
iQ-Check *Vibrio* Kit

User Guide

Test for the real-time PCR detection of *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* in food samples

Catalog #12006574

BIO-RAD

Table of Contents

Section 1	Introduction	1
Section 2	iQ-Check <i>Vibrio</i> Technology	1
Section 3	Kit Components	2
Section 4	Shelf Life and Storage	2
Section 5	Materials Required but Not Supplied	2
	Equipment	2
	Supplies	3
Section 6	Safety, Precautions, and Recommendations for Best Results	3
Section 7	Protocol	5
	Sample Enrichment	5
	Free DNA Removal Treatment	5
	DNA Extraction	5
	Real-Time PCR	6
	Data Analysis	6
Section 8	Confirmation of Positive Results	8
	All Samples	8
Section 9	Confirmation of Single Colonies Using the iQ-Check Kit	8
Section 10	Test Performance and Validations	8
Section 11	References	9
Section 12	Revision History	9
	Appendix — PCR Mix Calculation Guide	10

Section 1 Introduction

Vibrio spp. represents a serious threat to human health. Three species in particular (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus*) are linked to gastrointestinal issues and can lead to infections and septicemia.

This risk is linked primarily to the consumption of raw or undercooked seafood. Research into and management of this risk are crucial for worldwide seafood safety and the global seafood market.

Section 2 iQ-Check *Vibrio* Technology

The iQ-Check *Vibrio* Kit is a multiplex test based on gene amplification and detection by real-time PCR. The ready-to-use PCR reagents in the kit contain oligonucleotides (primers and probes) specific for *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus*, 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 CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System, with analysis by CFX Manager IDE Software.

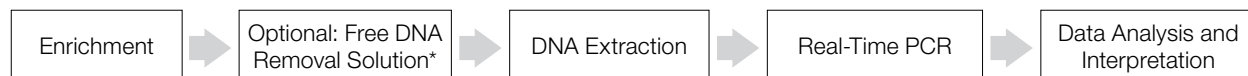
PCR is a powerful technique used to generate many copies of target DNA. The PCR reaction consists of cycles of heating and cooling to denature the DNA followed by the binding of primers to a specific target region. The DNA polymerase then uses these primers and deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) to extend the DNA, thereby creating copies of the target DNA. These copies are called amplicons.

In real-time PCR, probes are used to detect specific targets on the DNA during the amplification step. These probes are linked to a dye that emits fluorescence only when it's hybridized to the target 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 of the real-time PCR instrument measures this fluorescence at the annealing step during each PCR cycle while CFX Manager IDE Software plots the fluorescence intensity versus number of cycles.

A synthetic DNA internal control is included in the iQ-Check *Vibrio* Kit reaction mix to validate any possible negative results. This control is amplified at the same time as the *Vibrio* target DNA sequences and is detected by a specific probe coupled with another fluorophore.

This test allows the qualitative detection of *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* in food samples previously enriched by culture. The main targeted matrices are seafood, including fish and shellfish (mollusks and crustaceans).

The test includes five main steps:



* Please refer to the product insert, iQ-Check Free DNA Removal Solution for Food, Water, and Environmental Samples (10000058391), for the conditions of use.

Section 3

Kit Components

The iQ-Check *Vibrio* Kit contains sufficient reagents for 96 tests (94 samples).

Reagent ID	Reagent	Quantity Provided, ml
A	Lysis reagent I	1 bottle, 20
B	Fluorescent probes	1 tube, 0.55
C	Amplification mix	1 tube, 4.4
D	PCR negative control	1 tube, 0.5
E	PCR positive control	1 tube, 0.25

Section 4

Shelf Life and Storage

Once received, the kit must be stored at 2–8°C. Reagents stored at this temperature can be used until the expiration date indicated on the tubes.

Section 5

Materials Required but Not Supplied

Equipment

- Lab paddle blender for homogenizing test samples
- Incubator for sample microbiological enrichment
- Specific for extraction in sterile 1.5 ml conical screwcap tubes:
 - Dry heat block at 37 ± 2°C and/or 95–100°C
- Specific for extraction in deep well plate:
 - Heating thermoshaker* capable of maintaining 37 ± 2°C and/or 95–100°C, with a mixing speed of at least 1,300 rpm
- Vortexer
- 20, 200, and 1,000 µl micropipets
- Tips for repeat pipettors; sterile, individually packaged
- Bio-Rad real-time PCR system,* for example, the CFX96 Touch Deep Well System (catalog #3600037)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System for automated DNA extraction and PCR plate setup (catalog #3594911)

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

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

Supplies

- Enrichment medium: *Vibrio* Enrichment Broth (VEB), 500 g (catalog #12007405) or alkaline saline peptone water (ASPW) or alkaline saline water (ASW)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalog #3594970)
- Specific for extraction in tubes:
 - 1.5 ml conical screwcap tubes, sterile (for example, catalog #2240110XTU)
- Specific for extraction in a deep well plate:
 - 96-well deep well plate (catalog #3594900)
 - Plastic sealing film (catalog #3590139)
 - Pre-pierced sealing film or Pre-Pierced Plate Sealing Film (catalog #3600040, North America only)
- PCR plates, tubes, sealing tape, and caps
- Sterile filter tips adaptable to 20, 200, and 1,000 μ l micropipets
- Tips for Combitip Pipets or equivalent repeat pipettors; sterile, individually packaged
- 2 and 5 ml sterile test tubes
- Powder-free gloves
- Distilled sterile water
- Bleach, 5%
- Cleaning agent such as DNA AWAY or RNase AWAY

Section 6

Safety, Precautions, and Recommendations for Best Results

- 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
- iQ-Check *Vibrio* Kit:
 - All substances or mixtures in the test kit are classified products, according to the Globally Harmonized System (GHS). Contact with acids may cause release of toxic gases. No special precautions are necessary if used correctly. If the product is inhaled, supply fresh air and consult a doctor in case of complaints. After eye contact with the product, rinse opened eye for several minutes under running water. If the products are swallowed, induce vomiting and call for medical help

- iQ-Check Prep System:
 - Improper use of the iQ-Check Prep System may cause personal injury or damage to the instrument. Some components may pose a risk of personal injury due to excessive heat if improperly handled. For safe use, the iQ-Check Prep System must be operated only by qualified laboratory personnel who have been appropriately trained. Servicing of instrument must be performed only by Bio-Rad field service engineers
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System:
 - Improper use of the CFX96 Touch Deep Well System may cause personal injury or damage to the instrument. Some components may pose a risk of personal injury due to excessive heat if improperly handled. For safe use, the CFX96 Touch Deep Well System must be operated only by qualified laboratory personnel who have been appropriately trained. Servicing of instrument must be performed only by Bio-Rad Field Service Engineers
- Enrichment:
 - The user should read, understand, and follow all safety information in the instructions for the iQ-Check *Vibrio* Kit. Retain the safety instructions for future reference. To reduce the risks associated with exposure to chemicals and biohazards, perform pathogen testing in a properly equipped laboratory under the control of trained personnel. Always follow standard laboratory safety practices, including wearing appropriate protective apparel and eye protection while handling reagents and contaminated samples. Avoid contact with the contents of the enrichment media and reagent tubes after amplification. Dispose of enriched samples according to current industry standards
 - *Vibrio* is a Biosafety Level 2 organism. Biological samples such as enrichments have the potential to transmit infectious diseases. Follow all applicable local, state/provincial, and/or national regulations on disposal of biological waste. Wear appropriate protective equipment, which includes, but is not limited to, protective eyewear, face shield, clothing/lab coat, and gloves. All work should be conducted in properly equipped facilities utilizing the appropriate safety equipment (for example, physical containment devices). Individuals should be trained in accordance with applicable regulatory and company/institution requirements before working with potentially infectious materials
 - When testing is complete, all materials and media possibly containing pathogens should be decontaminated following current industry standards for the disposal of contaminated waste (that is, autoclave for 20 min at 120°C). Consult the Safety Data Sheet for additional information and local regulations for disposal
- The quality of results depends on strict compliance with Good Laboratory Practices (for example, the EN ISO 7218 standard), especially concerning 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 reagents 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 work spaces periodically with 5% bleach and other decontaminating agents such as DNA AWAY
- 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 22174:2005 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions)

Section 7

Protocol

It is strongly recommended to read the entire protocol before starting the test. Handle seafood samples as described in the standard methods (for example, ISO 7218:2007 or FDA BAM Chapter 9).

Sample Enrichment

Homogenize n g of sample in $9 \times n$ ml of VEB or ASPW or ASW (for example, 25 g in 225 ml) in a mixing bag with a lab paddle blender.

For VEB, incubate, without shaking, for 8 ± 1 hr at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ or $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Please refer to applicable local standards, regulations, and/or recommendations.

For ASPW or ASW, please refer to applicable local standards, regulations, and/or recommendations for incubation time and temperature.

Free DNA Removal Treatment

The iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalog #3594970) provides an ideal way to remove free DNA. Follow Bio-Rad's recommendations in the user guide.

DNA Extraction

General recommendations:

Turn on the heat block or thermoshaker to preheat before starting the test. Set it to $95\text{--}100^\circ\text{C}$. Keep the lysis reagent in suspension while pipetting by stirring at medium speed on a magnetic stir plate.

1. Add 100 μl of lysis reagent to all wells of the deep well plate or to tubes that contain enriched samples untreated or treated with the Free DNA Removal Solution (see previous paragraph).
2. Mix by pipetting up and down, and then close the tubes with caps or seal the deep well plate with prepierced sealing film.
3. Incubate the tubes in the appropriate heat block at $95\text{--}100^\circ\text{C}$ for 15–20 min or the deep well plate in the thermoshaker for 15–20 min at a mixing speed of 1,300 rpm minimum.
4. If using a deep well plate, allow it to cool to room temperature ($20\text{--}25^\circ\text{C}$).

If you choose to temporarily stop the procedure, this is the recommended stopping point. The supernatant can be stored for up to 1 year at -20°C . Before reusing it, always allow it to thaw and homogenize, and then centrifuge tubes at $10,000\text{--}12,000 \times g$ for 5 min.

The iQ-Check *Vibrio* Kit test can be performed on the iQ-Check Prep Automation System (DNA extraction, Free DNA Removal Treatment, if required, and PCR setup).

Real-Time PCR

1. For instrument and software setup, follow instructions in the CFX Manager IDE Software User Manual.
2. Prepare the PCR mix.

- a. Prepare the PCR mix containing the amplification solution (reagent C) and the fluorescent probes (reagent B) according to the number of samples and controls to be analyzed. At least one positive and one negative control must be included in each PCR run. Use the pipetting table in Section 12 Appendix — PCR Mix Calculation Guide to find the correct volumes to use for each reagent.

Note: The PCR mix (reagents B + C) must be used immediately. It is stable for 1 hr maximum at 2–8°C.

- b. Pipet 45 µl of the PCR mix into each well according to your plate setup.
 - c. Add 5 µl of sample, reagent D (negative control), or reagent E (positive control). Do not vortex the sample before pipetting. Pipet carefully to avoid bubbles at the bottom of the wells. Hermetically seal the wells of the plate or tube strips. As an optional step, centrifuge the sealed PCR plate or the PCR tube strips (quick spin) to eliminate any bubbles.
 - d. Place the plate or tube strips in the thermal cycler. Be sure to place the plate correctly with the A1 well at the upper left corner. Close the reaction module.
3. Start the PCR run.

To start the PCR run, follow instructions in the CFX Manager IDE Software User Manual.

Data Analysis

Data can be analyzed directly at the end of the PCR run or at a later time by opening the stored data file. Follow instructions in the corresponding CFX Manager 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 quantification cycle (Cq) values of each sample (the cycle at which the amplification curve crosses the threshold).

CFX Manager IDE Software allows complete automated analysis for Bio-Rad real-time PCR detection systems.

Controls

Verify the positive and negative controls before interpreting sample results.

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

	Vibrio Detection FAM, Cy5, and Texas Red Channels	Internal Control Detection HEX Channel
Negative control	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 36$
Positive control	$26 \leq Cq \leq 36$	Not significant

* When both *Vibrio* and internal control detection give a Cq value = N/A (not applicable), the sample must be diluted (1:10) and tested again.

If results of negative and positive controls differ from those in the Controls table, repeat the PCR run.

Samples

A *Vibrio* sample must have a Cq value ≥ 10 for the *V. cholerae* and/or *V. parahaemolyticus* and/or *V. vulnificus* fluorophore(s) to be considered positive. If the Cq value is less than 10, check the raw data and verify that the curve is a regular amplification curve (a flat baseline followed by a rapid increase of fluorescence and then a flattening out). If the curve seems correct, it may be considered a positive *Vibrio* sample.

If there is no Cq value (Cq = N/A) for *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* targets, or if the curve is not a typical amplification curve, the internal control for that sample must be analyzed:

- A *Vibrio* sample is considered negative if the *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* Cq values are N/A and the internal control Cq is ≥ 28
- If the internal control also has no Cq value (Cq = N/A), this probably indicates inhibition of the PCR reaction. Dilute the sample (perform a 1:10 dilution in distilled sterile water using 10 μ l of DNA extract), use 5 μ l of the dilution for amplification, and repeat the PCR test
- If the Cq value for the internal control is < 28 , it is not possible to interpret the result. Verify that the threshold was correctly placed or that the raw data curve is a regular amplification curve. If the curve does not have a characteristic shape, repeat the PCR test

Interpretation of sample results is summarized in the following table:

Vibrio Detection Vc (Texas Red) and/or Vp (FAM) and/or Vv (Cy5) Channels	Internal Control Detection IC (HEX) Channel	Interpretation
Cq ≥ 10	N/A	Positive
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negative
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition*

* When both *Vibrio* and internal control detection give a Cq value = N/A, the sample must be diluted (1:10) and tested again.

Section 8

Confirmation of Positive Results

Positive iQ-Check results should be confirmed.

All Samples

For the confirmation test, start from the *Vibrio* Enrichment Broth after the minimum 8 ± 1 hr enrichment at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ or $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Use methods described in ISO 21872-1:2017, FDA BAM Chapter 9, or other standard methods.

Section 9

Confirmation of Single Colonies Using the iQ-Check Kit

The iQ-Check *Vibrio* Kit may also be used to confirm single isolated colonies on agar plates.

1. Pick an isolated colony, selective or nonselective, from an agar plate with a toothpick, sterile loop, or other adapted consumable (for example, a pipet tip).
2. Resuspend the colony in 100 μl tryptone salt or distilled sterile water in a microcentrifuge tube. Homogenize using a vortexer.
3. Use 5 μl of the suspension with 45 μl of PCR mix (see D. Real-Time PCR in Section 7 Protocol) and follow the rest of the iQ-Check *Vibrio* protocol for the data and result interpretation.

Section 10

Test Performance and Validations



The iQ-Check *Vibrio* Kit (Easy Protocol and Easy Protocol with optional Free DNA Removal Protocol) has been validated by the AOAC Research Institute under the Performance Tested Method Program for detection of *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* in cooked shrimp, raw mussels, raw oysters, raw shrimp, and raw tuna. A positive result with iQ-Check should be considered presumptive and it is recommended that the result be confirmed by standard reference methods (see Section 11). Certificate number: 032002.

Section 11

References

ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 21872-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the determination of *Vibrio* spp.

ISO 22174:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions.

U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2004). Bacteriological Analytical Manual — Chapter 9. *Vibrio*.

Section 12

Revision History

Release Date	Document Number	Change
04.09.18	10000095779 Ver A	
06.19.18	10000095779 Ver B	Editorial changes
03.24.20	10000095779 Ver C	Editorial changes for AOAC-PTM validation Additional information for Sample Enrichment in Section 7

Appendix — PCR Mix Calculation Guide

To find the correct volumes for preparing the PCR mix, add the total number of samples and controls to be analyzed and find the corresponding volumes of reagent B and reagent C.

Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, μl	Amplification Mix Reagent C, μl	Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, μl	Amplification Mix Reagent C, μl	Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, μl	Amplification Mix Reagent C, μl
1	5	40	33	178	1,400	65	351	2,800
2	11	86	34	184	1,500	66	356	2,900
3	16	130	35	189	1,500	67	362	2,900
4	22	173	36	194	1,600	68	367	2,900
5	27	216	37	200	1,600	69	373	3,000
6	32	259	38	205	1,600	70	378	3,000
7	38	302	39	211	1,700	71	383	3,100
8	43	346	40	216	1,700	72	389	3,100
9	49	389	41	221	1,800	73	394	3,200
10	54	432	42	227	1,800	74	400	3,200
11	59	475	43	232	1,900	75	405	3,200
12	65	518	44	238	1,900	76	410	3,300
13	70	562	45	243	1,900	77	416	3,300
14	76	605	46	248	2,000	78	421	3,400
15	81	648	47	254	2,000	79	427	3,400
16	86	691	48	259	2,100	80	432	3,500
17	92	734	49	265	2,100	81	437	3,500
18	97	778	50	270	2,200	82	443	3,500
19	103	821	51	275	2,200	83	448	3,600
20	108	864	52	281	2,200	84	454	3,600
21	113	907	53	286	2,300	85	459	3,700
22	119	950	54	292	2,300	86	464	3,700
23	124	994	55	297	2,400	87	470	3,800
24	130	1,000	56	302	2,400	88	475	3,800
25	135	1,100	57	308	2,500	89	481	3,800
26	140	1,100	58	313	2,500	90	486	3,900
27	146	1,200	59	319	2,500	91	491	3,900
28	151	1,200	60	324	2,600	92	497	4,000
29	157	1,300	61	329	2,600	93	502	4,000
30	162	1,300	62	335	2,700	94	508	4,100
31	167	1,300	63	340	2,700	95	513	4,100
32	173	1,400	64	346	2,800	96	518	4,100

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

BIO-RAD is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK is a trademark of Bio-Rad Europe GmbH 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 2 3473 4460 **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



iQ-Check *Vibrio* Kit

Guide d'utilisation

Test pour la détection par PCR en temps réel de *Vibrio cholerae*,
V. parahaemolyticus et *V. vulnificus* dans les échantillons d'aliments

N° de référence 12006574



Sommaire

Section 1	Introduction	1
Section 2	Technologie iQ-Check <i>Vibrio</i>	1
Section 3	Composants du kit	2
Section 4	Durée de conservation et stockage.....	2
Section 5	Matériel requis non fourni.....	2
	Matériel	2
	Produits.....	3
Section 6	Sécurité, précautions et recommandations pour des résultats optimaux	3
Section 7	Protocole.....	5
	Enrichissement de l'échantillon	5
	Traitement d'élimination de l'ADN libre	5
	Extraction de l'ADN	5
	PCR en temps réel.....	6
	Analyse des données.....	6
Section 8	Confirmation des résultats positifs	8
	Tous les échantillons.....	8
Section 9	Confirmation de colonies isolées à l'aide du kit iQ-Check.....	8
Section 10	Performances du test et validations	8
Section 11	Références.....	9
Section 12	Historique des révisions	9
	Annexe – Guide de calcul du mélange de PCR	10

Section 1 Introduction

Vibrio spp. représente une menace grave pour la santé humaine. Trois espèces en particulier (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*) sont associées à des troubles gastro-intestinaux et peuvent causer des infections et une septicémie.

Ce risque est principalement lié à la consommation de poissons et fruits de mer crus ou insuffisamment cuits. Il est crucial d'étudier et de gérer ce risque, pour la sécurité relative à la consommation de poissons et fruits de mer et le marché correspondant dans le monde entier.

Section 2 Technologie iQ-Check *Vibrio*

Le kit iQ-Check *Vibrio* est un test multiplex basé sur l'amplification et la détection des gènes par PCR en temps réel. Les réactifs de PCR prêts à l'emploi de ce kit contiennent des oligonucléotides (amorces et sondes) propres à *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*, 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 le système CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection, avec logiciel d'analyse CFX Manager IDE.

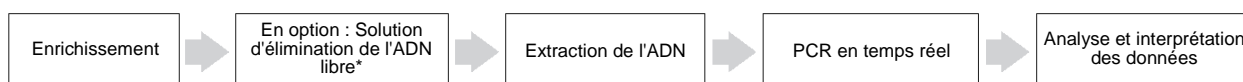
La PCR (amplification en chaîne par polymérase) est une technique puissante utilisée pour générer de nombreuses copies d'ADN cible. La réaction de PCR se compose de cycles de chauffage et de refroidissement pour dénaturer l'ADN, suivis de l'hybridation d'amorces avec une région cible spécifique. L'ADN polymérase utilise alors ces amorces et désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) pour étendre l'ADN, et créer ainsi des copies de l'ADN cible. Ces copies sont appelées amplicons.

Dans la PCR en temps réel, des sondes sont utilisées pour détecter des cibles spécifiques sur l'ADN lors de l'étape d'amplification. Ces sondes sont liées à un colorant qui émet de la fluorescence uniquement lorsqu'il est hybridé avec la séquence cible. 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 de l'instrument de PCR en temps réel mesure cette fluorescence à l'étape d'hybridation pour chaque cycle de PCR tandis que le logiciel CFX Manager IDE enregistre l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles.

Le mélange réactionnel du kit iQ-Check *Vibrio* comprend un contrôle interne d'ADN synthétique afin de valider tout résultat négatif éventuel. Ce contrôle est amplifié en même temps que les séquences d'ADN cible de *Vibrio* et est détecté par une sonde spécifique couplée avec un autre fluorophore.

Ce test permet la détection qualitative de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* dans les échantillons d'aliments préalablement enrichis par culture. Les principales matrices ciblées sont les fruits de mer, les poissons ainsi que les mollusques et crustacés.

Ce test comprend cinq étapes principales :



* Se reporter à la notice du produit iQ-Check Free DNA Removal Solution for Food, Water, and Environmental Samples (1000058391) pour les conditions d'utilisation.

Section 3

Composants du kit

Le kit iQ-Check *Vibrio* contient suffisamment de réactifs pour 96 tests (94 échantillons).

ID réactif	Réactif	Quantité fournie, ml
A	Réactif de lyse I	1 flacon, 20
B	Sondes fluorescentes	1 tube, 0,55
C	Mélange d'amplification	1 tube, 4,4
D	Contrôle négatif PCR	1 tube, 0,5
E	Contrôle positif PCR	1 tube, 0,25

Section 4

Durée de conservation et stockage

Après réception, le kit doit être stocké à 2-8 °C. Les réactifs stockés à cette température peuvent être utilisés jusqu'à la date d'expiration indiquée sur les tubes.

Section 5

Matériel requis non fourni

Matériel

- Stomacher de laboratoire pour homogénéiser les échantillons de test
- Incubateur pour l'enrichissement microbiologique des échantillons
- Spécifique pour extraction en tubes coniques à bouchon fileté 1,5 ml stériles :
 - Bloc de chauffage à sec à 37 ± 2 °C et/ou 95-100 °C
- Spécifique pour extraction en plaque à deep well :
 - Agitateur incubateur* capable de maintenir une température de 37 ± 2 °C et/ou 95-100 °C, avec une vitesse de mélange d'au moins 1 300 tr/min
- Agitateur-mélangeur vortex
- Micropipettes de 20, 200 et 1 000 µl
- Embouts pour pipettes à répétition ; stériles, emballés individuellement
- Système de PCR en temps réel de Bio-Rad* ; par exemple, CFX96 Touch Deep Well System (n° de référence 3600037)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System pour l'extraction automatisée d'ADN et la préparation des plaques de PCR (n° de référence 3594911)

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

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

Produits

- Milieu d'enrichissement : Bouillon d'enrichissement Vibrio (VEB – Vibrio Enrichment Broth), 500 g (n° de référence 12007405) ou eau peptonée saline alcaline (alkaline saline peptone water – ASPW) ou eau peptonée alcaline (alkaline peptone water – APW)
- Solution d'élimination de l'ADN libre iQ-Check Free DNA Removal Solution (n° de référence 3594970)
- Spécifique pour extraction en tubes :
 - Tubes coniques à bouchon fileté 1,5 ml, stériles (par exemple, n° de référence 2240110XTU)
- Spécifique pour extraction en plaque à deep well :
 - Plaque à deep well de 96 puits (n° de référence 3594900)
 - Film à sceller en plastique (n° de référence 3590139)
 - Film à sceller préperforé ou film à sceller préperforé pour plaque (n° de référence 3600040, Amérique du Nord uniquement)
- Plaques, tubes, ruban à sceller et bouchons pour PCR
- Embouts filtrants stériles adaptables pour micropipettes de 20, 200 et 1 000 µl
- Seringue Combitip ou pipettes à répétition équivalentes ; stériles, emballés individuellement
- Tubes à essai stériles de 2 et 5 ml
- Gants non poudrés
- Eau distillée stérile
- Eau de Javel, 5 %
- Agent nettoyant tel que DNA AWAY ou RNase AWAY

Section 6

Sécurité, précautions et recommandations pour des résultats optimaux

- Ce test doit être réalisé par du personnel formé.
- Les échantillons et cultures d'enrichissement doivent être traités en tant que substances potentiellement infectieuses et éliminés conformément aux règles et réglementations locales.
- Toutes les substances potentiellement infectieuses doivent être autoclavées avant élimination.
- Kit iQ-Check *Vibrio* :
 - Toutes les substances ou tous les mélanges du kit de test sont des produits classés conformément au Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). Tout contact avec des acides peut causer la libération de gaz toxiques. Aucune précaution particulière n'est nécessaire si le kit est utilisé correctement. Si les produits sont inhalés, apporter de l'air frais et consulter un médecin en cas de troubles. En cas de contact avec les yeux, rincer l'œil ouvert pendant plusieurs minutes sous l'eau courante. Si les produits sont ingérés, provoquer le vomissement et appeler les secours médicaux.

- iQ-Check Prep System :
 - Une utilisation incorrecte d'iQ-Check Prep System peut causer des blessures corporelles ou endommager l'instrument. En cas de manipulation incorrecte, certains composants peuvent poser un risque de blessures corporelles causées par une chaleur excessive. Pour une utilisation en toute sécurité, iQ-Check Prep System doit être utilisé uniquement par du personnel de laboratoire qualifié et convenablement formé. La maintenance de l'instrument doit être réalisée uniquement par des techniciens de maintenance de Bio-Rad.
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System :
 - Une utilisation incorrecte du CFX96 Touch Deep Well System peut causer des blessures corporelles ou endommager l'instrument. En cas de manipulation incorrecte, certains composants peuvent poser un risque de blessures corporelles causées par une chaleur excessive. Pour une utilisation en toute sécurité, CFX96 Touch Deep Well System doit être utilisé uniquement par du personnel de laboratoire qualifié et convenablement formé. La maintenance de l'instrument doit être réalisée uniquement par des techniciens de maintenance de Bio-Rad.
- Enrichissement :
 - L'utilisateur doit lire, comprendre et suivre toutes les informations relatives à la sécurité dans les instructions du kit iQ-Check *Vibrio*. Conserver les instructions relatives à la sécurité pour référence ultérieure. Afin de réduire les risques associés à l'exposition aux produits chimiques et biologiques, réaliser les analyses d'agents pathogènes dans un laboratoire convenablement équipé, sous le contrôle d'un personnel qualifié. Toujours suivre les bonnes pratiques en matière de sécurité en laboratoire, notamment, porter des vêtements et lunettes ou masque de protection appropriés pour manipuler les réactifs et échantillons contaminés. Éviter tout contact avec le contenu du milieu d'enrichissement et des tubes de réactif après amplification. Éliminer les échantillons enrichis conformément aux normes actuelles.
 - *Vibrio* est un organisme de niveau de biosécurité 2. Les échantillons biologiques tels que les enrichissements peuvent transmettre des maladies infectieuses. Suivre toutes les réglementations locales, étatiques/provinciales et/ou nationales applicables à l'élimination des déchets biologiques. Porter un équipement de protection approprié, ce qui comprend, sans s'y limiter, lunettes ou masque de protection, écran facial, vêtements de protection/blouse de laboratoire et gants. Tout travail doit être effectué dans des installations convenablement équipées et en utilisant les équipements de sécurité appropriés (par exemple, dispositifs de confinement physique). Les individus doivent être formés conformément aux exigences réglementaires et aux exigences de l'entreprise/de l'institution avant de travailler avec des substances potentiellement infectieuses.
 - Une fois l'analyse terminée, tout le matériel et les milieux pouvant contenir des agents pathogènes doivent être décontaminés conformément aux normes actuelles pour l'élimination des déchets contaminés (c'est-à-dire, avec un passage à l'autoclave de 20 min à 120 °C). Consulter la fiche de données de sécurité pour obtenir des informations supplémentaires ainsi que les réglementations locales relatives à l'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 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 de réactifs après leur date d'expiration.
 - Vortexer les réactifs du kit avant de les utiliser afin d'assurer leur homogénéité.
 - 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 tels que DNA AWAY.
 - Utiliser des gants non poudrés et éviter les empreintes digitales et l'écriture sur les bouchons des tubes. Ces dernières pourraient interférer avec l'acquisition des données.
- Il est fortement recommandé de suivre les exigences générales décrites dans la norme EN ISO 22174:2005 (Microbiologie des aliments – Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments – Exigences générales et définitions).

Section 7

Protocole

Il est fortement recommandé de lire le protocole dans son intégralité avant de commencer le test. Manipuler les échantillons de poissons et fruits de mer selon la description des méthodes normalisées (par exemple, ISO 7218:2007 ou FDA BAM Chapitre 9).

Enrichissement de l'échantillon

Homogénéiser n g d'échantillon dans $9 \times n$ ml de VEB ou ASPW ou APW (par exemple, 25 g dans 225 ml) dans un sac d'homogénéisation avec un Stomacher de laboratoire.

Pour le bouillon VEB, incuber, sans agiter, pendant 8 ± 1 hr à 35 ± 1 °C ou 37 ± 1 °C. Se référer aux normes, réglementations et/ou recommandations locales applicables.

Pour l'eau ASPW ou APW, se référer aux normes, réglementations et/ou recommandations locales applicables en ce qui concerne la durée et la température d'incubation.

Traitement d'élimination de l'ADN libre

La solution iQ-Check Free DNA Removal Solution (n° de référence 3594970) est un moyen idéal de se débarrasser de l'ADN libre. Suivre les recommandations de Bio-Rad dans le guide d'utilisation.

Extraction de l'ADN

Recommandations générales :

Allumer le bloc de chauffage ou l'agitateur thermique afin de préchauffer avant de commencer le test. Le régler sur 95-100 °C. Garder le réactif de lyse en suspension pendant le pipettage en mélangeant à vitesse moyenne sur une plaque d'agitation magnétique.

1. Ajouter 100 µl de réactif de lyse dans tous les puits de la plaque deep well ou dans les tubes qui contiennent des échantillons enrichis non traités ou traités avec la solution Free DNA Removal Solution (voir le paragraphe précédent).
2. Mélanger en pipettant de haut en bas, puis fermer les tubes avec leur bouchon ou sceller la plaque deep well avec du film préperforé.
3. Incuber les tubes dans le bloc de chauffage approprié à 95-100 °C pendant 15-20 min ou la plaque deep well dans l'agitateur thermique pendant 15-20 min à une vitesse de 1 300 rpm minimum.

4. Dans le cas d'une plaque deep well, la laisser refroidir à température ambiante (20-25 °C).

Si vous souhaitez vous arrêter temporairement dans la procédure, cette étape est la plus appropriée. Le surnageant peut être stocké jusqu'à 1 an à -20 °C. Avant de le réutiliser, toujours le laisser décongeler et l'homogénéiser, puis centrifuger les tubes à 10 000-12 000 x g pendant 5 min.

Le test du kit iQ-Check *Vibrio* peut être réalisé sur le système l'iQ-Check Prep Automation System (extraction de l'ADN, traitement d'élimination de l'ADN libre si nécessaire et préparation de la PCR).

PCR en temps réel

1. Pour la configuration de l'instrument et du logiciel, suivre les instructions du manuel d'utilisation de CFX Manager IDE.
2. Préparer le mélange de PCR.
 - a. Préparer le mélange de PCR contenant la solution d'amplification (réactif C) et les sondes fluorescentes (réactif B) en fonction du nombre d'échantillons et de contrôles à analyser. Au moins un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque PCR. Utiliser le tableau de pipettage de l'annexe de la Section 12 – Guide de calcul du mélange de PCR, pour trouver les volumes corrects pour chaque réactif.

Remarque : le mélange de PCR (réactifs B + C) doit être utilisé immédiatement. Il est stable pendant 1 h maximum à une température de 2-8 °C.

- b. Pipetter 45 µl de ce mélange de PCR dans chaque puits en fonction de la plaque préparée.
 - c. Ajouter 5 µl d'échantillon, de réactif D (contrôle négatif) ou de réactif E (contrôle positif). Ne pas vortexer l'échantillon avant le pipettage. Pipetter avec précaution afin d'éviter la formation de bulles au fond des puits. Sceller hermétiquement les puits de la plaque ou les bandes de tubes. Étape facultative : centrifuger la plaque de PCR scellée ou les bandes de tubes de PCR (rotation rapide) afin d'éliminer les bulles éventuelles.
 - d. Placer la plaque ou les bandes de tubes dans le thermocycleur. Veiller à placer la plaque correctement : le puits A1 dans le coin supérieur gauche. Fermer le module réactionnel.
3. Lancer la PCR.

Pour lancer la PCR, suivre les instructions du manuel d'utilisation de CFX Manager IDE.

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 CFX Manager IDE correspondant 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 C_q (cycle de quantification) de chaque échantillon (le cycle auquel la courbe d'amplification dépasse le seuil).

Le logiciel CFX Manager IDE assure une analyse automatisée complète des systèmes de détection par PCR en temps réel de Bio-Rad.

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 est nécessaire de répéter la réaction de PCR.

	Détection de <i>Vibrio</i> Canaux FAM, Cy5 et Texas Red	Détection contrôle interne Canal HEX
Contrôle négatif	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 36$
Contrôle positif	$26 \leq Cq \leq 36$	Non significatif

* Lorsque la détection de *Vibrio* et de contrôle interne donne une valeur Cq = N/A (non applicable), l'échantillon doit être dilué (1:10) et testé à nouveau.

Si les résultats des contrôles négatif et positif diffèrent des résultats indiqués dans le tableau ci-dessus, répéter la PCR.

Échantillons

Un échantillon de *Vibrio* doit avoir une valeur Cq ≥ 10 pour que le(s) fluorophore(s) *V. cholerae* et/ou *V. parahaemolyticus* et/ou *V. vulnificus* soient considérés comme positifs. Si la valeur Cq est inférieure à 10, vérifier les données brutes et contrôler que la courbe est une courbe d'amplification régulière (une ligne de départ plane avec une augmentation rapide de la fluorescence, puis une stabilisation). Si la courbe semble correcte, l'échantillon peut être considéré comme positif pour la présence de *Vibrio*.

S'il n'y a pas de valeur Cq (Cq = N/A) pour les cibles *V. cholera*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*, ou si la courbe n'est pas une courbe d'amplification typique, le contrôle interne de cet échantillon doit être analysé :

- Un échantillon de *Vibrio* est considéré comme négatif si les valeurs Cq de *V. cholera*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* sont N/A et que la valeur Cq de contrôle interne est ≥ 28 .
- Un contrôle interne qui n'a pas non plus de valeur Cq (Cq = N/A) indique probablement une inhibition de la réaction de PCR. Diluer l'échantillon (réaliser une dilution à 1:10 dans de l'eau distillée stérile avec 10 μ l d'extrait d'ADN), utiliser 5 μ l de la dilution pour l'amplification et répéter le test de PCR.
- Si la valeur de 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 de l'échantillon est résumée dans le tableau suivant :

Détection <i>Vibrio</i> Canaux Vc (Texas Red) et/ou Vp (FAM) et/ou Vv (Cy5)	Détection contrôle interne Canal IC (HEX)	Interprétation
Cq ≥ 10	N/A	Positif
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Négatif
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition*

* Lorsque la détection de *Vibrio* et de contrôle interne donne une valeur Cq = N/A, l'échantillon doit être dilué (1:10) et testé à nouveau.

Section 8

Confirmation des résultats positifs

Les résultats iQ-Check positifs doivent être confirmés.

Tous les échantillons

Pour le test de confirmation, commencer à partir du bouillon d'enrichissement *Vibrio* après un enrichissement de 8 ± 1 hr minimum à 35 ± 1 °C ou 37 ± 1 °C.

Utiliser les méthodes décrites dans ISO 21872-1:2017, FDA BAM chapitre 9 ou d'autres méthodes normalisées.

Section 9

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

Le kit iQ-Check *Vibrio* peut également être utilisé pour confirmer des colonies isolées sur plaques gélosées.

1. Choisir une colonie isolée, sur un milieu de culture gélosé sélective ou non sélective, avec un cure-dent, une anse stérile ou un autre consommable adapté (par exemple, un embout de pipette).
2. Remettre en suspension la colonie dans 100 µl de tryptone-sel ou d'eau distillée stérile dans un microtube à centrifuger.
Vortexer pour homogénéiser.
3. Utiliser 5 µl de la suspension avec 45 µl de mélange de PCR (voir PCR en temps réel, Section 7 Protocole) et suivre le reste du protocole iQ-Check *Vibrio* pour l'interprétation des données et du résultat.

Section 10

Performances du test et validations



Le kit iQ-Check *Vibrio* (Protocole simplifié et Protocole simplifié avec traitement facultatif d'élimination de l'ADN libre) a été validé par AOAC Research Institute dans le cadre du programme « Performance Tested Methods » pour la détection de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, et *V. vulnificus* dans les crevettes cuites, les moules crues, les huîtres crues, les crevettes crues et le thon cru. Il convient de considérer un résultat positif avec iQ-Check comme étant présumé et il est recommandé de le confirmer grâce aux méthodes de référence standard (voir Section 11).
Numéro de certificat : 032002.

Section 11

Références

ISO 7218:2007. Microbiologie des aliments – Exigences générales et recommandations.

ISO 21872-1:2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire – Méthode horizontale pour la détermination des *Vibrio* spp.

ISO 22174:2005. Microbiologie des aliments – Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments – Exigences générales et définitions.

U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2004). Bacteriological Analytical Manual – Chapter 9. *Vibrio*.

Section 12

Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
09/04/18	10000095779 Ver A	
19/06/18	10000095779 Ver B	Modifications rédactionnelles
24/03/20	10000095779 Ver C	Modifications rédactionnelles pour la validation AOAC-PTM Informations supplémentaires pour l'enrichissement de l'échantillon, Section 7

Annexe – Guide de calcul du mélange de PCR

Pour trouver les volumes corrects de préparation du mélange de PCR, additionner le nombre total d'échantillons et de contrôles à analyser et consulter les volumes correspondants de réactif B et de réactif C.

Nombre total d'échantillons et de contrôles	Sondes Réactif B, μ	Mélange d'amplification Réactif C, μ l	Nombre total d'échantillons et de contrôles	Sondes Réactif B, μ	Mélange d'amplification Réactif C, μ l	Nombre total d'échantillons et de contrôles	Sondes Réactif B, μ	Mélange d'amplification Réactif C, μ l
1	5	40	33	178	1 400	65	351	2 800
2	11	86	34	184	1 500	66	356	2 900
3	16	130	35	189	1 500	67	362	2 900
4	22	173	36	194	1 600	68	367	2 900
5	27	216	37	200	1 600	69	373	3 000
6	32	259	38	205	1 600	70	378	3 000
7	38	302	39	211	1 700	71	383	3 100
8	43	346	40	216	1 700	72	389	3 100
9	49	389	41	221	1 800	73	394	3 200
10	54	432	42	227	1 800	74	400	3 200
11	59	475	43	232	1 900	75	405	3 200
12	65	518	44	238	1 900	76	410	3 300
13	70	562	45	243	1 900	77	416	3 300
14	76	605	46	248	2 000	78	421	3 400
15	81	648	47	254	2 000	79	427	3 400
16	86	691	48	259	2 100	80	432	3 500
17	92	734	49	265	2 100	81	437	3 500
18	97	778	50	270	2 200	82	443	3 500
19	103	821	51	275	2 200	83	448	3 600
20	108	864	52	281	2 200	84	454	3 600
21	113	907	53	286	2 300	85	459	3 700
22	119	950	54	292	2 300	86	464	3 700
23	124	994	55	297	2 400	87	470	3 800
24	130	1 000	56	302	2 400	88	475	3 800
25	135	1 100	57	308	2 500	89	481	3 800
26	140	1 100	58	313	2 500	90	486	3 900
27	146	1 200	59	319	2 500	91	491	3 900
28	151	1 200	60	324	2 600	92	497	4 000
29	157	1 300	61	329	2 600	93	502	4 000
30	162	1 300	62	335	2 700	94	508	4 100
31	167	1 300	63	340	2 700	95	513	4 100
32	173	1 400	64	346	2 800	96	518	4 100

Visiter bio-rad.com/iqcheck pour obtenir davantage d'informations.

BIO-RAD est une marque déposée de Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK est une marque déposée de Bio-Rad Europe GmbH dans certaines circonscriptions.

Toutes les marques déposées utilisées dans ce document appartiennent à leur propriétaire respectif.



Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science Group

Site web bio-rad.com États-Unis 1 800 424 6723 Australie 61 2 9914 2800 Autriche 00 800 00 24 67 23 Belgique 00 800 00 24 67 23
Brésil 4003 0399 Canada 1 905 364 3435 Chine 86 21 6169 8500 République tchèque 00 800 00 24 67 23 Danemark 00 800 00 24 67 23
Finlande 00 800 00 24 67 23 France 00 800 00 24 67 23 Allemagne 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300
Hongrie 00 800 00 24 67 23 Inde 91 124 4029300 Israël 0 3 9636050 Italie 00 800 00 24 67 23 Japon 81 3 6361 7000
Corée 82 2 3473 4460 Luxembourg 00 800 00 24 67 23 Mexique 52 555 488 7670 Pays-Bas 00 800 00 24 67 23
Nouvelle-Zélande 64 9 415 2280 Norvège 00 800 00 24 67 23 Pologne 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23
Russie 00 800 00 24 67 23 Singapour 65 6415 3188 Afrique du Sud 00 800 00 24 67 23 Espagne 00 800 00 24 67 23
Suède 00 800 00 24 67 23 Suisse 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thaïlande 66 2 651 8311
Émirats arabes unis 36 1 459 6150 Royaume-Uni 00 800 00 24 67 23



iQ-Check *Vibrio* Kit

Anwenderhandbuch

Test zum Nachweis von *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* in
Lebensmittelproben durch die Real-Time PCR

Katalog-Nr. 12006574



Inhaltsverzeichnis

Section 1	Einleitung	1
Section 2	Die iQ-Check <i>Vibrio</i> Technologie	1
Section 3	Zusammensetzung des Kits	2
Section 4	Haltbarkeit und Lagerung	2
Section 5	Zusätzlich benötigte Materialien	2
	Geräte	2
	Zubehör	3
Section 6	Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse	3
Section 7	Protokoll	5
	Probenanreicherung	5
	Behandlung zur Entfernung freier DNA	5
	DNA-Extraktion	5
	Real-Time PCR	6
	E. Datenanalyse	6
Section 8	Bestätigung positiver Ergebnisse	8
	Alle Proben	8
Section 9	Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit	8
Section 10	Testleistung und Validierungen	8
Section 11	Literatur	9
Section 12	Revisionshistorie	9
	Anhang – Pipettiertabelle für das PCR Reaktionsgemisch	10

Abschnitt 1 Einleitung

Vibrio spp. stellt eine ernsthafte Bedrohung für die menschliche Gesundheit dar. Insbesondere drei Arten (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, und *V. vulnificus*) werden mit gastrointestinalen Problemen in Verbindung gebracht und können zu Infektionen und Sepsis führen.

Dieses Risiko hängt primär mit dem Verzehr von rohem oder zu wenig gekochtem Fisch und Meeresfrüchten zusammen. Die Untersuchung und das Risikomanagement dieser Gefahr sind für die weltweite Sicherheit in Bezug auf Fisch und Meeresfrüchte und damit für den globalen Fischmarkt entscheidend.

Abschnitt 2 Die iQ-Check *Vibrio* Technologie

Das iQ-Check *Vibrio* Kit ist ein Multiplex-Test, der auf der Amplifizierung und dem Nachweis von Genen mittels Real-Time PCR beruht. Die gebrauchsfertigen PCR-Reagenzien des Kits enthalten für *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* spezifische Oligonukleotide (Primer und Sonden) sowie DANN-Polymerase und Nukleotide. Der Nachweis und die Datenanalyse sind für die Verwendung eines Real-Time PCR Gerätes von Bio-Rad, z. B. des CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR-Nachweissystems, mit Analyse durch die Software CFX Manager IDE, optimiert.

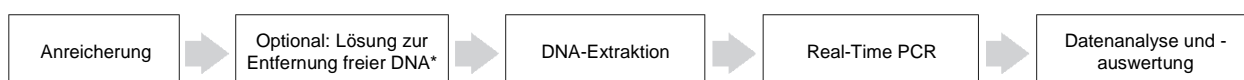
Die PCR ist eine leistungsstarke Technik, mit der viele Kopien der Ziel-DNA erzeugt werden können. Während der PCR Reaktion wird die DNA während mehrerer Zyklen des Erhitzens und Abkühlens denaturiert. Danach binden Primer an die Zielregion. Die DNA-Polymerase verwendet diese Primer und die Desoxynukleotridiphosphaten (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 während der Amplifikation an die Amplikons. An diese Sonden ist ein Fluorophor gebunden, das nur fluoresziert, wenn die Sonde an die Zielsequenz hybridisiert. 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 bzw. der Detektor diese Fluoreszenz. Die Software des Geräts trägt die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zyklen auf.

Das Reaktionsgemisch des iQ-Check *Vibrio*-Kit enthält eine synthetische interne DNA-Kontrolle, um jedes etwaige negative Ergebnis zu validieren. Diese Kontrolle wird gleichzeitig mit der *Vibrio*-DNA-Zielsequenz amplifiziert und durch eine spezifische Sonde nachgewiesen, die mit einem anderen Fluorophor gekoppelt ist.

Dieser Test gestattet den qualitativen Nachweis von *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* in Lebensmittelproben, die zuvor durch Kultur angereichert wurden. Die wesentlichen Ziel-Matrizes sind Meeresfrüchte, darunter Fisch und Schalentiere (Weich- und Krebstiere).

Der Test beinhaltet fünf Hauptschritte:



* Die Verwendungsbedingungen sind der Produktbeilage „iQ-Check Free DNA Removal Solution for Food, Water, and Environmental Samples“ (iQ-Check Lösung zur Entfernung freier DNA für Lebensmittel-, Wasser- und Umweltproben) (1000058391) zu entnehmen

Abschnitt 3 Zusammensetzung des Kits

Das iQ-Check *Vibrio* Kit enthält ausreichend Reagenzien für 96 Tests (94 Proben).

Reagenz-ID	Reagenz	Menge, ml
A	Lysereagenz I	1 Flasche, 20 ml
B	Fluoreszenzsonden	1 Röhrchen, 0,55 ml
C	Amplifikationsmix	1 Röhrchen, 4,4 ml
D	PCR Negativkontrolle	1 Röhrchen, 0,5 ml
E	PCR Positivkontrolle	1 Röhrchen, 0,25 ml

Abschnitt 4 Haltbarkeit und Lagerung

Nach dem Erhalt muss das Kit bei 2 °C bis 8 °C aufbewahrt werden. Bei Aufbewahrung bei dieser Temperatur können die Reagenzien bis zu dem auf dem Röhrchen angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

Abschnitt 5 Zusätzlich benötigte Materialien

Geräte

- Labor-Paddel-Blender zur Homogenisierung von Testproben
- Inkubator zur mikrobiologischen Anreicherung von Proben
- Speziell für die Extraktion in sterilen konischen sterile 1,5 ml Röhrchen mit Schraubdeckel:
 - Heitzrockenblock bei 37 °C ±2 °C und/oder 95 °C -100 °C
- Speziell für die Extraktion in einer Deep Well-Platte:
 - Thermoschüttler* mit Heizfunktion, der bei einer Mischgeschwindigkeit von mindestens 1.300 U/min 37 °C ± 2°C und/oder 95 °C bis 100 °C halten kann
- Vortexer
- 20 µl, 200 µl Und 1.000 µl Mikropipetten
- sterile, einzeln verpackte Spitzen für Multipipetten
- Bio-Rad Real-Time PCR-System*, z. B. das CFX96 Touch Deep Well System (Katalog-Nr. 3600037)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System für automatisierte DNA-Extraktion und Vorbereitung der PCR-Platte (Katalog-Nr. 3594911)

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

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

Zubehör

- Anreicherungsmedium: Vibrio Enrichment broth (VEB), 500 g (Katalog-Nr. 12007405) oder alkaline saline peptone water (ASPW) oder alkaline peptone water (APW)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (Katalog-Nr. 3594970)
- Speziell für die Extraktion in Röhrrchen:
 - Konische, sterile 1,5 ml Röhrrchen mit Schraubdeckel (z. B. Katalog-Nr. 2240110XTU)
- Speziell für die Extraktion in einer Deep Well-Platte:
 - 96-Well Deep Well-Platte (Katalog-Nr. 3594900)
 - Abdichtungsfolie aus Kunststoff (Katalog-Nr. 3590139)
 - vorpunktierte Abdichtungsfolie oder vorpunktierte Platten-Abdichtungsfolie (Katalog-Nr. 3600040, nur in Nordamerika)
- ■ PCR-Platten, -Röhrrchen, -Abdichtungsfolie und -Deckel
- Sterile Filterspitzen für 20 µl-, 200 µl- und 1.000 µl Mikropipetten
- Sterile, einzeln verpackte Spitzen für Combitip-Pipetten oder äquivalente Multipipetten
- Sterile 2 ml und 5 ml Teströhrrchen
- Puderfreie Handschuhe
- Destilliertes, steriles Wasser
- 5%-ige Bleichlösung
- Reinigungsmittel wie DNA AWAY oder RNase AWAY

Abschnitt 6

Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse

- 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 sollten vor dem Entsorgen autoklaviert werden.
- iQ-Check *Vibrio* Kit:
 - Alle Substanzen oder Mischungen im Testkit sind klassifizierte Produkte, gemäß Einstufungs- und Kennzeichnungssystem GHS. Säurekontakt kann die Freisetzung giftiger Gase bewirken. Bei korrekter Verwendung sind keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen erforderlich. Wird das Produkt eingeatmet, für frische Luft sorgen und bei Beschwerden einen Arzt aufsuchen. Bei Augenkontakt Produkt mit offenem Auge mehrere Minuten lang bei laufendem Wasser ausspülen. Werden die Produkte geschluckt, Erbrechen herbeiführen und medizinische Hilfe anfordern.

- iQ-Check Prep System:
 - Die unsachgemäße Verwendung des iQ-Check Prep Systems kann zu Körperverletzungen oder Instrumentschäden führen. Einige Komponenten können bei unsachgemäßer Handhabung Körperverletzungen aufgrund übermäßiger Hitze verursachen. Für eine sichere Nutzung darf das iQ-Check Prep System nur von qualifiziertem Laborpersonal bedient werden, das angemessen geschult wurde. Die Instrumente dürfen nur von Kundendiensttechnikern im Außendienst gewartet werden.
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR-Nachweissystem:
 - Die unsachgemäße Verwendung des CFX96 Touch Deep Well Systems kann zu Körperverletzungen oder Instrumentschäden führen. Einige Komponenten können bei unsachgemäßer Handhabung Körperverletzungen aufgrund übermäßiger Hitze verursachen. Für eine sichere Nutzung darf das CFX96 Touch Deep Well System nur von qualifiziertem Laborpersonal bedient werden, das angemessen geschult wurde. Die Instrumente dürfen nur von Kundendiensttechnikern im Außendienst gewartet werden.
- Anreicherung:
 - Der Benutzer sollte alle Sicherheitsinformationen in der Anweisung des iQ-Check *Vibrio*-Kits lesen, verstehen und beachten. Sicherheitsanweisungen zum künftigen Nachschlagen aufbewahren. Führen Sie Pathogentests nur in korrekt ausgestatteten Labors unter der Aufsicht von geschultem Personal durch. So reduzieren Sie Gefahren im Zusammenhang mit dem Ausgesetztsein von Chemikalien und Biogefährdungen. Befolgen Sie stets die Standard-Sicherheitspraktiken für Labore. Dazu zählt auch das Tragen von geeigneter Schutzkleidung und Augenschutz während der Handhabung von Reagenzien und kontaminierten Proben. Vermeiden Sie nach der Amplifizierung Kontakt mit den Inhalten der Anreicherungsmedien und Reagenzröhrchen. Entsorgen Sie angereicherte Proben gemäß aktuellen Industriestandards.
 - *Vibrio* ist ein Organismus der biologischen Sicherheitsstufe 2. Biologische Proben wie Anreicherungen können potenziell infektiöse Krankheiten übertragen. Beachten Sie alle Bestimmungen, die für die Entsorgung von biologischem Abfall auf lokaler, regionaler und/oder nationaler Ebene gelten. Tragen Sie geeignete Schutzausrüstung. Dazu zählen u. a. Schutzbrille, Gesichtsschutz, Kleidung/Laborkittel und Handschuhe. Die gesamte Arbeit sollte in geeignet ausgestatteten Einrichtungen erfolgen, unter Einsatz geeigneter Sicherheitsausrüstung (z. B. physische Sicherheitsvorrichtungen). Mitarbeiter sollten vor der Arbeit mit potenziell infektiösen Materialien nach den geltenden Bestimmungen und Anforderungen der Firma/Institution geschult werden.
 - Bei Testabschluss sollten alle Materialien und Medien, die möglicherweise Pathogene enthalten, unter Einhaltung der aktuellen Industriestandards für die Entsorgung von kontaminiertem Abfall dekontaminiert werden (d. h. 20 min bei 120 °C autoklavieren). Weitere Informationen und lokale Bestimmungen zur Entsorgung entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt.
- Die Ergebnisqualität hängt von der strikten Einhaltung guter Laborpraktiken ab (zum Beispiel der Norm EN ISO 7218). In Bezug auf die PCR ist vor allem Folgendes zu beachten:
 - Tragen Sie Laborausstattung (Pipetten, Röhrchen usw.) auf keinen Fall von Arbeitsplatz zu Arbeitsplatz.
 - Verwenden Sie bei jeder Serie von Amplifikationsreaktionen stets eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle.
 - Verwenden Sie Reagenzien nach Ablauf ihres Verfallsdatums nicht mehr.
 - Mischen Sie Reagenzien aus dem Kit vor dem Gebrauch auf dem Vortex, um ihre Homogenität sicherzustellen.
 - Überprüfen Sie regelmäßig die Genauigkeit und Präzision der Pipetten sowie die ordnungsgemäße Funktion der Geräte.

- Wechseln Sie häufig die Handschuhe, vor allem dann, wenn Sie vermuten, dass sie kontaminiert sein könnten.
- Reinigen Sie die Arbeitsbereiche regelmäßig mit 5%-iger Bleichlösung und anderen Dekontaminationsmitteln, z. B. DNA AWAY.
- Verwenden Sie puderfreie Handschuhe und vermeiden Sie Fingerabdrücke und Beschriftungen auf dem Deckel, da diese die Datenerfassung beeinträchtigen würden.
- Es wird dringend empfohlen, die in der Norm EN ISO 22174:2005 „Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln - Allgemeine Anforderungen und Begriffe“ beschriebenen Anforderungen einzuhalten.

Abschnitt 7

Protokoll

Es wird dringend empfohlen, vor Beginn des Tests das gesamte Protokoll durchzulesen. Beachten Sie für den Umgang mit Fischproben die Standardmethoden (z. B. ISO 7218:2007 oder FDA BAM Kapitel 9).

Probenanreicherung

Homogenisieren Sie n g der Probe in $9 \times n$ ml VEB oder ASPW oder APW (z. B. 25 g in 225 ml) in einem Anreicherungsbeutel, mit einem Labor-Blender.

VEB: Ohne Schütteln für 8 ± 1 hr bei $35 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ oder $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ inkubieren. Siehe geltende lokale Standards, Bestimmungen und/oder Empfehlungen.

ASPW oder APW: Siehe geltende lokale Standards, Bestimmungen und/oder Empfehlungen für Inkubation, Zeit und Temperatur.

Behandlung zur Entfernung freier DNA

Die iQ-Check Lösung zur Entfernung freier DNA (Katalog-Nr. 3594970) eignet sich bestens zur Entfernung freier DNA. Beachten Sie die Empfehlungen von Bio-Rad im Benutzerhandbuch.

DNA-Extraktion

Allgemeine Empfehlungen:

Schalten Sie vor Testbeginn den Inkubationsblock oder Thermoshaker ein, um ihn vorzuheizen. Stellen Sie ihn auf $95\text{-}100 \text{ °C}$ ein. Lassen Sie das Lysereagenz in Suspension und pipettieren Sie, indem Sie bei mittlerer Geschwindigkeit auf einer Magnetrührplatte rühren.

1. Geben Sie $100 \mu\text{l}$ Lysereagenz in alle Wells der Deep Well-Platte oder Rörhchen, die angereicherte Proben enthalten, die mit der Lösung zur Entfernung freier DNA behandelt wurden oder nicht.
2. Durch Auf- und Abpipettieren mischen und dann Rörhchen mit Deckel bzw. die Deep Well-Platte mit vorpunktierter Abdichtungsfolie verschließen.
3. Die Rörhchen im geeigneten Heizblock für 15 bis 20 min bei $95\text{-}100 \text{ °C}$ oder die Deep Well-Platte im Thermoshaker 15 bis 20 min lang bei einer Mischgeschwindigkeit von 1.300 rpm inkubieren.
4. Wird eine Deep Well-Platte verwendet, muss sie auf Raumtemperatur ($20\text{-}25\text{ °C}$) gebracht werden.

Dies ist der empfohlene Zeitpunkt, um die Probenaufbereitung vorübergehend zu unterbrechen. Der Überstand kann bis zu 1 Jahr lang bei -20 °C aufbewahrt werden. Vor der erneuten Verwendung stets auftauen lassen, homogenisieren und die Röhrchen 5 Minuten bei 10.000-12.000 x g zentrifugieren.

Der Test im iQ-Check *Vibrio*-Kit kann auf dem automatisierten iQ-Check Prep System (DNA-Extraktion, Behandlung zur Entfernung freier DNA, falls nötig, und Vorbereitung der PCR) durchgeführt werden.

Real-Time PCR

1. Befolgen Sie zur Vorbereitung von Instrument und Software die Anweisungen im Benutzerhandbuch der Software CFX Manager IDE.
2. Bereiten Sie das PCR-Gemisch vor.
 - a. Bereiten Sie mit der Amplifizierungslösung (Reagenz C) und den Fluoreszenzsonden (Reagenz B), je nach der Gesamtzahl der zu analysierenden Proben und Kontrollen, das PCR-Gemisch vor. Jeder PCR-Lauf muss zumindest eine Positiv- und ein Negativkontrolle enthalten. Die korrekten Mengen jedes Reagenzes sind der Pipettiertabelle in Abschnitt 12, Anhang – Leitfaden zur Berechnung des PCR-Reaktionsgemisches, zu entnehmen.

Hinweis: Das PCR-Gemisch (Reagenzien B + C) muss sofort verwendet werden. Es ist bei 2 °C bis 8 °C maximal 1 hr haltbar.

- b. Von diesem PCR-Gemisch, dem jeweils verwendeten Platten-Layout entsprechend, 45 µl in in jedes Well pipettieren.
 - c. 5 µl Probe, Reagenz D (Negativkontrolle) oder Reagenz E (Positivkontrolle) zugeben. Die Probe vor dem Pipettieren nicht vortexen. Behutsam pipettieren, um Luftblasen am Boden der Wells zu vermeiden. Die Wells der Platte bzw. die Röhrchen-Teststreifen hermetisch abdichten. Optional kann die verschlossene PCR-Platte bzw. können die verschlossenen PCR-Streifen zur Beseitigung etwaiger Luftblasen kurz zentrifugiert werden.
 - d. Die Platte oder die Streifen in den Thermocycler stellen. Darauf achten, dass die Platte korrekt platziert wird, nämlich mit dem Well A1 in der oberen linken Ecke. Das Reaktionsmodul schließen.
3. Den PCR-Lauf starten.

Zum Starten des PCR-Laufs die Anweisungen im Benutzerhandbuch der Software CFX Manager IDE beachten.

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 Benutzerhandbuch der Software CFX Manager IDE befolgen.

Ergebnisinterpretation

Nach Festlegung der Datenanalyseparameter werden die Ergebnisse durch Analyse der Quantifizierungszykluswerte (Cq) jeder Probe (Zyklus, in dem die Amplifikationskurve den Schwellenwert übersteigt) ausgewertet.

Die Software CFX Manager IDE gestattet eine völlig automatisierte Analyse für Real-Time PCR-Nachweissysteme von Bio-Rad.

Kontrollen

Überprüfen Sie vor der Auswertung der Probenergebnisse die Positiv- und Negativkontrollen.

Damit das Experiment gültig ist, müssen die Kontrollergebnisse den Werten entsprechen, die in folgender Tabelle zusammengefasst sind. Ansonsten muss die PCR-Reaktion wiederholt werden.

	Vibrio-Nachweis Kanäle FAM, Cy5 und Texas Red	Nachweis der internen Kontrolle Kanal HEX
Negativkontrolle	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 36
Positivkontrolle	26 ≤ Cq ≤ 36	Nicht signifikant

* Wenn sowohl beim *Vibrio*-Nachweis als auch beim Nachweis der internen Kontrolle der Cq-Wert = N/A (nicht anwendbar) erhalten wird, muss die Probe verdünnt (1:10) und dann erneut getestet werden.

Wenn sich die Ergebnisse der Negativ- und Positivkontrollen von denen in der Kontrolltabelle unterscheiden, muss der PCR-Lauf wiederholt werden.

Proben

Eine *Vibrio*-Probe muss für *V. cholerae* und/oder *V. parahaemolyticus* und/oder *V. vulnificus* fluorophore(s) einen Cq-Wert von ≥10 haben, um als positiv erachtet zu werden. Liegt der Cq-Wert 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 Anstieg der Fluoreszenz und anschließender Abflachung). Wenn die Kurve korrekt aussieht, ist die Probe möglicherweise positiv auf *Vibrio*.

Wenn kein Cq-Wert für Ziele von *V. cholera*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* 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:

- Eine *Vibrio*-Probe wird als negativ erachtet, wenn die Cq-Werte von *V. cholera*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* = N/A und der Cq der internen Kontrolle ≥ 28 ist.
- Falls auch für die interne Kontrolle kein Cq-Wert vorliegt (Cq = N/A), bedeutet dies, dass die PCR-Reaktion vermutlich gehemmt war. Verdünnen Sie die Probe (mit 10 µl DNA-Extrakt eine 1:10 Verdünnung in destilliertem, sterilem Wasser durchführen), nehmen Sie 5 µl der verdünnten Lösung für die Amplifikation und wiederholen Sie den PCR-Test.
- Falls der Cq-Wert für die interne Kontrolle < 28 liegt, ist keine Ergebnisauswertung möglich. Überprüfen Sie, ob der Schwellenwert korrekt platziert wurde oder ob es sich bei der Kurve in den Rohdaten um eine normale Amplifikationskurve handelt. PCR-Test wiederholen, wenn die Kurve keine charakteristische Form aufweist.

Die Auswertung der Probenergebnisse ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Vibrio-Nachweis Kanäle Vc (Texas Red) und/oder Vp (FAM) und/oder Vv (Cy5)	Nachweis der internen Kontrolle IC (HEX) Kanal	Auswertung
Cq ≥ 10	N/A	Positiv
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negativ
Cq = N/A	Cq = N/A	Hemmung*

* Wenn sowohl beim *Vibrio*-Nachweis als auch beim Nachweis der internen Kontrolle der Cq-Wert = N/A erhalten wird, muss die Probe verdünnt (1:10) und dann erneut getestet werden.

Abschnitt 8

Bestätigung positiver Ergebnisse

Positive iQ-Check-Ergebnisse sollten bestätigt werden.

Alle Proben

Der Bestätigungstest kann ausgehend von der *Vibrio* Anreicherungsbouillon, nach mindestens 8 ± 1 hr Anreicherung bei $35 \pm 1^\circ\text{C}$ oder $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durchgeführt werden.

Wenden Sie hierzu die Methoden, die in der ISO 21872-1:2017, im FDA BAM, Kapitel 9 oder anderen Standardmethoden beschrieben sind, an.

Abschnitt 9

Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit

Das iQ-Check *Vibrio* Kit kann auch zum Bestätigen isolierter Kolonien auf Agarplatten verwendet werden.

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 Tryptonsalz-Medium oder destilliertem, sterilem Wasser in einem Mikrozentrifugenröhrchen resuspendieren.
Auf dem Vortex homogenisieren.
3. 5 µl der Suspension zu 45 µl PCR-Reaktionsgemisch geben (siehe D. Real Time PCR in Abschnitt 7 Protokoll) und zur Daten- und Ergebnisauswertung die übrigen Schritte des iQ-Check *Vibrio*-Protokolls befolgen.

Abschnitt 10

Testleistung und Validierungen



Das iQ-Check *Vibrio* Kit (Protokoll Easy und Protokoll Easy mit optional Protokoll für Entfernung freier DNA) ist vom AOAC-Research Institute im Rahmen des Performance Tested Method Program zum Nachweis von *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* in gekochten Shrimps, rohen Miesmuscheln, rohen Austern, rohen Shrimps und rohem Thunfisch validiert worden. Ein positives Ergebnis beim iQ-Check ist als vorläufig positiv zu betrachten und sollte mit Standardreferenzmethoden bestätigt werden (siehe Abschnitt 11). Zertifikatnummer: 032002.

Abschnitt 11

Literatur

ISO 7218:2007. Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen.

ISO 21872-1:2017. Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Horizontales Verfahren zur Bestimmung von *Vibrio* spp.

ISO 22174:2005. Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln - Allgemeine Anforderungen und Begriffe.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2004). Bacteriological Analytical Manual – Kapitel 9. *Vibrio*.

Abschnitt 12

Revisionshistorie

Veröffentlichungsdatum	Dokumentnummer	Änderung
09.04.18	10000095779 Ver A	
19.06.18	10000095779 Ver B	Inhaltliche Änderungen
24.03.20	10000095779 Ver C	Änderungen im Zusammenhang der AOAC-PTM-Validierung Zusätzliche Information für Probenanreicherung in Abschnitt 7

Anhang – Pipettiertabelle für das PCR Reaktionsgemisch

Die Tabelle gibt Aufschluss über die entsprechenden korrekten Mengen von Reagenz B und C zur Herstellung des PCR-Reaktionsgemisches je nach der Gesamtzahl der zu analysierenden Proben und Kontrollen.

Gesamtzahl an Proben & Kontrollen	Sonden Reagenz B, µl	Amplifikationsmix Reagenz C, µl	Gesamtzahl an Proben & Kontrollen	Sonden Reagenz B, µl	Amplifikationsmix Reagenz C, µl	Gesamtzahl an Proben & Kontrollen	Sonden Reagenz B, µl	Amplifikationsmix Reagenz C, µl
1	5	40	33	178	1.400	65	351	2.800
2	11	86	34	184	1.500	66	356	2.900
3	16	130	35	189	1.500	67	362	2.900
4	22	173	36	194	1.600	68	367	2.900
5	27	216	37	200	1.600	69	373	3.000
6	32	259	38	205	1.600	70	378	3.000
7	38	302	39	211	1.700	71	383	3.100
8	43	346	40	216	1.700	72	389	3.100
9	49	389	41	221	1.800	73	394	3.200
10	54	432	42	227	1.800	74	400	3.200
11	59	475	43	232	1.900	75	405	3.200
12	65	518	44	238	1.900	76	410	3.300
13	70	562	45	243	1.900	77	416	3.300
14	76	605	46	248	2.000	78	421	3.400
15	81	648	47	254	2.000	79	427	3.400
16	86	691	48	259	2.100	80	432	3.500
17	92	734	49	265	2.100	81	437	3.500
18	97	778	50	270	2.200	82	443	3.500
19	103	821	51	275	2.200	83	448	3.600
20	108	864	52	281	2.200	84	454	3.600
21	113	907	53	286	2.300	85	459	3.700
22	119	950	54	292	2.300	86	464	3.700
23	124	994	55	297	2.400	87	470	3.800
24	130	1.000	56	302	2.400	88	475	3.800
25	135	1.100	57	308	2.500	89	481	3.800
26	140	1.100	58	313	2.500	90	486	3.900
27	146	1.200	59	319	2.500	91	491	3.900
28	151	1.200	60	324	2.600	92	497	4.000
29	157	1.300	61	329	2.600	93	502	4.000
30	162	1.300	62	335	2.700	94	508	4.100
31	167	1.300	63	340	2.700	95	513	4.100
32	173	1.400	64	346	2.800	96	518	4.100

Nähere Informationen finden Sie auf bio-rad.com/iqcheck.

BIO-RAD ist eine Marke der Bio-Rad Laboratories, Inc.
iQ-CHECK ist in bestimmten Ländern eine Marke der Bio-Rad Europe GmbH.
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 Australien 61 2 9914 2800 Österreich 00 800 00 24 67 23 Belgien 00 800 00 24 67 23
Brasilien 4003 0399 Kanada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Tschechische Republik 00 800 00 24 67 23 Dänemark 00 800 00 24
67 23 Finnland 00 800 00 24 7 23 Frankreich 00 800 00 24 67 23 Deutschland 00 800 00 24 67 23 Hongkong 852 2789 3300
Ungarn 00 800 00 24 67 23 Indien 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050 Italien 00 800 00 24 67 23 Japan 81 3 6361 7000
Korea 82 2 3473 4460 Luxemburg 00 800 00 24 67 23 Mexiko 52 555 488 7670 Niederlande 00 800 00 24 67 23
Neuseeland 64 9 415 2280 Norwegen 00 800 00 24 67 23 Polen 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23
Russische Föderation 00 800 00 24 67 23 Singapur 65 6415 3188 Südafrika 00 800 00 24 67 23 Spanien 00 800 00 24 67 23
Schweden 00 800 00 24 67 23 Schweiz 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 651 8311
Vereinigte Arabische Emirate 36 1 459 6150 Vereinigtes Königreich 00 800 00 24 67 23



iQ-Check *Vibrio* Kit

User Guide

Test per il rilevamento PCR real-time di *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*
e *V. vulnificus* in campioni di alimenti

Numero catalogo 12006574



Indice

Section 1	Introduzione	1
Section 2	Tecnologia iQ-Check <i>Vibrio</i>	1
Section 3	Componenti del kit	2
Section 4	Durata e conservazione	2
Section 5	Materiali necessari ma non forniti	2
	Apparecchiatura	2
	Materiali in dotazione	3
Section 6	Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali	3
Section 7	Protocollo	5
	Arricchimento del campione	5
	Trattamento per la rimozione del DNA libero	5
	Estrazione del DNA	5
	PCR real-time	6
	Analisi dei dati	6
Section 8	Conferma dei risultati positivi	8
	Tutti i campioni	8
Section 9	Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check	8
Section 10	Performance del test e validazioni	8
Section 11	Riferimenti	9
Section 12	Cronologia delle revisioni	9
	Appendice – Guida al calcolo della miscela di PCR	10

Sezione 1 Introduzione

Le specie *Vibrio* costituiscono una seria minaccia per la salute dell'uomo. Tre specie in particolare (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*) sono collegate a disturbi gastrointestinali e possono provocare infezioni e setticemia.

Il rischio è legato principalmente al consumo di frutti di mare crudi o poco cotti. Lo studio e la gestione di tale rischio rivestono importanza cruciale ai fini della sicurezza su scala internazionale, nonché del mercato globale dei prodotti di origine marina.

Sezione 2 Tecnologia iQ-Check *Vibrio*

Il kit iQ-Check *Vibrio* è un test multiplex basato sull'amplificazione genica e la rilevazione mediante PCR real-time. I reagenti PCR inclusi nel kit contengono oligonucleotidi (primer e sonde) specifici per *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, oltre a DNA polimerasi e nucleotidi. La rilevazione e l'analisi dei dati sono ottimizzate per l'utilizzo con uno strumento PCR real-time Bio-Rad, quale ad esempio la PCR real-time CFX96 Touch Deep Well Real-Time, con analisi tramite software CFX Manager IDE.

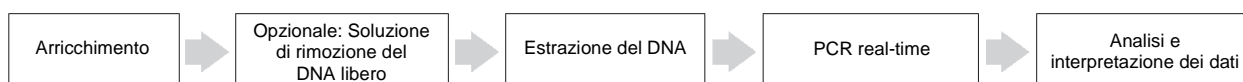
La PCR è una tecnica di grande efficacia impiegata per generare molteplici copie di DNA target. La reazione PCR consiste in cicli di riscaldamento e raffreddamento finalizzati alla denaturazione del DNA, con successivo appaiamento dei primer ad una regione target specifica. La DNA polimerasi utilizza quindi questi primer e deossinucleotidi trifosfati (dNTP) per estendere il DNA, creando così copie del DNA target. Queste copie sono denominate ampliconi.

La PCR real-time prevede l'impiego di sonde allo scopo di rilevare target specifici sul DNA durante la fase di amplificazione. Queste sonde sono legate ad un fluoroforo che emette fluorescenza unicamente quando viene ibridato alla sequenza target. 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 dello strumento di PCR real-time misura questa fluorescenza nella fase di appaiamento durante ogni ciclo PCR, mentre il software CFX Manager IDE traccia l'intensità della fluorescenza rispetto al numero di cicli.

Nella miscela di reazione del kit iQ-Check *Vibrio* è incluso un DNA sintetico come controllo interno per la convalida degli eventuali risultati negativi. Questo controllo viene amplificato contemporaneamente alle sequenze target del DNA di *Vibrio* e viene rilevato tramite una sonda specifica abbinata ad un ulteriore fluoroforo.

Questo test consente la rilevazione qualitativa di *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* in campioni di alimenti precedentemente arricchiti mediante coltura. Le principali matrici target sono i alimenti di origine marina come il pesce e frutti di mare (molluschi e crostacei).

Il test si articola in cinque fasi principali:



* Per le condizioni di utilizzo, consultare la documentazione del prodotto iQ-Check Free DNA Removal Solution for Food, Water, and Environmental Samples (1000058391).

Sezione 3

Componenti del kit

Il kit iQ-Check *Vibrio* contiene reagenti a sufficienza per l'esecuzione di 96 test (94 campioni).

ID reagente	Reagente	Quantità fornita, ml
A	Reagente di lisi I	1 flacone, 20
B	Sonde fluorescenti	1 provetta, 0,55
C	Miscela di amplificazione	1 provetta, 4,4
D	Controllo negativo PCR	1 provetta, 0,5
E	Controllo positivo PCR	1 provetta, 0,25

Sezione 4

Durata e conservazione

Una volta ricevuto, il kit deve essere conservato a 2-8°C. I reagenti conservati a questa temperatura possono essere utilizzati fino alla data di scadenza riportata sulle provette.

Sezione 5

Materiali necessari ma non forniti

Apparecchiatura

- Miscelatore a pale da laboratorio per omogeneizzazione dei campioni di prova
- Incubatore per arricchimento microbiologico dei campioni
- Specifico per estrazione in provette coniche sterili con tappo a vite da 1,5 ml:
 - Blocco termico a secco a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ e/o $95-100^\circ\text{C}$
- Specifico per estrazione in piastra a deep well:
 - Termoagitatore in grado di mantenere una temperatura di $37 \pm 2^\circ\text{C}$ e/o $95-100^\circ\text{C}$, con velocità di miscelazione di almeno 1.300 rpm
- Miscelatore vortex
- Micropipette da 20, 200 e 1.000 μl
- Puntali per pipettatori a ripetizione; sterili, confezionati singolarmente
- Sistema PCR real-time Bio-Rad, *ad esempio CFX96 Touch Deep Well (numero catalogo 3600037)
- Sistema Bio-Rad iQ-Check Prep per estrazione automatica del DNA e setup delle piastre PCR (numero catalogo 3594911)

Nota: Con il termociclatore e il sistema 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 in dotazione

- Terreno di arricchimento: Vibrio Enrichment Broth (VEB), 500 g (numero catalogo 12007405) o alcaline saline peptone water (ASPW) o alcaline peptone water (APW)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (numero catalogo 3594970)
- Specifico per estrazione in provette:
 - Provette coniche sterili con tappo a vite da 1,5 ml (ad esempio, numero catalogo 2240110XTU)
- Specifico per estrazione in una piastra a deep well:
 - Piastra a 96 deep well (numero catalogo 3594900)
 - Pellicola sigillante in plastica (numero catalogo 3590139)
 - Pellicola sigillante preforata o pellicola sigillante per piastra preforata (numero catalogo 3600040, solo Nord America)
- Piastre PCR, provette, nastro sigillante e tappi
- Puntali sterili con filtro adattabili a micropipette da 20, 200 e 1000 µl
- Puntali per pipette Combitip o pipettatori a ripetizione equivalenti, sterili e confezionati singolarmente
- Provette per test sterili da 2 e 5 ml
- Guanti senza polvere
- Acqua distillata sterile
- Candeggina, 5%
- Detergente come DNA AWAY o RNase AWAY

Sezione 6

Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali

- Il test deve essere eseguito da personale addestrato
- I campioni e le colture di arricchimento devono essere manipolati come materiali potenzialmente infetti ed eliminati nel rispetto delle regole e normative locali
- Tutti i materiali potenzialmente infetti devono essere autoclavati prima dello smaltimento
- Kit iQ-Check *Vibrio*:
 - Tutte le sostanze o miscele contenute nel kit per il test sono classificate come prodotti in conformità al sistema mondiale armonizzato GHS. Il contatto con acidi potrebbe causare il rilascio di gas tossici. Se utilizzato correttamente, non sono necessarie precauzioni particolari. In caso di inalazione del prodotto, spostarsi in una zona ben areata e rivolgersi a un medico in caso di disturbi. Se il prodotto viene a contatto con gli occhi, sciacquarli mantenendoli aperti sotto l'acqua corrente per alcuni minuti. In caso di ingestione del prodotto, indurre il vomito e contattare un medico

- Sistema iQ-Check Prep:
 - L'utilizzo improprio del sistema iQ-Check Prep potrebbe causare lesioni personali o danni allo strumento. Se manipolati in modo improprio, alcuni componenti potrebbero presentare un rischio di lesioni personali dovuto al calore eccessivo. Per garantire sicurezza, il sistema iQ-Check Prep deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato e opportunamente addestrato. La manutenzione dello strumento deve essere eseguita esclusivamente da tecnici Bio-Rad
- Sistema di rilevazione mediante PCR real-time CFX96 Touch Deep Well:
 - L'utilizzo improprio del sistema CFX96 Touch Deep Well potrebbe causare lesioni personali o danni allo strumento. Se manipolati in modo improprio, alcuni componenti potrebbero presentare un rischio di lesioni personali dovuto al calore eccessivo. Per garantire sicurezza, il sistema CFX96 Touch Deep Well deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato e opportunamente addestrato. La manutenzione dello strumento deve essere eseguita esclusivamente da tecnici Bio-Rad
- Arricchimento:
 - L'utente è tenuto a leggere, comprendere e osservare le informazioni relative alla sicurezza contenute nelle istruzioni del kit iQ-Check *Vibrio*. Conservare le istruzioni di sicurezza per consultazioni future. Al fine di ridurre i rischi biologici e legati all'esposizione a sostanze chimiche, eseguire i test degli agenti patogeni in un laboratorio adeguatamente attrezzato sotto la supervisione di personale addestrato. Seguire sempre le pratiche di laboratorio standard sulla sicurezza, indossando ad esempio indumenti protettivi e una protezione per gli occhi durante la manipolazione di reagenti e campioni contaminati. Evitare il contatto con il contenuto dei terreni di arricchimento e delle provette di reagenti al termine dell'amplificazione. Smaltire i campioni arricchiti in conformità alle norme di settore vigenti
 - *Vibrio* è un organismo che richiede il livello di biosicurezza 2. I campioni biologici come gli arricchimenti sono in grado di trasmettere malattie infettive. Osservare ogni normativa locale, statale/provinciale e/o nazionale applicabile in materia di smaltimento di rifiuti biologici. Indossare i dispositivi di protezione individuale, inclusi, senza a ciò limitarsi, protezioni per gli occhi, schermi per il viso, camici da laboratorio e guanti. Il lavoro deve essere svolto presso strutture adeguatamente attrezzate e utilizzando i dispositivi di sicurezza opportuni (ad esempio, quelli per il contenimento fisico). Prima di operare con materiali potenzialmente infetti, gli addetti devono essere addestrati in conformità ai requisiti normativi aziendali/dell'ente applicabili
 - Al termine del test, tutti i materiali e i terreni che potrebbero contenere agenti patogeni devono essere decontaminati in linea con le attuali norme di settore in materia di smaltimento dei rifiuti contaminati (ovvero, autoclavati per 20 min a 120°C). Per maggiori informazioni relative alle normative locali in materia di smaltimento, consultare la scheda di sicurezza
- La qualità dei risultati si basa sulla rigorosa osservanza delle buone pratiche di laboratorio (ad esempio, la norma EN ISO 7218), soprattutto in materia di 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
 - Per garantirne l'omogeneità, miscelare i reagenti nel vortex prima di utilizzarli
 - 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 la presenza di contaminazione

- Pulire gli spazi di lavoro periodicamente con candeggina al 5% e altri prodotti disinfettanti come DNA AWAY
- Indossare guanti senza polvere e non lasciare impronte digitali o 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 22174:2005 (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)

Sezione 7

Protocollo

Si raccomanda vivamente di leggere l'intero protocollo prima di iniziare il test. Manipolare i campioni come descritto nei metodi standard (ad esempio, ISO 7218:2007 o FDA BAM capitolo 9).

Arricchimento del campione

Omogeneizzare n g di campione in $9 \times n$ ml di VEB, ASPW o APW (ad esempio, 25 g in 225 ml) in una sacca di miscelazione con un miscelatore a pale da laboratorio.

In caso di VEB, incubare, senza agitare, per 8 ± 1 ore a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ o $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Fare riferimento alle norme, regolamentazioni e/o raccomandazioni locali applicabili.

In caso di ASPW o APW, fare riferimento alle normative, regolamentazioni e/o raccomandazioni locali applicabili per ciò che riguarda i tempi e la temperatura di incubazione.

Trattamento per la rimozione del DNA libero

Il prodotto iQ-Check Free DNA Removal Solution (numero catalogo 3594970) rappresenta un metodo ottimale per la rimozione del DNA libero. Seguire le raccomandazioni di Bio-Rad contenute nel manuale d'uso.

Estrazione del DNA

Raccomandazioni generali:

Prima di iniziare il test, accendere il blocco termico o il termoagitatore con la funzione di preriscaldamento. Impostare a $95\text{-}100^\circ\text{C}$. Durante il pipettaggio, mantenere in sospensione il reagente di lisi agitando a media velocità su una piastra di agitazione magnetica.

1. Aggiungere 100 μl di reagente di lisi a tutti i pozzetti della piastra deep well o alle provette contenenti campioni arricchiti non trattati o trattati con la soluzione di rimozione del DNA libero (vedere il paragrafo precedente).
2. Miscelare pipettando verso l'alto e verso il basso, quindi chiudere le provette con i tappi o sigillare la piastra deep well con la pellicola sigillante perforata.
3. Incubare le provette nel blocco termico indicato a $95\text{-}100^\circ\text{C}$ per 15-20 min o collocare la piastra deepwell nel termoagitatore per 15-20 min ad una velocità di miscelazione di almeno 1300 rpm.
4. In caso di utilizzo di una piastra deepwell, lasciarla raffreddare a temperatura ambiente ($20\text{-}25^\circ\text{C}$).

Se si prevede di dover interrompere temporaneamente la procedura, questo è il momento idoneo. Il surnatante può essere conservato per 1 anno a -20°C. Prima di riutilizzarlo, attendere sempre lo scongelamento e l'omogeneizzazione, quindi centrifugare a 10.000-12.000 x g per 5 min.

Il test con kit iQ-Check *Vibrio* può essere eseguito sul sistema automatizzato iQ-Check Prep (estrazione del DNA, trattamento per la rimozione del DNA libero, se necessario, e organizzazione della PCR).

PCR real-time

1. Per l'installazione dello strumento e del software, seguire le istruzioni contenute nel manuale d'uso del software CFX Manager IDE.

2. Preparare la miscela di PCR.

- a. Preparare la miscela di PCR contenente la soluzione di amplificazione (reagente C) e le sonde fluorescenti (reagente B) in base al numero di campioni e controlli da analizzare. In ogni ciclo PCR devono essere inclusi almeno un controllo positivo e un controllo negativo. Per verificare i corretti volumi da impiegare per ogni reagente, consultare la tabella relativa al pipettaggio riportata nella sezione 12, Appendice – Guida al calcolo della miscela di PCR.

Nota: La miscela di PCR (reagenti B + C) deve essere utilizzata immediatamente. Essa rimane stabile per un massimo di 1 hr a 2-8°C.

- b. Pipettare 45 µl della miscela di PCR in ogni pozzetto secondo lo schema analitico scelto.
- c. Aggiungere 5 µl di campione, reagente D (controllo negativo) o reagente E (controllo positivo). Non miscelare nel vortex il campione prima del pipettaggio. Pipettare con cura per evitare la formazione di bolle sul fondo dei pozzetti. Sigillare ermeticamente i pozzetti della piastra o le strip delle provette. Come passaggio facoltativo, per eliminare eventuali bolle centrifugare la piastra PCR o le strip delle provette PCR sigillate (centrifuga rapida).
- d. Posizionare la piastra o le strip delle provette nel termociclatore. Accertarsi di posizionare la piastra correttamente, con il pozzetto A1 nell'angolo superiore sinistro. Chiudere il modulo di reazione.

3. Avviare il ciclo PCR.

Per avviare il ciclo PCR, seguire le istruzioni contenute nel manuale d'uso del software CFX Manager IDE.

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 d'uso del software CFX Manager IDE.

Interpretazione dei risultati

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

Il software CFX Manager IDE consente l'analisi interamente automatizzata dei sistemi di rilevazione Bio-Rad mediante PCR real-time.

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 riepilogati nella tabella seguente. In caso contrario, la reazione PCR deve essere ripetuta.

	Rilevazione <i>Vibrio</i> Canali FAM, Cy5 e Texas Red	Rilevazione controllo interno Canale HEX
Controllo negativo	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 36$
Controllo positivo	$26 \leq Cq \leq 36$	Non significativo

* Qualora la rilevazione produca un valore Cq = N/A (non applicabile) sia per *Vibrio*, sia per il controllo interno, il campione deve essere diluito (1:10) e testato nuovamente.

Se i risultati dei controlli negativi e positivi si discostano da quelli riportati nella tabella dei controlli, ripetere il ciclo PCR.

Campioni

Un campione di *Vibrio* deve avere un valore Cq ≥ 10 perché i fluorofori di *V. cholerae* e/o *V. parahaemolyticus* e/o *V. vulnificus* siano considerati positivi. Se il valore Cq è inferiore a 10, controllare i dati non elaborati e verificare che il risultato sia una curva di amplificazione regolare (linea di base piatta, seguita da un rapido aumento della fluorescenza e quindi da appiattimento). Se la curva appare corretta, potrebbe essere considerata come campione di *Vibrio* positivo.

In assenza di valore Cq (Cq = N/A) per i target *V. cholera*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, o se il risultato non è una tipica curva di amplificazione, il controllo interno per il campione in questione deve essere analizzato:

- Un campione di *Vibrio* è considerato negativo se i valori Cq di *V. cholera*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* sono N/A e il controllo interno Cq è ≥ 28
- Se il controllo interno non presenta a sua volta un valore Cq (Cq = N/A), ciò indica probabilmente inibizione della reazione PCR. Diluire il campione (eseguire una diluizione 1:10 in acqua distillata sterile tramite 10 μ l di estratto di DNA), utilizzare 5 μ l della diluizione per l'amplificazione, quindi ripetere il test 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 presenta una forma caratteristica, ripetere il test PCR

L'interpretazione dei risultati del campione è riepilogata nella tabella seguente:

Rilevazione <i>Vibrio</i> Canali Vc (Texas Red) e/o Vp (FAM) e/o Vv (Cy5)	Rilevazione controllo interno Canale IC (HEX)	Interpretazione
Cq ≥ 10	N/A	Positivo
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Inibizione*

* Qualora la rilevazione produca un valore Cq = N/A sia per *Vibrio*, sia per il controllo interno, il campione deve essere diluito (1:10) e testato nuovamente.

Sezione 8

Conferma dei risultati positivi

I risultati positivi con iQ-Check devono essere confermati.

Tutti i campioni

Per il test di conferma, iniziare dal brodo di arricchimento per *Vibrio* al termine del periodo di arricchimento di 8 ± 1 hr a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ o $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Applicare i metodi descritti nella normativa ISO 21872-1:2017, FDA BAM capitolo 9, o altri metodi standard.

Sezione 9

Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check

Il kit iQ-Check *Vibrio* può essere utilizzato anche per la conferma di singole colonie isolate su agar.

1. Prelevare una colonia isolata, da una piastra agar servendosi di un'ansa sterile o altri prodotti di consumo adattati (ad esempio, un puntale per pipetta).
2. Risospendere la colonia in 100 μl di acqua peptonata o acqua distillata sterile in una provetta microcentrifuga.
Omogeneizzare il tutto mediante un miscelatore vortex.
3. Utilizzare 5 μl della sospensione con 45 μl di miscela di PCR (vedere il paragrafo D. PCR real-time nella sezione 7 Protocollo) e seguire il resto del protocollo iQ-Check *Vibrio* per l'interpretazione di dati e risultati.

Sezione 10

Performance del test e validazioni



Il kit iQ-Check *Vibrio* (protocollo Easy e protocollo Easy con opzione di rimozione del DNA libero) è stato validato dall'AOAC Research Institute nell'ambito del programma Performance Tested Methods per la rilevazione di *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* nei gamberetti crudi, cozze crude, ostriche crude e tonno crudo.

Un risultato positivo con iQ-Check deve essere considerato presuntivo e si raccomanda pertanto di ottenerne conferma tramite metodi standard di riferimento (vedere la sezione 11). Numero di certificato: 032002.

Sezione 11

Riferimenti

ISO 7218:2007. Microbiologia degli alimenti e dei mangimi – Requisiti generali e guida per le analisi microbiologiche.

ISO 21872-1:2017. Microbiologia della catena alimentare – Metodo orizzontale per la determinazione di *Vibrio* spp.

ISO 22174:2005. 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.

U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2004). Bacteriological Analytical Manual—Chapter 9. *Vibrio*.

Sezione 12

Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero documento	Modifica
09/04/2018	10000095779 Ver A	
19/06/2018	10000095779 Ver B	Modifiche redazionali
24/03/2020	10000095779 Ver C	Modifiche redazionali per convalida AOAC-PTM Ulteriori informazioni per l'arricchimento del campione nella sezione 7

Appendice – Guida al calcolo della miscela di PCR

Per trovare i volumi corretti per la preparazione della miscela PCR, verificare il numero totale di campioni e controlli da analizzare e trovare i volumi corrispondenti del reagente B e del reagente C.

Numero totale di campioni e controlli	Sonde reagente B, µl	Miscela amplificazione reagente C, µl	Numero totale di campioni e controlli	Sonde reagente B, µl	Miscela amplificazione reagente C, µl	Numero totale di campioni e controlli	Sonde reagente B, µl	Miscela amplificazione reagente C, µl
1	5	40	33	178	1.400	65	351	2.800
2	11	86	34	184	1.500	66	356	2.900
3	16	130	35	189	1.500	67	362	2.900
4	22	173	36	194	1.600	68	367	2.900
5	27	216	37	200	1.600	69	373	3.000
6	32	259	38	205	1.600	70	378	3.000
7	38	302	39	211	1.700	71	383	3.100
8	43	346	40	216	1.700	72	389	3.100
9	49	389	41	221	1.800	73	394	3.200
10	54	432	42	227	1.800	74	400	3.200
11	59	475	43	232	1.900	75	405	3.200
12	65	518	44	238	1.900	76	410	3.300
13	70	562	45	243	1.900	77	416	3.300
14	76	605	46	248	2.000	78	421	3.400
15	81	648	47	254	2.000	79	427	3.400
16	86	691	48	259	2.100	80	432	3.500
17	92	734	49	265	2.100	81	437	3.500
18	97	778	50	270	2.200	82	443	3.500
19	103	821	51	275	2.200	83	448	3.600
20	108	864	52	281	2.200	84	454	3.600
21	113	907	53	286	2.300	85	459	3.700
22	119	950	54	292	2.300	86	464	3.700
23	124	994	55	297	2.400	87	470	3.800
24	130	1.000	56	302	2.400	88	475	3.800
25	135	1.100	57	308	2.500	89	481	3.800
26	140	1.100	58	313	2.500	90	486	3.900
27	146	1.200	59	319	2.500	91	491	3.900
28	151	1.200	60	324	2.600	92	497	4.000
29	157	1.300	61	329	2.600	93	502	4.000
30	162	1.300	62	335	2.700	94	508	4.100
31	167	1.300	63	340	2.700	95	513	4.100
32	173	1.400	64	346	2.800	96	518	4.100

Per maggiori informazioni, visitare bio-rad.com/iqcheck.

Bio-Rad è un marchio registrato di Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK è un marchio registrato di Bio-Rad Europe, GmbH in alcune giurisdizioni.

Tutti i marchi registrati qui utilizzati sono di proprietà dei rispettivi titolari.



Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science Group

Sito web bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgio** 00 800 00 24 67 23
Brasile 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **Cina** 86 21 6169 8500 **Repubblica Ceca** 00 800 00 24 67 23 **Danimarca** 00 800 00 24 67 23
Finlandia 00 800 00 24 67 23 **Francia** 00 800 00 24 67 23 **Germania** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Ungheria 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israele** 0 3 9636050 **Italia** 00 800 00 24 67 23 **Giappone** 81 3 6361 7000
Corea 82 2 3473 4460 **Lussemburgo** 00 800 00 24 67 23 **Messico** 52 555 488 7670 **Paesi Bassi** 00 800 00 24 67 23
Nuova Zelanda 64 9 415 2280 **Norvegia** 00 800 00 24 67 23 **Polonia** 00 800 00 24 67 23 **Portogallo** 00 800 00 24 67 23
Federazione Russa 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **Sudafrica** 00 800 00 24 67 23 **Spagna** 00 800 00 24 67 23
Svezia 00 800 00 24 67 23 **Svizzera** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Tailandia** 66 2 651 8311
Emirati Arabi Uniti 36 1 459 6150 **Regno Unito** 00 800 00 24 67 23



iQ-Check *Vibrio* Kit

Guia do usuário

Teste para a detecção por PCR em tempo real de *Vibrio cholerae*,
V. parahaemolyticus, e *V. vulnificus* em amostras de alimentos

Nº no catálogo 12006574



Índice

Section 1	Introdução	1
Section 2	Tecnologia iQ-Check <i>Vibrio</i>	1
Section 3	Componentes do Kit.....	2
Section 4	Prazo de Validade e Armazenamento.....	2
Section 5	Materiais necessários, mas não fornecidos	2
	Equipamento	2
	Suprimentos.....	3
Section 6	Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados.....	3
Section 7	Protocolo.....	5
	Enriquecimento da amostra	5
	Tratamento de remoção de DNA livre.....	5
	Extração de DNA	5
	PCR em Tempo Real.....	6
	Análise de dados.....	6
Section 8	Confirmação de Resultados Positivos.....	8
	Todas as amostras.....	8
Section 9	Confirmação de Colônias Únicas usando o Kit iQ-Check	8
Section 10	Desempenho e validação do teste.....	8
Section 11	Referências.....	9
Section 12	Histórico de Revisão	9
	Apêndice – Guia de Cálculo da Mistura de PCR	10

Seção 1 Introdução

Vibrio spp. representa uma séria ameaça para a saúde humana. Três espécies, em especial (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus*), estão associadas a problemas gastrointestinais, podendo levar a infecções e septicemia.

Esse risco está associado principalmente ao consumo de frutos do mar crus ou mal cozidos. A pesquisa e gerenciamento desse risco são cruciais para a segurança alimentar em matéria de frutos do mar e o mercado global de produtos do mar.

Seção 2 Tecnologia iQ-Check *Vibrio*

O Kit iQ-Check *Vibrio* é um teste multiplex baseado na amplificação e detecção genética através de PCR em tempo real. Os reagentes de PCR prontos para uso no kit contêm oligonucleotídeos (iniciadores e sondas) específicos para *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus*, bem como DNA polimerase e nucleotídeos. A detecção e a análise de dados são otimizadas para uso com um instrumento de PCR em tempo real da Bio-Rad, como o sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well, com análise através do Software CFX Manager IDE.

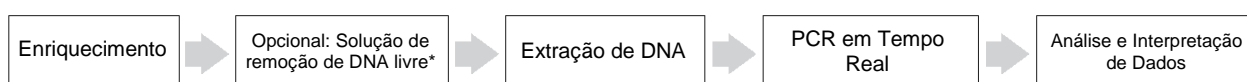
A PCR é uma poderosa técnica utilizada para gerar muitas cópias do DNA alvo. A reação de PCR consiste em vários ciclos de aquecimento e resfriamento para desnaturar o DNA, seguidos pela ligação dos primers a uma região-alvo específica. A DNA polimerase utiliza, então, esses primers e desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) para estender o DNA, criando, assim, cópias do DNA-alvo. Essas cópias se chamam amplicons.

Na PCR em tempo real, são utilizadas sondas para detectar alvos específicos no DNA durante a etapa de amplificação. Essas sondas estão ligadas a um pigmento que emite fluorescência apenas quando é hibridizado à sequência-alvo. 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 do instrumento de PCR em tempo real mede essa fluorescência na fase de hibridação (annealing) durante cada ciclo de PCR enquanto o Software CFX Manager IDE plota a intensidade da fluorescência em função do número de ciclos.

Um controle interno de DNA sintético é incluído na mistura da reação do Kit iQ-Check *Vibrio* para validar quaisquer possíveis resultados negativos. Este controle é amplificado ao mesmo tempo que as sequências-alvo de DNA de *Vibrio* e é detectado por uma sonda específica combinada com outro fluoróforo.

Esse teste permite a detecção qualitativa de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, e *V. vulnificus* em amostras de alimentos previamente enriquecidas por cultura. As matrizes-alvo principais são frutos do mar, incluindo peixe e mariscos (moluscos e crustáceos).

O teste inclui cinco etapas principais:



* Consulte o folheto do produto, Solução iQ-Check Free DNA Removal para amostras de alimentos, água e ambiente (1000058391), para as condições de uso.

Seção 3

Componentes do Kit

O kit iQ-Check *Vibrio* contém reagentes suficientes para 96 testes (94 amostras).

ID do Reagente	Reagente	Quantidade fornecida, ml
A	Reagente de lise I	1 garrafa, 20
B	Sondas fluorescentes	1 tubo, 0,55
C	Mistura de amplificação	1 tubo, 4,4
D	Controle de PCR negativo	1 tubo, 0,5
E	Controle de PCR positivo	1 tubo, 0,25

Seção 4

Prazo de Validade e Armazenamento

Uma vez recebido, o kit deve ser armazenado a 2-8 °C. Os reagentes armazenados a esta temperatura podem ser utilizados até o prazo de validade indicado nos tubos.

Seção 5

Materiais necessários, mas não fornecidos

Equipamento

- Liquidificador de laboratório para homogeneizar amostras de teste
- Incubadora para enriquecimento microbiológico de amostras
- Específico para extração em tubos estéreis de tampa de rosca cônica de 1,5 ml:
 - Bloco para banho seco a 37 ± 2 °C e/ou 95-100 °C
- Específico para extração em deep well:
 - Agitador térmico de aquecimento* capaz de manter 37 ± 2 °C e/ou 95-100 °C, com uma velocidade de mistura de pelo menos 1.300 rpm
- Vortexer
- Micropipetas de 20, 200 e 1.000 µl
- Pontas para pipetadores de repetição, estéreis, embalagem individual
- Sistema de PCR em tempo real da Bio-Rad, *por exemplo, CFX96 Touch Deep Well System (número no catálogo 3600037)
- Sistema Bio-Rad iQ-Check Prep para extração automatizada de DNA e configuração de placas de PCR (número no catálogo 3594911)

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

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

Suprimentos

- Meio de enriquecimento: *Vibrio* Enrichment Broth (VEB), 500 g (nº no catálogo 12007405) ou alkaline saline peptone water (ASPW) ou alkaline peptone water (APW)
- Solução iQ-Check Free DNA Removal(número no catálogo 3594970)
- Específico para extração em tubos:
 - Tubos com tampa cônica de rosca de 1,5 ml, estéreis (por exemplo, nº no catálogo 2240110XTU)
- Específico para extração em deep well:
 - Deep well de 96 poços (nº no catálogo 3594900)
 - Filme plástico de vedação (número no catálogo 3590139)
 - Filme de vedação pré-perfurado Filme de vedação de placa pré-perfurado (nº no catálogo 3600040, apenas América do Norte)
- Placas de PCR, tubos, fitas e tampas de vedação
- Pontas de filtro estéreis adaptáveis a micropipetas de 20, 200 e 1.000 µl
- Pontas para Pipetas Combitip ou pipetadores de repetição equivalentes, estéreis, embalados individualmente
- Tubos de ensaio estéreis de 2 e 5 ml
- Luvas sem talco
- Água estéril destilada
- Alvejante, 5%
- Agente de limpeza, como o DNA AWAY ou o RNase AWAY

Seção 6

Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados

- 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
- Kit iQ-Check *Vibrio*:
 - Todas as substâncias ou misturas no kit de teste são produtos classificados, de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado (GHS). O contato com ácidos pode causar a liberação de gases tóxicos. Nenhuma precaução especial é necessária, se usado corretamente. Se o produto for inalado, forneça ar fresco e consulte um médico em caso de queixas. Após o contato dos olhos com o produto, enxágue os olhos abertos por vários minutos em água corrente. Se os produtos forem ingeridos, provoque vômito e procure ajuda médica

- Sistema iQ-Check Prep:
 - O uso inadequado do sistema iQ-Check Prep pode causar ferimentos ou danos ao instrumento. Alguns componentes podem representar um risco de ferimentos pessoais devido ao calor excessivo, se manuseados incorretamente. Para uso seguro, o sistema iQ-Check Prep deve ser operado somente por pessoal qualificado do laboratório que tenha sido treinado adequadamente. A manutenção do instrumento deve ser realizada apenas pelos engenheiros de serviço de campo da Bio-Rad
- Sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well:
 - O uso inadequado do Sistema CFX96 Touch Deep Well pode causar ferimentos ou danos ao instrumento. Alguns componentes podem representar um risco de ferimentos pessoais devido ao calor excessivo, se manuseados incorretamente. Para uso seguro, o Sistema CFX96 Touch Deep Well deve ser operado somente por pessoal qualificado do laboratório que tenha sido treinado adequadamente. A manutenção do instrumento deve ser realizada apenas pelos engenheiros de serviço de campo da Bio-Rad
- Enriquecimento:
 - O usuário deve ler, entender e seguir todas as informações de segurança nas instruções do Kit iQ-Check *Vibrio*. Guarde as instruções de segurança para referência futura. Para reduzir os riscos associados à exposição a produtos químicos e riscos biológicos, realize testes de patógenos em um laboratório devidamente equipado, sob o controle de pessoal treinado. Sempre siga as práticas padrão de segurança do laboratório, incluindo o uso de vestuário de proteção e proteção ocular adequados ao manusear reagentes e amostras contaminadas. Evite o contato com o conteúdo do meio de enriquecimento e dos tubos de reagentes após a amplificação. Descarte amostras enriquecidas de acordo com as normas atuais do setor
 - O *Vibrio* é um organismo de nível 2 de biossegurança. Amostras biológicas, como enriquecimentos, têm o potencial de transmitir doenças infecciosas. Siga todos os regulamentos locais, estaduais/provinciais e/ou nacionais aplicáveis sobre o descarte de resíduos biológicos. Use equipamento de proteção adequado, que inclua, entre outros, óculos de proteção, proteção facial, roupas/jaleco e luvas. Todo o trabalho deve ser realizado em instalações adequadamente equipadas, utilizando o equipamento de segurança apropriado (por exemplo, dispositivos de contenção física). Os indivíduos devem ser treinados de acordo com os requisitos regulamentares e da empresa/instituição aplicáveis antes de trabalhar com materiais potencialmente infecciosos
 - Quando o teste estiver concluído, todos os materiais e meios possivelmente contendo patógenos devem ser descontaminados, seguindo as normas atuais da indústria para o descarte de resíduos contaminados (ou seja, autoclave por 20 min a 120 °C). Consulte a folha de dados de segurança para obter informações adicionais e regulamentos locais para descarte
- A qualidade dos resultados depende do estrito cumprimento das Boas Práticas de Laboratório (por exemplo, a norma EN ISO 7218), especialmente em relação à PCR:
 - Nunca faça circular 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 reagentes do kit com o vortex antes de utilizá-los, de modo a garantir a homogeneidade
 - Verifique periodicamente a exatidão e precisão das pipetas, bem como o correto funcionamento dos instrumentos
 - Troque frequentemente de luvas, especialmente se suspeitar que estão contaminadas

- Limpe os espaços de trabalho periodicamente com alvejante a 5% e outros agentes descontaminantes, como o DNA AWAY
- Utilize luvas sem talco e evite escrever ou deixar impressões digitais nas tampas dos tubos. Ambos interferem com a aquisição de dados
- Recomenda-se fortemente seguir os requisitos gerais descritos na norma EN ISO 22174:2005 (Microbiologia de alimentos para animais e para animais – reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de patógenos de origem alimentar – Requisitos e definições gerais)

Seção 7

Protocolo

É altamente recomendável ler o protocolo inteiro antes de iniciar o teste. Manuseie as amostras de frutos do mar conforme descrito nos métodos padronizados (por exemplo, ISO 7218:2007 ou Capítulo 9 do BAM da FDA).

Enriquecimento da amostra

Homogeneíze n g de amostra em $9 \times n$ ml de VEB, ASPW ou APW (por exemplo, 25 g em 225 ml).

Para VEB, incube, sem agitação, por 8 ± 1 hr a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ou $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Por favor, consulte as normas locais, regulamentos e/ou recomendações aplicáveis.

Para ASPW e APW, consulte as normas locais, regulamentos e/ou recomendações aplicáveis a respeito do tempo e temperatura de incubação.

Tratamento de remoção de DNA livre

A Solução iQ-Check Free DNA Removal (número no catálogo 3594970) fornece uma maneira ideal de remover DNA livre. Siga as recomendações da Bio-Rad no guia do usuário.

Extração de DNA

Recomendações gerais:

Ligue o bloco de calor ou o termocortador para pré-aquecer antes de iniciar o teste. Defina para $95\text{-}100^\circ\text{C}$. Mantenha o reagente de lise em suspensão enquanto pipeta, agitando a velocidade média em uma placa de agitação magnética.

1. Adicione $100\ \mu\text{l}$ de reagente de lise em todos os poços da deep well ou nos tubos que contenham amostras enriquecidas não tratadas ou tratadas com a Solução de Remoção de DNA Livre (ver parágrafo anterior).
2. Misture pipetando para cima e para baixo e feche os tubos com as tampas, ou vede a deep well com a película de vedação pré-perfurada.
3. Incube os tubos no bloco de calor apropriado a $95\text{-}100^\circ\text{C}$ por 15-20 min ou na deep well no agitador térmico por 15-20 min a uma velocidade de mistura mínima de 1.300 rpm.
4. Se estiver usando uma deep well, deixe-a esfriar a temperatura ambiente ($20\text{-}25^\circ\text{C}$).

Caso decida interromper temporariamente o procedimento, este é o momento de parada recomendado.

O sobrenadante pode ser armazenado por até 1 ano a -20 °C. Antes de reutilizá-lo, sempre deixe descongelar e homogeneizar e depois centrifugue os tubos a 10.000-12.000 x g por 5 min.

O teste do Kit iQ-Check *Vibrio* pode ser realizado no Sistema de Automação iQ-Check Prep (extração de DNA, tratamento de remoção de DNA livre, se necessário, e configuração de PCR).

PCR em Tempo Real

1. Para a configuração do instrumento e do software, siga as instruções do manual do usuário do Software CFX Manager IDE.
2. Prepare a mistura de PCR.
 - a. Prepare a mistura de PCR contendo a solução de amplificação (reagente C) e as sondas fluorescentes (reagente B) de acordo com o número de amostras e controles a serem analisados. Devem ser incluídos pelo menos um controle positivo e um controle negativo em cada execução da PCR. Use a tabela de pipetagem no Apêndice da Seção 12 – Guia de cálculo da mistura de PCR para encontrar os volumes corretos a serem usados para cada reagente.

Nota: A mistura de PCR (reagentes B + C) deve ser utilizada imediatamente. Ela é estável por 1 hr no máximo a 2-8 °C.

- b. Pipete 45 µl da mistura de PCR para cada poço, de acordo com a configuração da placa.
 - c. Adicione 5 µl de amostra, reagente D (controle negativo) ou reagente E (controle positivo). Não agite a amostra em vortex antes da pipetagem. Pipete para evitar a formação de bolhas no fundo dos poços. Vede hermeticamente os poços da placa de ou tiras de tubo. Como uma etapa opcional, centrifugue a placa de PCR selada ou as tiras de tubo (rotação rápida) de PCR para eliminar quaisquer bolhas.
 - d. Coloque a placa de PCR ou as tiras de tubo no termociclador. Certifique-se de colocar a placa corretamente com o poço A1 no canto superior esquerdo. Feche o módulo de reação.
3. Inicie a execução da PCR.

Para iniciar a execução da PCR, siga as instruções do manual do usuário do Software CFX Manager IDE.

Análise de dados

Os dados podem ser analisados diretamente no final da execução da PCR ou posteriormente, abrindo o arquivo de dados armazenados. Siga as instruções no manual do usuário do software CFX Manager IDE correspondente 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 do ciclo de quantificação (Cq) de cada amostra (o ciclo no qual a curva de amplificação cruza o limite).

O software CFX Manager IDE permite análises automatizadas completas para sistemas de detecção de PCR em tempo real da Bio-Rad.

Controles

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

Para que a experiência seja válida, os controles devem ter os resultados resumidos na tabela a seguir. Caso contrário, a reação de PCR deve ser repetida.

	Detecção do <i>Vibrio</i> Canais FAM, Cy5 e Texas Red	Detecção de controle interno Canal HEX
Controle negativo	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 36
Controle positivo	26 ≤ Cq ≤ 36	Não significativo

* Quando a detecção do *Vibrio* e do controle interno fornece um valor de Cq = N/A, a amostra deve ser diluída (1:10) e testada novamente.

Se os resultados dos controles negativos e positivos diferirem dos da tabela Controles, repita a execução da PCR.

Amostras

Uma amostra de *Vibrio* deve ter um valor de Cq ≥ 10 para o(s) fluoróforo(s) *V. cholerae* e/ou *V. parahaemolyticus* e/ou *V. vulnificus* para ser considerada positiva. Se o valor de Cq for menor que 10, verifique os dados brutos e se a curva é uma curva de amplificação regular (uma linha de base plana seguida de um rápido aumento da fluorescência e depois de um achatamento). Se a curva parecer correta, considere estar diante de uma amostra positiva para *Vibrio*.

Caso não haja valor Cq (Cq = N/A) para os alvos *V. cholera*, *V. parahaemolyticus*, e *V. vulnificus*, ou caso a curva não seja uma curva de amplificação típica, deve-se analisar o controle interno dessa amostra:

- Uma amostra *Vibrio* é considerada negativa se os valores de Cq para *V. cholera*, *V. parahaemolyticus*, e *V. vulnificus* forem N/A e o Cq de controle interno for ≥ 28
- Se o controle interno também não tiver valor Cq (Cq = N/A), isso provavelmente indica inibição da reação de PCR. Dilua a amostra (faça uma diluição de 1:10 em água esterilizada destilada usando 10 µl de extrato de DNA), use 5 µl da diluição para amplificação e repita o teste de PCR
- Se o valor Cq para o controle interno for <28, não será possível interpretar o resultado. Confirme que o limite foi colocado corretamente ou se a curva de dados brutos é uma curva regular de amplificação. Caso a curva não apresente uma forma característica, repita o teste de PCR

A interpretação dos resultados das amostras é resumida na seguinte tabela:

Detecção do <i>Vibrio</i> Canais Vc (Texas Red) e/ou Vp (FAM) e/ou Vv (Cy5)	Detecção de Controle Interno Canal IC (HEX)	Interpretação
Cq ≥ 10	N/A	Positivo
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Inibição*

* Quando a detecção do *Vibrio* e do controle interno fornece um valor de Cq = N/A, a amostra deve ser diluída (1:10) e testada novamente.

Seção 8

Confirmação de Resultados Positivos

Os resultados positivos do iQ-Check devem ser confirmados.

Todas as amostras

Para o teste de confirmação, comece pelo Caldo de Enriquecimento do *Vibrio* após o enriquecimento por 8 ± 1 hr a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ou $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Utilize os métodos descritos na ISO 21872-1:2017, no Capítulo 9 do BAM da FDA ou outros métodos padrão.

Seção 9

Confirmação de Colônias Únicas usando o Kit iQ-Check

O kit iQ-Check *Vibrio* também pode ser usado para confirmar colônias isoladas em meios de cultura de ágar.

1. Escolha uma colônia isolada, seletiva ou não seletiva, de um meio de cultura de ágar com um palito de dente, alça estéril ou outro consumível adaptado (por exemplo, uma ponta de pipeta).
2. Ressuspenda a colônia em 100 µl de sal de triptona ou água estéril destilada em um tubo de microcentrífuga.
Homogeneíze usando um vortexer.
3. Use 5 µl da suspensão com 45 µl de mistura de PCR (consulte D. PCR em tempo real na seção 7 do protocolo) e siga o restante do protocolo para interpretação de dados e resultados do iQ-Check *Vibrio*.

Seção 10

Desempenho e validação do teste



O kit iQ-Check *Vibrio* (Easy Protocol e Easy Protocol com Protocolo de Remoção de DNA Livre opcional) foi validado pelo AOAC Research Institute no âmbito do Programa de Método de Testes de Desempenho para detecção de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, e *V. vulnificus* em camarão cozido, mexilhões cozidos, ostras cruas, camarão cru e atum cru. Um resultado positivo com o iQ-Check deve ser considerado presumido e é recomendável que o resultado seja confirmado por métodos de referência padrão (consulte a Seção 11). Número do certificado: 032002.

Seção 11

Referências

ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 21872-1:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the determination of *Vibrio* spp.

ISO 22174:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – General requirements and definitions.

U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2004). Bacteriological Analytical Manual – Chapter 9. *Vibrio*.

Seção 12

Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
04.09.18	10000095779 Ver A	
06.19.18	10000095779 Ver B	Alterações editoriais
03.24.20	10000095779 Ver C	Alterações editoriais para validação AOAC-PTM Informações adicionais para enriquecimento de amostras na Seção 7

Apêndice – Guia de Cálculo da Mistura de PCR

Para encontrar os volumes corretos para a preparação da mistura de PCR, adicione o número total de amostras e de controles a serem analisados e encontre os volumes correspondentes de reagente B e de reagente

Número Total de Amostras e Controles	Reagente de sondas B, µl	Reagente C da mistura de amplificação, µl	Número Total de Amostras e Controles	Reagente de sondas B, µl	Reagente C da mistura de amplificação, µl	Número Total de Amostras e Controles	Reagente de sondas B, µl	Reagente C da mistura de amplificação, µl
1	5	40	33	178	1.400	65	351	2.800
2	11	86	34	184	1.500	66	356	2.900
3	16	130	35	189	1.500	67	362	2.900
4	22	173	36	194	1.600	68	367	2.900
5	27	216	37	200	1.600	69	373	3.000
6	32	259	38	205	1.600	70	378	3.000
7	38	302	39	211	1.700	71	383	3.100
8	43	346	40	216	1.700	72	389	3.100
9	49	389	41	221	1.800	73	394	3.200
10	54	432	42	227	1.800	74	400	3.200
11	59	475	43	232	1.900	75	405	3.200
12	65	518	44	238	1.900	76	410	3.300
13	70	562	45	243	1.900	77	416	3.300
14	76	605	46	248	2.000	78	421	3.400
15	81	648	47	254	2.000	79	427	3.400
16	86	691	48	259	2.100	80	432	3.500
17	92	734	49	265	2.100	81	437	3.500
18	97	778	50	270	2.200	82	443	3.500
19	103	821	51	275	2.200	83	448	3.600
20	108	864	52	281	2.200	84	454	3.600
21	113	907	53	286	2.300	85	459	3.700
22	119	950	54	292	2.300	86	464	3.700
23	124	994	55	297	2.400	87	470	3.800
24	130	1.000	56	302	2.400	88	475	3.800
25	135	1.100	57	308	2.500	89	481	3.800
26	140	1.100	58	313	2.500	90	486	3.900
27	146	1.200	59	319	2.500	91	491	3.900
28	151	1.200	60	324	2.600	92	497	4.000
29	157	1.300	61	329	2.600	93	502	4.000
30	162	1.300	62	335	2.700	94	508	4.100
31	167	1.300	63	340	2.700	95	513	4.100
32	173	1.400	64	346	2.800	96	518	4.100

Visite bio-rad.com/iqcheck para maiores informações.

BIO-RAD é uma marca comercial da Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK é uma marca comercial da Bio-Rad Europe GmbH em certas jurisdições.

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



Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science Group

Site bio-rad.com **EUA** 1 800 424 6723 **Austrália** 61 2 9914 2800 **Áustria** 00 800 00 24 67 23 **Bélgica** 00 800 00 24 67 23 **Brasil** 4003 0399 **Canadá** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Tchéquia** 00 800 00 24 67 23 **Dinamarca** 00 800 00 24 67 23 **Finlândia** 00 800 00 24 67 23 **França** 00 800 00 24 67 23 **Alemanha** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300 **Hungria** 00 800 00 24 67 23 **Índia** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Itália** 00 800 00 24 67 23 **Japão** 81 3 6361 7000 **Coreia** 82 2 3473 4460 **Luxemburgo** 00 800 00 24 67 23 **México** 52 555 488 7670 **Países Baixos** 00 800 00 24 67 23 **Nova Zelândia** 64 9 415 2280 **Noruega** 00 800 00 24 67 23 **Polônia** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23 **Federação Russa** 00 800 00 24 67 23 **Singapura** 65 6415 3188 **África do Sul** 00 800 00 24 67 23 **Espanha** 00 800 00 24 67 23 **Suécia** 00 800 00 24 67 23 **Suíça** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Tailândia** 66 2 651 8311 **Emirados Árabes Unidos** 36 1 459 6150 **Reino Unido** 00 800 00 24 67 23



iQ-Check *Vibrio* Kit

Guía del usuario

Análisis para la detección por PCR en tiempo real de *Vibrio cholerae*,
V. parahaemolyticus, y *V. vulnificus* en muestras de alimentos

Referencia 12006574



Tabla de Contenidos

Section 1	Introducción	1
Section 2	Tecnología iQ-Check <i>Vibrio</i>	1
Section 3	Componentes del kit	2
Section 4	Vida útil y conservación	2
Section 5	Materiales necesarios, pero no suministrados	2
	Equipamiento	2
	Materiales no incluidos en el kit	3
Section 6	Seguridad, precauciones y recomendaciones para la obtención de resultados óptimos	3
Section 7	Protocolo	5
	Enriquecimiento de la muestra	5
	Procedimiento de extracción de ADN libre	5
	Extracción de ADN	5
	PCR en tiempo real	6
	Análisis de los datos	6
Section 8	Confirmación de resultados positivos	8
	Todas las muestras	8
Section 9	Confirmación de colonias individuales usando el iQ-Check Kit	8
Section 10	Aplicaciones del ensayo y validaciones	8
Section 11	Referencias	9
Section 12	Historial de revisiones	9
	Apéndice - Guía de cálculo de la mix de PCR	10

Apartado 1

Introducción

Vibrio spp. constituye una grave amenaza para la salud humana. Existen tres especies en particular, (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus*), que están relacionadas con problemas gastrointestinales y pueden provocar infecciones y septicemia.

Este riesgo está relacionado principalmente con el consumo de marisco crudo o poco cocinado. La investigación y el control de este riesgo son cruciales para la seguridad de los alimentos de origen marino en todo el mundo y para el mercado global de los productos pesqueros.

Apartado 2

Tecnología iQ-Check *Vibrio*

El iQ-Check *Vibrio* Kit es un test multiplex que se basa en la amplificación de genes y la detección por PCR en tiempo real. Los reactivos de PCR listos para usar del kit contienen oligonucleótidos (cebadores y sondas) específicos para *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus*, además de ADN polimerasas y nucleótidos. La detección y el análisis de datos han sido optimizados para su uso con un instrumento de PCR en tiempo real de Bio-Rad, como el CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System, con el análisis e interpretación de datos mediante el software CFX Manager IDE.

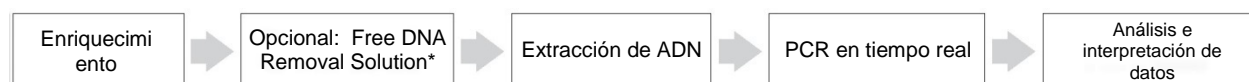
La PCR es una potente técnica que se utiliza para generar múltiples copias del ADN diana. La reacción PCR consiste en ciclos de calentamiento y enfriamiento para desnaturalizar el ADN, seguidos de la unión de los cebadores a una región diana concreta. La ADN polimerasa utiliza estos cebadores y desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) para extender el ADN, creando así copias del ADN diana. Estas copias se llaman amplicones.

En la PCR en tiempo real, se utilizan sondas para detectar secuencias específicas en el ADN durante la fase de amplificación. Estas sondas están vinculadas a un fluoróforo que emite fluorescencia solo cuando se hibrida con la secuencia diana. En ausencia de ADN diana o de interés, no se detectará fluorescencia. A medida que el número de amplicones aumenta con cada ciclo de amplificación, la intensidad de la fluorescencia también se incrementa. El módulo óptico del instrumento de PCR en tiempo real mide esta fluorescencia en la fase de lectura durante cada ciclo de PCR, mientras que el software CFX Manager IDE registra la intensidad de la fluorescencia en función del número de ciclos.

En la mix de reacción del iQ-Check *Vibrio* Kit se incluye un control interno de ADN sintético para validar cualquier posible resultado negativo. Este control se amplifica al mismo tiempo que las secuencias de ADN diana de *Vibrio*, y se detecta mediante una sonda específica marcada con otro fluoróforo.

Este ensayo permite la detección cualitativa de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus* en muestras de alimentos previamente enriquecidas por cultivo. Las principales matrices a las que está dirigido son los productos del mar, incluyendo pescado y mariscos (moluscos y crustáceos).

El ensayo engloba cinco fases principales:



* Por favor, consulte las condiciones de uso en el manual del producto iQ-Check Free DNA Removal Solution para alimentos, aguas y muestras ambientales (10000058391).

Apartado 3 Componentes del kit

El iQ-Check *Vibrio* Kit contiene suficientes reactivos para 96 ensayos (94 muestras).

ID de reactivo	Reactivo	Cantidad suministrada, ml
A	Reactivo de lisis I	1 frasco, 20
B	Sondas fluorescentes	1 tubo, 0,55
C	Mix de amplificación	1 tubo, 4,4
D	Control negativo PCR	1 tubo, 0,5
E	Control positivo PCR	1 tubo, 0,25

Apartado 4 Vida útil y conservación

Una vez recibido, el kit se debe conservar a 2-8 °C. A esta temperatura, los reactivos se pueden utilizar hasta la fecha de caducidad indicada en los tubos.

Apartado 5 Materiales necesarios, pero no suministrados

Equipamiento

- Homogeneizador de palas para homogeneizar las muestras de ensayo
- Incubador para el enriquecimiento microbiológico de muestras
- Específico para extracción en tubos cónicos estériles de 1,5 mL con tapón de rosca :
 - Calentador de bloque seco a 37 ± 2 °C y/o 95 - 100 °C
- Específico para extracción en placa Deep Well:
 - Calefactor térmico con agitación * con capacidad para mantener 37 ± 2 °C y/o 95 - 100 °C, con una velocidad de mezcla de al menos 1.300 rpm
- Vórtex (agitador vórtex)
- Micropipetas de 20, 200, y 1.000 µl
- Puntas para pipetas de repetición; estériles, envasadas individualmente
- Sistema de PCR en tiempo real de Bio-Rad*, por ejemplo, CFX96 Touch Deep Well System (Referencia 3600037)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System para extracción automatizada de ADN y configuración de placa de PCR (Referencia 3594911)

Nota: : Recomendamos usar una fuente de alimentación ininterrumpida (SAI) con el termociclador y el sistema iQ-Check Prep..

* Si desea obtener más información sobre los instrumentos recomendados, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Bio-Rad.

Materiales no incluidos en el kit

- Medio de enriquecimiento: Vibrio Enrichment Broth (VEB), 500 g (Referencia 12007405) o alcaline saline peptone water (ASPW), o alcaline peptone water (APW)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (Referencia 3594970)
- Específico para extracción en tubos:
 - Tubos cónicos de tapón de rosca de 1,5 ml, estériles (por ejemplo, referencia #2240110XTU)
- Específico para extracción en placa Deep Well:
 - Placa Deep Well de 96 pocillos (microplacas Deep Well iQ-Check, referencia #3594900)
 - Película o film plástico de sellado (referencia #3590139)
 - Película de sellado X-Pierce, referencia #3593977, o película pre-perforada de sellado de placas, #3600040, sólo en América del Norte
- Placas PCR, tubos, film adhesivo y tapas
- Puntas estériles con filtro, adaptables para micropipetas de 20, 200, y 1.000 µl
- Puntas para pipetas Combitip o pipetas de repetición equivalentes; estériles, envasadas individualmente
- Tubos para ensayo estériles de 2 y 5 ml
- Guantes sin polvo
- Agua destilada estéril
- Lejía diluida al 5%
- Solución limpiadora, como DNA AWAY o RNase AWAY

Apartado 6

Seguridad, precauciones y recomendaciones para la obtención de resultados óptimos

- Este ensayo debe realizarlo personal debidamente instruido
- Las muestras y los cultivos de enriquecimiento deben ser tratados como material potencialmente infeccioso y deben eliminarse de acuerdo con las normas y reglamentos locales
- Todo el material potencialmente infeccioso debe ser esterilizado en autoclave antes de su eliminación
- iQ-Check *Vibrio* Kit:
 - Todas las sustancias o mezclas del kit de análisis son productos clasificados conforme al Sistema Global Armonizado de Clasificación y Rotulado de Productos Químicos (SGA). El contacto con ácidos puede causar la liberación de gases tóxicos. Con un uso correcto, no es necesario tomar precauciones especiales. En caso de inhalación del producto, proveer aire fresco y consultar a un médico si se sufren molestias. En caso de contacto del producto con los ojos, enjuagar el ojo abierto durante varios minutos con abundante agua corriente. En caso de ingestión de los productos, inducir el vómito y solicitar asistencia médica

- iQ-Check Prep System:
 - El uso inadecuado del iQ-Check Prep System puede causar lesiones personales o daños en el instrumento. Algunos componentes pueden entrañar riesgo de lesiones personales por calor excesivo si se utilizan de forma inadecuada. Para un uso seguro, el iQ-Check Prep System debe ser manejado únicamente por personal de laboratorio cualificado y debidamente formado. El mantenimiento del instrumento debe correr a cargo exclusivamente de los ingenieros del servicio de campo de Bio-Rad
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System:
 - El uso inadecuado del CFX96 Touch Deep Well System puede causar lesiones personales o daños en el instrumento. Algunos componentes pueden entrañar riesgo de lesiones personales por calor excesivo si se utilizan de forma inadecuada. Para un uso seguro, el CFX96 Touch Deep Well System debe ser operado únicamente por personal de laboratorio cualificado y debidamente formado. El mantenimiento del instrumento debe correr a cargo exclusivamente de los ingenieros del servicio técnico de Bio-Rad
- Enriquecimiento:
 - El usuario debe leer, comprender y observar toda la información de seguridad que figura en las instrucciones para el iQ-Check *Vibrio* Kit. Conserve las instrucciones de seguridad para futuras consultas. Se recomienda que, a fin de reducir los riesgos asociados a la exposición a productos químicos y peligros biológicos, se efectúen ensayos de patógenos en un laboratorio debidamente acondicionado y bajo el control de personal capacitado. Siga siempre las prácticas estándar de seguridad para los laboratorios, entre ellas el uso de prendas de protección adecuadas y protección ocular al manipular reactivos y muestras contaminadas. Evite el contacto con el contenido de los tubos de medios de enriquecimiento y reactivos después de la amplificación. Deseche las muestras enriquecidas conforme a las normas vigentes de la industria
 - *Vibrio* es un organismo de nivel 2 de bioseguridad. Las muestras biológicas, como los enriquecimientos, etc. son susceptibles de transmitir enfermedades infecciosas. Siga todas las normas locales, estatales/provinciales y/o nacionales aplicables en materia de eliminación de desechos biológicos. Use el equipo de protección apropiado, que incluye, aunque sin limitarse a, gafas protectoras, protector facial, ropa/bata de laboratorio y guantes. Todos los trabajos deben realizarse en instalaciones debidamente acondicionadas y con el equipo de seguridad adecuado (por ejemplo, sistemas de contención física). Antes de trabajar con materiales potencialmente infecciosos, se debe capacitar al personal conforme a los requisitos reglamentarios y normativos de la empresa/institución.
 - Una vez finalizados los ensayos, todos los materiales y medios susceptibles de contener patógenos deberán descontaminarse siguiendo las normas en vigor en la industria en materia de eliminación de desechos contaminados (es decir, en autoclave durante 20 min a 120 °C). Para más información y consultas sobre las regulaciones locales de eliminación, ver la Ficha de Datos de Seguridad.
- La calidad de los resultados radica en un estricto cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio (por ejemplo, la norma EN ISO 7218), especialmente en lo que respecta a la PCR:
 - El equipo de laboratorio (pipetas, tubos, etc.) no debe intercambiarse entre un puesto de trabajo y otro
 - Es imprescindible utilizar un control positivo y otro negativo para cada serie de reacciones de amplificación
 - No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada
 - Agitar con un vórtex los reactivos del kit antes de utilizarlos, para garantizar la homogeneidad
 - Verificar regularmente la exactitud y la precisión de las pipetas, así como el funcionamiento correcto del instrumental

- Cambiarse los guantes a menudo, en particular si sospecha que pueden estar contaminados
 - Limpiar regularmente las superficies de trabajo con lejía diluida al 5% y otro agente descontaminante, como DNA AWAY
 - Usar guantes sin polvo para no dejar huellas. No escribir en las tapas de los tubos. En ambos casos, puede dificultar la adquisición de datos
- Se recomienda encarecidamente seguir las disposiciones generales descritas en la norma EN ISO 22174:2005 (Microbiología de los alimentos y los piensos - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos transmitidos por los alimentos - Requisitos y definiciones generales)

Apartado 7

Protocolo

Se aconseja encarecidamente leer el protocolo completo antes de proceder con el ensayo. Manipular las muestras de mariscos como se describe en los métodos normalizados (por ejemplo, ISO 7218:2007 o FDA BAM Capítulo 9).

Enriquecimiento de la muestra

Homogeneizar n g de muestra en $9 \times n$ ml de VEB o ASPW o APW (por ejemplo, 25 g en 225 ml) en una bolsa de mezcla con un homogeneizador de palas de laboratorio.

Para VEB, incubar, sin agitar, durante 8 ± 1 hora a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ o $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Consultar las normas, regulaciones y/o recomendaciones locales aplicables.

Para ASPW o APW, consultar las normas, regulaciones y/o recomendaciones locales aplicables en cuanto a tiempo de incubación y temperatura.

Procedimiento de extracción de ADN libre

La solución iQ-Check Free DNA Removal Solution (Referencia 3594970) es el método ideal para la eliminación de ADN libre. Siga las recomendaciones de Bio-Rad descritas en la guía del usuario.

Extracción de ADN

Recomendaciones generales:

Encienda el bloque calefactor o el termomezclador antes de iniciar el ensayo. Ajústelo a $95 - 100^\circ\text{C}$. Mantenga el reactivo de lisis en suspensión mientras pipetea agitando a velocidad media en una placa agitadora magnética.

1. Añada 100 μl de reactivo de lisis a todos los pocillos de la placa Deep Well, o bien a los tubos que contienen muestras enriquecidas no tratadas o tratadas con el iQ-Check Free DNA Removal Solution (ver párrafo anterior).
2. Mezclar pipeteando arriba y abajo, y a continuación cerrar los tubos con tapas o sellar la placa Deep Well con una película pre-perforada.
3. Incubar los tubos en el bloque calefactado a $95 - 100^\circ\text{C}$ durante 15-20 min. o la placa Deep Well en el termomezclador durante 15-20 min. a una velocidad de agitación de 1.300 rpm como mínimo.

4. Si se usa una placa Deep Well, debe dejarse enfriar a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

Si decide detener temporalmente el procedimiento, este es el momento recomendado para ello. El sobrenadante se puede conservar hasta 1 año a -20 °C. Antes de reutilizarlo, déjelo siempre descongelar y homogenícelo, y luego centrifugue los tubos a 10.000 - 12.000 x g durante 5 min.

El ensayo iQ-Check *Vibrio* Kit se puede realizar en el iQ-Check Prep Automation System (extracción de ADN, procedimiento de eliminación de ADN libre, en caso necesario, y configuración de PCR).

PCR en tiempo real

1. Para la configuración del instrumento y del software, siga las instrucciones del Manual del usuario del software CFX Manager IDE.
2. Preparar la mix de PCR.
 - a. Prepare la mix de PCR que contiene la solución de amplificación (reactivo C) y las sondas fluorescentes (reactivo B) en función del número de muestras y controles a analizar. Cada vez que se realice una PCR, se debe incluir al menos un control positivo y uno negativo. Utilice la tabla de pipeteo del Apartado 12, Apéndice Guía de cálculo de la mezcla de PCR para determinar los volúmenes correctos para cada reactivo.

Nota: La mix de PCR (reactivos B + C) debe usarse inmediatamente. Como máximo, es estable durante 1 hr a 2 - 8 °C.

- b. Pipetee 45 µl de la mix de PCR en cada pocillo de acuerdo con la configuración de su placa.
 - c. Añada 5 µl de muestra, reactivo D (control negativo) o reactivo E (control positivo). No agite la muestra con un vórtex antes de pipetear. Pipetee con cuidado para evitar que se formen burbujas en el fondo de los pocillos. Selle herméticamente los pocillos de la placa o las tiras de tubos. Opcionalmente, puede centrifugar la placa de PCR o las tiras de tubos de PCR selladas (quick spin) para eliminar posibles burbujas.
 - d. Coloque la placa o las tiras de tubos en el termociclador. Asegúrese de colocar la placa correctamente con el pocillo A1 en la esquina superior izquierda. Cierre el módulo de reacción.
3. Inicie el ensayo de PCR.

Para iniciar la PCR, siga las instrucciones del Manual del usuario del software CFX Manager IDE.

Análisis de los datos

Los datos se pueden analizar directamente al final del ensayo de PCR, o posteriormente abriendo el fichero de datos archivado. Para abrir los ficheros de datos y configurar los parámetros de análisis de datos, siga las instrucciones del Manual del usuario del software CFX Manager IDE.

Interpretación de los resultados

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

El software CFX Manager IDE facilita un análisis automatizado completo para los sistemas de detección por PCR en tiempo real de Bio-Rad.

Controles

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

Para que el ensayo sea válido, los controles deben presentar los resultados resumidos en la siguiente tabla. De lo contrario, la reacción PCR se tiene que repetir

	Detección de <i>Vibrio</i> Canales FAM, Cy5 y Texas Red	Detección de control interno Canal HEX
Control negativo	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 36
Control positivo	26 ≤ Cq ≤ 36	No significativo

* Si tanto la detección de *Vibrio* como la detección de control interno dan un valor Cq = N/A (no aplicable), se debe diluir la muestra (1:10) y volver a analizarla.

Si los resultados de los controles negativos y positivos difieren de los de la tabla de controles, debe repetirse el ensayo de PCR.

Muestras

Una muestra de *Vibrio* tiene que tener un valor Cq ≥ 10 para el / los fluoróforo(s) *V. cholerae* y / o *V. parahaemolyticus* y / o *V. vulnificus* para poder considerarla como positiva. Si el valor Cq es inferior a 10, compruebe los datos brutos y verifique que la curva es una curva de amplificación típica (línea de base plana seguida de un rápido aumento de la fluorescencia y un posterior aplanamiento). Si la curva parece correcta, se puede considerar que la muestra de *Vibrio* es positiva.

Si no hay un valor Cq (Cq = N/A) para las dianas de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus*, o si la curva no es una curva de amplificación típica, hay que analizar el control interno de esa muestra:

- Una muestra de *Vibrio* se considera negativa si los valores Cq de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus* son N/A y el Cq de control interno es ≥ 28
- Si el control interno tampoco tiene un valor Cq (Cq = N/A), probablemente sea indicativo de inhibición de la reacción PCR. Diluya la muestra (dilución 1:10 en agua destilada estéril usando 10 µl de extracto de ADN), use 5 µl de la dilución para la amplificación, y repita el ensayo de PCR
- Si el valor Cq del control interno es < 28, no es posible interpretar el resultado. Verifique que el umbral fue ubicado correctamente o que la curva de datos en bruto es una curva de amplificación típica. Si la curva no tiene una forma característica, repita el ensayo PCR

En la siguiente tabla encontrará un resumen de la interpretación de los resultados de la muestra:

Canales de detección de <i>Vibrio</i> Vc (Texas Red) y / o Vp (FAM) y / o Vv (Cy5)	Detección de control interno Canal IC (HEX)	Interpretación
Cq ≥ 10	N/A	Positivo
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibición*

* Si tanto la detección de *Vibrio* como la detección de control interno dan un valor Cq = N/A, se tiene que diluir la muestra (1:10) y volver a analizarla.

Apartado 8

Confirmación de resultados positivos

Los resultados positivos con iQ-Check deben confirmarse.

Todas las muestras

Para el ensayo de confirmación, tome como punto de partida el *Vibrio* Enrichment Broth después del mínimo de 8 ± 1 hr de enriquecimiento a 35 ± 1 °C o 37 ± 1 °C.

Aplique los métodos descritos por la norma ISO 21872-1:2017, FDA BAM capítulo 9, u otros métodos estandarizados similares.

Apartado 9

Confirmación de colonias individuales usando el iQ-Check Kit

El iQ-Check *Vibrio* Kit también se puede utilizar para confirmar colonias aisladas en placas de agar.

1. Escoja una colonia aislada, selectiva o no selectiva, de una placa de agar con un palillo, un asa estéril u otro consumible adaptado (por ejemplo, una punta de pipeta).
2. Resuspenda la colonia en 100 µl de agua destilada estéril o de triptona sal en un tubo de microcentrifuga. Homogenice con vórtex.
3. Utilice 5 µl de la suspensión con 45 µl de la mix de PCR (véase el epígrafe PCR en tiempo real en el Apartado 7 Protocolo) y continúe con el resto del protocolo iQ-Check *Vibrio* para la interpretación de los datos y los resultados.

Apartado 10

Aplicaciones del ensayo y validaciones



El iQ-Check *Vibrio* Kit (Easy Protocol e Easy Protocol con Free DNA Removal Protocol opcional) ha sido validado por el Instituto de Investigación de la AOAC en el marco del Programa de Métodos de Rendimiento Comprobados para la detección de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus* en gambas cocinadas, mejillones crudos, ostras crudas, gambas crudas y atún crudo. El resultado positivo con iQ-Check debe considerarse de carácter presuntivo y se recomienda confirmar dicho resultado aplicando métodos de referencia normalizados (ver Apartado 11). Número de certificado: 032002.

Apartado 11 Referencias

ISO 7218:2007. Microbiología de los alimentos y los piensos - Requisitos generales y orientación para los exámenes microbiológicos.

ISO 21872-1:2017. Microbiología de la cadena alimentaria - Método horizontal para la determinación de *Vibrio* spp.

ISO 22174:2005. Microbiología de los alimentos y los piensos - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos transmitidos por los alimentos - Requisitos y definiciones generales.

Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, Centro de Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada (2004). Manual de Análisis Bacteriológico - Capítulo 9. *Vibrio*.

Apartado 12 Historial de revisiones

Fecha de publicación	Número de documento	Cambio
09/04/18	10000095779 Ver A	
19/06/18	10000095779 Ver B	Cambios de editorial
24/03/20	10000095779 Ver C	Cambios de editorial para validación AOAC-PTM Información adicional para el enriquecimiento de muestras en el Apartado 7

Apéndice - Guía de cálculo de la mix de PCR

Para obtener los volúmenes correctos para la preparación de la mix de PCR, sume el número total de muestras y controles a analizar y localice los volúmenes correspondientes de reactivo B y reactivo

Número total de muestras y controles	Sondas reactivo B, µl	Mix de amplificación reactivo C, µl	Número total de muestras y controles	Sondas reactivo B, µl	Mix de amplificación reactivo C, µl	Número total de muestras y controles	Sondas reactivo B, µl	Mix de amplificación reactivo C, µl
1	5	40	33	178	1.400	65	351	2.800
2	11	86	34	184	1.500	66	356	2.900
3	16	130	35	189	1.500	67	362	2.900
4	22	173	36	194	1.600	68	367	2.900
5	27	216	37	200	1.600	69	373	3.000
6	32	259	38	205	1.600	70	378	3.000
7	38	302	39	211	1.700	71	383	3.100
8	43	346	40	216	1.700	72	389	3.100
9	49	389	41	221	1.800	73	394	3.200
10	54	432	42	227	1.800	74	400	3.200
11	59	475	43	232	1.900	75	405	3.200
12	65	518	44	238	1.900	76	410	3.300
13	70	562	45	243	1.900	77	416	3.300
14	76	605	46	248	2.000	78	421	3.400
15	81	648	47	254	2.000	79	427	3.400
16	86	691	48	259	2.100	80	432	3.500
17	92	734	49	265	2.100	81	437	3.500
18	97	778	50	270	2.200	82	443	3.500
19	103	821	51	275	2.200	83	448	3.600
20	108	864	52	281	2.200	84	454	3.600
21	113	907	53	286	2.300	85	459	3.700
22	119	950	54	292	2.300	86	464	3.700
23	124	994	55	297	2.400	87	470	3.800
24	130	1.000	56	302	2.400	88	475	3.800
25	135	1.100	57	308	2.500	89	481	3.800
26	140	1.100	58	313	2.500	90	486	3.900
27	146	1.200	59	319	2.500	91	491	3.900
28	151	1.200	60	324	2.600	92	497	4.000
29	157	1.300	61	329	2.600	93	502	4.000
30	162	1.300	62	335	2.700	94	508	4.100
31	167	1.300	63	340	2.700	95	513	4.100
32	173	1.400	64	346	2.800	96	518	4.100

Para más información, visite bio-rad.com/iqcheck .

BIO-RAD es una marca comercial de Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK es una marca registrada de Bio-Rad Europe, GmbH en diversos países.

Todas las marcas comerciales aquí indicadas son propiedad de sus respectivos propietarios.



Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science Group

*Sitio Web bio-rad.com USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 00 800 00 24 67 23 Bélgica 00 800 00 24 67 23
Brasil 4003 0399 Canadá 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 República Checa 00 800 00 24 67 23 Dinamarca 00 800 00 24 67 23
Finlandia 00 800 00 24 67 23 France 00 800 00 24 67 23 Alemania 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300
Hungria 00 800 00 24 67 23 India 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050 Italia 00 800 00 24 67 23 Japón 81 3 6361 7000
Corea 82 2 3473 4460 Luxemburgo 00 800 00 24 67 23 México 52 555 488 7670 Países Bajos 00 800 00 24 67 23
Nueva Zelanda 64 9 415 2280 Noruega 00 800 00 24 67 23 Polonia 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23
Federación Rusa 00 800 00 24 67 23 Singapur 65 6415 3188 Sudáfrica 00 800 00 24 67 23 España 00 800 00 24 67 23
Suecia 00 800 00 24 67 23 Suiza 00 800 00 24 67 23 Taiwán 886 2 2578 7189 Tailandia 66 2 651 8311
Emiratos Árabes Unidos 36 1 459 6150 Reino Unido 00 800 00 24 67 23*

