

---

# iQ-Check *Campylobacter* Kit

## User Guide

Test for the real-time PCR detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* in food and environmental samples

Catalog #357813

**BIO-RAD**

# Table of Contents

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

## Section 1 Introduction

*Campylobacter* has emerged as the most frequent cause of gastroenteritis. *C. jejuni* and, to a lesser extent, *C. coli* and *C. lari* are the species most commonly identified with infection. The bacteria are commensal in the intestinal tract of cattle, sheep, pigs, and birds, and consequently food of animal origin can become contaminated. The majority of *Campylobacter* infections are acquired through the consumption of contaminated water, raw and inadequately pasteurized milk, and undercooked meats, particularly poultry. The infectious dose of *Campylobacter* is thought to be as low as 500 cells. Conventional bacteriological methods for detection of *Campylobacter* are often long and tedious. The iQ-Check *Campylobacter* real-time PCR Kit is a simple rapid test, allowing detection of the bacteria in food and environmental samples.

## Section 2 The iQ-Check *Campylobacter* Technology

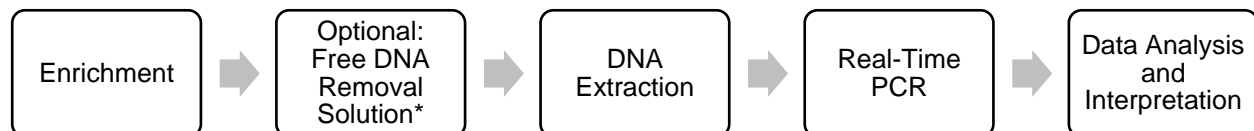
The iQ-Check *Campylobacter* Kit is a test based on gene amplification and detection by real-time PCR. The kit's ready-to-use PCR reagents contain oligonucleotides (primers and probes) specific for *C. jejuni*, *C. coli*, and *C. lari*, as well as DNA polymerase and nucleotides. Detection and data analysis 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 allow DNA denaturation. 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 *Campylobacter*-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 *Campylobacter* spp. target DNA sequence and is detected by a second fluorophore.

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



\* 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 *Campylobacter* Kit contains sufficient reagents for 96 tests (94 samples).

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

## Section 4 Shelf Life and Storage

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

## Section 5 Materials Required but Not Supplied

### Equipment

- Lab paddle blender for homogenizing test samples
- Incubator for sample microbiological enrichment
- Specific for extraction in sterile 1.5 ml conical screwcap tubes
  - Benchtop centrifuge capable of 10,000–12,000 x g
  - Dry heat block at 37 ± 2°C and/or 95–100°C
- Specific for extraction in deep well plate
  - Heating thermoshaker\* capable of maintaining 37 ± 2°C and/or 95–100°C, with a mixing speed of at least 1,300 rpm
- Vortexer
- 20, 200, and 1,000 µl micropipets
- Bio-Rad real-time PCR system,\* for example, the CFX96 Touch Deep Well (catalog #3600037) or CFX Opus Deepwell (catalog # 17007991) Real-Time PCR Systems
- 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: Bolton broth, supplemented or double strength blood free
- 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. BPW Standard catalog #12013259, dehydrated, 500 g; 12013258 dehydrated, 5 kg; 12013260 5 L x 2 bags)
- Enrichment medium: Hunt Broth, prepared per manufacturer's recommendation
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalog #3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (catalog #12012383)
- RAPID' *Campylobacter* Agar (catalog #12012036, 90 mm x 20 dishes; 3564295, dehydrated base, 500 g; 3564296, supplement, 10 vials)
- Specific for environmental samples
  - Environmental sponges
  - Neutralizing broth for sponges, 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 #12014473)
  - Filter tips (catalog #12014486, 50  $\mu$ l x 5,760; 12014483, 1,000  $\mu$ l x 3,840)
  - PCR mix tubes (catalog #12016673, 5 ml x 25)
- PCR plates, tubes, sealing tape, and caps
- Sterile filter tips adaptable to 20, 200, and 1,000  $\mu$ l 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
  - 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 *Campylobacter* 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

## Section 7 Protocol

- 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 or CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Detection System
  - Improper use of the CFX96 Touch Deep Well or CFX Opus Deepwell 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 and CFX Opus Deepwell 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 *Campylobacter* 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
  - *Campylobacter* 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

### A. Sample Enrichment

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

Enrichment media must be at the appropriate incubation temperature (20–25°C) before use.

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

**AOAC PTM 031209**

| <b>Scope (Matrices)</b>           | <b>Sample Preparation</b>   | <b>Enrichment/DNA Extraction</b>  |
|-----------------------------------|---|---|
| Raw ground chicken                | Homogenize <i>n</i> g sample in 9 x <i>n</i> ml Supplemented Bolton broth   | <b>Easy I extraction</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubate 4 hr at 37 ± 1°C under microaerobic conditions</li> <li>▪ Incubate an additional 20 hr at 41.5 ± 1°C under microaerobic conditions</li> <li>▪ Tube/deep well format</li> </ul> |
| Carcass rinses and carcass sponge | Homogenize <i>n</i> g food in 9 x <i>n</i> ml 2x Blood-Free Bolton's Enrichment Broth (BF-BEB)  | <b>Easy I extraction</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubate 24 hr at 42 ± 1°C under microaerobic conditions</li> <li>▪ Tube/deep well format</li> </ul>  |
| Raw ground chicken                | Homogenize 325 g of raw poultry to 1,625 ml of BPW. Add 30 ml of homogenized sample to 30 ml Hunt Broth and mix   | <b>Easy I extraction</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubate 22-26 hr at 42 ± 1°C under microaerobic conditions</li> <li>▪ Tube/deep well format</li> </ul>   |
| Poultry rinse                     | Homogenize 30 ml of poultry rinsate in 30 ml Hunt Broth   | <b>Easy I extraction</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubate 22-26 hr at 42 ± 1°C under microaerobic conditions</li> <li>▪ Tube/deep well format</li> </ul>   |
| Carcass sponge                    | Add 25 ml of Hunt Broth to sponge with 25 ml transport media  | <b>Easy I extraction</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubate 22-26 hr at 42 ± 1°C under microaerobic conditions</li> <li>▪ Tube/deep well format</li> </ul>   |
| <b>Scope (Matrices)</b>           | <b>Sample Preparation</b>   | <b>Enrichment/DNA Extraction</b>  |
| Environmental sponge              | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Moisten sponges with a neutralizing broth that does not contain aryl sulfonate complex</li> <li>▪ Add 20 ml BPW plus 30 ml Hunt Broth to bag containing the sponge</li> <li>▪ Homogenize sponge samples prior to incubation by stomaching or hand massaging for 30 sec</li> <li>▪ Homogenize swab samples in the tube by shaking vigorously or vortexing for 10 sec</li> </ul> | <b>Easy I extraction</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubate 22-26 hr at 42 ± 1°C under microaerobic conditions</li> <li>▪ Tube/deep well format</li> </ul>   |
| Food samples                      | Homogenize <i>n</i> g food in 9 x <i>n</i> ml Supplemented Bolton broth   | <b>Easy I extraction</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubate 4 hr at 37 ± 1°C</li> <li>▪ Incubate an additional 20 hr at 41.5 ± 1°C under microaerobic conditions</li> <li>▪ Tube/deep well format</li> </ul>                               |
| Feces                             | Homogenize <i>n</i> g feces in 1 x <i>n</i> ml Supplemented Bolton broth  | <b>Easy I extraction</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Direct detection (no enrichment needed)</li> <li>▪ Tube/deep well format</li> </ul>   |

## **B. Free DNA Removal Treatment**

The iQ-Check Free DNA Removal Solution provides an ideal way to remove free DNA. Follow recommendations from Bio-Rad in the user guide (document #10000058391).

## **C. DNA Extraction**

General recommendations:

1. Turn on the heat block or thermoshaker to preheat before starting the test. Set it to 95–100°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.

## Section 7 Protocol

3. Open tubes and wells carefully to avoid any possible cross-contamination.
4. Cool the deep well plate before pipetting directly through pre-pierced 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. Then pipet while it is stirring at medium speed with the magnetic bar in the bottle, in order to keep it in suspension.

### Easy I protocol

1. Aliquot 100  $\mu$ l of lysis reagent (reagent A) to tubes or the wells of a deep well plate.
2. Add 100  $\mu$ l 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 pre-pierced sealing film.
5. Incubate the tubes in the heat block at 95–100°C for 15–20 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. 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 (reagents B + C) immediately after preparation. It is stable for 1 hr maximum at 2–8°C.

2. Pipet 45  $\mu$ l of the PCR mix into each well according to your plate setup.
3. Add 5  $\mu$ l 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 PCR plate or tube 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.

- Place the PCR plate or tube strips in the thermal cycler. Be sure to place the plate correctly, with the A1 well at the upper left corner. Close the reaction module.

## Run PCR

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

## E. 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. A verification of the typical characteristics of the amplification curves should be performed prior to releasing results. Contact your Bio-Rad technical support team if additional support is required.

### Controls

Verify the positive and negative controls before interpreting sample results.

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

|                  | <b><i>Campylobacter</i> detection<br/>(FAM)</b> | <b>Internal control detection<br/>(HEX channel)</b> |
|------------------|---|---|
| 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 iQ-Check *Campylobacter* PCR test must show a typical amplification curve and a Cq value  $\geq 10$  for the FAM fluorophore.

- If the Cq value for both channels is less than 10, verify 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 *Campylobacter* test.

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

## Section 8 Confirmation of Positive Results

- This sample is considered a **negative** *Campylobacter* sample if there is no Cq value in the FAM channel and the internal control has a Cq value  $\geq 28$
- Should the internal control also not have a Cq value (Cq = N/A), this probably indicates an inhibition of the PCR reaction. The sample needs to be diluted (using 10  $\mu$ l of DNA extract, perform a 1:10 dilution in distilled sterile water, and then test 5  $\mu$ l of the dilution) and the PCR repeated
- Should the Cq value for the internal control be  $<28$ , it is not possible to interpret the result. Verify that the threshold was correctly placed or that the curve as raw data is a regular amplification curve. If the curve does not have a characteristic shape, it will be necessary to repeat the PCR test.

Interpretation of sample results is summarized in the following table:

| <b><i>Campylobacter</i> Detection (FAM channel)</b> | <b>Internal control detection (HEX channel)</b> | <b>Interpretation</b> |
|---|---|-----------------------|
| Cq $\geq 10$  | Not significant                                 | Positive              |
| Cq = N/A  | Cq $\geq 28$                                    | Negative              |
| Cq = N/A  | Cq = N/A  | Inhibition*           |

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

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

## Section 8 Confirmation of Positive Results

A positive iQ-Check *Campylobacter* result is presumed to be positive, and confirmation according to an appropriate reference method is recommended. RAPID' *Campylobacter* chromogenic media can also be used.

In the context of AOAC validation, a positive iQ-Check *Campylobacter* result should be considered presumptive positive and confirmation according to an appropriate reference method (for example, USDA MLG) is recommended. Alternatively, streak 10  $\mu$ l enriched Hunt Broth directly to RAPID' *Campylobacter* Agar and incubate for  $48 \pm 2$  hr at  $42 \pm 1^\circ\text{C}$  under microaerobic conditions.

## Section 9 Confirmation of Single Colonies Using iQ-Check Kit

The iQ-Check *Campylobacter* Kit may also be used to confirm single isolated *Campylobacter* colonies on agar plates. This is officially validated by AFNOR Certification on RAPID' *Campylobacter* Chromogenic Media.

1. Pick an isolated colony from a selective or nonselective agar plate with a toothpick, sterile loop, or other adapted consumable (for example, a pipet tip).
2. Resuspend the colony in 100  $\mu$ l tryptone salt or distilled sterile water in a microcentrifuge tube. Homogenize using a vortexer.
3. Use 5  $\mu$ l of the suspension with 45  $\mu$ l of PCR mix (see Section 7 Protocol, D. Real-Time PCR) and

follow the rest of the iQ-Check *Campylobacter* protocol for the data and result interpretation. DNA extraction is not necessary.

## Section 10 Test Performance and Validation



### AOAC Validation

The iQ-Check *Campylobacter* Kit has been validated by the AOAC Research Institute under the Performance Tested Method Program for detection of *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* from raw ground chicken, chicken carcass rinses and turkey sponges with use of CFX96 Touch Deep Well and CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Systems are validated for all samples. The associated software is CFX Manager IDE Software (version 2.2 and later). 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: 031209

## Section 11 References

ISO 10272-1 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration and of *Campylobacter* spp. - Part 1 Detection method

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2022). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 41.07. Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples

## Section 12 Revision History

| Release date | Document number   | Change   |
|--------------|-------------------|--|
| August 2020  | 10000131520 Ver A | <ul style="list-style-type: none"><li>- New document design and update of content</li><li>- Document number change – previous version 881039 REV G</li></ul>   |
| April 2023   | 10000131520 Ver B | <ul style="list-style-type: none"><li>- General content updates</li><li>- AOAC extension: Hunt Broth and CFX Opus Deepwell PCR system</li><li>- Replaced protocol section with summary table</li></ul> |

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

---

---

# iQ-Check *Campylobacter* Kit

## Guide d'utilisation

Test pour la détection par PCR en temps réel de *Campylobacter jejuni*,  
*Campylobacter coli* et *Campylobacter lari* dans les échantillons alimentaires et  
environnementaux

N° de référence 3578135

**BIO-RAD**

# Sommaire

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Section 1  | Introduction.....   | 1  |
| Section 2  | Technologie iQ-Check <i>Campylobacter</i> .....                         | 1  |
| Section 3  | Composants du kit.....  | 2  |
| Section 4  | Durée de conservation et stockage.....                                  | 2  |
| Section 5  | Matériel requis non fourni.....   | 2  |
|            | Matériel.....   | 2  |
|            | Produits.....   | 3  |
| Section 6  | Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux..... | 4  |
| Section 7  | Protocole.....  | 5  |
|            | A. Enrichissement de l'échantillon.....                                 | 5  |
|            | B. Traitement de l'ADN libre.....                                       | 6  |
|            | C. Extraction de l'ADN.....   | 6  |
|            | D. PCR en temps réel.....   | 7  |
| Section 8  | Confirmation des résultats positifs.....                                | 9  |
| Section 9  | Confirmation de colonies isolées à l'aide du kit iQ-Check.....          | 9  |
| Section 10 | Performance du test et validation.....                                  | 10 |
| Section 11 | Références.....   | 10 |
| Section 12 | Historique des révisions.....   | 10 |
|            | Annexe — Guide de calcul du mélange de PCR.....                         | 11 |

## Section 1 Introduction

La bactérie *Campylobacter* apparaît aujourd'hui comme la principale cause de gastroentérite. *C. jejuni* et, dans une moindre mesure, *C. coli* et *C. lari* sont les espèces infectieuses les plus couramment signalées. Bactérie commensale, elle est présente dans le tractus intestinal des races bovines, ovines, porcines et aviaires. Par conséquent, les produits alimentaires issus de ces sources sont susceptibles d'être contaminés. La majorité des infections à *Campylobacter* ont lieu via la consommation d'eau contaminée, de lait cru inadéquatement pasteurisé et de viande insuffisamment cuite (en particulier la volaille). Il est admis que la dose infectieuse de *Campylobacter* est de 500 cellules. Les méthodes bactériologiques traditionnelles pour la détection de *Campylobacter* sont souvent chronophages et fastidieuses. Le kit iQ-Check *Campylobacter* permet une détection rapide de la bactérie dans les échantillons alimentaires et environnementaux.

## Section 2 Technologie iQ-Check *Campylobacter*

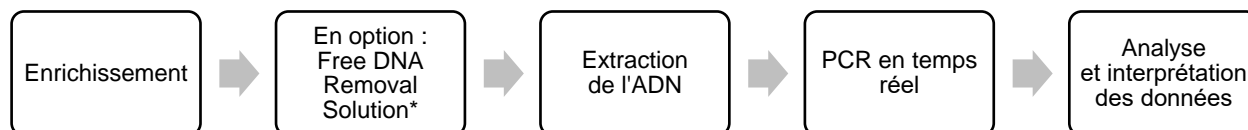
Le kit iQ-Check *Campylobacter* est un test basé sur l'amplification et la détection des gènes par PCR en temps réel. Les réactifs PCR prêts à l'emploi de ce kit contiennent des oligonucléotides (amorces et sondes) propres à *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*, ainsi que de l'ADN polymérase et des nucléotides. 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 *Campylobacter*. 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 *Campylobacter* et est détecté par un second fluorophore.

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



\* Se référer au guide d'utilisation d'iQ-Check Free DNA Removal Solution (n° de référence 1000058391) pour les conditions d'utilisation.

## Section 3

### Composants du kit

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

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

## Section 4

### Durée de conservation et stockage

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

## Section 5

### Matériel requis non fourni

#### Matériel

- Stomacher de laboratoire pour homogénéiser les échantillons de test
- Incubateur pour l'enrichissement microbiologique des échantillons
- 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/ou 95–100 °C
- Matériel spécifique pour extraction en plaque Deep Well
  - Agitateur incubateur\* capable de maintenir une température de 37 ± 2 °C et/ou 95–100 °C, avec une vitesse de mélange d'au moins 1 300 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 (n° de référence 3600037) ou CFX Opus Deepwell (n° de référence 17007991)
- 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 : Bouillon Bolton, avec supplément ou doublement concentré et exempt de sang
- Milieu d'enrichissement : eau peptonée tamponnée (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. BPW Standard n° de référence 12013259, base déshydratée, 500 g ; 12013258 base déshydratée, 5 kg ; 12013260, 5 L x 2 poches)
- Milieu d'enrichissement : bouillon Hunt, préparé selon les recommandations du fabricant
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (n° de référence 3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (n° de référence 12012383)
- RAPID *Campylobacter* Agar (n° de référence 12012036, 90 mm x 20 boîtes ; 3564295, base déshydratée, 500 g ; 3564296, supplément, 10 flacons)
- Produits spécifiques pour les échantillons environnementaux
  - Éponges d'échantillonnage environnemental
  - Bouillon neutralisant pour éponges, par exemple, Dey-Engley (D/E), HiCap ou Letheen
- 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 Pre-Pierced Plate Sealing Film, n° de référence 3600040, Amérique du Nord uniquement)
- Produits spécifiques pour iQ-Check Prep System
  - Récipient de dilution 60 ml (n° de référence 12014473)
  - Embouts à filtre (n° de référence 12014486, 50 µl x 5 760 ; 12014483, 1 000 µl x 3 840)
  - Tubes de mélange de PCR (n° de référence 12016673, 5 ml x 25)
- 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.
  - 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 *Campylobacter* 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 de l'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.

## Section 7 Protocole

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 PCR en temps réel CFX96 Touch Deep Well ou CFX Opus Deepwell
  - Une utilisation incorrecte du système de PCR en temps réel CFX96 Touch Deep Well ou CFX Opus Deepwell 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, les systèmes de PCR en temps réel CFX96 Touch Deep Well et CFX Opus Deepwell doivent être uniquement manipulés 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 *Campylobacter*. 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.
  - *Campylobacter* 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

### A. Enrichissement de l'échantillon

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

Les milieux d'enrichissement doivent être portés à la température d'incubation appropriée (20 – 25 °C) avant utilisation.

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

| AOAC PTM 031209                          |  |   |
|--|--|---|
| Domaine (matrices)                       | Préparation des échantillons   | Enrichissement/Extraction de l'ADN  |
| Poulet haché cru                         | Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon dans 9 x <i>n</i> ml de bouillon Bolton supplémenté  | <b>Extraction Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incuber pendant 4 hr à 37 ± 1 °C en microaérobiose</li> <li>▪ Incuber pendant 20 hr supplémentaires à 41,5 ± 1 °C en microaérobiose</li> <li>▪ Format tube/Deep Well</li> </ul> |
| Rinçages de carcasse et éponge carcasse  | Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml de bouillon d'enrichissement Bolton doublement concentré et exempt de sang  | <b>Extraction Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incuber pendant 24 hr à 42 ± 1 °C en microaérobiose</li> <li>▪ Format tube/Deep Well</li> </ul>   |
| Poulet haché cru                         | Homogénéiser 325 g de volaille crue dans 1 625 ml de BPW. Ajouter 30 ml de l'échantillon homogénéisé à 30 ml de bouillon Hunt et mélanger  | <b>Extraction Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incuber pendant 22 – 26 hr à 42 ± 1 °C en microaérobiose</li> <li>▪ Format tube/Deep Well</li> </ul>  |
| Rinçage de volaille                      | Homogénéiser 30 ml de rinçage de volaille dans 30 ml de bouillon Hunt  | <b>Extraction Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incuber pendant 22 – 26 hr à 42 ± 1 °C en microaérobiose</li> <li>▪ Format tube/Deep Well</li> </ul>  |
| Éponge carcasse                          | Ajouter 25 ml de bouillon Hunt à l'éponge avec 25 ml de milieu de transport  | <b>Extraction Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incuber pendant 22 – 26 hr à 42 ± 1 °C en microaérobiose</li> <li>▪ Format tube/Deep Well</li> </ul>  |
| Domaine (matrices)                       | Préparation des échantillons   | Enrichissement/Extraction de l'ADN  |
| Éponge d'échantillonnage environnemental | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Humidifier les éponges avec un bouillon neutralisant qui ne contient pas de complexe aryle-sulfonate</li> <li>▪ Ajouter 20 ml de BPW et 30 ml de bouillon Hunt dans le sachet contenant l'éponge</li> <li>▪ Avant l'incubation, homogénéiser les échantillons d'éponge avec un homogénéisateur Stomacher ou à la main pendant 30 sec</li> <li>▪ Homogénéiser les échantillons d'écouvillon dans le tube en agitant vigoureusement ou en vortexant pendant 10 sec</li> </ul> | <b>Extraction Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incuber pendant 22 – 26 hr à 42 ± 1 °C en microaérobiose</li> <li>▪ Format tube/Deep Well</li> </ul>  |
| Échantillons alimentaires                | Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml de bouillon Bolton supplémenté  | <b>Extraction Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incuber pendant 4 hr à 37 ± 1 °C</li> <li>▪ Incuber pendant 20 hr supplémentaires à 41,5 ± 1 °C en microaérobiose</li> <li>▪ Format tube/Deep Well</li> </ul>                   |
| Fèces                                    | Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon de fèces dans 1 x <i>n</i> ml de bouillon Bolton supplémenté   | <b>Extraction Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Détection directe (aucun enrichissement nécessaire)</li> <li>▪ Format tube/Deep Well</li> </ul>   |

## B. Traitement de l'ADN libre

iQ-Check Free DNA Removal Solution est un moyen idéal d'éliminer l'ADN libre. Suivre les recommandations de Bio-Rad dans le guide d'utilisation (n° de document 10000058391).

## 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 pipetage 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.

## Section 7 Protocole

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 réactif de lyse en suspension pendant le pipetage en mélangeant à vitesse moyenne avec le barreau magnétique dans le flacon.

### Protocole Easy 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 15–20 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. 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 de PCR 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. Une vérification des caractéristiques typiques des courbes d'amplification doit être réalisée avant la publication des résultats. Contacter l'équipe d'assistance technique de Bio-Rad en cas de besoin.

### Contrôles

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

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

|                  | Détection de <i>Campylobacter</i> (FAM) | Détection de contrôle interne (canal HEX) |
|------------------|---|---|
| Contrôle négatif | Cq = N/A*                               | 28 ≤ Cq ≤ 40                              |
| Contrôle positif | 26 ≤ Cq ≤ 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 test PCR iQ-Check *Campylobacter* positif doit présenter une courbe d'amplification typique et une valeur Cq ≥ 10 pour le fluorophore FAM.

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

## Section 8 Confirmation des résultats positifs

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  $\geq 28$ , l'échantillon est considéré **négatif** pour *Campylobacter*.
- 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  $\mu$ l d'extrait d'ADN), utiliser 5  $\mu$ l de la dilution 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>Campylobacter</i> (canal FAM) | Détection de contrôle interne (canal HEX) | Interprétation |
|---|---|----------------|
| Cq $\geq 10$                                  | Non significatif                          | Positif        |
| Cq = N/A                                      | Cq $\geq 28$                              | Négatif        |
| Cq = N/A                                      | Cq = N/A                                  | Inhibition*    |

\* Lorsque la détection pour *Campylobacter* 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 *Campylobacter* positif est supposé être positif et une confirmation selon une méthode de référence appropriée est recommandée. Il est également possible d'utiliser le milieu chromogène RAPID' *Campylobacter*.

Dans le contexte de la validation AOAC, un résultat iQ-Check *Campylobacter* positif doit être présumé positif et une confirmation selon une méthode de référence appropriée (par exemple, USDA MLG) est recommandée. Il est également possible de strier 10  $\mu$ l de bouillon Hunt enrichi directement sur la gélose RAPID' *Campylobacter* avant incubation pendant  $48 \pm 2$  hr à  $42 \pm 1$  °C en microaérobiose.

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

Le kit iQ-Check *Campylobacter* peut également être utilisé pour confirmer des colonies de *Campylobacter* isolées sur boîtes gélosées. Cette méthode est officiellement validée par AFNOR Certification pour le milieu chromogène RAPID' *Campylobacter*.

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  $\mu$ l de tryptone-sel ou d'eau distillée stérile dans un microtube à centrifuger. Vortexer pour homogénéiser.
3. Utiliser 5  $\mu$ l de la suspension avec 45  $\mu$ l de mélange de PCR (voir Section 7 Protocole, D. PCR en temps réel) et suivre le reste du protocole iQ-Check *Campylobacter* pour l'interprétation des données et du résultat. L'extraction d'ADN n'est pas nécessaire.

## Section 10

### Performance du test et validation



#### Validation AOAC

Le kit iQ-Check *Campylobacter* est validé par AOAC Research Institute dans le cadre du programme « Performance Tested Methods » pour la détection de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* dans les éléments suivants : poulet haché cru, rinçages de carcasse de poulet et éponges d'échantillonnage de dinde, avec l'utilisation des systèmes de PCR en temps réel CFX96 Touch Deep Well et CFX Opus Deepwell validés pour tous les échantillons. Le logiciel associé est CFX Manager IDE (version 2.2 et ultérieure). 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 : 031209

## Section 11

### Références

ISO 10272-1 - Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Campylobacter* spp. — Partie 1 : Méthode de recherche

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2022). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 41.07. Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples

## Section 12

### Historique des révisions

| Date de publication | Numéro de document | Modification   |
|---------------------|--------------------|--|
| Août 2020           | 10000131520 Ver A  | <ul style="list-style-type: none"><li>- Nouvelle conception de document et mise à jour du contenu</li><li>- Modification du numéro de document (version précédente 881039 REV G)</li></ul>   |
| Avril 2023          | 10000131520 Ver B  | <ul style="list-style-type: none"><li>- Mises à jour générales du contenu</li><li>- Extension AOAC : bouillon Hunt et système de PCR CFX Opus Deepwell</li><li>- Remplacement de la section Protocole par un tableau récapitulatif</li></ul> |

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

---

---

# iQ-Check *Campylobacter* Kit

## Anwenderhandbuch

Test für den Nachweis von *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* und *Campylobacter lari* in Lebensmittel- und Umgebungsproben durch Real-Time PCR

Katalog-Nr. 3578135



# Inhaltsverzeichnis

|              |  |    |
|--------------|--|----|
| Abschnitt 1  | Einleitung .....   | 1  |
| Abschnitt 2  | Die iQ-Check <i>Campylobacter</i> -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 .....  | 5  |
|              | A. Probenanreicherung .....                                      | 5  |
|              | B. Behandlung zur Entfernung freier DNA .....                    | 6  |
|              | C. DNA-Extraktion .....  | 7  |
|              | D. Real-Time PCR.....  | 7  |
|              | E. Datenanalyse .....  | 8  |
| Abschnitt 8  | Bestätigung positiver Ergebnisse.....                            | 10 |
| Abschnitt 9  | Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit.....         | 10 |
| Abschnitt 10 | Testleistung und Testvalidierung .....                           | 10 |
|              | AOAC-Validierung.....  | 10 |
| Abschnitt 11 | Literatur .....  | 11 |
| Abschnitt 12 | Revisionshistorie .....  | 11 |
|              | Anhang — Pipettiertabelle für das PCR Reaktionsgemisch.....      | 12 |

## Abschnitt 1 Einleitung

*Campylobacter* ist die häufigste Ursache von Gastroenteritis. Die am häufigsten bei einer Infektion identifizierten Arten sind *C. jejuni* und in geringerem Maße *C. coli* und *C. lari*. Da die Bakterien im Darmtrakt von Rindern, Schafen, Schweinen und Vögeln vorkommen, können Lebensmittel tierischer Herkunft kontaminiert sein. Die meisten *Campylobacter*-Infektionen finden durch den Verzehr von kontaminiertem Wasser, Rohmilch und unzureichend pasteurisierter Milch sowie unzureichend gegartem Fleisch, insbesondere Geflügel, statt. Für eine Infektion mit *Campylobacter* sind vermutlich bereits 500 Bakterienzellen ausreichend. Herkömmliche bakteriologische Methoden zum Nachweis von *Campylobacter* sind oft langwierig und aufwändig. Der iQ-Check *Campylobacter* Real-Time PCR Kit ist ein einfacher Schnelltest zum Nachweis der Bakterien in Lebensmittel- und Umgebungsproben.

## Abschnitt 2 Die iQ-Check *Campylobacter*-Technologie

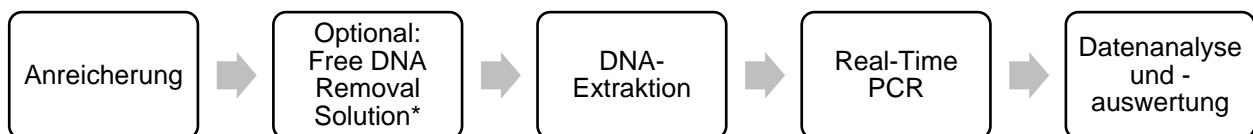
Das iQ-Check *Campylobacter* Kit ist ein Test, der auf der Amplifizierung und dem Nachweis von Genen mittels Real-Time PCR beruht. Die gebrauchsfertigen PCR-Reagenzien im Kit enthalten Oligonukleotide (Primer und Sonden), die für *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* spezifisch sind, sowie DNA-Polymerase 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 *Campylobacter*-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 mit der *Campylobacter* spp.-DNA-Zielsequenz mit einer spezifischen Sonde amplifiziert und durch einen zweiten Fluorophor nachgewiesen.

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



\* Die Verwendungsbedingungen sind dem Anwenderhandbuch für die iQ-Check Free DNA Removal Solution (Katalog-Nr. 10000058391) zu entnehmen.

## Abschnitt 3

### Zusammensetzung des Kits

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

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

## Abschnitt 4

### Haltbarkeit und Lagerung

Nach dem Erhalt muss das Kit bei +2°C bis 8°C aufbewahrt werden. Bei Aufbewahrung bei dieser Temperatur können die Reagenzien bis zu dem auf 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/oder 95 – 100°C
- Speziell für die Extraktion in einer Deep Well-Platte
  - Thermoshaker mit Heizfunktion\*, der eine Temperatur von 37 ± 2°C und/oder 95 – 100°C aufrecht erhalten kann, mit einer Mischgeschwindigkeit von mindestens 1.300 rpm
- Vortex
- Mikropipetten für 20 µl, 200 µl, 1.000 µl
- Bio-Rad Real-Time PCR-System,\* zum Beispiel das Real-Time PCR-System CFX96 Touch Deep Well (Katalog-Nr. 3600037) oder CFX Opus Deepwell (Katalog-Nr. 17007991)
- iQ-Check Prep System von Bio-Rad für die automatisierte DNA-Extraktion und PCR-Plattenvorbereitung (Katalog-Nr. 3594911)

## Abschnitt 5 Zusätzlich benötigtes Material

**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: Bolton-Nährbouillon, mit Supplementen oder doppelt konzentriert, ohne Blut
- Anreicherungsmedium: Gepuffertes Peptonwasser (z. B. BPW Plus Katalog-Nr. 3564684, dehydratisiert, 500 g; 3554179, 6 Flaschen x 225 ml; 3555790, 2 Beutel x 5 L; 3555795, 4 Beutel x 3 L. BPW Standard Katalog-Nr. 12013259, dehydratisiert, 500 g; 12013258 dehydratisiert, 5 kg; 12013260 2 Beutel x 5 L)
- Anreicherungsmedium: Hunt Nährlösung, hergestellt nach Herstellerempfehlung
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (Lösung zur Entfernung von freier DNA, Katalog-Nr. 3594970)
- iQ-Check Reinigungsreagenz (Katalog-Nr. 12012383)
- RAPID'*Campylobacter* Agar (Katalog-Nr. 12012036, 20 Agarplatten x 90 mm; 3564295, dehydriertes Basismaterial, 500 g; 3564296, Supplement, 10 Fläschchen)
- Speziell für die Untersuchung von Umgebungsproben
  - Schwämme zur Gewinnung von Umweltproben
  - Neutralisierungsmedium für Probennahme-Schwämme, z. B. Dey-Engley (D/E) oder HiCap Neutralizing Broth oder Letheen Broth
- Speziell für die Extraktion in Röhrcchen
  - Konische, sterile 1,5 ml Röhrcchen 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 Verdünnungsbehältnis (Katalog-Nr. 12014473)
  - Filterspitzen (Katalog-Nr. 12014486, 5.760 x 50 µl; Katalog-Nr. 12014483, 3.840 x 1.000 µl)
  - PCR Mix-Röhrcchen (Katalog-Nr. 12016673, 25 x 5 ml)
- PCR-Platten, -Röhrcchen, -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 Teströhrcchen
- 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.
  - 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 Röhrchendeckeln 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 *Campylobacter* 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.

## Abschnitt 7 Protokoll

- 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 oder CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Nachweissystem
  - Die unsachgemäße Verwendung des CFX96 Touch Deep Well oder CFX Opus Deepwell 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 oder CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Nachweissystem nur von qualifiziertem Laborpersonal bedient werden, das entsprechend geschult wurde. Die Instrumente dürfen nur von Kundendiensttechnikern im Außendienst gewartet werden.
- Anreicherung
  - Der Benutzer sollte alle Sicherheitsinformationen in der Anweisung des iQ-Check *Campylobacter* Kits lesen, verstanden haben und beachten. 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.
  - *Campylobacter* 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 vor Ort geltende Entsorgungsvorschriften sind im Sicherheitsdatenblatt aufgeführt.

## Abschnitt 7 Protokoll

### A. Probenanreicherung

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

Das Anreicherungsmedium muss vor der Verwendung die geeignete Inkubationstemperatur (20–25 °C) aufweisen.

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

| AOAC PTM 031209   |  |   |
|---|--|---|
| Umfang (Matrizes)                                       | Probenvorbereitung   | Anreicherung/DNA-Extraktion   |
| Rohes gemahlene Hühnerfleisch                           | $n$ g Probe in $9 \times n$ ml angereicherter Bolton Nährlösung homogenisieren   | <b>Easy I-Extraktion</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>4 Stunden bei <math>37 \pm 1</math> °C unter mikroaeroben Bedingungen inkubieren</li> <li>Weitere 20 Stunden bei <math>41,5 \pm 1</math> °C unter mikroaeroben Bedingungen inkubieren</li> <li>Röhrchen/Deep Well-Format</li> </ul> |
| Spülung der Hühnerknochen und Schwamm mit Hühnerknochen | $n$ g Lebensmittelerzeugnis in $9 \times n$ ml 2x blutfreie Bolton Anreicherungs-Nährlösung (BF-BEB) homogenisieren  | <b>Easy I-Extraktion</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>24 Stunden bei <math>42 \pm 1</math> °C unter mikroaeroben Bedingungen inkubieren</li> <li>Röhrchen/Deep Well-Format</li> </ul>   |
| Rohes gemahlene Hühnerfleisch                           | 325 g rohes Hühnerfleisch in 1.625 ml BPW homogenisieren. 30 ml der homogenisierten Probe zu 30 ml Hunt Nährlösung geben und mischen   | <b>Easy I-Extraktion</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>22-26 Stunden bei <math>42 \pm 1</math> °C unter mikroaeroben Bedingungen inkubieren</li> <li>Röhrchen/Deep Well-Format</li> </ul>  |
| Spülung der Geflügelprobe                               | 30 ml der gespülten Geflügelprobe in 30 ml Hunt Nährlösung homogenisieren  | <b>Easy I-Extraktion</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>22-26 Stunden bei <math>42 \pm 1</math> °C unter mikroaeroben Bedingungen inkubieren</li> <li>Röhrchen/Deep Well-Format</li> </ul>  |
| Schwamm mit Hühnerknochen                               | 25 ml Hunt Nährlösung zum Schwamm mit 25 ml Transportmedium geben  | <b>Easy I-Extraktion</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>22-26 Stunden bei <math>42 \pm 1</math> °C unter mikroaeroben Bedingungen inkubieren</li> <li>Röhrchen/Deep Well-Format</li> </ul>  |
| Umfang (Matrizes)                                       | Probenvorbereitung   | Anreicherung/DNA-Extraktion   |
| Schwamm zur Gewinnung von Umweltproben                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Schwämme mit einer neutralisierenden Nährlösung befeuchten, die keinen Arylsulfonatkomplex enthält.</li> <li>20 ml BPW plus 30 ml Hunt Nährlösung in den Beutel mit dem Schwamm geben</li> <li>Schwammproben vor der Inkubation durch 30 sec langes Stampfen oder Massieren mit der Hand homogenisieren</li> <li>Schwammproben im Röhrchen durch kräftiges Schütteln oder Vortexen für 10 sec homogenisieren</li> </ul> | <b>Easy I-Extraktion</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>22-26 Stunden bei <math>42 \pm 1</math> °C unter mikroaeroben Bedingungen inkubieren</li> <li>Röhrchen/Deep Well-Format</li> </ul>  |
| Lebensmittelerzeugnis-Proben                            | $n$ g Lebensmittelerzeugnis in $9 \times n$ ml angereicherter Bolton Nährlösung homogenisieren   | <b>Easy I-Extraktion</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Für 4 Stunden bei <math>37 \pm 1</math> °C inkubieren</li> <li>Weitere 20 Stunden bei <math>41,5 \pm 1</math> °C unter mikroaeroben Bedingungen inkubieren</li> <li>Röhrchen/Deep Well-Format</li> </ul>                            |
| Exkremete   | $n$ g Exkremete in $1 \times n$ ml angereicherter Bolton Nährlösung homogenisieren   | <b>Easy I-Extraktion</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Direkter Nachweis (keine Anreicherung notwendig)</li> <li>Röhrchen/Deep Well-Format</li> </ul>  |

## B. Behandlung zur Entfernung freier DNA

Die iQ-Check Free DNA Removal Solution ist speziell dafür vorgesehen, freie DNA zu entfernen. Es sind die Empfehlungen von Bio-Rad im Anwenderhandbuch zu beachten (Dokument-Nr. 1000058391).

## C. DNA-Extraktion

Allgemeine Empfehlungen:

1. Den Heizblock oder den Thermoshaker zum Vorheizen einschalten, bevor mit dem Test begonnen wird. Auf 95–100°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. Das Lysereagenz pipettieren, während es bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt wird (Magnetrührstab befindet sich in der Flasche), damit es in Suspension bleibt.

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 vorpunktierter Abdichtungsfolie verschließen.
5. Die Röhrchen 15 bis 20 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.  
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.

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 PCR-Platte oder der PCR-Röhrchenstreifens 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. Auf die korrekte Ausrichtung der Platte achten, d. h. das Well A1 muss sich oben links befinden. 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. Vor der Freigabe der Ergebnisse sollten die typischen Charakteristika der Amplifikationskurven verifiziert werden. Wenn zusätzlicher Support gewünscht wird, ist der technische Kundendienst von Bio-Rad zu kontaktieren.

### Kontrollen

## Abschnitt 7 Protokoll

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.

|                  | <b><i>Campylobacter</i>-Nachweis<br/>(FAM)</b> | <b>Nachweis der internen Kontrolle<br/>(HEX-Kanal)</b> |
|------------------|--|--|
| Negativkontrolle | Cq = N/A*                                      | $28 \leq Cq \leq 40$                                   |
| Positivkontrolle | $26 \leq Cq \leq 36$                           | Nicht signifikant                                      |

\* Die Software gibt als Cq-Wert 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

Ein positiver iQ-Check *Campylobacter* PCR-Test muss eine typische Amplifikationskurve und für den FAM-Fluorophor einen Cq-Wert von  $\geq 10$  ergeben.

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

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

- Die Probe gilt als **negativ** auf *Campylobacter*, wenn kein Cq-Wert für FAM vorliegt und die interne Kontrolle einen Cq-Wert  $\geq 28$  aufweist.
- Falls auch für die interne Kontrolle kein Cq-Wert vorliegt (Cq = N/A), bedeutet dies, dass die PCR-Reaktion vermutlich gehemmt war. Die Probe muss verdünnt (mit 10  $\mu$ l DNA-Extrakt eine 1:10-Verdünnung in destilliertem sterilem Wasser durchführen und dann 5  $\mu$ l der Verdünnung testen) und die PCR wiederholt werden.
- Falls der Cq-Wert für die interne Kontrolle  $< 28$  liegt, ist keine Interpretation des Ergebnisses möglich. Es ist zu überprüfen ob der Schwellenwert korrekt platziert wurde oder ob es sich bei der Kurve aus den Rohdaten um eine normale Amplifikationskurve handelt. Wenn die Kurve keine charakteristische Form aufweist, muss der PCR-Test wiederholt werden.

Die Interpretation der Probenergebnisse ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

| <b><i>Campylobacter</i>-Nachweis<br/>(FAM-Kanal)</b> | <b>Nachweis der internen Kontrolle<br/>(HEX-Kanal)</b> | <b>Auswertung</b> |
|--|--|-------------------|
| Cq $\geq 10$   | Nicht signifikant                                      | Positiv           |
| Cq = N/A   | Cq $\geq 28$   | Negativ           |
| Cq = N/A   | Cq = N/A   | Hemmung*          |

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

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 *Campylobacter*-Ergebnis gilt als vermutlich positiv, und es wird die Bestätigung mit einer geeigneten Referenzmethode empfohlen. Es kann auch das chromogene RAPID' *Campylobacter* Medium verwendet werden.

Im Rahmen der AOAC-Validierung ist ein positives iQ-Check *Campylobacter*-Ergebnis als positiv zu betrachten und es wird die Bestätigung mit einer geeigneten Referenzmethode (z. B. USDA MLG) empfohlen. Alternativ können 10 µl der angereicherten Hunt-Nährlösung direkt auf den RAPID' *Campylobacter*-Agar gestreut und für 48 ± 2 Stunden bei 42 ± 1 °C unter mikroaeroben Bedingungen inkubiert werden.

## Abschnitt 9

### Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit

Das iQ-Check *Campylobacter* Kit kann auch zum Bestätigen isolierter *Campylobacter*-Kolonien auf Agarplatten verwendet werden. Dies wurde im Rahmen der AFNOR-Zertifizierung auf dem chromogenen RAPID' *Campylobacter* Medium offiziell validiert.

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 Mikrozentrifugenröhrchen resuspendieren. Auf dem Vortex homogenisieren.
3. 5 µl der Suspension zu 45 µl PCR-Reaktionsgemisch geben (siehe Abschnitt 7 Protokoll D. Real-Time PCR), und zur Daten- und Ergebnisinterpretation die übrigen Schritte des iQ-Check *Campylobacter*-Protokolls befolgen. Eine DNA-Extraktion ist nicht erforderlich.

## Abschnitt 10

### Testleistung und Testvalidierung



#### AOAC-Validierung

Das iQ-Check *Campylobacter* Kit wurde vom AOAC Research Institute im Rahmen des Performance Tested Method Program für den Nachweis von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* aus rohem, gemahlenem Hühnerfleisch, Spülung von Hühnerknochen und Schwämmen mit Putenknochen unter Verwendung des CFX96 Touch Deep Well und CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Systeme für alle Proben validiert. Die zugehörige Software ist die CFX Manager IDE-Software (ab Version 2.2). Ein positives Ergebnis mit dem iQ-Check Kit ist als vorläufig positiv zu betrachten und sollte mit Standardreferenzmethoden bestätigt werden (siehe Abschnitt 8).  
Zertifikatnummer: 031209

## Abschnitt 11 Literatur

ISO 10272-1 Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von *Campylobacter* spp. - Teil 1: Nachweisverfahren.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2022). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 41.07. Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples

## Abschnitt 12 Revisionshistorie

| Freigabedatum | Dokumentnummer    | Änderung  |
|---------------|-------------------|---|
| August 2020   | 10000131520 Ver A | <ul style="list-style-type: none"><li>- Neues Dokumentdesign und Aktualisierung des Inhalts</li><li>- Änderung der Dokumentnummer - vorhergehende Version 881039 REV G</li></ul>  |
| April 2023    | 10000131520 Ver B | <ul style="list-style-type: none"><li>- Allgemeine inhaltliche Aktualisierungen</li><li>- AOAC-Erweiterung: Hunt Nährlösung und CFX Opus Deepwell PCR System</li><li>- Protokollabschnitt durch Übersichtstabelle ersetzt</li></ul> |

## 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](http://bio-rad.com/iqcheck).

BIO-RAD ist eine Marke der Bio-Rad Laboratories, Inc.

iQ-CHECK ist in bestimmten Ländern eine Marke der Bio-Rad Europe GmbH.

Alle hier genannten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.



**Bio-Rad  
Laboratories, Inc.**

Life Science  
Group

---

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

---

---

# iQ-Check *Campylobacter* Kit

## Manuale utente

Test per la rilevazione mediante PCR real-time di *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, e *Campylobacter lari* in prodotti alimentari e campioni ambientali

Catalogo #3578135



# Indice

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Sezione 1  | Introduzione.....  | 1  |
| Sezione 2  | La tecnologia iQ-Check <i>Campylobacter</i> .....                              | 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.....  | 5  |
|            | A. Arricchimento del campione .....  | 5  |
|            | B. Trattamento per la rimozione del DNA libero .....                           | 6  |
|            | C. Estrazione del DNA .....  | 6  |
|            | D. PCR real-time .....   | 7  |
|            | E. Analisi dei dati .....  | 8  |
| Sezione 8  | Conferma dei risultati positivi.....   | 10 |
| Sezione 9  | Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check .....                      | 10 |
| Sezione 10 | Prestazioni del test e validazione .....                                       | 11 |
| Sezione 11 | Riferimenti .....  | 11 |
| Sezione 12 | Cronologia delle revisioni .....   | 11 |
|            | Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR .....                        | 12 |

## Sezione 1 Introduzione

Il *Campylobacter* è risultato essere uno delle cause più frequenti della gastroenterite. Il *C. jejuni* e, in misura minore, il *C. coli* e il *C. lari* sono le specie batteriche più comunemente associate all'infezione. I batteri sono commensali nel tratto intestinale di bovini, pecore, maiali e uccelli, e di conseguenza gli alimenti di origine animale possono essere contaminati. La maggior parte delle infezioni da *Campylobacter* viene contratta con il consumo di acqua contaminata, carne cruda, latte non adeguatamente pastorizzato e carni poco cotte, in particolare il pollame. La dose infettante di *Campylobacter* è ritenuta essere inferiore a 500 cellule. I metodi batteriologici convenzionali per la rilevazione di *Campylobacter* sono spesso lunghi e noiosi. Il kit iQ-Check *Campylobacter* real-time PCR è un test semplice e rapido che consente di rilevare la presenza di batteri nei prodotti alimentari e nei campioni ambientali.

## Sezione 2 La tecnologia iQ-Check *Campylobacter*

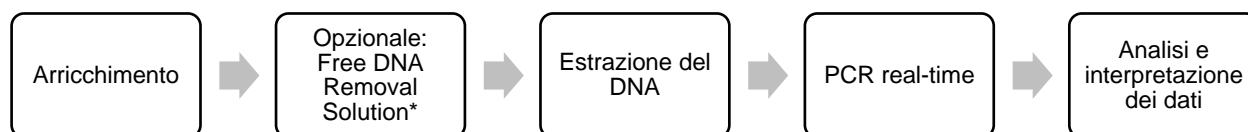
Il kit iQ-Check *Campylobacter* è un test basato sull'amplificazione genica e la rilevazione mediante PCR real-time. I reagenti PCR pronti all'uso inclusi nel kit contengono oligonucleotidi (primer e sonde) specifici per *C. jejuni*, *C. coli*, e *C. lari*, oltre a DNA polimerasi e nucleotidi. La rilevazione 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 *Campylobacter*. 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 target di DNA di *Campylobacter* spp. e viene rilevato da un secondo fluoroforo.

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



\* 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 *Campylobacter* contiene reagenti a sufficienza per l'esecuzione di 96 test (94 campioni).

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

## Sezione 4

### Durata e conservazione

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

## Sezione 5

### Materiali necessari ma non forniti

#### Apparecchiatura

- 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/o 95–100°C
- Materiali specifici per l'estrazione in una piastra Deep Well
  - Termoagitatore\* in grado di mantenere 37 ± 2°C e/o 95–100°C con una velocità di miscelazione di almeno 1300 rpm
- Vortex
- Micropipette da 20, 200, e 1.000 µl
- Sistema PCR real-time di Bio-Rad, ad esempio, i sistemi PCR real-time CFX96 Touch Deep Well (catalogo #3600037) o CFX Opus Deepwell (catalogo #17007991)
- Sistema Bio-Rad iQ-Check Prep per l'estrazione automatizzata di DNA e la preparazione della piastra PCR (catalogo #3594911)

**Nota:** Con il termociclature 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: brodo Bolton, supplementato o a doppia concentrazione senza sangue
- Terreno di arricchimento: acqua peptonata tamponata (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. BPW Standard catalogo #12013259, in forma disidratata, 500 g; 12013258 in forma disidratata, 5 kg; 12013260 5 L x 2 sacche)
- Terreno di arricchimento: Hunt Broth, preparato secondo le raccomandazioni del produttore
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalogo #3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (catalogo #12012383)
- Agar RAPID' *Campylobacter* (catalogo #12012036, 90 mm x 20 piastre; 3564295, base disidratata, 500 g; 3564296, supplemento, 10 fiale)
- Materiali specifici per campioni ambientali
  - Spugne ambientali
  - Brodo neutralizzante per spugne come Dey-Engley (D/E), HiCap Neutralizing Broth, o Lethen Broth
- Materiali specifici per l'estrazione in provette
  - Provette coniche sterili con tappo a vite da 1,5 ml (ad esempio, catalogo #2240110XTU)
- Materiali specifici per l'estrazione in una piastra Deep Well
  - 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)
- Materiali specifici per il sistema iQ-Check Prep
  - Contenitore per la diluizione da 60 ml (catalogo #12014473)
  - Puntali con filtro (catalogo #12014486, 50 µl x 5.760; 12014483, 1.000 µl x 3.840)
  - Provette per miscela di PCR (catalogo #12016673, 5 ml x 25)
- 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
  - 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)
- Kit iQ-Check *Campylobacter*
  - 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
- Sistema iQ-Check Prep
  - L'utilizzo improprio del sistema iQ-Check Prep potrebbe causare lesioni personali o danni allo strumento. Se manipolati in modo improprio, alcuni componenti potrebbero presentare un

rischio di lesioni personali dovuto al calore eccessivo. Per garantire sicurezza, il sistema iQ-Check Prep deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato e opportunamente addestrato. La manutenzione dello strumento deve essere eseguita esclusivamente da tecnici Bio-Rad

- Sistema di rilevazione mediante PCR real-time CFX96 Touch Deep Well o CFX Opus Deepwell
  - 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 *Campylobacter*. 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
  
  - *Campylobacter* 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

### A. Arricchimento del campione

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

I terreni di arricchimento devono essere mantenuti alla temperatura di incubazione opportuna (20–25 °C) prima dell'utilizzo.

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

**AOAC PTM 031209**

| <b>Oggetto (matrici)</b>                    | <b>Preparazione dei campioni</b>  | <b>Arricchimento/Estrazione del DNA</b>  |
|---|---|--|
| Pollo macinato crudo                        | Omogeneizzare <i>n</i> g di campione in 9 x <i>n</i> ml di Bolton Broth supplementato   | <b>Estrazione Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 4 hr a 37 ± 1°C in condizioni microaerobiche</li> <li>▪ Incubare per ulteriori 20 hr a 41,5 ± 1°C in condizioni microaerobiche</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul> |
| Risciacqui di carcasse e spugna di carcassa | Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 9 x <i>n</i> ml di un doppio brodo di arricchimento Bolton senza sangue (BF-BEB)   | <b>Estrazione Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 24 hr a 42 ± 1°C in condizioni microaerobiche</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>  |
| Pollo macinato crudo                        | Omogeneizzare 325 g di manzo di crudo in 1.625 ml di acqua peptonata tamponata (BPW). Aggiungere 30 ml di campione omogeneizzato a 30 ml di Hunt Broth e miscelare  | <b>Estrazione Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 22-26 hr a 42 ± 1°C in condizioni microaerobiche</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>   |
| Risciacquo di pollame                       | Omogeneizzare 30 ml di risciacquo di pollame in 30 ml di Hunt Broth   | <b>Estrazione Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 22-26 hr a 42 ± 1°C in condizioni microaerobiche</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>   |
| Spugna di carcassa                          | Aggiungere 25 ml di Hunt Broth per idratare la spugna con 25 ml di mezzo di trasporto   | <b>Estrazione Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 22-26 hr a 42 ± 1°C in condizioni microaerobiche</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>   |
| <b>Oggetto (matrici)</b>                    | <b>Preparazione dei campioni</b>  | <b>Arricchimento/Estrazione del DNA</b>  |
| Spugna ambientale                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inumidire le spugne con un brodo neutralizzante che non contenga un complesso di aril solfonato</li> <li>▪ Aggiungere 20 ml di BPW oltre a 30 ml di Hunt Broth nella sacca contenente la spugna</li> <li>▪ Omogeneizzare i campioni di spugna prima dell'incubazione con l'apposito strumento stomacher oppure massaggiando manualmente per 30 sec</li> <li>▪ Omogeneizzare i campioni di tamponi nella provetta agitando vigorosamente o nel vortex per 10 secondi</li> </ul> | <b>Estrazione Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 22-26 hr a 42 ± 1°C in condizioni microaerobiche</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>   |
| Campioni alimentari                         | Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 9 x <i>n</i> ml di Bolton Broth supplementato  | <b>Estrazione Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 4 hr a 37 ± 1°C</li> <li>▪ Incubare per ulteriori 20 hr a 41,5 ± 1°C in condizioni microaerobiche</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>                              |
| Feci  | Omogeneizzare <i>n</i> g di feci in 1 x <i>n</i> ml di Bolton Broth supplementato   | <b>Estrazione Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Determinazione diretta</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>  |

## B. Trattamento per la rimozione del DNA libero

Il prodotto iQ-Check Free DNA Removal Solution rappresenta un metodo ottimale per la rimozione del DNA libero. Seguire le raccomandazioni di Bio-Rad contenute nel manuale d'uso (documento #10000058391)

## 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 95-100°C. Durante il pipettaggio, mantenere in sospensione il reagente di lisi agitando a media velocità su una piastra di agitazione magnetica.

## Sezione 7 Protocollo

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.
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 mediante la barra magnetica contenuta nel flacone.

### 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 a pozzetti profondi con la pellicola sigillante preforata.
5. Incubare le provette nel blocco termico a 95-100°C per 15–20 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. 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. Utilizzare la tabella relativa al pipettaggio riportata nell'Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR per verificare i corretti volumi da impiegare per ogni reagente.

Nota: Utilizzare la miscela di PCR (reagenti 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 PCR o le strip delle provette. 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 correttamente, con il pozzetto A1 rivolto all'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. È necessario eseguire una verifica delle caratteristiche tipiche della curva di amplificazione prima di rilasciare i risultati. Nel caso in cui sia necessario ulteriore supporto, contattare il proprio team di supporto tecnico Bio-Rad.

### Controlli

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

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

|                    | Rilevazione di <i>Campylobacter</i><br>(FAM) | Rilevazione controllo interno<br>(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 test di iQ-Check *Campylobacter* positivo deve mostrare una curva di amplificazione tipica e un valore  $Cq \geq 10$  per il fluoroforo FAM.

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

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

- Questo campione viene considerato come campione **negativo** a *Campylobacter* se non esiste un valore  $Cq$  per il canale FAM e il controllo interno ha un valore  $Cq \geq 28$
- Se il controllo interno non presenta a sua volta un valore  $Cq$  ( $Cq = N/A$ ), ciò indica probabilmente un'inibizione della reazione PCR. È necessario diluire il campione (mediante 10  $\mu$ l di estratto di DNA, eseguire una diluizione 1:10 in acqua distillata sterile, quindi analizzare 5  $\mu$ l della diluizione) e ripetere la reazione PCR
- Se il valore  $Cq$  per il controllo interno è  $< 28$ , l'interpretazione del risultato non sarà possibile. Verificare che la soglia sia posizionata correttamente o che la curva dei dati non elaborati sia una curva di amplificazione regolare. Se la curva non possiede una forma caratteristica, sarà necessario ripetere il test PCR.

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

| Rilevazione di <i>Campylobacter</i><br>(canale FAM) | Rilevazione controllo interno<br>(canale HEX) | Interpretazione |
|---|---|-----------------|
| $Cq \geq 10$  | Non significativo                             | Positivo        |
| $Cq = N/A$  | $Cq \geq 28$                                  | Negativo        |
| $Cq = N/A$  | $Cq = N/A$                                    | Inibizione*     |

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

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

## Sezione 8

### Conferma dei risultati positivi

Il risultato positivo di iQ-Check *Campylobacter* si considera presuntivo, ed è raccomandata la conferma in conformità a un metodo di riferimento opportuno. Possono essere utilizzati anche i terreni cromogenici RAPID' *Campylobacter*.

Nell'ambito della validazione AOAC, un risultato positivo di iQ-Check *Campylobacter* deve essere considerato come presunto, si raccomanda pertanto di ottenere la conferma tramite un opportuno metodo di riferimento (ad esempio USDA MLG). In alternativa, strisciare 10 µl di Hunt Broth arricchito direttamente sull'agar su RAPID' *Campylobacter* e incubare per  $48 \pm 2$  hr a  $42 \pm 1^\circ\text{C}$  in condizioni microaerobiche.

## Sezione 9

### Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check

Il kit iQ-Check *Campylobacter* può essere utilizzato anche per la conferma di singole colonie isolate di *Campylobacter* su agar. Quanto segue è ufficialmente validato dal certificato AFNOR in materia di terreni cromogenici RAPID' *Campylobacter*.

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

## Sezione 10 Prestazioni del test e validazione



### Validazione AOAC

Il kit iQ-Check *Campylobacter* è stato validato dall'AOAC Research Institute nell'ambito del programma Performance Tested Methods per la rilevazione di *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* in pollo macinato crudo, risciacqui di carcasse di pollo e spugne di tacchino con l'uso dei sistemi PCR real-time CFX96 Touch Deep Well e CFX Opus Deepwell, convalidati per tutti i campioni. Il software associato è CFX Manager Software IDE (versione 2.2 e successive). Un risultato positivo con iQ-Check deve essere considerato come presunto, si raccomanda pertanto di ottenere la conferma tramite metodi standard di riferimento (vedere Sezione 8). Numero di certificato: 031209

## Sezione 11 Riferimenti

ISO 10272-1 Microbiologia della catena alimentare – Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di *Campylobacter* spp. – Parte 1: Metodo per la ricerca

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2022). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 41.07. Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples

## Sezione 12 Cronologia delle revisioni

| Data di pubblicazione | Numero di documento | Modifica  |
|-----------------------|---------------------|---|
| Agosto 2020           | 10000131520 Ver A   | <ul style="list-style-type: none"><li>- Nuova struttura del documento e aggiornamento del contenuto</li><li>- Modifica al numero di documento – versione precedente 881039 REV G</li></ul>  |
| Aprile 2023           | 10000131520 Ver B   | <ul style="list-style-type: none"><li>- Aggiornamenti generali dei contenuti</li><li>- Estensione AOAC: Hunt Broth e sistema PCR CFX Opus Deepwell</li><li>- Sostituita sezione del protocollo con tabella di riepilogo</li></ul> |

## 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](http://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  
Laboratories, Inc.**

Life Science  
Group

---

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

---

---

# iQ-Check *Campylobacter* Kit

## Guia do usuário

Teste para a detecção da PCR em tempo real da *Campylobacter jejuni*,  
*Campylobacter coli*, e *Campylobacter lariem* alimentos e amostras ambientais

Nº do catálogo 3578135



# Índice

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Seção 1  | Introdução .....  | 1  |
| Seção 2  | Tecnologia iQ-Check <i>Campylobacter</i> .....                        | 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 .....   | 8  |
| Seção 8  | Confirmação de Resultados Positivos .....                             | 10 |
| Seção 9  | Confirmação de Colônias Únicas usando o Kit iQ-Check .....            | 10 |
| Seção 10 | Desempenho e Validação do Teste.....                                  | 11 |
| Seção 11 | Referências .....   | 11 |
| Seção 12 | Histórico de Revisão .....  | 11 |
|          | Apêndice - Guia de Cálculo da Mistura de PCR.....                     | 12 |

## Seção 1 Introdução

A *Campylobacter* destacou-se como a mais frequente causa de gastroenterite. *AC. jejuni* e, com menos frequência, a *C. coli* e a *C. lari* são as espécies mais comumente identificadas com a infecção. As bactérias são comensais do trato intestinal do gado, das ovelhas, dos porcos e dos pássaros. Consequentemente, o alimento de origem animal pode ser infectado. A maioria das infecções por *Campylobacter* são adquiridas através do consumo de água contaminada, leite cru e inadequadamente pasteurizado e carne malpassada, especialmente de aves. Acredita-se que a dosagem infecciosa de *Campylobacter* é bem baixa, em torno de 500 células. Os métodos bacteriológicos convencionais para a detecção do *Campylobacter* são, muitas vezes, longos e entediados. O kit de PCR em tempo real iQ-Check *Campylobacter* é um teste rápido simples, que permite a detecção de bactérias em alimentos e amostras ambientais.

## Seção 2 Tecnologia iQ-Check *Campylobacter*

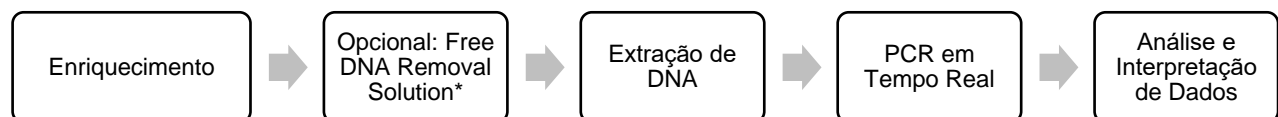
O kit iQ-Check *Campylobacter* é um teste baseado na amplificação e detecção genética através de PCR em tempo real. Os reagentes de PCR prontos para uso do kit contêm oligonucleotídeos (iniciadores e sondas) específicos para *C. jejuni*, *C. coli*, and *C. lari*, bem como DNA polimerase e nucleotídeos. 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 *Campylobacter*. 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 *Campylobacter* spp., e é detectado por um segundo fluoróforo.

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



\* 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 *Campylobacter* contém reagentes suficientes para 96 testes (94 amostras).

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

## Seção 4

### Prazo de validade e armazenamento

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

## Seção 5

### Materiais necessários, mas não fornecidos

#### Equipamento

- Liquidificador de laboratório para homogeneizar amostras de teste
- Incubadora para enriquecimento microbiológico de amostras
- Específico para extração em tubos estéreis de tampa de rosca cônica de 1,5 ml
  - Centrífuga de bancada capaz de 10.000–12.000 x g
  - Bloco para banho seco a 37 ± 2 °C e/ou 95–100°C
- Específico para extração em placa Deep Well
  - Termocortador de aquecimento\* capaz de manter 37 ± 2 °C e/ou 95–100 °C, com uma velocidade de mistura de pelo menos 1.300 rpm
- Vortexer
- Micropipetas de 20, 200 e 1.000 µl
- Sistema de PCR em tempo real da Bio-Rad\*; por exemplo, os sistemas de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well (nº do catálogo 3600037) ou CFX Opus Deepwell (nº do catálogo 17007991)
- 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: Caldo Bolton sem sangue, concentração dupla ou suplementado
- Meio de enriquecimento: Água peptonada tamponada (por exemplo, BPW Plus nº no catálogo 3564684, desidratado, 500 g, 3554179, 6 frascos de 225 ml, 3555790, 2 sacos de 5 L, 3555795, 4 sacos de 3 L. BPW Standard, nº no catálogo 12013259, desidratado, 500 g, 12013258 desidratado, 5 kg, 12013260 5 L x 2 sacos)
- Meio de enriquecimento: Caldo Hunt, preparado de acordo com a recomendação do fabricante
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (nº do catálogo 3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (nº do catálogo 12012383)
- RAPID' *Campylobacter* Agar (12012036, 90 mm x 20 placas, 3564295, base desidratada, 500 g, 3564296, suplemento, 10 ampolas)
- Específico para amostras ambientais
  - Esponjas ambientais
  - Caldo neutralizante para esponjas, como Dey-Engley (D/E) ou HiCap Neutralizing Broth ou Letheen 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 uma 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 System
  - Recipiente de diluição de 60 ml (nº do catálogo 12014473)
  - Pontas de filtro (nº do catálogo 12014486, 50 µl x 5.760; 12014483, 1.000 µl x 3.840)
  - Tubos de mistura de PCR (nº do catálogo 12016673, 5 ml x 25)
- 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 Combipip 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
  - 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.)
- Kit iQ-Check *Campylobacter*
  - 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

## Seção 6

o contato dos olhos com o produto, enxágue os olhos abertos por vários minutos em água corrente. Se os produtos forem ingeridos, provoque vômito e procure ajuda médica

- Sistema iQ-Check Prep System
  - O uso inadequado do sistema iQ-Check Prep pode causar ferimentos ou danos ao instrumento. Alguns componentes podem representar um risco de ferimentos pessoais devido ao calor excessivo, se manuseados incorretamente. Para uso seguro, o sistema iQ-Check Prep deve ser operado somente por pessoal qualificado do laboratório que tenha sido treinado adequadamente. A manutenção do instrumento deve ser realizada apenas pelos engenheiros de serviço de campo da Bio-Rad
- Sistemas de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well ou CFX Opus Deepwell
  - O uso inadequado do Sistema de PCR em tempo real ou CFX96 Opus Deepwell 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 *Campylobacter*. Guarde as instruções de segurança para referência futura. Para reduzir os riscos associados à exposição a produtos químicos e riscos biológicos, realize testes de patógenos em um laboratório devidamente equipado, sob o controle de pessoal treinado. Sempre siga as práticas padrão de segurança do laboratório, incluindo o uso de vestuário de proteção e proteção ocular adequados ao manusear reagentes e amostras contaminadas. Evite o contato com o conteúdo do meio de enriquecimento e dos tubos de reagentes após a amplificação. Descarte amostras enriquecidas de acordo com as normas atuais do setor
  - O *Campylobacter* 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

### A. Enriquecimento da amostra

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

O meio de enriquecimento deve estar na temperatura de incubação adequada (20–25°C) antes de uso.

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

| AOAC PTM 031209                          |   |  |
|--|---|--|
| Escopo (Matrizes)                        | Preparação da amostra   | Enriquecimento/Extração de DNA   |
| Frango moído cru                         | Homogeneize <i>n</i> g de amostra em 9 x <i>n</i> ml de caldo Bolton suplementado   | <b>Extração Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incube por 4 horas a 37 ± 1°C em condições microaeróbicas</li> <li>▪ Incube por mais 20 horas a 41,5 ± 1°C em condições microaeróbicas</li> <li>▪ Formato de tubo/poço profundo</li> </ul> |
| Enxágues de carcaça e esponja de carcaça | Homogeneize <i>n</i> g de alimento em 9 x <i>n</i> ml de caldo de enriquecimento Bolton sem sangue 2x (BF-BEB)  | <b>Extração Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incube por 24 horas a 42 ± 1°C em condições microaeróbicas</li> <li>▪ Formato de tubo/poço profundo</li> </ul>   |
| Frango moído cru                         | Homogeneize 325 g de aves cruas em 1.625 ml de BPW. Adicione 30 ml de amostra homogeneizada a 30 ml de caldo Hunt e misture   | <b>Extração Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 22-26 horas a 42 ± 1°C em condições microaeróbicas</li> <li>▪ Formato de tubo/poço profundo</li> </ul>   |
| Enxágue de aves                          | Homogeneize 30 ml de enxágue de aves em 30 ml de caldo Hunt   | <b>Extração Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 22-26 horas a 42 ± 1°C em condições microaeróbicas</li> <li>▪ Formato de tubo/poço profundo</li> </ul>   |
| Esponja de carcaça                       | Adicione 25 ml de caldo Hunt à esponja com 25 ml de meio de transporte  | <b>Extração Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 22-26 horas a 42 ± 1°C em condições microaeróbicas</li> <li>▪ Formato de tubo/poço profundo</li> </ul>   |
| Escopo (Matrizes)                        | Preparação da amostra   | Enriquecimento/Extração de DNA   |
| Esponja ambiental                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Umedeça as esponjas com um caldo neutralizante que não contenha complexo aril sulfonato</li> <li>▪ Adicione 20 ml de BPW mais 30 ml de caldo Hunt à bolsa que contém a esponja</li> <li>▪ Homogeneize as amostras de esponja antes da incubação por meio de estomia ou massagem manual por 30 segundos</li> <li>▪ Homogeneize as amostras de cotonete no tubo, agitando vigorosamente ou agitando em vórtex por 10 segundos</li> </ul> | <b>Extração Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 22-26 horas a 42 ± 1°C em condições microaeróbicas</li> <li>▪ Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>   |
| Amostras de alimentos                    | Homogeneize <i>n</i> g de alimento em 9 x <i>n</i> ml de caldo Bolton suplementado  | <b>Extração Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 4 horas a 37 ± 1°C</li> <li>▪ Incube por mais 20 horas a 41,5 ± 1°C em condições microaeróbicas</li> <li>▪ Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>                                |
| Fezes                                    | Homogeneize <i>n</i> g de fezes em 1 x <i>n</i> ml de caldo Bolton suplementado   | <b>Extração Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Detecção direta (sem necessidade de enriquecimento)</li> <li>▪ Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>  |

## B. Tratamento de remoção de DNA livre

A Solução de Remoção de DNA Livre iQ-Check fornece uma maneira ideal de remover DNA livre. Siga as recomendações da Bio-Rad no guia do usuário (nº do documento #10000058391).

## 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 °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 estiver mexendo em velocidade média com a barra magnética na garrafa, para mantê-la em suspensão.

Protocolo Easy I

1. Aliquote 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 15–20 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. 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 (reagentes 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 PCR ou tiras de tubo. 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 corretamente, 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 C<sub>q</sub> 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. Uma verificação das características típicas das curvas de amplificação deve ser realizada antes da liberação dos resultados. Entre em contato com a equipe de suporte técnico da Bio-Rad se for necessário suporte adicional.

## Controles

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

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

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

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

Se 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

Um teste de PCR positivo iQ-Check *Campylobacter* deve mostrar uma curva de amplificação típica e um valor de Cq  $\geq 10$  para o fluoróforo FAM.

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

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:

- Essa amostra é considerada **negativa** para *Campylobacter* spp. se não houver valor Cq no canal FAM e o controle interno tiver um valor Cq  $\geq 28$
- Caso o controle interno também não tenha um valor Cq (Cq = N/A), provavelmente isso indica a inibição da reação de PCR. A amostra precisa ser diluída (usando 10  $\mu$ l de extrato de DNA, realizar uma diluição de 1:10 em água estéril destilada e depois testar 5  $\mu$ l da diluição) e a PCR repetida
- Se o valor Cq para o controle interno for  $< 28$ , não será possível interpretar o resultado. Confirme se o limite foi corretamente colocado, ou se a curva, como dados brutos, é uma curva regular de amplificação. Caso a curva não apresente uma forma característica, será necessário repetir o teste de PCR.

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

| Detecção de <i>Campylobacter</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 do *Campylobacter* e do controle interno fornece um valor de Cq = N/A, a amostra deve ser diluída 1:10 e testada novamente.

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

## Seção 8

### Confirmação de Resultados Positivos

Um resultado positivo do iQ-Check *Campylobacter* é considerado positivo e a confirmação de acordo com um método de referência apropriado é recomendada. O meio cromogênico RAPID' *Campylobacter* também pode ser usado.

No contexto da validação da AOAC, um resultado positivo do iQ-Check *Campylobacter* deve ser considerado presumivelmente positivo e recomenda-se a confirmação de acordo com um método de referência apropriado (por exemplo, USDA MLG). Como alternativa, coloque 10 µl de caldo Hunt enriquecido diretamente no ágar RAPID' *Campylobacter* e incube por 48 ± 2 horas a 42 ± 1°C em condições microaeróbicas.

## Seção 9

### Confirmação de Colônias Únicas usando o Kit iQ-Check

O kit iQ-Check *Campylobacter* também pode ser usado para confirmar colônias isoladas de *Campylobacter* em meios de cultura de ágar. Isso é validado oficialmente pela Certificação AFNOR no meio cromogênico RAPID' *Campylobacter*.

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. Ressuspensa 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 do Protocolo 7, D. PCR em tempo real) e siga o restante do protocolo iQ-Check *Campylobacter* para a interpretação dos dados e resultados. A extração de DNA não é necessária.

## Seção 10

### Desempenho e Validação do Teste



#### Validação AOAC

O kit iQ-Check *Campylobacter* validado pelo AOAC Research Institute no âmbito do Performance Tested Method Program para a detecção de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* em frango cru moído, enxágues de carcaça de frango e esponjas de peru com o uso dos sistemas de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well e CFX Opus Deepwell, validados para todas as amostras. O software associado é o CFX Manager IDE Software (versão 2.2 e posterior). 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: 031209

## Seção 11

### Referências

ISO 10272-1 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration and of *Campylobacter* spp. - Part 1 Detection method

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2022). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 41.07. Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples

## Seção 12

### Histórico de Revisão

| Data de lançamento | Número do documento | Alteração   |
|--------------------|---------------------|---|
| Agosto de 2020     | 10000131520 Ver A   | <ul style="list-style-type: none"><li>- Novo design de documento e atualização de conteúdo</li><li>- Alteração do número do documento - versão anterior 881039 REV G</li></ul>  |
| Abril de 2023      | 10000131520 Ver B   | <ul style="list-style-type: none"><li>- Atualizações do conteúdo geral</li><li>- Extensão AOAC: Caldo Hunt e sistema de PCR CFX Opus Deepwell</li><li>- Seção de protocolo substituída por tabela de resumo</li></ul> |

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

---

---

# iQ-Check *Campylobacter* Kit

## Manual del usuario

**Análisis de detección por PCR en tiempo real de *Campylobacter jejuni*,  
*Campylobacter coli*, y *Campylobacter lari* en muestras alimentarias y ambientales**

Referencia #3578135



# Tabla de Contenidos

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Apartado 1  | Introducción.....  | 1  |
| Apartado 2  | Tecnología de iQ-Check <i>Campylobacter</i> .....  | 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..... | 4  |
| 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 .....   | 8  |
| Apartado 8  | Confirmación de resultados positivos .....   | 10 |
| Apartado 9  | Confirmación de colonias aisladas usando el kit iQ-Check .....                           | 10 |
| Apartado 10 | Aplicación del ensayo y validaciones.....  | 11 |
| Apartado 11 | Referencias .....  | 11 |
| Apartado 12 | Historial de revisiones .....  | 11 |
|             | Apéndice — Tabla de cálculo de la mix de PCR .....                                       | 12 |

## Apartado 1 Introducción

*Campylobacter* se ha convertido en la causa más frecuente de gastroenteritis. *C. jejuni* y, en menor medida, *C. coli* y *C. lari* son las especies más comúnmente identificadas correlacionadas con la infección. Las bacterias son comensales en el tracto intestinal del ganado vacuno, ovino, porcino y avícola y, por tanto, los alimentos de origen animal pueden contaminarse. La mayoría de las infecciones por *Campylobacter* se contraen por el consumo de agua contaminada, leche cruda y mal pasteurizada, y carnes poco cocinadas, en particular aves de corral. Se cree que la dosis de infección por *Campylobacter* es de tan solo 500 células. Los métodos bacteriológicos convencionales para la detección de *Campylobacter* suelen ser largos y tediosos. El kit iQ-Check *Campylobacter* real-time PCR es una prueba rápida y sencilla, que permite la detección de la bacteria en muestras de alimentos y muestras ambientales.

## Apartado 2 Tecnología de iQ-Check *Campylobacter*

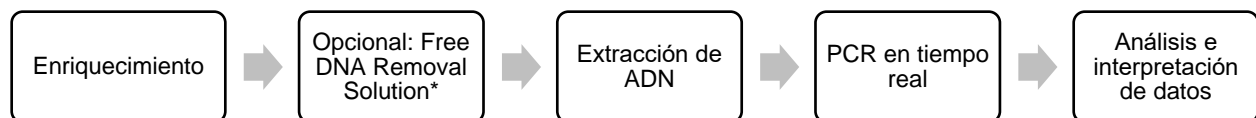
El kit iQ-Check *Campylobacter* es un ensayo basado en la detección y amplificación de genes por PCR en tiempo real. Los reactivos de PCR listos para su uso incluidos en el kit contienen oligonucleótidos (cebadores y sondas) específicos para *C. jejuni*, *C. coli*, y *C. lari*, así como ADN polimerasa 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 múltiples 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 la *Campylobacter*. 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 *Campylobacter* spp. y se detecta por un segundo fluoróforo.

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



\* 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 *Campylobacter* contiene suficientes reactivos para 96 pruebas (94 muestras).

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

## Apartado 4

### Vida útil y conservación

Una vez recibido, el kit 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/o 95–100°C
- Instrumentos específicos para la extracción en placa Deep Well
  - Calefactor térmico con agitación\* con capacidad para mantener 37 ± 2°C y/o 95–100°C, con una velocidad de agitación de al menos 1.300 rpm
- Agitador vortex
- Placa agitadora magnética
- Micropipetas de 20, 200 y 1.000 µl
- Sistema de PCR en tiempo real de Bio-Rad\*, por ejemplo, los sistemas de PCR en tiempo real CFX96 Touch Deep Well (referencia #3600037) o CFX Opus Deepwell (referencia #17007991)
- iQ-Check Prep System de Bio-Rad para el procedimiento de extracción automático de ADN y configuración de la placa de PCR (referencia #3594911)

## Apartado 5 Materiales necesarios, no suministrados

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

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

## Fungibles

- Medio de enriquecimiento: Caldo Bolton, suplementado o de doble fuerza libre de sangre
- Medio de enriquecimiento: Agua de peptona tamponada (por ejemplo, BPW Plus, referencia #3564684, deshidratada, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 frascos; 3555790, 5 L x 2 bolsas; 3555795, 3 L x 4 bolsas. BPW Standard, referencia #12013259, deshidratada, 500 g; 12013258 deshidratada, 5 kg; 12013260 5 L x 2 bolsas)
- Medio de enriquecimiento: Caldo Hunt, preparado conforme a las recomendaciones del fabricante.
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (referencia #3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (referencia #12012383)
- RAPID' *Campylobacter* Agar (referencia #12012036, 90 mm x 20 placas; 3564295, base deshidratada, 500 g; 3564296, suplemento, 10 viales)
- Materiales específicos para muestras ambientales
  - Esponjas ambientales
  - Caldo neutralizante para esponjas, como el caldo neutralizante Dey-Engley (D/E) o HiCap o el caldo Lethen
- 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 #12014473)
  - Puntas con filtro (referencia #12014486, 50 µl x 5.760; 12014483, 1.000 µl x 3.840)
  - Tubos para mix de PCR (referencia #12016673, 5 ml x 25)
- Placas, tubos, film 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 su homogeneidad
  - Verifique periódicamente la exactitud y la precisión de las pipetas, así como el correcto funcionamiento de los instrumentos
  - Cámbiese 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. Ambos interferirán con la 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 *Campylobacter* 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.

## Apartado 6

- iQ-Check Prep System
  - El uso inadecuado del sistema 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 sistema iQ-Check Prep 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 o CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Detection System
  - El uso inadecuado del CFX96 Touch Deep Well o del CFX Opus Deepwell 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 y el CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Detection System deben ser manipulados y utilizados 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 *Campylobacter*. 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 *Campylobacter* 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

### A. Enriquecimiento de la muestra

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

El medio de enriquecimiento debe encontrarse a la temperatura de incubación apropiada (20–25°C) antes de su utilización.

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

| AOAC PTM 031209                       |   |  |
|---------------------------------------|---|--|
| Alcance (matrices)                    | Preparación de las muestras   | Enriquecimiento/Extracción de ADN  |
| Pollo crudo picado                    | Homogeneizar <i>n</i> g de muestra en 9 x <i>n</i> ml de caldo Bolton suplementado  | <b>Extracción Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar durante 4 hr a 37 ± 1°C en condiciones microaeróbicas</li> <li>▪ Incubar otras 20 hr a 41,5 ± 1°C en condiciones microaeróbicas</li> <li>▪ Formato tubo/Deep Well</li> </ul> |
| Enjuagues de canal y esponja de canal | Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml 2x de caldo de enriquecimiento Bolton sin sangre (Blood-Free Bolton's Enrichment Broth, BF-BEB)  | <b>Extracción Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar durante 24 hr a 42 ± 1°C en condiciones microaeróbicas</li> <li>▪ Formato tubo/Deep Well</li> </ul>  |
| Pollo crudo picado                    | Homogeneizar 325 g de carne de ave cruda en 1.625 ml de agua de peptona tamponada. Añadir 30 ml de muestra homogeneizada a 30 ml de caldo Hunt y mezclar  | <b>Extracción Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar durante 22-26 hr a 42 ± 1°C en condiciones microaeróbicas</li> <li>▪ Formato tubo/Deep Well</li> </ul>   |
| Enjuague de carne de ave              | Homogeneizar 30 ml de enjuague de carne de ave en 30 ml de caldo Hunt   | <b>Extracción Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar durante 22-26 hr a 42 ± 1°C en condiciones microaeróbicas</li> <li>▪ Formato tubo/Deep Well</li> </ul>   |
| Esponja de canal                      | Añadir 25 ml de caldo Hunt a la esponja con 25 ml de medio de transporte  | <b>Extracción Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar durante 22-26 hr a 42 ± 1°C en condiciones microaeróbicas</li> <li>▪ Formato tubo/Deep Well</li> </ul>   |
| Alcance (matrices)                    | Preparación de las muestras   | Enriquecimiento/Extracción de ADN  |
| Esponja ambiental                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Humedecer las esponjas con un caldo neutralizante que no contenga complejo de sulfonato de arilo</li> <li>▪ Añadir 20 ml de agua de peptona tamponada más 30 ml de caldo Hunt a la bolsa que contiene la esponja</li> <li>▪ Homogeneizar las muestras de esponja antes de la incubación mediante homogeneizador o masaje manual durante 30 sec.</li> <li>▪ Homogeneizar las muestras de hisopo en el tubo agitando enérgicamente o agitando en vórtex durante 10 sec.</li> </ul> | <b>Extracción Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar durante 22-26 hr a 42 ± 1°C en condiciones microaeróbicas</li> <li>▪ Formato tubo/Deep Well</li> </ul>   |
| Muestras de alimentos                 | Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de caldo Bolton suplementado   | <b>Extracción Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar durante 4 hr a 37 ± 1°C</li> <li>▪ Incubar otras 20 hr a 41,5 ± 1°C en condiciones microaeróbicas</li> <li>▪ Formato tubo/Deep Well</li> </ul>                               |
| Heces                                 | Homogeneizar <i>n</i> g de heces en 1 x <i>n</i> ml de caldo Bolton suplementado  | <b>Extracción Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Detección directa (no requiere enriquecimiento)</li> <li>▪ Formato tubo/Deep Well</li> </ul>   |

## B. Tratamiento de eliminación de ADN libre

La solución iQ-Check Free DNA Removal Solution proporciona una forma ideal de eliminación de ADN libre. Siga las recomendaciones de Bio-Rad descritas en la guía del usuario (documento #10000058391).

## C. Extracción de ADN

Recomendaciones generales:

1. Encienda el bloque calefactor o calefactor térmico con agitación para precalentar antes de iniciar la prueba. Configúrelo a 95–100°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. Seguidamente, pipetee mientras la barra magnética agita a velocidad media el contenido del frasco para mantener el reactivo en suspensión.

### 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 desellado
5. Si trabaja con tubos, incúbelos en el bloque calefactor a 95 - 100°C durante 15 - 20 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 (reactivos B + C) inmediatamente después de su preparación. La mix permanecerá estable durante 1 hr como máximo a 2–8°C.

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 de PCR o las tiras de tubos. 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 correctamente, 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 C<sub>q</sub> de cada muestra (el ciclo en el que la curva de amplificación cruza el umbral).

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

## Controles

Verifique los controles 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>Campylobacter</i><br>(canal FAM) | Detección de control interno<br>(canal HEX) |
|------------------|--|---|
| Control negativo | Cq = N/A*  | $28 \leq Cq \leq 40$                        |
| Control positivo | $26 \leq Cq \leq 36$                             | 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 negativo y positivo 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 análisis iQ-Check *Campylobacter* PCR positivo debe mostrar una curva de amplificación típica y un valor Cq  $\geq 10$  para el fluoróforo FAM.

- Si el valor Cq de ambos canales es inferior a 10, verifique que la curva de datos brutos sea una curva de amplificación normal (con una línea de base plana, seguida de un rápido aumento exponencial de la fluorescencia, y luego un aplanamiento). Si la curva parece ser correcta, puede considerarse un análisis positivo de *Campylobacter*.

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:

- Esta muestra se considera **negativa en *Campylobacter*** si no hay un valor Cq en el canal FAM y el control interno tiene un valor Cq  $\geq 28$
- 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  $\mu$ l de extracto de ADN), utilice 5  $\mu$ l de la dilución para la amplificación y repita el análisis de 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 en forma de datos brutos es una curva de amplificación típica. Si la curva no tiene una forma característica, será necesario repetir el análisis de PCR.

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

| Detección de <i>Campylobacter</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 *Campylobacter* 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 *Campylobacter* se presume que es positivo y se recomienda su confirmación mediante un método de referencia apropiado. También se puede usar el medio cromogénico RAPID' *Campylobacter*.

En el contexto de la validación AOAC, un resultado positivo de iQ-Check *Campylobacter* debe considerarse como presunto positivo y se recomienda la confirmación aplicando un método de referencia apropiado (por ejemplo, USDA MLG). Como alternativa, rayar directamente 10 µl de caldo Hunt enriquecido en RAPID' *Campylobacter* Agar e incubar durante 48 ± 2 hr a 42 ± 1°C en condiciones microaeróbicas.

## Apartado 9

### Confirmación de colonias aisladas usando el kit iQ-Check

El kit iQ-Check *Campylobacter* puede utilizarse también para confirmar colonias de *Campylobacter* aisladas en placas de agar. Este procedimiento está validado oficialmente por la certificación AFNOR para el medio cromogénico RAPID' *Campylobacter*.

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 microcentrifuga. Homogenice con vortex.
3. Analice 5 µl de la suspensión con 45 µl de mix de PCR (véase 7 Protocolo, D. PCR en tiempo real) y siga el resto del protocolo iQ-Check *Campylobacter* para la interpretación de los datos y los resultados. No es necesario realizar extracción de ADN.

## Apartado 10

### Aplicación del ensayo y validaciones



#### Validación AOAC

El iQ-Check *Campylobacter* Kit ha sido validado para todas las muestras por el AOAC Research Institute en el marco del Performance Tested Method Program para la detección de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* a partir de pollo crudo picado, enjuagues de canales de pollo y esponjas de pavo con el uso de los sistemas de PCR en tiempo real CFX96 Touch Deep Well y CFX Opus Deepwell. El software asociado es el CFX Manager IDE (versión 2.2 y posteriores). Un resultado positivo con iQ-Check debe considerarse como no definitivo y se recomienda que se confirme mediante métodos de referencia estándar (véase el apartado 8). Número de certificado: 031209

## Apartado 11

### Referencias

ISO 10272-1 Microbiología de la cadena alimentaria – Método horizontal para la detección y el recuento de *Campylobacter* spp. – Parte 1: Método de detección

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2022). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 41.07. Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples

## Apartado 12

### Historial de revisiones

| Fecha de publicación | N.º de documento  | Cambio   |
|----------------------|-------------------|--|
| Agosto 2020          | 10000131520 Ver A | <ul style="list-style-type: none"><li>- Nuevo diseño del documento y actualización del contenido</li><li>- Cambio en el número de documento - versión anterior 881039 REV G</li></ul>  |
| Abril de 2023        | 10000131520 Ver B | <ul style="list-style-type: none"><li>- Actualizaciones generales de contenido</li><li>- Extensión AOAC: Caldo Hunt y sistema PCR CFX Opus Deepwell</li><li>- Sustitución de la sección de protocolo por un cuadro resumen</li></ul> |

## Apéndice — Tabla de cálculo de la mix de PCR

Para obtener los volúmenes correctos a usar en la preparación del 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](http://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  
Laboratories, Inc.**

Life Science  
Group

---

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

---

---

# iQ-Check *Campylobacter* Kit

## 用户指南

食品和环境样本中的空肠弯曲杆菌、大肠弯曲杆菌和结肠弯曲杆菌实时荧光定量 PCR 检测

目录 #357813

**BIO-RAD**

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 第 1 部分  | 简介 .....                               | 1  |
| 第 2 部分  | iQ-Check <i>Campylobacter</i> 技术 ..... | 1  |
| 第 3 部分  | 试剂盒成分 .....                            | 2  |
| 第 4 部分  | 保质期及储存条件 .....                         | 2  |
| 第 5 部分  | 未提供的所需材料 .....                         | 3  |
|         | 设备 .....                               | 3  |
|         | 试剂和耗材 .....                            | 4  |
| 第 6 部分  | 最佳实验结果的安全预防措施及建议 .....                 | 5  |
| 第 7 部分  | 操作流程 .....                             | 7  |
|         | A. 样本增菌 .....                          | 7  |
|         | B. 去除游离 DNA 处理 .....                   | 8  |
|         | C. DNA 提取 .....                        | 9  |
|         | D. 实时荧光定量 PCR .....                    | 10 |
|         | E. 分析 .....                            | 11 |
| 第 8 部分  | 阳性结果的确认 .....                          | 12 |
| 第 9 部分  | 使用 iQ-Check 试剂盒确认单菌落 .....             | 13 |
| 第 10 部分 | 测试性能和验证 .....                          | 13 |
| 第 11 部分 | 参考资料 .....                             | 14 |
| 第 12 部分 | 修订记录 .....                             | 14 |
|         | 附录 — PCR 混合物计算指南 .....                 | 15 |

## 第 1 部分 简介

*弯曲杆菌*已成为胃肠炎的最常见病因。*空肠弯曲杆菌*（在较小程度上）与*大肠弯曲杆菌*和*结肠弯曲杆菌*是最常见的感染菌种。这种细菌存在于牛、羊、猪和鸟类的肠道中，因此动物源性食物可能会受到污染。大多数*弯曲杆菌*是通过饮用受污染的水源、未经充分消毒的生牛奶和未煮熟的肉类，尤其食用家禽而感染。*弯曲杆菌*的感染剂量被认为低至 500 个细胞。用于检测*弯曲杆菌*的传统细菌学方法往往耗时较长且复杂繁琐。iQ-Check *Campylobacter* 实时荧光定量 PCR 试剂盒是一种简单快捷的检测方法，用于检测食品和环境样品中的细菌。

## 第 2 部分

### iQ-Check *Campylobacter* 技术

iQ-Check *弯曲杆菌*试剂盒是一项基于基因扩增和实时荧光定量 PCR 检测的技术。该试剂盒的即用型 PCR 试剂包含*空肠弯曲杆菌*、*大肠弯曲杆菌*和*结肠弯曲杆菌*寡核苷酸（引物和探针），以及 DNA 聚合酶和核苷酸。我们将检测过程 and 数据分析进行了优化，可与 Bio-Rad 的实时荧光定量 PCR 仪器（如 CFX96 Touch Deep Well 系统）配合使用。

PCR 是分子生物学中使用最广泛的技术，它能在短时间内大量扩增目标 DNA。在 PCR 反应过程中，通过好几个周期的加热和冷却的循环使 DNA 变性。然后退火，引物与 DNA 目标区域结合，DNA 聚合酶使用引物和三磷酸脱氧核糖核苷酸（dNTP）延伸 DNA，生成目标 DNA 的扩增产物。也称“扩增子”。

在实时 PCR 中，特异性探针用于在扩增过程中与扩增子杂交，从而检测目标 DNA。这些探针与荧光团相连，仅在与目标序列杂交时才会发出荧光；FAM 是连接到与*弯曲杆菌*特异性 DNA 序列杂交的探针的荧光团。当不存在目标 DNA 时，无法检测到荧光。随着每轮扩增后扩增量的增加，荧光强度也随之增强。光模块可以在每个 PCR 周期的退火步骤中测量荧光基团，而相关的软件可以绘制荧光强度与周期数的关系图。

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

该检测方法可对培养增菌后的选定食品和环境样本（包括初级生产环境）中的 *弯曲杆菌属* 进行定性检测。其中主要包括以下五个步骤：



\*使用条件请参阅 iQ-Check 游离 DNA 去除方案 (iQ-Check Free DNA Removal Solution, 1000058391) 的用户指南。

## 第 3 部分

### 试剂盒成分

iQ-Check *Campylobacter* Kit 试剂盒所含试剂可进行 96 次检测（共 94 个样本）。

| 试剂 ID | 试剂       | 提供数量, ml  |
|-------|----------|-----------|
| A     | 裂解液      | 1 瓶, 20   |
| B     | 荧光探针     | 1 管, 0.55 |
| C     | 扩增混合液    | 1 管, 4.4  |
| D     | PCR 阴性对照 | 1 管, 0.5  |
| E     | PCR 阳性对照 | 1 管, 0.25 |

## 第 4 部分

### 保质期及储存条件

请将该试剂盒置于 2-8°C 条件下储存。在该条件下储存的试剂在有效期内均可使用。

## 第 5 部分

### 未提供的所需材料

#### 设备

- 实验室专用拍打式无菌均质器：用于检测样本的混匀处理
- 恒温箱：用于微生物增菌
- 专用于在无菌 1.5 ml 锥形螺帽管中提取
  - 台式离心机 ( 可调至 10,000-12,000 x g )
  - 干式恒温器 ( 可调至  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$  和/或  $95-100^{\circ}\text{C}$  )
- 提取专用深孔板
  - 加热振荡混合仪 ( 可维持  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$  和/或  $95-100^{\circ}\text{C}$  恒温，混合速度至少为 1,300 rpm )
- 涡旋振荡器
- 微量移液枪 (20  $\mu\text{l}$  , 200  $\mu\text{l}$  , 1,000  $\mu\text{l}$ )
- Bio-Rad 实时 PCR 系统，\*例如 CFX96 Touch Deep Well ( 目录号 3600037 ) 或 CFX Opus Deepwell ( 目录号 17007991 ) 实时 PCR 系统
- Bio-Rad iQ-Check Prep System：用于全自动 DNA 提取和 PCR 板设置 ( 目录 #3594911 )

注: 推荐使用配备热循环仪和 iQ-Check Prep Systems 的不间断电源 (UPS)。

\* 请联系 Bio-Rad 技术支持获取推荐仪器的信息。

## 试剂和耗材

- 培养基: 无血补充或双倍强的 Bolton 肉汤
- 培养基: 缓冲蛋白胨水 (例如, BPW Plus 目录号 3564684, 干粉, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 瓶; 3555790, 5 L x 2 袋; 3555795, 3 L x 4 袋。缓冲蛋白胨水 Standard 目录号 12013259, 干粉, 500 g; 12013258 干粉, 5 kg; 12013260 5 L x 2 袋)
- 培养基: Hunt Broth, 按照制造商的建议进行制备
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (目录 #3594970)
- iQ-Check 纯化试剂 (目录 #12012383)
- RAPID 弯曲杆菌培养基 (目录 #12012036, 90 mm x 20 个培养皿; 3564295, 干粉, 500 g, 3564296, 添加剂, 10 个小瓶)
- 环境样本专用
  - 采样海绵
  - 用于采样海绵的中和肉汤, 例如 Dey-Engley (D/E) 或 HiCap 中和肉汤, 或 Lethen 肉汤
- 专用于管内提取
  - 1.5 ml 锥形螺旋盖管, 无菌 (例如产品目录号 2240110XTU 的产品)
- 专用于在深孔板内提取
  - 96 孔深孔板 (iQ-Check Deep Well Microplates, 目录号 #3594900)
  - 塑料密封膜 (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, 目录号 #3590139)
  - 预穿孔密封膜 (X-Pierce Films, 目录 #3593977, 或预穿孔板密封膜, #3600040, 仅限北美)

## 第 6 部分 最佳实验结果的安全预防措施及建议

- 专用于 iQ-Check Prep System
  - 60 ml 稀释容器 ( 目录 #12014473 )
  - 带滤芯的移液枪枪头 ( 目录 #12014486 , 50  $\mu$ l x 5,760 ; 12014483 , 1,000  $\mu$ l x 3,840 )
  - PCR 混合管 ( 目录 #12016673 , 5 ml x 25 )
- PCR 板、管子、密封胶带和盖子
- 适用于 20、200 和 1,000  $\mu$ l 微量移液管的无菌带滤芯移液器枪头
- Combitip 移液器或等效重复移液器的枪头 ; 无菌 , 独立包装
- 5 ml 无菌试管
- 无粉手套
- 蒸馏无菌水
- 漂白剂 , 5%
- DNA AWAY 或 RNase AWAY 等清洁剂

## 第 6 部分

### 最佳实验结果的安全预防措施及建议

- 此测试必须由经过专门培训的人员操作
- 样品和增菌培养物必须作为潜在传染性材料处理 , 并根据当地法规和规定进行废弃物处理
- 所有具有潜在传染性的材料在处置前都应进行高压灭菌

- 最后的实验结果取决于严格遵守良好实验室规范（例如，EN ISO 7218 标准），尤其是 PCR 操作：
  - 切勿将实验室设备（移液管、试管等）从一个工作站重复使用到另一个工作站
  - 对于每个系列的扩增反应，始终使用阳性对照及阴性对照
  - 试剂过期后请勿使用
  - 使用前涡旋试剂盒中的试剂以确保均匀
  - 定期验证移液器的准确度和精密度，以及仪器的正常功能
  - 经常更换手套，尤其是当您怀疑它们被污染时
  - 使用 5% 的漂白剂和其他去污剂（例如 DNA AWAY）定期清洁工作空间
  - 使用无粉手套并避免在管帽上留下指纹和墨迹。两者都会干扰数据采集
- 强烈建议遵守标准 EN ISO 22174:2005（食品和动物饲料微生物学 — 用于检测食品病原体的聚合酶链反应 (PCR) — 一般要求和定义）中描述的一般要求
- iQ-Check *Campylobacter* Kit
  - 根据全球化学品统一分类和标签制度 (GHS)，测试套件中的所有物质或混合物均属于分类产品。与酸接触可能会释放有毒气体。如果使用得当，则不需要特别的预防措施。如果产品被吸入，请立即吸入新鲜空气并在出现投诉时咨询医生。眼睛接触产品后，用流水冲洗睁开的眼睛几分钟。如果误吞下产品，请催吐并寻求医疗帮助
- iQ-Check Prep System
  - iQ-Check Prep System 的不当使用可能会导致身体伤害或仪器损坏。如果处理不当，某些组件可能会有因过热而造成人身伤害的风险。为安全使用，iQ-Check Prep System 只能由经过适当培训的合格实验室人员操作。只能由 Bio-Rad 现场服务工程师执行仪器维修

## 第 7 部分 操作流程

- CFX96 Touch Deep Well 或 CFX Opus Deepwell 实时 PCR 检测系统
  - CFX96 Touch Deep Well 或 CFX Opus Deepwell 实时 PCR 检测系统使用不当可能会导致人身伤害或仪器损坏。如果处理不当，某些组件可能会有因过热而造成人身伤害的风险。为确保安全使用，CFX96 Touch Deep Well 和 CFX Opus Deepwell 实时 PCR 检测系统只能由经过适当培训的合格实验室人员操作。只能由 Bio-Rad 现场服务工程师执行仪器维修
  
- 样本增菌
  - 用户应阅读、理解并遵守 iQ-Check *Campylobacter* Kit 试剂盒说明中的所有安全信息。保留安全说明以备将来参考。为降低与接触化学品和生物危害相关的风险，请在经过培训的人员控制下，在配备适当的实验室进行病原体检测。始终遵循标准的实验室安全规范，包括在处理试剂和受污染的样品时穿戴适当的防护服和护目镜。扩增后避免接触增菌培养液和试剂管。根据当前行业标准处理增菌样品。
  
  - *弯曲杆菌*属于生物安全 2 级微生物。增菌生物样本具有传播传染病的潜力。遵守所有适用的地方、州/省和/或国家有关生物废物处置的法规。穿戴合适的防护设备，包括但不限于：防护眼镜、面罩、衣服/实验服和手套。所有工作都应在配备适当安全设备（例如隔离装置）的设施中进行。在处理潜在传染性材料之前，个人应根据适用的法规和公司/机构要求接受培训
  
  - 测试完成后，所有可能含有病原体的材料和介质都应按照当前处理污染废弃物的行业标准进行净化（即在 120°C 下高压灭菌 20 min）。有关更多信息和当地处理法规，请参阅安全数据表

## 第 7 部分 操作流程

### A. 样本增菌

强烈建议您在阅读完全部操作流程后才开始进行检测。

使用前请将增菌液根据需求放置于适当的孵育温度下（20–25°C）。

下表概述了可供使用的不同方案，具体取决于应用和验证范围。

| AOAC PTM 031209 |  |  |
|-----------------|--|--|
| 范围 (食品基质)       | 样本制备   | 增菌/DNA 提取  |
| 生碎肉鸡            | 在 9 x n ml 添加 Bolton 肉汤中均匀混合 ng 样品   | <b>Easy I 提取</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>在 37±1°C 的微需氧条件下培养 4 小时</li> <li>在 41.5 ± 1°C 的微需氧条件下额外培养 20 小时</li> <li>管/深孔</li> </ul> |
| 胴体冲洗液和胴体海绵      | 在 9 x n ml 2x Bolton 无血增菌肉汤 (BF-BEB) 中均匀混合 ng 食物   | <b>Easy I 提取</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>在 42±1°C 的微需氧条件下培养 24 小时</li> <li>管/深孔</li> </ul>  |
| 生碎肉鸡            | 在 1,625 ml BPW 中均匀混合 325 g 生禽肉将 30 ml 均质样品加入到 30 ml Hunt 肉汤并混合   | <b>Easy I 提取</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>在 42 ± 1°C 的微需氧条件下培养 22-26 小时</li> <li>管/深孔</li> </ul>                                   |
| 禽肉胴体冲洗液         | 在 30 ml Hunt 肉汤中均匀混合 30 ml 禽肉胴体冲洗液   | <b>Easy I 提取</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>在 42 ± 1°C 的微需氧条件下培养 22-26 小时</li> <li>管/深孔</li> </ul>                                   |
| 胴体海绵            | 在海绵上加入 25 ml Hunt 肉汤和 25 ml 转移到培养基上  | <b>Easy I 提取</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>在 42 ± 1°C 的微需氧条件下培养 22-26 小时</li> <li>管/深孔</li> </ul>                                   |
| 范围 (食品基质)       | 样本制备   | 增菌/DNA 提取  |
| 环境采样海绵          | <ul style="list-style-type: none"> <li>用不含芳基磺酸盐复合物的中和肉汤润湿采样海绵</li> <li>将 20 ml BPW 和 30 ml Hunt 肉汤加入到有海绵的袋子中</li> <li>培育前使用均质器或用手按摩 30 秒, 将海绵样品均匀混匀</li> <li>用力摇晃或使用涡旋仪摇晃 10 秒, 将试管内的拭子样品混匀</li> </ul> | <b>Easy I 提取</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>在 42 ± 1°C 的微需氧条件下培养 22-26 小时</li> <li>管/深孔</li> </ul>                                   |
| 食物样品            | 在 9 x n ml 添加 Bolton 肉汤中均匀混合 ng 食物   | <b>Easy I 提取</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>在 37±1°C 下培养 4 小时</li> <li>在 41.5 ± 1°C 的微需氧条件下额外培养 20 小时</li> <li>管/深孔</li> </ul>       |
| 粪样              | 在 1 x n ml 添加 Bolton 肉汤中均匀混合 ng 粪样   | <b>Easy I 提取</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>直接检测 (无需增菌)</li> <li>管/深孔</li> </ul>   |

## B. 去除游离 DNA 处理

iQ-Check Free DNA Removal Solution 是去除游离 DNA 的最佳选择。请遵守 Bio-Rad 用户指南 (文件编号 1000058391) 中的建议。

## 第 7 部分 操作流程

### C. DNA 提取

以下是我们的建议:

1. 检测开始前, 预热恒温器或加热振荡混合仪。将其设置为 95-100°C。移液时将裂解液置于磁力搅拌板上以中等速度搅拌, 使其保持悬浮状态。
2. 避免晃动增菌袋和采集大块食品碎屑。若食品样本中含有脂肪上清液, 只需收集脂肪层以下的样本。
3. 小心打开离心管和孔板, 避免交叉污染。
4. 在直接移液到预穿孔密封膜前, 冷却深孔板。
5. 使用磁力搅拌棒使裂解剂保持悬浮状态。以中等速度搅拌时进行移液。
6. 使用裂解液时, 首先用手轻轻晃动裂解液。然后, 瓶中磁力搅拌棒以中速搅拌液体时移液, 使液体保持呈悬浮状态。

#### 简易法 I 操作流程

1. 向试管或深孔板中加入 100 微升裂解液 (试剂 A)。
2. 加入 100  $\mu$ l 增菌后的样品。
3. 用移液枪上下吹打溶液, 直至安全混合均匀。
4. 盖上离心管盖, 或用预穿孔密封膜将深孔板密封。
5. 将试管置于恒温器中, 在 95–100°C 条件下培养 15–20 分钟。将深孔板置于培养器中, 以 1300-1600 转速搅动, 在 95–100°C 条件下培养 15–20 分钟。
6. 以较高的速度对试管进行涡流操作, 然后以 10000-12000  $\times$  克的标准离心操作至少 2 分钟。深孔板不需要进行离心。

如需暂时停止检测, 推荐在此步骤暂停。

上清液可在 -20°C 条件下保存长达 1 年。再次使用前, 将其解冻、混匀, 然后离心 10,000-12,000  $\times$  g 5 min。

## D. 实时荧光定量 PCR

### 仪器和软件设置

请参阅 iQ-Check Kits 的实时荧光定量 PCR 系统用户指南中的说明进行仪器和软件设置。

### PCR 混合物的制备

1. 制备 PCR 混合物需用到扩增液 ( C 试剂 ) 和荧光探针 ( B 试剂 )。所需 PCR 混合物的体积取决于待分析的样本和对照的数目。每次运行的 PCR 中必须至少包含阳性对照和阴性对照各一个。利用“附录 — PCR 混合物计算指南”中的移液概览表，即可确定每种试剂的所需体积。

注意: PCR 混合物 ( B 试剂 + C 试剂 ) 准备完后，应立即使用。在 2-8°C 条件下最多可稳定保存 1 小时。

2. 根据您的实验设计方案，向每孔中加入 45  $\mu$ l PCR 混合物。
3. 加入 5  $\mu$ l DNA 提取物，或试剂 D ( 阴性对照 ) 或试剂 E ( 阳性对照 )。移液前不要涡旋振荡样品。将 PCR 板或联管上的孔密封。请小心移液，避免孔底部产生气泡。可选步骤：对密封后的 PCR 板或联管进行离心操作 ( 快速旋转 )，以消除气泡。
4. 将 PCR 板或联管放入热循环仪中。确保正确放置板，即 A1 孔位于左上角。最后关上 PCR 仪器盖。

### 运行 PCR

要开始运行 PCR，请参阅 iQ-Check 试剂盒的实时荧光定量 PCR 系统用户指南中的说明。

## 第 7 部分 操作流程

### E. 分析

可在 PCR 运行结束后直接进行数据分析，或稍后打开存储的数据文件进行分析。请参阅 CFX Manager IDE Software 用户手册中的说明，来打开数据文件并设置数据分析参数。

#### 结果解释

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

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

#### 对照

在解释样本结果之前，需核实阳性和阴性对照。

当对照出现下表所示结果时，表示实验有效。否则必须重新进行 PCR 反应。

|      | <b>弯曲杆菌检测<br/>(FAM)</b> | <b>内部对照检测<br/>(HEX 通道)</b> |
|------|-------------------------|----------------------------|
| 阴性对照 | Cq = N/A*               | $28 \leq Cq \leq 40$       |
| 阳性对照 | $26 \leq Cq \leq 36$    | 不显著                        |

\* 当样本的荧光信号并未显著高于背景干扰，并因此没有高于阈值时，软件会显示 Cq 值为 N/A（不适用）。

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

#### 样本

阳性 iQ-Check *Campylobacter* PCR 检测必须显示典型的扩增曲线，并且 FAM 荧光团的 Cq 值  $\geq 10$ 。

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

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

- 如果无 FAM Cq 值但内部对照 Cq 值  $\geq 28$  , 则可将样本视为阴性 *弯曲杆菌属* 样本
- 如果内部对照也无 Cq 值 ( Cq = N/A ) , 说明 PCR 反应未正常进行。需将样本进行稀释 ( 将 10  $\mu$ l DNA 提取物用无菌蒸馏水 1:10 稀释后 , 取 5  $\mu$ l 稀释液进行检测 ) 并重新进行 PCR。
- 如果内部对照 Cq 值  $<28$  , 则无法解释结果。需核实阈值是否设置正确 , 或原始数据曲线是否为正常扩增曲线。如果曲线不具有典型形状 , 则需重新进行 PCR 检测。

样本结果解释如下表所示:

| <b>弯曲杆菌检测<br/>( FAM 通道 )</b> | <b>内部对照检测<br/>( HEX 通道 )</b> | <b>结果解释</b> |
|------------------------------|------------------------------|-------------|
| Cq $\geq 10$                 | 不显著                          | 阳性          |
| Cq = N/A                     | Cq $\geq 28$                 | 阴性          |
| Cq = N/A                     | Cq = N/A                     | 反应抑制*       |

\* 当 *弯曲杆菌属* 检测和内部对照检测均为 Cq 值 = N/A 时 , 必须将样本按 1:10 稀释并再次进行检测。

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

## 第 8 部分

### 阳性结果的确认

假定阳性 iQ-Check *Campylobacter* 结果为阳性 , 并建议按照适当的参考方法进行确认。还可以使用 RAPID'Campylobacter 显色培养基进行再次确认。

如果是 AOAC 验证 , iQ-Check *弯曲杆菌属* 阳性结果应视为假定阳性 , 建议按照适当的参考方法 ( 例如 USDA MLG ) 进行确认。 或者将 10  $\mu$ l Hunt 肉汤直接划线到 RAPID'Campylobacter 显色培养基 , 并在  $42\pm 1^{\circ}\text{C}$  的微需氧条件下培养  $48\pm 2$  小时。

## 第 9 部分

### 使用 iQ-Check 试剂盒确认单菌落

还可使用 iQ-Check *Campylobacter* Kit 试剂盒确认培养基平板上单菌落的 *弯曲杆菌*。该方法已获得 AFNOR 验证对 RAPID<sup>®</sup>*Campylobacter* 显色培养基的正式确认。

1. 用牙签、无菌环或其他合适耗材（如移液枪枪头）从选择性或非选择性培养基平板上挑取一个单菌落。
2. 用 100 µl 胰蛋白胍盐或无菌蒸馏水在微量离心管中重悬菌落，并使用涡旋振荡器混匀。
3. 取 5 µl 悬浮液，加入 45 µl PCR 混合物（请参见第 7 部分操作流程，D. 实时 PCR），参照 iQ-Check *Campylobacter* 流程进行后续操作，获取数据并进行结果解释。不需要进行 DNA 提取。

## 第 10 部分

### 测试性能和验证



#### AOAC 验证

iQ-Check *弯曲杆菌*试剂盒已按照性能测试方法程序通过了 AOAC 研究所的验证，可检测生碎肉鸡、鸡胴体冲洗液和火鸡海绵中的 *空肠弯曲杆菌*、*大肠弯曲杆菌*和 *结肠弯曲杆菌*，CFX96 Touch Deep Well 和 CFX Opus Deepwell 实时 PCR 系统对所有样品进行了验证。相关软件是 CFX Manager IDE 软件（版本 2.2 及更高版本）。iQ-Check 阳性检测结果应视为推定结果，建议按照标准参考方法（请参见第 8 部分）进行确认。

证书编号：031209

## 第 11 部分

### 参考资料

ISO 10272-1 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration and of *Campylobacter* spp. - Part 1 Detection method

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2022). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 41.07. Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples

## 第 12 部分

### 修订记录

| 发布日期       | 文件编号              | 变更   |
|------------|-------------------|--|
| 2020 年 8 月 | 10000131520 Ver A | <ul style="list-style-type: none"><li>- 新的文档设计和内容的更新</li><li>- 文件编号更改 – 先前版本 881039 REV G</li></ul>                                |
| 2023 年 4 月 | 10000131520 B 版本  | <ul style="list-style-type: none"><li>- 常规内容更新</li><li>- AOAC 扩展：Hunt 肉汤和 CFX Opus Deepwell PCR 系统</li><li>- 将方案部分替换为汇总表</li></ul> |

## 附录 — PCR 混合物计算指南

在准备 PCR 混合物时，根据待分析的样本和对照总数，即可在下表中找到相应 B 试剂和 C 试剂的所需体积。

| Total Number of Samples and Controls | Probes Reagent B, $\mu\text{l}$ | 扩增混合液 Reagent C, $\mu\text{l}$ | Total Number of Samples and Controls | Probes Reagent B, $\mu\text{l}$ | 扩增混合液 Reagent C, $\mu\text{l}$ | Total Number of Samples and Controls | Probes Reagent B, $\mu\text{l}$ | 扩增混合液 Reagent C, $\mu\text{l}$ |
|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 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                          |

请访问 [bio-rad.com/iqcheck](http://bio-rad.com/iqcheck) 了解更多信息。

BIO-RAD 是 Bio-Rad Laboratories, Inc. 的商标。

IQ-CHECK 是 Bio-Rad Europe GmbH 在某些司法管辖区的商标。

本文使用的所有商标均为其各自所有者的财产。

**BIO-RAD**

**Bio-Rad  
Laboratories, Inc.**

Life Science  
Group

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