1 min in 975 ml di mTSB 	Incubare per 8–22 hr a 42 ± 1°C (375 g) Incubare per 15–24 hr a 42 ± 1°C (325 g)
Risciacquo della carcassa di pollo	<ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare 30 ml di risciacquo della carcassa 30 ml di BPW preriscaldato (37 ± 1°C) Omogeneizzare 30 mL di risciacquo della carcassa in 30 mL di BPW 	Incubare per 18–22 hr a 37 ± 1°C Incubare per 20–24 hr a 35 ± 2°C
Panno per campionamento di carni bovine crude, panni per campionamento	<ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare 1 min in 200 ml di BPW o mTSB preriscaldato (42 ± 1°C) 	Incubare per 8–22 hr a 42 ± 1°C (PBW) Incubare per 15–24 hr a 42 ± 1°C (mTBS)
Cibo secco per cani	<ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare 375 g di campione 30 sec in 1.125 ml di BPW 	Incubare per 18–26 hr a 37 ± 1°C
Acciaio inox, calcestruzzo sigillato, superfici ambientali in gomma	<ul style="list-style-type: none"> Inumidire tamponi e spugne con HiCap Neutralizing Broth Omogeneizzare i tamponi a mano per 30 sec 10 ml di BPW Omogeneizzare le spugne 30 sec a mano 60 ml di BPW 	Incubare per 18–24 hr a 37 ± 1°C

¹La validazione include la piastratura diretta sulle piastre per *Salmonella* RAPID¹.

²Se il campione mostra inibizione della PCR, procedere con un nuovo test o con una diluizione di 1 su 10 in acqua distillata sterile. Se l'inibizione della PCR è ancora presente, utilizzare il iQ-Check Purification Reagent trattamento o una diluizione di acqua distillata sterile di 1 su 50 (sono necessari ulteriori test di verifica).

Certificazione NF		
Oggetto (matrici) ¹	Preparazione dei campioni	Arricchimento
Tutti gli alimenti umani, i mangimi per animali, i campioni ambientali	<ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare 25 g o 25 ml di campione 1 min in 225 ml di BPW 	Incubare per 18–26 hr a 37 ± 1°C
Superfici ambientali	<ul style="list-style-type: none"> Bagnare leggermente i tamponi e le spugne con un brodo neutralizzante che non contenga un complesso di aril solfonato Omogeneizzare i tamponi a mano per 30 sec 10 ml di BPW Omogeneizzare le spugne 30 sec a mano 60 ml di BPW 	Incubare per 18–26 hr a 37 ± 1°C
Prodotti a base di cacao e cioccolato ² (fino a 375 g)	<ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare n g di campione alimentare in 9 x n ml di BPW preriscaldato (41,5 ± 1°C) (375 g in 1.125 mL) 	Incubare per 18–26 hr a 41,5 ± 1°C
Prodotti lattiero-caseari trattati a caldo ³ (fino a 375 g)	<ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare n g di campione in 9 x n mL di BPW preriscaldato (37 ± 1°C) (375 g in 3.375 mL) 	Incubare per 18–26 ore a 37 ± 1°C
Prodotti a base di carne cruda e pollame (fino a 375 g)	<ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare n g di campione in 3 x n mL di BPW preriscaldato (41,5 ± 1°C) (375 g in 1.125 mL) 	Incubare per 8–26 ore a 41,5 ± 1°C

¹Se il campione mostra inibizione della PCR, procedere con un nuovo test o con una diluizione di 1 su 10 in acqua distillata sterile. Se l'inibizione della PCR è ancora presente, utilizzare il iQ-Check Purification Reagent trattamento o una diluizione di acqua distillata sterile di 1 su 50 (sono necessari ulteriori test di verifica).

²Eeguire una diluizione obbligatoria di 1 su 10 sul campione arricchito con sale triptone dopo l'incubazione prima di procedere alla fase di estrazione del DNA. Se l'estratto di DNA mostra inibizione della PCR, procedere con un nuovo test o utilizzare il iQ-Check Purification Reagent trattamento o una diluizione 1 su 10 (nell'ambito della certificazione NF). Il Free DNA Removal Solution non è stato valutato per questa categoria.

³Per ridurre l'inibizione della PCR per il tipo di alimento ingrediente, diluire l'estratto di DNA 1 su 10 in acqua distillata sterile. Se l'inibizione della PCR è ancora presente, utilizzare un rapporto di diluizione maggiore (p. es. diluizione 1 su 50 in acqua distillata sterile, sono necessari ulteriori test di verifica).

B. Trattamento per la rimozione del DNA libero (fase opzionale)

Il Free DNA Removal Solution rappresenta un metodo ottimale per la rimozione del DNA libero.

1. Dispensare 10 µL di soluzione attivata Free DNA Removal Solution in tanti pozzetti di una micropiastra a pozzetti profondi vuota quanti sono i campioni da analizzare.
2. Aggiungere 100 µL di campione arricchito decantato per ogni pozzetto.

Nota: Per evitare detriti di matrice o strati di grasso, pipettare appena sotto lo strato di grasso e sopra eventuali detriti sul fondo della provetta.

3. Incubare la micropiastra a pozzetti profondi sigillata nell'agitatore termico SENZA agitare ad una temperatura di 37 ± 2 °C per 15-30 min
4. Procedere al EZ-Check Lysis protocollo utilizzando 25 µl di campione arricchito trattato con EZ-Check Lysis Kit.

Per ulteriori informazioni, consultare la Guida per l'utente per la rimozione del DNA gratuito (documento #100000253856).

C. Sistema iQ-Check Prep (opzionale)

Il sistema iQ-Check Prep viene utilizzato per automatizzare il flusso di lavoro EZ-Check, incluso il trattamento opzionale per la rimozione del DNA libero, l'estrazione del DNA e la configurazione della piastra PCR in tempo reale.

1. Aprire il software CFX Maestro IDE e selezionare il protocollo di dosaggio "EZ Salmo" dal menu.
2. Assegnare i tipi di campione a ciascun pozzetto della vista piastra selezionando Sconosciuto, Controllo positivo o Controllo negativo.
3. Configurare le opzioni richieste per ciascun pozzetto (p. es.: FDRS, diluizione).
4. Fare clic su "Invia a iQ-Check Prep" per esportare la lista di lavoro.
5. Trasferire un minimo di 500 µL di campione arricchito nel pozzetto appropriato di una piastra a pozzetti profondi o nelle provette secondo il layout della piastra.
6. Aprire il software iQ-Check Prep sul computer dello strumento.
7. Caricare la lista di lavoro trasferita nel passaggio 4.
8. Seguire le istruzioni per caricare manualmente i materiali di consumo (puntali, piastre), i reagenti e i campioni preparati.
9. Avviare il ciclo.
10. Al termine dell'esecuzione, rimuovere la piastra PCR e sigillare ermeticamente le strisce con i tappi ottici EZ-Check.
11. Posizionare il telaio PCR EZ-Check nel termociclatore. Accertarsi di posizionare la piastra con il pozzetto A1 nell'angolo superiore sinistro e chiudere il coperchio dello strumento.

Per ulteriori informazioni, fare riferimento alle guide per l'utente CFX Maestro Industrial Diagnostic Edition e iQ-Check Prep System.

D. Estrazione del DNA

Raccomandazioni generali:

Utilizzare un'area dedicata, attrezzature e materiali di consumo per eseguire questa operazione.

Prima di iniziare il test, accendere il termoaggitatore con la funzione di preriscaldamento. Impostarlo su 95–100°C.

Di norma, evitare l'agitazione del sacco di arricchimento e la raccolta di grossi frammenti di residui alimentari. Per i campioni alimentari aventi un surnatante grasso, raccogliere il campione appena al di sotto di tale strato.

Per risultati ottimali, lasciare raffreddare le provette di lisi prima di pipettare l'estratto di DNA.

Protocolli per la lisi EZ-Check

1. Collocare il numero appropriato di provette per lisi EZ-Check (8 provette/strip) in EZ-Check Lysis Rack. Verificare che i tubi siano inseriti completamente nel EZ-Check Lysis Rack.
2. Picchiare delicatamente sul EZ-Check Lysis Rack banco di lavoro per far scendere sul fondo della provetta il reagente di lisi.
3. Staccare con cautela il sigillo in alluminio dalle provette di lisi.

Nota: Il reagente di lisi EZ-Check potrebbe presentare gocce sul lato interno del pozzetto. Non ha alcun effetto sulla qualità dell'estrazione.

4. Aggiungere 25 µL di campione arricchito alle provette di lisi. Se si utilizza la soluzione di rimozione del DNA libero, aggiungere 25 µL di campioni arricchiti trattati alle provette di lisi.
5. Incubare le strisce di lisi nel riscaldatore-agitatore sotto agitazione a 1.300 rpm per 15-20 min a 95-100°C.
6. Raffreddare le provette di lisi posizionando il EZ-Check Lysis Rack sul banco a temperatura ambiente per 10-30 min.

In questa fase il protocollo può essere messo in pausa e ripreso in un secondo momento.

- L'estratto di DNA può essere conservato sigillato per 7 giorni a 2-8°C direttamente nelle provette di lisi EZ-Check mediante i tappi di conservazione per lisi EZ-Check
- Per la conservazione congelata (-25°C, -15°C), l'estratto di DNA deve essere trasferito in una provetta separata e può essere conservato sigillato per un massimo di 30 giorni (al di fuori dell'ambito della validazione AOAC e della NF Validation)

E. PCR real-time

Installazione strumento e software

Per l'installazione dello strumento e del software, seguire le istruzioni contenute nel manuale utente del software CFX Maestro, Industrial Diagnostic Edition (IDE).

Preparazione al rilevamento di PCR

1. Aprire la EZ-Check *Salmonella* spp. ReadyPCR Strips custodia.
2. Rimuovere il numero totale richiesto di provette (numero di campioni più due controlli) dalla busta in alluminio.

Nota: Risigillare correttamente le provette inutilizzate nella busta con la sostanza igroscopica all'interno

3. Posizionare il ReadyPCR Strips sul supporto PCR EZ-Check assicurandosi che le provette siano fissate saldamente. Si consiglia di picchiare delicatamente il supporto PCR EZ-Check sul bancone per assicurarsi che le biglie si trovino sul fondo dei pozzetti PCR.

4. Staccare con cautela il sigillo in alluminio da ogni singola provetta e controllare visivamente la presenza di una biglia PCR per pozzetto. Una volta aperto, ReadyPCR strips è stabile fino a 4 hr prima di essere reidratato.
5. Trasferire con cautela 25 µL di estratto di DNA lungo la parete interna di ciascun pozzetto del ReadyPCR Strips secondo la configurazione della piastra. Non aspirare l'estratto di DNA dal fondo della provetta di lisi per evitare di trasferire gli inibitori della PCR nel pozzetto PCR.

Nota: Una reazione di effervescenza indica che il campione è stato correttamente aggiunto al reagente PCR.

6. Per i controlli negativi e positivi, trasferire 25 µL del EZ-Check controllo negativo (NC) e EZ-Check *della Salmonella* spp. Controllo positivo (PC) con cautela lungo la parete interna dei ReadyPCR pozzetti corrispondenti.

Nota: L'analisi PCR deve essere avviata entro le 4 hr successive all' ReadyPCR strip apertura.

7. Opzionale: Per purificare il DNA, combinare 50 µL di DNA estratto da ciascun campione con 200 µL di iQ-Check Purification Reagent. pipetta su e giù 5 volte per omogeneizzare. In alternativa, è possibile eseguire una diluizione 1:10 di DNA estratto utilizzando acqua sterile. Questa fase non è stata testata durante la certificazione DI VALIDAZIONE NF.
8. Sigillare ermeticamente i pozzetti delle provette PCR con i EZ-Check tappi ottici.
9. Posizionare il supporto EZ-Check nel termociclatore. Accertarsi di posizionare la piastra con il pozzetto A1 nell'angolo superiore sinistro e chiudere il coperchio dello strumento.

Preparazione del controllo di laboratorio (fase opzionale)

I controlli di laboratorio sono trattati come campioni alimentari. Vengono utilizzati per validare l'intero EZ-Check flusso di lavoro. Il DNA estratto dai controlli di laboratorio viene collocato nella piastra PCR e utilizzato come controlli PCR in sostituzione dei EZ-Check controlli negativi e positivi.

Per essere valido, il controllo negativo di laboratorio non deve contenere *Salmonella* spp. DNA. Per essere valido, il controllo positivo in laboratorio deve contenere DNA di *Salmonella* spp. amplificato con valori CQ tra 26 e 36. Vedere il manuale utente del software CFX Maestro Industrial Diagnostic Edition (IDE) (documento #10000241897).

L'utente finale è responsabile della realizzazione e dell'attuazione di controlli di laboratorio appropriati. La validità e l'affidabilità di EZ-Check *Salmonella* spp. i risultati dipendono dalla corretta verifica, validazione e preparazione di questi controlli preparati dall'utente.

Eeguire la PCR

Per avviare l'esecuzione PCR, seguire le istruzioni CFX Maestro, manuale utente del software IDE (DIR 10000241897).

F. Analisi dei dati

È possibile analizzare i dati direttamente al termine del ciclo PCR o in un secondo momento tramite l'apertura del file di dati memorizzato. Per aprire i file di dati e impostare i parametri dell'analisi, seguire le istruzioni contenute nel manuale utente del software CFX Maestro, IDE.

Interpretazione dei risultati

Dopo aver impostato i parametri dell'analisi dati, i risultati vengono interpretati analizzando i valori Cq di ogni campione (il ciclo nel quale la curva di amplificazione supera la soglia).

Il software CFX Maestro IDE consente l'analisi interamente automatizzata dei sistemi di rilevazione Bio-Rad mediante PCR real-time. È necessario eseguire una verifica delle caratteristiche tipiche della curva di amplificazione prima di rilasciare i risultati. Nel caso in cui sia necessario ulteriore supporto, contattare il proprio team di supporto tecnico Bio-Rad.

Controlli

Prima di interpretare i risultati dei campioni, verificare i controlli positivi e negativi.

Perché l'esperimento sia valido, i controlli devono rispettare i risultati seguenti, come riepilogato nella tabella sottostante. In caso contrario, la reazione PCR deve essere ripetuta.

	Rilevazione <i>Salmonella</i> spp. (canale FAM)	Rilevazione controllo interno (canale HEX)
Controllo negativo	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Controllo positivo	$26 \leq Cq \leq 36$	Non pertinente

* Il software indica un valore Cq di N/A (non applicabile) quando la fluorescenza di un campione non aumenta in maniera significativa sopra il rumore di fondo, non superando quindi la soglia.

Se i risultati dei controlli positivo e negativo differiscono da quelli indicati nella tabella sopra riportata (controllo non valido) ripetere il ciclo e l'analisi descritti nei paragrafi D. PCR real-time ed E. Analisi dei dati nel protocollo della Sezione 7.

Campioni

Un test di PCR **positivo EZ-Check *Salmonella* spp.** deve mostrare una curva di amplificazione tipica e un valore Cq ≥ 10 per il fluoroforo FAM.

- Se il valore Cq è inferiore a 10 per entrambi i canali, verificare che la curva dei dati non elaborati sia una curva di amplificazione regolare (con linea di base piatta, seguita da un rapido aumento esponenziale della fluorescenza e infine da un secondo appiattimento). Se la curva sembra corretta, potrebbe essere considerata come test positivo a *Salmonella* spp.

In assenza di valore Cq (Cq = N/A) per FAM, o se il risultato non è una tipica curva di amplificazione, il controllo interno per il campione in questione deve essere analizzato.

- Questo campione viene considerato come campione **negativo** a *Salmonella* spp. se non esiste un valore Cq per il canale FAM e il controllo interno ha un valore Cq ≥ 28
- Se il controllo interno non presenta a sua volta un valore Cq (Cq = N/A), ciò indica probabilmente un'inibizione della reazione PCR. È necessario diluire il campione (mediante 10 μ l di estratto di DNA, eseguire una diluizione 1:10 in acqua distillata sterile, quindi analizzare 25 μ l della diluizione) e ripetere la reazione PCR

- Se il valore Cq per il controllo interno è <28, l'interpretazione del risultato non sarà possibile. Verificare che la soglia sia posizionata correttamente o che la curva dei dati non elaborati sia una curva di amplificazione regolare. Se la curva non possiede una forma caratteristica, sarà necessario ripetere il test PCR

L'interpretazione dei risultati del test viene riepilogata nella tabella seguente:

Rilevazione <i>Salmonella</i> spp. (canale FAM)	Rilevazione controllo interno (canale HEX)	Interpretazione
Cq ≥ 10	N/A*	Positivo
Cq = N/A*	Cq ≥ 28	Negativo
Cq = N/A*	Cq = N/A*	Inibizione*

* Il software indica un valore Cq di N/A (non applicabile) quando la fluorescenza di un campione non aumenta in maniera significativa sopra il rumore di fondo, non superando quindi la soglia.

** Qualora la rilevazione produca un valore Cq = N/A sia per il target, sia per il controllo interno, l'estratto di DNA deve essere diluito in proporzione 1:10 e testato nuovamente.

È possibile fornire un'interpretazione non valida quando i criteri di validazione non vengono soddisfatti. Controllare i dati non elaborati e procedere come se il campione fosse inibito.

Sezione 9

Conferma dei risultati positivi

Nell'ambito della validazione AOAC, un risultato positivo di EZ-Check *Salmonella* spp. si presume essere positivo, ed è raccomandata la conferma in conformità a un metodo di riferimento opportuno (ad esempio, USDA MLG, FDA BAM, ISO, MFHPB, AOAC SMPR, ecc.). In alternativa, piastrare 10 µL di brodo di arricchimento direttamente RAPID'*Salmonella* Agar e incubare per 24 ± 2 hr a 37 ± 1°C. Nel caso in cui la flora interferente fosse elevata, trasferire 0,5 ml di coltura pre-aricchita in brodo di soia Rappaport Vassiliadis (RVS) da 10 ml e incubare per 24 ± 3 hr a 41,5 ± 1°C. Procedere con il piastramento di 10 µL di RVS arricchito a RAPID'*Salmonella* Agar. Fare riferimento al metodo di conferma descritto RAPID'*Salmonella* Agar nella guida dell'utente (documento #10000126748).

Nell'ambito del metodo certificazione NF, tutti i risultati positivi con il kit iQ-Check devono essere confermati come segue:

1. Mediante test classici descritti nei metodi standardizzati CEN o ISO (inclusa la purificazione) direttamente dal brodo di arricchimento BPW dopo l'arricchimento completo per 18-26 hr a 37°C.
2. In alternativa, strizzare 10 µL di brodo di arricchimento direttamente RAPID'*Salmonella* Agar e incubare per 24 ± 2 hr a 37 ± 1°C. quando la flora interferente potrebbe essere elevata, trasferire 0,1 ml di coltura pre-aricchita in brodo di soia Rappaport Vassiliadis (RVS) da 10 ml e incubare per 24 ± 3 hr a 41,5 ± 1°C. procedere con lo striscio di 10 µL di RVS arricchito a RAPID'*Salmonella* Agar. Le colonie tipiche sono confermate come descritto nel manuale utente RAPID'*Salmonella*.
3. Tramite qualunque metodo alternativo certificato dalla VALIDAZIONE NF in base a un principio diverso da quello impiegato nel test PCR EZ-Check *Salmonella*spp Kit. Il protocollo validato di questo secondo metodo deve essere seguito interamente, incluso l'arricchimento selettivo in terreno RVS, se necessario. Se questo passaggio è comune ad entrambi i metodi, la conferma viene effettuata dal brodo di arricchimento BPW.

Sezione 10
Conferma di singole colonie tramite il Kit EZ-Check

Nell'ambito della certificazione NF, è possibile conservare il BPW arricchito a 2-8°C per un massimo di 72 hr a seguito dell'incubazione a 37°C prima di eseguire la conferma.

In caso di risultati discrepanti tra il EZ-Check *Salmonella* spp. Kit e una qualunque delle opzioni di conferma sopraelencate, seguire i passaggi necessari al fine di garantire risultati validi.

Sezione 10

Conferma di singole colonie tramite il Kit EZ-Check

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit può essere utilizzato anche per la conferma di singole colonie isolate di *Salmonella* spp. su piastre agar (al di fuori dello scopo di validazione AOAC). Per le condizioni d'uso, fare riferimento al manuale utente di RAPID'*Salmonella* Agar (documento #10000126748).

1. Scegliere una colonia isolata da una piastra agar selettiva o non selettiva servendosi di uno stuzzicadenti, un'ansa sterile o altri prodotti di consumo adattati (ad esempio, un puntale per pipetta).
2. Sospendere nuovamente la colonia in 100 µl di acqua distillata sterile in una provetta microcentrifuga. Omogeneizzare tramite vortex.
3. Aggiungere 25 µL di sospensione direttamente al reagente PCR o alla soluzione di lisi EZ-Check e seguire il EZ-Check *Salmonella* spp. protocollo per l'interpretazione dei dati e dei risultati.

Sezione 11 Performance del test e validazioni

Il kit EZ-Check *Salmonella* spp. è specificamente indicato per la rilevazione del genere *Salmonella*.



BRD 07/27-07/25

ALTERNATIVE ANALYTICAL
METHODS FOR AGRIBUSINESS

<http://nf-validation.afnor.org>

Certificazione NF

Il EZ-Check *Salmonella* spp. Kit è certificato ai sensi della CERTIFICAZIONE NF come metodo alternativo rispetto a quello di riferimento ISO 6579 -1 (2017) per la rilevazione di *Salmonella* spp. in tutti i prodotti destinati al consumo umano e animale, nonché nei campioni ambientali. La validazione osserva il protocollo dello standard ISO 16140-2: 2016 e comprende l'utilizzo CFX Opus 96, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well e CFX Duet sistemi PCR Real-Time. L'uso della soluzione iQ-Check Free DNA Removal Solution è incluso nell'ambito della validazione per tutte le categorie validate, ad eccezione dei prodotti a base di cacao e cioccolato. L'uso del iQ-Check Prep System v5 è incluso nell'ambito della validazione per tutte le categorie validate. Il software associato è CFX Maestro Software IDE V4.0. L'"EZ Salmo" APF è validato per tutti i campioni. Numero di certificato: BRD 07/27-07/25. Fare riferimento al certificato disponibile sul sito web <http://nf-validation.afnor.org/en> per informazioni sulla validità.



Validazione AOAC

Il EZ-Check *Salmonella* spp. Kit è validato dall'istituto di ricerca AOAC ai sensi del PTM 082501 per l'individuazione della *Salmonella* spp. In insalata gastronomica¹ (25 g), carne di manzo macinata cruda² (375 g), tacchino macinato crudo² (375 g), petti di pollo crudi² (375 g), risciacquo della carcassa di pollo² (30 ml), carne di maiale macinata cruda 2 (375 g), latte secco non grasso¹ (375 g), proteine del siero di latte in polvere¹ (375 g), farina 00 (375 g), formaggio cheddar¹ (375 g), lattuga romana¹ (375 g), miscela vegetale congelata¹ (375 g), cantalupo fresco¹ (375 g), cacao in polvere¹ (375 g), burro di arachidi cremoso¹ (375 g), alimenti secchi per cani¹ (375 g), latte in polvere per lattanti con probiotici 1 (375 g), aglio in polvere 1 (375 g), germogli di soia¹ (375 g), panno per campionamento di carni bovine grezze², superficie in acciaio inossidabile¹ (4" x 4", spugna), superficie in gomma¹ (1" x 1", tampone), superficie in calcestruzzo sigillato¹ (4" x 4", spugna). Un risultato positivo con il kit EZ-Check deve essere considerato come presunto, si raccomanda pertanto di effettuare la conferma come da precedente Sezione 9. L'APF "EZ Salmo", l'uso di Free DNA Removal Solution, e l'uso di CFX Opus Standard, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well, e i CFX Duet sistemi PCR in tempo reale sono validati per tutti i campioni. Il software associato è CFX Maestro IDE Software (versione 4.0 e successive).

¹ Testato in base al metodo di riferimento FDA BAM Ch. 5

² Testato in base al metodo di riferimento USDA MLG 4,15

Sezione 12

Riferimenti

ISO 7218. Microbiology of the food chain — General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 6887. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1 – 6.

ISO 6579-1. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp.

ISO 16140-2. Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2024). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 4.15: Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Siluriformes (Fish) Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2024). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 5: *Salmonella*.

Per maggiori informazioni, visitare il sito bio-rad.com/EZCheck.

Bio-Rad è un marchio registrato di Bio-Rad Laboratories, Inc. in determinate giurisdizioni.
Tutti i marchi registrati qui utilizzati sono di proprietà dei rispettivi titolari.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

EZ-Check™ *Salmonella* spp. Kit

Guia do usuário

Teste para a detecção por PCR em tempo real de *Salmonella* spp. em amostras de produtos alimentícios destinados ao consumo humano, ração animal e amostras ambientais

Nº do catálogo 12018082

Somente para uso em laboratório *in vitro*



Índice

Seção 1 Histórico de revisão	3
Seção 2 Introdução	3
Seção 3 A tecnologia EZ-Check <i>Salmonella</i> spp.	4
Seção 4 Componentes do Kit	5
Seção 5 Prazo de validade e armazenamento	5
Seção 6 Materiais necessários, mas não fornecidos	5
Seção 7 Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados	6
Seção 8 Protocolo	8
A. Enriquecimento da amostra.....	8
B. Tratamento de remoção de DNA livre (etapa opcional)	10
C. iQ-Check Prep System (opcional)	11
D. Extração de DNA	11
E. PCR em Tempo Real.....	12
F. Análise de dados.....	13
Seção 9 Confirmação de resultados positivos	15
Seção 10 Confirmação de colônias únicas usando o kit EZ-Check	16
Seção 11 Desempenho e validação do teste	17
Seção 12 Referências	18

Seção 1 Histórico de revisão

Data de publicação	Número/versão do documento	Alteração
Julho de 2025	Bulletin 5145 Ver A	Novo documento
Agosto de 2025	Bulletin 5145 Ver B	- Aprovação AOAC - Edição do conteúdo
Outubro de 2025	Bulletin 5145 Ver C	- Extensão da NF Validation: Produtos de cacau e chocolate, até 375 g, Sistema iQ-Check Prep - Edição do conteúdo
Abril de 2026	Boletim 5145 Ver D	- Extensão da NF Validation: Fórmulas infantis e cereais com/sem probióticos e ingredientes associados até 375 g, produtos lácteos processados termicamente até 375 g, produtos de carnes e aves cruas até 375 g - Correção do protocolo de confirmação da NF Validation: O volume de enriquecimento foi modificado para 0,1 mL em RVS, em enriquecimento secundário - Edição do conteúdo

Seção 2 Introdução

Salmonellae são as mais frequentes causas de envenenamento alimentar no mundo, apesar das diversas medidas preventivas tomadas para controlar esses organismos. Ovos, produtos lácteos, carne bovina e de aves domésticas são os alimentos mais comumente associados à transmissão de *Salmonella* (65% dos casos). Foram identificados mais de 2.500 sorotipos, sendo todos eles potencialmente patogênicos para humanos. Por causa da baixa dose infecciosa e da séria ameaça imposta aos produtores e consumidores de alimentos, vários países agora exigem ausência total de *Salmonella* em produtos alimentícios.

Os métodos de cultura clássicos são, muitas vezes, longos e entediante. O kit EZ-Check *Salmonella* spp., em comparação, é um teste qualitativo simples e rápido que permite a detecção de sequências de DNA específicas da *Salmonella* spp. encontradas em produtos alimentícios, ração animal e amostras ambientais. Utilizando PCR de tempo real, as sequências de DNA específicas de *Salmonella* spp. são amplificadas e detectadas simultaneamente através de sondas fluorescentes. Podem ser processadas 96 amostras de uma vez, com risco mínimo de contaminação e um procedimento fácil de usar. Os usuários pretendidos deste kit são profissionais qualificados de laboratório que estão desempenhando testes para detectar *Salmonella* spp. O uso deste teste permite que resultados sejam obtidos em algumas horas após enriquecimento de uma amostra.

Seção 3

A tecnologia EZ-Check *Salmonella* spp.

O EZ-Check *Salmonella* spp. Kit deve ser usado com o EZ-Check Lysis Kit (nº do catálogo 12018075).

O EZ-Check *Salmonella* spp. Kit é baseado na amplificação de genes e detecção por PCR em tempo real.

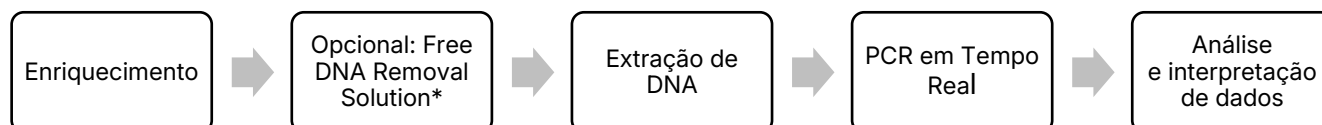
Os reagentes de PCR liofilizados e prontos para uso do kit contêm oligonucleotídeos (iniciadores e sondas) específicos para *Salmonella* spp., bem como DNA-polimerase e nucleotídeos. A detecção e a análise de dados são otimizadas para uso com um equipamento de PCR em tempo real da Bio-Rad, como os sistemas de detecção PCR em tempo real CFX Opus 96, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well e CFX Duet.

A PCR é uma poderosa técnica utilizada para gerar muitas cópias do DNA alvo. Durante a reação de PCR, os vários ciclos de aquecimento e resfriamento permitem a desnaturação do DNA, seguido pelos primers ligando-se à região-alvo. O DNA-polimerase utiliza esses primers e desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) para estender o DNA, criando cópias do DNA-alvo. Essas cópias se chamam amplicons.

Na PCR em tempo real, sondas específicas são usadas para detectar o DNA durante a etapa de amplificação por meio da hibridização com os amplicons. Estas sondas estão ligadas a um fluoróforo, que apresenta fluorescência apenas quando hibridizado à sequência-alvo. O FAM é o fluoróforo ligado às sondas que estão hibridizando nas sequências de DNA exclusivas da *Salmonella* spp. Na ausência de DNA-alvo, não será observada fluorescência. Como o número de amplicons aumenta em cada rodada de amplificação, a intensidade da fluorescência aumenta também. O módulo óptico mede essa fluorescência em cada ciclo de PCR, na fase de hibridização (annealing), e o software associado plota a intensidade da fluorescência em função do número de ciclos.

Um controle interno de DNA sintético é incluído na mistura da reação para validar quaisquer possíveis resultados negativos. Este controle é amplificado com uma sonda específica ao mesmo tempo que a sequência-alvo de DNA de *Salmonella*, e é detectado por um segundo fluoróforo.

Esse teste permite a detecção qualitativa de *Salmonella* spp. em uma ampla gama de produtos alimentícios, ração animal e amostras ambientais após etapa de enriquecimento. Inclui as cinco etapas principais seguintes:



* Consulte, no guia do usuário do Free DNA Removal Solution (documento nº 10000253856), as condições de uso.

Seção 4

Componentes do Kit

O EZ-Check *Salmonella* spp. Kit contém reagentes suficientes para 96 testes.

ID do reagente	Item	Descrição	Quantidade
RPS	EZ-Check <i>Salmonella</i> spp. ReadyPCR Strips*	Reagentes PCR prontos para utilizar	12 tiras de 8 poços
CAP	EZ-Check Tampas ópticas	Tampas ópticas	12 tiras de 8 tampas
NC	EZ-Check Controle negativo	Controle de PCR negativo	1 tubo 1,0 ml
PC	EZ-Check <i>Salmonella</i> spp. Controle positivo	Controle de PCR positivo	1 tubo 0,6 ml

*O EZ-Check *Salmonella* spp. ReadyPCR strips pode ser identificado pelas abas roxas em cada lado das tiras de PCR. Os indicadores de cor roxa para *Salmonella* também são visíveis na embalagem do kit e no software CFX Maestro IDE.

Seção 5

Prazo de validade e armazenamento

- O kit é enviado refrigerado.
- Armazenar os kits a 2–8 °C.
- Não congelar
- Não utilize reagentes após a expiração de suas datas de validade impressas no rótulo.
- Após a primeira abertura, o ReadyPCR Strips vedado na embalagem com dessecante e armazenado entre 2 e 8 °C permanece utilizável por até 5 meses. A bolsa pode ser reaberta até 5 vezes durante este período.

Seção 6

Materiais necessários, mas não fornecidos

Equipamentos e software

- Específico para extração de DNA: Agitador-aquecedor* capaz de manter 95–100 °C e/ou 37 ±2 °C, com uma velocidade de mistura de pelo menos 1.300 rpm (por exemplo, catálogo nº 3594995 e catálogo nº 12022466)
- Sistema de PCR em tempo real da Bio-Rad*; por exemplo, os sistemas de PCR em tempo real CFX Opus 96 (nº do catálogo 17007991), CFX Opus Deepwell (nº do catálogo 17007992) ou CFX Duet (nº do catálogo 17010275)
- iQ-Check Prep System* (Nº do catálogo 3594911)
- Pipeta multicanal ajustável de 20 a 200 µL (nº de catálogo 17010702) e/ou pipeta simples de 20 a 200 µL (nº de catálogo 17010259)
- EZ-Check Lysis Rack (nº do catálogo 12019781)
- EZ-Check PCR Frame (nº do catálogo 12019771)

Seção 7

Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados

- CFX Maestro Software, Industrial Diagnostic Edition, versão 4.0 (nº do catálogo 3593893)
- Liquidificador de laboratório para homogeneizar amostras de teste
- Incubadora para enriquecimento microbiológico de amostras

Nota: Recomendamos o uso de uma fonte de alimentação ininterrupta (UPS) com o termociclador e os sistemas iQ-Check Prep.

*Entre em contato com o suporte técnico da Bio-Rad para obter informações sobre os equipamentos recomendados.

Suprimentos

- EZ-Check Lysis Kit (Nº do catálogo 12018075, 96 testes)
- Meio de enriquecimento: Água peptonada tamponada, por exemplo
BPW Plus
nº do catálogo 3564684, desidratado, 500 g
nº no catálogo 3554179, 225 ml x 6 frascos
nº do catálogo 3555795, 3 L x 4 sacos
nº do catálogo 3555790, 5 L x 2 sacos
BPW Standard
nº do catálogo 12013259, desidratado, 500 g
nº do catálogo 12013258, desidratado, 5 kg
nº do catálogo 12013260, 5 L x 2 sacos
- RAPID'*Salmonella* Agar (nº do catálogo 3563961, 90 mm x 20 placas; 3563963 90 mm x 120 placas; 3564705, desidratado, 500 g)
- Free DNA Removal Solution (nº do catálogo 3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (nº do catálogo 12012383)
- PIF Supplement (nº do catálogo 12013322, 2 g)
- Microplaca Deep Well (nº do catálogo 3594900)
- Ponteiras de pipeta com filtro estéril compatíveis, adaptáveis a pipetas de 5-50 µL ou 20-200 µL (por exemplo, catálogo nº 17010688).
- EZ-Check Lysis Storage Caps (nº catálogo 12022880)
- Ferramenta de capeamento de PCR (catálogo nº ECT2000)
- Sacos de filtro
- Água destilada estéril
- Alvejante a 5% e descontaminante de superfícies
- Luvas sem talco

Suprimentos para o sistema iQ-Check Prep

- Tubos de 2 mL do Free DNA Removal Solution (nº do catálogo 17010255)
- Microplacas Deep Well (nº do catálogo 3594900)
- Ponteiras de filtro condutivas (nº do catálogo 12022468, 300 µL x 5760)
- Recipiente de diluição de 60 ml (nº do catálogo 12014473)

Seção 7

Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados

- Isenção de responsabilidade: Para consultar nossos termos e condições de venda padrão, incluindo quaisquer isenções de responsabilidade, acesse: <https://www.bio-rad.com/en-us/terms-conditions>

Seção 7

Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados

- Este guia do usuário e os respectivos guias de reagentes, equipamentos e softwares devem ser lidos na íntegra antes de utilizar o método.
- Este teste deve ser realizado por pessoal treinado
- Amostras e culturas de enriquecimento devem ser manuseadas como material potencialmente infeccioso e descartadas de acordo com as regras e regulamentos locais
- Todos os materiais potencialmente infecciosos devem passar por autoclavagem antes do descarte
- A qualidade dos resultados depende do estrito cumprimento das Boas Práticas de Laboratório (por exemplo, a norma EN ISO 7218), especialmente em relação a microbiologia e PCR:
 - Nunca circule equipamentos de laboratório (pipetas, tubos etc.) de uma estação de trabalho para outra
 - Sempre use um controle positivo e um controle negativo para cada série de reações de amplificação
 - Não utilize reagentes após a expiração de suas datas de validade
 - Agite os controles positivos e negativos do kit antes de utilizá-los, de modo a garantir a homogeneidade.
 - Verifique periodicamente a exatidão e precisão das pipetas, bem como o correto funcionamento dos equipamentos
 - Troque frequentemente de luvas, especialmente se suspeitar que estão contaminadas
 - Limpe os espaços de trabalho periodicamente com 5% de alvejante e outros agentes descontaminantes.
 - Utilize luvas sem talco e evite escrever ou deixar impressões digitais nas tampas dos tubos. Ambos interferem na aquisição de dados
- Recomenda-se fortemente o cumprimento dos requisitos gerais descritos na norma EN ISO 22174 "Microbiologia de alimentos para consumo humano e para alimentação animal – reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de patógenos alimentares – Requisitos e definições gerais" (Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food pathogens – General requirements and definitions)
 - Consulte a folha de dados de segurança para obter informações adicionais e regulamentos locais para descarte
- No caso de amostras ambientais, os dispositivos de coleta de amostras devem ser hidratados com um diluente estéril (por exemplo, água peptonada tamponada) e, se necessário, com uma solução neutralizante (por exemplo, HiCap Neutralizing Broth, Dey-Engley Neutralizing Broth, Lethen Broth) para inativar os efeitos do sanitizante. Recomenda-se evitar tampões neutralizantes que contenham complexo de sulfonato de arilo na solução hidratante.

- Após abrir a vedação do ReadyPCR strips, certifique-se de que as tiras sejam colocadas no equipamento CFX dentro de 4 horas. Uma vez hidratado o reagente de PCR liofilizado, a mistura de PCR resultante permanece estável entre 18 e 25 °C.
- Ao utilizar o sistema CFX Real time PCR, sempre equilibre as tiras de tubos para garantir que a tampa aquecida aplique pressão uniforme em todo o bloco.
- É sempre recomendável realizar estudos de adequação ao propósito ou de verificação matricial antes de utilizar este método.
- Manuseie os reagentes EZ-Check como material com possível risco biológico em condições de contenção de nível de biossegurança 2 ou superior.

Seção 8

Protocolo

É altamente recomendável ler o protocolo inteiro antes de iniciar o teste.

A. Enriquecimento da amostra

Equilibre os caldos de enriquecimento até temperatura ambiente (20–25 °C) antes do uso.

Para enriquecimento com até 10 horas de duração, aqueça o caldo de enriquecimento até a temperatura de incubação da amostra antes do uso. Os tempos de enriquecimento curto são sensíveis às condições de incubação, e as temperaturas indicadas devem ser rigorosamente respeitadas. A duração da preparação da amostra (tempo entre o preaquecimento do caldo de enriquecimento e o começo da incubação da amostra de alimento) não deve exceder 45 min. Recomenda-se o uso de uma incubadora ventilada.

Descongele completamente as amostras congeladas antes de utilizá-las.

O uso de um saco de enriquecimento com filtro incorporado é altamente recomendado.

O uso de amilase alfa é recomendado para cereais ou enriquecimento de produtos de amido conforme descrito na norma ISO 6887-4.

No escopo da validação certificação NF VALIDATION, as amostras podem ser preparadas observando ou não o disposto nas normas ISO 6887-2 a 6887-6. Caso não seja indicado, porções de teste pesando mais de 25 g não têm sido testadas. Incubar sem mexer de acordo com os tempos e as temperaturas indicados na tabela.

A tabela a seguir descreve os diferentes protocolos que podem ser usados, dependendo do aplicativo e do escopo da validação.

As amostras enriquecidas podem ser armazenadas com uma temperatura entre +2 e +8 °C por 72 horas antes de realizar a etapa de lise do EZ-Check.

AOAC		
Escopo (matrizes) ^{1,2}	Preparação da amostra	Enriquecimento
Saladas prontas	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneíze 25 g ou 25 ml de amostra 1 min em 225 ml de APT. 	Incubar por 18–26 hr a 37 ±1 °C
Alface-romana	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneíze 375 g de amostra 1 min em 1.125 ml de APT pré-aquecida (42 ±1 °C). 	Incubar por 10–24 hr a 42 ±1 °C
Mistura de vegetais congelados, brotos de feijão, melão-cantaloupe fresco cortado	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneíze 375 g de amostra 1 min em 1.125 ml de APT pré-aquecida (37 ±1 °C). 	Incubar por 18–22 hr a 37 ±1 °C
Queijo cheddar, cacau em pó	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneíze 375 g de amostra 1 min em 1.125 ml de APT. 	Incubar por 18–22 hr a 37 ±1 °C
Leite em pó desnatado, proteína de soro de leite em pó (whey), farinha de trigo, fórmula infantil com probióticos	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneíze 375 g de amostra 1 min em 1.125 ml de APT com PIF Supplement. 	Incubar por 18–26 hr a 37 ±1 °C
Manteiga de amendoim cremosa	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneíze 375 g de amostra 1 min em 1.125 ml de APT pré-aquecida (42 ±1 °C). 	Incubar por 18–24 hr a 42 ±1 °C
Alho em pó	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneíze 375 g de amostra 1 min em 3.000 ml de APT pré-aquecida (37 ±1 °C) e K₂SO₃ a 0,5%. 	Incubar por 18–26 hr a 37 ±1 °C
Peru moído cru, peito de frango cru	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneíze 375 g de amostra 1 min em 1.125 ml de APT pré-aquecida (42 ±1 °C). Homogeneíze 325 g de amostra 1 min em 1.625 ml de APT. 	Incubar por 8–22 hr a 42 ±1 °C Incubar por 20–24 hr a 35 ±2 °C
Carne bovina ou de porco moída e crua	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneíze 375 g de amostra 1 min em 1.125 ml de APT pré-aquecida (42 ±1 °C). Homogeneíze 325 g de amostra 1 min em 975 ml de mTSB. 	Incubar por 8–22 hr a 42 ±1 °C (375 g)
		Incubar por 15–24 hr a 42 ±1 °C (325 g)
Enxágue da carcaça de frango	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneíze 30 ml de enxágue de carcaça em 30 ml de APT pré-aquecida (37 ±1 °C). Homogeneíze 30 ml de enxágue de carcaça em 30 ml de APT. 	Incubar por 18–22 hr a 37 ±1 °C
		Incubar por 20–24 hr a 35 ±2 °C
Pano para amostragem de carne bovina crua, panos para amostragem	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneíze 1 min em 200 ml de APT pré-aquecida (42 ±1 °C) ou mTSB. 	Incubar por 8–22 hr a 42 ±1 °C (APT)
		Incubar por 15–24 hr a 42 ±1 °C (mTSB)
Ração seca para cães	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneíze 375 g de amostra 30 sec em 1.125 ml de APT. 	Incubar por 18–26 hr a 37 ±1 °C
Aço inoxidável, concreto selado, superfícies de borracha (amostras ambientais)	<ul style="list-style-type: none"> Swabs e esponjas umedecidos com HiCap Neutralizing Broth Homogeneíze swabs 30 sec à mão em 10 ml de APT. Homogeneíze swabs 30 sec à mão em 60 ml de APT. 	Incubar por 18–24 hr a 37 ±1 °C

¹ A validação inclui estriamento direto nas placas RAPID'*Salmonella*.

² Caso a amostra apresente inibição da PCR, realize um novo teste ou uma diluição de 1 em 10 em água destilada estéril. Caso a inibição da PCR ainda esteja presente, utilize o tratamento iQ-Check Purification Reagent ou uma diluição de 1 em 50 em água destilada estéril (testes de verificação adicionais são necessários).

NF Validation		
Escopo (matrizes) ¹	Preparação da amostra	Enriquecimento
Todos os alimentos humanos, rações e amostras ambientais	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneíze 25 g ou 25 ml de amostra 1 min em 225 ml de APT. 	Incubar por 18–26 hr a 37 ±1 °C
Superfícies ambientais	<ul style="list-style-type: none"> Umedeça os cotonetes e esponjas com um caldo neutralizante que não contenha complexo aril sulfonato Homogeneíze swabs 30 sec à mão em 10 ml de APT. Homogeneíze swabs 30 sec à mão em 60 ml de APT. 	Incubar por 18–26 hr a 37 ±1 °C
Produtos de cacau e chocolate ² (até 375 g)	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneíze n g de amostra em 9 x n mL de APT pré-aquecida (41,5 ±1 °C). (375 g em 1.125 mL) 	Incubar por 18–26 hr a 41,5 ±1 °C
Produtos lácteos processados termicamente ³ (até 375 g)	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneíze n g de amostra em 9 x n mL de APT pré-aquecida (37 ±1 °C) (375 g em 3.375 mL) 	Incubar por 18–26h a 37 ±1 °C
Produtos de carnes e aves cruas (até 375 g)	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneíze n g de amostra em 3 x n mL de APT pré-aquecida (41,5 ±1 °C) (375 g em 1.125 mL) 	Incubar por 8–26h a 41,5 ±1 °C

¹ Caso a amostra apresente inibição da PCR, realize um novo teste ou uma diluição de 1 em 10 em água destilada estéril. Caso a inibição da PCR ainda esteja presente, utilize o tratamento iQ-Check Purification Reagent ou uma diluição de 1 em 50 em água destilada estéril (testes de verificação adicionais são necessários).

² Realizar diluição 1:10 obrigatória na amostra enriquecida com sal de triptona após incubação antes de prosseguir para a etapa de extração de DNA. Caso o extrato de DNA apresente inibição da PCR, realize um novo teste ou utilize o tratamento iQ-Check Purification Reagent ou uma diluição de 1 em 10 (dentro do escopo da certificação NF VALIDATION). O Free DNA Removal Solution não foi avaliado nessa categoria.

³ Para reduzir a inibição da PCR para o tipo de alimento em questão, dilua o extrato de DNA na proporção de 1 em 10 em água destilada estéril. Caso a inibição da PCR ainda esteja presente, utilize uma proporção de diluição maior (p. ex., de 1 em 50 em água destilada estéril; (testes de verificação adicionais são necessários).

B. Tratamento de remoção de DNA livre (etapa opcional)

O Free DNA Removal Solution fornece uma maneira ideal de remover DNA livre.

1. Dispense 10 µL de solução ativada do Free DNA Removal Solution em tantos poços de uma microplaca de poços quantas amostras a serem analisadas.
2. Adicione 100 µL da amostra enriquecida decantada por poço.

Nota: Para evitar detritos da matriz ou camadas de gordura, pipete logo abaixo da camada de gordura e acima de quaisquer detritos no fundo do tubo.

3. Incube a microplaca Deep Well no agitador térmico SEM agitar a 37 ±2 °C por 15-30 min.
4. Prossiga com o protocolo EZ-Check Lysis usando 25 µL da amostra enriquecida tratada com o EZ-Check Lysis Kit.

*Para mais informações, consulte as condições de uso no guia do usuário da Solução de Remoção de DNA Livre (nº do documento 100000253856).

C. iQ-Check Prep System (opcional)

O iQ-Check Prep System é usado para automatizar o fluxo de trabalho EZ-Check, com o tratamento opcional de remoção de DNA livre, a extração de DNA e a configuração da placa de PCR em tempo real.

1. Abra o software CFX Maestro IDE e selecione o protocolo de ensaio "EZ Salmo" no menu.
2. Atribua tipos de amostra a cada poço da placa selecionando Unknown (Desconhecido), Positive Control (Controle positivo) ou Negative Control (Controle negativo).
3. Configure as opções necessárias para cada poço (p. ex: FDRS, diluição).
4. Clique em "Send to the iQ-Check Prep" (Enviar para o iQ-Check Prep) para exportar a lista de trabalho.
5. Transfira um mínimo de 500 µL da amostra enriquecida para o poço apropriado de uma placa de poços profundos ou para tubos, de acordo com o layout da placa.
6. Abra o software iQ-Check Prep no computador do equipamento.
7. Carregue a lista de trabalho transferida na etapa 4.
8. Siga as instruções para carregar manualmente os consumíveis (ponteiras, placas), reagentes e amostras preparadas.
9. Inicie a corrida.
10. Após a conclusão da corrida, remova a placa de PCR e sele hermeticamente as tiras com as tampas ópticas EZ-Check.
11. Coloque a estrutura de PCR EZ-Check no termociclador. Certifique-se de colocar a placa com o poço A1 no canto superior esquerdo e fechar a tampa do equipamento.

Para mais informações, consulte os guias do usuário do CFX Maestro Industrial Diagnostic Edition e do iQ-Check Prep System.

D. Extração de DNA

Recomendações gerais:

Utilize uma área, equipamentos e materiais de consumo dedicados para realizar esta etapa.

Ligue o agitador térmico para pré-aquecer antes de iniciar o teste. Ajustar em 95–100 °C.

Em geral, evite agitar o saco de enriquecimento e coletar fragmentos de grande dimensão de resíduos alimentares. Para amostras alimentares com uma camada gordurosa, colete a amostra logo abaixo desta camada.

Para melhores resultados, deixe as tiras de lise esfriarem sem serem perturbadas antes de pipetar o extrato de DNA.

Protocolos de lise Ez-Check

1. Coloque o número apropriado de tubos de lise EZ-Check (8 tubos/tira) no EZ-Check Lysis Rack. Certifique-se de que os tubos estejam totalmente inseridos no EZ-Check Lysis Rack.
2. Bata levemente o EZ-Check Lysis Rack na bancada para aspirar o reagente de lise.
3. Retire cuidadosamente o lacre de alumínio dos tubos de lise.

Nota: O reagente de lise EZ-Check pode apresentar gotas do lado interno do poço. Isso não afeta a qualidade de extração.

4. Adicione 25 µl de amostra enriquecida aos tubos de lise. Caso seja utilizada a solução de remoção de DNA livre, adicione 25 µL das amostras enriquecidas e tratadas aos tubos de lise.
5. Incube as tiras de lise no agitador térmico sob agitação a 1.300 rpm durante 15 a 20 min a 95 °C a 100 °C.
6. Resfrie os tubos de lise colocando o EZ-Check Lysis Rack sobre a bancada à temperatura ambiente, sem mexer por 10-30 min.

Nesta etapa, o protocolo pode ser pausado e retomado posteriormente.

- O extrato de DNA pode ser armazenado selado por 7 dias a 2-8 °C diretamente nos tubos de lise EZ-Check usando as tampas EZ-Check Lysis Storage Caps.
- Para armazenamento congelado (-25 °C; -15 °C), o extrato de DNA deve ser transferido para um tubo separado e pode ser armazenado selado por até 30 dias (Fora do escopo da validação AOAC e da NF Validation.).

E. PCR em Tempo Real

Configuração do equipamento e do software

Para a configuração do equipamento e do software, siga as instruções do manual do usuário do software CFX Maestro, Industrial Diagnostic Edition (IDE).

Preparação da reação de PCR

1. Abra a bolsa EZ-Check *Salmonella* spp. ReadyPCR Strips.
2. Retire da embalagem de alumínio o número total necessário de tiras (número de amostras mais dois controles).

Nota: Coloque as tiras não utilizadas novamente vedadas na bolsa com dessecante.

3. Coloque o ReadyPCR Strips na estrutura EZ-Check PCR, certificando-se de que as tiras estejam firmemente presas à estrutura. Recomenda-se bater levemente a estrutura EZ-Check PCR na bancada para garantir que as microesferas estejam no fundo dos poços de PCR.
4. Retire cuidadosamente a película protetora de cada tira individual e verifique visualmente a presença de uma microesfera de PCR por poço. Uma vez abertos, os produtos ReadyPCR strips permanecem estáveis por até 4 horas antes de serem reidratados.

5. Transfira cuidadosamente 25 µL do extrato de DNA ao longo da parede interna de cada poço do ReadyPCR Strips, de acordo com a configuração da mesma. Não aspire o extrato de DNA do fundo do tubo de lise para evitar a transferência de inibidores de PCR para o poço de PCR.

Nota: Uma reação efervescente indicará que a amostra foi adicionada corretamente ao reagente de PCR.

6. No caso dos controles negativo e positivo, transfira 25 µL do controle negativo (CN) do EZ-Check e do controle positivo do EZ-Check *Salmonella* spp. (CP) cuidadosamente ao longo da parede interna dos respectivos poços ReadyPCR .

Nota: O teste PCR deve ser iniciado dentro de 4 horas após a abertura do ReadyPCR strip.

7. Opcional: Para purificar o DNA, combine 50 µl de DNA extraído de cada amostra com 200 µl de iQ-Check Purification Reagent.. Pipete para cima e para baixo 5 vezes para homogeneizar. Alternativamente, uma diluição de 1:10 do DNA extraído pode ser feita usando água esterilizada. Esta etapa não foi testada durante a Certificação NF VALIDATION.
8. Vede hermeticamente os poços das tiras PCR com as tampas ópticas EZ-Check.
9. Coloque a placa de PCR EZ-Check ou as tiras de tubo no termociclador. Certifique-se de colocar a placa com o poço A1 no canto superior esquerdo e fechar a tampa do equipamento.

Preparação do controle laboratorial (etapa opcional)

Os controles de laboratório são tratados da mesma forma que as amostras de alimentos. Eles são usados para validar todo o fluxo de trabalho do EZ-Check. O DNA extraído dos controles de laboratório é colocado na placa de PCR e usado como controle da placa de PCR, substituindo os controles negativos e positivos EZ-Check.

Para ser válido, o controle negativo de laboratório não deve conter DNA de *Salmonella* spp. Para ser válido, o controle positivo de laboratório deve conter DNA de *Salmonella* spp. amplificado com valores de C_q entre 26 e 36. Vide o manual do usuário do software CFX Maestro Industrial Diagnostic Edition (IDE); número do documento 10000241897.

O usuário final é responsável por estabelecer e implementar os controles laboratoriais adequados. A validade e a confiabilidade dos resultados do EZ-Check *Salmonella* spp dependem da correta verificação, validação e preparação desses controles definidos pelo usuário.

Corrida do PCR

Para iniciar a corrida da PCR, siga as instruções do manual do usuário do Software CFX Manager CFX Maestro, IDE (DIR 10000241897).

F. Análise de dados

Os dados podem ser analisados diretamente no final da execução do PCR ou posteriormente, abrindo o arquivo de dados armazenados. Siga as instruções no respectivo manual do usuário do software CFX Maestro, IDE para abrir arquivos de dados e definir os parâmetros de análise de dados.

Interpretação de resultados

Depois que os parâmetros de análise de dados forem definidos, os resultados serão interpretados através da análise dos valores Cq de cada amostra (o ciclo no qual a curva de amplificação cruza o limite).

O software CFX Maestro IDE permite a análise automatizada completa dos sistemas de detecção de PCR em tempo real da Bio-Rad. Uma verificação das características típicas das curvas de amplificação deve ser realizada antes da liberação dos resultados. Entre em contato com a equipe de suporte técnico da Bio-Rad se for necessário suporte adicional.

Controles

Verifique os controles positivo e negativo antes de interpretar os resultados da amostra.

Para a experiência ser válida, os controles devem apresentar os resultados sumarizados na tabela abaixo. Caso contrário, a reação de PCR deve ser repetida.

	Detecção de <i>Salmonella</i> spp. (Canal FAM)	Detecção de controle interno (Canal HEX)
Controle negativo	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Controle positivo	$26 \leq Cq \leq 36$	Não significativo

* O software indica um valor de Cq de N/A (não aplicável) quando a fluorescência de uma amostra não se destaca significativamente do ruído de fundo e, portanto, não ultrapassa o limite.

Se resultados dos controles negativos e positivos diferirem dos da tabela acima (controle inválido), repita a execução e a análise descritas em "D. PCR em tempo real" e "E. Análise de dados" na seção 7 do Protocolo.

Amostras

Um teste de PCR positivo EZ-Check *Salmonella* spp. deve mostrar uma curva de amplificação típica e um valor de Cq ≥ 10 para o fluoróforo FAM.

- Se o valor de Cq para ambos os canais estiver abaixo de 10, verifique se a curva de dados brutos é uma curva de amplificação regular (com uma linha de base plana, seguida de um rápido aumento exponencial da fluorescência e depois de um achatamento). Se a curva parecer correta, o teste pode ser considerado positivo para *Salmonella* spp.

Se não houver valor de Cq (Cq = N/A) para FAM, ou se a curva não for uma curva de amplificação típica, o controle interno dessa amostra deve ser analisado.

- Essa amostra é considerada **negativa para *Salmonella* spp.** se não houver valor Cq no canal FAM e o controle interno tiver um valor Cq ≥ 28
- Caso o controle interno também não tenha um valor Cq (Cq = N/A), provavelmente isso indica a inibição da reação de PCR. A amostra precisa ser diluída (usando 10 µl de extrato de DNA, realizar uma diluição de 1:10 em água destilada estéril e depois testar 25 µl da diluição) e o PCR repetido.
- Se o valor Cq para o controle interno for < 28 , não será possível interpretar o resultado. Confirme se o limite foi corretamente colocado, ou se a curva, como dados brutos, é uma curva regular de amplificação. Caso a curva não apresente uma forma característica, será necessário repetir o a PCR

A interpretação dos resultados do teste é resumida na tabela a seguir:

Detecção de <i>Salmonella</i> spp. (Canal FAM)	Detecção de controle interno (Canal HEX)	Interpretação
Cq ≥ 10	N/A*	Positivo
Cq = N/A*	Cq ≥ 28	Negativo
Cq = N/A*	Cq = N/A*	Inibição**

* O software indica um valor de Cq de N/A (não aplicável) quando a fluorescência de uma amostra não se destaca significativamente do ruído de fundo e, portanto, não ultrapassa o limite.

Quando a detecção do alvo e do controle interno fornecer um valor Cq = N/A, o extrato de DNA deve ser diluído em 1:10 e testado novamente.

Uma interpretação inválida pode ser fornecida quando os critérios de validação não são atendidos. Verifique os dados brutos e proceda como se a amostra estivesse inibida.

Seção 9 Confirmação de resultados positivos

No contexto da validação da AOAC, presume-se que um resultado positivo no EZ-Check *Salmonella* spp. seja positivo e recomenda-se a confirmação de acordo com um método de referência apropriado (por exemplo, USDA MLG, FDA BAM, ISO, MFHPB, AOAC SMPR etc.). Alternativamente, estriar 10 µl de caldo de enriquecimento diretamente no RAPID'*Salmonella* Agar e incubar por 24 ± 2 hr a 37 ± 1 °C. Quando a flora interferente puder ser alta, transfira 0,5 ml de cultura pré-enriquecida para 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) e incubar por 24 ± 3 hr a 41,5 ± 1 °C. Proceder com estrias de 10 µl de RVS enriquecido para meio cromogênico no RAPID'*Salmonella* Agar. Consulte o método de confirmação descrito no guia do usuário do RAPID'*Salmonella* Agar (documento nº 10000126748).

No contexto do método certificado pela NF VALIDATION, todos os resultados positivos do kit EZ-Check devem ser confirmados das seguintes maneiras:

1. Usando testes clássicos descritos nos métodos CEN ou ISO padrão (incluindo a purificação) diretamente do caldo de enriquecimento APT após o total enriquecimento de 18-26 hr a 37 °C.
2. Estriar 10 µl de APT enriquecida diretamente no RAPID'*Salmonella* Agar e incubar por 24 ± 2 hr a 37 ± 1 °C. Quando a flora interferente puder ser alta, transfira 0,1 ml de APT enriquecida para 10 ml de caldo Rapaport Vassiliadis Soy (RVS) e incubar por 24 ± 3 hr a 41,5 ± 1 °C e, em seguida, proceder com estrias de 10 µl de RVS enriquecido no RAPID'*Salmonella* Agar. As colônias típicas são confirmadas conforme descrito no guia do usuário RAPID'*Salmonella*.
3. Utilizando qualquer outro método certificado pela NF VALIDATION baseado em um princípio diferente do utilizado no teste de PCR EZ-Check *Salmonella* spp. Kit. O protocolo validado deste o segundo método deve ser seguido inteiramente, incluindo o enriquecimento seletivo RVS, quando necessário. A confirmação é realizada a partir do caldo de enriquecimento APT se esta etapa for comum a ambos os métodos.

No contexto do NF VALIDATION, a APT enriquecida pode ser armazenado a 2-8 °C por 72 hr no máximo após a incubação a 37 °C antes de realizar a confirmação.

No caso de resultados discrepantes entre o EZ-Check *Salmonella* spp. Kit e qualquer uma das opções de confirmação listadas acima, siga as etapas necessárias para garantir resultados válidos.

Seção 10

Confirmação de colônias únicas usando o kit EZ-Check

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit também pode ser usado para confirmar colônias isoladas de *Salmonella* spp. em placas de ágar (fora do escopo da validação do AOAC).

* Consulte, no guia do usuário do RAPID¹ *Salmonella* Agar (nº 10000126748), as condições de uso.

1. Escolha uma colônia isolada de uma placa de cultura de ágar seletivo ou não seletivo com um palito de dente, alça estéril ou outro consumível adaptado (por exemplo, uma ponteira de pipeta).
2. Ressuspenda a colônia em 100 µl de água destilada estéril em um tubo de microcentrifuga. Homogeneíze usando um agitador.
3. Adicione 25 µL da suspensão diretamente ao reagente de PCR ou à solução de lise EZ-Check e siga o EZ-Check *Salmonella* spp. protocolo de interpretação de dados e resultados.

Seção 11 Desempenho e validação do teste

O kit EZ-Check *Salmonella* spp. é específico para a detecção do gênero *Salmonella*.



BRD 07/27-07/25

MÉTODOS ANALÍTICOS
ALTERNATIVOS PARA O
AGRONEGÓCIO

<http://nf-validation.afnor.org>

NF Validation

O EZ-Check *Salmonella* spp. Kit é certificado pela NF VALIDATION como uma alternativa para o método de referência ISO 6579 -1 (2017) para a detecção de *Salmonella* spp. em todos os produtos para consumo humano e animal, bem como amostras ambientais. A validação seguiu o protocolo da norma ISO 16140-2: Padrão 2016 e inclui o uso dos Sistemas CFX Opus 96, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well e CFX Duet de PCR em Tempo Real. O uso da Solução de Remoção de DNA Livre iQ-Check está incluído no escopo da validação para todas as categorias validadas, exceto para produtos de cacau e chocolate. O uso do iQ-Check Prep System v5 está incluído no escopo da validação para todas as categorias validadas.

Os programas de software associados são CFX Maestro Software IDE V4.0. O APF "EZ Salmo" é validado para todas as amostras. Número do certificado: BRD 07/27-07/25. Consulte informações de validade no certificado disponível no site <http://nf-validation.afnor.org/en>.



Validação AOAC

O EZ-Check *Salmonella* spp. Kit foi validado pelo AOAC Research Institute, PTM 082501, para detecção de *Salmonella* spp. em saladas prontas¹ (25 g), carne bovina moída crua² (375 g), peru moído cru² (375 g), peito de frango cru² (375 g), enxágue de carcaça de frango² (30 mL), carne de porco moída crua² (375 g), leite em pó desnatado¹ (375 g), proteína de soro de leite em pó¹ (whey, 375 g), farinha de trigo¹ (375 g), queijo cheddar¹ (375 g), alface-romana¹ (375 g), mix de vegetais congelados¹ (375 g), melão-cantaloupe fresco cortado¹ (375 g), cacau em pó¹ (375 g), manteiga de amendoim cremosa¹ (375 g), ração seca para cães¹ (375 g), fórmula infantil com probióticos¹ (375 g), alho em pó¹ (375 g), brotos de feijão¹ (375 g), pano para amostragem de carne bovina crua², superfície de aço inoxidável¹ (esponja de 4 pol. x 4 pol.), superfície de borracha¹ (swab de 1 pol. x 1 pol.), superfície de concreto selado¹ (esponja de 4 pol. x 4 pol.). Um resultado positivo com o kit EZ-Check é considerado como presumido e recomenda-se que seja confirmado pelos métodos de referência padrão na Seção 9 acima. O APF "EZ Salmo", o uso do Free DNA Removal Solution e o uso dos sistemas de PCR em tempo real CFX Opus Standard, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well e CFX Duet são validados para todas as amostras. O software associado é o CFX Maestro IDE Software (versão 4.0 e posterior).

¹ Testado pelo método de referência BAM, capítulo 5, FDA.

² Testado com o método de referência USDA MLG 4.15.

Seção 12

Referências

ISO 7218. Microbiology of the food chain — General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 6887. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1 – 6.

ISO 6579-1. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp.

ISO 16140-2. Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2024). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 4.15: Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Siluriformes (Fish) Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2024). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 5: *Salmonella*.

Acesse bio-rad.com/EZCheck para mais informações.

Bio-Rad e EZ-Check são marcas comerciais da Bio-Rad Laboratories, Inc. em certos foros.

Todas as marcas comerciais usadas neste documento são de propriedade de seus respectivos proprietários.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Boletim 5145 Ver D US/EG

Sig 0125

EZ-Check™ *Salmonella* spp. Kit

Manual del usuario

Análisis de detección por PCR en tiempo real de *Salmonella* spp. en muestras alimentarias de consumo humano y animal y muestras ambientales

Referencia #12018082

Solo para uso en laboratorio *in vitro*



Tabla de Contenidos

Apartado 1 Historial de revisiones	3
Apartado 2 Introducción	3
Apartado 3 Tecnología de EZ-Check <i>Salmonella</i> spp.	4
Apartado 4 Componentes del kit	5
Apartado 5 Vida útil y almacenamiento	5
Apartado 6 Materiales necesarios pero no suministrados	5
Apartado 7 Seguridad, precauciones y recomendaciones para la obtención de resultados óptimos	6
Apartado 8 Protocolo	8
A. Enriquecimiento de la muestra	8
B. Tratamiento de eliminación de ADN libre (paso opcional)	10
C. Sistema iQ-Check Prep (opcional)	11
D. Extracción de ADN	11
E. PCR en tiempo real	12
F. Análisis de los datos	13
Apartado 9 Confirmación de los resultados positivos	15
Apartado 10 Confirmación de colonias aisladas usando el kit EZ-Check	16
Apartado 11 Aplicaciones del ensayo y validaciones	17
Apartado 12 Referencias	18

Apartado 1

Historial de revisiones

Fecha de publicación	Número de documento / versión	Cambio
Julio 2025	Bulletin 5145 Ver A	Documento nuevo
Agosto 2025	Bulletin 5145 Ver B	- Aprobación AOAC - Modificaciones del contenido
Octubre de 2025	Bulletin 5145 Ver C	- Extensión de la Validación NF: Productos de cacao y chocolate hasta 375 g, Sistema iQ-Check Prep - Modificaciones del contenido
Abril de 2026	Boletín 5145 Ver D	- Extensión de la validación NF: Fórmula infantil y cereales con/sin probióticos e ingredientes relacionados hasta 375 g, productos lácteos con procesamiento térmico hasta 375 g, productos cárnicos y avícolas crudos hasta 375 g - Corrección del protocolo de confirmación de la validación NF: Volumen de enriquecimiento modificado a 0,1 mL en RVS para enriquecimiento secundario - Modificaciones del contenido

Apartado 2

Introducción

Las Salmonelas son la causa más frecuente de intoxicación alimentaria en el mundo, pese a las numerosas medidas preventivas adoptadas para controlar estos organismos. Los huevos, los productos lácteos, la carne y las aves de corral son los alimentos más comúnmente asociados con la transmisión de *Salmonella* (en el 65 % de los casos). Se han identificado más de 2.500 serotipos, todos ellos potencialmente patógenos para el ser humano. Dada la baja dosis infecciosa y la grave amenaza que supone para productores y consumidores, actualmente varios países exigen la ausencia total de *Salmonella* en los productos alimentarios.

Los métodos de cultivo convencionales suelen ser largos y tediosos. En comparación, el kit EZ-Check *Salmonella* spp. es una prueba cualitativa simple y rápida, que permite la detección de secuencias específicas de ADN de *Salmonella* spp. que se encuentran en productos alimentarios dedicados al consumo humano y animal y en muestras ambientales. Utilizando PCR en tiempo real, las secuencias de ADN específicas de *Salmonella* spp. se amplifican y se detectan simultáneamente por medio de sondas fluorescentes. Se pueden procesar 96 pruebas a la vez con un riesgo mínimo de contaminación y un procedimiento sencillo. Los usuarios previstos de este kit de detección son personal de laboratorio capacitado que realiza ensayos de detección de *Salmonella* spp. El uso de esta prueba permite obtener resultados en pocas horas tras el enriquecimiento de la muestra.

Apartado 3

Tecnología de EZ-Check *Salmonella* spp.

El EZ-Check *Salmonella* spp. Kit debe utilizarse con EZ-Check Lysis Kit (referencia 12018075).

El EZ-Check *Salmonella* spp. Kit se basa en la amplificación del gen y la detección por PCR en tiempo real.

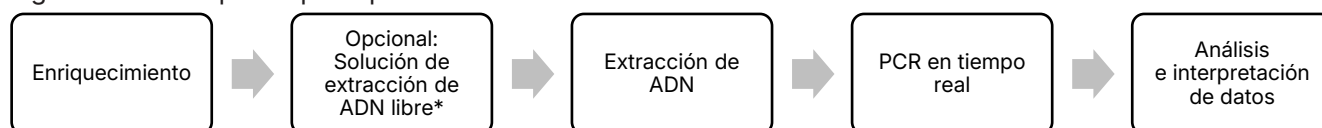
Los reactivos PCR liofilizados listos para usar incluidos en el kit contienen oligonucleótidos (cebadores y sondas) específicos para *Salmonella* spp., así como ADN polimerasa y nucleótidos. La detección y el análisis de datos están optimizados para su uso con un instrumento de PCR en tiempo real de Bio-Rad, como los sistemas de detección por PCR en tiempo real CFX Opus 96, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well y CFX Duet.

La PCR es una técnica potente que se utiliza para generar múltiples copias del ADN diana. Durante la reacción de PCR, varios ciclos de calentamiento y enfriamiento permiten la desnaturalización del ADN por calor, seguida de la unión de los cebadores a la región diana. La ADN polimerasa utiliza estos cebadores y desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) para extender el ADN, creando copias del ADN diana. Estas copias se llaman amplicones.

En la PCR en tiempo real, se utilizan sondas específicas para detectar el ADN durante la fase de amplificación, mediante la hibridación de los amplicones. Estas sondas están unidas a un fluoróforo que sólo se vuelve fluorescente cuando se hibrida con la secuencia diana. FAM es el fluoróforo unido a la sonda que hibrida con la secuencia de ADN específica de *Salmonella* spp. En ausencia de ADN diana, no se detectará fluorescencia. A medida que el número de amplicones aumenta con cada ciclo de amplificación, la intensidad de la fluorescencia también aumenta. El módulo óptico mide esta fluorescencia en la fase de hibridación durante cada ciclo de PCR mientras que el software correspondiente traza la intensidad de la fluorescencia en función del número de ciclos.

El mix de reacción contiene un control interno de ADN sintético para validar posibles resultados negativos. Este control se amplifica con una sonda específica al mismo tiempo que la secuencia de ADN diana de *Salmonella* y se detecta por un segundo fluoróforo.

Esta prueba permite la detección cualitativa de *Salmonella* spp. en una amplia gama de productos alimenticios, piensos y muestras ambientales tras una etapa de enriquecimiento. Consta de los siguientes cinco pasos principales:



* Consulte el manual del usuario del producto Free DNA Removal Solution (documento n.º 10000253856) para conocer las condiciones de uso.

Apartado 4

Componentes del kit

El EZ-Check *Salmonella* spp. Kit contiene reactivos suficientes para 96 pruebas.

Id. de reactivo	Elemento	Descripción	Cantidad
RPS	EZ-Check <i>Salmonella</i> spp. ReadyPCR Strips*	Reactivo de PCR listo para usar	12 tiras de 8 pocillos
CAP	EZ-Check Optical Caps	Tapones ópticos	12 tiras de 8 tapones
NC	EZ-Check Negative Control	Control negativo PCR	1 tubo, 1,0 ml
PC	EZ-Check <i>Salmonella</i> spp. Positive Control	Control positivo PCR	1 tubo, 0,6 ml

*Las EZ-Check *Salmonella* spp. ReadyPCR strips se pueden identificar por las pestañas púrpuras a cada lado de las tiras de PCR. Los indicadores de color púrpura de *Salmonella* también son visibles en el embalaje de la caja del kit y en el software CFX Maestro IDE.

Apartado 5

Vida útil y almacenamiento

- El kit se envía en frío
- Almacenar los kits a una temperatura de entre 2 y 8 °C
- No congelar
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas
- Tras la primera apertura, las ReadyPCR Strips selladas en la bolsa con desecante y almacenadas a una temperatura de entre 2 y 8 °C pueden utilizarse durante un máximo de 5 meses. La bolsa puede reabrirse hasta 5 veces durante este periodo

Apartado 6

Materiales necesarios pero no suministrados

Equipo y software

- Específicos para la extracción de ADN: agitador calefactor* capaz de mantener una temperatura de 95-100 °C y/o 37 ± 2 °C, con una velocidad de mezcla de al menos 1300 rpm (por ejemplo, referencia 3594995 y referencia 12022466)
- Sistema* de PCR en tiempo real de Bio-Rad, por ejemplo, los sistemas de PCR en tiempo real CFX Opus 96 (referencia 17007991) o CFX Opus Deepwell (referencia 17007992) o CFX Duet (referencia 17010275)
- iQ-Check Prep System* (referencia 3594911)
- Pipeta multicanal ajustable de 20-200 µL (referencia 17010702) y/o pipeta simple de 20-200 µL (referencia 17010259)
- EZ-Check Lysis Rack (referencia 12019781)
- EZ-Check PCR Frame (referencia 12019771)
- Mezcladora de paletas de laboratorio para homogeneizar las muestras de análisis

Apartado 7

Seguridad, precauciones y recomendaciones para la obtención de resultados óptimos

- CFX Maestro Software, Industrial Diagnostic Edition, versión 4.0 (referencia 3593893)
- Incubadora para el enriquecimiento microbiológico de muestras

Nota: Se recomienda utilizar un suministro de alimentación ininterrumpida (SAI) con el termociclador y el iQ-Check Prep System.

*Contacte con el Servicio Técnico de Bio-Rad para más información sobre los instrumentos recomendados.

Insumos

- EZ-Check Lysis Kit (referencia 12018075, 96 pruebas)
- Medio de enriquecimiento: Agua peptonada tamponada, por ejemplo
BPW Plus
referencia 3564684, deshidratada, 500 g
referencia 3554179, 225 mL x 6 frascos
referencia 3555795, 3 L x 4 bolsas
referencia 3555790, 5 L x 2 bolsas
BPW Standard
referencia 12013259, deshidratada, 500 g
referencia 12013258, deshidratada, 5 kg
referencia 12013260, 5 L x 2 bolsas
- RAPID'*Salmonella* Agar (referencia 3563961, 90 mm x 20 placas; referencia 3563963, 90 mm x 120 placas; referencia 3564705, deshidratada, 500 g)
- Free DNA Removal Solution (referencia 3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (referencia 12012383)
- PIF Supplement (referencia 12013322, 2 g)
- Microplaca de pocillo profundo (referencia 3594900)
- Puntas de pipeta con filtro estéril compatibles, adaptables a pipetas de 5-50 µL o 20-200 µL (por ejemplo, referencia 17010688)
- Tapas de almacenamiento de lisis EZ-Check (catálogo #12022880)
- Herramienta de taponado para PCR (referencia ECT2000)
- Bolsas con filtro
- Agua destilada estéril
- Lejía al 5 % y descontaminante de superficies
- Guantes libres de polvo

Insumos específicos para el iQ-Check Prep System

- Tubos de 2 mL para Free DNA Removal Solution (referencia 17010255)
- Microplacas de pocillo profundo (referencia 3594900)
- Puntas de filtro conductoras (referencia 12022468, 300 µL x 5760)
- Recipiente de 60 mL para dilución (referencia 12014473)

Apartado 7

Seguridad, precauciones y recomendaciones para la obtención de resultados óptimos

- Descargo de responsabilidad: para conocer nuestros términos y condiciones de venta estándar, incluidos los descargos de responsabilidad, visite <https://www.bio-rad.com/en-us/terms-conditions>

Apartado 7

Seguridad, precauciones y recomendaciones para la obtención de resultados óptimos

- Este manual del usuario, así como los de los reactivos, instrumentos y software relacionados, deben leerse en su totalidad antes de utilizar el método.
- Este análisis debe ser realizado por personal capacitado.
- Las muestras y los cultivos enriquecidos deben manipularse como material potencialmente infeccioso y desecharse de acuerdo con las normas y reglamentos locales.
- Todo el material potencialmente infeccioso debe ser esterilizado en autoclave antes de su eliminación.
- La calidad de los resultados depende del estricto cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio (por ejemplo, la norma EN ISO 7218), especialmente en lo que respecta a microbiología y PCR:
 - El material de laboratorio (pipetas, tubos, etc.) no debe intercambiarse entre un puesto de trabajo y otro.
 - Utilizar siempre un control positivo y un control negativo para cada serie de reacciones de amplificación.
 - No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad.
 - Agitar y centrifugar los controles positivos y negativos del kit antes de utilizarlos, para garantizar su homogeneidad.
 - Verificar periódicamente la exactitud y la precisión de las pipetas, así como el correcto funcionamiento de los instrumentos.
 - Cambiarse los guantes con frecuencia, especialmente si se sospecha que están contaminados.
 - Limpiar periódicamente los espacios de trabajo con lejía al 5 % y otros agentes descontaminantes.
 - Utilizar guantes sin talco, evitar las huellas dactilares o escribir en los tapones de los tubos. De lo contrario, en ambos se interferirá con la adquisición de datos.
- Se recomienda firmemente seguir los requisitos generales descritos en la norma EN ISO 22174 (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).
 - Consultar la Ficha de Datos de Seguridad para obtener información adicional y los reglamentos locales para la eliminación.
- En el caso de las muestras ambientales, los dispositivos de recogida de muestras deben hidratarse con un diluyente estéril (por ejemplo, agua peptonada tamponada) y, en caso necesario, con una solución neutralizante (por ejemplo, HiCap Neutralizing Broth, Dey-Engley Neutralizing Broth, Lethen Broth) para neutralizar los efectos del desinfectante. Se recomienda evitar los tampones neutralizantes que contengan complejo de sulfonato de arilo en la solución hidratante.

- Después de abrir el envase de ReadyPCR strips, asegurarse de que las tiras se coloquen en el instrumento CFX en un plazo de 4 hr. Una vez hidratado el reactivo de PCR liofilizado, la mezcla de PCR resultante es estable a una temperatura de entre 18 y 25 °C.
- Cuando se utilice el sistema de PCR en tiempo real CFX, equilibrar siempre las tiras de tubos para garantizar que la tapa calefactada aplique una presión uniforme en todo el bloque.
- Siempre se recomienda realizar estudios de verificación de idoneidad o de matriz antes de utilizar este método
- Manipular los reactivos EZ-Check como material potencialmente biopeligroso bajo un nivel de bioseguridad 2 como mínimo.

Apartado 8

Protocolo

Es altamente recomendable leer completa y detenidamente el protocolo antes de iniciar el análisis.

A. Enriquecimiento de la muestra

Equilibrar los caldos de enriquecimiento a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de su uso.

Para tiempos de enriquecimiento de 10 hr o menos, calentar el caldo de enriquecimiento a la temperatura de incubación de la muestra antes de su uso. Los periodos de enriquecimiento cortos son sensibles a las condiciones de incubación y se deben respetar estrictamente las temperaturas indicadas. La duración de la preparación de la muestra (tiempo entre el precalentamiento del caldo de enriquecimiento y el comienzo de la incubación de la muestra de alimento) no debe superar los 45 min. Se recomienda el uso de una incubadora o estufa ventilada.

Descongelar completamente las muestras congeladas antes de utilizarlas.

Se recomienda encarecidamente el uso de una bolsa de enriquecimiento con filtro incorporado.

Se recomienda el uso de alfa-amilasa para el enriquecimiento de cereales o productos de almidón, tal como se describe en la norma ISO 6887-4.

En el ámbito de la certificación NF VALIDATION, la preparación de muestras puede realizarse teniendo en cuenta o no las normas ISO 6887-2 a -6. Salvo que se indique lo contrario, las porciones de muestras de análisis con peso superior a 25 g no han sido testadas. Incubar, sin agitar, durante los tiempos y a las temperaturas indicados en la tabla.

En el cuadro que figura a continuación se esbozan los diferentes protocolos que pueden utilizarse, según la aplicación y el alcance de la validación.

Las muestras enriquecidas pueden almacenarse a 2-8 °C durante 72 hr antes de realizar el paso de lisis EZ-Check.

Apartado 8
Protocolo

AOAC		
Alcance (matrices) ^{1,2}	Preparación de las muestras	Enriquecimiento
Ensalada preparada	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar 25 g o 25 ml de muestra durante 1 min en 225 ml de agua de peptona tamponada 	Incubar durante 18-26 hr a 37 ± 1 °C
Lechuga romana	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar 375 g de muestra durante 1 min en 1.125 mL de agua de peptona tamponada precalentada (42 ± 1 °C) 	Incubar durante 10-24 hr a 42 ± 1 °C
Mezcla de verduras congeladas, brotes de soja, melón fresco cortado	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar 375 g de muestra durante 1 min en 1.125 mL de agua de peptona tamponada precalentada (37 ± 1 °C) 	Incubar durante 18-22 hr a 37 ± 1 °C
Queso cheddar, cacao en polvo	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar 375 g de muestra durante 1 min en 1.125 mL de agua de peptona tamponada 	Incubar durante 18-22 hr a 37 ± 1 °C
Leche desnatada en polvo, proteína de suero en polvo, harina para todo uso, fórmula infantil con probióticos	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar 375 g de muestra durante 1 min en 1.125 ml de agua de peptona tamponada con PIF Supplement 	Incubar durante 18-26 hr a 37 ± 1 °C
Mantequilla de cacahuete cremosa	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar 375 g de muestra durante 1 min en 1.125 mL de agua de peptona tamponada precalentada (42 ± 1 °C) 	Incubar durante 18-24 hr a 42 ± 1 °C
Ajo en polvo	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar 375 g de muestra durante 1 min en 3.000 mL de agua de peptona tamponada precalentada (37 ± 1 °C) + K₂SO₃ 0,5 % 	Incubar durante 18-26 hr a 37 ± 1 °C
Carne picada cruda de pavo, pechuga de pollo cruda	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar 375 g de muestra durante 1 min en 1.125 mL de agua de peptona tamponada precalentada (42 ± 1 °C) 	Incubar durante 8-22 hr a 42 ± 1 °C
	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar 325 g de muestra durante 1 min en 1.625 mL de agua de peptona tamponada 	Incubar durante 20-24 hr a 35 ± 2 °C
Carne picada cruda de vacuno, carne picada cruda de cerdo	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar 375 g de muestra durante 1 min en 1.125 mL de agua de peptona tamponada precalentada (42 ± 1 °C) 	Incubar durante 8-22 hr a 42 ± 1 °C (375 g)
	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar 325 g de muestra durante 1 min en 975 mL de caldo de soja triptona modificado 	Incubar durante 15-24 hr a 42 ± 1 °C (325 g)
Enjuagues de la canal de pollo	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar 30 mL de enjuague de la canal en 30 mL de agua de peptona tamponada precalentada (37 ± 1 °C) 	Incubar durante 18-22 hr a 37 ± 1 °C
	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar 30 mL de enjuague de la canal en 30 mL de agua de peptona tamponada 	Incubar durante 20-24 hr a 35 ± 2 °C
Toalla de muestreo de carne cruda de vacuno, toallas de muestreo	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar durante 1 min en 200 mL de agua de peptona tamponada o caldo de soja triptona modificado precalentado (42 ± 1 °C) 	Incubar durante 8-22 hr a 42 ± 1 °C (agua de peptona tamponada)
		Incubar durante 15-24 hr a 42 ± 1 °C (caldo de soja triptona modificado)
Pienso seco para perros	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar 375 g de muestra durante 30 sec en 1.125 mL de agua de peptona tamponada 	Incubar durante 18-26 hr a 37 ± 1 °C
Acero inoxidable, hormigón sellado, superficies ambientales de goma	<ul style="list-style-type: none"> Humedecer los hisopos y las esponjas con HiCap Neutralizing Broth Homogeneizar los hisopos durante 30 sec manualmente con 10 mL de agua de peptona tamponada Homogeneizar las esponjas durante 30 sec manualmente con 60 mL de agua de peptona tamponada 	Incubar durante 18-24 hr a 37 ± 1 °C

¹La validación incluye la siembra por estrías directamente en las placas RAPID' *Salmonella*.

² Si la muestra presenta inhibición de la PCR, realizar una nueva prueba o una dilución 1:10 en agua destilada estéril. Si la inhibición de la PCR sigue presente, utilizar el tratamiento iQ-Check Purification Reagent o una dilución de 1 en 50 en agua destilada estéril (se requiere una prueba de verificación adicional).

NF Validation		
Alcance (matrices) ¹	Preparación de las muestras	Enriquecimiento
Todos los alimentos para consumo humano, piensos para animales y muestras ambientales	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar 25 g o 25 ml de muestra durante 1 min en 225 ml de agua de peptona tamponada 	Incubar durante 18-26 hr a 37 ± 1 °C
Superficies ambientales	<ul style="list-style-type: none"> Humedecer los hisopos y las esponjas con un caldo neutralizante que no contenga complejo de sulfonato de arilo Homogeneizar los hisopos durante 30 sec manualmente con 10 mL de agua de peptona tamponada Homogeneizar las esponjas durante 30 sec manualmente con 60 mL de agua de peptona tamponada 	Incubar durante 18-26 hr a 37 ± 1 °C
Productos de cacao y chocolate ² (hasta 375 g)	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar n g de muestra en 9 x n mL de agua de peptona tamponada precalentada (41,5 ± 1 °C) (375 g en 1,125 ml) 	Incubar durante 18-26 hr a 41,5 ± 1 °C
Productos lácteos con procesamiento térmico ³ (hasta 375 g)	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar n g de muestra en 9 x n mL de agua de peptona tamponada precalentada (37 ± 1 °C) (375 g en 3,375 ml) 	Incubar durante 18-26 horas a 37 ± 1 °C
Productos cárnicos y avícolas crudos (hasta 375 g)	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar n g de muestra en 3 x n mL de agua de peptona tamponada precalentada (41,5 ± 1 °C) (375 g en 1,125 ml) 	Incubar durante 8-26 horas a 41,5 ± 1 °C

¹ Si la muestra presenta inhibición de la PCR, realizar una nueva prueba o una dilución 1:10 en agua destilada estéril. Si la inhibición de la PCR sigue presente, utilizar el tratamiento iQ-Check Purification Reagent o una dilución de 1 en 50 en agua destilada estéril (se requiere una prueba de verificación adicional).

² Realizar una dilución obligatoria de 1 en 10 en la muestra enriquecida con sal de triptona tras la incubación, antes de proceder con la fase de extracción de ADN. Si el extracto de ADN muestra inhibición de la PCR, proceder a realizar una nueva prueba o utilizar el tratamiento iQ-Check Purification Reagent o una dilución de 1 en 10 (en el marco de la certificación NF VALIDATION). La solución Free DNA Removal Solution no se ha evaluado para esta categoría.

³ Para reducir la inhibición de la PCR para el tipo de alimento del ingrediente, diluir el extracto de ADN en una relación 1:10 en agua destilada estéril. Si la inhibición de la PCR sigue presente, utilizar una mayor relación de dilución (p. ej., dilución 1:50 en agua destilada estéril, se requiere una prueba de verificación adicional).

B. Tratamiento de eliminación de ADN libre (paso opcional)

El Free DNA Removal Solution proporciona una forma ideal de eliminar el ADN libre.

1. Dispensar 10 µL de Free DNA Removal Solution activada en tantos pocillos de una microplaca de pocillo profundo como número de muestras deban analizarse.
2. Añadir 100 µL de muestra enriquecida decantada por pocillo.

Nota: para evitar restos de matriz o capas de grasa, pipetear justo por debajo de la capa de grasa y por encima de cualquier resto en el fondo del tubo.

3. Incubar la microplaca de pocillo profundo en el termoagitador SIN agitación a 37 ± 2 °C durante 15-30 min.
4. Proceder al protocolo EZ-Check Lysis utilizando 25 µL de muestra enriquecida tratada con el EZ-Check Lysis Kit.

Para más información, consultar el manual del usuario para la Eliminación de ADN libre (documento n.º 100000253856).

C. Sistema iQ-Check Prep (opcional)

El sistema iQ-Check Prep se utiliza para automatizar el flujo de trabajo de EZ-Check, incluido el tratamiento de eliminación de ADN libre opcional, la extracción de ADN y la configuración de la placa de PCR en tiempo real.

1. Abrir el software CFX Maestro IDE y seleccionar el protocolo de ensayo "EZ Salmo" en el menú.
2. Asignar tipos de muestra a cada pocillo de la vista de placa seleccionando Desconocido, Control positivo o Control negativo.
3. Configurar las opciones requeridas para cada pozo (ejemplo: FDRS, dilución).
4. Hacer clic en "Enviar a iQ-Check Prep" para exportar la lista de trabajo.
5. Transferir un mínimo de 500 μ L de muestra enriquecida al pocillo apropiado de una placa Deep Well o a tubos de acuerdo con la disposición de las placas.
6. Abrir el software iQ-Check Prep en el ordenador del instrumento.
7. Cargar la lista de trabajo transferida en el paso 4.
8. Seguir las instrucciones para cargar manualmente los consumibles (puntas, placas), los reactivos y las muestras preparadas.
9. Iniciar la ejecución.
10. Una vez finalizada la ejecución, retirar la placa de PCR y sellar herméticamente las tiras con EZ-Check Optical Caps.
11. Colocar EZ-Check PCR Fram en el termociclador. Asegurarse de colocar la placa con el pocillo A1 en la esquina superior izquierda y cerrar la tapa del instrumento.

Para obtener más información, consultar los manuales de usuario de Maestro Industrial Diagnostic Edition y sistema iQ-Check Prep.

D. Extracción de ADN

Recomendaciones generales:

Utilizar un área, equipos y consumibles específicos para realizar este paso.

Encender el calentador-agitador para precalentarlo antes de comenzar la prueba. Ajustarlo a 95–100 °C.

En general, evitar agitar la bolsa de enriquecimiento y recoger grandes fragmentos de restos de alimento. Para muestras de alimentos con una capa grasa, recoger la muestra justo debajo de esta capa.

Para obtener los mejores resultados, dejar que las tiras de lisis se enfríen sin tocarlas antes de pipetear el extracto de ADN.

Protocolo de lisis EZ-Check

1. Colocar el número adecuado de tubos de lisis EZ-Check (8 tubos/tira) en el EZ-Check Lysis Rack. Asegurarse de que los tubos estén completamente insertados en el EZ-Check Lysis Rack.
2. Golpear suavemente el EZ-Check Lysis Rack sobre la mesa de trabajo para desprender el reactivo de lisis.
3. Retirar con cuidado el sello de aluminio de los tubos de lisis.

Nota: el reactivo de lisis EZ-Check puede presentar gotas en el interior del pocillo. Esto no afecta a la calidad de la extracción.

4. Añadir 25 µL de muestra enriquecida a los tubos de lisis. Si se utiliza la solución de extracción de ADN libre, añadir 25 µL de muestras enriquecidas tratadas a los tubos de lisis.
5. Incubar las tiras de lisis en el agitador-calentador a 1300 rpm durante 15-20 min a 95-100 °C.
6. Enfriar los tubos de lisis colocando el EZ-Check Lysis Rack sobre la mesa a temperatura ambiente sin moverlo durante 10-30 min.

En este paso, el protocolo se puede pausar y reanudar más tarde.

- El extracto de ADN se puede almacenar sellado durante 7 días a 2-8 °C directamente en los tubos de lisis EZ-Check con las tapas de almacenamiento de lisis EZ-Check.
- Para el almacenamiento congelado (-25 °C, -15 °C), el extracto de ADN debe transferirse a un tubo separado y se puede almacenar sellado hasta 30 días (fuera del ámbito de la validación AOAC y la validación NF).

E. PCR en tiempo real

Configuración del software e instrumento

Para la configuración del instrumento y el software, seguir las instrucciones del manual del usuario del software CFX Maestro, Industrial Diagnostic Edition (IDE).

Preparación para la detección por PCR

1. Abrir el envase de EZ-Check *Salmonella* spp. ReadyPCR Strips.
2. Sacar el número total de tiras necesarias (número de muestras más dos controles) de la bolsa de aluminio.

Nota: vuelva a sellar correctamente las tiras no utilizadas en la bolsa con el desecante en su interior.

3. Colocar las ReadyPCR Strips en el soporte EZ-Check PCR Frame asegurándose de que las tiras estén bien sujetas al mismo. Se recomienda golpear suavemente el soporte EZ-Check PCR Frame sobre la mesa para asegurarse de que las perlas queden en el fondo de los pocillos de PCR.
4. Retirar con cuidado el sello de aluminio de cada tira individual y comprobar visualmente la presencia de una perla de PCR por pocillo. Una vez abiertas, las ReadyPCR strips son estables hasta 4 hr antes de ser rehidratadas.

- Transferir con cuidado 25 µL de extracto de ADN a lo largo de la pared interior de cada pocillo de las ReadyPCR Strips según la configuración de la placa. No aspirar el extracto de ADN del fondo del tubo de lisis para evitar transferir inhibidores de la PCR al pocillo de PCR.

Nota: una reacción efervescente indicará que la muestra se ha añadido correctamente al reactivo de PCR.

- Para los controles negativos y positivos, transferir con cuidado 25 µL del EZ-Check Negative Control (NC) y del EZ-Check *Salmonella* spp. Positive Control (PC) a lo largo de la pared interior de los pocillos correspondientes de ReadyPCR.

Nota: la PCR debe iniciarse en las 4 hr siguientes a la apertura de la ReadyPCR strip.

- Opcional: para purificar el ADN, combinar 50 µL de ADN extraído de cada muestra con 200 µL de iQ-Check Purification Reagent. Pipetear arriba y abajo 5 veces para homogeneizar. Como alternativa, se puede hacer una dilución de 1 en 10 del ADN extraído utilizando agua estéril. Este paso no fue evaluado durante la certificación NF VALIDATION.
- Sellar herméticamente los pocillos de las tiras de PCR con las tapas ópticas EZ-Check.
- Colocar el soporte del PCR EZ-Check PCR Frame en el termociclador. Asegurarse de colocar la placa con el pocillo A1 en la esquina superior izquierda y cerrar la tapa del instrumento.

Preparación del control de laboratorio (paso opcional)

Los controles de laboratorio se tratan como muestras de alimentos. Se utilizan para validar todo el flujo de trabajo de EZ-Check. El ADN extraído de los controles de laboratorio se coloca en la placa de PCR y se utiliza como controles de la placa de PCR en sustitución de los controles negativos y positivos de EZ-Check.

Para que sea válido, el control negativo de laboratorio no debe contener ADN de *Salmonella* spp. Para que sea válido, el control positivo de laboratorio debe contener ADN de *Salmonella* spp. amplificado con valores Cq entre 26 y 36. Consultar el manual del usuario del software CFX Maestro Industrial Diagnostic Edition (IDE) (documento n.º 10000241897).

El usuario final es responsable de establecer e implementar los controles de laboratorio adecuados. La validez y fiabilidad de los resultados del EZ-Check *Salmonella* spp. dependen de la correcta verificación, validación y preparación de estos controles preparados por el usuario.

Ejecución de la PCR

Para iniciar la PCR, seguir las instrucciones del manual del usuario del software CFX Maestro IDE (DIR 10000241897).

F. Análisis de los datos

Los datos pueden analizarse directamente al final de la ejecución de la PCR o más tarde abriendo el archivo de datos almacenado. Seguir las instrucciones del manual del usuario del software IDE CFX Maestro para abrir los archivos de datos y configurar los parámetros de análisis de datos.

Interpretación de los resultados

Una vez establecidos los parámetros de análisis de los datos, los resultados se interpretan analizando los valores Cq de cada muestra (el ciclo en el que la curva de amplificación cruza el umbral).

El software CFX Maestro IDE permite un análisis completamente automático para los sistemas de detección por PCR en tiempo real de Bio-Rad. Antes de publicar los resultados, debe realizarse una verificación de las características típicas de las curvas de amplificación. Póngase en contacto con el equipo de asistencia técnica de Bio-Rad si necesita ayuda adicional.

Controles

Verifique los controles positivos y negativos antes de interpretar los resultados de las muestras.

Para que el experimento sea válido, los controles deben tener los siguientes resultados, resumidos en la siguiente tabla. De lo contrario, deberá repetirse la reacción.

	Detección de <i>Salmonella</i> spp. (canal FAM)	Detección de control interno (canal HEX)
Control negativo	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Control positivo	26 ≤ Cq ≤ 36	No relevante

* El software indica un valor Cq como N/A (no aplicable) cuando la fluorescencia de una muestra no se eleva significativamente por encima del ruido de fondo y por lo tanto no cruza el umbral.

Si los resultados de los controles negativos y positivos difieren de los de la tabla anterior (control inválido), repita la corrida y el análisis que se describen en D. PCR en tiempo real y E. Análisis de datos en el apartado 7. Protocolo.

Muestras

Una prueba de PCR **positiva** EZ-Check *Salmonella* spp. debe mostrar una curva de amplificación típica y un valor Cq ≥10 para el fluoróforo FAM.

- Si el valor Cq de ambos canales está por debajo de 10, verifique que la curva de los datos brutos sea una curva de amplificación normal (con una línea de base plana, seguida de un rápido aumento exponencial de la fluorescencia, y luego un aplanamiento). Si la curva parece correcta, puede considerarse una prueba positiva de *Salmonella* spp.

Si no hay un valor Cq (Cq = N/A) para FAM, o si la curva no presenta una curva de amplificación típica, debe analizarse el control interno de esa muestra.

- Esta muestra se considera **negativa en *Salmonella* spp.** si no hay un valor Cq en el canal FAM y el control interno tiene un valor Cq ≥28
- Si el control interno tampoco tiene un valor Cq (Cq = N/A), esto probablemente indica la inhibición de la reacción de PCR. La muestra debe diluirse (utilizando 10 µL de extracto de ADN, realizar una dilución 1:10 en agua destilada estéril y, a continuación, analizar 25 µL de la dilución) y la PCR debe repetirse.
- Si el valor Cq del control interno es <28, no será posible interpretar el resultado. Verificar el posicionamiento correcto del umbral y que la curva en forma de datos brutos sea una curva de amplificación típica. Si la curva no presenta una forma característica, será necesario repetir la prueba de PCR.

Apartado 9
Confirmación de los resultados positivos

La interpretación de los resultados de la prueba se resume en la siguiente tabla:

Detección de <i>Salmonella</i> spp. (canal FAM)	Detección de control interno (canal HEX)	Interpretación
Cq ≥ 10	N/A*	Positivo
Cq = N/A*	Cq ≥ 28	Negativo
Cq = N/A*	Cq = N/A*	Inhibición**

* El software indica un valor Cq como N/A (no aplicable) cuando la fluorescencia de una muestra no se eleva significativamente por encima del ruido de fondo y por lo tanto no cruza el umbral.

** Si tanto la detección de la diana como del control interno dan un valor Cq = N/A, el extracto de ADN debe diluirse con una proporción de 1 en 10 y analizarse nuevamente.

Si no se cumplen los criterios de validación, se puede dar una interpretación inválida. Comprobar los datos en bruto y proceder como si la muestra se hubiera inhibido.

Apartado 9

Confirmación de los resultados positivos

En el contexto de la validación AOAC, un resultado positivo de EZ-Check *Salmonella* spp. debe considerarse presuntamente positivo y confirmarse según un método de referencia adecuado (por ejemplo, USDA MLG, FDA BAM, ISO, MFHPB, AOAC SMPR, etc.). Como alternativa, extender 10 µL de caldo de enriquecimiento haciendo estrías directamente en RAPID'*Salmonella* Agar e incubar durante 24 ± 2 hr a 37 ± 1 °C. Cuando la flora interferente sea elevada, transferir 0,5 mL de cultivo preenriquecido a 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) e incubar durante 24 ± 3 hr a 41,5 ± 1 °C. Proceder a extender 10 µL de RVS enriquecido formando estrías en RAPID'*Salmonella* Agar. Consultar el método de confirmación descrito en el manual del usuario del RAPID'*Salmonella* Agar (documento n.º 10000126748).

En el contexto del método certificado NF VALIDATION, todos los resultados positivos con el kit EZ-Check deben confirmarse de la siguiente manera:

1. Utilizando las pruebas clásicas descritas en los métodos normalizados CEN o ISO (incluyendo la purificación) directamente desde el caldo de enriquecimiento de APT después del enriquecimiento de 18 - 26 hr a 37 °C.
2. Extendiendo 10 µL de agua de peptona tamponada haciendo estrías directamente en RAPID'*Salmonella* Agar e incubando durante 24 ± 2 hr a 37 ± 1 °C. Cuando la flora interferente sea elevada, transferir 0,1 mL de agua de peptona tamponada enriquecida a 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) e incubar durante 24 ± 3 hr a 41,5 ± 1 °C. A continuación, proceder a extender 10 µL de RVS enriquecido formando estrías en RAPID'*Salmonella* Agar. Las colonias típicas se confirman tal y como se describe en el manual del usuario de RAPID'*Salmonella*.
3. Utilizando cualquier otro método certificado por NF VALIDATION basado en un principio diferente al utilizado en el EZ-Check *Salmonella* spp. Kit. El protocolo validado de este segundo método debe seguirse íntegramente, incluyendo el enriquecimiento selectivo de RVS cuando sea necesario. La confirmación se lleva a cabo partiendo del caldo de enriquecimiento de BPW si este paso es común a ambos métodos.

Apartado 10
Confirmación de colonias aisladas usando el kit EZ-Check

En el contexto de la NF VALIDATION, el agua de peptona tamponada enriquecida puede almacenarse a una temperatura de entre 2 y 8 °C durante un máximo de 72 hr tras la incubación a 37 °C antes de llevar a cabo la confirmación.

En caso de resultados discrepantes entre el EZ-Check *Salmonella* spp. Kit y cualquiera de las opciones de confirmación enumeradas anteriormente, siga los pasos necesarios para asegurar resultados válidos.

Apartado 10

Confirmación de colonias aisladas usando el kit EZ-Check

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit también puede usarse para confirmar colonias de *Salmonella* spp. aisladas en placas de agar (fuera del ámbito de la validación AOAC). Por favor, consultar el manual del usuario del producto RAPID' *Salmonella* Agar (documento n.º 10000126748) para más información sobre las condiciones de uso.

1. Recoger una colonia aislada de una placa de agar selectivo o no selectivo con un palillo de dientes, un lazo estéril u otro consumible adaptado (por ejemplo, una punta de pipeta).
2. Resuspender la colonia en 100 µL de agua estéril destilada en un tubo de microcentrífuga. Homogeneizar en un agitador vórtex.
3. Añadir 25 µL de la suspensión directamente al reactivo PCR o a la solución EZ-Check Lysis y seguir el protocolo EZ-Check *Salmonella* spp. para la interpretación de los datos y los resultados.

Apartado 11

Aplicaciones del ensayo y validaciones

El kit EZ-Check *Salmonella* spp. es específico para la detección de *Salmonella* genus.



BRD 07/27-07/25

ALTERNATIVE ANALYTICAL
METHODS FOR AGRIBUSINESS

<http://nf-validation.afnor.org>

NF Validation

El EZ-Check *Salmonella* spp. Kit está certificado por NF VALIDATION como una alternativa al método de referencia ISO 6579 -1 (2017) para la detección de *Salmonella* spp. en todos los productos para consumo humano y animal, así como en muestras ambientales. La validación siguió el protocolo de la norma ISO 16140-2: 2016 e incluye el uso de los sistemas de PCR en tiempo real CFX Opus 96, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well y CFX Duet. El uso de la solución iQ-Check Free DNA Removal Solution está incluido en el ámbito de la validación para todas las categorías validadas, excepto para los productos de cacao y chocolate. El uso de iQ-Check Prep System v5 está incluido en el ámbito de la validación para todas las categorías validadas. El software asociado es el CFX Maestro Software IDE V4.0. El APF "EZ Salmo" está validado para todas las muestras. Número de certificado: BRD 07/27-07/25. Consulte el certificado disponible en el sitio web <http://nf-validation.afnor.org/en> para obtener información sobre su validez.



Validación AOAC

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit cuenta con la validación del Instituto de Investigación AOAC conforme a PTM 082501 para la detección de *Salmonella* spp. en ensalada preparada¹ (25 g), carne picada cruda de vacuno² (375 g), carne picada cruda de pavo² (375 g), pechugas de pollo crudas² (375 g), enjuague de canal de pollo² (30 mL), carne picada cruda de cerdo² (375 g), leche desnatada en polvo¹ (375 g), proteína de suero en polvo¹ (375 g), harina para todo uso¹ (375 g), queso cheddar¹ (375 g), lechuga romana¹ (375 g), mezcla de verduras congeladas¹ (375 g), melón fresco cortado¹ (375 g), cacao en polvo¹ (375 g), mantequilla de cacahuete cremosa¹ (375 g), pienso seco para perros¹ (375 g), fórmula infantil con probióticos¹ (375 g), ajo en polvo¹ (375 g), brotes de soja¹ (375 g), toallita de muestreo para carne cruda², superficie de acero inoxidable¹ (4" x 4", esponja), superficie de goma¹ (1" x 1", hisopo), superficie de hormigón sellado¹ (4" x 4", esponja). Un resultado positivo con el kit EZ-Check se considera no definitivo y se recomienda confirmarlo siguiendo las recomendaciones del apartado 9 anterior. El APF "EZ Salmo", el uso del Free DNA Removal Solution y el uso del CFX Opus Standard, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well, y los sistemas de PCR en tiempo real CFX Duet están validados para todas las muestras. El software asociado es el CFX Maestro IDE Software (versión 4.0 y posteriores).

¹ Probado con el método de referencia FDA BAM cap. 5

² Probado con el método de referencia USDA MLG 4.15

Apartado 12

Referencias

ISO 7218. Microbiology of the food chain — General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 6887. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1 – 6.

ISO 6579-1. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp.

ISO 16140-2. Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2024). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 4.15: Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Siluriformes (Fish) Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2024). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 5: *Salmonella*.

Visite bio-rad.com/EZCheck para más información.

Bio-Rad y EZ-Check son marcas registradas de Bio-Rad Laboratories, Inc. en diversos países.

Todas las marcas comerciales utilizadas en el presente documento son propiedad de sus respectivos propietarios.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

EZ-Check™ *Salmonella* spp. Kit

用户指南

用于食品、动物饲料及环境样本中沙门氏菌属的实时荧光定量 PCR 检测

目录 #12018082

仅供实验室体外使用

The logo for BIO-RAD, featuring the text "BIO-RAD" in white, bold, uppercase letters inside a green rounded rectangle.

目录

第 1 部分 修订记录.....	3
第 2 部分 简介.....	3
第 3 部分 EZ-Check <i>Salmonella</i> spp. 技术.....	4
第 4 部分 试剂盒成分.....	5
第 5 部分 保质期及储存条件.....	5
第 6 部分 未提供的所需材料.....	6
第 7 部分 最佳实验结果的安全预防措施及建议.....	7
第 8 部分 操作流程.....	9
A. 样本增菌.....	9
B. 游离 DNA 去除方法（可选步骤）.....	11
C. iQ-Check Prep System（可选）.....	12
D. DNA 提取.....	12
E. 实时荧光定量 PCR.....	13
F. 数据分析.....	14
第 9 部分 阳性结果的确认.....	16
第 10 部分 使用 EZ-Check 试剂盒确认单菌落.....	17
第 11 部分 测试性能和验证.....	17
第 12 部分 参考资料.....	18

第 1 部分

修订记录

发布日期	文件/版本编号	变更
2025 年 7 月	Bulletin 5145 Ver A	新文件
2025 年 8 月	Bulletin 5145 Ver B	- AOAC 审批 - 内容编辑
2025 年 10 月	Bulletin 5145 Ver C	- NF 验证扩展：可及巧克力制品，最多为 375 g， iQ-Check Prep System - 内容编辑
2026 年 4 月	公告 5145 Ver D	- NF 验证扩展：有/无益生菌和相关成分的婴儿配方 奶粉和谷物不超过 375 g，加热加工乳制品不超过 375 g，生肉和家禽制品不超过 375 g - NF 验证确认方案更正：将用于二次增菌的 RVS 中的增菌体积修改为 0.1 mL - 内容编辑

第 2 部分

简介

尽管采取了多种预防措施来控制沙门氏菌，这类细菌仍是全球最常见的食物中毒致病菌原。鸡蛋、乳制品、肉类和家禽是最常与沙门氏菌传播相关的食物（65% 的病例）。已鉴定超过 2,500 种血清型，所有这些血清型均可能对人类具有致病性。由于沙门氏菌的感染剂量低且对食品生产者和消费者构成严重威胁，多国现要求食品中沙门氏菌必须完全不存在。

传统培养方法通常耗时且繁琐。相比之下，EZ-Check *Salmonella* spp. Kit 是一种简单快速的定性检测方法，可用于检测食品、动物饲料及环境样本中沙门氏菌属特异的 DNA 序列。利用实时 PCR，可同时扩增并通过荧光探针检测沙门氏菌属特异的 DNA 序列。一次可同时处理 96 个测试，操作简便且污染风险极低。本试剂盒的预期使用者为经过培训的实验室人员，用于检测沙门氏菌属。使用本检测方法可在样本增菌后数小时内获得结果。

第 3 部分

EZ-Check *Salmonella* spp. 技术

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit 必须与 EZ-Check Lysis Kit 一起使用（目录号 12018075）。

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit 基于实时 PCR 的基因扩增和检测。

本试剂盒即用型冻干 PCR 试剂中含有 *沙门氏菌* 属特异性寡核苷酸（引物和探针），DNA 聚合酶及核苷酸。检测和分析已针对 Bio-Rad 实时 PCR 仪器（如 CFX Opus 96、CFX Opus Deepwell、CFX96 Touch Deep Well 和 CFX Duet）进行优化。

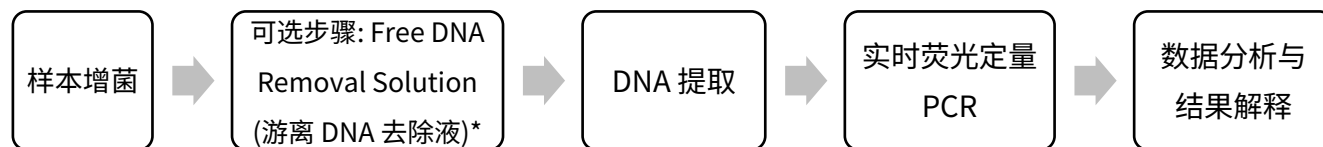
PCR 是分子生物学中使用最广泛的技术，它能在短时间内大量扩增目标 DNA。在 PCR 反应过程中，经过多次加热和冷却，可使 DNA 受热变性，然后退火，引物与目标 DNA 互补区结合，DNA 聚合酶使用这些引物和三磷酸脱氧核苷酸 (dNTP) 来扩增 DNA，从而生成目标 DNA 的扩增产物，也称“扩增子”。

在实时 PCR 中，特异性探针用于在扩增过程中与扩增子杂交，从而检测目标 DNA。这些探针与荧光基团相连，仅在与目标序列杂交时才会发出荧光。探针可与 *沙门氏菌* 属特异性 DNA 序列杂交，与该探针连接的荧光基团为 FAM。样品中如不含目标 DNA，则不会检测到荧光。随着每轮扩增后扩增量的增加，荧光强度也随之增强。光模块可以在每个 PCR 周期的退火步骤中测量荧光基团，而相关的软件可以绘制荧光强度与周期数的关系图。

反应混合物中包含合成的 DNA 内部对照，可验证任何可能的阴性结果。该对照与 *沙门氏菌* 目标 DNA 序列同时用特异性探针扩增，并由第二个荧光团检测。

该检测方法可对经过增菌步骤的多种食品制品、动物饲料和环境样本中的 *沙门氏菌* 属进行定性检测。

其中主要包括以下五个步骤：



* 使用条件请参阅 Free DNA Removal Solution（文件号 10000253856）的用户指南。

第 4 部分

试剂盒成分

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit 包含足够进行 96 项检测的试剂。

试剂 ID	产品	描述	数量
RPS	EZ-Check <i>Salmonella</i> spp. ReadyPCR Strips*	即用型 PCR 试剂	12 条 8 联盖
CAP	EZ-Check Optical Caps	光学盖	12 条 8 联盖
NC	EZ-Check Negative Control	PCR 阴性对照	1 管, 1.0 mL
PC	EZ-Check <i>Salmonella</i> spp. Positive Control	PCR 阳性对照	1 管, 0.6 mL

*EZ-Check *Salmonella* spp. ReadyPCR strips 可通过 PCR 联管两侧的紫色标签加以识别。沙门氏菌的紫色标识符号亦可见在试剂盒包装盒及 CFX Maestro IDE 软件中观察到。

第 5 部分

保质期及储存条件

- 本试剂盒以采用低温运输
- 将试剂盒储存于 2–8°C 下
- 请勿冷冻
- 请勿使用超过标签上注明有效期的试剂
- 首次开启后, ReadyPCR Strips 将试剂连同干燥剂密封于小袋中, 并在 2–8°C 保存, 可保持使用有效期最长达 5 个月。在此期间, 小袋子可重新开启使用, 最多不超过 5 次

第 6 部分

未提供的所需材料

第 6 部分

未提供的所需材料

设备和软件

- 专用于 DNA 提取：加热振荡器*，可维持 95–100°C 和/或 37±2°C 的温度，振荡速度至少为 1,300 rpm（例如，目录号 3594995 与 12022466）
- Bio-Rad 实时 PCR 系统*，例如 CFX Opus 96（目录号 17007991）或 CFX Opus Deepwell（目录号 17007992）或 CFX Duet（目录号 17010275）实时 PCR 系统
- CFX Maestro Software, Industrial Diagnostic Edition, 4.0 版（目录号 3593893）
- iQ-Check Prep System*（目录号 3594911）
- 可调多通道移液器（20–200 µL，目录号 17010702）和/或单通道移液器（20–200 µL，目录号 17010259）
- EZ-Check Lysis Rack（目录号 12019781）
- EZ-Check PCR 框架（目录号 12019771）
- 实验室专用拍打式无菌均质器：用于样品的混匀处理
- 恒温箱：用于微生物增菌

注：建议为热循环仪和 iQ-Check Prep Systems 配备不间断电源 (UPS)。

*如需了解推荐仪器的详细信息，请联系 Bio-Rad 技术支持

耗材

- EZ-Check Lysis Kit（目录号 12018075，96 项检测）
- 增菌培养基：例如缓冲蛋白胨水
BPW Plus
目录号 3564684，干粉，500 g
目录号 3554179，225 mL x 6 瓶
目录号 3555795，3 L x 4 袋
目录号 3555790，5 L x 2 袋
BPW Standard
目录号 12013259，干粉，500 g
目录号 12013258，干粉，5 kg
目录号 12013260，5 L x 2 袋
- RAPID' *Salmonella* Agar（目录号 3563961，90 mm x 20 个培养皿；目录号 3563963，90 mm x 120 个培养皿；目录号 3564705，干粉，500 g）
- Free DNA Removal Solution（目录号 3594970）
- iQ-Check Purification Reagent（目录号 12012383）
- PIF Supplement（目录号 12013322，2 g）
- 深孔微孔板（目录号 3594900）
- 适用于 5–50 µL 或 20–200 µL 移液器的兼容无菌滤芯吸头（例如，目录号 17010688）
- EZ-Check 裂解储存盖（目录号 12022880）
- PCR 封盖器（目录号 ECT2000）
- 过滤袋
- 蒸馏无菌水
- 5% 漂白剂及表面去污剂
- 无粉手套

第 7 部分

最佳实验结果的安全预防措施及建议

iQ-Check Prep System 耗材

- 适用于 Free DNA Removal Solution 的 2 mL 试管 (目录号 17010255)
- 深孔微孔板 (目录号 3594900)
- 导电滤芯枪头 (目录号 12022468, 300 μ L \times 5760)
- 60 mL 稀释容器 (目录号 12014473)

第 7 部分

最佳实验结果的安全预防措施及建议

- 免责声明: 有关标准销售条款及免责声明, 请访问:
<https://www.bio-rad.com/en-us/terms-conditions>
- 在使用该方法前, 须完整阅读本用户指南及相关试剂、仪器和软件的说明书
- 此测试必须由经过专门培训的人员操作
- 样本和增菌培养物应视为潜在传染性物质, 并应依照当地相关法规妥善处理和弃置
- 所有潜在传染性的材料在处置前应进行高压灭菌
- 结果的质量取决于是否严格遵守良好实验室规范 (例如, EN ISO 7218 标准), 尤其是微生物学和 PCR 相关操作:
 - 切勿将实验室设备 (移液管、试管等) 在不同工作台之间流通使用
 - 每个系列的扩增反应均应使用阳性对照和阴性对照
 - 试剂过期后请勿使用
 - 使用试剂盒中的阳性和阴性对照前, 应先进行涡旋振荡并离心, 以确保混匀
 - 应定期验证移液器的准确度和精确度, 以及仪器的正常运行情况
 - 经常更换手套, 尤其是当怀疑手套受到污染时
 - 使用 5% 的漂白剂和其他去污剂定期清洁工作空间
 - 使用无粉手套并避免在试管盖上留下指纹和字迹。两者均会干扰数据采集

第 7 部分

最佳实验结果的安全预防措施及建议

- 强烈建议遵守标准 EN ISO 22174（食品和动物饲料微生物学 — 用于检测食品病原体的聚合酶链反应 (PCR) — 一般要求和定义）中描述的一般要求
 - 有关更多信息和当地处理法规，请参阅安全数据表
- 针对环境样本，样本收集装置应用无菌稀释液（例如缓冲蛋白胨水进行复溶，必要时加入中和液（例如 HiCap Neutralizing Broth、Dey-Engley Neutralizing Broth 和 Letheen Broth）以消除消毒剂的影响。建议在复溶液中避免使用含芳基磺酸盐复合物的中和缓冲液
- 在打开 ReadyPCR strips 后，确保联管在 4 hr 内置于 CFX 仪器中。冻干 PCR 试剂复溶后，所得 PCR 混合物在 18–25°C 条件下稳定保存
- 运行 CFX 实时 PCR 系统时，应始终保持联管的平衡，以确保加热盖对反应块施加均匀压力
- 在使用本方法前，建议进行适用性验证或基质验证研究
- 至少按照生物安全 2 级防护要求，将 EZ-Check 试剂视为潜在生物危害材料进行处理

第 8 部分

操作流程

强烈建议您在阅读完全部操作流程后才开始进行检测。

A. 样本增菌

使用前，将增菌培养基肉汤平衡至室温 (20–25°C)。

对于增菌时间 10 hr 或更短的情况，使用前将增菌肉汤预热至样本培养温度。短时增菌对培养条件敏感，必须严格遵守指示的温度。样本制备的持续时间（增菌肉汤预热和食品样本培养开始之间的时间）不得超过 45 min。建议使用通风培养箱。

使用前将冷冻样本完全解冻。

强烈建议使用带有过滤功能的增菌袋。

如 ISO 6887-4 标准所述，建议将 α -淀粉酶用于谷物或淀粉产品的增菌。

在 NF 验证的认证范围内，样本制备可遵循或不遵循 ISO 6887-2 至 ISO 6887-6 的规定。如无特别说明，尚未对重量超过 25 g 的样本进行过测试。根据表中规定的时间和温度进行培养，无需摇动。

下表概述了可供使用的不同方案，具体取决于应用和验证范围。

增菌样本可在 2–8°C 条件下储存 72 hr，然后进行 EZ-Check 裂解步骤。

第 8 部分
操作流程

AOAC		
范围 (食品基质) ^{1,2}	样本制备	样本增菌
熟食沙拉	<ul style="list-style-type: none"> 将 25 g 或 25 mL 样本在 225 mL BPW 中均匀混合 1 min 	在 37±1°C 下培养 18–26 hr
罗马生菜	<ul style="list-style-type: none"> 将 375 g 样本在 1,125 mL 预热 (42±1°C) 的 BPW 中均匀混合 1 min 	在 42±1°C 下培养 10–24 hr
冷冻混合蔬菜、豆芽、鲜切哈密瓜	<ul style="list-style-type: none"> 将 375 g 样本在 1,125 mL 预热 (37±1°C) 的 BPW 中均匀混合 1 min 	在 37±1°C 下培养 18–22 hr
切达奶酪、可可粉	<ul style="list-style-type: none"> 将 375 g 样本在 1,125 mL BPW 中均匀混合 1 min 	在 37±1°C 下培养 18–22 hr
脱脂奶粉、乳清蛋白粉、通用面粉、添加益生菌的婴儿配方奶粉	<ul style="list-style-type: none"> 将 375 g 样本在添加了 PIF Supplement 的 1,125 mL BPW 中均匀混合 1 min 	在 37±1°C 下培养 18–26 hr
细腻花生酱	<ul style="list-style-type: none"> 将 375 g 样本在 1,125 mL 预热 (42±1°C) 的 BPW 中均匀混合 1 min 	在 42±1°C 下培养 18–24 hr
大蒜粉	<ul style="list-style-type: none"> 将 375 g 样本在预热 (37±1°C) 的 3,000 mL BPW + 0.5% K₂SO₃ 中均匀混合 1 min 	在 37±1°C 下培养 18–26 hr
生鸡肉末、生鸡胸肉	<ul style="list-style-type: none"> 将 375 g 样本在 1,125 mL 预热 (42±1°C) 的 BPW 中均匀混合 1 min 将 325 g 样本在 1,625 mL BPW 中均匀混合 1 min 	在 42±1°C 下培养 8–22 hr 在 35±2°C 下培养 20–24 hr
生牛肉末、生猪肉末	<ul style="list-style-type: none"> 将 375 g 样本在 1,125 mL 预热 (42±1°C) 的 BPW 中均匀混合 1 min 将 325 g 样本在 975 mL mTSB 中均匀混合 1 min 	在 42±1°C 下培养 8–22 hr (375 g) 在 42±1°C 下培养 15–24 hr (325 g)
鸡胴体冲洗液	<ul style="list-style-type: none"> 将 30 mL 胴体冲洗液在 30 mL 预热 (37±1°C) 的 BPW 中均匀混合 将 30 mL 胴体冲洗液在 30 mL BPW 中均匀混合 	在 37±1°C 下培养 18–22 hr 在 35±2°C 下培养 20–24 hr
生牛肉采样布、采样布	<ul style="list-style-type: none"> 将样本在 200 mL 预热 (42±1°C) 的 BPW 或 mTSB 中均匀混合 1 min 	在 42±1°C 下培养 8–22 hr (BPW) 在 42±1°C 下培养 15–24 hr (mTSB)
干狗粮	<ul style="list-style-type: none"> 将 375 g 样本在 1,125 mL BPW 中均匀混合 30 sec 	在 37±1°C 下培养 18–26 hr
不锈钢、密封混凝土、橡胶环境表面	<ul style="list-style-type: none"> 将 HiCap Neutralizing Broth 拭子和海绵润湿 将拭子置于 10 mL BPW 中手动均匀混合 30 sec 将海绵置于 60 mL BPW 中手动均匀混合 30 sec 	在 37±1°C 下培养 18–24 hr

¹ 验证步骤为直接滴加至 RAPID[®] 沙门氏菌平板。

² 如样本出现 PCR 抑制，可进行复测，或使用无菌蒸馏水进行 1:10 稀释后再检测。如仍存在 PCR 抑制，可使用 iQ-Check Purification Reagent 处理步骤或采用无菌蒸馏水中进行 1:50 稀释（需进行额外验证测试）。

NF 验证		
范围 (食品基质) ¹	样本制备	样本增菌
所有人类食品、动物饲料及环境样本	<ul style="list-style-type: none"> 将 25 g 或 25 mL 样本在 225 mL BPW 中均匀混合 1 min 	在 37±1°C 下培养 18–26 hr
环境表面	<ul style="list-style-type: none"> 用不含芳基磺酸盐复合物的中和肉汤润湿拭子和海绵 将拭子置于 10 mL BPW 中手动均匀混合 30 sec 将海绵置于 60 mL BPW 中手动均匀混合 30 sec 	在 37±1°C 下培养 18–26 hr
可可和巧克力产品 ² 最高 375 g	<ul style="list-style-type: none"> 将 n g 样本在 9 x n mL 预热 (41.5±1°C) 的 BPW 中混合均匀 (375 g/1,125 mL) 	在 41.5±1°C 下培养 18–26 hr
热加工乳制品 ³ 最高 375 g	<ul style="list-style-type: none"> 将 n g 样本在 9 x n mL 预热 (37 ± 1°C) 的 BPW 中混合均匀 (375 g/3,375 mL) 	在 37 ± 1°C 下培养 18–26 小时
生肉和家禽产品 最高 375 g	<ul style="list-style-type: none"> 将 n g 样本在 3 x n mL 预热 (41.5 ± 1°C) 的 BPW 中混合均匀 (375 g/1,125 mL) 	在 41.5 ± 1°C 下培养 8–26 小时

¹如果样品出现 PCR 抑制，应重新检测，或在无菌蒸馏水中进行 1:10 稀释后检测。若 PCR 抑制仍存在，可使用 iQ-Check Purification Reagent 处理方法或在无菌蒸馏水中进行 1:50 稀释（需进行额外验证测试）。

²在进入 DNA 提取步骤之前，必须对增菌后的样本与胰蛋白胍盐进行 1:10 稀释。若 DNA 提取物表现出 PCR 抑制，则进行复测，或使用 iQ-Check Purification Reagent 处理，或进行 1:10 稀释（在 NF 验证的认证范围内）。Free DNA Removal Solution 未针对该类别进行评估。

³为了减少成分食品类型的 PCR 抑制，在无菌蒸馏水中稀释 1:10 的 DNA 提取物。若 PCR 抑制仍存在，可使用较高的稀释比（如在无菌蒸馏水中进行 1:50 稀释，需进行额外验证测试）。

B. 游离 DNA 去除方法（可选步骤）

Free DNA Removal Solution 提供了一种去除游离 DNA 的理想方法。

1. 将 10 µL 已活化的 Free DNA Removal Solution 加入空深孔微孔板的每个孔中，每个样品对应一个孔。
2. 每孔加入 100 µL 增菌样本。

注：为避免基质碎片或脂肪层干扰，移液时应在脂肪层下方、管底碎片上方进行取样。

3. 在加热振荡装置中孵育深孔微孔板，于 37±2°C 条件下孵育 15–30 分钟，且不进行振荡。
4. 继续使用 EZ-Check Lysis 操作流程，使用 25 µL 经处理的增菌样本与 EZ-Check Lysis Kit。

更多信息请参阅 Free DNA Removal 用户指南（文档编号 10000253856）。

C. iQ-Check Prep System (可选)

iQ-Check Prep System 用于自动化 EZ-Check 工作流程，包括可选的游离 DNA 去除处理、DNA 提取和实时 PCR 板设置。

1. 打开 CFX Maestro IDE 软件，从菜单中选择“EZ Salmo”检测方案。
2. 通过选择“未知”、“阳性对照”或“阴性对照”，为板视图中的每个孔分配样品类型。
3. 为每个孔配置所需的选项（例如：FDRS、稀释度）。
4. 单击“发送到 iQ-Check Prep”以导出工作列表。
5. 根据板布局，将至少 500 μ L 的富集样品转移到深孔板的适当孔中或管中。
6. 打开仪器计算机上的 iQ-Check Prep Software。
7. 加载在步骤 4 中传输的工作清单。
8. 按照说明手动加载耗材（头、板）、试剂和准备好的样品。
9. 开始运行。
10. 运行完成后，取下 PCR 板，并使用 EZ-Check 光学盖密封条。
11. 将 EZ-Check PCR 框架放入热循环仪中。确保将带有 A1 孔的平板置于左上角，并关闭仪器盖板。

更多信息请参阅 CFX Maestro Industrial Diagnostic Edition 和 iQ-Check Prep System 用户指南。

D. DNA 提取

以下是我们的建议：

使用专用的区域、设备和耗材来完成此步骤。

检测开始前，开启加热振荡混合仪进行预热。将其设置为 95–100°C。

避免晃动增菌袋和采集大块食品碎屑。若食品样本中含有脂肪层，只需收集脂肪层以下的样本。

为获得最佳效果，在移取 DNA 提取物之前，让裂解管在无人干扰的情况下充分冷却。

第 8 部分

操作流程

EZ-Check 裂解操作流程

1. 将所需数量的 EZ-Check 裂解管（8 管/联管）置入 EZ-Check Lysis Rack。确保裂解管完全插入 EZ-Check Lysis Rack。
2. 轻轻在台面上敲打，EZ-Check Lysis Rack 使裂解试剂下沉。
3. 小心撕开裂解管上的铝箔封口。

注意： EZ-Check 裂解试剂可能在孔内侧可能形成液滴。这不会影响提取质量。

4. 向每个裂解管中加入 25 μ L 已增菌样本。如果使用游离 DNA 去除溶液，将 25 μ L 经处理的富集样品添加到裂解管中。
5. 将裂解管置于加热振荡器中，于 95–100°C 条件下，以 1,300 rpm 振荡 15–20 min。
6. 将 EZ-Check Lysis Rack 放置在台面上，在室温下静置至少 10–30 min，以冷却裂解管。

在此步骤可暂停操作，稍后继续。

- DNA 提取物可在 EZ-Check 裂解管 中使用 EZ-Check 裂解储存盖密封保存 7 天，温度为 2–8°C。
- 如需冷冻保存（–25°C 至 –15°C），应将提取的 DNA 转移至单独试管中密封，可保存最长 30 天（不在 AOAC 验证和 NF 验证范围内）。

E. 实时荧光定量 PCR

仪器和软件设置

关于仪器和软件设置，请遵循 CFX Maestro Industrial Diagnostic Edition (IDE) 软件用户指南中的说明。

PCR 检测准备

1. 打开 EZ-Check *Salmonella* spp. ReadyPCR Strips 包装袋。
2. 从铝箔袋中取出所需数量的联管（样本加上两个对照的数量）。

注： 将未使用的联管与干燥剂一起正确重新密封于袋内。

3. 将 ReadyPCR Strips 放置在 EZ-Check PCR Frame 上，确保联管牢固固定于框架。建议在操作台上轻拍 EZ-Check PCR 框架，以确保 PCR 孔内小珠沉至底部。

第 8 部分

操作流程

- 小心撕开每条联管上的铝箔封口，并目测确认每个 PCR 孔内是否有一枚珠子。一旦开启，ReadyPCR strips 在复水前可保持稳定状态长达 4 hr。
- 依照平板布局，将 25 μ L DNA 提取物沿每个孔的内壁小心转移至 ReadyPCR Strips 中。切勿从裂解管底部吸取 DNA 提取物，以避免将 PCR 抑制物转移至 PCR 孔中。

注：起泡反应表明样本已正确加入至 PCR 试剂中。

- 对于阴性与阳性对照，将 25 μ L EZ-Check 阴性对照 (NC) 与 EZ-Check 沙门氏菌属阳性对照 (PC) 沿相应 ReadyPCR 孔壁内侧小心转移加入。

注：PCR 运行必须在 ReadyPCR strip 开启后 4 hr 内启动。

- 可选步骤: 为纯化 DNA，将每个样本中提取的 50 μ L DNA 混合于 200 μ L 的 iQ-Check Purification Reagent。上下吸放 5 次以确保均匀混合。或者，可以使用无菌水对提取的 DNA 进行 1:10 稀释。此步骤未在 NF 验证的认证期间进行测试。
- 使用 EZ-Check 光学盖将 PCR 联管的孔密封严实。
- 将 EZ-Check PCR Frame 置于热循环仪中。确保将带有 A1 孔的平板置于左上角，并关闭仪器盖板。

实验室对照组制备（可选步骤）

实验室对照组作为食物样本处理。它们用于验证完整的 EZ-Check 工作流程。来自实验室对照样本的提取 DNA 被置于 PCR 平板上，并作为 PCR 平板对照品使用，以替代 EZ-Check 阴性与阳性对照。

为使结果有效，实验室阴性对照不得含有沙门氏菌属 DNA。为使结果有效，实验室阳性对照必须含有沙门氏菌属 DNA，且其扩增 Cq 值应在 26 到 36 之间。参阅 CFX Maestro Industrial Diagnostic Edition (IDE) 软件用户指南（文件编号 10000241897）。

最终用户负责建立并实施适当的实验室对照。EZ-Check *Salmonella* spp 结果的有效性与可靠性取决于用户所制备对照的正确核查、验证与制备。

运行 PCR

要 PCR 运行，请按照 CFX Maestro IDE 软件用户指南 (DIR 10000241897) 中的说明。

F. 数据分析

可在 PCR 运行结束时或稍后打开存储的数据文件直接分析数据。请参阅 CFX Maestro IDE 软件用户手册中的说明，来打开数据文件并设置数据分析参数。

第 8 部分

操作流程

结果解释

设置数据分析参数后，可通过分析每个样本的 Cq 值（扩增曲线与阈值相交的循环）来解读检测结果。

CFX Maestro IDE 软件可对 Bio-Rad 实时荧光定量 PCR 检测系统进行完整的自动化分析。在发布结果之前，应验证扩增曲线的典型特征。如需进一步支持，请联系您的 Bio-Rad 技术支持团队。

对照

在解释样本结果之前，需核实阳性和阴性对照。

为了使实验有效，对照必须具有下表所示结果。否则必须重新进行 PCR 反应。

	沙门氏菌属检测 (FAM 通道)	内部对照检测 (HEX 通道)
阴性对照	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
阳性对照	$26 \leq Cq \leq 36$	不相关

* 当样本的荧光信号未明显高于背景干扰，且未超过阈值时，软件会显示 Cq 值为 N/A（不适用）。

如果阴性和阳性对照的结果与上表中的结果不同（无效对照），则重复第 7 部分“操作流程”中的“D. 实时 PCR”和“E. 数据分析”中描述的操作和分析。

样本

阳性 EZ-Check *Salmonella* spp. PCR 检测必须显示典型的扩增曲线，并且 FAM 荧光团的 Cq 值 ≥ 10 。

- 如果两个通道的 Cq 值均小于 10，请核实原始数据曲线是否是正常的扩增曲线（具有平坦的基线，随后荧光发射呈指数快速增加，最后趋于平坦）。如果曲线正常，则可视为沙门氏菌属阳性检测。

如果没有 FAM Cq 值（Cq = N/A），或曲线不是典型扩增曲线，则必须分析该样本的内部对照。

- 如果无 FAM Cq 值但内部对照 Cq 值 ≥ 28 ，则可将样本视为**阴性**沙门氏菌属样本。
- 如果内部对照也无 Cq 值（Cq = N/A），说明 PCR 反应未正常进行。需将样本进行稀释（将 10 μ L DNA 提取物用无菌蒸馏水 1:10 稀释后，取 25 μ L 稀释液进行检测）并重新进行 PCR。
- 如果内部对照 Cq 值 < 28 ，则无法解释结果。需核实阈值是否设置正确，或原始数据曲线是否为正常扩增曲线。如果曲线不具有典型形状，则需重新进行 PCR 检测。

第 9 部分

阳性结果的确认

检测结果解释如下表所示：

沙门氏菌属检测 (FAM 通道)	内部对照检测 (HEX 通道)	解释
$Cq \geq 10$	N/A*	阳性
$Cq = N/A^*$	$Cq \geq 28$	阴性
$Cq = N/A^*$	$Cq = N/A^*$	反应抑制**

* 当样本的荧光信号未明显高于背景干扰，且未超过阈值时，软件会显示 Cq 值为 N/A（不适用）。

** 当目标检测和内部对照检测均为 Cq 值 = N/A 时，必须将 DNA 提取物按 1:10 稀释并再次进行检测。

当不满足验证标准时，可视为无效结果。如果样本的反应被抑制，需检查原始数据并重新进行检测。

第 9 部分

阳性结果的确认

如果是 AOAC 验证，阳性 EZ-Check *Salmonella* spp. 结果应被假定为阳性，并按照适当的参考方法（例如 USDA MLG、FDA BAM、ISO、MFHPB、AOAC SMPR 等方法）进行确认。或者，将 10 μ L 增菌培养液直接划线至 RAPID' *Salmonella* Agar，并于 37 \pm 1 $^{\circ}$ C 培养 24 \pm 2 hr。当干扰菌群可能较高时，将 0.5 mL 预增菌培养物转移至 10 mL Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) 肉汤中，在 41.5 \pm 1 $^{\circ}$ C 培养 24 \pm 3 hr。随后将 10 μ L 增菌 RVS 液划线至 RAPID' *Salmonella* Agar。参阅 RAPID' *Salmonella* Agar 用户指南（文档号 10000126748）中描述的确认方法。

在 NF 验证认证方法中，所有阳性 EZ-Check 试剂盒结果必须通过下列方法进行确认：

1. 使用标准 CEN 或 ISO 方法中描述的经典检测（包括纯化），在 37 $^{\circ}$ C 下增菌 18–26 hr 后，直接从 BPW 增菌肉汤中提取。
2. 通过将 10 μ L 增菌 BPW 直接划线至 RAPID' *Salmonella* Agar，并于 37 \pm 1 $^{\circ}$ C 培养 24 \pm 2 hr。当干扰菌群可能较高时，将 0.1 mL 增菌 BPW 转移至 10 mL Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) 肉汤中，并于 41.5 \pm 1 $^{\circ}$ C 培养 24 \pm 3 hr，然后继续将 10 μ L 增菌 RVS 划线至 RAPID' *Salmonella* Agar。典型菌落确认方法请参照 RAPID' 沙门氏菌用户指南。
3. EZ-Check *Salmonella* spp. Kit 使用任何其他由 NF，且原理不同于本方法的检测方法。必须严格遵循第二种方法的验证方案，包括在需要时的进行 RVS 选择性增菌步骤。如果这两种方法均使用该步骤，则从 BPW 增菌肉汤中进行确认。

在 NF 验证方法中，增菌 BPW 可在 37 $^{\circ}$ C 培养结束后于 2–8 $^{\circ}$ C 储存最长 72 hr，之后再行确认步骤。

第 10 部分

使用 EZ-Check 试剂盒确认单菌落

如果 EZ-Check *Salmonella* spp. Kit 和上面列出的任何确认选项之间的结果不一致，请遵循必要的步骤以确保结果有效。

第 10 部分

使用 EZ-Check 试剂盒确认单菌落

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit 亦可用于确认琼脂平板上单个分离的 *沙门氏菌属* 菌落（不在 AOAC 验证范围内）。有关使用条件，请参阅 RAPID' *Salmonella* Agar 用户指南（文件号 10000126748）。

1. 使用牙签、无菌接种环或其他适用耗材（如移液枪枪头）从选择性或非选择性培养基平板上挑取单个分离菌落。
2. 在微量离心管中，将菌落重新悬浮于 100 μ L 蒸馏无菌水中。并使用涡旋振荡器混匀。
3. 将 25 μ L 悬液直接加入 PCR 试剂或加入 EZ-Check 裂解液中，并根据 EZ-Check *Salmonella* spp. 操作步骤进行数据与结果解释。

第 11 部分

测试性能和验证

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit 对 *沙门氏菌属* 具有特异性。



NF 验证

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit 已通过 NF 验证认证，可作为参考方法 ISO 6579 -1 (2017) 的替代方法，用于检测人类和动物消费的所有产品以及环境样本中的 *沙门氏菌属*。验证遵循 ISO 16140-2: 2016 标准的方案，包括使用 CFX Opus 96, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well 和 CFX Duet 实时 PCR 系统。除可与巧克力产品外，iQ-Check Free DNA Removal Solution 的使用已被纳入所有验证类别的验证范围。iQ-Check Prep System v5 的使用已被纳入所有验证类别的验证范围。相关软件为 CFX Maestro Software IDE V4.0。

“EZ Salmo” APF 已对所有样本完成验证。证书编号：BRD 07/27-07/25。有关有效性信息，请参考网站 <http://nf-validation.afnor.org/en> 上提供的证书。

BRD 07/27-07/25

农业企业的替代分析方法

<http://nf-validation.afnor.org>



AOAC 验证

EZ-Check *Salmonella* spp. Kit 已由 AOAC Research Institute 根据 PTM 082501 进行验证，用于检测以下样本中的沙门氏菌属：熟食沙拉¹ (25 g)、生牛肉末² (375 g)、生火鸡肉末² (375 g)、生鸡胸肉² (375 g)、鸡胴体冲洗液² (30 mL)、生猪肉末² (375 g)、脱脂奶粉¹ (375 g)、乳清蛋白粉¹ (375 g)、通用面粉¹ (375 g)、切达干酪¹ (375 g)、长叶莴苣¹ (375 g)、冷冻蔬菜混合物¹ (375 g)、切块哈密瓜¹ (375 g)、可可粉¹ (375 g)、奶油花生酱¹ (375 g)、干狗粮¹ (375 g)、益生菌婴儿配方奶粉¹ (375 g)、大蒜粉¹ (375 g)、豆芽¹ (375 g)、生牛肉采样布²、不锈钢表面¹ (4" x 4"，海绵)、橡胶表面¹ (1" x 1"，拭子)、封闭混凝土表面¹ (4" x 4"，海绵)。EZ-Check 试剂盒所得阳性结果被视为推定阳性，建议根据上述第 9 节的建议进行确认。“EZ Salmo” APF、Free DNA Removal Solution、CFX Opus Standard, CFX Opus Deepwell, CFX96 Touch Deep Well 以及 CFX Duet 实时 PCR 系统的使用已对所有样本完成验证。关联软件为 CFX Maestro IDE Software (4.0 及更高版本)。

¹ 与 FDA BAM 第 5 章参考方法比对测试

² 与 USDA MLG 4.15 参考方法比对测试

第 12 部分

参考资料

ISO 7218. Microbiology of the food chain — General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 6887. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1 – 6.

ISO 6579-1. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp.

ISO 16140-2. Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2024). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 4.15: Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Siluriformes (Fish) Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2024). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 5: *Salmonella*.

请访问 [bio-rad.com/EZCheck](https://www.bio-rad.com/EZCheck) 了解更多信息。

Bio-Rad 和 EZ-Check 是 Bio-Rad Laboratories, Inc. 在某些司法管辖区的商标。

本文所使用的所有商标均归其各自所有者所有。

BIO-RAD

**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website [bio-rad.com](https://www.bio-rad.com) **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23
