
iQ-Check *S. Typhimurium* Kit

User Guide

Test for the real-time PCR detection of *Salmonella* Typhimurium
in food and environmental samples

Catalog # 12004306



Table of Contents

Section 1	Introduction	1
Section 2	The iQ-Check S. Typhimurium 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	4
Section 7	Protocol.....	5
	A. Sample Enrichment.....	6
	B. Free DNA Removal Treatment.....	7
	C. DNA Extraction.....	7
	D. Real-Time PCR	8
	E. Data Analysis	9
Section 8	Confirmation of Positive Results.....	10
Section 9	Confirmation of Single Colonies Using the iQ-Check Kit.....	10
Section 10	Test Performance and Validations	11
Section 11	References.....	11
Section 12	Revision History	11
	Appendix — PCR Mix Calculation Guide	12

Section 1 Introduction

Even though the incidence is decreasing in some areas, millions of cases of human salmonellosis are still reported worldwide each year. *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium, or ST) is one of the most frequently implicated serovars. Pork and poultry feed have been identified among the foods most commonly linked to these ST infections. Regulations have been implemented in some regions to monitor *Salmonella* species (spp.) and specific serotypes including *S. Typhimurium* in poultry from the primary production stage to the food products. The iQ-Check *S. Typhimurium* Kit allows for the rapid and specific detection of *S. Typhimurium* in food and environmental samples (including environment of primary production) within a few hours after the end of microbiological enrichment. Up to 94 samples can be processed with an easy-to-use procedure.

Section 2 The iQ-Check *S. Typhimurium* Technology

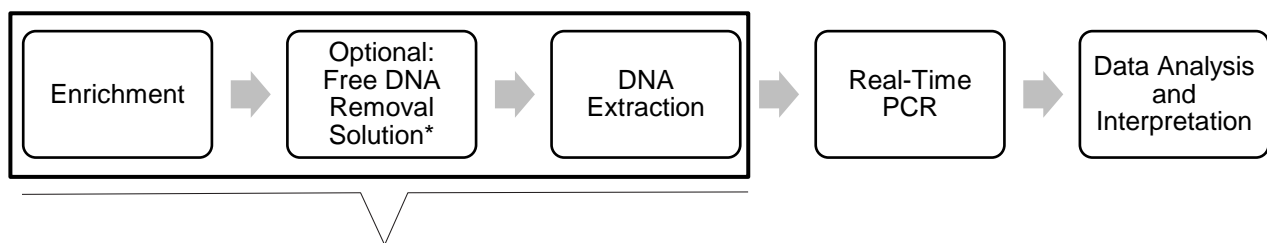
The iQ-Check *S. Typhimurium* Kit is a test based on gene amplification and detection by real-time PCR. The kit's ready-to-use PCR reagents contain oligonucleotides (primers and probes) specific for *S. Typhimurium*, as well as DNA polymerase and nucleotides. Detection and data analysis are optimized for use with a Bio-Rad real-time PCR instrument, such as the CFX96 Touch Deep Well System.

PCR is a powerful technique used to generate many copies of target DNA. During the PCR reaction, several cycles of heating and cooling denature the DNA. Primers then anneal to the target region, where the DNA polymerase uses the primers and deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) to extend the DNA, creating copies of the target DNA. These copies are called amplicons.

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

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

This test allows the qualitative detection of *S. Typhimurium* in select food products and environmental samples (including environment of primary production) previously enriched by culture. It includes the following five main steps:



This kit complements the iQ-Check *S. Enteritidis* and/or iQ-Check *Salmonella* II PCR Kits. The enrichment and DNA extraction steps are common. Please refer to the respective user guides.

*Please refer to the user guide of the iQ-Check Free DNA Removal Solution (#10000058391) for the conditions of use.

Section 3

Kit Components

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

Reagent ID	Reagent	Quantity Provided, ml
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:
 - Benchtop centrifuge capable of 10,000–12,000 x g
 - Dry heat block at 37 ± 2°C and 95–100°C
 - Cell disruptor, for example Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)
- Specific for extraction in deep well plate:
 - Heating thermoshaker* capable of maintaining 37 ± 2°C and 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

Section 5 Materials Required but Not Supplied

- 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 Systems.

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

Supplies

- Enrichment medium: Buffered Peptone Water (for example, BPW Plus, catalog #3564684, dehydrated, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 bottles; 3555790, 5 L x 2 bags; 3555795, 3 L x 4 bags; or BPW Standard, catalog #12013259, dehydrated, 500 g; 12013258, dehydrated, 5 kg; 12013260, 5 L x 2 bags)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalog #3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (catalog #12012383)
- RAPID'*Salmonella* Capsule (catalog #3564710, 100 capsules, quantity for 250 ml; 3564709, 100 capsules, quantity for 2.5 L; 3564712, 100 tests)
- RAPID'*Salmonella* Agar (catalog #3563961, 90 mm x 20 dishes; 3563962, 90 mm x 100 dishes; 3564705, dehydrated, 500 g)
- Specific for environmental samples:
 - Environmental sponges
 - Environmental swabs
 - Neutralizing broth for sponges and swabs, such as Dey-Engley (D/E) or HiCap Neutralizing Broth, or Lethen broth
- 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 (iQ-Check Deep Well Microplates, catalog #3594900)
 - Plastic sealing film (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, catalog #3590139)
 - Pre-pierced sealing film (X-Pierce Films, catalog #3593977 or Pre-Pierced Plate Sealing Film, #3600040, North America only)

- Specific for iQ-Check Prep System:
 - 60 ml dilution container (catalog #3594904)
 - Filter tips (catalog #3594902, 50 µl x 5,760; 3594903, 1,000 µl x 3,840)
 - PCR mix tubes (catalog #3594901, 5 ml x 50)
- PCR plates, tubes, sealing tape, and caps
- Sterile filter tips adaptable to 20, 200, and 1,000 µl micropipets
- Tips for Combitip pipets or equivalent repeat pipettors; sterile, individually packaged
- 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
- 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

Section 6

- 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 pathogens — General requirements and definitions)
- iQ-Check *S. Typhimurium* 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 the 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 Real-Time PCR Detection 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 Real-Time PCR Detection System must be operated only by qualified laboratory personnel who have been appropriately trained. Servicing of the 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 *S. Typhimurium* 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
 - *Salmonella* 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.

Section 7 Protocol

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

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

Scope (matrices)	Enrichment	DNA Extraction		Certification
		Method	Format	
Raw poultry with & without skin	BPW 21 ± 3 hr at 37 ± 1°C	Easy I	Tube/Deep well	AOAC PTM
Environmental primary production samples	Prewarmed Suppl. BPW 19 ± 1 hr at 41.5 ± 1°C + BPW 5 ± 1 hr at 37 ± 1°C	Easy I	Tube/Deep well	AOAC PTM
Other food products and environmental surfaces	BPW 21 ± 1 hr at 37 ± 1°C	Easy I/Standard I	Tube/Deep well	N/A

A. Sample Enrichment

Enrichment media must be at the appropriate incubation temperature (ambient, 37°C, or 41.5°C) before use.

Smaller sample sizes (up to 25 g)

1. Homogenize *n* g of sample in 9 x *n* ml BPW in a Stomacher bag with incorporated filter.
2. Incubate for 21 ± 1 hr at 37 ± 1°C.

Larger sample sizes (>25–375 g)

1. Homogenize *n* g of sample in 3 x *n* ml prewarmed BPW (for example, 375 g in 1,125 ml), in a Stomacher bag with incorporated filter.
2. Incubate for 21 ± 1 hr at 37 ± 1°C.

Environmental swabs and sponges

1. Homogenize swabs in 10 ml and sponges in 60–90 ml BPW. It is recommended to use neutralizing broth that does not contain aryl sulfonate complex. Neutralizing broths containing aryl sulfonate complex may require additional dilutions of the DNA extract.
2. Incubate for 21 ± 1 hr at 37 ± 1°C.

Primary production samples

1. Homogenize 1 swab in 100 ml BPW with RAPID' *Salmonella* supplement in a Stomacher bag with incorporated filter.
2. Incubate for 18–20 hr at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Transfer 100 μl of enriched sample to 900 μl BPW in a deep well plate.
4. Incubate for 4–6 hr at $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

B. 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.

C. DNA Extraction

General recommendations:

1. 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.
2. In general, avoid shaking the enrichment bag and collecting large fragments of food debris. For food samples with a fatty supernatant, collect the sample just below this layer.
3. Open tubes and wells carefully to avoid any possible cross contamination.
4. Cool the deep well plate before pipetting directly through prepierced sealing film.
5. Use the magnetic bar to keep the lysis reagent in suspension. Pipet while it is stirring at medium speed.
6. Gently shake the lysis reagent by hand first to resuspend the resin. Pipet while the magnetic stir bar is stirring the bottle contents at medium speed in order to keep the contents in suspension.

Standard I Protocol

1. Collect 1 ml of decanted enriched sample into a tube.
2. Centrifuge the tube at $10,000\text{--}12,000 \times g$ for 5 min. Discard the supernatant.
3. Add 200 μl of lysis reagent (reagent A) to the pellet and resuspend the pellet by pipetting the reagent up and down. Close the tube and vortex at high speed.
4. Incubate in the appropriate heat block at $95\text{--}100^\circ\text{C}$ for 10–15 min.
5. Vortex the tube at high speed and centrifuge at $10,000\text{--}12,000 \times g$ for 5 min.

This is the recommended stopping point for temporarily stopping the procedure.

The supernatant can be stored for up to 1 year at -20°C . Always allow it to thaw and homogenize, and then centrifuge at $10,000\text{--}12,000 \times g$ for 5 min before reusing.

Easy I Protocol

1. Aliquot 100 µl of lysis reagent (reagent A) to tubes or the wells of a deep well plate.
2. Add 100 µl of enriched sample.
3. Mix the solution by pipetting up and down until homogenized.
4. Close the tubes or seal the deep well plate with prepierced sealing film.
5. Incubate the tubes in the heat block at 95–100°C for 10–15 min. Incubate the deep well plate in the incubator under agitation at 1,300–1,600 rpm at 95–100°C for 15–20 min.
6. Vortex the tubes at high speed, and then centrifuge at 10,000–12,000 x g for at least 2 min.
7. Centrifugation is not needed for the deep well plate.

This is the recommended stopping point for temporarily stopping the procedure.

The supernatant can be stored for up to 1 year at –20°C. Always allow it to thaw and homogenize, and then centrifuge at 10,000–12,000 x g for 5 min before reusing.

D. Real-Time PCR

Instrument and Software Setup

For instrument and software setup, follow instructions in the real-time PCR system user guide for iQ-Check Kits.

PCR Mix Preparation

1. Prepare the PCR mix containing the amplification solution (reagent C) and the fluorescent probes (reagent B). The volume of PCR mix needed depends on 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 Appendix – PCR Mix Calculation Guide to find the correct volumes to use for each reagent.

Note: Use the PCR mix (reagent B + C) immediately after preparation. It is stable for 1 hr maximum at 2–8°C.

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

Run PCR

To start the PCR run, follow instructions in the real-time PCR system user guide for iQ-Check Kits.

E. 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 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 following results, as summarized in the table below. Otherwise the PCR reaction must be repeated.

	S. Typhimurium Detection (FAM)	Internal Control Detection (HEX channel)
Negative control	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Positive control	$26 \leq Cq \leq 36$	Not significant

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

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

Samples

A **positive** S. Typhimurium sample must have a Cq value ≥ 10 for the FAM fluorophore.

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

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

- If there is no Cq value for FAM and the internal control has a Cq ≥ 28 , this sample is considered a **negative** S. Typhimurium sample
- 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, it will be necessary to repeat the PCR test

Interpretation of sample results is summarized in the following table:

S. Typhimurium Detection (FAM channel)	Internal Control detection (HEX channel)	Interpretation
Cq ≥ 10	Not significant	Positive
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negative
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition*

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

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

Section 8

Confirmation of Positive Results

A positive iQ-Check *S. Typhimurium* result is presumed to be positive and confirmation according to an appropriate reference method is recommended.

Primary production samples

For environmental primary production samples, process the confirmation starting from the primary enrichment, then follow standard methods (ISO 6579-1, USDA MLG, or FDA BAM). For ISO 6579-1 standard, follow the MSRV method and then RAPID' *Salmonella* medium for the isolation. Complete the method with serological determination.

Results that are not in agreement between iQ-Check *S. Typhimurium* and the confirmation method described above may be due to the presence of nonmotile *Salmonella*. In that case, we recommend following the RAPID' *Salmonella* double enrichment protocol (refer to the user guide for instructions). This protocol includes a selective enrichment step in RVS medium.

Primary enrichment bags can be stored for up to 24 hr at 2–8°C before proceeding to the confirmation.

All other samples

Using tests described in the standard methods (ISO, USDA MLG, or FDA BAM) for the confirmation test, start from the buffered peptone water enrichment broth after the full 18 ± 2 hr enrichment at 37°C.

Using any other method based on a principle different from that used in the iQ-Check *S. Typhimurium* PCR test, for example, chromogenic medium RAPID' *Salmonella* with double enrichment; complete the method with serological determination. The protocol of this second method must be followed entirely; the confirmation is carried out from the BPW enrichment broth if this step is common to both methods.

Section 9

Confirmation of Single Colonies Using iQ-Check Kit

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

Section 10 Test Performance and Validation

1. Pick an isolated colony from selective or nonselective agar plate with a toothpick, sterile loop, or other adapted consumable (for example, a pipet tip).
2. Resuspend the colony in 100 µl 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 Section 7 D. Real-Time PCR) and follow the rest of the iQ-Check S. Typhimurium protocol for the data and result interpretation. DNA extraction is not necessary.

Section 10 Test Performance and Validation



The iQ-Check S. Typhimurium Kit (Easy Protocol) has been validated by the AOAC Research Institute under the Performance Tested Method Program for detection of *S. Typhimurium* from raw chicken breast with skin, raw chicken breast without skin, raw chicken breast without skin containing 2% w/w salt, raw chicken thigh with skin, raw chicken thigh without skin, environmental boot swabs, and drag swabs. A positive result with iQ-Check should be considered presumptive and it is recommended that it be confirmed by standard reference methods (see Section 8). Certificate number: 081904

Section 11 References

ISO 6579-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* spp. — Part 1: Detection of *Salmonella* spp.

ISO/TR 6579-3:2014. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 3: Guidelines for serotyping of *Salmonella* spp.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2019). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 4.10: Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Catfish Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2018). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 5: *Salmonella*.

Section 12 Revision History

Release date	Document number	Change
March 2017	10000065187 Ver A	New document
July 2020	10000065187 Ver B	AOAC validation

Appendix — PCR Mix Calculation Guide

To find the correct volumes to use when 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 in the table.

Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, μ l	Amplification Mix Reagent C, μ l	Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, μ l	Amplification Mix Reagent C, μ l	Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, μ l	Amplification Mix Reagent 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

Visit [bio-rad.com/iqcheck](https://www.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](https://www.bio-rad.com) **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 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

10000065187 Ver B US/EG

Sig 0220



iQ-Check *S. Typhimurium* Kit

Guide d'utilisation

Test pour la détection par PCR en temps réel de *Salmonella* Typhimurium dans les échantillons alimentaires et environnementaux

N° de référence 12004306

BIO-RAD

Sommaire

Section 1	Introduction.....	1
Section 2	Technologie iQ-Check S. Typhimurium.....	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	Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux.....	4
Section 7	Protocole.....	6
	A. Enrichissement de l'échantillon.....	6
	B. Traitement de l'ADN libre.....	7
	C. Extraction de l'ADN.....	7
	D. PCR en temps réel.....	8
	E. Analyse des données.....	9
Section 8	Confirmation des résultats positifs.....	10
Section 9	Confirmation de colonies isolées à l'aide du kit iQ-Check.....	11
Section 10	Performance du test et validation.....	11
Section 11	Références.....	12
Section 12	Historique des révisions.....	12
	Annexe — Guide de calcul du mélange de PCR.....	13

Section 1 Introduction

Bien que l'incidence diminue dans certaines zones, des millions de cas de salmonellose humaine sont toujours rapportés chaque année dans le monde. Le sérotype Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium ou ST), de la sous-espèce *Salmonella enterica*, représente l'un des agents les plus fréquents. Les sources alimentaires principalement liées aux infections par ST sont le porc et les volailles. Dans certaines régions, des réglementations ont été mises en place pour assurer la surveillance des espèces *Salmonella* (spp.) et de sérotypes spécifiques, notamment *S. Typhimurium*, dans la filière avicole, de l'étape de production primaire à la mise à disposition des produits alimentaires. Le kit iQ-Check *S. Typhimurium* permet une détection rapide et spécifique de *S. Typhimurium* dans les échantillons alimentaires et environnementaux (y compris l'environnement de production primaire), en quelques heures après l'enrichissement microbiologique. Il est possible de traiter jusqu'à 94 échantillons, avec une procédure d'utilisation aisée.

Section 2 Technologie iQ-Check *S. Typhimurium*

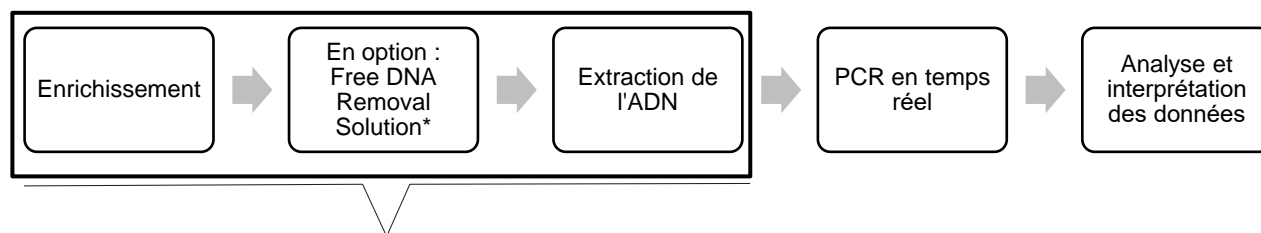
Le kit iQ-Check *S. Typhimurium* est un test basé sur l'amplification et la détection des gènes par PCR en temps réel. Les réactifs PCR prêts à l'emploi de ce kit contiennent des oligonucléotides (amorces et sondes) propres à *S. Typhimurium*, ainsi que de l'ADN polymérase et des nucléotides. La détection 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 System.

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

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

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

Ce test permet la détection qualitative de *S. Typhimurium* dans les échantillons alimentaires et environnementaux sélectifs (y compris l'environnement de production primaire), préalablement enrichis par culture. Il comprend cinq étapes principales :



Ce kit complète le kit PCR iQ-Check *S. Enteritidis* et/ou iQ-Check *Salmonella* II. Les étapes d'enrichissement et d'extraction de l'ADN sont communes. Se référer aux guides d'utilisation correspondants.

* Se référer au guide d'utilisation d'iQ-Check Free DNA Removal Solution (n° de référence 10000058391) pour les conditions d'utilisation.

Section 3

Composants du kit

Le kit iQ-Check *S. Typhimurium* contient la quantité de réactifs suffisante pour 96 tests (94 échantillons).

ID réactif	Réactif	Quantité fournie, ml
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
- Matériel spécifique pour extraction en tubes coniques à bouchon fileté 1,5 ml stériles :
 - Centrifugeuse de paillasse 10 000–12 000 x g
 - Bloc de chauffage à sec à 37 ± 2 °C et 95–100 °C
 - Cell Disruptor, tel que Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)

Section 5 Matériel requis non fourni

- Matériel spécifique pour extraction en plaque Deep Well :
 - Agitateur incubateur* capable de maintenir une température de 37 ± 2 °C et 95–100 °C, avec une vitesse de mélange d'au moins 1 300 rpm
- Agitateur-mélangeur vortex
- Micropipettes de 20, 200 et 1 000 µl
- 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 les systèmes 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 : Eau peptonée tamponnée (EPT) (par exemple BPW Plus, n° de référence 3564684, base déshydratée, 500 g ; 3554179, 225 ml x 6 flacons ; 3555790, 5 L x 2 poches ; 3555795, 3 L x 4 poches ; ou BPW Standard, n° de référence 12013259, base déshydratée, 500 g ; 12013258, base déshydratée, 5 kg ; 12013260, 5 L x 2 poches)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (n° de référence 3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (n° de référence 12012383)
- RAPID' *Salmonella* Capsule (n° de référence 3564710, 100 capsules, quantité pour 250 ml ; 3564709, 100 capsules, quantité pour 2,5 L ; 3564712, 100 tests)
- RAPID' *Salmonella* Agar (n° de référence 3563961, 90 mm x 20 boîtes ; 3563962, 90 mm x 100 boîtes ; 3564705, base déshydratée, 500 g)
- Produits spécifiques pour les échantillons environnementaux :
 - Éponges d'échantillonnage environnemental
 - Écouvillons d'échantillonnage environnemental
 - Bouillon neutralisant pour éponges et écouvillons, par exemple, Dey-Engley (D/E) HiCap ou Lethen
- Produits spécifiques pour extraction en tubes :
 - Tubes coniques à bouchon fileté 1,5 ml, stériles (par exemple, n° de référence 2240110XTU)
- Produits spécifiques pour extraction en plaque Deep Well :
 - Plaque Deep Well, 96 puits (iQ-Check Deep Well Microplates, n° de référence 3594900)
 - Film à sceller en plastique (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, n° de référence 3590139)

- Film à sceller préperforé (X-Pierce Film, n° de référence 3593977, ou film à sceller préperforé pour plaque, n° de référence 3600040, Amérique du Nord uniquement)
- Produits spécifiques pour iQ-Check Prep System :
 - Récipient de dilution 60 ml (n° de référence 3594904)
 - Embouts à filtre (n° de référence 3594902, 50 µl x 5 760 ; 3594903, 1 000 µl x 3 840)
 - Tubes de mélange de PCR (n° de référence 3594901, 5 ml x 50)
- Plaques, tubes, ruban à sceller et bouchons pour PCR
- Embouts filtrants stériles adaptables pour micropipettes de 20, 200 et 1 000 µl
- Embouts pour pipettes Combitip ou pipettes à répétition équivalentes ; stériles, emballés individuellement
- Tubes à essai stériles de 5 ml
- Gants non poudrés
- Eau distillée stérile
- Eau de Javel, 5 %
- Agent nettoyant tel que DNA AWAY ou RNase AWAY

Section 6

Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux

- Ce test doit être réalisé par du personnel formé.
- Les échantillons et cultures d'enrichissement doivent être manipulés en tant que substances potentiellement infectieuses et éliminés conformément aux règles et réglementations locales.
- Tous les matériels potentiellement infectieux doivent être soumis à l'autoclave avant élimination.
- La qualité des résultats dépend du respect strict 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 les réactifs après leur date d'expiration.
 - Vortexer les réactifs du kit avant de les utiliser afin d'assurer leur homogénéité.

Section 6

- 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. En effet, l'acquisition des données peut en être affectée.
- Il est fortement recommandé de respecter les exigences générales décrites dans la norme EN ISO 22174:2005 (Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences générales et définitions).
 - iQ-Check S. Typhimurium Kit
 - Tous les mélanges ou substances 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 entraîner 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 entraîner un risque de blessures corporelles causées par une chaleur excessive. Pour une utilisation en toute sécurité, iQ-Check Prep System doit être uniquement manipulé par du personnel de laboratoire qualifié et ayant reçu une formation adéquate. La maintenance de l'instrument doit être réalisée uniquement par des techniciens de maintenance de Bio-Rad.
 - Système de détection par PCR en temps réel CFX96 Touch Deep Well
 - Une utilisation incorrecte du CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System peut causer des blessures corporelles ou endommager l'instrument. En cas de manipulation incorrecte, certains composants peuvent entraîner un risque de blessures corporelles causées par une chaleur excessive. Pour une utilisation en toute sécurité, CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System doit être uniquement manipulé par du personnel de laboratoire qualifié et ayant reçu une formation adéquate. 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 S. Typhimurium. 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 de l'industrie.

- *Salmonella* est un organisme de niveau de biosécurité 2. Les échantillons biologiques tels que les enrichissements peuvent transmettre des maladies infectieuses. Respecter 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, à l'aide des équipements de sécurité appropriés (par exemple, dispositifs de confinement physique). Le personnel doit être formé 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, l'ensemble du matériel et les milieux de culture pouvant contenir des agents pathogènes doivent être décontaminés conformément aux normes actuelles de l'industrie 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.

Section 7 Protocole

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

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

Domaine (matrices)	Enrichissement	Extraction de l'ADN		Certification
		Méthode	Format	
Volaille crue avec et sans peau	BPW 21 ± 3 hr à 37 ± 1 °C	Easy I	Tube/Deep Well	AOAC PTM
Échantillons environnementaux de production primaire	BPW suppl. préchauffée 19 ± 1 hr à 41,5 ± 1 °C BPW + 5 ± 1 hr à 37 ± 1 °C	Easy I	Tube/Deep Well	AOAC PTM
Autres produits alimentaires et surfaces environnementales	BPW 21 ± 1 hr à 37 ± 1 °C	Easy I/Standard I	Tube/Deep Well	N/A

A. Enrichissement de l'échantillon

Les milieux d'enrichissement doivent être portés à la température d'incubation appropriée (ambiante, 37 °C ou 41,5 °C) avant utilisation.

Échantillons de petite taille (jusqu'à 25 g)

1. Homogénéiser n g d'échantillon dans $9 \times n$ ml d'eau peptonée tamponnée, dans une poche à filtre incorporé.
2. Incuber pendant 21 ± 1 hr à 37 ± 1 °C.

Échantillons de grande taille (> 25–375 g)

1. Homogénéiser n g d'échantillon dans $3 \times n$ ml d'eau peptonée tamponnée préchauffée (par exemple, 375 g dans 1 125 ml), dans une poche à filtre incorporé.
2. Incuber pendant 21 ± 1 hr à 37 ± 1 °C.

Écouvillons et éponges d'échantillonnage environnemental

1. Homogénéiser les écouvillons dans 10 ml d'EPT et les éponges dans 60–90 ml d'EPT. Il est recommandé d'utiliser un bouillon neutralisant qui ne contient pas de complexe aryle-sulfonate. Les bouillons neutralisants qui contiennent un complexe aryle-sulfonate peuvent nécessiter des dilutions supplémentaires de l'extrait d'ADN.
2. Incuber pendant 21 ± 1 hr à 37 ± 1 °C.

Échantillons de production primaire

1. Homogénéiser 1 écouvillon dans 100 ml d'EPT avec le supplément RAPID'*Salmonella*, dans une poche à filtre incorporé.
2. Incuber pendant 18–20 hr à $41,5 \pm 1$ °C.
3. Transférer 100 µl d'échantillon enrichi dans 900 µl d'EPT, dans une plaque Deep Well.
4. Incuber pendant 4–6 hr à 37 ± 1 °C.

B. Traitement de l'ADN libre

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

C. Extraction de l'ADN

Recommandations générales :

1. 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.
2. De façon générale, éviter d'agiter la poche d'enrichissement et de prélever de gros fragments d'aliments. Pour les échantillons alimentaires présentant une couche grasse surnageante, prélever juste en dessous de cette couche.
3. Ouvrir les tubes et les puits avec précaution pour éviter les risques de contamination croisée.
4. Refroidir la plaque Deep Well avant de pipetter directement à travers le film préperforé.
5. Utiliser le barreau magnétique afin de maintenir le réactif de lyse en suspension. Pipetter en mélangeant à vitesse moyenne.
6. Dans un premier temps, agiter délicatement le réactif de lyse à la main pour remettre la résine en suspension. Garder le contenu en suspension pendant le pipettage en mélangeant à vitesse moyenne avec le barreau magnétique.

Protocole standard I

1. Prélever 1 ml d'échantillon enrichi décanté dans un tube.
2. Centrifuger le tube à 10 000–12 000 x g pendant 5 min. Éliminer le surnageant.
3. Ajouter 200 µl du réactif de lyse (réactif A) au culot obtenu et mélanger par aspiration/refoulement avec la pipette. Fermer le tube et vortexer à grande vitesse.
4. Incuber dans le bloc de chauffage à 95–100 °C pendant 10–15 min.
5. Vortexer le tube à grande vitesse et centrifuger à 10 000–12 000 x g pendant 5 min.

Si vous souhaitez vous arrêter temporairement dans le protocole, cette étape est la plus appropriée.

Le surnageant peut être stocké jusqu'à 1 an à -20 °C. Avant de le réutiliser, toujours laisser décongeler, homogénéiser, puis centrifuger à 10 000–12 000 x g pendant 5 min.

Protocole simplifié I

1. Aliquoter 100 µl du réactif de lyse (réactif A) dans des tubes ou dans les puits d'une plaque Deep Well.
2. Ajouter 100 µl d'échantillon enrichi.
3. Mélanger la solution par aspiration/refoulement avec la pipette jusqu'à homogénéisation.
4. Fermer les tubes ou sceller la plaque Deep Well avec un film préperforé.
5. Incuber les tubes dans le bloc de chauffage à 95–100 °C pendant 10–15 min. Incuber la plaque dans l'agitateur-incubateur à 1 300–1 600 rpm et 95–100 °C pendant 15–20 min.
6. Vortexer les tubes à grande vitesse et centrifuger à 10 000–12 000 x g pendant 2 min au moins.
7. La centrifugation est inutile pour la plaque Deep Well.

Si vous souhaitez vous arrêter temporairement dans le protocole, cette étape est la plus appropriée.

Le surnageant peut être stocké jusqu'à 1 an à -20 °C. Avant de le réutiliser, toujours laisser décongeler, homogénéiser, puis centrifuger à 10 000–12 000 x g pendant 5 min.

D. PCR en temps réel

Configuration de l'instrument et du logiciel

Pour la configuration de l'instrument et du logiciel, suivre les instructions fournies dans le guide d'utilisation du système PCR en temps réel pour les kits iQ-Check.

Préparation du mélange de PCR

1. Préparer le mélange de PCR contenant la solution d'amplification (réactif C) et les sondes fluorescentes (réactif B). Le volume de mélange de PCR nécessaire dépend 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 pipetage de l'annexe (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 après la préparation. Il est stable pendant 1 hr maximum à une température de 2–8 °C.

2. Pipetter 45 µl de ce mélange de PCR dans chaque puits en fonction de la plaque préparée.
3. Ajouter 5 µl d'extrait d'ADN, de réactif D (contrôle négatif) ou de réactif E (contrôle positif). Ne pas vortexer l'échantillon avant le pipetage. Sceller hermétiquement les puits de la plaque ou les bandes de tubes. Pipetter avec précaution afin d'éviter la formation de bulles au fond des puits. Étape facultative : centrifuger la plaque de PCR scellée ou les bandes de tubes (rotation rapide) afin d'éliminer les bulles éventuelles.
4. Placer la plaque de PCR 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.

Lancement de la PCR

Pour lancer la PCR, suivre les instructions fournies dans le guide d'utilisation du système PCR en temps réel pour les kits iQ-Check.

E. 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 Cq 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 faut répéter la réaction de PCR.

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

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

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

Échantillons

Un échantillon est considéré **positif** pour *S. Typhimurium* lorsqu'il présente une valeur Cq ≥ 10 pour le fluorophore FAM.

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

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

- Si aucune valeur Cq n'est obtenue pour FAM et si le contrôle interne présente une valeur Cq ≥ 28 , l'échantillon est considéré **négatif** pour *S. Typhimurium*.
- Un contrôle interne qui n'a pas non plus de valeur Cq (Cq = N/A) indique probablement un phénomène d'inhibition de la réaction de PCR. 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 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 de <i>S. Typhimurium</i> (canal FAM)	Détection de contrôle interne (canal HEX)	Interprétation
Cq ≥ 10	Non significatif	Positif
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Négatif
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition*

* Lorsque la détection pour *S. Typhimurium* et le contrôle interne donne une valeur Cq = N/A, l'échantillon doit être dilué à 1:10 et testé à nouveau.

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

Section 8

Confirmation des résultats positifs

Un résultat iQ-Check *S. Typhimurium* positif est supposé être positif et une confirmation selon une méthode de référence appropriée est recommandée.

Échantillons de production primaire

Pour les échantillons environnementaux de production primaire, débiter la confirmation à partir de l'enrichissement primaire, puis suivre les méthodes normalisées (ISO 6579-1, USDA MLG ou FDA BAM). Norme ISO 6579-1 : suivre la méthode du milieu MSRv puis du milieu RAPID'*Salmonella* pour l'isolement. Compléter la méthode avec une détermination sérologique.

Section 9 Confirmation de colonies isolées à l'aide du kit iQ-Check

Il se peut que les divergences de résultat entre iQ-Check S. Typhimurium et la méthode de confirmation décrite ci-dessus soient dues à la présence de *Salmonella* non mobiles. Dans ce cas, il est recommandé de suivre le protocole d'enrichissement double de la méthode RAPID' *Salmonella* (se référer au guide d'utilisation pour les instructions). Ce protocole inclut une étape d'enrichissement sélectif en milieu RVS.

Il est possible de stocker les poches d'enrichissement primaire jusqu'à 24 hr à 2–8 °C avant de poursuivre la confirmation.

Tous les autres échantillons

À l'aide des tests décrits dans les méthodes normalisées (ISO, USDA MLG ou FDA BAM), dans le cadre du test de confirmation : démarrer à partir du bouillon d'enrichissement EPT, après l'enrichissement complet de 18 ± 2 hr à 37 °C.

À l'aide d'une autre méthode basée sur un principe différent de celui utilisé dans le test PCR iQ-Check S. Typhimurium, par exemple le milieu chromogène RAPID' *Salmonella* avec double enrichissement : compléter la méthode avec une détermination sérologique. Le protocole de cette seconde méthode doit être suivi dans son intégralité ; la confirmation est effectuée à partir du bouillon d'enrichissement EPT si cette étape est commune aux deux méthodes.

Section 9 Confirmation de colonies isolées à l'aide du kit iQ-Check

Le kit iQ-Check S. Typhimurium peut également être utilisé pour confirmer des colonies isolées de *S. Typhimurium* sur milieux de culture gélosés.

1. Choisir une colonie isolée sur un milieu de culture gélosé sélectif ou non sélectif, avec un cure-dent, une anse stérile ou un autre consommable adapté (par exemple, un embout de pipette).
2. Remettre 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 D. PCR en temps réel, Section 7 Protocole) et suivre le reste du protocole iQ-Check S. Typhimurium pour l'interprétation des données et des résultats. L'extraction d'ADN n'est pas nécessaire.

Section 10 Performance du test et validation



Le kit iQ-Check S. Typhimurium (Protocole simplifié) est validé par AOAC Research Institute dans le cadre du programme « Performance Tested Methods » pour la détection de *S. Typhimurium* dans les éléments suivants : poitrine de poulet cru avec peau, poitrine de poulet cru sans peau, poitrine de poulet cru sans peau contenant 2 % de sel masse/masse, cuisse de poulet cru avec peau, cuisse de poulet cru sans peau, pédichiffonnettes et chiffonnettes d'échantillonnage environnemental. 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 normalisées (voir Section 8). Numéro de certificat : 081904

Section 11

Références

ISO 6579-1:2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des *Salmonella* — Partie 1 : Recherche des *Salmonella* spp.

ISO/TR 6579-3:2014. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des *Salmonella* – Partie 3 : Lignes directrices pour le sérotypage des *Salmonella* spp.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2019). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 4.10: Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Catfish Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2018). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 5: *Salmonella*.

Section 12

Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Mars 2017	10000065187 Ver A	Nouveau document
Juillet 2020	10000065187 Ver B	Validation AOAC

Annexe — Guide de calcul du mélange de PCR

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

Nombre total d'échantillons et de contrôles	Sondes réactif B, µl	Mélange d'amplification Réactif C, µl	Nombre total d'échantillons et de contrôles	Sondes réactif B, µl	Mélange d'amplification Réactif C, µl	Nombre total d'échantillons et de contrôles	Sondes réactif B, µl	Mélange d'amplification Réactif C, µl
1	5	40	33	178	1400	65	351	2800
2	11	86	34	184	1500	66	356	2900
3	16	130	35	189	1500	67	362	2900
4	22	173	36	194	1600	68	367	2900
5	27	216	37	200	1600	69	373	3000
6	32	259	38	205	1600	70	378	3000
7	38	302	39	211	1700	71	383	3100
8	43	346	40	216	1700	72	389	3100
9	49	389	41	221	1800	73	394	3200
10	54	432	42	227	1800	74	400	3200
11	59	475	43	232	1900	75	405	3200
12	65	518	44	238	1900	76	410	3300
13	70	562	45	243	1900	77	416	3300
14	76	605	46	248	2000	78	421	3400
15	81	648	47	254	2000	79	427	3400
16	86	691	48	259	2100	80	432	3500
17	92	734	49	265	2100	81	437	3500
18	97	778	50	270	2200	82	443	3500
19	103	821	51	275	2200	83	448	3600
20	108	864	52	281	2200	84	454	3600
21	113	907	53	286	2300	85	459	3700
22	119	950	54	292	2300	86	464	3700
23	124	994	55	297	2400	87	470	3800
24	130	1000	56	302	2400	88	475	3800
25	135	1100	57	308	2500	89	481	3800
26	140	1100	58	313	2500	90	486	3900
27	146	1200	59	319	2500	91	491	3900
28	151	1200	60	324	2600	92	497	4000
29	157	1300	61	329	2600	93	502	4000
30	162	1300	62	335	2700	94	508	4100
31	167	1300	63	340	2700	95	513	4100
32	173	1400	64	346	2800	96	518	4100

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

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

10000065187 Ver B US/EG

Sig 0220



iQ-Check *S. Typhimurium* Kit

Anwenderhandbuch

Test zum Nachweis von *Salmonella* Typhimurium in
Lebensmittel- und Umgebungsproben durch Real-Time PCR

Katalog-Nr. 12004306



Inhaltsverzeichnis

Abschnitt 1	Einleitung.....	1
Abschnitt 2	Die iQ-Check S. Typhimurium Technologie	1
Abschnitt 3	Zusammensetzung des Kits	2
Abschnitt 4	Haltbarkeit und Lagerung.....	2
Abschnitt 5	Zusätzlich benötigtes Material	2
	Geräte	2
	Zubehör	3
Abschnitt 6	Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse.....	4
Abschnitt 7	Protokoll	6
	A. Probenanreicherung.....	6
	B. Behandlung zur Entfernung freier DNA.....	7
	C. DNA-Extraktion	7
	D. Real-Time PCR	8
	E. Datenanalyse	9
Abschnitt 8	Bestätigung positiver Ergebnisse.....	10
Abschnitt 9	Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit.....	11
Abschnitt 10	Testleistung und Testvalidierung.....	11
Abschnitt 11	Literatur	12
Abschnitt 12	Revisionshistorie.....	12
	Anhang — Pipettiertabelle für das PCR Reaktionsgemisch.....	13

Abschnitt 1 Einleitung

Jährlich werden Millionen Fälle von Salmonelleninfektion beim Menschen gemeldet, wenngleich die Zahl der Erkrankungen in manchen Gebieten zurückgeht. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* Serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium bzw. ST) zählt zu den am häufigsten beteiligten Serovaren. Schweine- und Geflügelerzeugnisse zählen zu den Nahrungsmitteln, die am häufigsten mit diesen ST-Infektionen in Verbindung gebracht werden. In manchen Regionen gibt es Vorschriften zur Überwachung von *Salmonella*-Arten (spp.) und speziellen Serotypen, einschließlich *S. Typhimurium*, bei Geflügel, die den gesamten Erzeugungsprozess ab der Primärproduktion abdecken. Das iQ-Check *S. Typhimurium* Kit ermöglicht den schnellen und spezifischen Nachweis von *S. Typhimurium* in Lebensmittel- und Umgebungsproben (einschließlich aus dem Umfeld der Primärproduktion) innerhalb weniger Stunden nach dem Ende der mikrobiologischen Anreicherung. In einem einfach durchzuführenden Verfahren können bis zu 94 Proben bearbeitet werden.

Abschnitt 2 Die iQ-Check *S. Typhimurium* Technologie

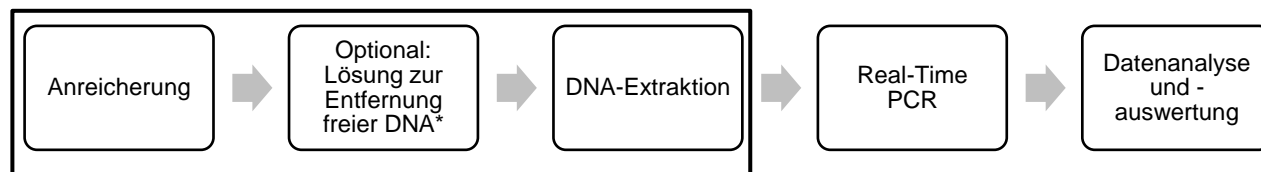
Das iQ-Check *S. Typhimurium* Kit ist ein Test, der auf der Amplifizierung und dem Nachweis von Genen mittels Real-Time PCR beruht. Die gebrauchsfertigen PCR-Reagenzien im Kit enthalten für *S. Typhimurium* spezifische Oligonukleotide (Primer und Sonden) sowie DNA-Polymerase und Nukleotide. Der Nachweis und die Datenanalyse sind für die Verwendung eines Real-Time PCR-Gerätes von Bio-Rad, z. B. des CFX96 Touch Deep Well Systems, 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 Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) zur Verlängerung der DNA, wodurch Kopien der Ziel-DNA erzeugt werden. Diese Kopien werden als Amplikons bezeichnet.

Bei der Real Time PCR beruht der DNA-Nachweis auf der Hybridisierung spezifischer Sonden an die Amplikons während der Amplifikation. Diese Sonden sind mit einem Fluorophor verknüpft, der nur dann Fluoreszenzsignale abgibt, wenn die Sonde mit der Zielsequenz hybridisiert ist. In diesem Fall ist die Sonde, die an die *S. Typhimurium*-spezifische DNA-Sequenz hybridisiert, mit dem Fluorophor FAM verknüpft. Wenn keine Ziel-DNA vorhanden ist, ist keine Fluoreszenz nachweisbar. Da sich die Zahl der Amplikons mit jeder Amplifizierungsrunde erhöht, verstärkt sich auch die Fluoreszenzintensität. Beim Annealing-Schritt jedes PCR-Zyklus misst das optische Modul diese Fluoreszenz, während die zugehörige Software die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zyklen aufträgt.

Das Reaktionsgemisch enthält eine synthetische interne DNA-Kontrolle aus synthetischer DNA, um jedes etwaige negative Ergebnis zu validieren. Diese Kontrolle wird gleichzeitig wie die *S. Typhimurium*-DNA-Zielsequenz mit einer spezifischen Sonde amplifiziert und durch einen dritten Fluorophor nachgewiesen.

Dieser Test gestattet den qualitativen Nachweis von *S. Typhimurium* in ausgewählten Lebensmittelerzeugnissen und Umgebungsproben (einschließlich aus dem Umfeld der Primärproduktion), die zuvor durch Kultur angereichert wurden. Er umfasst die folgenden fünf Hauptschritte:



Dieses Kit ergänzt das iQ-Check *S. Enteritidis* und/oder das iQ-Check *Salmonella* II PCR Kit. Die Schritte der Anreicherung und DNA-Extraktion sind jeweils dieselben. Es sind die jeweiligen Anwenderhandbücher zu beachten.

* Hinsichtlich der Verwendungsbedingungen ist das Anwenderhandbuch für die iQ-Check Free DNA Removal Solution (Katalog-Nr. 10000058391) zu beachten.

Abschnitt 3 Zusammensetzung des Kits

Das iQ-Check *S. Typhimurium* Kit enthält ausreichende Reagenzien für 96 Tests (94 Proben).

Reagenz-ID	Reagenz	Menge
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 den Röhrchen angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

Abschnitt 5 Zusätzlich benötigtes Material

Geräte

- Labor-Paddel-Blender zum Homogenisieren von Testproben
- Inkubator zur mikrobiologischen Anreicherung der Proben
- Speziell für die Extraktion in sterilen konischen 1,5 ml Röhrchen mit Schraubdeckel:
 - Tischzentrifuge 10.000 – 12.000 x g
 - Heitzrockenblock mit 37 ± 2°C und 95 – 100°C
 - Zellaufschlussgerät, z. B. Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)

Abschnitt 5 Zusätzlich benötigtes Material

- Speziell für die Extraktion in einer Deep Well Platte:
 - Thermoshaker mit Heizfunktion*, der eine Temperatur von $37 \pm 2^\circ\text{C}$ und $95 - 100^\circ\text{C}$ aufrecht erhalten kann, mit einer Mischgeschwindigkeit von mindestens 1.300 rpm
- Vortex
- Mikropipetten für 20 μl , 200 μl , 1.000 μl
- Real-Time PCR System von Bio-Rad*; z. B. das CFX96 Touch Deep Well System (Katalog-Nr. 3600037)
- iQ-Check Prep System von Bio-Rad für die automatisierte DNA-Extraktion und PCR-Plattenvorbereitung (Katalog-Nr. 3594911)

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

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

Zubehör

- Anreicherungsmedium: Gepuffertes Peptonwasser (Buffered Peptone Water, z. B. BPW Plus, Katalog-Nr. 3564684, dehydriert, 500 g; 3554179, 6 Flaschen x 225 ml; 3555790, 2 Beutel x 5 L; 3555795, 4 Beutel x 3 L; oder BPW Standard, Katalog-Nr. 12013259, dehydriert, 500 g; 12013258, dehydriert, 5 kg; 12013260, 2 Beutel x 5 L)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (Lösung zur Entfernung von freier DNA, Katalog-Nr. 3594970)
- iQ-Check Reinigungsreagenz (Katalog-Nr. 12012383)
- RAPID'*Salmonella*-Kapsel (Katalog-Nr. 3564710, 100 Kapseln, für 250 ml; Katalog-Nr. 3564709, 100 Kapseln, für 2,5 L; 3564712, 100 Tests)
- RAPID'*Salmonella* Agar (Katalog-Nr. 3563961, 20 Platten x 90 mm; 3563962, 100 Platten x 90 mm; 3564705, dehydriert, 500 g)
- Speziell für die Untersuchung von Umweltproben:
 - Schwämme zur Gewinnung von Umweltproben
 - Tupfer zur Gewinnung von Umweltproben
 - Neutralisierungsmedium für Probennahme-Schwämme und -Tupfer, z. B. Dey-Engley (D/E) oder HiCap Neutralizing Broth oder Letheen Broth
- Speziell für die Extraktion in Röhrchen:
 - Konische, sterile 1,5 ml Röhrchen mit Schraubdeckel (z. B. Katalog-Nr. 2240110XTU)
- Speziell für die Extraktion in einer Deep Well Platte:
 - Deep Well Platte mit 96 Wells (iQ-Check Deep Well Microplates, Katalog-Nr. 3594900)
 - Abdichtungsfolie aus Kunststoff (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, Katalog-Nr. 3590139)

- Vorgestanzte Abdichtungsfolie (X-Pierce Films, Katalog-Nr. 3593977 oder Pre-Pierced Plate Sealing Film, Katalog-Nr. 3600040, nur in Nordamerika)
- Speziell für das iQ-Check Prep-System:
 - 60 ml Verdünnungsbehälter (Katalog-Nr. 3594904)
 - Filterspitzen (Katalog-Nr. 3594902, 5.760 x 50 µl; 3594903, 3.840 x 1.000 µl)
 - PCR-Mix-Röhrchen (Katalog-Nr. 3594901, 50 x 5 ml)
- PCR-Platten, -Röhrchen, -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 5 ml Teströhrchen
- Ungepuderte 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.
- Die Ergebnisqualität hängt von der strikten Einhaltung der guten Laborpraxis ab (zum Beispiel der Norm EN ISO 7218). In Bezug auf die PCR ist vor allem Folgendes zu beachten:
 - Laborgeräte (Pipetten, Röhrchen usw.) nie von einem Arbeitsplatz zu einem anderen bringen.
 - Bei jeder Serie von Amplifikationsreaktionen eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle verwenden.
 - Die Reagenzien nach Ablauf ihres Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
 - Die Reagenzien aus dem Kit vor dem Gebrauch auf dem Vortex mischen, um ihre Homogenität sicherzustellen.
 - Regelmäßig die Genauigkeit und Präzision der Pipetten sowie die ordnungsgemäße Funktion der Geräte überprüfen.

Abschnitt 6

- Handschuhe häufig wechseln, vor allem dann, wenn vermutet wird, dass sie kontaminiert sein könnten.
- Die Arbeitsplätze regelmäßig mit 5%iger Bleichlösung und anderen Dekontaminationsmitteln, z. B. DNA AWAY, reinigen.
- Ungepuderte Handschuhe verwenden, und Fingerabdrücke und Beschriftungen auf Röhrendeckeln vermeiden, da dies die Datenerfassung beeinträchtigen würde.
- 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.
- iQ-Check S. Typhimurium Kit
 - Alle Substanzen oder Mischungen in dem Testkit sind klassifizierte Produkte gemäß dem globalen vereinheitlichten System (Global Harmonized System, GHS). Der Kontakt mit Säuren kann zur Freisetzung giftiger Gase führen. Bei korrekter Anwendung sind keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen erforderlich. Bei Einatmen des Produkts Frischluft zuführen und bei Beschwerden einen Arzt hinzuziehen. Nach Augenkontakt mit dem Produkt das geöffnete Auge mehrere Minuten unter fließendem Wasser ausspülen. Wenn die Produkte verschluckt werden, Erbrechen herbeiführen und ärztliche Hilfe anfordern.
- iQ-Check Prep System
 - Die unsachgemäße Verwendung des iQ-Check Prep Systems kann zu Personenverletzungen oder Schäden am Gerät führen. Einige Komponenten können bei unsachgemäßer Handhabung aufgrund übermäßiger Hitze zu Personenverletzungen führen. Zur sicheren Verwendung darf das iQ-Check Prep System nur von qualifiziertem Laborpersonal verwendet werden, das entsprechend 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 Real-Time PCR Nachweissystems kann zu Personenverletzungen oder Schäden am Gerät führen. Einige Komponenten können bei unsachgemäßer Handhabung aufgrund übermäßiger Hitze zu Personenverletzungen führen. Für eine sichere Nutzung darf das CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Nachweissystem nur von qualifiziertem Laborpersonal bedient werden, das entsprechend geschult wurde. Das Instrument darf nur von Kundendiensttechnikern von Bio-Rad im Außendienst gewartet werden.
- Anreicherung
 - Der Benutzer sollte alle Sicherheitshinweise in den Anweisungen für das iQ-Check S. Typhimurium Kit lesen, verstanden haben und befolgen. Die Sicherheitshinweise zum späteren Nachschlagen aufbewahren. Um die mit der Exposition gegenüber Chemikalien und biologischen Gefahren verbundenen Risiken zu verringern, sind Pathogentests in einem ordnungsgemäß ausgestatteten Labor unter der Kontrolle von geschultem Personal durchzuführen. Beim Umgang mit Reagenzien und kontaminierten Proben sind stets die üblichen Laborsicherheitspraktiken einzuhalten, beispielsweise sind geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille zu tragen. Den Kontakt mit dem Inhalt des Anreicherungsmediums und der Reagenzröhrchen nach der Anreicherung vermeiden. Angereicherte Proben im Einklang mit den aktuellen Branchenstandards entsorgen.
 - *Salmonella* ist ein Organismus der Biosicherheitsstufe 2. Biologische Proben, z. B. Anreicherungen, können Infektionskrankheiten übertragen. Es sind alle geltenden lokalen,

staatlichen/regionalen und/oder nationalen Vorschriften zur Entsorgung von biologischen Abfällen einzuhalten. Geeignete Schutzausrüstung tragen, einschließlich unter anderem Schutzbrille, Gesichtsschutz, Kleidung/Laborkittel und Handschuhe. Alle Arbeiten sollten in ordnungsgemäß ausgestatteten Einrichtungen unter Verwendung der entsprechenden Sicherheitsausrüstung (z. B. physikalische Eindämmungsvorrichtungen) durchgeführt werden. Personen sollten im Einklang mit den geltenden behördlichen Vorschriften und den Anforderungen des Unternehmens/der Einrichtung geschult werden, bevor sie mit potenziell infektiösen Materialien arbeiten.

- Nach Abschluss der Tests sind alle Materialien und Medien, die möglicherweise Krankheitserreger enthalten, im Einklang mit den geltenden Branchenstandards für die Entsorgung kontaminierter Abfälle zu dekontaminieren (d. h. 20 min bei 120°C autoklavieren). Weitere Informationen und lokale Bestimmungen zur Entsorgung sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen.

Abschnitt 7 Protokoll

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

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

Umfang (Matrizes)	Anreicherung	DNA-Extraktion		Zertifizierungsstelle
		Methode	Format	
Rohes Geflügel mit und ohne Haut	BPW 21 ± 3 hr bei 37 ± 1°C	Easy I	Röhrchen/Deep Well	AOAC PTM
Proben aus dem Umfeld der Primärproduktion	Vorgewärmtes Suppl. BPW 19 ± 1 hr bei 41,5 ± 1°C + BPW 5 ± 1 hr bei 37 ± 1°C	Easy I	Röhrchen/Deep Well	AOAC PTM
Bestimmte Lebensmittelzeugnisse und Umweltoberflächen	BPW 21 ± 1 hr bei 37 ± 1°C	Easy I/Standard I	Röhrchen/Deep Well	N/A

A. Probenanreicherung

Das Anreicherungsmedium muss vor der Verwendung die geeignete Inkubationstemperatur (Umgebungstemperatur, 37°C oder 41,5°C) aufweisen.

Kleinere Probenmengen (bis zu 25 g)

1. n g der Probe in 9 x n ml BPW in einem Stomacherbeutel mit integriertem Filter homogenisieren.
2. Bei 37 ± 1°C 21 ± 1 hr inkubieren.

Größere Probenmengen (> 25–375 g)

1. n g der Probe in 3 x n ml vorgewärmtem BPW (z. B. 375 g in 1.125 ml) in einem Stomacherbeutel mit integriertem Filter homogenisieren.
2. Bei 37 ± 1°C 21 ± 1 hr inkubieren.

Tupfer und Schwämme mit Umgebungsproben

1. Tupfer in 10 ml und Schwämme in 60–90 ml BPW homogenisieren. Es wird empfohlen, eine neutralisierende Nährlösung zu verwenden, die keinen Arylsulfonatkomplex enthält. Neutralisierende Nährlösungen mit Arylsulfonatkomplex können zusätzliche Verdünnungen des DNA-Extrakts erfordern.
2. Bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 21 ± 1 hr inkubieren.

Proben aus der Primärproduktion

1. 1 Tupfer in 100 ml BPW mit RAPID'*Salmonella* Supplement in einem Stomacherbeutel mit integriertem Filter homogenisieren.
2. Bei $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ 18 bis 20 hr inkubieren.
3. 100 µl angereicherte Probe in 900 µl BPW in einer Deep Well Platte überführen.
4. Bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 4 bis 6 hr inkubieren.

B. 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.

C. DNA-Extraktion

Allgemeine Empfehlungen:

1. Den Heizblock oder den Thermoshaker zum Vorheizen einschalten, bevor mit dem Test begonnen wird. Auf $95\text{--}100^\circ\text{C}$ einstellen. Das Lysereagenz während des Pipettierens durch Rühren bei mittlerer Geschwindigkeit auf einer Magnetrührplatte in Suspension halten.
2. Generell sollte vermieden werden, den Anreicherungsbeutel zu schütteln und große Lebensmittelfragmente in der Probe zu entnehmen. Bei Lebensmittelproben mit fettigem Überstand sollte die Probe knapp unterhalb dieser Schicht entnommen werden.
3. Beim Öffnen von Röhrchen und Wells vorsichtig vorgehen, um eine mögliche Kreuzkontamination zu vermeiden.
4. Die Deep Well Platte kühlen, bevor direkt durch die vorgestanzte Abdichtungsfolie pipettiert wird.
5. Den Magnetrührer verwenden, um das Lysereagenz in Suspension zu halten. Den Pipettiervorgang durchführen, während es bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt wird.
6. Das Lysereagenz zuerst vorsichtig per Hand schütteln, um das Harz zu resuspendieren. Den Inhalt der Flasche pipettieren, während er bei mittlerer Geschwindigkeit mit dem Magnetrührstab gerührt wird, damit er in Suspension bleibt.

Protokoll Standard I

1. 1 ml dekantierte angereicherte Probe in ein Röhrchen überführen.
2. Das Röhrchen bei $10.000 - 12.000 \times g$ 5 min zentrifugieren. Den Überstand verwerfen.

3. 200 µl Lysereagenz (Reagenz A) zu dem Pellet geben und das Pellet durch Auf- und Abpipettieren des Reagenzes resuspendieren. Das Röhrchen verschließen und den Inhalt bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortex mischen.
4. Für 10 bis 15 min in den jeweiligen auf 95–100°C vorgeheizten Heizblock stellen.
5. Das Röhrchen bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortex mischen und dann 5 min bei 10.000 – 12.000 x g zentrifugieren.

Dies ist der empfohlene Zeitpunkt, um die Probenaufbereitungen vorübergehend zu unterbrechen.

Der Überstand kann bis zu 1 Jahr bei -20°C gelagert werden. Vor der erneuten Verwendung stets auftauen und homogenisieren und anschließend 5 min bei 10.000 – 12.000 x g zentrifugieren.

Protokoll Easy I

1. 100 µl Lysereagenz (Reagenz A) in Röhrchen oder die Wells einer Deep Well-Platte aliquotieren.
2. 100 µl der angereicherten Probe dazugeben.
3. Die Lösung durch Auf- und Abpipettieren mischen, bis sie homogen ist.
4. Die Röhrchen verschließen bzw. die Deep Well Platte mit vorgestanzter Abdichtungsfolie verschließen.
5. Die Röhrchen 10 bis 15 min in den auf 95°C – 100°C vorgeheizten Heizblock stellen bzw. die Deep Well Platte 15 bis 20 min unter Agitation bei 1.300 – 1.600 rpm bei 95°C – 100°C in den Inkubator stellen.
6. Die Röhrchen bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortex mischen und dann 2 min bei 10.000 – 12.000 x g zentrifugieren.
7. Die Deep Well-Platte braucht nicht zentrifugiert zu werden.

Dies ist der empfohlene Zeitpunkt, um die Probenaufbereitungen vorübergehend zu unterbrechen.

Der Überstand kann bis zu 1 Jahr bei -20°C gelagert werden. Vor der erneuten Verwendung stets auftauen und homogenisieren und anschließend 5 min bei 10.000 – 12.000 x g zentrifugieren.

D. Real-Time PCR

Konfiguration des Geräts und der Software

Zur Konfiguration von Gerät und Software sind die Anleitungen im Anwenderhandbuch des Real-Time PCR-Systems für iQ-Check Kits zu beachten.

Vorbereitung des PCR-Reaktionsgemisches

1. Das PCR-Reaktionsgemisch mit der Amplifikationslösung (Reagenz C) und den fluoreszierenden Sonden (Reagenz B) vorbereiten. Das benötigte Volumen des PCR-Reaktionsgemisches hängt von der Anzahl der zu analysierenden Proben und Kontrollen ab. In jedem PCR-Lauf muss mindestens eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden. Die entsprechenden Volumen für jedes Reagenz sind in der Pipettiertabelle im Anhang zur Berechnung des PCR-Reaktionsgemisches angegeben.

Hinweis: Das PCR-Reaktionsgemisch (Reagenz B + C) sofort nach der Zubereitung verwenden. Es ist bei 2–8°C maximal 1 hr stabil.

Abschnitt 7 Protokoll

2. Aus diesem PCR-Reaktionsgemisch dem jeweils verwendeten Platten-Layout entsprechend 45 µl in jedes Well pipettieren.
3. 5 µl DNA-Extrakt, Reagenz D (Negativkontrolle) oder Reagenz E (Positivkontrolle) zugeben. Die Probe vor dem Pipettieren nicht vortexen. Die Wells der Platte bzw. die Teststreifen hermetisch abdichten. Es ist wichtig, Luftblasen am Boden der Wells zu vermeiden, indem behutsam pipettiert wird. Optional kann die verschlossene PCR-Platte bzw. können die verschlossenen PCR-Röhrchenstreifen zur Beseitigung etwaiger Luftblasen kurz zentrifugiert werden.
4. Die PCR-Platte bzw. die PCR-Röhrchenstreifen in den Thermocycler stellen. Die Platte so positionieren, dass sich das Well A1 oben links befindet. Das Reaktionsmodul schließen.

Die PCR durchführen

Zum Starten des PCR-Laufs ist die Anleitung im Anwenderhandbuch des Real-Time PCR Systems für die iQ-Check Kits zu beachten.

E. 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 sind die Anweisungen im Benutzerhandbuch der Software CFX Manager IDE befolgen.

Ergebnisinterpretation

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

Die CFX Manager IDE Software ermöglicht eine vollständige automatisierte Analyse bei Verwendung von Real-Time PCR-Nachweissystemen von Bio-Rad.

Kontrollen

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

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

	Nachweis von <i>S. Typhimurium</i> (FAM)	Nachweis der internen Kontrolle (HEX-Kanal)
Negativkontrolle	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Positivkontrolle	26 ≤ Cq ≤ 36	Nicht signifikant

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

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

Proben

Bei einer **positiven** *S. Typhimurium*-Probe muss der Cq-Wert für den FAM-Fluorophor bei ≥ 10 liegen.

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

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

- Wenn kein Cq-Wert für FAM vorliegt und der Cq-Wert für die interne Kontrolle ≥ 28 beträgt, gilt die Probe als **negativ** auf *S. Typhimurium*.
- Falls auch für die interne Kontrolle kein Cq-Wert vorliegt (Cq = N/A), bedeutet dies, dass die PCR-Reaktion vermutlich gehemmt war. In diesem Fall muss die Probe verdünnt (mit 10 μ l DNA-Extrakt eine 1:10 Verdünnung in destilliertem sterilem Wasser durchführen, dann 5 μ l der verdünnten Lösung für die Amplifikation verwenden) und die PCR wiederholt werden.
- Falls der Cq-Wert für die interne Kontrolle < 28 liegt, ist keine Interpretation des Ergebnisses möglich. Überprüfen Sie, ob der Schwellenwert korrekt platziert wurde oder ob es sich bei der Kurve in den Rohdaten um eine normale Amplifikationskurve handelt. Wenn die Kurve keine charakteristische Form aufweist, muss der PCR-Test wiederholt werden.

Die Interpretation der Probenergebnisse ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Nachweis von <i>S. Typhimurium</i> (FAM-Kanal)	Nachweis der internen Kontrolle (HEX-Kanal)	Auswertung
Cq ≥ 10	Nicht signifikant	Positiv
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negativ
Cq = N/A	Cq = N/A	Hemmung*

* Wenn sowohl beim Nachweis von *S. Typhimurium* als auch beim Nachweis der internen Kontrolle ein Cq-Wert = N/A erhalten wird, muss die Probe erneut getestet werden, jedoch im verdünnten Zustand (1:10).

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

Abschnitt 8

Bestätigung positiver Ergebnisse

Ein positives iQ-Check *S. Typhimurium*-Ergebnis gilt als vermutlich positiv, und es wird die Bestätigung mit einer geeigneten Referenzmethode empfohlen.

Proben aus der Primärproduktion

Bei Proben aus dem Umfeld der Primärproduktion ist die Bestätigung ab dem Schritt der primären Anreicherung durchzuführen. Anschließend nach standardisierten Methoden (ISO 6579-1, USDA MLG oder FDA BAM) vorgehen. Für ISO 6579-1 die MSRV-Methode und anschließend das RAPID'*Salmonella*-Medium für die Isolierung verwenden. Zum Abschluss der Methode einen serologischen Test durchführen.

Abschnitt 9 Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit

Eine Ergebnisdiskrepanz zwischen dem iQ-Check *S. Typhimurium* und der vorstehend beschriebenen Bestätigungsmethode sind möglicherweise auf das Vorhandensein nicht-motiler *Salmonella* zurückzuführen. In diesem Fall empfehlen wir, nach dem RAPID' *Salmonella*-Protokoll vorzugehen und eine doppelte Anreicherung durchzuführen (Anweisungen sind dem Anwenderhandbuch zu entnehmen). Dieses Protokoll beinhaltet einen selektiven Anreicherungsschritt in RVS-Medium.

Die Beutel mit der primären Anreicherung können bei 2–8°C bis zu 24 hr lang aufbewahrt werden, bevor mit der Bestätigung fortgefahren wird.

Alle anderen Proben

Bei Verwendung der in den Standardmethoden (ISO, USDA MLG oder FDA BAM) zur Ergebnisbestätigung beschriebenen Tests mit der BPW-Anreicherungsbouillon nach einer Anreicherung über 18 ± 2 hr bei 37°C beginnen.

Bei Verwendung einer auf einem anderen Prinzip als dem des iQ-Check *S. Typhimurium* PCR-Tests basierenden Methode, z. B. des chromogenen Mediums RAPID' *Salmonella* mit doppelter Anreicherung, zum Abschluss eine serologische Bestimmung durchführen. Das Protokoll dieser zweiten Methode muss genau befolgt werden. Die Bestätigung ist ab dem Schritt der BPW-Anreicherungsbouillon durchzuführen, wenn dieser Schritt beiden Methoden gemeinsam ist.

Abschnitt 9 Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit

Das iQ-Check *S. Typhimurium* Kit kann auch zum Bestätigen isolierter Kolonien von *S. Typhimurium* 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 Platte mit selektivem oder nichtselektivem Agar aufnehmen.
2. Die Kolonie in 100 µl Tryptonsalz-Medium oder destilliertem, sterilem Wasser in einem Mikrozentrifugentröhrchen resuspendieren. Auf dem Vortex homogenisieren.
3. 5 µl der Suspension zu 45 µl PCR-Reaktionsgemisch geben (siehe Abschnitt 7 D. Real-Time PCR) und zur Daten- und Ergebnisinterpretation die übrigen Schritte des iQ-Check *S. Typhimurium*-Protokolls befolgen. Eine DNA-Extraktion ist nicht erforderlich.

Abschnitt 10 Testleistung und Testvalidierung



Das iQ-Check *S. Typhimurium* Kit (Easy Protocol) wurde vom AOAC Research Institute im Rahmen des Performance Tested Method-Programms zum Nachweis von *S. Typhimurium* aus roher Hühnerbrust mit Haut, roher Hühnerbrust ohne Haut, roher Hühnerbrust ohne Haut mit 2 % (w/w) Salz, rohem Hühnerschenkel mit Haut, rohem Hühnerschenkel ohne Haut, an Stiefelüberziehern und in Zieh-Abstrichtupfern (Drag-Swabs) validiert. Ein positives Ergebnis mit dem iQ-Check Kit ist als vorläufig positiv zu betrachten und sollte mit Standardreferenzmethoden bestätigt werden (siehe Abschnitt 8). Zertifikatnummer: 081904

Abschnitt 11

Literatur

ISO 6579-1:2017. Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von Salmonellen - Teil 1: Nachweis von *Salmonella* spp.

ISO/TR 6579-3:2014. Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von Salmonellen - Teil 3: Leitfaden für die Serotypisierung von *Salmonella* spp.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2019). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 4.10: Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Catfish Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2018). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 5: *Salmonella*.

Abschnitt 12

Revisionshistorie

Freigabedatum	Dokumentnummer	Änderung
März 2017	10000065187 Ver A	Neues Dokument
Juli 2020	10000065187 Ver B	AOAC-Validierung

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 und Kontrollen	Sonden Reagenz B, µl	Amplifikationsmix Reagenz C, µl	Gesamtzahl an Proben und Kontrollen	Sonden Reagenz B, µl	Amplifikationsmix Reagenz C, µl	Gesamtzahl an Proben und 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

**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

10000065187 Ver B US/EG

Sig 0220



iQ-Check *S. Typhimurium* Kit

Manuale utente

Test per la rilevazione mediante PCR real-time di *Salmonella* Typhimurium in prodotti alimentari e campioni ambientali

Catalogo #12004306



Indice

Sezione 1	Introduzione	1
Sezione 2	Tecnologia di iQ-Check S. Typhimurium	1
Sezione 3	Componenti del kit	2
Sezione 4	Durata e conservazione	2
Sezione 5	Materiali necessari ma non forniti	2
	Apparecchiatura	2
	Materiali	3
Sezione 6	Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali	4
Sezione 7	Protocollo	6
	A. Arricchimento del campione	6
	B. Trattamento per la rimozione del DNA libero	7
	C. Estrazione del DNA	7
	D. PCR real-time	8
	E. Analisi dei dati	9
Sezione 8	Conferma dei risultati positivi	10
Sezione 9	Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check	11
Sezione 10	Prestazioni del test e validazione	12
Sezione 11	Riferimenti	12
Sezione 12	Cronologia delle revisioni	12
	Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR	13

Sezione 1 Introduzione

Sebbene in alcune aree l'incidenza delle infezioni causate da salmonella stia diminuendo, in tutto il mondo si registrano ogni anno milioni di casi di salmonellosi nell'uomo. La *Salmonella enterica* sottospecie enterica serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium, o ST) è uno dei sierotipi più frequentemente implicati. I mangimi per suini e pollame sono stati identificati tra i cibi più comunemente associati alle infezioni da ST. In alcune regioni sono state attuate norme al fine di monitorare nel pollame i sierotipi di *Salmonella* (spp.) e sierotipi specifici come la *S. Typhimurium* dalla fase della produzione primaria fino ai prodotti alimentari. Il kit iQ-Check *S. Typhimurium* consente di rilevare in modo rapido e preciso la *S. Typhimurium* in prodotti alimentari e campioni ambientali (incluso l'ambiente di produzione primaria) entro poche ore dal termine dell'arricchimento microbiologico. È possibile processare un numero massimo di 94 campioni, con una procedura intuitiva.

Sezione 2 Tecnologia di iQ-Check *S. Typhimurium*

Il kit iQ-Check *S. Typhimurium* è un test basato sull'amplificazione genica e la rilevazione mediante PCR real-time. I reagenti PCR pronti all'uso inclusi nel kit contengono oligonucleotidi (primer e sonde) specifici per la *S. Typhimurium*, oltre a DNA polimerasi e nucleotidi. La rilevazione e l'analisi dei dati vengono ottimizzate per l'utilizzo tramite uno strumento PCR real-time di Bio-Rad, come il sistema mediante CFX96 Touch Deep Well.

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

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

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

Questo test consente la rilevazione qualitativa di *S. Typhimurium* in determinati prodotti alimentari e campioni ambientali (incluso l'ambiente della produzione primaria) precedentemente arricchiti mediante coltura. Prevede le cinque fasi principali seguenti:



Questo kit integra i kit iQ-Check *S. Enteritidis* e/o iQ-Check *Salmonella* II PCR. Le fasi di arricchimento e di estrazione del DNA sono comuni. Fare riferimento ai rispettivi manuali utente.

* Per le condizioni d'uso, fare riferimento al manuale utente di iQ-Check Free DNA Removal Solution (#10000058391).

Sezione 3 Componenti del kit

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

ID reagente	Reagente	Quantità fornita, ml
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

- Omogeneizzatore da laboratorio per i campioni dei test
- Incubatore per l'arricchimento microbiologico dei campioni
- Materiali specifici per l'estrazione in provette da 1,5 ml coniche, sterili e con tappo a vite:
 - Centrifuga da banco 10.000-12.000 x g
 - Blocco termico a secco a 37 ± 2°C e 95-100°C

Sezione 5 Materiali necessari ma non forniti

- Dispositivo per il frazionamento cellulare, come Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)
- Materiali specifici per l'estrazione in una piastra a pozzetti profondi:
 - Thermoshaker* in grado di mantenere $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $95-100^{\circ}\text{C}$ con una velocità di miscelazione di almeno 1.300 rpm
- Vortex
- Micropipette da 20, 200, e 1.000 μl
- Sistema PCR real-time di Bio-Rad*, ad esempio CFX96 Touch Deep Well (catalogo #3600037)
- Sistema Bio-Rad iQ-Check Prep per l'estrazione automatizzata di DNA e la preparazione della piastra PCR (catalogo #3594911)

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

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

Materiali

- Terreno di arricchimento: Acqua peptonata tamponata APT (ad esempio, BPW Plus catalogo #3564684, in forma disidratata, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 flaconi; 3555790, 5 L x 2 sacche; 3555795, 3 L x 4 sacche; o BPW Standard catalogo #12013259, in forma disidratata, 500 g; 12013258 in forma disidratata, 5 kg; 12013260 5 L x 2 sacche)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalogo #3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (catalogo #12012383)
- RAPID' *Salmonella* Capsule (catalogo #3564710, 100 capsule, quantità per 250 ml; 3564709, 100 capsule, quantità per 2.5 L; 3564712, 100 test)
- RAPID' *Salmonella* Agar (catalogo #3563961, 90 mm x 20 piastre; 3563962, 90 mm x 100 piastre; 3564705, in forma disidratata, 500 g)
- Specifici per campioni ambientali:
 - Spugne ambientali
 - Tamponi ambientali
 - Brodo neutralizzante per spugne e tamponi come Dey-Engley (D/E), HiCap Neutralizing Broth, o Letheen Broth
- Specifici per l'estrazione in provetta:
 - Provette coniche sterili con tappo a vite da 1,5 ml (ad esempio, catalogo #2240110XTU)
- Specifici per l'estrazione in una piastra a pozzetti profondi:
 - Piastra da 96 pozzetti profondi (iQ-Check Deep Well Microplate, catalogo #3594900)

- Pellicola sigillante in plastica (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, catalogo #3590139)
- Pellicola sigillante preforata (X-Pierce Film, catalogo #3593977, o Pre-Pierced Plate Sealing Film, #3600040, solo Nord America)
- Specifici per il sistema iQ-Check Prep:
 - Contenitore per la diluizione da 60 ml (catalogo #3594904)
 - Puntali con filtro (catalogo #3594902, 50 µl x 5.760; 3594903, 1.000 µl x 3.840)
 - Provette per miscela di PCR (catalogo #3594901, 5 ml x 50)
- Piastre PCR, provette, nastro sigillante e tappi
- Puntali sterili con filtro adattabili a micropipette da 20, 200 e 1.000 µl
- Puntali per pipette Combitip o pipettatori a ripetizione equivalenti, sterili e confezionati singolarmente
- Provette per test sterili da 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 presente 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 direttive e normative locali
- Tutti i materiali potenzialmente infetti devono essere collocati in autoclave prima dello smaltimento
- 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

Sezione 6

- 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
 - Utilizzare guanti senza polvere e non lasciare impronte digitali e scritte sui tappi delle provette. Entrambi interferiscono con l'acquisizione dei dati
- Si consiglia vivamente di osservare i requisiti generali illustrati nella norma EN ISO 22174:2005 (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)
 - iQ-Check S. Typhimurium Kit
 - 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 diversi minuti. In caso di ingestione del prodotto, indurre il vomito e contattare un medico
 - iQ-Check Prep System
 - L'utilizzo improprio del sistema iQ-Check Prep System 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 System 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 di rilevazione mediante PCR real-time 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 di rilevazione mediante PCR real-time 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 S. Typhimurium. 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

- *Salmonella* 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, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, 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 industriali in materia di smaltimento dei rifiuti contaminati (ovvero, collocarli in autoclave per 20 min a 120°C). Per maggiori informazioni relative alle normative locali in materia di smaltimento, consultare la scheda di sicurezza.

Sezione 7 Protocollo

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

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

Oggetto (matrici)	Arricchimento	Estrazione del DNA		Certificazione
		Metodo	Formato	
Pollame crudo con o senza pelle	APT21 ± 3 hr a 37 ± 1°C	Easy I	Provetta/Deep Well	AOAC PTM
Campioni ambientali di produzione primaria	APT suppl. preriscaldato 19 ± 1 hr a 41,5 ± 1°C + APT 5 ± 1 hr a 37 ± 1°C	Easy I	Provetta/Deep Well	AOAC PTM
Altri prodotti alimentari e superfici ambientali	APT 21 ± 1 hr a 37 ± 1°C	Easy I/Standard I	Provetta/Deep Well	N/A

A. Arricchimento del campione

I terreni di arricchimento devono essere mantenuti alla temperatura di incubazione opportuna (ambiente, 37°C o 41,5°C) prima dell'utilizzo.

Campioni di dimensioni minori (fino a 25 g)

1. Omogeneizzare n g di campione in $9 \times n$ ml di APT in un sacco Stomacher con filtro incorporato.
2. Incubare per 21 ± 1 hr a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Campioni di dimensioni maggiori (>25–375 g)

1. Omogeneizzare n g di campione in $3 \times n$ ml di APT preriscaldata (ad esempio, 375 g in 1.125 ml) in un sacco Stomacher con filtro incorporato.
2. Incubare per 21 ± 1 hr a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tamponi e spugne ambientali

1. Omogeneizzare i tamponi in 10 ml e le spugne in 60–90 ml di APT. Si raccomanda di utilizzare un brodo neutralizzante che non contenga un complesso di aril solfonato. I brodi neutralizzanti che contengono un complesso di aril solfonato possono richiedere ulteriori diluizioni dell'estratto di DNA.
2. Incubare per 21 ± 1 hr a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Campioni di produzione primaria

1. Omogeneizzare 1 tampone in 100 ml di APT con il supplemento RAPID' *Salmonella* in un sacco Stomacher con filtro incorporato.
2. Incubare per 18-20 hr a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Trasferire 100 μl di campione arricchito in 900 μl di APT in una piastra a pozzetti profondi.
4. Incubare per 4-6 hr a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

B. 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.

C. Estrazione del DNA

Raccomandazioni generali:

1. Prima di iniziare il test, accendere il blocco termico o il thermoshaker 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.
2. Di norma, evitare l'agitazione del sacco di arricchimento e la raccolta di grossi frammenti di residui alimentari. Per i campioni alimentari aventi un surnatante grasso, raccogliere il campione appena al di sotto di questo strato.
3. Aprire le provette e i pozzetti con attenzione per evitare eventuali contaminazioni crociate.
4. Raffreddare la piastra Deep Well prima di pipettare direttamente nella pellicola sigillante preforata.
5. Utilizzare la barra magnetica per mantenere in sospensione il reagente di lisi. Pipettare mentre è in atto un'agitazione a media velocità.
6. Per risospendere la resina, per prima cosa agitare delicatamente a mano il reagente di lisi. Al fine di mantenerlo in sospensione, pipettare mentre è in atto un'agitazione a media velocità del contenuto del flacone mediante la barra magnetica.

Protocollo Standard I

1. Aliquotare 1 ml di campione decantato arricchito in una provetta.
2. Centrifugare la provetta a 10.000-12.000 x g per 5 min. Eliminare il surnatante.
3. Aggiungere 200 µl di reagente di lisi omogeneizzato (reagente A) al pellet e risospendere quest'ultimo pipettando il reagente in alto e in basso. Chiudere la provetta e miscelarla nel vortex ad alta velocità.
4. Incubare nel blocco termico indicato a 95-100°C per 10–15 min.
5. Miscelare la provetta nel vortex ad alta velocità e centrifugare a 10.000-12.000 x g per 5 min.

Questo è il momento raccomandato per l'interruzione temporanea della procedura.

Il surnatante può essere conservato per 1 anno a -20°C. Lasciare sempre il tempo necessario per lo scongelamento e l'omogeneizzazione, in seguito centrifugare a 10.000-12.000 x g per 5 minuti prima di utilizzarlo nuovamente.

Protocollo Easy I

1. Aliquotare 100 µl di reagente di lisi (reagente A) nelle provette o nei pozzetti di una piastra a pozzetti profondi.
2. Aggiungere 100 µl di campione arricchito.
3. Miscelare la soluzione pipettando in alto e in basso fino a che non si completa l'omogeneizzazione.
4. Chiudere le provette o sigillare la piastra deep well con la pellicola sigillante preforata.
5. Incubare le provette nel blocco termico a 95-100°C per 10–15 min. Collocare nell'incubatore la piastra a pozzetti profondi con agitazione a 1300-1600 rpm a 95-100°C per 15–20 min.
6. Miscelare la provetta nel vortex ad alta velocità e centrifugare a 10.000-12.000 x g per almeno 2 min.
7. La centrifugazione non è necessaria per la piastra a pozzetti profondi.

Questo è il momento raccomandato per l'interruzione temporanea della procedura.

Il surnatante può essere conservato per 1 anno a -20°C. Lasciare sempre il tempo necessario per lo scongelamento e l'omogeneizzazione, in seguito centrifugare a 10.000-12.000 x g per 5 minuti prima di utilizzarlo nuovamente.

D. PCR real-time

Installazione strumento e software

Per installare strumento e software, fare riferimento alle istruzioni contenute nel manuale utente del sistema PCR real-time per i kit iQ-Check.

Preparazione della miscela di PCR

1. Preparare la miscela di PCR contenente la soluzione di amplificazione (reagente C) e le sonde fluorescenti (reagente B). Il volume della miscela di PCR necessario dipende dal 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 in Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR.

Nota: Utilizzare la miscela di PCR (reagente B + C) immediatamente in seguito alla preparazione. Essa rimane stabile per un massimo di 1 ora a 2-8°C.

2. Pipettare 45 µl della miscela di PCR in ogni pozzetto secondo lo schema analitico scelto.
3. Aggiungere 5 µl di estratto di DNA, reagente D (controllo negativo) o reagente E (controllo positivo). Non miscelare nel vortex il campione prima del pipettaggio. Sigillare ermeticamente i pozzetti della piastra o le strip. È importante pipettare con attenzione al fine di evitare la formazione di bolle sul fondo dei pozzetti. Come fase facoltativa, per eliminare eventuali bolle centrifugare la piastra PCR o le strip delle provette sigillate (centrifuga rapida).
4. Posizionare la piastra PCR o le strip delle provette nel termociclatore. Accertarsi di posizionare la piastra con il pozzetto A1 nell'angolo superiore sinistro. Chiudere il modulo di reazione.

Eeguire la PCR

Per avviare il ciclo PCR, fare riferimento alle istruzioni contenute nel manuale utente del sistema PCR real-time per i kit iQ-Check.

E. 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 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 seguenti, come riepilogato nella tabella sottostante. In caso contrario, la reazione PCR deve essere ripetuta.

	Rilevazione <i>S. Typhimurium</i> (FAM)	Rilevazione controllo interno (canale HEX)
Controllo negativo	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Controllo positivo	26 ≤ Cq ≤ 36	Non significativo

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

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

Campioni

Un campione **positivo** di *S. Typhimurium* deve avere un valore Cq ≥ 10 per il fluoroforo FAM.

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

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

- Se non esiste un valore Cq per FAM e il controllo interno ha un Cq ≥ 28 , il campione viene considerato come campione **negativo** di *S. Typhimurium*
- 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 possiede una forma caratteristica, sarà necessario ripetere il test PCR

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

Rilevazione <i>S. Typhimurium</i> (canale FAM)	Rilevazione controllo interno (canale HEX)	Interpretazione
Cq ≥ 10	Non significativo	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 *S. Typhimurium*, sia per il controllo interno, il campione deve essere testato nuovamente ma diluito (1:10).

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

Sezione 8

Conferma dei risultati positivi

Il risultato positivo di iQ-Check *S. Typhimurium* si presume essere positivo, ed è raccomandata la conferma in conformità a un metodo di riferimento opportuno.

Campioni di produzione primaria

Per quanto riguarda i campioni ambientali di produzione primaria, elaborare la conferma a partire dall'arricchimento primario, quindi attenersi ai metodi standard (SO 6579-1, USDA MLG, o FDA BAM). Per lo standard ISO 6579-1, adottare il metodo MSR/V e utilizzare il terreno RAPID'*Salmonella* per l'isolamento. Completare il metodo con la determinazione sierologica.

Se emergono risultati discordanti tra l'iQ-Check *S. Typhimurium* e il metodo di conferma sopra descritto, questo è attribuibile alla presenza di *Salmonella* immobile. In tal caso, si consiglia di seguire il protocollo di arricchimento doppio RAPID'*Salmonella* (per le istruzioni, fare riferimento al manuale d'uso). Questo protocollo prevede una fase di arricchimento selettivo in terreno RVS.

I sacchi di arricchimento primario possono essere conservati a 2–8°C per un massimo di 24 ore prima di procedere con la conferma.

Tutti gli altri campioni

Tramite i test descritti nei metodi standard (ISO, USDA MLG, or FDA BAM) per il test di conferma, iniziare dal brodo di arricchimento acqua peptonata tamponata dopo il completo arricchimento per 18 ± 2 ore a 37°C.

Tramite qualunque metodo alternativo in base a un principio diverso da quello impiegato nel test PCR iQ-Check *S. Typhimurium*, ad esempio, il terreno cromogenico RAPID'*Salmonella* con doppio arricchimento; completare il metodo con la determinazione sierologica. Il protocollo validato di questo secondo metodo deve essere seguito interamente. Se questo passaggio è comune a entrambi i metodi, la conferma viene effettuata dal brodo di arricchimento BPW.

Sezione 9

Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check

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

1. Scegliere una colonia isolata da una piastra agar selettiva o non selettiva servendosi di uno stuzzicadenti, un'ansa sterile o altri prodotti di consumo adattati (ad esempio, un puntale per pipetta).
2. Risospendere la colonia in 100 µl di sale triptone o acqua distillata sterile in una provetta per 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) e seguire il resto del protocollo iQ-Check *S. Typhimurium* per l'interpretazione di dati e risultati. L'estrazione di DNA non è necessaria.

Sezione 10

Prestazioni del test e validazione



Il kit iQ-Check *S. Typhimurium* (protocollo Easy) è stato validato dall'AOAC Research Institute nell'ambito del programma Performance Tested Methods per la rilevazione di *S. Typhimurium* in un petto di pollo crudo con la pelle, in un petto di pollo crudo senza pelle, in un petto di pollo crudo senza pelle contenente il 2% w/w di sale, in una coscia di pollo crudo con la pelle, in una coscia di pollo crudo senza pelle, in tamponi da stivale e in tamponi di campionamento. Un risultato positivo con iQ-Check deve essere considerato come presunto, si raccomanda pertanto di effettuare la conferma tramite metodi standard di riferimento (vedere Sezione 8).
Numero di certificato: 081904

Sezione 11

Riferimenti

ISO 6579-1:2017. Microbiologia della catena alimentare — Metodo orizzontale per la sierotipizzazione e la conta di *Salmonella* spp. — Parte 1: Rilevazione di *Salmonella* spp.

ISO/TR 6579-3:2014. Microbiologia della catena alimentare — Metodo orizzontale per la sierotipizzazione e la conta di *Salmonella* — Parte 3: Linee guida per la sierotipizzazione di *Salmonella* spp.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2019). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 4.10: Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Catfish Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2018). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 5: *Salmonella*.

Sezione 12

Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero di documento	Modifica
Marzo 2017	10000065187 Ver A	Nuovo documento
Luglio 2020	10000065187 Ver B	Validazione AOAC

Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR

Al fine di trovare i volumi corretti da utilizzare per la preparazione della miscela di PCR, aggiungere il numero totale di campioni e controlli da analizzare e trovare i volumi corrispondenti del reagente B e del reagente C nella tabella.

Numero totale di campioni e controlli	Sonde reagente B, μl	Miscela di amplificazione Reagente C, μl	Numero totale di campioni e controlli	Sonde reagente B, μl	Miscela di amplificazione Reagente C, μl	Numero totale di campioni e controlli	Sonde reagente B, μl	Miscela di 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

Visitare bio-rad.com/iqcheck per maggiori informazioni.

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

**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

10000065187 Ver B US/EG

Sig 0220



iQ-Check *S. Typhimurium* Kit

Guia do usuário

Teste para detecção de PCR em tempo real de *Salmonella* Typhimurium em amostras de alimentos e ambientais

N° do catálogo 12004306

BIO-RAD

Índice

Seção 1	Introdução	1
Seção 2	Tecnologia iQ-Check S. Typhimurium	1
Seção 3	Componentes do Kit	2
Seção 4	Prazo de validade e armazenamento	2
Seção 5	Materiais necessários, mas não fornecidos.....	2
	Equipamento	2
	Suprimentos.....	3
Seção 6	Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados.....	4
Seção 7	Protocolo	6
	A. Enriquecimento da amostra.....	6
	B. Tratamento de remoção de DNA livre	7
	C. Extração de DNA.....	7
	D. PCR em Tempo Real	8
	E. Análise de dados.....	9
Seção 8	Confirmação de Resultados Positivos.....	10
Seção 9	Confirmação de Colônias Únicas usando o kit iQ-Check	11
Seção 10	Desempenho e Validação do Teste	11
Seção 11	Referências	12
Seção 12	Histórico de Revisão	12
	Apêndice - Guia de Cálculo da Mistura de PCR	13

Seção 1 Introdução

Embora a incidência esteja diminuindo em algumas áreas, milhões de casos de salmonelose humana ainda são relatados em todo o mundo todos os anos. A *Salmonella enterica* subespécie enterica sorovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium, ou ST) é um dos sorovares mais frequentemente implicados. Alimentos para suínos e aves foram identificados entre os alimentos mais comumente associados a essas infecções por ST. Regulamentações foram implementadas em algumas regiões para monitorar espécies de *Salmonella* (spp.) e sorotipos específicos, incluindo *S. Typhimurium* em aves desde o estágio de produção primária até os produtos alimentícios. O kit iQ-Check *S. Typhimurium* permite a detecção rápida e específica de *S. Typhimurium* em alimentos e amostras ambientais (incluindo ambiente de produção primária) dentro de algumas horas após o término do enriquecimento microbiológico. Podem ser processadas até 94 amostras, com um procedimento fácil de usar.

Seção 2 Tecnologia iQ-Check *S. Typhimurium*

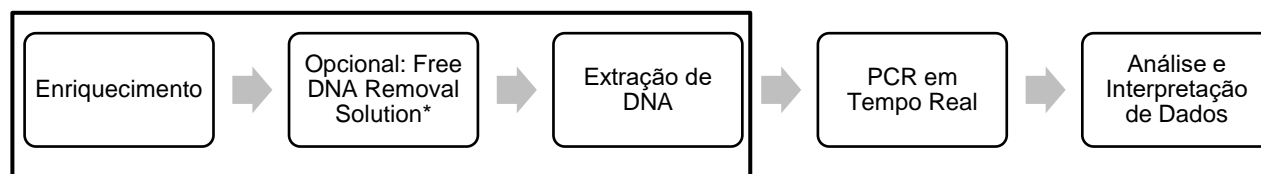
O kit iQ-Check *S. Typhimurium* é um teste baseado na amplificação e detecção genética através de PCR em tempo real. Os reagentes de PCR prontos para uso do kit contêm oligonucleotídeos (iniciadores e sondas) específicos para *S. Typhimurium*, bem como DNA polimerase e nucleotídeos. A detecção e a análise de dados são otimizadas para uso com um instrumento de PCR em tempo real da Bio-Rad, como o CFX96 Touch Deep Well.

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

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

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

Esse teste permite a detecção qualitativa de *S. Typhimurium* em produtos alimentícios selecionados e amostras ambientais (incluindo ambiente de produção primária) previamente enriquecido por cultura. Inclui as cinco etapas principais a seguir:



Este kit complementa os kits de PCR iQ-Check *S. Enteritidis* e/ou iQ-Check *Salmonella* II. As etapas de enriquecimento e extração de DNA são comuns. Consulte os respectivos guias do usuário.

*Consulte o guia do usuário da solução de remoção de DNA iQ-Check Free (#10000058391) para as condições de uso.

Seção 3 Componentes do Kit

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

ID do Reagente	Reagente	Quantidade fornecida, ml
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:
 - Centrífuga de bancada capaz de 10.000–12.000 x g
 - Bloco para banho seco a 37 ± 2 °C e 95–100 °C

Seção 5 Materiais necessários, mas não fornecidos

- Disruptor celular, por exemplo, um Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)
- Específico para extração em placa Deep Well:
 - Agitador térmico de aquecimento* capaz de manter 37 ± 2 °C e 95–100 °C, com uma velocidade de mistura de pelo menos 1.300 rpm
- Vortexer
- Micropipetas de 20, 200 e 1.000 µl
- Sistema de PCR em tempo real da Bio-Rad*, por exemplo, CFX96 Touch Deep Well System (número do catálogo 3600037)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System para extração automatizada de DNA e configuração de placas de PCR (nº do catálogo 3594911)

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

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

Suprimentos

- Meio de enriquecimento: Água Peptonada Tamponada (por exemplo, BPW Plus, nº do catálogo 3564684, desidratado, 500 g, 3554179, 225 ml x 6 frascos, 3555790, 5 L x 2 sacos, 3555795, 3 L x 4 sacos, ou BPW Standard, nº do catálogo 12013259, desidratado, 500 g, 12013258, desidratado, 5 kg, 12013260, 5 L x 2 sacos)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (nº do catálogo 3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (nº do catálogo 12012383)
- RAPID' *Salmonella* Capsule (número do catálogo 3564710, 100 cápsulas, quantidade para 250 ml, 3564709, 100 cápsulas, quantidade para 2,5 L, 3564712, 100 testes)
- RAPID' *Salmonella* Agar (número do catálogo 3563961, 20 placas de 90 mm, nº 3563962, 100 placas de 90 mm, nº 3564705, desidratado, 500 g)
- Específico para amostras ambientais:
 - Esponjas ambientais
 - Esfregaços ambientais
 - Caldo neutralizante para esponjas e esfregaços, como Dey-Engley (D/E) ou HiCap Neutralizing Broth ou Lethen Broth
- Específico para extração em tubos:
 - Tubos com tampa cônica de rosca de 1,5 ml, estéreis (por exemplo, nº do catálogo 2240110XTU)
- Específico para extração em placa Deep Well:

- Placa Deep Well de 96 poços (iQ-Check Deep Well Microplates, nº do catálogo 3594900)
- Filme plástico de vedação (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, nº do catálogo 3590139)
- Filme de vedação pré-perfurado (X-Pierce Films,, nº do catálogo 3593977, ou Pre-Pierced Plate Sealing Film, nº 3600040, apenas América do Norte)
- Específico para o sistema iQ-Check Prep:
 - Recipiente de diluição de 60 ml (nº do catálogo 3594904)
 - Pontas de filtro (nº do catálogo 3594902, 50 µl x 5.760, 3594903, 1.000 µl x 3.840)
 - Tubos de mistura de PCR (nº do catálogo 3594901, 5 ml x 50)
- 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 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
- 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 circule equipamentos de laboratório (pipetas, tubos etc.) de uma estação de trabalho para outra
 - Sempre use um controle positivo e um controle negativo para cada série de reações de amplificação
 - Não utilize reagentes após a expiração de suas datas de validade

Seção 6

- Agite os reagentes do kit antes de utilizá-los, de modo a garantir a homogeneidade
 - Verifique periodicamente a exatidão e precisão das pipetas, bem como o correto funcionamento dos 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 o cumprimento dos requisitos gerais descritos na norma EN ISO 22174:2005 “Microbiologia de alimentos para consumo humano e para alimentação animal – reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de patógenos alimentares – Requisitos e definições gerais” (Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food pathogens – General requirements and definitions.)
 - iQ-Check S. Typhimurium Kit
 - 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
 - iQ-Check Prep System
 - O uso inadequado do sistema iQ-Check Prep System 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 System 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 de PCR em tempo real 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 de PCR em tempo real 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 S. Typhimurium. 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

- A *Salmonella* 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.

Seção 7 Protocolo

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

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

Escopo (matrizes)	Enriquecimento	Extração de DNA		Certificação
		Método	Formato	
Aves cruas com e sem pele	BPW 21 ± 3 hr em 37 ± 1°C	Easy I	Tubo/Deep Well	AOAC PTM
Amostras de produção primária ambiental	Supl. BPW pré-aquecido 19 ± 1 hr em 41,5 ± 1°C + BPW 5 ± 1 hr em 37 ± 1°C	Easy I	Tubo/Deep Well	AOAC PTM
Outros produtos alimentícios e superfícies ambientais	BPW 21 ± 1 hr em 37 ± 1°C	Easy I/Standard I	Tubo/Deep Well	N/A

A. Enriquecimento da amostra

Os meios de enriquecimento devem estar na temperatura de incubação apropriada (ambiente, 37 °C ou 41,5 °C) antes do uso.

Tamanhos de amostra menores (até 25 g)

1. Homogeneizar n g da amostra em 9 x n ml de BPW em um saco Stomacher com filtro incorporado.
2. Incubar por 21 ± 1 hr em 37 ± 1°C.

Tamanhos maiores de amostra (>25–375 g)

1. Homogeneizar n g da amostra em $3 \times n$ ml de BPW pré-aquecido (por exemplo, 375 g em 1.125 ml) em um saco Stomacher com filtro incorporado.
2. Incubar por 21 ± 1 hr em $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Esfregaços e esponjas ambientais

1. Homogeneíze esfregaços em 10 ml e esponjas em 60–90 ml BPW. Recomenda-se usar um caldo neutralizante que não contenha complexo de sulfonato de arilo. Os caldos neutralizantes contendo complexo de sulfonato de arilo podem exigir diluições adicionais do extrato de DNA.
2. Incubar por 21 ± 1 hr em $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Amostras de produção primária

1. Homogeneíze 1 esfregaço em 100 ml BPW com suplemento RAPID' *Salmonella* em um saco Stomacher com filtro incorporado.
2. Incubar por 18–20 hr em $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Transfira 100 μl da amostra enriquecida para 900 μl BPW em uma placa Deep Well.
4. Incubar por 4–6 hr em $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

B. Tratamento de remoção de DNA livre

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

C. Extração de DNA

Recomendações gerais:

1. Ligue o bloco de calor ou o agitador térmico para pré-aquecer antes de iniciar o teste. Defina para 95–100 $^\circ\text{C}$. Mantenha o reagente de lise em suspensão enquanto pipeta, agitando a velocidade média em uma placa de agitação magnética.
2. Em geral, evite agitar o saco de enriquecimento e coletar fragmentos de grande dimensão de resíduos alimentares. Para amostras alimentares com um sobrenadante gorduroso, colete a amostra logo abaixo desta camada.
3. Abra os tubos e os poços com cuidado para evitar possíveis contaminações cruzadas.
4. Resfrie a placa Deep Well antes de pipetar diretamente através do filme de vedação pré-perfurado.
5. Use a barra magnética para manter o reagente de lise em suspensão. Pipete enquanto estiver mexendo em velocidade média.
6. Agite suavemente o reagente de lise manualmente primeiro para ressuspender a resina. Pipete enquanto a barra magnética agita o conteúdo do frasco em velocidade média para manter o conteúdo em suspensão.

Protocolo Standard I

1. Colete 1 ml de amostra enriquecida decantada em um tubo.
2. Centrifugue o tubo a 10.000–12.000 x g por 5 min. Descarte o sobrenadante.
3. Adicione 200 µl de reagente de lise (reagente A) ao sedimento e ressuspenda o sedimento pipetando o reagente para cima e para baixo. Feche o tubo e agite em vortex em alta velocidade.
4. Incube no bloco de calor apropriado a 95-100 °C por 10–15 min.
5. Agite no vortex o tubo em alta velocidade e centrifugue a 10.000-12.000 x g por 5 min.

Este é o ponto de parada recomendado para interromper temporariamente o procedimento.

O sobrenadante pode ser armazenado por até 1 ano a –20°C. Sempre deixe descongelar e homogeneizar e depois centrifugue a 10.000–12.000 x g por 5 min antes de reutilizar.

Protocolo Easy I

1. Alíquota de 100 µl de reagente de lise (reagente A) para tubos ou poços de uma placa Deep Well.
2. Adicione 100 µl de amostra enriquecida.
3. Misture a solução pipetando para cima e para baixo até homogeneizar.
4. Feche os tubos ou sele a placa Deep Well com filme de vedação pré-perfurado.
5. Incube os tubos no bloco de calor a 95–100 °C por 10–15 minutos. Incube a placa Deep Well na incubadora sob agitação a 1.300–1.600 rpm a 95–100 °C por 15–20 minutos.
6. Agite no vortex os tubos em alta velocidade e em seguida centrifugue a 10.000–12.000 x g por 2 min.
7. A centrifugação não é necessária para a placa Deep Well.

Este é o ponto de parada recomendado para interromper temporariamente o procedimento.

O sobrenadante pode ser armazenado por até 1 ano a –20°C. Sempre deixe descongelar e homogeneizar e depois centrifugue a 10.000–12.000 x g por 5 min antes de reutilizar.

D. PCR em Tempo Real

Configuração do instrumento e do software

Para a configuração do instrumento e do software, siga as instruções do guia do usuário do sistema PCR em tempo real para kits iQ-Check.

Preparação da mistura de PCR

1. Prepare a mistura de PCR contendo a solução de amplificação (reagente C) e as sondas fluorescentes (reagente B). O volume de mistura de PCR necessário depende do 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 – Guia de cálculo da mistura de PCR para encontrar os volumes corretos a serem usados para cada reagente.

Nota: Use a mistura de PCR (reagente B + C) imediatamente após a preparação. Ela é estável por 1 hr no máximo a 2–8 °C.

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

Execute a PCR

Para iniciar a execução da PCR, siga as instruções do guia do usuário do sistema PCR em tempo real para os kits iQ-Check.

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

	Detecção de S. Typhimurium (FAM)	Detecção de controle interno (Canal HEX)
Controle negativo	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Controle positivo	26 ≤ Cq ≤ 36	Não significativo

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

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

Amostras

Uma amostra **positiva** de *S. Typhimurium* deve ter um valor de Cq ≥ 10 para o fluoróforo FAM.

- Se o valor de Cq para ambos os canais for menor que 10, certifique-se de que a curva de dados brutos é uma curva de amplificação regular (com uma linha de base plana, seguida de um rápido aumento exponencial da fluorescência e depois de um achatamento). Se a curva parecer correta, considere estar diante de uma amostra positiva para *S. Typhimurium*

Caso não haja valor Cq (Cq = N/A) para a FAM, ou caso a curva não seja uma curva de amplificação típica, deve-se analisar o controle interno dessa amostra.

- Se não houver valor de Cq para a FAM e o controle interno tiver Cq ≥ 28 , essa amostra será considerada uma amostra **negativa** de *S. Typhimurium*
- 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 μ l de extrato de DNA), use 5 μ l 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, será necessário repetir o teste de PCR

A interpretação dos resultados da amostra é resumida na seguinte tabela:

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

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

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

Seção 8 Confirmação de Resultados Positivos

Um resultado positivo do iQ-Check *S. Typhimurium* é considerado positivo e a confirmação de acordo com um método de referência apropriado é recomendada.

Amostras de produção primária

Para amostras de produção primária ambiental, processe a confirmação a partir do enriquecimento primário e siga os métodos padrão (ISO 6579-1, USDA MLG, ou FDA BAM). Para o padrão ISO 6579-1, siga o método MSRV e então o meio RAPID[®] *Salmonella* para o isolamento. Complete o método com determinação sorológica.

Seção 9 Confirmação de Colônias Únicas usando o kit iQ-Check

Os resultados que não estão de acordo entre o iQ-Check *S. Typhimurium* e o método de confirmação descrito acima podem ser devido à presença de *Salmonella* não móvel. Nesse caso, recomendamos seguir o protocolo de enriquecimento duplo do RAPID' *Salmonella* (consulte o guia do usuário para obter instruções). Este protocolo inclui uma etapa de enriquecimento seletivo em meio RVS.

Os sacos de enriquecimento primário podem ser armazenados por até 24 horas a 2–8 °C antes de prosseguir para a confirmação.

Todas as outras amostras

Usando os testes descritos nos métodos padrão (ISO, USDA MLG ou FDA BAM) para o teste de confirmação, comece com o caldo de enriquecimento com água peptonada tamponada após o enriquecimento total de 18 ± 2 horas a 37 °C.

Usando qualquer outro método baseado em um princípio diferente daquele usado no teste de PCR iQ-Check *S. Typhimurium*, por exemplo, meio cromogênico RAPID' *Salmonella* com enriquecimento duplo, complete o método com determinação sorológica. O protocolo deste segundo método deve ser seguido inteiramente. A confirmação é realizada a partir do caldo de enriquecimento BPW se esta etapa for comum aos dois métodos.

Seção 9 Confirmação de Colônias Únicas usando o kit iQ-Check

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

1. Escolha uma colônia isolada de uma placa de cultura de ágar seletivo ou não seletivo com um palito de dente, alça estéril ou outro consumível adaptado (por exemplo, uma 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 a seção 7D. PCR em tempo real) e siga o restante do protocolo iQ-Check *S. Typhimurium* para a interpretação dos dados e resultados. A extração de DNA não é necessária.

Seção 10 Desempenho e Validação do Teste



O kit iQ-Check *S. Typhimurium* (Protocolo Fácil) foi validado pelo AOAC Research Institute no âmbito do Programa de Método de Teste de Desempenho para detecção de *S. Typhimurium* de peito de frango cru com pele, peito de frango cru sem pele, peito de frango cru sem pele contendo 2% p/p de sal, coxa de frango cru com pele, coxa de frango cru sem pele, esfregaços ambientais e esfregaços. Um resultado positivo com o iQ-Check deve ser considerado presumido e é recomendável que seja confirmado por métodos de referência padrão (consulte a Seção 8). Número do certificado: 081904

Seção 11

Referências

ISO 6579-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* spp. — Part 1: Detection of *Salmonella* spp.

ISO/TR 6579-3:2014. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 3: Guidelines for serotyping of *Salmonella* spp.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2019). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 4.10: Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Catfish Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2018). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 5: *Salmonella*.

Seção 12

Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Março de 2017	10000065187 Ver A	Novo documento
Julho de 2020	10000065187 Ver B	Validação AOAC

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 C na tabela.

Número Total de Amostras e Controles	Reagente de sondas B, µl	Mistura de amplificação Reagente C, µl	Número Total de Amostras e Controles	Reagente de sondas B, µl	Mistura de amplificação Reagente C, µl	Número Total de Amostras e Controles	Reagente de sondas B, µl	Mistura de amplificação 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

Visite bio-rad.com/iqcheck para mais 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

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

10000065187 Ver B US/EG

Sig 0220



iQ-Check *S. Typhimurium* Kit

Manual del usuario

Análisis de detección por PCR en tiempo real de *Salmonella* Typhimurium en muestras alimentarias y ambientales

Referencia #12004306



Tabla de Contenidos

Apartado 1	Introducción.....	1
Apartado 2	Tecnología de iQ-Check S. Typhimurium	1
Apartado 3	Componentes del kit.....	2
Apartado 4	Vida útil y conservación	2
Apartado 5	Materiales necesarios, no suministrados	2
	Equipos	2
	Fungibles.....	3
Apartado 6	Precauciones y recomendaciones de seguridad para la obtención de resultados óptimos	
Apartado 7	Protocolo	6
	A. Enriquecimiento de la muestra	6
	B. Tratamiento de eliminación de ADN libre	7
	C. Extracción de ADN	7
	D. PCR en tiempo real.....	8
	E. Análisis de los datos.....	9
Apartado 8	Confirmación de resultados positivos	10
Apartado 9	Confirmación de colonias aisladas usando el kit iQ-Check.....	11
Apartado 10	Aplicación del ensayo y validaciones.....	11
Apartado 11	Referencias	12
Apartado 12	Historial de revisiones	12
	Apéndice — Tabla de cálculo de la mix de PCR	13

Apartado 1 Introducción

Aunque la incidencia está disminuyendo en algunas zonas, cada año se siguen notificando millones de casos de salmonelosis humana en todo el mundo. *Salmonella enterica* subespecie enterica serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium, o ST) es uno de los serovares más frecuentemente implicados. Los piensos para cerdos y aves de corral han sido identificados entre los productos más comúnmente vinculados a estas infecciones de ST. Se han implementado regulaciones en algunas regiones para controlar las especies de *Salmonella* (spp.) y serotipos específicos incluyendo *S. Typhimurium* en aves de corral, desde la etapa de producción primaria hasta los productos alimentarios. El kit iQ-Check *S. Typhimurium* permite la detección rápida y específica de *S. Typhimurium* en muestras alimentarias y ambientales (incluyendo el ambiente de producción primaria) en pocas horas tras completarse el enriquecimiento microbiológico. Se pueden procesar hasta 94 muestras con un procedimiento fácil de usar.

Apartado 2 Tecnología de iQ-Check *S. Typhimurium*

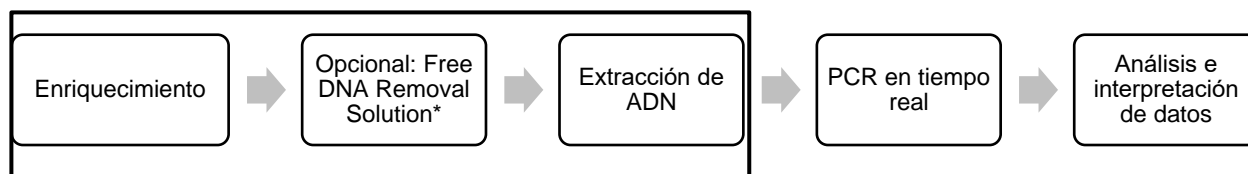
El kit iQ-Check *S. Typhimurium* es un ensayo basado en la detección y amplificación de genes por PCR en tiempo real. Los reactivos de PCR listos para su uso incluidos en el kit contienen oligonucleótidos (cebadores y sondas) específicos para *S. Typhimurium*, así como ADN polimerasa y nucleótidos. La detección y el análisis de datos están optimizados para su uso con un instrumento de PCR en tiempo real de Bio-Rad, como el CFX96 Touch Deep Well System

La PCR es una técnica potente que se utiliza para generar muchas copias del ADN diana. Durante la reacción de PCR, varios ciclos de calentamiento y enfriamiento promueven la desnaturalización del ADN, seguido de la unión de los cebadores a la región diana. La ADN polimerasa utiliza dichos cebadores y desoxinucleótido trifosfatos (dNTPs) para extender el ADN, creando copias del ADN diana. Estas copias se llaman amplicones.

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

En la mix de reacción se incluye un control interno de ADN sintético para validar cualquier posible resultado negativo. Este control se amplifica con una sonda específica al mismo tiempo que la secuencia de ADN diana de *S. Typhimurium* y se detecta por un segundo fluoróforo.

Esta prueba permite la detección cualitativa de *S. Typhimurium* en muestras de productos alimentarios (incluyendo el ambiente de producción primaria) y muestras ambientales, previamente enriquecidas por cultivo. Consta de los siguientes cinco pasos:



Este kit complementa los kits iQ-Check *S. Enteritidis* y / o iQ-Check *Salmonella* II PCR. Los pasos de enriquecimiento y extracción de ADN son comunes. Por favor, consulte los respectivos manuales de usuario.

*Por favor, consulte la guía de usuario del producto iQ-Check Free DNA Removal Solution (#10000058391), para conocer las condiciones de uso.

Apartado 3

Componentes del kit

El kit iQ-Check *S. Typhimurium* contiene suficientes reactivos para 96 pruebas (94 muestras).

ID de reactivo	Reactivo	Cantidad proporcionada, ml
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 debe ser almacenado a 2 – 8°C. Los reactivos almacenados a esta temperatura pueden usarse hasta la fecha de caducidad indicada en los tubos.

Apartado 5

Materiales necesarios, no suministrados

Equipos

- Homogeneizador de palas para homogeneizar las muestras de ensayo
- Incubador para el enriquecimiento microbiológico de muestras
- Instrumentos específicos para la extracción en tubos cónicos estériles de 1,5mL y tapa de rosca:
 - Centrífuga de sobremesa con capacidad de 10.000-12.000 x g
 - Bloque calefactor seco a 37 ± 2°C y 95–100°C
 - Disruptor celular, como el Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)

Apartado 5 Materiales necesarios, no suministrados

- Instrumentos específicos para la extracción en placa Deep Well:
 - Calefactor térmico con agitación* con capacidad para mantener $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $95\text{--}100^{\circ}\text{C}$, con una velocidad de agitación de al menos 1.300 rpm
- Agitador vortex
- Placa agitadora magnética
- Micropipetas de 20, 200 y 1.000 μl
- Sistema PCR en tiempo real Bio-Rad*; por ejemplo, el CFX96 Touch Deep Well System (referencia #3600037)
- iQ-Check Prep System de Bio-Rad para el procedimiento de extracción automático de ADN y configuración de la placa de PCR (referencia #3594911)

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

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

Fungibles

- Caldo de enriquecimiento: Agua de peptona tamponada (por ejemplo, BPW Plus, referencia #3564684, deshidratado, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 frascos; 3555790, 5 L x 2 bolsas; 3555795, 3 L x 4 bolsas; o BPW Standard, referencia #12013259, deshidratado, 500 g; 12013258, deshidratado, 5 kg; 12013260, 5 L x 2 bolsas)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (referencia #3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (referencia #12012383)
- RAPID' *Salmonella* Capsule (referencia #3564710, 100 cápsulas, cantidad para 250 ml; 3564709, 100 cápsulas, cantidad para 2,5 L; 3564712, 100 ensayos)
- RAPID' *Salmonella* Agar (referencia #3563961, 90 mm x 20 placas; 3563962, 90 mm x 100 placas; 3564705, deshidratado, 500 g)
- Materiales específicos para muestras ambientales:
 - Esponjas ambientales
 - Hisopos ambientales
 - Caldo neutralizante para esponjas e hisopos, como el caldo neutralizante Dey-Engley (D/E) o HiCap o el caldo Letheen
- Materiales específicos para la extracción en tubos:
 - Tubos cónicos estériles de 1,5 ml y tapa de rosca (por ejemplo, referencia #2240110XTU)
- Materiales específicos para la extracción en placa Deep Well:
 - Placa Deep Well de 96 pocillos (iQ-Check Deep Well Microplates, referencia #3594900)

- Película o film plástico de sellado (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, referencia #3590139)
- Película pre-perforada de sellado para placas Deep Well (X-Pierce Films, referencia #3593977 o Pre-Pierced Plate Sealing Film, #3600040, solo en Norteamérica)
- Materiales específicos para el iQ-Check Prep System:
 - Recipiente de 60 ml para dilución (referencia #3594904)
 - Puntas con filtro (referencia #3594902, 50 µl x 5.760; 3594903, 1.000 µl x 3.840)
 - Tubos para mix de PCR (referencia #3594901, 5 ml x 50)
- Placas , tubos, filme de sellado y tapas de PCR
- Puntas con filtro estériles adaptables a micropipetas de 20, 200 y 1.000 µl
- Puntas para pipeta Combitip o pipetas de repetición equivalentes; estériles, empaquetadas individualmente
- Tubos de ensayo estériles de 5 ml
- Guantes sin polvo
- Agua destilada estéril
- Lejía, 5 %
- Descontaminante, como DNA AWAY o RNase AWAY

Apartado 6

Precauciones y recomendaciones de seguridad para la obtención de resultados óptimos

- Este análisis debe ser realizado por personal capacitado
- Las muestras y los cultivos enriquecidos deben manipularse como material potencialmente infeccioso y desecharse de acuerdo con las normas y reglamentos locales
- Todo el material potencialmente infeccioso debe ser esterilizado en autoclave antes de su eliminación
- La calidad de los resultados depende del estricto cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio (por ejemplo, la norma EN ISO 7218), especialmente en lo que respecta a la PCR:
 - El material de laboratorio (pipetas, tubos, etc.) no debe intercambiarse entre un puesto de trabajo y otro.
 - Utilice siempre un control positivo y un control negativo para cada serie de reacciones de amplificación
 - No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad
 - Agite (mediante vórtex) los reactivos del kit antes de usarlos para asegurar la homogeneidad

Apartado 6

- Verifique periódicamente la exactitud y la precisión de las pipetas, así como el correcto funcionamiento de los instrumentos
- Cámbiense los guantes a menudo, especialmente si sospecha que están contaminados
- Limpie los espacios de trabajo periódicamente con un 5 % de lejía y otros agentes descontaminantes, como DNA AWAY
- Use guantes sin polvo y evite las huellas dactilares y escribir en las tapas de los tubos. Ello podría interferir en la correcta adquisición de datos
- Se recomienda encarecidamente seguir los requisitos generales descritos en la norma EN ISO 22174:2005 (Microbiología de los alimentos y piensos - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en alimentos - Requisitos generales y definiciones)
- iQ-Check S. Typhimurium Kit
 - Todas las sustancias o mezclas del kit de análisis son productos clasificados, según el Sistema Global Armonizado de Clasificación y Rotulado de Productos Químicos (SGA). El contacto con los ácidos puede causar la liberación de gases tóxicos. No es necesario tomar precauciones especiales si se utiliza correctamente. Si se inhala el producto, suministre aire fresco y consulte a un médico en caso de presentar molestias. En caso de contacto del producto con los ojos, enjuague el ojo abierto durante varios minutos con agua corriente. En caso de ingestión de los productos, induzca el vómito y solicite ayuda 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 suponer un riesgo de lesiones personales debido al calor excesivo si se manejan de forma inadecuada. Para un uso seguro, el iQ-Check Prep System debe ser manipulado y utilizado sólo por personal de laboratorio cualificado que haya sido instruido para tal fin. El mantenimiento del instrumento debe correr a cargo exclusivamente de los ingenieros del servicio técnico de Bio-Rad.
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System
 - El uso inadecuado del CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System puede causar lesiones personales o daños en el instrumento. Algunos componentes pueden suponer un riesgo de lesiones personales debido al calor excesivo si se manejan de forma inadecuada. Para un uso seguro, el CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System debe ser manipulado y utilizado sólo por personal de laboratorio cualificado y que haya sido instruido para tal fin. 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 seguir toda la información de seguridad en las instrucciones del kit iQ-Check S. Typhimurium. Conserve las instrucciones de seguridad para futuras consultas. Para reducir los riesgos asociados a la exposición a productos químicos y a riesgos biológicos, los análisis de patógenos deben ser realizados en un laboratorio debidamente equipado y bajo el control de personal capacitado. Siga siempre las prácticas reguladas de seguridad de los laboratorios, incluido el uso de vestimenta protectora adecuada y protección ocular al manipular reactivos y muestras contaminadas. Evite el contacto con el contenido de los medios de enriquecimiento y los tubos de reactivos después de la amplificación. Deseche las muestras enriquecidas de acuerdo con las normas vigentes aplicables a la industria

- La *Salmonella* es un organismo considerado en el nivel de bioseguridad 2. Las muestras biológicas como los enriquecimientos tienen potencial de transmitir enfermedades infecciosas. Siga todos los reglamentos locales, estatales/provinciales y/o nacionales aplicables para la eliminación de desechos biológicos. Use el equipo de protección apropiado, que incluya, pero no se limite a, gafas protectoras, protector facial, vestimenta/bata de laboratorio y guantes. Todos los trabajos deben realizarse en instalaciones debidamente equipadas, utilizando el equipo de seguridad adecuado (por ejemplo, dispositivos de contención física). Las personas deben ser instruidas y estar capacitadas de acuerdo con los requisitos reglamentarios y de la empresa/institución aplicables antes de trabajar con materiales potencialmente infecciosos
- Una vez finalizados los análisis, todos los materiales y medios que puedan contener patógenos deberán descontaminarse siguiendo las normas actuales de la industria para la eliminación de desechos contaminados (es decir, en autoclave durante 20 minutos a 120 °C). Consulte la Ficha de Datos de Seguridad para obtener información adicional y los reglamentos locales para la eliminación.

Apartado 7

Protocolo

Se recomienda encarecidamente leer completa y detenidamente el protocolo antes de iniciar la prueba.

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

Alcance (matrices)	Enriquecimiento	Extracción de ADN		Certificación
		Método	Formato	
Carne cruda de ave con y sin piel	APT 21 ± 3 hr a 37 ± 1 °C	Easy I	Tubo/Deep Well	AOAC PTM
Muestras ambientales de producción primaria	APT sum. precalentada 19 ± 1 hr a 41,5 ± 1 °C + APT 5 ± 1 hr a 37 ± 1 °C	Easy I	Tubo/Deep Well	AOAC PTM
Otros productos alimentarios y muestras ambientales	APT 21 ± 1 hr a 37 ± 1 °C	Easy I/Standard I	Tubo/Deep Well	N/A

A. Enriquecimiento de la muestra

El medio de enriquecimiento debe encontrarse a la temperatura de incubación apropiada (ambiente 37°C o 41,5°C) antes de su uso.

Muestras con peso hasta 25 g

1. Homogeneizar n g de muestra en $9 \times n$ ml de APT en una bolsa de stomacher con filtro incorporado.
2. Incube durante 21 ± 1 hr a 37 ± 1 °C.

Muestras con peso comprendido desde 25 hasta 375 g

1. Homogeneizar n g de muestra en $3 \times n$ ml de APT precalentada (por ejemplo, 375 g en 1.125 ml) en una bolsa de stomacher con filtro incorporado.
2. Incubar durante 21 ± 1 hr a 37 ± 1 °C.

Hisopos y esponjas ambientales

1. Homogeneizar los hisopos en 10 ml y las esponjas en 60–90 ml de APT. Se recomienda usar un caldo neutralizante que no contenga complejos aril sulfonato. Los caldos neutralizantes que contengan complejos aril sulfonato pueden requerir diluciones adicionales del extracto de ADN.
2. Incube durante 21 ± 1 hr a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Muestras de producción primaria

1. Homogeneizar 1 hisopo en 100 ml de APT con suplemento RAPID' *Salmonella* en una bolsa de stomacher con filtro incorporado.
2. Incubar durante 18–20 hr a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Transferir 100 μl de muestra enriquecida a 900 μl de APT en una placa Deep Well.
4. Incubar durante 4–6 hr a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

B. Tratamiento de eliminación de ADN libre

La solución iQ-Check Free DNA Removal Solution (referencia #3594970) es la mejor forma de eliminar el ADN libre. Siga las recomendaciones de Bio-Rad descritas en la guía del usuario.

C. Extracción de ADN

Recomendaciones generales:

1. Encienda el bloque calefactor o calefactor térmico con agitación para precalentar antes de iniciar la prueba. Póngalo a $95\text{--}100^\circ\text{C}$. Mantenga el reactivo de lisis en agitación a velocidad media en una placa agitadora magnética mientras pipetea.
2. En general, evite agitar la bolsa de enriquecimiento y recoger grandes fragmentos de restos de muestra. Para muestras de alimentos con un sobrenadante graso, recoja la muestra justo debajo de esta capa.
3. Abra los tubos y pocillos con cuidado para evitar cualquier posible contaminación cruzada.
4. Enfríe la placa Deep Well antes de pipetear directamente a través de la película pre-perforada de sellado .
5. Utilice la barra magnética para mantener el reactivo de lisis en suspensión. Pipetee mientras se agita a velocidad media.
6. Agite suavemente el reactivo de lisis manualmente para resuspender la resina. Pipetee mientras la barra magnética agita el contenido del frasco a velocidad media para mantener el contenido en suspensión.

Protocolo Standard I

1. Recoja 1 ml de muestra enriquecida decantada en un tubo.
2. Centrifugue el tubo a 10.000 - 12.000 x g durante 5 min. Descarte el sobrenadante.

3. Añada 200 µl de reactivo de lisis (reactivo A) al pellet y resuspéndalo pipeteando el reactivo hacia arriba y hacia abajo. Cierre el tubo y agite (agitador vortex) a alta velocidad.
4. Incube en el bloque calefactor apropiado a 95 – 100°C durante 10 - 15 min.
5. Agite el tubo con vortex a alta velocidad y centrifugue a 10.000 - 12.000 x g durante 5 min.

Este es el punto de parada recomendado para detener temporalmente el procedimiento.

El sobrenadante puede ser almacenado hasta 1 año a –20 °C. Antes de volver a utilizarlo, déjelo descongelar y homogenícelo y, a continuación, centrifúguelo a 10.000 - 12.000 x g durante 5 minutos.

Protocolo Easy I

1. Deposite una alícuota de 100 µl de reactivo de lisis (reactivo A) en los tubos o pocillos de una placa Deep Well.
2. Añada 100 µl de muestra enriquecida.
3. Mezcle la solución pipeteando hacia arriba y hacia abajo hasta que se homogeneice.
4. Cierre los tubos o selle la placa Deep Well mediante la película pre-perforada de sellado.
5. Si trabaja con tubos, incúbelos en el bloque calefactor a 95 - 100°C durante 10 - 15 min. Si trabaja con placa Deep Well, incúbela en el incubador agitando simultáneamente a 1.300 - 1.600 rpm a 95 - 100°C durante 15 - 20 min.
6. Agite los tubos con vórtex a alta velocidad y a continuación centrifugue a 10.000 - 12.000 x g durante al menos 2 min.

La centrifugación no es necesaria en el caso de la placa Deep Well.

Este es el punto de parada recomendado para detener temporalmente el procedimiento.

El sobrenadante puede ser almacenado hasta 1 año a –20 °C. Antes de volver a utilizarlo, déjelo descongelar y homogenícelo y, a continuación, centrifúguelo a 10.000 - 12.000 x g durante 5 minutos.

D. PCR en tiempo real

Configuración del software e instrumento

Para la configuración del instrumento y del software, siga las instrucciones de la guía del usuario del sistema de PCR en tiempo real para los kits iQ-Check.

Preparación de la mix de PCR

1. Prepare la mix de PCR que contiene la solución de amplificación (reactivo C) y las sondas fluorescentes (reactivo B). El volumen de mix de PCR necesario depende del número de muestras y controles a analizar. Se debe incluir al menos un control positivo y uno negativo en cada run de PCR. Utilice la tabla de pipeteo del Apéndice – Guía de cálculo de la mix de PCR para obtener los volúmenes correctos a utilizar para cada reactivo.

Nota: Utilice la mix de PCR (reactivo B + C) inmediatamente después de su preparación. La mix permanecerá estable durante 1 hr como máximo a 2–8°C.

Apartado 7 Protocolo

2. Pipetee 45 µl de la mix de PCR en cada pocillo según la configuración de su placa.
3. Añada 5 µl de extracto de ADN, reactivo D (control negativo) o reactivo E (control positivo). No agite con vórtex la muestra antes del pipeteo. Selle herméticamente los pocillos de la placa o las tiras de PCR. Es importante evitar la formación de burbujas en el fondo de los pocillos pipeteando con cuidado. Como paso opcional, centrifugue la placa de PCR sellada o las tiras de tubos (quick spin) para eliminar cualquier burbuja.
4. Coloque la placa de PCR o las tiras de tubos en el termociclador. Asegúrese de colocar la placa con el pocillo A1 en la esquina superior izquierda. Cierre el módulo de reacción.

Run de PCR

Para iniciar el run de PCR, siga las instrucciones del manual del usuario del sistema de PCR en tiempo real del kit iQ-Check.

E. Análisis de los datos

Los datos pueden ser analizados directamente al final del run de PCR o en un momento posterior abriendo el archivo de datos almacenados. Siga las instrucciones del correspondiente manual del usuario del software CFX Manager IDE para abrir los archivos de datos y configurar los parámetros de análisis de datos.

Interpretación de los resultados

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

El software CFX Manager IDE permite un análisis completamente automático para los sistemas de detección por PCR en tiempo real de Bio-Rad.

Controles

Verifique los controles positivo y negativo 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, deberá repetirse la reacción.

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

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

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

Muestras

Una muestra de *S. Typhimurium* positiva debe presentar un valor Cq ≥ 10 relativo al fluoróforo FAM.

- Si el valor Cq de ambos canales es inferior a 10, verifique que la curva presente una amplificación normal (con una línea de base plana, seguida de un rápido aumento exponencial de la fluorescencia, y luego un aplanamiento o fase meseta). Si la curva parece correcta, puede considerarse una muestra positiva de *S. Typhimurium*

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

- Si no hay un valor Cq para FAM y el control interno tiene un Cq ≥ 28 , esta muestra se considera una muestra **negativa** en *S. Typhimurium*
- Si el control interno tampoco tiene un valor Cq (Cq = N/A), esto probablemente indica la inhibición de la reacción de PCR. Diluya la muestra (realice una dilución 1:10 en agua destilada estéril utilizando 10 μ l de extracto de ADN), utilice 5 μ l de la dilución para la amplificación y repita la prueba PCR.
- Si el valor Cq del control interno es < 28 , no es posible interpretar el resultado. Verifique el posicionamiento correcto del umbral y que la curva presente una amplificación típica. Si la curva no tiene una forma característica, será necesario repetir la prueba de PCR.

La interpretación de los resultados de las muestras se resume en la siguiente tabla.

Detección de <i>S. Typhimurium</i> (canal FAM)	Detección de control interno (canal HEX)	Interpretación
Cq ≥ 10	No significativo	Positivo
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibición*

* Si tanto la detección de *S. Typhimurium* como la del control interno dan un valor Cq = N/A, es necesario volver a analizar la muestra diluida (1:10).

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

Apartado 8

Confirmación de resultados positivos

Un resultado positivo con el kit iQ-Check *S. Typhimurium* se presume que es positivo y se recomienda su confirmación mediante un método de referencia apropiado.

Muestras de producción primaria

Para las muestras ambientales de producción primaria, proceda con la confirmación a partir del enriquecimiento primario, y a continuación utilice métodos normalizados (ISO 6579-1, USDA MLG, o FDA BAM). Para la norma ISO 6579-1, siembre en MSRv y después utilice el medio RAPID' *Salmonella* para el aislamiento. Complete el método con la determinación serológica.

Los resultados no concordantes entre iQ-Check *S. Typhimurium* y el método de confirmación arriba descrito pueden ser debidos a la presencia de *Salmonella* inmóvil. En ese caso, recomendamos seguir el protocolo de doble enriquecimiento RAPID' *Salmonella* (consulte las instrucciones en la guía del usuario). Este protocolo incluye un paso de enriquecimiento selectivo en medio RVS.

Apartado 9 Confirmación de colonias aisladas usando el kit iQ-Check

Las bolsas de enriquecimiento primario se pueden conservar hasta 24 hr a 2-8°C antes de proceder con la confirmación.

Resto de muestras

Utilizando los ensayos descritos en los métodos normalizados (ISO, USDA MLG, o FDA BAM) para la prueba de confirmación, comience con el caldo de enriquecimiento de agua de peptona tamponada después del enriquecimiento completo de 18 ± 2 hr a 37°C.

Utilizando cualquier otro método basado en un principio diferente del utilizado en el ensayo de PCR iQ-Check *S. Typhimurium*, por ejemplo, el medio cromogénico RAPID[®] *Salmonella* con doble enriquecimiento; complete el método con la determinación serológica. El protocolo validado de este segundo método debe ser seguido en su totalidad; la confirmación se realiza a partir del caldo de enriquecimiento de APT si este paso es común a ambos métodos.

Apartado 9 Confirmación de colonias aisladas usando el kit iQ-Check

El kit iQ-Check *S. Typhimurium* puede utilizarse también para confirmar colonias de *S. Typhimurium* aisladas en placas de agar.

1. Recoja una colonia aislada de una placa de agar selectivo o no selectivo con un palillo, un asa estéril u otro fungible adaptado (por ejemplo, una punta de pipeta).
2. Resuspenda la colonia en 100 µl de sal triptona o agua destilada estéril en un tubo de microcentrífuga. Homogenice con vortex.
3. Analice 5 µl de la suspensión con 45 µl de mix de PCR (véase 7 D. PCR en tiempo real) y siga el resto del protocolo iQ-Check *S. Typhimurium* para la interpretación de los datos y los resultados. No es necesario realizar extracción de ADN.

Apartado 10 Aplicación del ensayo y validaciones



El kit iQ-Check *S. Typhimurium* (protocolo Easy) está validado por el Instituto de Investigación de la AOAC en el marco del Programa "Performance Tested Methods" para la detección de *S. Typhimurium* en pechuga de pollo cruda con piel, pechuga de pollo cruda sin piel, pechuga de pollo cruda sin piel que contiene un 2% p/p de sal, muslo de pollo crudo con piel, muslo de pollo crudo sin piel, calzas ambientales e hisopos de arrastre. Un resultado positivo con iQ-Check debe considerarse como no definitivo y se recomienda que se confirme mediante métodos de referencia normalizados (véase el apartado 8). Número de certificado: 081904

Apartado 11

Referencias

ISO 6579-1:2017. Microbiología de la cadena alimentaria — Método horizontal para la detección, recuento y serotipado de *Salmonella* spp. — Parte 1: Detección de *Salmonella* spp.

ISO/TR 6579-3:2014. Microbiología de la cadena alimentaria — Método horizontal para la detección, recuento y serotipado de *Salmonella* — Parte 3: Guía de serotipado de *Salmonella* spp.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2019). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 4.10: Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Catfish Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2018). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 5: *Salmonella*.

Apartado 12

Historial de revisiones

Fecha de publicación	N.º de documento	Cambio
Marzo 2017	10000065187 Ver A	Documento nuevo
Julio 2020	10000065187 Ver B	Validación AOAC

Apéndice — Tabla de cálculo de la mix de PCR

Para obtener los volúmenes correctos a usar en la preparación de la mix de PCR, sume el número total de muestras y controles a analizar y localice los volúmenes correspondientes del reactivo B y del reactivo C en la tabla.

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	1400	65	351	2800
2	11	86	34	184	1500	66	356	2900
3	16	130	35	189	1500	67	362	2900
4	22	173	36	194	1600	68	367	2900
5	27	216	37	200	1600	69	373	3000
6	32	259	38	205	1600	70	378	3000
7	38	302	39	211	1700	71	383	3100
8	43	346	40	216	1700	72	389	3100
9	49	389	41	221	1800	73	394	3200
10	54	432	42	227	1800	74	400	3200
11	59	475	43	232	1900	75	405	3200
12	65	518	44	238	1900	76	410	3300
13	70	562	45	243	1900	77	416	3300
14	76	605	46	248	2000	78	421	3400
15	81	648	47	254	2000	79	427	3400
16	86	691	48	259	2100	80	432	3500
17	92	734	49	265	2100	81	437	3500
18	97	778	50	270	2200	82	443	3500
19	103	821	51	275	2200	83	448	3600
20	108	864	52	281	2200	84	454	3600
21	113	907	53	286	2300	85	459	3700
22	119	950	54	292	2300	86	464	3700
23	124	994	55	297	2400	87	470	3800
24	130	1000	56	302	2400	88	475	3800
25	135	1100	57	308	2500	89	481	3800
26	140	1100	58	313	2500	90	486	3900
27	146	1200	59	319	2500	91	491	3900
28	151	1200	60	324	2600	92	497	4000
29	157	1300	61	329	2600	93	502	4000
30	162	1300	62	335	2700	94	508	4100
31	167	1300	63	340	2700	95	513	4100
32	173	1400	64	346	2800	96	518	4100

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

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

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

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

BIO-RAD

**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

10000065187 Ver B US/CE

Sig 0220

