

---

# iQ-Check *Salmonella* spp. II Kit

## User Guide

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

Catalog #3578123



# Table of Contents

Section 1.	Introduction.....	1
Section 2.	The iQ-Check <i>Salmonella</i> spp. II 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.....	6
	Sample Enrichment.....	6
	Free DNA Removal Treatment.....	9
	DNA Extraction.....	9
	Real-Time PCR.....	11
	Data Analysis .....	12
Section 8.	Confirmation of Positive Results.....	13
Section 9.	Confirmation of Single Colonies Using iQ-Check Kit.....	14
Section 10.	Test Performance and Validations .....	15
Section 11.	References.....	16
Section 12.	Revision History .....	17
	Appendix — PCR Mix Calculation Guide.....	18

## Section 1

### Introduction

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

Classical culture methods are often long and tedious. The iQ-Check *Salmonella* II Kit, in comparison, is a simple and rapid qualitative test allowing the detection of DNA sequences specific to *Salmonella* spp. found in food products, animal feed, and environmental samples. Using real-time PCR, *Salmonella* spp.–specific DNA sequences are amplified and detected simultaneously by means of fluorescent probes. Up to 94 samples can be processed at one time, with a minimal risk of contamination and an easy-to-use procedure. The intended users of this kit are trained laboratory personnel who are performing tests to detect *Salmonella* spp. The use of this test allows results to be obtained within a few hours following enrichment of a sample.

## Section 2

### The iQ-Check *Salmonella* spp. II Technology

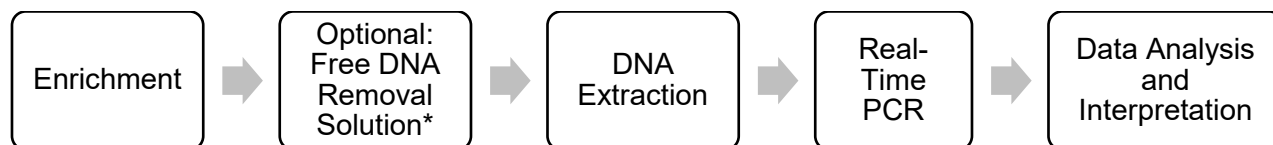
The iQ-Check *Salmonella* II Kit is based on gene amplification and detection by real-time PCR. The kit's ready-to-use PCR reagents contain oligonucleotides (primers and probes) specific for *Salmonella* spp., as well as DNA polymerase and nucleotides. Detection and data analysis are optimized for use with a Bio-Rad real-time PCR instrument, such as the 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 by heat followed by primers annealing to the target region. The DNA polymerase then uses these primers and deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) to extend the DNA, creating copies of the target DNA. These copies are called amplicons.

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

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

This test allows the qualitative detection of *Salmonella* spp. in select food products, animal feed, and environmental samples 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 conditions of use.

## Section 3

### Kit Components

The iQ-Check *Salmonella* spp. II 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

## Section 5 Materials Required but Not Supplied

- Dry heat block at  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  and/or  $95\text{--}100^\circ\text{C}$
- Cell disruptor (for example, Disruptor Genie, Scientific Industries, Inc.) – for Standard II Protocol
- Specific for extraction in deep well plate:
  - Heating thermoshaker\* capable of maintaining  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  and/or  $95\text{--}100^\circ\text{C}$ , with a mixing speed of at least 1,300 rpm
  - DW40 Deep Well Microplate Washer (catalog #90137) – for Standard II Protocol
- Vortexer
- Magnetic stir plate
- 20, 200, and 1,000  $\mu\text{l}$  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: Buffered Peptone Water (for example, BPW Plus, catalog #3564684, dehydrated, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 bottles; 3555795, 3 L x 4 bags; 3555790, 5 L x 2 bags BPW Standard, catalog #12013259, dehydrated, 500 g; 12013258, dehydrated, 5 kg; 12013260, 5 L x 2 bags)
- Specific for enrichment of environmental primary production samples: RAPID' *Salmonella* Capsule, (catalog #3564710, 1x strength, 100 capsules; 3564709, 10x strength, 100 capsules; 3564712, powder, 100 tests)
- Selective supplement: Novobiocin
- PIF Supplement (catalog #12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalog #3594970)
- Specific for environmental samples:
  - Environmental sponges
  - Environmental swabs
  - Neutralizing broth for sponges and swabs, such as Dey-Engley (D/E) or HiCap Neutralizing Broth, or Lethen Broth

- Specific for extraction in tubes
  - 1.5 ml conical screwcap tubes, sterile (for example catalog #2240110XTU)
- Specific for extraction in a deep well plate
  - 96-well deep well plate (iQ-Check Deep Well Microplates, catalog #3594900)
  - Plastic sealing film (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, catalog #3590139)
  - Pre-pierced sealing film (X-Pierce Films, catalog #3593977 or Pre-Pierced Plate Sealing Film, 3600040, North America only)
- Specific for iQ-Check Prep System
  - 60 ml dilution container (catalog #3594904 or 12014473)
  - Filter tips (catalog #3594902 or 12014486, 50 µl x 5,760; 3594903 or 12014483, 1,000 µl x 3,840)
  - PCR mix tubes (catalog #12016673, 5 ml x 25)
- Specific for Standard II and Easy II Extraction Protocols:
  - Lysis beads reagent F (catalog #3578136)
  - 200 µl wide-opening pipet tips
- RAPID'*Salmonella* Agar (catalog #3563961, 90 mm x 20 dishes; 3563963 90 mm x 120 dishes; 3564705, dehydrated, 500 g)
- PCR plates, tubes, sealing tape, and caps
- Sterile filter tips adaptable to 20, 200, and 1,000 µl micropipets
- Tips for Combitip pipets or equivalent repeat pipettors; sterile, individually packaged
- 1 and 10 ml pipets
- 2 and 5 ml sterile test tubes
- Powder-free gloves
- Distilled sterile water
- Bleach, 5%
- Cleaning agent such as DNA AWAY or RNase AWAY

## Section 6

### **Safety Precautions and Recommendations for Best Results**

- This test must be performed by trained personnel

## Section 6 Safety Precautions and Recommendations for Best Results

- 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 workspaces 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 *Salmonella* II Kit
  - All substances or mixtures in the test kit are classified products, according to the Globally Harmonized System (GHS). Contact with acids may cause release of toxic gases. No special precautions are necessary if used correctly. If the product is inhaled, supply fresh air and consult a doctor in case of complaints. After eye contact with the product, rinse opened eye for several minutes under running water. If the products are swallowed, induce vomiting and call for medical help
- iQ-Check Prep System
  - Improper use of the iQ-Check Prep System may cause personal injury or damage to the instrument. Some components may pose a risk of personal injury due to excessive heat if improperly handled. For safe use, the iQ-Check Prep System must be operated only by qualified laboratory personnel who have been appropriately trained. Servicing of the instrument must be performed only by Bio-Rad field service engineers
- CFX96 Touch Deep Well 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 *Salmonella* II Kit. Retain the safety instructions for future reference. To reduce the risks associated with exposure to chemicals and biohazards, perform pathogen testing in a properly equipped laboratory under the control of trained personnel. Always follow standard laboratory safety practices, including wearing appropriate protective apparel and eye protection while handling reagents and contaminated samples. Avoid contact with the contents of the enrichment media and reagent tubes after amplification. Dispose of enriched samples according to current industry standards
  - *Salmonella* is a Biosafety Level 2 organism. Biological samples such as enrichments have the potential to transmit infectious diseases. Follow all applicable local, state/provincial, and/or national regulations on disposal of biological waste. Wear appropriate protective equipment, which includes but is not limited to: protective eyewear, face shield, clothing/lab coat, and gloves. All work should be conducted in properly equipped facilities utilizing the appropriate safety equipment (for example, physical containment devices). Individuals should be trained in accordance with applicable regulatory and company/institution requirements before working with potentially infectious materials
  - When testing is complete, all materials and media possibly containing pathogens should be decontaminated following current industry standards for the disposal of contaminated waste (that is, autoclave for 20 min at 121°C). Consult the Safety Data Sheet for additional information and local regulations for disposal

## Section 7

### Protocol

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

#### A. Sample Enrichment

For overnight enrichment, warm media to room temperature (20–25°C) before use. For a short enrichment (8 hr), warm enrichment broth to the sample incubation temperature before use. Short enrichment times are sensitive to incubation conditions and temperatures indicated must be strictly respected. The duration of the sample preparation (time between preheating of the enrichment broth and the beginning of the food sample incubation) must not exceed 45 min. The use of a ventilated incubator is recommended.

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

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

Within the scope of the NF Validation, respect ISO standards 6887-2 to -6 for sample preparation. If not indicated, test portions weighing more than 25 g have not been tested. Incubate without shaking



## Section 7 Protocol

according to the times and temperatures indicated in the table. Standard I DNA Extraction Protocol can be used for all matrices except environmental primary production samples.

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

NF VALIDATION BRD 07/06 – 07/04 and NordVal 038		
Scope (Matrices)	Sample Preparation	Enrichment/DNA Extraction
Food products, animal feed, & environmental samples <sup>1</sup>	Small sample sizes: 1:10 dilution <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogenize <i>n</i> g food in 9 x <i>n</i> ml BPW (25 g in 225 ml)</li> </ul>	<b>Standard I extraction</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 16–24 hr at 37 ± 1°C</li> <li>Tube format</li> </ul> <b>Easy I extraction</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 20–24 hr at 37 ± 1°C</li> <li>Tube/deep well format</li> </ul>
Raw meat products (25 g, 375 g) <sup>2</sup>	25 g sample sizes: 1:10 dilution <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogenize 25 g raw meat in 225 ml prewarmed BPW</li> </ul>	Easy II extraction for 25 g samples <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 8-16 hr at 41.5 ± 1°C</li> <li>Tube/deep well format</li> </ul>
	375 g sample sizes: 1:4 dilution <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogenize 375 g raw meat in 1,125 ml prewarmed BPW</li> </ul>	Easy II extraction for 375 g samples <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 10–18 hr at 41.5 ± 1°C</li> <li>Tube/deep well format</li> </ul>
Environmental primary production samples	Homogenize <i>n</i> g sample in 9 x <i>n</i> ml BPW supplemented with RAPID <sup>®</sup> <i>Salmonella</i> capsule	Standard II <sup>3</sup> or Easy I extraction <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 18–26 hr at 41.5 °C</li> <li>Transfer 100 µl into 900 µl fresh BPW</li> <li>Incubate 4–6 hr at 37 ± 1°C</li> </ul>
Infant formula & cereal with/without probiotics, ingredients (50-375 g) <sup>4</sup>	Homogenize <i>n</i> g food in 3 x <i>n</i> ml BPW with PIF Supplement (375 g in 1,125 ml)	Easy I extraction <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 18–26 hr at 37 ± 1°C</li> <li>Tube/deep well format</li> </ul>
Raw dairy products (up to 50 g)	Homogenize <i>n</i> g food in 9 x <i>n</i> ml BPW supplemented with 20 mg/L novobiocin (50 g in 450 ml)	Easy I extraction <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 20–24 hr at 41.5 ± 1°C</li> <li>Tube/deep well format</li> </ul>
Pet food and animal feed (375g)	Homogenize <i>n</i> g sample in 5 x <i>n</i> ml of pre warmed BPW supplemented with RAPID <sup>®</sup> <i>Salmonella</i> capsule	Easy I extraction <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 18–24 hr at 37 ± 1°C</li> <li>Tube/deep well format</li> </ul>
AOAC OMA 2017.06		
Scope (Matrices)	Sample Preparation	Enrichment/DNA Extraction
Selected food products & environmental surfaces	Small sample sizes: 1:10 dilution <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogenize <i>n</i> g food in 9 x <i>n</i> ml BPW (25 g in 225 ml)</li> </ul>	Easy I extraction <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 19–23 hr at 37 ± 1°C</li> <li>Tube/deep well format</li> </ul>
	Large sample sizes: 1:4 dilution <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogenize <i>n</i> g food in 3 x <i>n</i> ml BPW (375 g in 1,125 ml)</li> </ul>	
	Environmental samples <ul style="list-style-type: none"> <li>Moisten swabs and sponges with a neutralizing broth that does not contain aryl sulfonate complex</li> <li>For surfaces being analyzed with swabs, sample a 1 x 1" (2.54 x 2.54 cm) area</li> </ul>	

	<ul style="list-style-type: none"> <li>For surfaces being analyzed with sponges, sample a 4 x 4" (10.16 x 10.16 cm) area</li> <li>Add to enough BPW to cover the swab (10 ml) or sponge (100 ml)</li> </ul>	
Milk chocolate (375 g)	Homogenize 375 g milk chocolate in 3,000 ml skim milk medium	Easy I extraction <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 18–22 hr at 37 ± 1°C</li> <li>Tube/deep well format</li> </ul>
Carcass rinses	Homogenize 30 ml carcass rinse in 30 ml BPW	Easy I extraction <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 20–22 hr at 37 ± 1°C</li> <li>Tube/deep well format</li> </ul>
<b>AOAC PTM 010803</b>		
Scope (Matrices)	Sample Preparation	Enrichment/DNA Extraction
Raw ground beef and raw beef trim (375 g) <sup>5,7</sup>	Homogenize <i>n</i> g food in 3 x <i>n</i> ml pre-warmed BPW (375 g in 1,125 ml)	Easy II extraction <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 8–22 hr at 41.5 ± 1°C</li> <li>Tube/deep well format</li> </ul>
Fresh raw spinach (375 g) <sup>5,7</sup>	Homogenize <i>n</i> g food in 3 x <i>n</i> ml pre-warmed BPW (375 g in 1,125 ml)	Easy II extraction <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 10–22 hr at 41.5 ± 1°C</li> <li>Tube/deep well format</li> </ul>
Dairy powders (375 g) <sup>7</sup>	Homogenize <i>n</i> g food in 3 x <i>n</i> ml BPW with PIF Supplement (375 g in 1,125 ml)	Easy I extraction <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 18–26 hr at 37 ± 1°C</li> <li>Tube/deep well format</li> </ul>
Chocolate liquor & white chocolate (375 g) <sup>6,7</sup>	Homogenize 375 g food in 3,000 ml prewarmed BPW	Easy I extraction <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 18–26 hr at 37 ± 1°C</li> <li>Tube/deep well format</li> </ul>
Cannabis flower (10 g) <sup>5,7</sup> and hemp flower (25 g) <sup>5</sup>	Homogenize <i>n</i> g food in 9 x <i>n</i> ml BPW (10 g in 90 ml BPW cannabis flower and 25 g in 225 ml BPW hemp flower)	Easy I extraction <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 20–22 hr at 37 ± 1°C</li> <li>Tube/deep well format</li> </ul>
Cannabis-infused chocolate and gummies (25 g) and cannabis-derived concentrates (5 g) <sup>5,7</sup>	Homogenize <i>n</i> g food in 9 x <i>n</i> ml BPW (25 g in 225 ml or 5 g in 45 ml).	Easy I extraction <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 18–22 hr at 37 ± 1°C</li> <li>Tube/deep well format</li> </ul>
Plant-based meat products (375 g) <sup>7</sup>	Homogenize <i>n</i> g food in 3 x <i>n</i> ml BPW (375 g in 1,125 ml )	Easy I extraction <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 20–22 hr at 37 ± 1°C</li> <li>Tube/deep well format</li> </ul>
All-purpose flour (375 g) <sup>5,7</sup>	1:3 dilution <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogenize <i>n</i> g food in 3 x <i>n</i> ml prewarmed BPW + PIF Supplement (375 g in 1,125 ml + 150 µl prepared PIF Supplement)</li> <li>After enrichment, transfer a 1–5 ml aliquot to a tube or deep well plate and allow to sit for at least 30 min before proceeding to DNA extraction</li> </ul> 1:9 dilution <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogenize <i>n</i> g food in 9 x <i>n</i> ml prewarmed BPW + PIF Supplement (375 g in 3,375 ml + 375 µl prepared PIF Supplement)</li> </ul>	Easy II extraction <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubate 20–24 hr at 37 ± 1°C</li> <li>Tube/deep well format</li> </ul>
<b>Refer to MFLP-38 for Health Canada approved matrices and protocols</b>		

<sup>1</sup> Except environmental primary production samples

<sup>2</sup> Protocol used for simultaneous detection of *E. coli* O157:H7

<sup>3</sup> Lysis reagent used is reagent A only (without reagent F)

## Section 7 Protocol

<sup>4</sup> The protocol is harmonized with the iQ-Check *Cronobacter* spp. and iQ-Check *Enterobacteriaceae* Kits

<sup>5</sup> Harmonized protocol with iQ-Check *E. coli* O157:H7 and iQ-Check STEC VirX Kits

<sup>6</sup> Validation includes performing test with and without iQ-Check Purification Reagent

<sup>7</sup> Validation includes direct streak to *RAPID* *Salmonella* plates

### B. Free DNA Removal Treatment

The iQ-Check Free DNA Removal Solution provides an ideal way to remove free DNA. Follow Bio-Rad's recommendations 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.
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. Pipet while the magnetic stir bar is stirring the bottle contents at medium speed in order to keep the contents in suspension.
7. For Easy II and Standard II Protocols, reconstitute the final lysis reagent as follows:
  - a. Carefully pour all the contents from reagent F (lysis beads) into reagent A (lysis reagent).
  - b. Use consumables with a wide enough tip to allow pipetting of the homogenized lysis reagent.
  - c. The lysis reagent mixed with lysis beads (reagents A + F) has a shelf life of 6 months when stored at 4°C.

#### Easy I Protocol

1. Aliquot 100 µl of homogenized lysis reagent (reagent A) to tubes or wells of a deep well plate.
2. Add 100 µl of enriched sample.
3. Mix the solution by pipetting up and down until homogenized.
4. Close the tubes or seal the deep well plate with pre-pierced sealing film.
5. Incubate tubes in the heat block at 95–100°C for 15–20 min. Incubate deep well plate in the thermoshaker under agitation at 1,300–1,600 rpm at 95–100°C for 15–20 min.

6. Vortex tubes at high speed, and then centrifuge at 10,000–12,000 x g for at least 2 min. Centrifugation is not needed for deep well plate.

### Easy II Protocol

1. Aliquot 100 µl of homogenized lysis reagent (reagents A + F) to wells of a deep well plate.

**Note:** Gently shake the lysis reagent by hand first to resuspend the beads.

2. Add 100 µl of enriched sample.

**Note:** Shake the suspension to homogenize the culture and then allow any debris to settle before collecting the 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. Place tubes in the cell disruptor for  $3 \pm 1$  min.
6. Incubate tubes in the heat block at 95–100°C for 10–15 min. Incubate deep well plate in the thermoshaker under agitation at 1,300 rpm at 95–100°C for 15–20 min.
7. Vortex tubes at high speed, and then centrifuge at 10,000–12,000 x g for at least 2 min. Centrifugation is not needed for 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.

### Standard I Protocol

1. Collect 1 ml of decanted enriched sample into a tube.
2. Centrifuge at 10,000–12,000 x g for 5 min.
3. Discard all the supernatant.
4. Add 200 µl lysis reagent (reagent A) to pellet.
5. Pipet reagent in tube up and down enough times to resuspend pellet. The number of times will depend on the sample.
6. Vortex at high speed and place the tube in the heat block at 95–100°C for 10–15 min.
7. Vortex at high speed and centrifuge at 10,000–12,000 x g for 5 min.

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

The supernatant can be stored 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.

### Standard II Protocol

1. Collect 1 ml of decanted enriched sample into a tube or in a well of a deep well plate. Seal the deep well plate with a plastic film.

## Section 7 Protocol

**Note:** Shake suspension to homogenize the culture and then allow any debris to settle before collecting the sample.

2. Centrifuge tubes at 10,000–12,000 x g for 5 min. Discard the supernatant. Centrifuge deep well plates at 2,250 x g for 20 min and discard supernatant manually or using the DW40.
3. Add 200 µl of homogenized lysis reagent (reagents A + F) to the pellet and resuspend pellet by pipetting the reagent up and down. Close tubes or seal deep well plate with pre-pierced sealing film.

**Note:** Gently shake lysis reagent by hand first to resuspend the beads. For primary production samples, use reagent A without reagent F.

4. Place tube in the cell disruptor for  $3 \pm 1$  min, or shake deep well plate in the thermoshaker at 1,300–1,600 rpm at 95–100°C for 15–20 min.
5. Incubate tubes in the appropriate heat block at 95–100°C for 10–15 min.
6. Vortex tubes at high speed and centrifuge at 10,000–12,000 x g for 5 min. Centrifuge deep well plate at 2,250 x g for 2 min.

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

The supernatant can be stored for up to 1 year at –20°C. Always allow it to thaw and homogenize, and then centrifuge at 10,000–12,000 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 PCR mix containing the amplification solution (reagent C) and the fluorescent probes (reagent B). 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 the Appendix – PCR Mix Calculation Guide to find the correct volumes to use for each reagent.
2. Use the PCR mix (reagents B + C) immediately after preparation. It is stable for 1 hr maximum at 2–8°C.
3. Pipet 45 µl of PCR mix into each well according to your plate setup.
4. To purify DNA, combine 50 µl of DNA extracted from each sample with 200 µl of iQ-Check Purification Reagent. Pipet up and down 5 times to homogenize. Alternatively, a 1:10 dilution of extracted DNA can be made using sterile water.
5. Add 5 µl of DNA extract, reagent D (negative control), or reagent E (positive control). Do not vortex the sample before pipetting. Hermetically seal the wells of the plate or strips. It is important to avoid

bubbles at the bottom of the wells by pipetting carefully. As an optional step, centrifuge the sealed PCR plate or tube strips (quick spin) to eliminate any bubbles.

6. Place the plate or strips in the thermal cycler. Be sure to place the plate with the A1 well at the upper left corner. Close the reaction module.

## Run PCR

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

The Application Protocol File “Salmo Fast” has been certified by NF Validation and AOAC PTM.

## E. Data Analysis

Data can be analyzed directly at the end of the PCR run or at a later time by opening the stored data file. Follow instructions in the corresponding CFX Manager IDE Software User Manual for opening data files and setting the data analysis parameters.

### Interpreting Results

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

CFX Manager IDE Software allows complete automated analysis for Bio-Rad real-time PCR detection systems. 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>Salmonella</i> spp. Detection (FAM channel)</b>	<b>Internal Control Detection (HEX channel)</b>
Negative control	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Positive control	$26 \leq Cq \leq 36$	N/A

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

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

### Samples

A **positive** iQ-Check *Salmonella* II PCR test must show a typical amplification curve and a Cq value  $\geq 10$  for the FAM fluorophore.

## Section 8 Confirmation of Positive Results

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

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

- This sample is considered a **negative** *Salmonella* spp. sample if there is no Cq value in the FAM channel and the internal control has a Cq value  $\geq 28$
- 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 test results is summarized in the following table:

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

\* When both target and internal control detection give a Cq value = N/A, the DNA extract 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

In the context of AOAC validation, a positive iQ-Check *Salmonella* II result should be considered presumptive positive and confirmed according to an appropriate reference method (for example, USDA MLG, FDA BAM, ISO, MFHPB, AOAC SMPR, etc.) is recommended. Alternatively, streak 10  $\mu$ l enriched BPW (with supplements when applicable) directly to RAPID' *Salmonella* chromogenic and incubate for  $24 \pm 2$  hr at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  (except for hemp flower). When interfering flora could be high, transfer 0.5 ml enriched BPW to 10 ml Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) broth and incubate for  $24 \pm 3$  hr at  $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$  then proceed with streaking 10  $\mu$ l enriched RVS to RAPID' *Salmonella* chromogenic media. Refer to the confirmation method in the RAPID' *Salmonella* chromogenic media user guide (document #10000126748).

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

#### All samples except primary production samples

1. Using classical tests described in the standardized CEN or ISO methods (including the purification) directly from the BPW enrichment broth after the full  $18 \pm 2$  hr enrichment at  $37^\circ\text{C}$ .

2. By streaking 10 µl enriched BPW (with supplements when applicable) directly to RAPID' *Salmonella* chromogenic media and incubating for 24 ± 2 hr at 37 ± 1°C. When interfering flora could be high, transfer 0.5 ml enriched BPW to 10 ml Rapaport Vassiliadis Soy (RVS) broth and incubate for 24 ± 3 hr at 41.5 ± 1°C then proceed with streaking 10 µl enriched RVS to RAPID' *Salmonella* chromogenic media.
3. Using any other method certified by NF VALIDATION based on a principle different from that used in the iQ-Check *Salmonella* II PCR test. The validated protocol of this second method must be followed entirely, including RVS selective enrichment, when needed. Confirmation is carried out from the BPW enrichment broth if this step is common to both methods.

It is possible to store the enriched BPW at 2–8°C for 72 hr maximum, following the last incubation at 37°C, with the exception of dairy and environmental surface samples.

### Primary production samples

Start the confirmation process from the primary enrichment, following the MSR/V method indicated in Appendix D of the ISO 6579/A1 standard and using RAPID' *Salmonella* medium for the isolation.

Disagreement between results of the iQ-Check *Salmonella* II Kit and the confirmation method described above may be caused by the presence of nonmotile *Salmonella*. In that case, follow the RAPID' *Salmonella* double enrichment protocol (refer to the product user guide for instructions for use). This protocol includes a selective enrichment step in RVS medium.

In the scope of the NF VALIDATION, primary enrichment bags can be stored for up to 24 hr at 2–8°C before proceeding to the confirmation.

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

## Section 9

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

iQ-Check *Salmonella* spp. II. Kit may also be used for confirming single isolated *Salmonella* spp. colonies on agar plates. This is officially validated by AFNOR Certification on RAPID' *Salmonella* 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 µl tryptone salt or distilled sterile water in a microcentrifuge tube. Homogenize using a vortexer.
3. Use 5 µl of the suspension with 45 µl of PCR mix (see D. Real-Time PCR, in Section 7 Protocol) and follow the rest of the iQ-Check *Salmonella* II Protocol for the data and result interpretation.



## Section 10

# Test Performance and Validations

The iQ-Check *Salmonella* II Kit is specific for the detection of *Salmonella* genus.



BRD 07/10 – 04/05

ALTERNATIVE ANALYSIS  
METHODS FOR AGRIBUSINESS

### NF Validation

The iQ-Check *Salmonella* II Kit is certified by NF VALIDATION as an alternative to the reference method ISO 6579 -1 (2017) for the detection of *Salmonella* spp. in all products for human and animal consumption, as well as environmental samples. The validation followed the protocol of the ISO 16140: 2016 standard and includes the use of the CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well and CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Systems. The use of the iQ-Check Free DNA Removal Solution is validated for infant formula and ingredients, pet food and animal feed. The associated software is CFX Manager Software IDE (V2.2 and later). The “Salmo Fast” APF is validated for all samples. Certificate number: BRD 07/06 – 07/04. Refer to the certificate available on the AFNOR Certification website for validity information.

OMA 2017.06



### AOAC Validation

The iQ-Check *Salmonella* II Kit (Easy Protocol) is validated by the AOAC Research Institute under OMA 2017.06 for the detection of *Salmonella* spp. in eggs (25 g), raw ground chicken (25 and 375 g), raw beef (25 g), raw pork (25 g), fresh spinach (25 g and 375 g), cantaloupe (25 g), peanut butter (25 g), ready-to-eat deli ham (375 g), selected environmental surfaces, wet (25 g) and dry (25 and 375 g) pet food, milk chocolate (375 g), cheese (375 g), carcass rinses, chocolate liquor (375 g), white chocolate (375 g), NFDM (375 g) whey powder (375 g), raw ground beef (375 g), raw beef trim (375 g), cannabis flower (10 g), cannabis-infused chocolate (25 g), cannabis-infused gummies (25 g), cannabis-derived concentrates (5 g), hemp flower (25 g), flour (375 g) and plant-based meat products (375 g). A positive result with the iQ-Check Kit is considered presumptive, and it is recommended it be confirmed following the recommendation in Section 8 above. The “Salmo Fast” APF, the use of the iQ-Check Free DNA Removal Solution, and the 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).



### Health Canada Validation

The iQ-Check *Salmonella* II (Easy Protocol) has been validated by Health Canada (MFLP-38) for detection of *Salmonella* spp. A positive result with the iQ-Check Kit is presumed to be positive and must be confirmed according to MFHPB-20 (see Section 11, reference 5).



## NordVal Validation

The iQ-Check *Salmonella* II Kit is validated by NordVal for Standard I and Easy I Protocols (in microplates) in food, feed, and environment, and for Easy II Protocols (in microplates) in raw meat. The “Salmo Fast” APF is validated for all samples. Certificate number: 038. Refer to the certificate available on the NordVal website for validity information.

## Section 11

### References

- ISO 7218. Microbiology of the food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examination.
- ISO 6887-4. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
- ISO 6579-1. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
- ISO 16140-2. Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
- Miras I et al. (1995). Nucleotide sequence of *iagA* and *iagB* genes involved in invasion of HeLa cells by *Salmonella* enteritica subsp. Enteritica ser. Typhi. *Res Microbiol* 46, 17–20.
- United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2019). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 4.10: Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Catfish Products and Carcass and Environmental Sponges.
- United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2018). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 5: *Salmonella*.
- Health Canada Health Products and Food Branch, MFHPB-20 Isolation and Identification of *Salmonella* from Food and Environmental Samples, Compendium of Analytical Methods, Volume 2, March 2009.
- Health Canada Health Products and Food Branch, Part 4: Qualitative Methods, Procedure for the Development and Management of Food Microbiological Methods, Compendium of Analytical Methods, Volume 1.

## Section 12

### Revision History

Release date	Document number	Change
October 2020	10000131519 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Renewal and extension of AFNOR validation: FDRS use as an option, "Salmo Fast" APF</li> <li>- New document design and update of references and content</li> <li>- Document number change (previous version was 808463 Rev G)</li> </ul>
February 2023	10000131519 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Added new catalog number for consumables and instrument</li> <li>- Clarification of result interpretation protocol</li> <li>- AOAC extension: New matrices, FDRS, "Salmo Fast" APF</li> <li>- Replaced protocol section with summary table</li> <li>- Update of NordVal validation scope</li> <li>- Extension of validations for CFX Opus Deepwell Real-Time PCR System and upgrade to CFX Manager Software IDE version 3.1</li> <li>- AFNOR Validation extension on pet food and animal feed</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**

**Bio-Rad  
Laboratories, Inc.**

*Life Science  
Group*

**Website** *bio-rad.com* **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23  
**Belgium** 00 800 00 24 67 23 **Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500  
**Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23 **Finland** 00 800 00 24 67 23  
**France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300  
**Hungary** 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23  
**Japan** 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23  
**Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280  
**Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23  
**Russian Federation** 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188  
**South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23 **Sweden** 00 800 00 24 67 23  
**Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311  
**United Arab Emirates** 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0122



10000131519 Ver B US/EG

---

# **iQ-Check *Salmonella* spp. II Kit**

## **Guide d'utilisation**

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

Référence — N° 3578123



# Sommaire

Section 1	Introduction .....	1
Section 2	Technologie iQ-Check <i>Salmonella</i> spp. II .....	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 .....	5
Section 7	Protocole.....	7
	Enrichissement de l'échantillon.....	7
	Traitement de l'ADN libre.....	9
	Extraction de l'ADN.....	9
	PCR en temps réel.....	12
	Analyse des données.....	13
Section 8	Confirmation des résultats positifs .....	14
	Tous les échantillons à l'exception des échantillons de production primaire .....	14
	Échantillons de production primaire .....	15
Section 9	Confirmation de colonies isolées à l'aide du kit iQ-Check.....	15
Section 10	Performance du test et validations .....	16
Section 11	Références.....	17
Section 12	Historique des révisions .....	18
	Annexe — Guide de calcul du mélange de PCR.....	19

## Section 1

### Introduction

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

Les méthodes traditionnelles de culture bactérienne sont souvent chronophages et fastidieuses. En comparaison, iQ-Check *Salmonella* II Kit constitue un test qualitatif rapide et simple permettant la détection de séquences d'ADN spécifiques de *Salmonella* spp. dans les échantillons de produits alimentaires destinés à la consommation humaine et animale et les échantillons environnementaux. Grâce à la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel, la séquence d'ADN spécifique de *Salmonella* spp. est amplifiée et détectée simultanément au moyen d'une sonde fluorescente. Il est possible de traiter jusqu'à 94 échantillons en une fois, avec un risque minimum de contamination et une procédure d'utilisation simple. Ce kit est destiné au personnel de laboratoire qualifié, qui réalise des tests de détection de *Salmonella* spp. La mise en œuvre de ce test permet l'obtention de résultats en quelques heures après l'enrichissement d'un échantillon.

## Section 2

### Technologie iQ-Check *Salmonella* spp. II

iQ-Check *Salmonella* II Kit est 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) spécifiques de *Salmonella* spp., ainsi que de l'ADN polymérase et des nucléotides. La détection et l'analyse des données sont optimisées pour l'utilisation avec un instrument de PCR en temps réel Bio-Rad, comme CFX96 Touch Deep Well System.

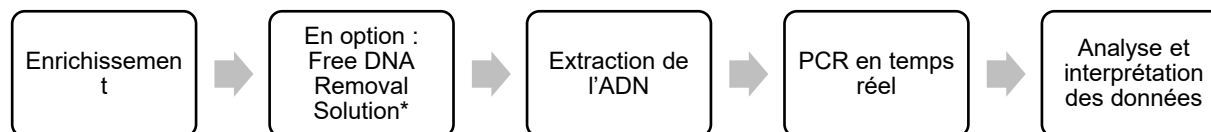
La PCR (amplification en chaîne par polymérase) est une technique puissante utilisée pour générer de nombreuses copies d'ADN cible. Durant la réaction de PCR, la succession de cycles de chauffage et de refroidissement permet une dénaturation de l'ADN, suivie d'une hybridation des amorces à la région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

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



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

Ce test permet la détection qualitative de *Salmonella* spp. dans les échantillons sélectifs de produits alimentaires destinés à la consommation humaine et animale et les échantillons environnementaux préalablement enrichis par culture. Il comprend les cinq étapes principales suivantes :



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

## Section 3

### Composants du kit

iQ-Check *Salmonella* spp. II Kit 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 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 :

## Section 5 Matériel requis non fourni

- Centrifugeuse de paillasse 10 000–12 000 x g
- Bloc de chauffage à sec à 37 ± 2 °C et/ou 95–100 °C
- Cell disruptor (par exemple, Disruptor Genie, Scientific Industries, Inc.) – pour le protocole Standard II
- 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
  - DW40 Deep Well Microplate Washer (n° de référence 90137) – pour le protocole Standard II
- Agitateur-mélangeur vortex
- Plaque d'agitation magnétique
- Micropipettes de 20, 200 et 1 000 µl
- Système de PCR en temps réel de Bio-Rad\*, par exemple CFX96 Touch Deep Well System (n° de référence 3600037) ou CFX Opus Deepwell System (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 : Eau peptonée tamponnée (EPT) (par exemple BPW Plus, n° de référence 3564684, base déshydratée, 500 g ; n° de référence 3554179, 225 ml x 6 flacons ; n° de référence 3555795, 3 L x 4 poches ; n° de référence 3555790, 5 L x 2 poches ; BPW Standard, n° de référence 12013259, base déshydratée, 500 g ; n° de référence 12013258, base déshydratée, 5 kg ; n° de référence 12013260, 5 L x 2 poches)
- Produits spécifiques pour l'enrichissement d'échantillons environnementaux de production primaire : RAPID' *Salmonella* Capsule (n° de référence 3564710, concentration 1x, 100 capsules ; 3564709, concentration 10x, 100 capsules ; 3564712, poudre, 100 tests)
- Supplément sélectif : Novobiocine
- PIF Supplement (n° de référence 12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (n° de référence 3594970)
- Produits spécifiques pour les échantillons environnementaux :
  - Éponges d'échantillonnage environnemental

- Écouvillons d'échantillonnage environnemental
- Bouillon neutralisant pour éponges et écouvillons, tel que Dey-Engley (D/E), HiCap ou bouillon 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 Films, 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 3594904 ou 12014473)
  - Embouts à filtre (n° de référence 3594902 ou 12014486, 50 µl x 5 760 ; n° de référence 3594902 ou 12014483, 1 000 µl x 3 840)
  - Tubes de mélange de PCR (n° de référence 12016673, 5 ml x 25)
- Produits spécifiques pour les protocoles d'extraction Standard II et Easy II :
  - Billes de lyse (réactif F) (n° de référence 3578136)
  - Embouts de pipette à large ouverture 200 µl
- RAPID'*Salmonella* Agar (n° de référence 3563961, 90 mm x 20 boîtes ; 3563963, 90 mm x 120 boîtes ; 3564705, base déshydratée, 500 g)
- 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
- Pipettes 1 et 10 ml
- Tubes à essai stériles de 2 et 5 ml
- Gants non poudrés
- Eau distillée stérile
- Eau de Javel, 5 %
- Agent nettoyant tel que DNA AWAY ou RNase AWAY

## Section 6

# 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 Salmonella II Kit
  - Tous les mélanges ou substances du kit de test sont des produits classés conformément au Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). Tout contact avec des acides peut entraîner la libération de gaz toxiques. Aucune précaution particulière n'est nécessaire si le kit est utilisé correctement. Si les produits sont inhalés, apporter de l'air frais et consulter un médecin en cas de troubles. En cas de contact avec les yeux, rincer l'œil ouvert pendant plusieurs minutes sous l'eau courante. Si les produits sont ingérés, provoquer le vomissement et appeler les secours médicaux.

- iQ-Check Prep System
  - Une utilisation incorrecte d'iQ-Check Prep System peut causer des blessures corporelles ou endommager l'instrument. En cas de manipulation incorrecte, certains composants peuvent entraîner un risque de blessures corporelles causées par une chaleur excessive. Pour une utilisation en toute sécurité, iQ-Check Prep System doit être uniquement manipulé par du personnel de laboratoire qualifié et ayant reçu une formation adéquate. La maintenance de l'instrument doit être réalisée uniquement par des techniciens de maintenance de Bio-Rad.
  
- Système de détection par PCR en temps réel CFX96 Touch Deep Well System ou CFX Opus Deepwell System
  - Une utilisation incorrecte du système de détection par 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, le système de détection en temps réel CFX Opus Deepwell doit être uniquement manipulé par du personnel de laboratoire qualifié et ayant reçu une formation adéquate. La maintenance de l'instrument doit être réalisée uniquement par des techniciens de maintenance de Bio-Rad.
  
- Enrichissement
  - L'utilisateur doit lire, comprendre et respecter toutes les informations de sécurité présentes dans les instructions de iQ-Check Salmonella II Kit. 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 pratiques standard en matière de sécurité en laboratoire, notamment porter des vêtements et lunettes/masque de protection appropriés pour manipuler les réactifs et échantillons contaminés. Éviter tout contact avec le contenu du milieu d'enrichissement et des tubes de réactif après amplification. Éliminer les échantillons enrichis conformément aux normes actuelles de l'industrie.
  - Salmonella est un organisme de niveau de biosécurité 2. Les échantillons biologiques tels que les enrichissements peuvent transmettre des maladies infectieuses. Respecter toutes les réglementations locales, étatiques/provinciales et/ou nationales applicables à l'élimination des déchets biologiques. Porter un équipement de protection approprié, ce qui comprend, sans s'y limiter : lunettes ou masque de protection, écran facial, vêtements de protection/blouse de laboratoire et gants. Tout travail doit être effectué dans des installations convenablement équipées, à l'aide des équipements de sécurité appropriés (par exemple, dispositifs de confinement physique). Le personnel doit être formé conformément aux exigences réglementaires et aux exigences de l'entreprise/de l'institution avant de travailler avec des substances potentiellement infectieuses.
  - Une fois l'analyse terminée, l'ensemble du matériel et des milieux de culture pouvant contenir des agents pathogènes doit être décontaminé 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 121 °C). Consulter la fiche de données de sécurité pour obtenir des informations supplémentaires ainsi que les réglementations locales relatives à l'élimination.

## Section 7

### Protocole

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

#### A. Enrichissement de l'échantillon

Pour un enrichissement d'une nuit, porter le milieu à température ambiante (20–25 °C) avant utilisation. Pour un enrichissement court (8 hr), porter le bouillon d'enrichissement à la température d'incubation de l'échantillon, avant utilisation. Les courtes durées d'enrichissement sont sensibles aux conditions d'incubation et les températures indiquées doivent être strictement respectées. La durée de préparation de l'échantillon (du préchauffage du bouillon d'enrichissement au début de l'incubation de l'échantillon alimentaire) ne doit pas dépasser 45 min. Il est recommandé d'utiliser un incubateur à ventilateur intégré.

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

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

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, respecter les normes ISO 6887-2 à 6887-6 en ce qui concerne la préparation des échantillons. Sans indication, les portions d'essai supérieures à 25 g n'ont pas été testées. Incuber, sans agiter, conformément aux durées et températures indiquées dans le tableau. Il est possible d'utiliser le protocole d'extraction d'ADN Standard I pour toutes les matrices, à l'exception des échantillons environnementaux de production primaire.

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

NF VALIDATION BRD 07/06 – 07/04 et NordVal 038		
Domaine (matrices)	Préparation des échantillons	Enrichissement/ Extraction de l'ADN
Échantillons de produits alimentaires destinés à la consommation humaine et animale et échantillons environnementaux <sup>1</sup>	Échantillons de petite taille : Dilution au 1:10 <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml d'EPT (25 g dans 225 ml)</li> </ul>	<b>Extraction Standard I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber pendant 16–24 hr à 37 ± 1 °C</li> <li>Format tube</li> </ul> <b>Extraction Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber pendant 20–24 hr à 37 ± 1 °C</li> <li>Format tube/Deep Well</li> </ul>
	Produits à base de viande crue (25 g, 375 g) <sup>2</sup>	Échantillons de 25 g : Dilution au 1:10 <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogénéiser 25 g de viande crue dans 225 ml d'EPT préchauffée</li> </ul> Échantillons de 375 g : Dilution au 1:4 <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogénéiser 375 g de viande crue dans 1 125 ml d'EPT préchauffée</li> </ul>

Échantillons environnementaux de production primaire	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon dans 9 x <i>n</i> ml d'EPT supplémentée avec la gelule RAPID' <i>Salmonella</i>	Extraction Standard II <sup>3</sup> ou Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber 18–26 hr à 41,5 ± 1 °C</li> <li>Transférer 100 µl dans 900 µl d'EPT fraîche</li> <li>Incuber pendant 4–6 hr à 37 ± 1 °C</li> </ul>
Préparations en poudre de lait infantile, céréales (avec ou sans probiotiques) et ingrédients associés (50-375 g) <sup>4</sup>	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 3 x <i>n</i> ml d'EPT avec PIF Supplement (375 g dans 1 125 ml)	Extraction Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber pendant 18–26 hr à 37 ± 1 °C</li> <li>Format tube/Deep Well</li> </ul>
Produits laitiers crus (jusqu'à 50 g)	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml d'EPT supplémentée avec 20 mg/L de novobiocine (50 g dans 450 ml)	Extraction Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber pendant 20–24 hr à 41,5 ± 1 °C</li> <li>Format tube/Deep Well</li> </ul>
Nourriture pour animaux domestiques et autres animaux (375 g)	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon dans 5 x <i>n</i> ml d'EPT préchauffée supplémentée avec la gelule RAPID' <i>Salmonella</i>	Extraction Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber pendant 18–24 hr à 37 ± 1 °C</li> <li>Format tube/Deep Well</li> </ul>
<b>AOAC OMA 2017.06</b>		
<b>Domaine (matrices)</b>	<b>Préparation des échantillons</b>	<b>Enrichissement/Extraction de l'ADN</b>
Produits alimentaires et surfaces environnementales sélectionnés	Échantillons de petite taille : Dilution au 1:10 <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml d'EPT (25 g dans 225 ml)</li> </ul>	Extraction Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber pendant 19–23 hr à 37 ± 1 °C</li> <li>Format tube/Deep Well</li> </ul>
	Échantillons de grand taille : Dilution au 1:4 <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 3 x <i>n</i> ml d'EPT (375 g dans 1 125 ml)</li> </ul>	
	Échantillons environnementaux <ul style="list-style-type: none"> <li>Humidifier les écouvillons et éponges avec un bouillon neutralisant qui ne contient pas de complexe aryle-sulfonate.</li> <li>Pour les surfaces analysées avec un écouvillon, échantillonner une zone de 2,54 x 2,54 cm.</li> <li>Pour les surfaces analysées avec une éponge, échantillonner une zone de 10,16 x 10,16 cm.</li> <li>Ajouter suffisamment d'EPT pour couvrir l'écouvillon (10 ml) ou l'éponge (100 ml)</li> </ul>	
Chocolat au lait (375 g)	Homogénéiser 375 g de chocolat au lait dans 3 000 ml d'un milieu avec lait écrémé	Extraction Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber pendant 18–22 hr à 37 ± 1 °C</li> <li>Format tube/Deep Well</li> </ul>
Rinçages de carcasse	Homogénéiser 30 ml de rinçage de carcasse dans 30 ml d'EPT	Extraction Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber pendant 20–22 hr à 37 ± 1 °C</li> <li>Format tube/Deep Well</li> </ul>
<b>AOAC PTM 010803</b>		
<b>Domaine (matrices)</b>	<b>Préparation des échantillons</b>	<b>Enrichissement/Extraction de l'ADN</b>
Bœuf cru haché et bœuf cru en morceaux (375 g) <sup>5,7</sup>	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 3 x <i>n</i> ml d'EPT préchauffée (375 g dans 1 125 ml)	Extraction Easy II <ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber pendant 8–22 hr à 41,5 ± 1 °C</li> <li>Format tube/Deep Well</li> </ul>
Épinards frais crus (375 g) <sup>5,7</sup>	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 3 x <i>n</i> ml d'EPT préchauffée (375 g dans 1 125 ml)	Extraction Easy II <ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber pendant 10–22 hr à 41,5 ± 1 °C</li> <li>Format tube/Deep Well</li> </ul>

## Section 7 Protocole

Laits en poudre (375 g) <sup>7</sup>	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 3 x <i>n</i> ml d'EPT avec PIF Supplement (375 g dans 1 125 ml)	Extraction Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber pendant 18–26 hr à 37 ± 1 °C</li> <li>Format tube/Deep Well</li> </ul>
Liqueur de chocolat et chocolat blanc (375 g) <sup>6,7</sup>	Homogénéiser 375 g d'échantillon alimentaire dans 3 000 ml d'EPT préchauffée	Extraction Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber pendant 18–26 hr à 37 ± 1 °C</li> <li>Format tube/Deep Well</li> </ul>
Fleur de cannabis (10 g) <sup>5,7</sup> et fleur de chanvre (25 g) <sup>5</sup>	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml d'EPT (10 g dans 90 ml d'EPT [fleur de cannabis] et 25 g dans 225 ml d'EPT [fleur de chanvre])	Extraction Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber pendant 20–22 hr à 37 ± 1 °C</li> <li>Format tube/Deep Well</li> </ul>
Chocolat et gummies au cannabis (25 g) et aux dérivés concentrés de cannabis (5 g) <sup>5,7</sup>	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml d'EPT (25 g dans 225 ml ou 5 g dans 45 ml).	Extraction Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber pendant 18–22 hr à 37 ± 1 °C</li> <li>Format tube/Deep Well</li> </ul>
Produits de viande végétale (375 g) <sup>7</sup>	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 3 x <i>n</i> ml d'EPT (375 g dans 1 125 ml)	Extraction Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber pendant 20–22 hr à 37 ± 1 °C</li> <li>Format tube/Deep Well</li> </ul>
Farine universelle (375 g) <sup>5,7</sup>	Dilution au 1:3 <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 3 x <i>n</i> ml d'EPT préchauffée avec PIF Supplement (375 g dans 1 125 ml + 150 µl de PIF Supplement préparé)</li> <li>Après enrichissement, transférer une aliquote de 1 à 5 ml dans un tube ou une plaque Deep Well et laisser reposer pendant 30 min au moins avant de procéder à l'extraction de l'ADN.</li> </ul> Dilution au 1:9 <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml d'EPT + PIF Supplement préchauffé (375 g dans 3 375 ml + 375 µl de PIF Supplement préparé)</li> </ul>	Extraction Easy II <ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber pendant 20–24 hr à 37 ± 1 °C</li> <li>Format tube/Deep Well</li> </ul>

**Se reporter à MFLP-38 pour les matrices et protocoles validés par Santé Canada**

<sup>1</sup> À l'exception des échantillons environnementaux de production primaire

<sup>2</sup> Protocole utilisé pour la détection simultanée d'*E. coli* O157:H7

<sup>3</sup> Le réactif de lyse utilisé est le réactif A uniquement (sans réactif F)<sup>4</sup>Le protocole est harmonisé avec les kits iQ-Check *Cronobacter* spp. et iQ-Check *Enterobacteriaceae*

<sup>5</sup> Protocole harmonisé avec les kits iQ-Check *E. coli* O157:H7 et iQ-Check STEC VirX

<sup>6</sup> La validation inclut de réaliser le test avec et sans le réactif iQ-Check Purification Reagent

<sup>7</sup> La validation inclut l'étalement directement sur les plaques gélosées *RAPID Salmonella*

## B. Traitement de l'ADN libre

iQ-Check Free DNA Removal Solution est un moyen idéal pour 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 :

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



3. Ouvrir les tubes et les puits avec précaution pour éviter les risques de contamination croisée.
4. Refroidir la plaque Deep Well avant de pipetter directement à travers le film préperforé.
5. Utiliser le barreau magnétique afin de maintenir le réactif de lyse en suspension. Pipetter en mélangeant à vitesse moyenne.
6. Dans un premier temps, agiter délicatement le réactif de lyse à la main pour remettre la résine en suspension. Garder le contenu en suspension pendant le pipettage en mélangeant à vitesse moyenne avec le barreau magnétique.
7. Pour les protocoles Easy II et Standard II, reconstituer le réactif de lyse final de la façon suivante :
  - a. Verser soigneusement tout le contenu du réactif F (billes de lyse) dans le réactif A (réactif de lyse).
  - b. Utiliser des consommables adaptés, avec un embout à large ouverture, pour permettre le pipettage du réactif de lyse homogénéisé.
  - c. Le réactif de lyse mélangé aux billes de lyse (réactifs A + F) présente une durée de conservation de 6 mois pour un stockage à 4 °C.

### **Protocole Easy I**

1. Aliquoter 100 µl du réactif de lyse homogénéisé (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 thermique 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 au moins 2 min. La centrifugation est inutile pour les plaques Deep Well.

### **Protocole Easy II**

1. Aliquoter 100 µl du réactif de lyse homogénéisé (réactifs A + F) dans les puits d'une plaque Deep Well.

**Remarque** : dans un premier temps, agiter doucement à la main le flacon de réactif de lyse afin de remettre en suspension les billes.

2. Ajouter 100 µl d'échantillon enrichi.

**Remarque** : agiter la suspension pour homogénéiser la culture et attendre le dépôt des débris avant la collecte de l'échantillon.

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.

## Section 7 Protocole

5. Placer les tubes dans le Cell disruptor pendant  $3 \pm 1$  min.
6. Incuber les tubes dans le bloc de chauffage à 95–100 °C pendant 10–15 min. Incuber la plaque Deep Well dans l'agitateur-incubateur à 1 300 rpm et 95–100 °C pendant 15–20 min.
7. Vortexer les tubes à grande vitesse et centrifuger à 10 000–12 000 x g pendant au moins 2 min. La centrifugation est inutile pour les plaques 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.

### Protocole Standard I

1. Prélever 1 ml d'échantillon enrichi décanté dans un tube.
2. Centrifuger à 10 000–12 000 x g pendant 5 min.
3. Éliminer le surnageant.
4. Ajouter 200 µl du réactif de lyse (réactif A) au culot obtenu.
5. Mélanger par aspiration/refoulement avec la pipette plusieurs fois pour remettre en suspension. Le nombre de fois dépend de l'échantillon.
6. Vortexer à grande vitesse et placer le tube dans le bloc de chauffage à 95–100 °C pendant 10–15 min.
7. Vortexer à grande vitesse et centrifuger à 10 000–12 000 x g pendant 5 min.

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

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

### Protocole Standard II

1. Prélever 1 ml d'échantillon enrichi décanté dans un tube ou dans un puits de plaque Deep Well. Sceller la plaque Deep Well avec un film plastique.

**Remarque :** agiter la suspension pour homogénéiser la culture et attendre le dépôt des débris avant la collecte de l'échantillon.

2. Centrifuger les tubes à 10 000–12 000 x g pendant 5 min. Éliminer le surnageant. Centrifuger les plaques Deep Well à 2 250 x g pendant 20 min et éliminer le surnageant manuellement ou à l'aide du DW40.
3. Ajouter 200 µl du réactif de lyse homogénéisé (réactifs A + F) au culot obtenu et mélanger par aspiration/refoulement avec la pipette. Fermer les tubes ou sceller la plaque Deep Well avec un film préperforé.

**Remarque** : dans un premier temps, agiter doucement à la main le flacon de réactif de lyse afin de remettre en suspension les billes. Pour les échantillons de production primaire, utiliser le réactif A sans le réactif F.

4. Placer les tubes dans le Cell disruptor pendant  $3 \pm 1$  min ou la plaque Deep Well dans l'agitateur-incubateur à 1 300–1 600 rpm et 95–100 °C pendant 15–20 min.
5. Incuber les tubes dans le bloc de chauffage à 95–100 °C pendant 10–15 min.
6. Vortexer les tubes à grande vitesse et centrifuger à 10 000–12 000 x g pendant 5 min. Centrifuger la plaque Deep Well à 2 250 x g pendant 2 min.

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

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

## 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 pipettage de l'annexe (Guide de calcul du mélange de PCR) pour trouver les volumes corrects pour chaque réactif.
2. 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.
3. Pipetter 45 µl de ce mélange de PCR dans chaque puits en fonction de la plaque préparée.
4. Pour purifier l'ADN, combiner 50 µl d'ADN extrait de chaque échantillon et 200 µl de réactif iQ-Check Purification Reagent. Pipetter par aspiration/refoulement 5 fois pour homogénéiser. Il est également possible de préparer une dilution à 1:10 d'ADN extrait, avec de l'eau stérile.
5. 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 pipettage. Sceller hermétiquement les puits de la plaque ou les bandes de tubes. Pipetter avec précaution afin d'éviter la formation de bulles au fond des puits. Étape facultative : centrifuger la plaque de PCR scellée ou les bandes de tubes (rotation rapide) afin d'éliminer les bulles éventuelles.
6. Placer la plaque ou les bandes de tubes dans le thermocycleur. Veiller à placer la plaque correctement, le puits A1 dans le coin supérieur gauche. Fermer le module réactionnel.

### 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.

Le fichier de protocole d'application « Salmo Fast » a été certifié par NF VALIDATION et AOAC PTM.

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

\* 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 *Salmonella* II **positif** doit présenter une courbe d'amplification typique et une valeur Cq  $\geq 10$  pour le fluorophore FAM.

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

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

- Si aucune valeur Cq n'est obtenue pour FAM et si le contrôle interne présente une valeur Cq  $\geq 28$ , l'échantillon est considéré négatif pour *Salmonella* spp.
- Un contrôle interne qui n'a pas non plus de valeur Cq (Cq = N/A) indique probablement un phénomène d'inhibition de la réaction de PCR. 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 du test est résumée dans le tableau suivant :

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

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

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

## Section 8

### Confirmation des résultats positifs

Dans le contexte de la validation AOAC, un résultat iQ-Check *Salmonella* II positif est présumé positif, et une confirmation selon une méthode de référence appropriée (par exemple, USDA MLG, FDA BAM, ISO, MFHPB, etc.) est recommandée. Il est également possible d'ensemencer 10  $\mu$ l d'EPT enrichie (avec les suppléments le cas échéant) directement sur le milieu chromogène RAPID'*Salmonella* avant d'incuber pendant  $24 \pm 2$  hr à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  (sauf pour la fleur de chanvre). Si le niveau de flore interférente est susceptible d'être élevé, transférer 0,5 ml d'EPT enrichie à 10 ml de bouillon Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) et incuber pendant  $24 \pm 3$  hr à  $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$  avant de strier 10  $\mu$ l du bouillon RVS enrichi sur le milieu chromogène RAPID'*Salmonella*. Se reporter à la méthode de confirmation du guide d'utilisation RAPID'*Salmonella* (document n° 10000126748).

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

#### Tous les échantillons à l'exception des échantillons de production primaire

1. Mise en œuvre des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées CEN ou ISO (y compris la purification), directement à partir du bouillon d'enrichissement d'EPT, après l'enrichissement complet de  $18 \pm 2$  hr à  $37^\circ\text{C}$ .
2. Ensemencement en stries de 10  $\mu$ l d'EPT enrichie (avec des suppléments le cas échéant) directement sur le milieu chromogène RAPID'*Salmonella* avant d'incuber pendant  $24 \pm 2$  hr

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

à  $37 \pm 1$  °C. Si le niveau de flore interférente est susceptible d'être élevé, transférer 0,5 ml d'EPT enrichie à 10 ml de bouillon Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) et incubé pendant  $24 \pm 3$  hr à  $41,5 \pm 1$  °C avant de strier 10 µl de bouillon RVS enrichi sur le milieu chromogène RAPID'*Salmonella*.

3. Utilisation de toute autre méthode certifiée par NF VALIDATION et basée sur un principe différent de celui utilisé dans le test PCR iQ-Check *Salmonella* II. Le protocole validé de cette seconde méthode doit être suivi dans sa totalité, y compris l'enrichissement sélectif RVS, selon le cas. La confirmation est mise en œuvre à partir du bouillon d'enrichissement à l'EPT, si cette étape est commune aux deux méthodes.

Il est possible de stocker l'EPT enrichie à 2–8 °C pendant 72 hr maximum, à la suite de la dernière incubation à 37 °C, à l'exception des échantillons de produits laitiers et de surface environnementale.

### Échantillons de production primaire

Démarrer le processus de confirmation à partir de l'enrichissement primaire, à la suite de la méthode du milieu MSRVI indiquée à l'annexe D de la norme ISO 6579/A1 et à l'aide du milieu RAPID'*Salmonella* pour l'isolement.

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

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, il est possible de stocker les poches d'enrichissement primaire jusqu'à 24 hr à 2–8 °C avant de poursuivre la confirmation.

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

## Section 9

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

iQ-Check *Salmonella* spp. II Kit peut également être utilisé pour confirmer des colonies isolées de *Salmonella* spp. sur milieux de culture gélosés. Cette méthode est officiellement validée par AFNOR Certification pour le milieu chromogène RAPID'*Salmonella*.

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

## Section 10

# Performance du test et validations

iQ-Check Salmonella II Kit est spécifiquement destiné à la détection du genre *Salmonella*.



BRD 07/10 – 04/05

MÉTHODES D'ANALYSE  
ALTERNATIVES POUR  
LE SECTEUR  
AGROALIMENTAIRE

### NF VALIDATION

iQ-Check Salmonella II Kit est certifié NF VALIDATION comme méthode alternative à la méthode de référence ISO 6579-1 (2017) pour la détection de *Salmonella* spp. dans tous les produits destinés à la consommation humaine et animale, ainsi que dans les échantillons environnementaux. La validation respecte le protocole de la norme ISO 16140:2016 et inclut l'utilisation des systèmes de détection par PCR en temps réel CFX96 Touch System, CFX96 Touch Deep Well System et CFX Opus Deepwell System. L'utilisation d'iQ-Check Free DNA Removal Solution est validée pour les échantillons de lait infantile en poudre et ingrédients associés, nourriture pour animaux domestiques et autres animaux. Le logiciel associé est CFX Manager IDE (version 2.2 et ultérieure). Le fichier de protocole d'application « Salmo Fast » est validé pour tous les échantillons. Numéro de certificat : BRD 07/06 – 07/04. Se reporter au certificat disponible sur le site Web AFNOR Certification Validations pour toutes les informations de validité.

OMA 2017.06



### Validation AOAC

iQ-Check *Salmonella* II Kit (protocole Easy) est validé par AOAC Research Institute sous la référence OMA 2017.06 pour la détection de *Salmonella* spp. dans les produits suivants : œufs (25 g), poulet haché cru (25 et 375 g), bœuf cru (25 g), porc cru (25 g), épinards frais (25 g et 375 g), melon (25 g), beurre de cacahuètes (25 g), jambon prêt-à-manger (375 g), surfaces environnementales sélectionnées, nourriture humide (25 g) et sèche (25 et 375 g) pour animaux de compagnie, chocolat au lait (375 g), fromage (375 g), rinçages de carcasse, liqueur de chocolat (375 g), chocolat blanc (375 g), lait en poudre (375 g), poudre de lactosérum (375 g), bœuf cru haché (375 g), bœuf cru en morceaux (375 g), fleur de cannabis (10 g), chocolat au cannabis (25 g), gummies au cannabis (25 g), dérivés concentrés de cannabis (5 g), fleur de chanvre (25 g), farine (375 g) et produits de viande végétale (375 g). Il convient de considérer un résultat positif avec le kit iQ-Check comme étant présumé et il est recommandé de le confirmer conformément aux recommandations de la section 8. Le fichier « Salmo Fast », l'utilisation d'iQ-Check Free DNA Removal Solution et des systèmes de PCR en temps réel CFX96 Touch Deep Well System et CFX Opus Deepwell System sont validés pour tous les échantillons. Le logiciel associé est CFX Manager IDE (version 2.2 et ultérieure).





### Validation Santé Canada

iQ-Check *Salmonella* II (protocole Easy) a été validé par Santé Canada (MFLP-38) pour la détection de *Salmonella* spp. Il convient de considérer un résultat positif avec iQ-Check Kit comme étant présumé et il est nécessaire de le confirmer selon le document MFHPB-20 (voir section 11, référence 5).



### Validation NordVal

iQ-Check *Salmonella* II Kit est validé par NordVal pour les protocoles Standard I et Easy I (microplaques) pour les échantillons de produits alimentaires destinés à la consommation humaine et animale et les échantillons environnementaux, ainsi que pour les protocoles Easy II (microplaques) pour les échantillons de viande crue. Le fichier de protocole d'application « Salmo Fast » est validé pour tous les échantillons. Numéro de certificat : 038. Se reporter au certificat disponible sur le site Web NordVal pour toutes les informations de validité.

## Section 11 Références

ISO 7218. Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations.

ISO 6887-4. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 4 : Règles spécifiques pour la préparation de produits variés.

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

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

Miras I et al. (1995). Nucleotide sequence of *iagA* and *iagB* genes involved in invasion of HeLa cells by *Salmonella enteritica* subsp. *Enteritica* ser. Typhi. *Res Microbiol* 46, 17–20.

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

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

Health Canada Health Products and Food Branch, MFHPB-20 Isolation and Identification of *Salmonella* from Food and Environmental Samples, *Compendium of Analytical Methods*, Volume 2, March 2009.

Health Canada Health Products and Food Branch, Part 4: Qualitative Methods, Procedure for the Development and Management of Food Microbiological Methods, *Compendium of Analytical Methods*, Volume 1.



## Section 12

### Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Octobre 2020	10000131519 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Renouvellement et extension de la validation AFNOR : Utilisation de FDRS (Free DNA Removal Solution) comme option, fichier de protocole d'application « Salmo Fast »</li> <li>- Nouvelle conception de document et mise à jour des références et du contenu</li> <li>- Modification du numéro de document (version précédente 808463 Rev G)</li> </ul>
Février 2023	10000131519 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ajout de nouvelles références pour les consommables et équipements</li> <li>- Clarification du protocole d'interprétation des résultats</li> <li>- Extension AOAC : nouvelles matrices, FDRS, fichier de protocole d'application « Salmo Fast »</li> <li>- Remplacement de la section protocole avec un tableau récapitulatif</li> <li>- Mise à jour du champ de validation NordVal</li> <li>- Extension des validations pour le système de détection par PCR en temps réel CFX Opus Deepwell et mise à jour vers CFX Manager Software IDE version 3.1.</li> <li>- Extension de la validation AFNOR pour la nourriture pour animaux domestiques et autres animaux</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	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

Visitez [bio-rad.com/iqcheck](http://bio-rad.com/iqcheck) pour plus 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 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23  
**Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280  
**Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23  
**Russian Federation** 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188  
**South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23 **Sweden** 00 800 00 24 67 23  
**Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311  
**United Arab Emirates** 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

---

Sig 0122



---

# iQ-Check *Salmonella* spp. II Kit

## Anwenderhandbuch

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

Katalog-Nr. 3578123



# Inhaltsverzeichnis

Abschnitt 1.	Einleitung .....	1
Abschnitt 2.	Die iQ-Check <i>Salmonella</i> spp. II-Technologie .....	1
Abschnitt 3.	Zusammensetzung des Kits .....	2
Abschnitt 4.	Haltbarkeit und Lagerung .....	2
Abschnitt 5.	Zusätzlich benötigtes Material .....	2
	Geräte .....	2
	Zubehör .....	3
Abschnitt 6.	Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse .....	4
Abschnitt 7.	Protokoll .....	6
	Probenanreicherung .....	6
	Behandlung zur Entfernung freier DNA .....	9
	DNA-Extraktion .....	9
	Real-Time PCR .....	12
	Datenanalyse .....	12
Abschnitt 8.	Bestätigung positiver Ergebnisse .....	14
Abschnitt 9.	Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit .....	15
Abschnitt 10.	Testleistung und Testvalidierungen .....	16
Abschnitt 11.	Literatur .....	17
Abschnitt 12.	Revisionshistorie .....	18
	Anhang — Pipettiertabelle für das PCR-Reaktionsgemisch .....	19

## Abschnitt 1 Einleitung

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

Klassische Anzuchtmethoden sind oftmals langwierig und mühsam. Bei dem iQ-Check *Salmonella* II Kit dagegen handelt es sich um einen einfachen und schnellen qualitativen Test zum Nachweis *Salmonella* spp. spezifischer DNA-Sequenzen in Lebensmittelerzeugnissen, Futtermitteln und Umgebungsproben. Mithilfe der Real-Time PCR werden *Salmonella* spp. spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert und durch fluoreszierende Sonden gleichzeitig nachgewiesen. In einem einfach durchzuführenden Verfahren können bei minimalem Kontaminationsrisiko bis zu 94 Proben auf einmal bearbeitet werden. Dieses Kit ist zur Verwendung durch geschultes Laborpersonal bestimmt, das Tests zum Nachweis von *Salmonella* spp. durchführt. Der vorliegende Test liefert Ergebnisse bereits innerhalb weniger Stunden nach der Anreicherung einer Probe.

## Abschnitt 2 Die iQ-Check *Salmonella* spp. II-Technologie

Das iQ-Check *Salmonella* II Kit beruht auf der Amplifizierung und dem Nachweis von Genen mittels Real-Time PCR. Die gebrauchsfertigen PCR-Reagenzien im Kit enthalten *Salmonella* spp. spezifische Oligonukleotide (Primer und Sonden) sowie DNA-Polymerase und Nukleotide. Der Nachweis und die Datenanalyse sind für die Verwendung 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 in mehreren Erwärmungs- und Abkühlzyklen durch Hitze denaturiert. Danach binden Primer an die Zielregion. Die DNA-Polymerase verwendet diese Primer und die Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) zur Verlängerung der DNA, wodurch Kopien der Ziel-DNA erzeugt werden. Diese Kopien werden als Amplikons bezeichnet.

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

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

Dieser Test ermöglicht den Nachweis von *Salmonella* spp. in bestimmten Lebensmittelerzeugnissen, Tierfuttermitteln und Umgebungsproben nach vorhergehender Anreicherung durch Kultur. 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 *Salmonella* spp. II 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 2–8 °C aufbewahrt werden. Bei Aufbewahrung bei dieser Temperatur können die Reagenzien bis zu dem auf den Röhrchen angegebenen Verfallsdaten 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
  - Zellaufschlussgerät (z. B. Disruptor Genie, Scientific Industries, Inc.) – für Standardprotokoll II
- Speziell für die Extraktion in einer Deep Well Platte:

## Abschnitt 5 Zusätzlich benötigtes Material

- Thermoshaker mit Heizfunktion\*, der eine Temperatur von  $37 \pm 2$  °C und/oder 95–100 °C aufrecht erhalten kann, mit einer Mischgeschwindigkeit von mindestens 1.300 rpm
- DW40 Deep Well Microplate Washer (Katalog-Nr. 90137) – für Protokoll Standard II
- Vortex
- Magnetrührer
- Mikropipetten für 20 µl, 200 µl, 1.000 µl
- Bio-Rad Real-Time PCR System,\* zum Beispiel das CFX96 Touch Deep Well (Katalog-Nr. 3600037) oder CFX Opus Deep Well (Katalog-Nr. 17007991)
- iQ-Check Prep System von Bio-Rad für die automatisierte DNA-Extraktion und PCR-Plattenvorbereitung (Katalog-Nr. 3594911)

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

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

## Zubehör

- Anreicherungsmedium: Gepuffertes Peptonwasser (GPW; Buffered Peptone Water, z. B. BPW Plus, Katalog-Nr. 3564684, dehydriert, 500 g; Katalog-Nr. 3554179, 6 Flaschen x 225 ml; Katalog-Nr. 3555795, 4 Beutel x 3 L; Katalog-Nr. 3555790, 2 Beutel x 5 L BPW Standard, Katalog-Nr. 12013259, dehydriert, 500 g; Katalog-Nr. 12013258, dehydriert, 5 kg; Katalog-Nr. 12013260, 2 Beutel x 5 L)
- Speziell zur Anreicherung von Umgebungsproben aus der Primärproduktion: RAPID'*Salmonella* Capsule (RAPID'*Salmonella* Kapsel, Katalog-Nr. 3564710, 1x konzentriert, 100 Kapseln; 3564709, 10x konzentriert, 100 Kapseln; 3564712, Pulver, 100 Tests)
- Selektives Supplement: Novobiocin
- PIF Supplement (Katalog-Nr. 12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (Lösung zur Entfernung von freier DNA, Katalog-Nr. 3594970)
- Speziell für die Untersuchung von Umgebungsproben:
  - Schwämme zur Gewinnung von Umgebungsproben
  - Tupfer zur Gewinnung von Umgebungsproben
  - Neutralisierungsmedium für Probennahme-Schwämme und -Tupfer, z. B. Dey-Engley (D/E) oder HiCap Neutralizing Broth oder Letheen Broth
- Speziell für die Extraktion in Röhrchen
  - Konische sterile 1,5 ml Röhrchen mit Schraubdeckel (z. B. Katalog-Nr. 2240110XTU)
- Speziell für die Extraktion in einer Deep Well Platte
  - Deep Well Platte mit 96 Wells (iQ-Check Deep Well Microplates, Katalog-Nr. 3594900)
  - Abdichtungsfolie aus Kunststoff (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, Katalog-Nr. 3590139)
  - Verschlussfolie für PCR-Platten (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 Behälter zum Herstellen von Verdünnungen (Katalog-Nr. 3594904 oder 12014473)
  - Filterspitzen (Katalog-Nr. 3594902 oder 12014486, 5.760 x 50 µl; Katalog-Nr. 3594903 oder 12014483, 3.840 x 1.000 µl)
  - PCR-Mix Röhrchen (Katalog-Nr. 12016673, 25 x 5 ml)
- Speziell für die Extraktionsprotokolle Standard II und Easy II:
  - Lysis Beads Reagenz F (Katalog-Nr. 3578136)
  - 200-µl-Pipettenspitzen mit weiter Öffnung
- RAPID'*Salmonella* Agar (Katalog-Nr. 3563961, 20 Platten x 90 mm; Katalog-Nr. 3563963, 120 Platten x 90 mm Katalog-Nr. 3564705, dehydriert, 500 g)
- PCR-Platten, -Röhrchen, -Abdichtungsfolie und -Deckel
- Sterile Filterspitzen für 20 µl, 200 µl und 1.000 µl Mikropipetten
- Sterile, einzeln verpackte Spitzen für Combipip-Pipetten oder äquivalente Mehrfachpipetten
- 1 ml und 10 ml Pipetten
- Sterile 2 ml und 5 ml Teströhrchen
- Ungepuderte Handschuhe
- Destilliertes steriles Wasser
- 5%ige Bleichlösung
- Reinigungsmittel wie DNA AWAY oder RNase AWAY

## Abschnitt 6

### Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse

- Dieser Test muss von geschultem Personal durchgeführt werden.
- Proben und Anreicherungskulturen sind bei der Handhabung als potenziell infektiös zu betrachten und im Einklang mit vor Ort geltenden Verordnungen und Bestimmungen zu entsorgen.
- Alle potenziell infektiösen Materialien sollten vor dem Entsorgen autoklaviert werden.
- Die Ergebnisqualität hängt von der strikten Einhaltung der guten Laborpraxis ab (zum Beispiel der Norm EN ISO 7218). In Bezug auf die PCR ist vor allem Folgendes zu beachten:
  - Laborgeräte (Pipetten, Röhrchen usw.) nie von einem Arbeitsplatz zu einem anderen bringen.
  - Bei jeder Serie von Amplifikationsreaktionen eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle verwenden.
  - Die Reagenzien nach Ablauf ihres Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
  - Die Reagenzien aus dem Kit vor dem Gebrauch auf dem Vortex mischen, um ihre Homogenität sicherzustellen.

## Abschnitt 6 Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse

- 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 Salmonella II Kit
  - Alle Substanzen oder Mischungen in dem Testkit sind klassifizierte Produkte gemäß dem globalen vereinheitlichten System (Global Harmonized System, GHS). Der Kontakt mit Säuren kann zur Freisetzung giftiger Gase führen. Bei korrekter Anwendung sind keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen erforderlich. Bei Einatmen des Produkts Frischluft zuführen und bei Beschwerden einen Arzt hinzuziehen. Nach Augenkontakt mit dem Produkt das geöffnete Auge mehrere Minuten unter fließendem Wasser ausspülen. Wenn die Produkte verschluckt werden, Erbrechen herbeiführen und ärztliche Hilfe anfordern.
- iQ-Check Prep System
  - Die unsachgemäße Verwendung des iQ-Check Prep Systems kann zu Personenverletzungen oder Schäden am Gerät führen. Einige Komponenten können bei unsachgemäßer Handhabung aufgrund übermäßiger Hitze zu Personenverletzungen führen. Zur sicheren Verwendung darf das iQ-Check Prep System nur von qualifiziertem Laborpersonal verwendet werden, das entsprechend geschult wurde. Die Instrumente dürfen nur von Kundendiensttechnikern im Außendienst gewartet werden.
- Real-Time PCR Nachweissystem CFX96 Touch Deep Well oder CFX Opus Deep Well
  - Die unsachgemäße Verwendung des Real-Time PCR Nachweissystems CFX96 Touch Deep Well oder CFX Opus Deepwell kann zu Personenverletzungen oder Schäden am Gerät führen. Einige Komponenten können bei unsachgemäßer Handhabung aufgrund übermäßiger Hitze zu Personenverletzungen führen. Zur sicheren Verwendung dürfen die Real-Time PCR Nachweissysteme CFX96 Touch Deep Well und CFX Opus Deepwell nur von qualifiziertem Laborpersonal verwendet werden, das entsprechend geschult wurde. Die Instrumente dürfen nur von Kundendiensttechnikern im Außendienst gewartet werden.
- Anreicherung
  - Benutzer sollte alle Sicherheitsinformationen in der Anweisung des iQ-Check Salmonella II Kit lesen, verstehen 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.

- *Salmonella* ist ein Organismus der Biosicherheitsstufe 2. Biologische Proben, z. B. Anreicherungen, können Infektionskrankheiten übertragen. Es sind alle geltenden lokalen, staatlichen/regionalen und/oder nationalen Vorschriften zur Entsorgung von biologischen Abfällen einzuhalten. Geeignete Schutzausrüstung tragen. Dazu zählen u. a. Schutzbrille, Gesichtsschutz, Kleidung/Laborkittel und Handschuhe. Alle Arbeiten sollten in ordnungsgemäß ausgestatteten Einrichtungen unter Verwendung der entsprechenden Sicherheitsausrüstung (z. B. physikalische Eindämmungsvorrichtungen) durchgeführt werden. Mitarbeiter sollten vor der Arbeit mit potenziell infektiösen Materialien nach den geltenden Bestimmungen und Anforderungen der Firma/Institution geschult werden.
- Nach Abschluss der Tests sind alle Materialien und Medien, die möglicherweise Krankheitserreger enthalten, im Einklang mit den geltenden Industriestandards für die Entsorgung kontaminierter Abfälle zu dekontaminieren (d. h. 20 min bei 121 °C autoklavieren). Weitere Informationen und vor Ort geltende Entsorgungsvorschriften sind im Sicherheitsdatenblatt aufgeführt.

## Abschnitt 7

### Protokoll

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

#### A. Probenanreicherung

Zur Anreicherung über Nacht das Medium vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20–25 °C) erwärmen. Bei einer kurzen Anreicherung (8 hr) die Anreicherungsbouillon vor der Verwendung auf die Inkubationstemperatur der Probe erwärmen. Bei kurzen Anreicherungszeiten müssen die Inkubationsbedingungen und die angegebenen Temperaturen strikt eingehalten werden. Die Dauer der Probenvorbereitung (Zeit zwischen dem Vorheizen der Anreicherungsbouillon und dem Beginn der Inkubation der Lebensmittelprobe) darf 45 min nicht überschreiten. Es wird empfohlen, einen belüfteten Inkubator zu verwenden.

Die Verwendung eines Anreicherungsbeutels mit eingebautem Filter wird dringend empfohlen.

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

Im Rahmen der NF Validation sind für die Probenvorbereitung die ISO-Normen 6887-2 bis -6 zu beachten. Sofern nichts anderes angegeben ist, wurden keine Mengen über 25 g getestet. Bei der Inkubation sind die in der Tabelle angegebenen Zeiten und Temperaturen einzuhalten. Nicht schütteln. Das DNA-Extraktionsprotokoll Standard I kann für alle Matrices verwendet werden, außer für Umgebungsproben aus der Primärproduktion.

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

Abschnitt 7 Protokoll

NF VALIDATION BRD 07/06 – 07/04 und NordVal 038		
Umfang (Matrices)	Probenvorbereitung	Anreicherung/ DNA-Extraktion
Lebensmittelerzeugnisse, Tierfutter & Umgebungsproben <sup>1</sup>	Kleine Probenmengen: 1:10 Verdünnung <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>n</math> g Lebensmittelerzeugnis in <math>9 \times n</math> ml GPW homogenisieren (25 g in 225 ml).</li> </ul>	<b>Standard I Extraktion</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Für 16–24 hr bei <math>37 \pm 1</math> °C inkubieren.</li> <li>▪ Röhrchenformat</li> </ul> <b>Easy I Extraktion</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Für 20–24 hr bei <math>37 \pm 1</math> °C inkubieren.</li> <li>▪ Röhrchen/ Deep Well-Format</li> </ul>
Rohfleischerzeugnisse (25 g, 375 g) <sup>2</sup>	Probenmenge 25 g: 1:10 Verdünnung <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 25 g Rohfleisch in 225 ml vorgewärmtem GPW homogenisieren.</li> </ul>	Easy II Extraktion aus 25 g Proben <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Für 8–16 hr bei <math>41,5 \pm 1</math> °C inkubieren.</li> <li>▪ Röhrchen/ Deep Well-Format</li> </ul>
	Probenmenge 375 g: 1:4 Verdünnung <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 375 g Rohfleisch in 1.125 ml vorgewärmtem GPW homogenisieren.</li> </ul>	Easy II Extraktion aus 375 g Proben <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Für 10–18 hr bei <math>41,5 \pm 1</math> °C inkubieren.</li> <li>▪ Röhrchen/ Deep Well-Format</li> </ul>
Proben aus dem Umfeld der Primärproduktion	$n$ g Probe in $9 \times n$ ml GPW mit zugesetzter RAPID' <i>Salmonella</i> Kapsel homogenisieren.	Standard II <sup>3</sup> oder Easy I Extraktion <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Für 18–26 hr bei <math>41,5 \pm 1</math> °C inkubieren</li> <li>▪ 100 µl in 900 µl frisches GPW überführen.</li> <li>▪ Für 4–6 hr bei <math>37 \pm 1</math> °C inkubieren.</li> </ul>
Säuglingsnahrung und Zerealien mit und ohne Probiotika, Zutaten (50–375 g) <sup>4</sup>	$n$ g Lebensmittel in $3 \times n$ ml GPW mit PIF Supplement homogenisieren (375 g in 1.125 ml).	Easy I Extraktion <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Für 18–26 hr bei <math>37 \pm 1</math> °C inkubieren.</li> <li>▪ Röhrchen/ Deep Well-Format</li> </ul>
Rohmilcherzeugnisse (bis zu 50 g)	$n$ g Lebensmittel in $9 \times n$ ml GPW mit 20 mg/L Novobiocin homogenisieren (50 g in 450 ml).	Easy I Extraktion <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Für 20–24 hr bei <math>41,5 \pm 1</math> °C inkubieren.</li> <li>▪ Röhrchen/ Deep Well-Format</li> </ul>
Tiernahrung und Futtermittel (375 g)	$n$ g Probe in $5 \times n$ ml vorgewärmtem GPW mit zugesetzter RAPID' <i>Salmonella</i> Kapsel homogenisieren.	Easy I Extraktion <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Für 18–24 hr bei <math>37 \pm 1</math> °C inkubieren.</li> <li>▪ Röhrchen/ Deep Well-Format</li> </ul>

AOAC OMA 2017.06		
Umfang (Matrices)	Probenvorbereitung	Anreicherung/ DNA-Extraktion
Bestimmte Lebensmittelerzeugnisse und Umweltflächen	Kleine Probenmengen: 1:10 Verdünnung <ul style="list-style-type: none"> <li><math>n</math> g Lebensmittelerzeugnis in <math>9 \times n</math> ml GPW homogenisieren (25 g in 225 ml).</li> </ul>	Easy I Extraktion <ul style="list-style-type: none"> <li>Für 19–23 hr bei <math>37 \pm 1</math> °C inkubieren.</li> <li>Röhrchen/ Deep Well-Format</li> </ul>
	Große Probenmengen: 1:4 Verdünnung <ul style="list-style-type: none"> <li><math>n</math> g Lebensmittelerzeugnis in <math>3 \times n</math> ml GPW homogenisieren (375 g in 1.125 ml).</li> </ul>	
	Umgebungsproben <ul style="list-style-type: none"> <li>Tupfer und Schwämme mit einer neutralisierenden Nährlösung befeuchten, die keinen Arylsulfonatkomplex enthält.</li> <li>Bei Verwendung eines Tupfers sollte die Probe von einer Fläche der Größe 2,54 x 2,54 cm genommen werden.</li> <li>Bei Verwendung eines Schwamms sollte die Probe von einer Fläche der Größe 10,16 x 10,16 cm genommen werden.</li> <li>Ausreichend GPW zugeben, um den Tupfer oder den Schwamm zu bedecken (10 ml bzw. 100 ml).</li> </ul>	
Milchschokolade (375 g)	375 g Milchschokolade in 3.000 ml Magermilchmedium homogenisieren.	Easy I Extraktion <ul style="list-style-type: none"> <li>Für 18–22 hr bei <math>37 \pm 1</math> °C inkubieren.</li> <li>Röhrchen/ Deep Well-Format</li> </ul>
Schlachtkörper- Abspülflüssigkeit	30 ml Schlachtkörper-Abspülflüssigkeit in 30 ml GPW homogenisieren.	Easy I Extraktion <ul style="list-style-type: none"> <li>Für 20–22 hr bei <math>37 \pm 1</math> °C inkubieren.</li> <li>Röhrchen/ Deep Well-Format</li> </ul>
AOAC PTM 010803		
Umfang (Matrices)	Probenvorbereitung	Anreicherung/ DNA-Extraktion
Rohes Rinderhackfleisch und Abschnitte von rohem Rindfleisch (375 g) <sup>5,7</sup>	$n$ g Lebensmittelerzeugnis in $3 \times n$ ml vorgewärmtem GPW homogenisieren (375 g in 1.125 ml).	Easy II Extraktion <ul style="list-style-type: none"> <li>Für 8–22 hr bei <math>41,5 \pm 1</math> °C inkubieren.</li> <li>Röhrchen/ Deep Well-Format</li> </ul>
Frischer Rohspinat (375 g) <sup>5,7</sup>	$n$ g Lebensmittelerzeugnis in $3 \times n$ ml vorgewärmtem GPW homogenisieren (375 g in 1.125 ml).	Easy II Extraktion <ul style="list-style-type: none"> <li>Für 10–22 hr bei <math>41,5 \pm 1</math> °C inkubieren.</li> <li>Röhrchen/ Deep Well-Format</li> </ul>
Milchpulver (375 g) <sup>7</sup>	$n$ g Lebensmittel in $3 \times n$ ml GPW mit PIF Supplement homogenisieren (375 g in 1.125 ml).	Easy I- Extraktion <ul style="list-style-type: none"> <li>Für 18–26 hr bei <math>37 \pm 1</math> °C inkubieren.</li> <li>Röhrchen/ Deep Well-Format</li> </ul>
Schokoladenlikör und weiße Schokolade (375 g) <sup>6,7</sup>	375 g Lebensmittel in 3.000 ml vorgewärmtem GPW homogenisieren.	Easy I Extraktion <ul style="list-style-type: none"> <li>Für 18–26 hr bei <math>37 \pm 1</math> °C inkubieren.</li> <li>Röhrchen/ Deep Well-Format</li> </ul>
Cannabis-Blüten (10 g) <sup>5,7</sup> und Hanfblüten (25 g) <sup>5</sup>	$n$ g Lebensmittel in $9 \times n$ ml GPW homogenisieren (10 g in 90 ml GPW bei Cannabis-Blüten und 25 g in 225 ml GPW bei Hanfblüten)	Easy I Extraktion <ul style="list-style-type: none"> <li>Für 20–22 hr bei <math>37 \pm 1</math> °C inkubieren.</li> <li>Röhrchen/ Deep Well-Format</li> </ul>

## Abschnitt 7 Protokoll

Cannabis angereicherte Schokolade und Gummibärchen (25 g) und Cannabis-Konzentrate (5 g) <sup>5,7</sup>	<i>n</i> g Lebensmittel in 9 x <i>n</i> ml BPW (25 g in 225 ml oder 5 g in 45 ml) homogenisieren.	Easy I Extraction <ul style="list-style-type: none"> <li>Für 20–22 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren</li> <li>Röhrchen/ Deep Well-Format</li> </ul>
Pflanzliche Fleischerzeugnisse (375 g) <sup>7</sup>	<i>n</i> g Lebensmittelerzeugnis in 3 x <i>n</i> ml GPW homogenisieren (375 g in 1.125 ml).	Easy I Extraktion <ul style="list-style-type: none"> <li>Für 20–22 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren.</li> <li>Röhrchen/ Deep Well-Format</li> </ul>
Weizenmehl Type 405 (375 g) <sup>5,7</sup>	1:3 Verdünnung <ul style="list-style-type: none"> <li><i>n</i> g Lebensmittelerzeugnis in 3 x <i>n</i> ml vorgewärmtem GPW + PIF Supplement homogenisieren (375 g in 1.125 ml + 150 µl zubereitetes PIF Supplement)</li> <li>Nach der Anreicherung ein 1 bis 5 ml Aliquot in ein Röhrchen oder eine Deep-Well Platte überführen und mindestens 30 min ruhen lassen, bevor Sie mit der DNA-Extraktion fortfahren</li> </ul> 1:9 Verdünnung <ul style="list-style-type: none"> <li><i>n</i> g Lebensmittelerzeugnis in 9 x <i>n</i> ml vorgewärmtem GPW + PIF Supplement homogenisieren (375 g in 3.375 ml + 375 µl zubereitetes PIF Supplement)</li> </ul>	Easy II Extraktion <ul style="list-style-type: none"> <li>Für 20–24 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren.</li> <li>Röhrchen/ Deep Well-Format</li> </ul>
<b>Siehe MFLP-38 bezüglich Matrices und Protokollen mit Freigabe von Health Canada</b>		

<sup>1</sup> Außer Umgebungsproben aus der Primärproduktion.

<sup>2</sup> Für den gleichzeitigen Nachweis von *E. coli* O157:H7 verwendetes Protokoll.

<sup>3</sup> Als Lysereagens wird nur Reagenz A verwendet (ohne Reagenz F)

<sup>4</sup> Das Protokoll ist auf das iQ-Check *Cronobacter* spp. und das iQ-Check *Enterobacteriaceae* Kit abgestimmt.

<sup>5</sup> Mit dem iQ-Check *E. coli* O157:H7 und dem iQ-Check STEC VirX Kit abgestimmtes Protokoll.

<sup>6</sup> Die Validierung umfasst die Durchführung des Tests mit und ohne iQ-Check Purification Reagent

<sup>7</sup> Die Validierung umfasst einen direkten Ausstrich auf RAPID<sup>®</sup> *Salmonella* Platten

## 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. 10000058391).

## C. DNA-Extraktion

Allgemeine Empfehlungen:

- Den Heizblock oder den Thermoshaker zum Vorheizen einschalten, bevor mit dem Test begonnen wird. Auf 95–100 °C einstellen. Das Lysereagens während des Pipettierens durch Rühren bei mittlerer Geschwindigkeit auf einer Magnetrührplatte in Suspension halten.
- 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.
- Beim Öffnen von Röhrchen und Wells vorsichtig vorgehen, um eine mögliche Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Die Deep Well Platte kühlen, bevor direkt durch die vorgestanzte Abdichtungsfolie pipettiert wird.

5. Den Magnetrührer verwenden, um das Lysereagenz in Suspension zu halten. Den Pipettiervorgang durchführen, während es bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt wird.
6. Das Lysereagenz zuerst vorsichtig per Hand schütteln, um das Harz zu resuspendieren. Den Inhalt der Flasche pipettieren, während er bei mittlerer Geschwindigkeit mit dem Magnetrührstab gerührt wird, damit er in Suspension bleibt.
7. Bei Verwendung der Protokolle Easy II und Standard II das Lysereagenz zur Herstellung der Arbeitslösung wie folgt rekonstituieren:
  - a. Den Inhalt von Reagenz F (Lysis Beads) vollständig zu Reagenz A (Lysereagenz) geben.
  - b. Zum Pipettieren des homogenisierten Lysereagenzes Pipettenspitzen mit ausreichend großer Öffnung verwenden.
  - c. Das mit Lysis Beads gemischte Lysereagenz (Reagenz A + F) ist bei 4 °C für 6 Monate haltbar.

### **Protokoll Easy I**

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

### **Protokoll Easy II**

1. 100 µl homogenisiertes Lysereagenz (Reagenz A + F) in Wells einer Deep Well Platte aliquotieren.

**Hinweis:** Das Lysereagenz zuerst vorsichtig per Hand schütteln, um die Beads zu resuspendieren.

2. 100 µl der angereicherten Probe dazugeben.

**Hinweis:** Die Suspension schütteln, um die Kultur zu homogenisieren, und dann vor der Probenentnahme alle Partikel absetzen lassen.

3. Die Lösung durch Auf- und Abpipettieren mischen, bis sie homogen ist.
4. Die Röhrchen verschließen bzw. die Deep Well Platte mit vorgestanzter Abdichtungsfolie verschließen.
5. Die Röhrchen für 3 ± 1 min in den Cell Disruptor geben.
6. Die Röhrchen für 10–15 min in den auf 95–100 °C vorgeheizten Heizblock stellen bzw. die Deep Well Platte für 15–20 min unter Agitation bei 1.300 rpm bei 95–100 °C in den Thermoshaker stellen.
7. Die Röhrchen bei hoher Geschwindigkeit vortexen und dann mindestens 2 min bei 10.000–12.000 x g zentrifugieren. Die Deep Well Platte muss nicht zentrifugiert werden.

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

## Abschnitt 7 Protokoll

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

### Protokoll Standard I

1. 1 ml dekantierte angereicherte Probe in ein Röhrchen überführen.
2. Bei 10.000–12.000 x g 5 min zentrifugieren.
3. Den Überstand vollständig verwerfen.
4. Zu dem Pellet 200 µl Lysereagenz (Reagenz A) geben.
5. Das Pellet durch Auf- und Abpipettieren in dem Röhrchen vollständig resuspendieren. Die Häufigkeit des Auf- und Abpipettierens hängt von der Probe.
6. Den Inhalt des Röhrchens bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortex mischen und das Röhrchen dann für 10–15 min bei 95–100 °C in den Heizblock stellen.
7. Den Inhalt des Röhrchens bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortex mischen und dann 5 min bei 10.000–12.000 x g zentrifugieren.

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

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

### Protokoll Standard II

1. 1 ml dekantierte angereicherte Probe in ein Röhrchen oder in ein Well einer Deep Well Platte überführen. Die Deep Well Platte mit Kunststoffabdichtungsfolie verschließen.

**Hinweis:** Die Suspension schütteln, um die Kultur zu homogenisieren, und dann vor der Probenentnahme alle Partikel absetzen lassen.

2. Die Röhrchen bei 10.000–12.000 x g 5 min zentrifugieren. Den Überstand verwerfen. Die Deep Well Platten 20 min bei 2.250 x g zentrifugieren und den Überstand manuell oder mithilfe des DW40 verwerfen.
3. 200 µl homogenisiertes Lysereagenz (Reagenz A + F) zu dem Pellet geben und das Pellet durch Auf- und Abpipettieren des Reagenzes resuspendieren. Die Röhrchen verschließen bzw. die Deep Well Platte mit vorgestanzter Abdichtungsfolie verschließen.

**Hinweis:** Das Lysereagenz zuerst vorsichtig per Hand schütteln, um die Lysis Beads zu resuspendieren. Bei Proben aus der Primärproduktion Reagenz A ohne Reagenz F verwenden.

4. Das Röhrchen für  $3 \pm 1$  min in das Zellaufschlussgerät geben bzw. die Deep Well Platte für 15–20 min bei 1.300–1.600 rpm und 95–100 °C im Thermoshaker schütteln.
5. Die Röhrchen für 10–15 min in den jeweiligen auf 95–100 °C vorgeheizten Heizblock stellen.
6. Die Röhrchen bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortex mischen und 5 min bei 10.000–12.000 x g zentrifugieren. Die Deep Well Platte 2 min bei 2.250 x g zentrifugieren.

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

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



## 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 müssen 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.
2. Das PCR-Reaktionsgemisch (Reagenz B + C) sofort nach der Zubereitung verwenden. Es ist bei 2–8 °C maximal 1 hr stabil.
3. Aus diesem PCR-Reaktionsgemisch dem jeweils verwendeten Platten-Layout entsprechend 45 µl in jedes Well pipettieren.
4. Zum Aufreinigen von DNA 50 µl aus jeder Probe extrahierte DNA mit 200 µl iQ-Check Purification Reagent kombinieren. Zum Homogenisieren 5-mal auf und ab pipettieren. Alternativ kann die extrahierte DNA 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt werden.
5. 5 µl DNA-Extrakt, Reagenz D (Negativkontrolle) oder Reagenz E (Positivkontrolle) zugeben. Die Probe vor dem Pipettieren nicht vortexen. Die Wells der Platte bzw. die Teststreifen hermetisch abdichten. Es ist wichtig, Luftblasen am Boden der Wells zu vermeiden, indem behutsam pipettiert wird. Optional kann die verschlossene PCR-Platte bzw. können die verschlossenen PCR-Röhrchenstreifen zur Beseitigung etwaiger Luftblasen kurz zentrifugiert werden.
6. Die Platte bzw. die Streifen in den Thermocycler stellen. Die Platte so positionieren, dass sich das Well A1 oben links befindet. Das Reaktionsmodul schließen.

### Die PCR durchführen

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

Die Anwendungsprotokolldatei „Salmo Fast“ wurde von NF Validation und AOAC PTM zertifiziert.

## 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 CFX Manager IDE Software befolgen.

## Ergebnisinterpretation

Nach Festlegung der Datenanalyseparameter werden die Ergebnisse durch Analyse der Cq-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

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

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

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

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

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

## Proben

Ein **positiver** iQ-Check *Salmonella* II 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 *Salmonella* spp. betrachtet werden.

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

- Die Probe gilt als **negativ** auf *Salmonella* spp., wenn kein Cq-Wert für FAM vorliegt und die interne Kontrolle einen Cq-Wert  $\geq 28$  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 µl DNA-Extrakt eine 1:10-Verdünnung in destilliertem sterilem Wasser durchführen und dann 5 µl der Verdünnung testen) und die PCR wiederholt werden.
- Falls der Cq-Wert für die interne Kontrolle  $< 28$  liegt, ist keine Interpretation des Ergebnisses möglich. Es ist zu überprüfen ob der Schwellenwert korrekt platziert wurde oder ob es sich bei

der Kurve aus den Rohdaten um eine normale Amplifikationskurve handelt. Wenn die Kurve keine charakteristische Form aufweist, muss der PCR-Test wiederholt werden.

Die Interpretation der Testergebnisse ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

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

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

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

## Abschnitt 8

### Bestätigung positiver Ergebnisse

Im Rahmen der AOAC-Validierung gilt ein positives iQ-Check *Salmonella* II Ergebnis als vorläufig positiv, und es wird die Bestätigung mit einer geeigneten Referenzmethode (z. B. USDA MLG, FDA BAM, ISO, MFHPB, AOAC SMPR usw.) empfohlen. Alternativ werden 10  $\mu$ l angereichertes GPW (gegebenenfalls mit Supplements) direkt auf chromogenes RAPID' *Salmonella* Medium ausgestrichen und für 24  $\pm$  2 hr bei 37  $\pm$  1 °C inkubiert (ausgenommen Hanfblüten). Bei möglicherweise hohem Gehalt an Begleitflora 0,5 ml angereichertes GPW in 10 ml Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) Bouillon überführen und 24  $\pm$  3 hr bei 41,5  $\pm$  1 °C inkubieren, dann mit dem Ausstreichen von 10  $\mu$ l angereicherter RVS-Bouillon auf chromogenes RAPID' *Salmonella* Medium fortfahren. Es wird eine Bestätigung mit der im Anwenderhandbuch für das chromogene RAPID' *Salmonella* Medium genannten Methode empfohlen (Dokument-Nr. 10000126748).

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

#### Alle Proben, außer Proben aus der Primärproduktion

1. Verwendung der in den standardisierten CEN- oder ISO-Methoden beschriebenen klassischen Tests (einschließlich Aufreinigung) direkt aus der GPW-Anreicherungsbouillon nach einer Anreicherung über volle 18  $\pm$  2 hr bei 37 °C.
2. Durch Ausstreichen von 10  $\mu$ l angereichertem GPW (gegebenenfalls mit Supplements) direkt auf chromogenes RAPID' *Salmonella* Medium und Inkubation für 24  $\pm$  2 hr bei 37  $\pm$  1 °C. Bei möglicherweise hohem Gehalt an Begleitflora 0,5 ml angereichertes GPW in 10 ml Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) Bouillon überführen und 24  $\pm$  3 hr bei 41,5  $\pm$  1 °C inkubieren, dann mit dem Ausstreichen von 10  $\mu$ l angereicherter RVS-Bouillon auf chromogenes RAPID' *Salmonella* Medium fortfahren.
3. Verwendung einer anderen von NF VALIDATION zertifizierten Methode, die auf einem anderen Prinzip als dem des iQ-Check *Salmonella* II PCR Tests beruht. Das validierte Protokoll dieser zweiten Methode muss genau befolgt werden, einschließlich gegebenenfalls der selektiven Anreicherung in RVS-Medium. Die Bestätigung wird ab dem Schritt der Anreicherung in GPW-Anreicherungsbouillon durchgeführt, falls dieser Schritt beiden Methoden gemeinsam ist.

## Abschnitt 9 Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit

Ausgenommen bei Proben von Milcherzeugnissen und von Oberflächen in der Umgebung kann das angereicherte GPW nach der letzten Inkubation bei 37 °C maximal 72 hr bei 2–8 °C aufbewahrt werden.

### Proben aus der Primärproduktion

Die Bestätigung wird ab dem Schritt der primären Anreicherung nach der MSR-V-Methode (siehe Anhang D der Norm ISO 6579/A1) und unter Verwendung des RAPID'*Salmonella* Mediums für die Isolation durchgeführt.

Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen des iQ-Check *Salmonella* II Kit und der vorstehend beschriebenen Bestätigungsmethode können durch das Vorhandensein nicht-motiler *Salmonellen* verursacht werden. In diesem Fall sollte eine doppelte Anreicherung mit RAPID'*Salmonella* durchgeführt werden (zur Vorgehensweise ist das Anwenderhandbuch zu beachten). Dieses Protokoll beinhaltet einen selektiven Anreicherungs-schritt in RVS-Medium.

Im Rahmen der NF VALIDATION-Zertifizierung können die Beutel mit der primären Anreicherung bei 2–8 °C bis zu 24 hr lang aufbewahrt werden, bevor mit der Bestätigung fortgefahren wird.

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

## Abschnitt 9

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

Das iQ-Check *Salmonella* spp. II Kit kann auch zum Bestätigen isolierter *Salmonella* spp. Einzelkolonien auf Agarplatten verwendet werden. Dies wurde im Rahmen der AFNOR-Zertifizierung auf dem chromogenen RAPID'*Salmonella* 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 D. „Real-Time PCR“, in Abschnitt 7 „Protokoll“) und zur Daten- und Ergebnisauswertung die übrigen Schritte des iQ-Check *Salmonella* II Protokolls befolgen.

# Abschnitt 10

## Testleistung und Testvalidierungen

Das iQ-Check *Salmonella* II Kit ist für die Gattung *Salmonella* spezifisch.



BRD 07/10–04/05

ALTERNATIVE ANALYSIS  
METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

### NF Validation

Das iQ-Check *Salmonella* II Kit ist von NF VALIDATION als alternative Methode zur Referenzmethode ISO 6579-1 (2017) zum Nachweis von *Salmonella* spp. in allen Erzeugnissen für den menschlichen und tierischen Verzehr sowie von Umgebungsproben zertifiziert. Bei der Validierung wurde das Protokoll der Norm ISO 16140: 2016 befolgt, einschließlich der Verwendung der Real-Time PCR Systeme CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well und CFX Opus Deep Well. Die Verwendung der iQ-Check Free DNA Removal Solution ist für Säuglingsnahrung und deren Zutaten sowie für Tiernahrung und Futtermittel validiert. Die zugehörige Software ist die CFX Manager IDE Software (ab Version 2.2). Die „Salmo Fast“ APF ist für alle Proben validiert. Zertifikatnummer: BRD 07/06 – 07/04. Für Angaben zur Validität ist das Zertifikat auf der Website von AFNOR Certification zu beachten.

OMA 2017.06



### AOAC-Validierung

Das iQ-Check *Salmonella* II Kit (Protokoll Easy) wurde vom AOAC Research Institute unter OMA 2017.06 für den Nachweis von *Salmonella* spp. in Eiern (25 g), rohem Hühnerhackfleisch (25 und 375 g), rohem Rindfleisch (25 g), rohem Schweinefleisch (25 g), frischem Spinat (25 g und 375 g), Melone (25 g), Erdnussbutter (25 g), verzehrfertigem Feinkostschinken (375 g), ausgewählten Umweltoberflächen, Tiernassfutter (25 g) und Tiertrockenfutter (25 und 375 g), Milkschokolade (375 g), Käse (375 g), Schlachtkörper-Abspülflüssigkeit, Schokoladenlikör (375 g), weißer Schokolade (375 g), NFDM (375 g), Molkepulver (375 g), rohem Rinderhackfleisch (375 g), Abschnitten von rohem Rindfleisch (375 g), Cannabisblüten (10 g), mit Cannabis angereicherte Schokolade (25 g), mit Cannabis angereicherte Gummibärchen (25 g), Cannabis-Konzentrate (5 g), Hanfblüten (25 g), Mehl (375 g) und pflanzlichen Fleischerzeugnissen (375 g) validiert. Ein positives Ergebnis mit dem iQ-Check Kit ist als vorläufig positiv zu betrachten und sollte der Empfehlung in Abschnitt 8 vorstehend entsprechend bestätigt werden. Die „Salmo Fast“ APF, die Verwendung der iQ-Check Free DNA Removal Solution sowie die Verwendung der Real-Time PCR Systeme CFX96 Touch Deep Well und CFX Opus Deep Well sind für alle Proben validiert. Die zugehörige Software ist die CFX Manager IDE Software (ab Version 2.2).



### Health Canada-Validierung

iQ-Check *Salmonella* II (Protokoll Easy) wurde von Health Canada (MFLP-38) für den Nachweis von *Salmonella* spp validiert. Ein positives Ergebnis mit dem iQ-Check Kit gilt als vermutlich positiv und muss gemäß MFHPB-20 bestätigt werden (siehe Abschnitt 11, Referenz 5).



### NordVal-Validierung

Das iQ-Check *Salmonella* II Kit ist von NordVal für die Protokolle Standard I und Easy I (in Mikrotiterplatten) mit Lebensmittel-, Futtermittel- und Umgebungsproben und für Easy II Protokolle (in Mikrotiterplatten) mit Rohfleisch validiert worden. Die „Salmo Fast“ APF ist für alle Proben validiert. Zertifikatnummer: 038. Für Angaben zur Validität ist das Zertifikat auf der Website von NordVal zu beachten.

## Abschnitt 11 Literatur

ISO 7218. Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen.

ISO 6887-4. Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 4: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von sonstigen Erzeugnissen.

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

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

Miras I et al. (1995). Nucleotide sequence of *iagA* and *iagB* genes involved in invasion of HeLa cells by *Salmonella enteritica* subsp. *Enteritica* ser. Typhi. *Res Microbiol* 46, 17–20.

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

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

Health Canada Health Products and Food Branch, MFHPB-20 Isolation and Identification of *Salmonella* from Food and Environmental Samples, *Compendium of Analytical Methods*, Volume 2, March 2009.

Health Canada Health Products and Food Branch, Part 4: Qualitative Methods, Procedure for the Development and Management of Food Microbiological Methods, *Compendium of Analytical Methods*, Volume 1.

## Abschnitt 12

### Revisionshistorie

Freigabedatum	Dokumentnummer	Änderung
Oktober 2020	10000131519 Ver A	<ul style="list-style-type: none"><li>- Verlängerung und Erweiterung der AFNOR-Validierung: FDRS verwenden als Option „Salmo Fast“ APF</li><li>- Neues Dokumentdesign und Aktualisierung der Quellenangaben und des Inhalts</li><li>- Änderung der Dokumentnummer (vorhergehende Version war 808463 Rev G)</li></ul>
Februar 2023	10000131519 Ver B	<ul style="list-style-type: none"><li>- Neue Katalognummer für Verbrauchsmaterialien und Gerät hinzugefügt</li><li>- Klarstellung des Ergebnisinterpretationsprotokolls</li><li>- AOAC-Erweiterung: Neue Matrices, FDRS, „Salmo Fast“ APF</li><li>- Protokollabschnitt durch Übersichtstabelle ersetzt</li><li>- Aktualisierung des Umfangs der NordVal-Validierung</li><li>- Erweiterung der Validierungen für das CFX Opus Deepwell Real-Time PCR System und Aktualisierung auf CFX Manager IDE Software Version 3.1</li><li>- Erweiterung der AFNOR-Validierung auf Tiernahrung und Futtermittel</li></ul>

## Anhang — Pipettiertabelle für das PCR-Reaktionsgemisch

Die Tabelle gibt Aufschluss über die entsprechenden korrekten Mengen von Reagenz B und Reagenz 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



Weitere 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](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 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23  
**Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280  
**Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23  
**Russian Federation** 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188  
**South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23 **Sweden** 00 800 00 24 67 23  
**Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311  
**United Arab Emirates** 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

---

Sig 0122



---

# iQ-Check *Salmonella* spp. II Kit

## Manuale d'uso

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

N. catalogo 3578123

**BIO-RAD**

---

# Indice

Sezione 1.	Introduzione .....	1
Sezione 2.	Tecnologia iQ-Check <i>Salmonella</i> spp. II .....	1
Sezione 3.	Componenti del kit .....	2
Sezione 4.	Validità e conservazione .....	2
Sezione 5.	Materiali necessari ma non inclusi .....	2
	Apparecchiatura .....	2
	Materiali .....	3
Sezione 6.	Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali .....	5
Sezione 7.	Protocollo .....	7
	Arricchimento del campione .....	7
	Trattamento per la rimozione del DNA libero .....	9
	Estrazione del DNA .....	9
	PCR real-time .....	12
	Analisi dei dati .....	13
Sezione 8.	Conferma dei risultati positivi .....	15
Sezione 9.	Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check .....	16
Sezione 10.	Esecuzione e convalida del test .....	16
Sezione 11.	Riferimenti bibliografici .....	18
Sezione 12.	Cronologia delle revisioni .....	19
	Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR .....	20

## Sezione 1

### Introduzione

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

I metodi di coltura convenzionali sono spesso lunghi e tediosi. iQ-Check *Salmonella* II Kit, in confronto, è un test qualitativo semplice e rapido che consente la rilevazione di sequenze di DNA specifiche di *Salmonella* spp. ritrovate in prodotti alimentari, mangimi per animali e campioni ambientali. Mediante la PCR real-time, le sequenze specifiche di DNA di *Salmonella* spp. vengono amplificate e rilevate simultaneamente tramite sonde fluorescenti. È possibile processare contemporaneamente fino a 94 campioni, con un rischio minimo di contaminazione e una procedura intuitiva. Questo kit è destinato al personale di laboratorio qualificato, incaricato di eseguire test per la rilevazione di *Salmonella* spp. I risultati del test si ottengono entro poche ore dall'arricchimento del campione.

## Sezione 2

### Tecnologia iQ-Check *Salmonella* spp. II

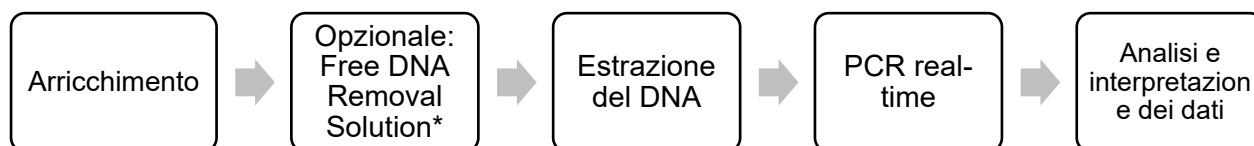
Il iQ-Check *Salmonella* II Kit è un test basato sull'amplificazione e sulla rilevazione genica mediante PCR real-time. I reagenti PCR pronti all'uso inclusi nel kit contengono oligonucleotidi (primer e sonde) specifici per *Salmonella* spp., oltre a DNA polimerasi e nucleotidi. La rilevazione e l'analisi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

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

Nella PCR real-time, vengono utilizzate specifiche sonde per rilevare il DNA durante la fase di amplificazione tramite ibridazione degli ampliconi. Queste sonde sono 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 *Salmonella* spp. In assenza di DNA target, non viene rilevata alcuna fluorescenza. Man mano che il numero di ampliconi aumenta a ogni ciclo di amplificazione, l'intensità della fluorescenza aumenta a sua volta. Il modulo ottico misura questa fluorescenza nella fase di appaiamento durante ogni ciclo PCR, mentre il software associato traccia l'intensità della fluorescenza rispetto al numero di cicli.

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

Questo test consente la rilevazione qualitativa di *Salmonella* spp. in determinati prodotti alimentari, mangimi per animali e campioni ambientali 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 (n. catalogo 10000058391).

## Sezione 3

### Componenti del kit

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

ID reagente	Reagente	Quantità in 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

### Validità 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 inclusi

#### 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:

## Sezione 5 Materiali necessari ma non inclusi

- Centrifuga da banco 10.000-12.000 x g
- Blocco termico a secco a  $37 \pm 2$  °C e/o 95-100 °C
- Cell disruptor (ad esempio, Disruptor Genie, Scientific Industries, Inc.) – per il protocollo Standard II
- Materiali specifici per l'estrazione in una piastra Deep Well:
  - Termoagitatore\* in grado di mantenere  $37 \pm 2$  °C e/o 95-100 °C con una velocità di miscelazione di almeno 1300 rpm
  - DW40 Deep Well Microplate Washer (n. catalogo 90137) – per il protocollo Standard II
- Vortex
- Piastra di agitazione magnetica
- Micropipette da 20 µl, 200 µl e 1000 µl
- Sistema PCR real-time di Bio-Rad;\* ad esempio, i sistemi PCR real-time CFX96 Touch Deep Well System (n. catalogo 3600037) o CFX Opus Deepwell System (n. catalogo 17007991)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System per l'estrazione automatizzata del DNA e il setup delle piastre PCR (n. catalogo 3594911)

**Nota:** si raccomanda di utilizzare un gruppo di continuità (UPS) con il termociclatore e iQ-Check Prep Systems.

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

## Materiali

- Terreno di arricchimento: Acqua peptonata tamponata (ad esempio, BPW Plus, n. catalogo 3564684, in forma disidratata, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 flaconi; 3555795, 3 L x 4 sacche; 3555790, 5 L x 2 sacche; BPW Standard, n. catalogo 12013259, in forma disidratata, 500 g; 12013258, in forma disidratata, 5 kg; 12013260, 5 L x 2 sacche)
- Materiali specifici per l'arricchimento di campioni ambientali di produzione primaria: RAPID'*Salmonella* Capsule, (n. catalogo 3564710, 1x concentrazione, 100 capsule; 3564709, 10x concentrazione, 100 capsule; 3564712, polvere, 100 test)
- Supplemento selettivo: Novobiocina
- PIF Supplement (n. catalogo 12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (n. catalogo 3594970)
- Specifici per campioni ambientali:
  - Spugne ambientali
  - Tamponi ambientali

- Brodo neutralizzante per spugne e tamponi come Dey-Engley (D/E), HiCap Neutralizing Broth, o Letheen Broth
- Materiali specifici per l'estrazione in provette
  - Provette coniche sterili con tappo a vite da 1,5 ml (ad esempio, n. catalogo 2240110XTU)
- Materiali specifici per l'estrazione in una piastra Deep Well
  - Piastra da 96 Deep Well (iQ-Check Deep Well Microplate, n. catalogo 3594900)
  - Pellicola sigillante in plastica (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, n. catalogo 3590139)
  - Pellicola sigillante preforata (X-Pierce Film, n. catalogo 3593977 o Pre-Pierced Plate Sealing Film, n. catalogo 3600040, solo Nord America)
- Specifici per iQ-Check Prep System:
  - Contenitore per la diluizione da 60 ml (n. catalogo 3594904 o 12014473)
  - Puntali con filtro (n. catalogo 3594902 o 12014486, 50 µl x 5.760; 3594903 o 12014483, 1.000 µl x 3.840)
  - Provette per miscela di PCR (n. catalogo 12016673, 5 ml x 25)
- Specifici per i protocolli di estrazione Standard II e Easy II:
  - Lysis beads (reagente F) (n. catalogo 3578136)
  - Puntali per pipette ad ampia apertura da 200 µl
- RAPID'*Salmonella* Agar (n. catalogo 3563961, 90 mm x 20 piastre petri; 3563963 90 mm x 120 piastre petri; 3564705, in forma disidratata, 500 g)
- Piastre PCR, provette, nastro isolante e tappi
- Puntali sterili con filtro adattabili a micropipette da 20, 200 e 1000 µl
- Puntali per pipette Combitip o pipettatori a ripetizione equivalenti, sterili e confezionati singolarmente
- Pipette da 1 e 10 ml
- Provette sterili per test da 2 e 5 ml
- Guanti senza polvere
- Acqua distillata sterile
- Candeggina, 5%
- Detergenti 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 regole 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 ciascuna serie di reazioni di amplificazione
  - Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza
  - Per garantire l'omogeneità dei reagenti del kit, miscelarli 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 raccomanda vivamente di seguire i requisiti generali descritti nella norma 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 *Salmonella* II Kit
  - Tutte le sostanze o miscele contenute nel kit per il test sono classificate come prodotti in conformità al sistema mondiale armonizzato (GHS). Il contatto con acidi potrebbe causare il rilascio di gas tossici. Se utilizzato correttamente, non sono necessarie precauzioni particolari. Se il prodotto viene inalato, portare il soggetto in una zona ben aerata e in caso di disturbi consultare un medico. Se il prodotto viene a contatto con gli occhi, sciacquarli mantenendoli aperti sotto l'acqua corrente per diversi minuti. In caso di ingestione del prodotto, indurre il vomito e contattare un medico



- iQ-Check Prep System
  - L'utilizzo improprio dell'iQ-Check Prep System potrebbe causare lesioni personali o danni allo strumento. Se manipolati in modo improprio, alcuni componenti potrebbero presentare un rischio di lesioni personali dovuto al calore eccessivo. Per garantire sicurezza, iQ-Check Prep System deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato e opportunamente addestrato. La manutenzione dello strumento deve essere eseguita solo dai tecnici di assistenza Bio-Rad
- Sistema di rilevazione tramite PCR real-time CFX96 Touch Deep Well System o CFX Opus Deepwell System
  - L'utilizzo improprio del sistema di rilevazione tramite PCR real-time CFX96 Touch Deep Well o CFX Opus Deepwell 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 e CFX Opus Deepwell deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato e opportunamente addestrato. La manutenzione dello strumento deve essere eseguita solo dai tecnici di assistenza Bio-Rad
- Arricchimento
  - L'utente è tenuto a leggere, comprendere e osservare le informazioni relative alla sicurezza contenute nelle istruzioni del iQ-Check *Salmonella* II Kit. Conservare le istruzioni di sicurezza per consultazioni future. Per ridurre i rischi biologici e i rischi legati all'esposizione ai prodotti chimici, eseguire il test dei patogeni in un laboratorio adeguatamente attrezzato sotto il controllo di personale qualificato. Seguire sempre le pratiche di laboratorio standard sulla sicurezza, tra cui indossare gli indumenti protettivi e la 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 con i reagenti al termine dell'amplificazione. Smaltire i campioni arricchiti in conformità alle attuali norme industriali
  - *Salmonella* è un organismo che richiede il livello di biosicurezza 2. I campioni biologici come gli arricchimenti sono in grado di trasmettere malattie infettive. Osservare ogni normativa locale, statale/provinciale e/o nazionale applicabile in materia di smaltimento di rifiuti biologici. Indossare dispositivi di protezione adeguati, che includono, a titolo esemplificativo, dispositivi di protezione per gli occhi, schermi per il viso, indumenti/camici da laboratorio e guanti. Tutti le operazioni devono essere eseguite in strutture adeguatamente attrezzate utilizzando gli idonei dispositivi di sicurezza (ad esempio, i dispositivi di contenimento fisico). Prima di lavorare con materiali potenzialmente infettivi, gli addetti devono ricevere una formazione che sia conforme alle disposizioni regolamentari in vigore e ai requisiti dell'azienda/ente
  - Al termine del test, tutti i materiali 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 121 °C). Per maggiori informazioni relative alle normative locali in materia di smaltimento, consultare la scheda di sicurezza

## Sezione 7

# Protocollo

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

### A. Arricchimento del campione

Per l'arricchimento nel corso dell'intera notte, riscaldare il terreno a temperatura ambiente (20-25 °C) prima dell'uso. Per un arricchimento breve (8 hr), riscaldare il brodo di arricchimento alla temperatura di incubazione del campione prima dell'uso. I tempi di arricchimento breve sono sensibili alle condizioni di incubazione, pertanto è necessario rispettare rigorosamente le temperature indicate. La durata della preparazione del campione (tempo intercorrente tra il preriscaldamento del brodo di arricchimento e l'inizio dell'incubazione del campione alimentare) non deve superare i 45 min. Si consiglia l'uso di un incubatore ventilato.

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

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

Nell'ambito della validazione NF, rispettare gli standard ISO da 6887-2 a -6 sulla preparazione dei campioni. Se non indicato, le aliquote di peso superiore a 25 g non sono state analizzate. Incubare senza agitare rispettando i tempi e le temperature indicati nella tabella. Il protocollo Standard I per l'estrazione del DNA può essere utilizzato per tutte le matrici ad eccezione dei campioni ambientali di produzione primaria.

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

VALIDAZIONE NF BRD 07/06 – 07/04 e NordVal 038		
Oggetto (matrici)	Preparazione dei campioni	Arricchimento/Estrazione del DNA
Prodotti alimentari, mangimi per animali e campioni ambientali <sup>1</sup>	Campioni di piccole dimensioni: diluizione 1:10. <ul style="list-style-type: none"> <li>Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 9 x <i>n</i> ml (ad esempio, 25 g in 225 ml) di APT</li> </ul>	<b>Estrazione Standard I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubare per 16-24 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>Formato provetta</li> </ul> <b>Estrazione Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubare per 20-24 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>Formato provetta/Deep Well</li> </ul>
Prodotti a base di carne cruda (25 g, 375 g) <sup>2</sup>	Dimensioni del campione da 25 g: diluizione 1:10. <ul style="list-style-type: none"> <li>Omogeneizzare 25 g di carne cruda in 225 ml di APT preriscaldata</li> </ul>	Estrazione Easy II per campioni da 25 g <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubare per 8-16 hr a 41,5 ± 1 °C</li> <li>Formato provetta/Deep Well</li> </ul>
	Dimensioni del campione da 375 g: diluizione 1:4 <ul style="list-style-type: none"> <li>Omogeneizzare 375 g di carne cruda in 1.125 ml di APT preriscaldata</li> </ul>	Estrazione Easy II per campioni da 375 g <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubare per 10-18 hr a 41,5 ± 1 °C</li> <li>Formato provetta/Deep Well</li> </ul>
Campioni ambientali di produzione primaria	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione in 9 x <i>n</i> ml di APT supplementata con capsula di RAPID' <i>Salmonella</i>	Estrazione Standard II <sup>3</sup> o Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubare per 18-26 hr a 41,5 ± 1 °C</li> <li>Trasferire 100 µl in 900 µl di APT fresca</li> <li>Incubare per 4-6 hr a 37 ± 1 °C</li> </ul>

Formule e cereali per neonati con/senza probiotici, ingredienti (50-375 g) <sup>4</sup>	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 3 x <i>n</i> ml di APT con supplemento PIF (375 g in 1.125 ml)	Estrazione Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 18-26 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>
Prodotti lattiero-caseari crudi (fino a 50 g)	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 9 x <i>n</i> ml di APT supplementata con 20 mg/L di novobiocina (50 g in 450 ml)	Estrazione Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 20-24 hr a 41,5 ± 1 °C</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>
Alimenti e mangimi per animali (375 g)	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione in 5 x <i>n</i> ml di APT preriscaldata supplementata con capsula di RAPID'Salmonella	Estrazione Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 18-24 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>
<b>AOAC OMA 2017.06</b>		
<b>Oggetto (matrici)</b>	<b>Preparazione dei campioni</b>	<b>Arricchimento/Estrazione del DNA</b>
Prodotti alimentari e superfici ambientali selezionati	Campioni di piccole dimensioni: diluizione 1:10. <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 9 x <i>n</i> ml (ad esempio, 25 g in 225 ml) di APT</li> </ul>	Estrazione Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 19-23 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>
	Dimensioni del campione grande: diluizione 1:4 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 3 x <i>n</i> ml (ad esempio, 375 g in 1.125 ml) di APT</li> </ul>	
	Campioni ambientali <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bagnare leggermente i tamponi e le spugne con un brodo neutralizzante che non contenga un complesso di aril solfonato</li> <li>▪ Per le superfici analizzate mediante tamponi, campionare un'area di 2,54 x 2,54 cm (1 x 1")</li> <li>▪ Per le superfici analizzate mediante spugne, campionare un'area di 10,16 x 10,16 cm (4 x 4")</li> <li>▪ Aggiungere ad APT sufficiente per ricoprire il tampone (10 ml) o la spugna (100 ml)</li> </ul>	
Cioccolato al latte (375 g)	Omogeneizzare 375 g di cioccolato al latte in 3.000 ml di terreno di latte scremato	Estrazione Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 18-22 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>
Risciacqui della carcassa	Omogeneizzare 30 ml di risciacquo della carcassa in 30 ml di APT	Estrazione Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 20-22 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>
<b>AOAC PTM 010803</b>		
<b>Oggetto (matrici)</b>	<b>Preparazione dei campioni</b>	<b>Arricchimento/Estrazione del DNA</b>
Manzo macinato crudo e rifilatura di manzo crudo (375 g) <sup>5,7</sup>	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 3 x <i>n</i> ml di APT preriscaldata (375 g in 1.125 ml)	Estrazione Easy II <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 8-22 hr a 41,5 ± 1 °C</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>
Spinaci crudi freschi (375 g) <sup>5,7</sup>	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 3 x <i>n</i> ml di APT preriscaldata (375 g in 1.125 ml)	Estrazione Easy II <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 10-22 hr a 41,5 ± 1 °C</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>
Latticini in polvere (375 g) <sup>7</sup>	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 3 x <i>n</i> ml di APT con supplemento PIF (375 g in 1.125 ml)	Estrazione Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 18-26 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>
Liquore al cioccolato e cioccolato bianco (375 g) <sup>6,7</sup>	Omogeneizzare 375 g di campione alimentare in 3.000 ml di APT preriscaldata	Estrazione Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 18-26 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>

## Sezione 7 Protocollo

Fiore di cannabis (10 g) <sup>5,7</sup> e fiore di canapa (25 g) <sup>5</sup>	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 9 x <i>n</i> ml di APT (10 g in 90 ml di APT fiore di cannabis e 25 g in 225 ml di APT fiore di canapa)	Estrazione Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 20-22 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>
Cioccolato e caramelle gommose infuse alla cannabis (25 g) e concentrati derivati dalla cannabis (5 g) <sup>5,7</sup>	Cioccolato e caramelle gommose infuse alla cannabis (25 g) e concentrati derivati dalla cannabis (5 g).	Estrazione Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 18-22 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>
Prodotti a base di carne di origine vegetale (375 g) <sup>7</sup>	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 3 x <i>n</i> ml di APT (375 g in 1.125 ml)	Estrazione Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 20-22 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>
Farina multiuso (375 g) <sup>5,7</sup>	Diluizione 1:3 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 3 x <i>n</i> ml di APT preriscaldata + supplemento PIF (375 g in 1.125 ml + 150 µl di supplemento PIF preparato)</li> <li>▪ Dopo l'arricchimento, trasferire un'aliquota di 1-5 ml in una provetta o in una piastra a pozzetto profondo e lasciare depositare per almeno 30 min prima di procedere all'estrazione del DNA</li> </ul> Diluizione 1:9 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 9 x <i>n</i> ml di APT preriscaldata + supplemento PIF (375 g in)</li> <li>▪ 3.375 ml + 375 µl di supplemento PIF preparato)</li> </ul>	Estrazione Easy II <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubare per 20-24 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>▪ Formato provetta/Deep Well</li> </ul>
<b>Fare riferimento a MFLP-38 per le matrici e i protocolli approvati da Health Canada</b>		

<sup>1</sup> Ad eccezione dei campioni ambientali di produzione primaria

<sup>2</sup> Protocollo utilizzato per la rilevazione simultanea di *E. coli* O157:H7

<sup>3</sup> Il reagente di lisi utilizzato è solo il reagente A (senza reagente F) <sup>4</sup>Il protocollo è armonizzato con i kit iQ-Check *Cronobacter* spp. e iQ-Check *Enterobacteriaceae*

<sup>5</sup> Protocollo armonizzato con i kit iQ-Check *E. coli* O157:H7 e iQ-Check STEC VirX

<sup>6</sup> La validazione include l'esecuzione di test con e senza il reagente di purificazione iQ-Check

<sup>7</sup> La validazione include una strisciatura diretta su piastre di ation includes direct streak to *RAPID'* *Salmonella*

## B. Trattamento per la rimozione del DNA libero

iQ-Check Free DNA Removal Solution offre il metodo ideale per rimuovere il DNA libero. Seguire le raccomandazioni di Bio-Rad contenute nel manuale d'uso (documento n. catalogo 1000058391).

## C. Estrazione del DNA

Raccomandazioni generali:

1. Prima di iniziare il test, accendere il blocco termico o il thermoshaker per 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.

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 effettuare il pipettaggio direttamente nella pellicola sigillante preforata.
5. Utilizzare la barra magnetica per mantenere in sospensione il reagente di lisi. Effettuare il pipettaggio mentre è in atto un'agitazione a media velocità.
6. Per risospendere la resina, per prima cosa agitare delicatamente a mano il reagente di lisi. Per mantenere in sospensione il contenuto, eseguire il pipettaggio mentre la barra magnetica esegue l'agitazione a media velocità del contenuto del flacone.
7. Per i protocolli Easy II e Standard II, ricostituire il reagente di lisi finale come segue:
  - a. Versare con attenzione tutto il contenuto del reagente F (sfere di lisi) nel reagente A (reagente di lisi).
  - b. Utilizzare materiali di consumo con un puntale largo abbastanza da consentire il pipettaggio del reagente di lisi omogeneizzato.
  - c. Se conservato a 4 °C, il reagente di lisi miscelato con le sfere di lisi (reagente A + F) ha una validità pari a 6 mesi.

### **Protocollo Easy I**

1. Trasferire un'aliquota di 100 µl di reagente di lisi omogeneizzato (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 su e giù fino a ottenere 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. Incubare nel termoagitatore la piastra Deep Well con agitazione a 1300-1600 rpm a 95-100 °C per 15-20 min.
6. Miscelare le provette nel vortex ad alta velocità e centrifugare a 10.000-12.000 x g per almeno 2 min. La centrifugazione per la piastra Deep Well non è necessaria.

### **Protocollo Easy II**

1. Aliquotare 100 µl di reagente di lisi omogeneizzato (reagenti A + F) nei pozzetti di una piastra Deep Well.

**Nota:** prima agitare delicatamente a mano il reagente di lisi per risospendere le sfere.

2. Aggiungere 100 µl di campione arricchito.

## Sezione 7 Protocollo

**Nota:** agitare la sospensione per omogeneizzare la coltura, quindi evitare che eventuali residui si depositino prima di raccogliere il campione.

3. Miscelare la soluzione pipettando su e giù fino a ottenere l'omogeneizzazione.
4. Chiudere le provette o sigillare la piastra a pozzetti profondi con la pellicola sigillante preforata.
5. Posizionare le provette nel dispositivo per il frazionamento cellulare per  $3 \pm 1$  min.
6. Incubare le provette nel blocco termico a 95-100 °C per 10-15 min. Incubare nel termoaggitatore la piastra Deep Well con agitazione a 1300 rpm a 95-100 °C per 15-20 min.
7. Miscelare le provette nel vortex ad alta velocità e centrifugare a 10.000-12.000 x g per almeno 2 min. La centrifugazione per la piastra Deep Well non è necessaria.

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 min prima di utilizzarlo nuovamente.

### Protocollo Standard I

1. Raccogliere 1 ml di campione decantato arricchito in una provetta.
2. Centrifugare a 10.000-12.000 x g per 5 min.
3. Eliminare il surnatante.
4. Aggiungere 200 µl di reagente di lisi (reagente A) al pellet.
5. Pipettare il reagente nella provetta in alto e in basso un numero di volte sufficiente a risospendere il pellet. Il numero di volte dipenderà dal campione.
6. Miscelare nel vortex ad alta velocità e collocare la provetta nel blocco termico a 95-100 °C per 10-15 min.
7. Miscelare nel vortex ad alta velocità e centrifugare a 10.000-12.000 x g per 5 min.

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

Il surnatante può essere conservato fino a 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 min prima di utilizzarlo nuovamente.

### Protocollo Standard II

1. Raccogliere 1 ml di campione decantato arricchito in una provetta o in un pozzetto di una piastra Deep Well. Sigillare la piastra Deep Well con una pellicola in plastica.

**Nota:** Agitare la sospensione per omogeneizzare la coltura e permettere l'assestamento dei residui prima di raccogliere il campione.

2. Centrifugare le provette a 10.000-12.000 x g per 5 min. Eliminare il surnatante. Centrifugare le piastre Deep Well a 2.250 x g per 20 min ed eliminare il surnatante manualmente o mediante la DW40.
3. Aggiungere 200 µl di reagente di lisi omogeneizzato (reagente A + F) al pellet e risospendere quest'ultimo pipettando il reagente in alto e in basso. Chiudere le provette o sigillare la piastra Deep Well con la pellicola sigillante preforata.

**Nota:** Per risospendere le sfere, per prima cosa agitare delicatamente a mano il reagente di lisi. Per i campioni di produzione primaria, utilizzare il reagente A senza il reagente F.

4. Collocare la provetta nel cell disruptor per  $3 \pm 1$  min, oppure agitare la piastra Deep Well nel termoagitatore a 1.300-1.600 rpm a 95-100 °C per 15-20 min.
5. Incubare le provette nel blocco termico indicato a 95-100 °C per 10-15 min.
6. Miscelare nel vortex le provette ad alta velocità e centrifugare a 10.000-12.000 x g per 5 min. Centrifugare la piastra Deep Well a 2.250 x g per 2 min.

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

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

## D. PCR real-time

### Installazione strumento e software

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

### Preparazione della miscela di PCR

1. Preparare la miscela di PCR contenente la soluzione di amplificazione (reagente C) e le sonde fluorescenti (reagente B). Il volume della miscela di PCR necessario dipende dal numero di campioni e controlli da analizzare. In ogni ciclo PCR devono essere inclusi almeno un controllo positivo e un controllo negativo. Per verificare i corretti volumi da impiegare per ogni reagente, consultare la tabella relativa al pipettaggio riportata in Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR.
2. Utilizzare la miscela di PCR (reagenti B + C) immediatamente in seguito alla preparazione. Essa rimane stabile per massimo 1 hr a 2-8 °C.
3. Pipettare 45 µl di miscela di PCR in ogni pozzetto secondo lo schema analitico scelto.
4. Per purificare il DNA, combinare 50 µl di DNA estratto da ciascun campione con 200 µl dell'iQ-Check Purification Reagent. Pipettare 5 volte verso l'alto e verso il basso per omogeneizzare. In alternativa, è possibile eseguire una diluizione 1:10 di DNA estratto utilizzando acqua sterile.

## Sezione 7 Protocollo

5. Aggiungere 5 µl di estratto di DNA, reagente D (controllo negativo) o reagente E (controllo positivo). Non miscelare nel vortex il campione prima del pipettaggio. Sigillare ermeticamente i pozzetti della piastra o le strip. Pipettare con attenzione per 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).
6. Posizionare la piastra o le strip nel termociclatore. Accertarsi di posizionare la piastra con il pozzetto A1 nell'angolo superiore sinistro. Chiudere il modulo di reazione.

### Eeguire un ciclo PCR

Per avviare un ciclo PCR, seguire le istruzioni contenute nel manuale d'uso del sistema PCR real-time per i kit iQ-Check.

Il file di protocollo di applicazione "Salmo Fast" è stato certificato dalla validazione NF e AOAC PTM.

## 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 Software.

### Interpretazione dei risultati

Una volta definiti i parametri di analisi dei dati, i risultati vengono interpretati analizzando i valori Cq di ciascun campione (il ciclo in cui la curva di amplificazione supera la soglia)

Il software CFX Manager IDE Software consente di completare un'analisi automatizzata per i sistemi di rilevazione PCR real-time Bio-Rad. 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 positivo e negativo.

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

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

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



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

## Campioni

Un test di PCR per iQ-Check *Salmonella* Il **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 *Salmonella* spp.

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

- Questo campione viene considerato come campione **negativo** a *Salmonella* spp. se non esiste un valore Cq per il canale FAM e il controllo interno ha un valore Cq  $\geq 28$
- 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 (utilizzando 10  $\mu$ l di estratto di DNA, effettuare una diluizione 1:10 in acqua distillata sterile e quindi analizzare 5  $\mu$ l di diluizione) e ripetere la PCR
- Se il valore Cq per il controllo interno è  $< 28$ , non è possibile interpretare il risultato. Verificare che la soglia sia posizionata correttamente o che la curva dei dati non elaborati sia una curva di amplificazione regolare. Se la curva non possiede una forma caratteristica, sarà necessario ripetere il test PCR.

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

Rilevazione <i>Salmonella</i> spp. (canale FAM)	Rilevazione controllo interno (canale HEX)	Interpretazione
Cq $\geq 10$	N/A	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 il target, sia per il controllo interno, l'estratto di DNA deve essere diluito (1:10) e testato nuovamente.

Il mancato rispetto dei criteri di convalida può portare a un'interpretazione non valida. Verificare i dati non elaborati e procedere come se il campione fosse inibito.

## Sezione 8

### Conferma dei risultati positivi

Nell'ambito della validazione AOAC, il risultato positivo di iQ-Check *Salmonella* II deve essere considerato presuntivo positivo e confermato in conformità a un metodo di riferimento opportuno (ad esempio, USDA MLG, FDA BAM, ISO, MFHPB, AOAC SMPR, ecc.). In alternativa, strisciare 10 µl di APT arricchita (con supplementi, quando applicabile) direttamente su RAPID' *Salmonella* cromogenico e incubare per  $24 \pm 2$  hr a  $37 \pm 1$  °C (eccetto per il fiore di canapa). Nei casi in cui la flora interferente potrebbe essere elevata, trasferire 0,5 ml di APT arricchita in 10 ml di brodo di Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) e incubare per  $24 \pm 3$  hr a  $41,5 \pm 1$  °C, quindi procedere a strisciare 10 µl di RVS arricchito sul terreno cromogenico RAPID' *Salmonella*. Fare riferimento al metodo di conferma nel manuale d'uso per terreno cromogenico RAPID' *Salmonella* (documento n. catalogo 10000126748).

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

#### Tutti i campioni ad eccezione dei campioni di produzione primaria

1. Mediante test classici descritti nei metodi standardizzati CEN o ISO (inclusa la purificazione) direttamente dal brodo di arricchimento APT dopo l'arricchimento completo per  $18 \pm 2$  hr a 37 °C.
2. Strisciare 10 µl di APT arricchita (con supplementi, quando applicabile) direttamente sul terreno cromogenico RAPID' *Salmonella* e incubare per  $24 \pm 2$  hr a  $37 \pm 1$  °C. Nei casi in cui la flora interferente potrebbe essere elevata, trasferire 0,5 ml di APT arricchita in 10 ml di brodo di Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) e incubare per  $24 \pm 3$  hr a  $41,5 \pm 1$  °C, quindi procedere a strisciare 10 µl di RVS arricchito sul terreno cromogenico RAPID' *Salmonella*.
3. Tramite qualunque metodo alternativo certificato dalla VALIDAZIONE NF in base a un principio diverso da quello impiegato nel test PCR iQ-Check *Salmonella* II. Il protocollo validato di questo secondo metodo deve essere seguito interamente, incluso l'arricchimento selettivo in terreno RVS, se necessario. Se questo passaggio è comune ad entrambi i metodi, la conferma viene effettuata dal brodo di arricchimento APT.

Successivamente all'ultima incubazione a 37 °C, è possibile conservare l'APT arricchita a 2-8 °C per un massimo di 72 hr, ad eccezione dei campioni di prodotti lattiero-caseari e di quelli prelevati da superfici ambientali.

#### Campioni di produzione primaria

Iniziare il processo di conferma dall'arricchimento primario, seguendo il metodo MSRVI indicato nell'Appendice D dello standard ISO 6579/A1 e utilizzando il terreno RAPID' *Salmonella* per l'isolamento.

Risultati discordanti tra il iQ-Check *Salmonella* II Kit e il metodo di conferma sopra descritto possono essere causati dalla presenza di *Salmonella* immobile. In tal caso, seguire il protocollo di arricchimento doppio RAPID' *Salmonella* (per le istruzioni per l'uso, fare riferimento al manuale utente del prodotto). Questo protocollo prevede una fase di arricchimento selettivo in terreno RVS.

Nell'ambito della VALIDAZIONE NF, i sacchi di arricchimento primario possono essere conservati fino a 24 hr a 2-8 °C prima di procedere alla conferma.

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

## Sezione 9

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

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

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

## Sezione 10

### Esecuzione e convalida del test

Il iQ-Check *Salmonella* II Kit è specificamente indicato per la rilevazione del genere *Salmonella*.



### Validazione NF

iQ-Check *Salmonella* II Kit è certificato ai sensi della VALIDAZIONE NF come metodo alternativo rispetto a quello di riferimento ISO 6579 -1 (2017) per la rilevazione di *Salmonella* spp. in tutti i prodotti destinati al consumo umano e animale, nonché nei campioni ambientali. La validazione osserva il protocollo dello standard ISO 16140: 2016 e comprende l'utilizzo dei sistemi PCR Real-Time CFX96 Touch System, CFX96 Touch Deep Well System e CFX Opus Deepwell System. L'utilizzo di iQ-Check Free DNA Removal Solution è validato per la formula per neonati e gli ingredienti associati, alimenti e mangimi per animali. Il software associato è CFX Manager IDE Software (V2.2 e successive). Il file di protocollo di applicazione "Salmo Fast" APF è validato per tutti i campioni. Numero di certificato: BRD 07/06 – 07/04. Fare riferimento al certificato disponibile sul sito web di AFNOR per informazioni sulla validità.

BRD 07/10 – 04/05

METODI DI ANALISI  
ALTERNATIVI PER IL SETTORE  
AGROALIMENTARE

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

OMA 2017.06



## Validazione AOAC

iQ-Check *Salmonella* II Kit (protocollo Easy) è stato validato dall'AOAC Research Institute in base all'OMA 2017.06 per la rilevazione di *Salmonella* spp. in uova (25 g), pollo macinato crudo (25 e 375 g), manzo crudo (25 g), maiale crudo (25 g), spinaci freschi (25 g e 375 g), melone (25 g), burro di arachidi (25 g), prosciutto pronto al consumo (375 g), superfici ambientali selezionate, alimenti per animali umidi (25 g) e secchi (25 e 375 g), cioccolato al latte (375 g), formaggio (375 g), risciacqui di carcasse, liquore al cioccolato (375 g), cioccolato bianco (375 g), NFDM (375 g), siero di latte in polvere (375 g), manzo macinato crudo (375 g), rifilatura di manzo crudo (375 g), fiore di cannabis (10 g), cioccolata infusa alla cannabis (25 g), caramelle gommosse infuse alla cannabis (25 g), concentrati derivati dalla cannabis (5 g), fiore di canapa (25 g), farina (375 g) e prodotti a base di carne di origine vegetale (375 g). Un risultato positivo con il kit iQ-Check deve essere considerato come presunto, si raccomanda pertanto di effettuare la conferma seguendo le raccomandazioni nella Sezione 8 precedente. L'APF "Salmo Fast", l'uso dell'iQ-Check Free DNA Removal Solution e l'uso dei sistemi PCR real-time CFX96 Touch Deep Well System e CFX Opus Deep Well System sono validati per tutti i campioni. Il software associato è CFX Manager IDE Software (versione 2.2 e successive).



## Validazione Health Canada

iQ-Check *Salmonella* II (protocollo Easy) è stato validato da Health Canada (MFLP-38) per il rilevamento di *Salmonella* spp. Un risultato positivo con iQ-Check Kit deve essere considerato come presunto positivo ed essere confermato in base a MFHPB-20 (vedere Sezione 11, riferimento 5).



## Validazione NordVal

iQ-Check *Salmonella* II Kit è stato validato da NordVal rispettivamente per i protocolli Standard I e Easy I (in micropiastre) in alimenti, mangimi e superfici ambientali, e per i protocolli Easy II (in micropiastre) in carne cruda. Il file di protocollo di applicazione "Salmo Fast" APF è validato per tutti i campioni. Numero di certificato: 038. Fare riferimento al certificato disponibile sul sito web di NordVal per informazioni sulla validità.

## Sezione 11

### Riferimenti bibliografici

ISO 7218. Microbiology of the food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examination.

ISO 6887-4. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.

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

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

Miras I et al. (1995). Nucleotide sequence of *iagA* and *iagB* genes involved in invasion of HeLa cells by *Salmonella* enteritica subsp. Enteritica ser. Typhi. Res Microbiol 46, 17–20.

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

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

Health Canada Health Products and Food Branch, MFHPB-20 Isolation and Identification of *Salmonella* from Food and Environmental Samples, Compendium of Analytical Methods, Volume 2, March 2009.

Health Canada Health Products and Food Branch, Part 4: Qualitative Methods, Procedure for the Development and Management of Food Microbiological Methods, Compendium of Analytical Methods, Volume 1.

## Sezione 12

**Cronologia delle revisioni**

<b>Data di rilascio</b>	<b>Numero di documento</b>	<b>Modifica</b>
Ottobre 2020	10000131519 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rinnovo ed estensione della validazione AFNOR: Utilizzo di FDRS come opzione, Protocollo di file di applicazione "Salmo Fast"</li> <li>- Nuova struttura del documento e aggiornamento di riferimenti e contenuto</li> <li>- Modifica al numero di documento (la versione precedente era 808463 Rev G)</li> </ul>
Febbraio 2023	10000131519 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aggiunto nuovo numero di catalogo per i materiali di consumo e lo strumento</li> <li>- Chiarimento del protocollo di interpretazione dei risultati</li> <li>- Estensione AOAC: Nuove matrici, FDRS, APF "Salmo Fast"</li> <li>- Sostituita sezione del protocollo con tabella di riepilogo</li> <li>- Aggiornamento dell'ambito della validazione NordVal</li> <li>- Estensione delle validazioni per il sistema di PCR real-time CFX Opus Deepwell e aggiornamento alla versione 3.1 del software CFX Manager IDE Software</li> <li>- Estensione della validazione AFNOR su alimenti e mangimi per animali</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

Per maggiori informazioni, visitare il sito [bio-rad.com/iqcheck](http://bio-rad.com/iqcheck).

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

IQ-CHECK è un marchio registrato di Bio-Rad Europe GMBH in determinate giurisdizioni.

Tutti i marchi registrati qui utilizzati sono di proprietà del rispettivo proprietario.



**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 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23  
**Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280  
**Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23  
**Russian Federation** 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188  
**South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23 **Sweden** 00 800 00 24 67 23  
**Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311  
**United Arab Emirates** 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0122





---

# iQ-Check *Salmonella* spp. II Kit

## Guia do usuário

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

Nº do catálogo 3578123



# Índice

Seção 1.	Introdução .....	1
Seção 2.	Tecnologia iQ-Check <i>Salmonella</i> spp. II .....	1
Seção 3.	Componentes do kit .....	2
Seção 4.	Prazo de validade e armazenamento .....	2
Seção 5.	Materiais necessários, mas não fornecidos .....	3
	Equipamento .....	3
	Suprimentos .....	3
Seção 6.	Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados .....	5
Seção 7.	Protocolo .....	7
	Enriquecimento da amostra .....	7
	Tratamento de remoção de DNA livre .....	9
	Extração de DNA .....	10
	PCR em Tempo Real .....	12
	Análise de dados .....	13
Seção 8.	Confirmação de Resultados Positivos .....	15
Seção 9.	Confirmação de Colônias Isoladas usando o iQ-Check Kit .....	16
Seção 10.	Desempenho e validação do teste .....	16
Seção 11.	Referências .....	18
Seção 12.	Histórico de Revisão .....	19
	Apêndice – Guia de Cálculo da Mistura de PCR .....	20

## Seção 1

### Introdução

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

Os métodos de cultura clássicos são, muitas vezes, longos e entediante. O iQ-Check *Salmonella* II Kit, em comparação, é um teste qualitativo simples e rápido que permite a detecção de sequências de DNA específicas da *Salmonella* spp. encontradas em produtos alimentícios, ração animal e amostras ambientais. Utilizando PCR em tempo real, as sequências de DNA específicas de *Salmonella* spp. são amplificadas e detectadas simultaneamente através de sondas fluorescentes. Podem ser processadas até 94 amostras de uma vez, com risco mínimo de contaminação e um procedimento fácil de usar. Os usuários pretendidos deste kit são profissionais qualificados de laboratório que estão desempenhando testes para detectar *Salmonella* spp. O uso deste teste permite que resultados sejam obtidos em algumas horas após enriquecimento de uma amostra.

## Seção 2

### Tecnologia iQ-Check *Salmonella* spp. II

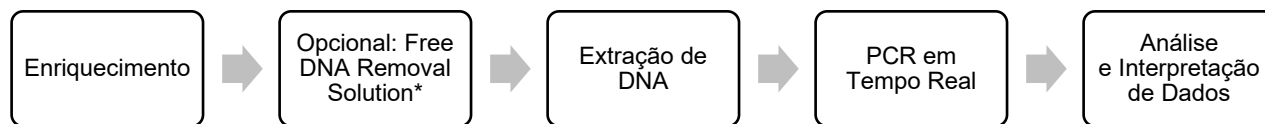
O iQ-Check *Salmonella* II Kit é baseado na amplificação de genes e detecção por PCR em tempo real. Os reagentes de PCR prontos para uso do kit contêm oligonucleotídeos (iniciadores e sondas) específicos para *Salmonella* spp., bem como DNA polimerase e nucleotídeos. A detecção e a análise de dados são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

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

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

Esse teste permite a detecção qualitativa de *Salmonella* spp. em produtos alimentícios selecionados, ração animal e amostras ambientais previamente enriquecidas por cultura. Inclui as cinco etapas principais seguintes:



\* Consulte o guia do usuário da iQ-Check Free DNA Removal Solution (nº 10000058391) para as condições de uso.

## Seção 3

### Componentes do kit

O iQ-Check *Salmonella* spp. II Kit contém reagentes suficientes para 96 testes (94 amostras).

ID do reagente	Reagente	Quantidade fornecida, ml
A	Reagente de lise	1 ampola, 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  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  e/ou  $95\text{--}100^\circ\text{C}$
  - Disruptor celular, por exemplo, um Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.) – para protocolo Standard II
- Específico para extração em placa Deep Well:
  - Agitador térmico de aquecimento\* capaz de manter  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  e/ou  $95\text{--}100^\circ\text{C}$ , com uma velocidade de mistura de pelo menos 1.300 rpm
  - DW40 Deep Well Microplate Washer (nº do catálogo 90137) – para protocolo Standard II
- Vortexer
- Placa de agitação magnética
- Micropipetas de 20, 200 e 1.000  $\mu\text{l}$
- 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: Água Peptonada Tamponada (APT) (por exemplo, BPW Plus, nº do catálogo 3564684, desidratado, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 frascos; 3555795, 3 L x 4 sacos; 3555790, 5 L x 2 sacos BPW Standard, nº do catálogo 12013259, desidratado, 500 g; 12013258, desidratado, 5 kg, 12013260, 5 L x 2 sacos)

- Específico para enriquecimento de amostras de produção primária ambientais: RAPID'*Salmonella* Capsule, (nº do catálogo 3564710, 1x concentração, 100 cápsulas; 3564709, 10x concentração, 100 cápsulas; 3564712, pó, 100 testes)
- Suplemento seletivo: Novobiocina
- PIF Supplement (nº do catálogo 12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (nº do catálogo 3594970)
- Específico para amostras ambientais:
  - Esponjas ambientais
  - Esfregaços ambientais
  - Caldo neutralizante para esponjas e cotonetes, como Dey-Engley (D/E) ou HiCap Neutralizing Broth ou Lethen Broth
- Específico para extração em tubos
  - Tubos com tampa cônica de rosca de 1,5 ml, estéreis (por exemplo, nº do catálogo 2240110XTU)
- Específico para extração em 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 do catálogo 3600040, apenas América do Norte)
- Específico para o sistema iQ-Check Prep System
  - Recipiente de diluição de 60 ml (nº do catálogo 3594904 ou 12014473)
  - Pontas de filtro (nº do catálogo 3594902 ou 12014486, 50 µl x 5.760; 3594903 ou 12014483, 1.000 µl x 3.840)
  - Tubos de mistura de PCR (nº do catálogo 12016673, 5 ml x 25)
- Específico para protocolos de extração Standard II e Easy II:
  - Lysis Beads (Reagente F) (nº do catálogo 3578136)
  - Pontas de pipete com abertura ampla, 200 µl
- RAPID'*Salmonella* Agar (nº do catálogo 3563961, 20 placas de 90 mm, nº do catálogo 3563963, 120 placas de 90 mm, nº do catálogo 3564705, desidratado, 500 g)
- Placas de PCR, tubos, fitas e tampas de vedação
- Pontas de filtro estéreis adaptáveis a micropipetas de 20, 200 e 1.000 µl

## Seção 6 Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados

- Ponteiras para pipetas Combitip ou pipetadores de repetição equivalentes, estéreis, embalados individualmente
- Pipetas de 1 e 10 ml
- Tubos de ensaio estéreis de 2 e 5 ml
- Luvas sem talco
- Água estéril destilada
- Alvejante, 5%
- Agente de limpeza, como o DNA AWAY ou o RNase AWAY

## Seção 6

### **Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados**

- Este teste deve ser realizado por pessoal treinado
- Amostras e culturas de enriquecimento devem ser manuseadas como material potencialmente infeccioso e descartadas de acordo com as regras e regulamentos locais
- Todos os materiais potencialmente infecciosos devem passar por autoclavagem antes do descarte
- A qualidade dos resultados depende do estrito cumprimento das Boas Práticas de Laboratório (por exemplo, a norma EN ISO 7218), especialmente em relação ao 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 5% de alvejante e outros agentes descontaminantes, como DNA AWAY
  - Utilize luvas sem talco e evite escrever ou deixar impressões digitais nas tampas dos tubos. Ambos interferem na aquisição de dados

- Recomenda-se fortemente o cumprimento dos requisitos gerais descritos na norma EN ISO 22174:2005 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food pathogens — General requirements and definitions)
- iQ-Check *Salmonella* II Kit
  - Todas as substâncias ou misturas no kit de teste são produtos classificados, de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado (GHS). O contato com ácidos pode causar a liberação de gases tóxicos. Nenhuma precaução especial é necessária, se usado corretamente. Se o produto for inalado, forneça ar fresco e consulte um médico em caso de queixas. Após o contato dos olhos com o produto, enxágue os olhos abertos por vários minutos em água corrente. Se os produtos forem ingeridos, provoque vômito e procure ajuda médica
- iQ-Check Prep System
  - O uso inadequado do iQ-Check Prep System pode causar ferimentos ou danos ao instrumento. Alguns componentes podem representar um risco de ferimentos pessoais devido ao calor excessivo, se manuseados incorretamente. Para uso seguro, o iQ-Check Prep System deve ser operado somente por pessoal qualificado do laboratório que tenha sido treinado adequadamente. A manutenção do instrumento deve ser realizada apenas pelos engenheiros de serviço de campo da Bio-Rad
- Sistemas de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well ou CFX Opus Deepwell:
  - O uso inadequado dos sistemas de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well ou CFX Opus Deepwell pode causar ferimentos pessoais 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 detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well e CFX Opus Deepwell deve ser operado apenas por pessoal de laboratório qualificado e devidamente treinado. A manutenção do instrumento deve ser realizada apenas pelos engenheiros de serviço de campo da Bio-Rad
- Enriquecimento
  - O usuário deve ler, compreender e seguir todas as informações de segurança contidas nas instruções do iQ-Check *Salmonella* II Kit. Guarde as instruções de segurança para referência futura. Para reduzir os riscos associados à exposição a produtos químicos e riscos biológicos, realize testes de patógenos em um laboratório devidamente equipado, sob o controle de pessoal treinado. Sempre siga as práticas padrão de segurança do laboratório, incluindo o uso de vestuário de proteção e proteção ocular adequados ao manusear reagentes e amostras contaminadas. Evite o contato com o conteúdo do meio de enriquecimento e dos tubos de reagentes após a amplificação. Descarte amostras enriquecidas de acordo com as normas atuais do setor
  - A *Salmonella* é um organismo de nível 2 de biossegurança. Amostras biológicas, como enriquecimentos, têm o potencial de transmitir doenças infecciosas. Siga todos os regulamentos locais, estaduais/provinciais e/ou nacionais aplicáveis sobre o descarte de resíduos biológicos. Use equipamento de proteção adequado, que inclua, entre outros, óculos de proteção, proteção facial, roupas/jaleco e luvas. Todo o trabalho deve ser realizado em instalações adequadamente equipadas, utilizando o equipamento de segurança apropriado (por exemplo, dispositivos de contenção física). Os indivíduos devem ser treinados de acordo com os requisitos regulamentares e da empresa/instituição aplicáveis antes de trabalhar com materiais potencialmente infecciosos



- Quando o teste estiver concluído, todos os materiais e meios possivelmente contendo patógenos devem ser descontaminados, seguindo as normas atuais da indústria para o descarte de resíduos contaminados (ou seja, autoclave por 20 min a 121°C). Consulte a folha de dados de segurança para obter informações adicionais e regulamentos locais para descarte

## Seção 7

### Protocolo

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

#### A. Enriquecimento da amostra

Para enriquecimento durante a noite, aqueça os meios até temperatura ambiente (20–25°C) antes do uso. Para um enriquecimento curto (8 hr), aqueça o caldo de enriquecimento até a temperatura de incubação da amostra antes do uso. Os tempos de enriquecimento curto são sensíveis às condições de incubação, e as temperaturas indicadas devem ser rigorosamente respeitadas. A duração da preparação da amostra (tempo entre o preaquecimento do caldo de enriquecimento e o começo da incubação da amostra de alimento) não deve exceder 45 min. Recomenda-se o uso de uma incubadora ventilada.

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

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

No escopo da validação NF VALIDATION, respeitar as normas ISO 6887-2 a 6 sobre preparação de amostras. Caso não seja indicado, porções de teste pesando mais de 25 g não têm sido testadas. Incubar sem mexer de acordo com os tempos e as temperaturas indicados na tabela. O protocolo de extração de DNA Standard I pode ser utilizado para todas as matrizes, exceto amostras de produção primária ambientais.

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

NF VALIDATION BRD 07/06 – 07/04 e NordVal 038		
Escopo (Matrizes)	Preparação da amostra	Enriquecimento/Extração de DNA
Produtos alimentícios, ração animal e amostras ambientais <sup>1</sup>	Pequenos tamanhos de amostras: Diluição 1:10 <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogeneize <i>n</i> g de alimento em 9 x <i>n</i> ml de APT (25 g em 225 ml)</li> </ul>	<b>Extração Standard I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar por 16–24 hr a 37 ± 1°C</li> <li>Formato do tubo</li> </ul> <b>Extração Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar por 20–24 hr a 37 ± 1°C</li> <li>Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>
	Produtos de carne crua (25 g, 375 g) <sup>2</sup>	Tamanhos de amostra de 25 g: Diluição 1:10 <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogeneize 25 g de carne crua em 225 ml de APT pré-aquecida</li> </ul>
	Tamanhos de amostra de 375 g: Diluição 1:4 <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogeneize 375 g de carne crua em 1.125 ml de APT pré-aquecida</li> </ul>	Extração II para amostras de 375 g <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar por 10–18 hr a 41,5 ± 1°C</li> <li>Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>

Amostras de produção primária ambiental	Homogeneize $n$ g amostra em $9 \times n$ ml de APT suplementada com cápsula RAPID' <i>Salmonella</i>	Standard II <sup>3</sup> ou extração Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 18–26 hr a <math>41,5 \pm 1^\circ\text{C}</math></li> <li>▪ Transferir 100 <math>\mu\text{l}</math> para 900 <math>\mu\text{l}</math> de APT fresca</li> <li>▪ Incubar por 4–6 hr a <math>37 \pm 1^\circ\text{C}</math></li> </ul>
Fórmula infantil e cereais com/sem probióticos, ingredientes (50–375 g) <sup>4</sup>	Homogeneize $n$ g de alimento em $3 \times n$ ml de c com suplemento PIF (375 g em 1.125 ml)	Extração Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 18–26 hr a <math>37 \pm 1^\circ\text{C}</math></li> <li>▪ Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>
Produtos lácteos não pasteurizados (até 50 g)	Homogeneize $n$ g de alimento em $9 \times n$ ml de APT suplementada com 20 mg/L novobiocina (50 g em 450 ml)	Extração Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 20–24 hr a <math>41,5 \pm 1^\circ\text{C}</math></li> <li>▪ Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>
Alimentos para animais de estimação e ração animal (375g)	Homogeneize a amostra $n$ g em $5 \times n$ ml de APT suplementada com cápsula RAPID' <i>Salmonella</i>	Extração Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 18–24 hr a <math>37 \pm 1^\circ\text{C}</math></li> <li>▪ Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>
<b>AOAC OMA 2017.06</b>		
<b>Escopo (Matrizes)</b>	<b>Preparação da amostra</b>	<b>Enriquecimento/Extração de DNA</b>
Produtos alimentícios selecionados e superfícies ambientais	Pequenos tamanhos de amostras: Diluição 1:10 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Homogeneize <math>n</math> g de alimento em <math>9 \times n</math> ml de APT (25 g em 225 ml)</li> </ul>	Extração Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 19–23 hr a <math>37 \pm 1^\circ\text{C}</math></li> <li>▪ Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>
	Grandes tamanhos de amostras: Diluição 1:4 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Homogeneize <math>n</math> g de alimento em <math>3 \times n</math> ml de APT (375 g em 1.125 ml)</li> </ul>	
	Amostras ambientais <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Umedeça os cotonetes e esponjas com um caldo neutralizante que não contenha complexo aril sulfonato</li> <li>▪ Para superfícies sendo analisadas com swabs, faça a amostragem de uma área de <math>1 \times 1''</math> (2,54 x 2,54 cm)</li> <li>▪ Para superfícies sendo analisadas com esponjas, faça a amostragem de uma área de <math>4 \times 4''</math> (10,16 x 10,16 cm)</li> <li>▪ Adicionar APT suficiente para cobrir o cotonete (10 ml) ou a esponja (100 ml)</li> </ul>	
Chocolate ao leite (375g)	Homogeneize 375 g de chocolate ao leite em 3.000 ml de meio de leite desnatado	Extração Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 18–22 hr a <math>37 \pm 1^\circ\text{C}</math></li> <li>▪ Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>
Enxágues de carcaça	Homogeneize 30 ml de enxágue de carcaça em 30 ml de APT	Extração Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 20–22 hr a <math>37 \pm 1^\circ\text{C}</math></li> <li>▪ Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>
<b>AOAC PTM 010803</b>		
<b>Escopo (Matrizes)</b>	<b>Preparação da amostra</b>	<b>Enriquecimento/Extração de DNA</b>
Carne bovina crua moída e aparas de carne bovina crua (375 g) <sup>5,7</sup>	Homogeneize $n$ g de alimento em $3 \times n$ ml de APT pré-aquecida (375 g em 1.125 ml)	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 8–22 hr a <math>41,5 \pm 1^\circ\text{C}</math></li> <li>▪ Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>
Espinafre cru fresco (375 g) <sup>5,7</sup>	Homogeneize $n$ g de alimento em $3 \times n$ ml de APT pré-aquecida (375 g em 1.125 ml)	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 10–22 hr a <math>41,5 \pm 1^\circ\text{C}</math></li> <li>▪ Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>

## Seção 7 Protocolo

Pós lácteos (375 g) <sup>7</sup>	Homogeneize <i>n</i> g de alimento em 3 x <i>n</i> ml de c com suplemento PIF (375 g em 1.125 ml)	Extração Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 18–26 hr a 37 ± 1°C</li> <li>▪ Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>
Licor de chocolate e chocolate branco (375 g) <sup>6,7</sup>	Homogeneize 375 g de alimento em 3.000 ml de APT pré-aquecida	Extração Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 18–26 hr a 37 ± 1°C</li> <li>▪ Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>
Flor de cannabis (10 g) <sup>5,7</sup> e flor de cânhamo <sup>5</sup>	Homogeneize <i>n</i> g de alimento em 9 x <i>n</i> ml de APT (flor de cânhamo: 10 g em 90 ml de APT e flor de cânhamo: 25 g em 225 ml de APT)	Extração Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 20–22 hr a 37 ± 1°C</li> <li>▪ Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>
Chocolate e gomas com infusão de cannabis (25 g) e concentrados derivados de cannabis (5 g) <sup>5,7</sup>	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento em 9 x <i>n</i> ml de APT (25 g em 225 ml ou 5 g em 45 ml).	Extração Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar 18–22 hr a 37 ± 1°C</li> <li>▪ Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>
Produtos à base de carne vegetal (375 g) <sup>7</sup>	Homogeneize <i>n</i> g de alimento em 3 x <i>n</i> ml de APT (375 g em 1.125 ml)	Extração Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 20–22 hr a 37 ± 1°C</li> <li>▪ Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>
Farinha de uso geral (375 g) <sup>5,7</sup>	<p>Diluição 1:3</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Homogeneize <i>n</i> g de alimento em 3 x <i>n</i> ml de APT pré-aquecida + suplemento PIF (375 g em 1.125 ml + 150 µl de suplemento PIF preparado)</li> <li>▪ Após o enriquecimento, transfira uma alíquota de 1 a 5 ml para um tubo ou placa Deep Well e deixe descansar por pelo menos 30 min. antes de prosseguir para a extração de DNA</li> </ul> <p>Diluição 1:9</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Homogeneize <i>n</i> g de alimento em 9 x <i>n</i> ml de APT pré-aquecida + suplemento PIF (375 g em 3.375 ml + 375 µl de Suplemento PIF preparado)</li> </ul>	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar por 20–24 hr a 37 ± 1°C</li> <li>▪ Formato do tubo/Deep Well</li> </ul>

**Consulte o MFLP-38 para matrizes e protocolos aprovados pela Health Canada**

<sup>1</sup> Exceto amostras de produção primária ambientais

<sup>2</sup> Protocolo utilizado para detecção simultânea de *E. coli* O157:H7

<sup>3</sup> O reagente de lise utilizado é apenas o reagente A (sem o reagente F)

<sup>4</sup> O protocolo está harmonizado com os iQ-Check *Cronobacter* spp. e iQ-Check *Enterobacteriaceae* Kits

<sup>5</sup> Protocolo harmonizado com os iQ-Check *E. coli* O157:H7 e iQ-Check STEC VirX kits

<sup>6</sup> A validação inclui a realização de teste com e sem Reagente de Purificação iQ-Check

<sup>7</sup> A validação inclui estriamento direto para as placas *RAPID* *Salmonella*

## B. Tratamento de remoção de DNA livre

A iQ-Check Free DNA Removal Solution 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 em velocidade média em uma placa de agitação magnética.
2. Em geral, evite agitar o saco de enriquecimento e coletar fragmentos de grande dimensão de resíduos alimentares. Para amostras alimentares com um sobrenadante gorduroso, colete a amostra logo abaixo desta camada.
3. Abra os tubos e os poços com cuidado para evitar possíveis contaminações cruzadas.
4. Resfrie a placa Deep Well antes de pipetar diretamente através do filme de vedação pré-perfurado.
5. Use a barra magnética para manter o reagente de lise em suspensão. Pipete enquanto estiver mexendo em velocidade média.
6. Agite suavemente o reagente de lise manualmente primeiro para ressuspender a resina. Pipete enquanto a barra magnética agita o conteúdo da ampola em velocidade média para manter o conteúdo em suspensão.
7. Para protocolos Easy II e Standard II, reconstitua o reagente de lise final da seguinte forma:
  - a. Despeje cuidadosamente todo o conteúdo do reagente F (microesferas de lise) no reagente A (reagente de lise).
  - b. Use consumíveis com uma ponta larga o suficiente para permitir a pipetagem do reagente de lise homogeneizado.
  - c. O reagente de lise misturado com as microesferas de lise (reagentes A + F) tem um prazo de validade de 6 meses quando armazenado a 4°C.

### Protocolo Easy I

1. Alíquote 100 µl de reagente lise homogeneizado (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 min. Incube a placa Deep Well na incubadora sob agitação a 1.300–1.600 rpm a 95–100°C por 15–20 min.
6. Agite no vórtex os tubos em alta velocidade e depois centrifugue a 10.000–12.000 x g por pelo menos 2 min. A centrifugação não é necessária para a placa Deep Well.

### Protocolo Easy II

1. Alíquota de 100 µl de reagente de lise homogeneizado (reagentes A + F) para poços de uma placa Deep Well.

**Nota:** Agite suavemente o reagente de lise manualmente com a mão para ressuspender as microesferas.

2. Adicione 100 µl de amostra enriquecida.

**Nota:** Agite a suspensão para homogeneizar a cultura e, em seguida, permita que os detritos se depositem antes de coletar a amostra.

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. Coloque os tubos no Cell disruptor por  $3 \pm 1$  min.
6. Incube os tubos no bloco de calor a 95–100°C por 10–15 min. Incube a placa Deep Well no agitador térmico a 1.300 rpm a 95–100°C por 15–20 min.
7. Agite no vórtex os tubos em alta velocidade e depois centrifugue a 10.000–12.000 x g por pelo menos 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.

### Protocolo Standard I

1. Colete 1 ml de amostra enriquecida decantada em um tubo.
2. Centrifugue a 10.000–12.000 x g por 5 min.
3. Descarte todo o sobrenadante.
4. Adicione 200 µl de reagente de lise (reagente A) ao sedimento.
5. Pipete o reagente no tubo para cima e para baixo suficiente para ressuspender o pellet. A quantidade de vezes dependerá da amostra.
6. Agite no vortex em alta velocidade e coloque o tubo no bloco de calor a 95–100°C por 10 a 15 min.
7. Agite no vortex em alta velocidade e centrifugue a 10.000–12.000 x g por 5 min.

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

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

## Protocolo Standard II

1. Coletar 1 ml de amostra enriquecida decantada em um tubo ou uma placa Deep Well. Sele a placa Deep Well com um filme plástico.

**Nota:** Agite a suspensão para homogeneizar a cultura e, em seguida, permita que os detritos se depositem antes de coletar a amostra.

2. Centrifugue os tubos a 10.000–12.000 x g por 5 min. Descarte o sobrenadante. Centrifugue as placas de poço a 2.250 x g por 20 min e descarte o sobrenadante manualmente ou usando o DW40.
3. Adicione 200 µl de reagente de lise homogeneizado (reagentes A + F) ao sedimento e ressuspensa o sedimento pipetando o reagente para cima e para baixo. Feche os tubos ou sele a placa Deep Well com filme de vedação pré-perfurado.

**Nota:** Agite suavemente o reagente de lise manualmente com a mão para ressuspender as microesferas. Para amostras de produção primária, utilize o reagente A sem reagente F.

4. Coloque o tubo no disruptor de célula por  $3 \pm 1$  min ou mexa a placa Deep Well no agitador térmico a 1.300–1.600 rpm a 95–100°C por 15–20 min.
5. Incube tubos no bloco de calor apropriado a 95–100°C por 10–15 min.
6. Agite no vortex os tubos em alta velocidade e centrifugue a 10.000–12.000 x g por 5 min. Centrifugue a placa Deep Well a 2.250 x g por 2 min.

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

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

## 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 iQ-Check kits.

### 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.
2. Use a mistura de PCR (reagentes B + C) imediatamente após a preparação. Ela é estável por 1 hr no máximo a 2–8°C.
3. Pipete 45 µl da mistura de PCR para cada poço, de acordo com a configuração da placa.

## Seção 7 Protocolo

4. Para purificar o DNA, combine 50 µl de DNA extraído de cada amostra com 200 µl de iQ-Check Purification Reagent. Pipete para cima e para baixo 5 vezes para homogeneizar. Alternativamente, uma diluição de 1:10 do DNA extraído pode ser feita usando água esterilizada.
5. 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 ou tiras. É importante evitar a formação de bolhas no fundo dos poços, o que é conseguido fazendo a pipetagem cuidadosamente. Como uma etapa opcional, centrifugue a placa de PCR selada ou as tiras de tubo (rotação rápida) para eliminar quaisquer bolhas.
6. Coloque a placa ou as tiras no termociclador. Certifique-se de colocar a placa com o poço A1 no canto superior esquerdo. Feche o módulo de reação.

### Execute o PCR

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

O Arquivo de Protocolo de Aplicação “Salmo Fast” foi certificado pela NF Validation e AOAC PTM.

## E. Análise de dados

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

### Interpretação de resultados

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

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

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

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

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

## Amostras

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

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

- Essa amostra é considerada **negativa** para *Salmonella* spp. se não houver valor Cq no canal FAM e o controle interno tiver um valor Cq  $\geq 28$
- 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 do teste é resumida na tabela a seguir:

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

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

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



## Seção 8

### Confirmação de Resultados Positivos

No contexto da validação da AOAC, presume-se que um resultado positivo para iQ-Check Salmonella II seja positivo e recomenda-se a confirmação de acordo com um método de referência apropriado (por exemplo, USDA MLG, FDA BAM, ISO, MFHPB, AOAC SMPR etc.). Alternativamente, estriar 10 µl de APT enriquecida (com suplementos quando aplicável) diretamente para RAPID'Salmonella cromogênico e incubar por 24 ± 2 hr a 37 ± 1 °C (exceto para flor de cânhamo). Quando a flora interferente puder ser alta, transfira 0,5 ml de APT enriquecida para 10 ml de caldo Rapaport Vassiliadis Soy (RVS) e incubar por 24 ± 3 hr a 41,5 ± 1°C e, em seguida, proceder com estrias de 10 µl de RVS enriquecido para meios cromogênicos RAPID'Salmonella. Consulte o método de confirmação do guia do usuário de meio cromogênico RAPID'Salmonella (nº do documento 10000126748).

No contexto do método certificado NF VALIDATION, todos os resultados positivos iQ-Check Kit devem ser confirmados das seguintes formas:

#### Todas as amostras, exceto as de produção primária

1. Usando testes clássicos descritos nos métodos CEN ou ISO padrão (incluindo a purificação) diretamente do caldo de enriquecimento APT após o total enriquecimento de 18 ± 2 hr a 37 °C.
2. Ao estriar 10 µl de APT enriquecida (com suplementos quando aplicável) diretamente no meio cromogênico RAPID'Salmonella e incubar por 24 ± 2 hr a 37 ± 1°C. Quando a flora interferente puder ser alta, transfira 0,5 ml de APT enriquecida para 10 ml de caldo Rapaport Vassiliadis Soy (RVS) e incubar por 24 ± 3 hr a 41,5 ± 1°C e, em seguida, proceder com estrias de 10 µl de RVS enriquecido para meios cromogênicos RAPID'Salmonella.
3. Utilizando qualquer outro método certificado pela NF VALIDATION, com base em um princípio diferente daquele usado no Teste de PCR iQ-Check Salmonella II. O protocolo validado deste o segundo método deve ser seguido inteiramente, incluindo o enriquecimento seletivo RVS, quando necessário. A confirmação é realizada a partir do caldo de enriquecimento APT se esta etapa for comum a ambos os métodos.

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

É possível armazenar a APT enriquecida a 2–8°C por 72 hr no máximo, após a última incubação a 37°C, com exceção das amostras de superfícies ambientais e lácteas.

#### Amostras de produção primária

Comece o processo de confirmação a partir do enriquecimento primário, após o método MSR/V indicado no Apêndice D da norma ISO 6579/A1 e usando meio RAPID'Salmonella para isolamento.

O desacordo entre os resultados do iQ-Check Salmonella II Kit e o método de confirmação descrito acima pode ser causado pela presença de Salmonella imóvel. Nesse caso, siga o protocolo de enriquecimento duplo de RAPID'Salmonella (consulte o guia do usuário do produto para obter instruções de uso). Este protocolo inclui uma etapa de enriquecimento seletivo em meio RVS.

No escopo da NF VALIDATION, os sacos de enriquecimento primário podem ser armazenados por até 24 hr a 2–8°C antes de prosseguir para a confirmação.

## Seção 9

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

O iQ-Check *Salmonella* spp. II. Kit também pode ser usado para confirmar colônias isoladas de *Salmonella* spp. em placas de ágar. Isso é oficialmente validado pela AFNOR Certification no meio cromogênico RAPID' *Salmonella* .

1. Escolha uma colônia isolada de uma placa de cultura de ágar seletivo ou não seletivo com um palito de dente, alça estéril ou outro consumível adaptado (por exemplo, uma ponta de pipeta).
2. Ressuspenda a colônia em 100 µl de sal de triptona ou água estéril destilada em um tubo de microcentrifuga. Homogeneíze usando um vortexer.
3. Use 5 µl da suspensão com 45 µl de mistura de PCR (consulte D. PCR em Tempo Real, na Seção 7 Protocolo) e siga o protocolo *Salmonella* II para a interpretação dos dados e resultados.

## Seção 10

### Desempenho e validação do teste

O iQ-Check *Salmonella* II Kit é específico para a detecção do gênero *Salmonella*.



BRD 07/10 – 04/05

MÉTODOS ALTERNATIVOS DE  
ANÁLISE PARA AGRONEGÓCIO

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

### NF Validation

O iQ-Check *Salmonella* II Kit é certificado pela NF VALIDATION como uma alternativa para o método de referência ISO 6579 -1 (2017) para a detecção de *Salmonella* spp. em todos os produtos para consumo humano e animal, bem como amostras ambientais. A validação seguiu o protocolo da norma ISO 16140: padrão 2016 e inclui o uso dos sistemas de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well e CFX Opus Deepwell. O uso da solução iQ-Check Free DNA Removal Solution é validado para ingredientes e fórmulas infantis, comida de animais de estimação e alimentação animal. O software associado é CFX Manager IDE Software (V2.2 e posterior). O APF “Salmo Fast” é validado para todas as amostras. Número do certificado: BRD 07/06 – 07/04. Consulte o certificado disponível no site de Certificação AFNOR para obter informações de validade.

OMA 2017.06



## Validação AOAC

O iQ-Check *Salmonella* II Kit (protocolo Easy) é validado pelo AOAC Research Institute sob o OMA 2017.06 para a detecção de *Salmonella* spp. em ovos (25 g), frango moído cru (25 e 375 g), carne de vaca crua (25 g), carne de porco crua (25 g), espinafres frescos (25 g e 375 g), melão (25 g), manteiga de amendoim (25 g), presunto frio pronto para comer (375 g), superfícies ambientais selecionadas, ração úmida (25 g) e seca (25 e 375 g), chocolate ao leite (375 g), queijo (375 g), enxágues de carcaça, licor de chocolate (375 g), chocolate branco (375 g), NFDM (375 g) soro de leite em pó (375 g), carne moída crua (375 g), aparas de carne crua (375 g), flor de cannabis (10 g), chocolate com infusão de cannabis (25 g), gomas com infusão de cannabis (25 g), concentrados derivados de cannabis (5 g), flor de cânhamo (25 g), farinha (375 g) e produtos de carne à base de plantas (375 g). Um resultado positivo com o iQ-Check kit é considerado como presumido e recomenda-se que seja confirmado pelos métodos de referência padrão na Seção 8 acima. O "Salmo Fast" APF, o uso da iQ-Check Free DNA Removal Solution, e o uso dos sistemas PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well e CFX Opus Deepwell são validados para todas as amostras. O software associado é o CFX Manager IDE Software (versão 2.2 e posterior).



## Validação Health Canada

O iQ-Check *Salmonella* II (protocolo Easy) foi validado pela Health Canada (MFLP-38) para detecção de *Salmonella* spp. Presume-se que um resultado positivo com o iQ-Check kit seja positivo e deve ser confirmado de acordo com MFHPB-20 (consulte a Seção 11, referência 5).



## NordVal Validation

O iQ-Check *Salmonella* II Kit é validado pela NordVal para os protocolos Standard I e Easy I (em microplacas) em alimentos, ração e ambiente, e para os protocolos Easy II (em microplacas) em carne crua e carne bovina crua, respectivamente. O APF "Salmo Fast" é validado para todas as amostras. Número do certificado: 038. Consulte o certificado disponível no site da NordVal para informações de validade.

## Seção 11

### Referências

ISO 7218. Microbiology of the food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examination.

ISO 6887-4. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.

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

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

Miras I et al. (1995). Nucleotide sequence of *iagA* and *iagB* genes involved in invasion of HeLa cells by *Salmonella* enteritica subsp. Enteritica ser. Typhi. Res Microbiol 46, 17–20.

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

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

Health Canada Health Products and Food Branch, MFHPB-20 Isolation and Identification of *Salmonella* from Food and Environmental Samples, Compendium of Analytical Methods, Volume 2, March 2009.

Health Canada Health Products and Food Branch, Part 4: Qualitative Methods, Procedure for the Development and Management of Food Microbiological Methods, Compendium of Analytical Methods, Volume 1.

## Seção 12

### Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Outubro de 2020	10000131519 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Renovação e extensão da validação AFNOR: FDRS use como opção, APF “Salmo Fast”</li> <li>- Novo design de documento e atualização de referências e conteúdo</li> <li>- Alteração do número do documento (a versão anterior era 808463 Rev G)</li> </ul>
Fevereiro de 2023	10000131519 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Adicionado novo n° do catálogo para consumíveis e instrumentos</li> <li>- Esclarecimento do protocolo de interpretação de resultados</li> <li>- Extensão AOAC: Novas matrizes, FDRS, “Salmo Fast” APF</li> <li>- Seção de protocolo substituída por tabela de resumo</li> <li>- Atualização do escopo da validação NordVal</li> <li>- Extensão de validações CFX Opus Deepwell para sistema de PCR em tempo real CFX Opus Deepwell Real-Time e atualização para CFX Manager Software IDE versão 3.1</li> <li>- Extensão da Validação AFNOR em alimentos para animais de estimação e ração animal</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 maiores informações.

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

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

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



**Bio-Rad  
Laboratories, Inc.**

Life Science  
Group

---

**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 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23  
**Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280  
**Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23  
**Russian Federation** 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188  
**South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23 **Sweden** 00 800 00 24 67 23  
**Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311  
**United Arab Emirates** 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

---

Sig 0122



---

# **iQ-Check *Salmonella* spp. II Kit**

## **Manual de usuario**

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

Referencia #3578123





# Tabla de Contenidos

Apartado 1.	Introducción.....	1
Apartado 2.	Tecnología de iQ-Check <i>Salmonella</i> spp. II .....	1
Apartado 3.	Componentes del kit.....	2
Apartado 4.	Vida útil y conservación.....	2
Apartado 5.	Materiales necesarios, no suministrados .....	3
	Equipos .....	3
	Consumibles.....	3
Apartado 6.	Seguridad, precauciones y recomendaciones para la obtención de resultados óptimos .....	5
Apartado 7.	Protocolo .....	7
	Enriquecimiento de la muestra .....	7
	Tratamiento de eliminación de ADN libre .....	10
	Extracción de ADN .....	10
	PCR en tiempo real .....	13
	Análisis de los datos.....	14
Apartado 8.	Confirmación de resultados positivos.....	16
Apartado 9.	Confirmación de colonias aisladas usando el kit iQ-Check .....	17
Apartado 10.	Aplicación del análisis y validaciones .....	17
Apartado 11.	Referencias .....	19
Apartado 12.	Historial de revisiones .....	20
	Apéndice — Tabla de cálculo de la mix de PCR.....	21

## Apartado 1

### Introducción

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

Los métodos de cultivo convencionales suelen ser largos y tediosos. En comparación, iQ-Check *Salmonella* II Kit es un ensayo cualitativo simple y rápido, que permite la detección de secuencias específicas de ADN de *Salmonella* spp. que se encuentran en productos alimentarios dedicados al consumo humano y animal y en muestras ambientales. Utilizando PCR en tiempo real, las secuencias de ADN específicas de *Salmonella* spp. se amplifican y se detectan simultáneamente por medio de sondas fluorescentes. Se pueden procesar hasta 94 muestras a la vez con un riesgo mínimo de contaminación y un procedimiento sencillo. Los usuarios a los que se destina este kit de detección son personal de laboratorio capacitado que realiza ensayos para detectar *Salmonella* spp. El uso de este ensayo permite obtener resultados pocas horas después del enriquecimiento de una muestra.

## Apartado 2

### Tecnología de iQ-Check *Salmonella* spp. II

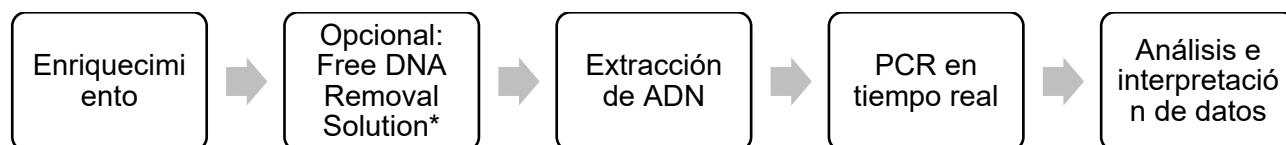
iQ-Check *Salmonella* II Kit se basa en la amplificación del gen y la detección por PCR en tiempo real. Los reactivos de PCR listos para su uso incluidos en el kit contienen oligonucleótidos (cebadores y sondas) específicos para *Salmonella* spp., así como ADN polimerasa y nucleótidos. La detección y el análisis de datos están optimizados para su uso con un instrumento de PCR en tiempo real de Bio-Rad, como el sistema CFX96 Touch Deep Well.

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

En la PCR en tiempo real, se utilizan sondas específicas para detectar el ADN durante la fase de amplificación, mediante la hibridación de los amplicones. Estas sondas están unidas a un fluoróforo que sólo se vuelve fluorescente cuando se hibrida con la secuencia diana. FAM es el fluoróforo unido a la sonda que hibrida con la secuencia de ADN específica de *Salmonella* spp. En ausencia de ADN diana, no se detectará 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 hibridación 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 *Salmonella* y se detecta por un segundo fluoróforo.

Este ensayo permite la detección cualitativa de *Salmonella* spp. en muestras seleccionadas de productos alimentarios para consumo humano y animal y en muestras ambientales, previamente enriquecidas por cultivo. Consta de los siguientes cinco pasos principales:



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

## Apartado 3

### Componentes del kit

iQ-Check *Salmonella* spp. II Kit contiene suficientes reactivos para 96 ensayos (94 muestras).

ID de reactivo	Reactivo	Cantidad proporcionada, ml
A	Reactivo de lisis	1 frasco, 20
B	Sondas de fluorescencia	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

- Mezcladora de paletas de laboratorio para homogeneizar las muestras de ensayo
- Incubadora para el enriquecimiento microbiológico de muestras
- Materiales específicos para la extracción en tubos estériles de tapón de rosca cónico de 1,5 ml:
  - Centrifuga de sobremesa capacidad de 10.000-12.000 x g
  - Calentador de bloque seco a  $37 \pm 2$  °C y/o 95-100 °C
  - Disruptor celular (por ejemplo, Disruptor Genie, Scientific Industries, Inc.) para el protocolo Standard II
- Materiales específicos para la extracción en la placa Deep Well:
  - Calefactor térmico con agitación\* con capacidad para mantener  $37 \pm 2$  °C y/o 95-100 °C, con una velocidad de agitación de al menos 1.300 rpm
  - DW40 Deep Well Microplate Washer (referencia #90137) – para protocolo Standard II
- Agitador vórtex
- 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 System (referencia #3600037) o CFX Opus Deepwell System (referencia #17007991)
- iQ-Check Prep System de Bio-Rad para el procedimiento de extracción automático de ADN y configuración de la placa PCR (referencia #3594911)

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

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

#### Consumibles

- Caldo de enriquecimiento: Agua de peptona tamponada (por ejemplo, BPW Plus, referencia #3564684, deshidratado, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 frascos; 3555795, 3 L x 4 bolsas; 3555790, 5 L x 2 bolsas; o BPW Standard, referencia #12013259, deshidratado, 500 g; 12013258, deshidratado, 5 kg; 12013260, 5 L x 2 bolsas)

- Específicamente para el enriquecimiento de muestras ambientales de producción primaria: RAPID'*Salmonella* Capsule, (referencia #3564710, concentración 1x, 100 cápsulas; 3564709, concentración 10x, 100 cápsulas; 3564712, polvo, 100 ensayos)
- Agentes selectivos: Novobiocina
- PIF Supplement (referencia #12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (referencia #3594970)
- Materiales específicos para muestras ambientales:
  - Esponjas ambientales
  - Hisopos ambientales
  - Caldo neutralizante para esponjas e hisopos, como el caldo neutralizante Dey-Engley (D/E) o HiCap Neutralizing Broth o Lethen Broth
- 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 una 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 Norteamérica)
- Materiales específicos para el iQ-Check Prep System
  - Recipiente de 60 ml para dilución (referencia #3594904 o 12014473)
  - Puntas con filtros (referencia #3594902 o 12014486, 50 µl x 5760; 3594903 o 12014483, 1.000 µl x 3.840)
  - Tubos de mix de PCR (referencia #12016673, 5 ml x 25)
- Materiales específicos para protocolos de extracción Standard II y Easy II:
  - Lysis beads reagent F (referencia #3578136)
  - Puntas de pipeta de 200 µl con apertura ancha
- RAPID'*Salmonella* Agar (referencia #3563961, 90 mm x 20 placas; 3563963 90 mm x 120 placas; 3564705, deshidratado, 500 g)
- Placas PCR, tubos, film adhesivo y tapas
- Puntas estériles con filtro adaptables a micropipetas de 20, 200 y 1.000 µl

## Apartado 6 Seguridad, precauciones y recomendaciones para la obtención de resultados óptimos

- Puntas de pipeta Combitip o pipetas de repetición equivalente; estériles, empaquetadas individualmente
- Pipetas de 1 y 10 ml
- Tubos de ensayo estériles de 2 y 5 ml
- Guantes sin talco
- Agua destilada estéril
- Lejía, 5 %
- Agente descontaminante, como DNA AWAY o RNase AWAY

## Apartado 6

### **Seguridad, precauciones y recomendaciones 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:
  - Nunca haga circular el material de laboratorio (pipetas, tubos, etc.) de una estación de trabajo a otra
  - 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 lejía al 5 % y otros agentes descontaminantes, como DNA AWAY

- Use guantes sin talco y evite las huellas dactilares y escribir en los tapones de los tubos. Ello podría interferir en la correcta adquisición de datos
- Se recomienda encarecidamente seguir los requisitos generales descritos en la norma EN ISO 22174:2005 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions)
- iQ-Check *Salmonella* II Kit
  - Todas las sustancias o mezclas del equipo de ensayo son productos clasificados, según el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS en inglés por el acrónimo de Globally Harmonized System). El contacto con ácidos puede causar la liberación de gases tóxicos. No es necesario tomar precauciones especiales si se utiliza correctamente. Si se inhala el producto, suministre aire fresco y consulte a un médico en caso de presentar molestias. En caso de contacto del producto con los ojos, enjuague el ojo abierto durante varios minutos con agua corriente. En caso de ingestión de los productos, induzca el vómito y solicite ayuda médica.
- iQ-Check Prep System
  - El uso inadecuado del sistema de preparación iQ-Check Prep System puede causar lesiones personales o daños en el instrumento. Algunos componentes pueden suponer un riesgo de lesiones personales debido al calor excesivo si se manejan de forma inadecuada. Para un uso seguro, el iQ-Check Prep System debe ser manipulado y utilizado sólo por personal de laboratorio calificado que haya sido instruido para tal fin. El mantenimiento del instrumento debe ser realizado sólo por los ingenieros del servicio técnico de Bio-Rad
- Sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch Deep Well System o CFX Opus Deepwell System
  - El empleo inadecuado de sistemas de detección mediante PCR en tiempo real CFX96 Touch Deep Well o CFX Opus Deepwell 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, los sistemas de detección CFX96 Touch Deep Well y CFX Opus Deepwell mediante PCR en tiempo real deben ser manipulados y utilizados sólo por personal de laboratorio cualificado que haya sido instruido para tal fin. El mantenimiento del instrumento debe ser realizado sólo por 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 iQ-Check *Salmonella* II Kit. 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 normalizadas 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.

## Apartado 7 Protocolo

- La *Salmonella* es un organismo considerado en el nivel de bioseguridad 2. Las muestras biológicas como los enriquecimientos tienen potencial de transmitir enfermedades infecciosas. Siga todos los reglamentos locales, estatales/provinciales y/o nacionales aplicables para la eliminación de desechos biológicos. Use el equipo de protección apropiado, que incluya, pero no se limite a, gafas protectoras, protector facial, ropa/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 min a 121 °C). Consulte la Ficha de Datos de Seguridad para obtener información adicional y los reglamentos locales para la eliminación

## Apartado 7

### Protocolo

Altamente recomendable leer completa y detenidamente el protocolo antes de iniciar el ensayo.

#### A. Enriquecimiento de la muestra

Para el enriquecimiento de un día para otro, lleve el medio a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de utilizarlo. Para un enriquecimiento corto (8 hr), caliente el caldo de enriquecimiento a la temperatura de incubación de la muestra antes de su uso. Los periodos de enriquecimiento cortos son sensibles a las condiciones de incubación y se deben respetar estrictamente las temperaturas indicadas. La duración de la preparación de la muestra (tiempo entre el precalentamiento del caldo de enriquecimiento y el comienzo de la incubación de la muestra de alimento) no debe superar los 45 min. Se recomienda el uso de un incubador o estufa ventilada.

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

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

En el contexto de NF Validation, respete las normas ISO 6887-2 a -6 para la preparación de muestras. Salvo que se indique lo contrario, las porciones de muestra con peso superior a 25 g no han sido testadas. Incube, sin agitar, durante los tiempos y a las temperaturas indicados en la tabla. El protocolo de extracción de ADN Standard I puede utilizarse para todas las matrices, excepto para las muestras ambientales de producción primaria.

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



**NF VALIDACIÓN BRD 07/06 – 07/04 y NordVal 038**

<b>Alcance (matrices)</b>	<b>Preparación de las muestras</b>	<b>Enriquecimiento/ Extracción de ADN</b>
Productos alimentarios humanos y animales y muestras de superficies superficiales ambientales <sup>1</sup>	Muestras de pequeño tamaño: Dilución 1:10 <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de APT (25 g en 225 ml)</li> </ul>	<b>Extracción estándar I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar durante 16-24 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>Formato de tubo</li> </ul> <b>Extracción Easy I</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar durante 20-24 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>Formato de tubo/ Deep Well</li> </ul>
Productos cárnicos crudos (25 g, 375 g) <sup>2</sup>	Tamaños de muestra de 25 g: Dilución 1:10 <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogeneizar 25 g de carne cruda en 225 ml de APT precalentada</li> </ul>	Extracción Easy II para muestras de 25 g <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar durante 8-16 hr a 41,5 ± 1 °C</li> <li>Formato de tubo/ Deep Well</li> </ul>
	Tamaños de muestra de 375 g: Dilución de 1:4 <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogeneizar 375 g de carne cruda en 1.125 ml de APT precalentada</li> </ul>	Extracción Easy II para muestras de 375 g <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar durante 10-18 hr a 41,5 ± 1 °C</li> <li>Formato de tubo/ Deep Well</li> </ul>
Muestras ambientales de producción primaria	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de ATP suplementada con la cápsula RAPID' <i>Salmonella</i>	Extracción Standard II <sup>3</sup> o Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar 18-26 hr a 41,5 ± 1 °C</li> <li>Transferir 100 µl en 900 µl de APT fresca.</li> <li>Incubar durante 4-6 hr a 37 ± 1 °C</li> </ul>
Fórmula infantil y cereales con y sin probióticos, ingredientes (50-375 g) <sup>4</sup>	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 3 x <i>n</i> ml de APT (375 g en 1.125 ml)	Extracción Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar durante 18-26 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>Formato de tubo/ Deep Well</li> </ul>
Productos lácteos crudos (hasta 50 g)	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de APT complementada con 20 mg/L de novobiocina (50 g en 450 ml)	Extracción Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar durante 20-24 hr a 41,5 ± 1 °C</li> <li>Formato de tubo/ Deep Well</li> </ul>
Alimentos para animales (375 g)	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 5 x <i>n</i> ml de ATP precalentada suplementada con la cápsula RAPID' <i>Salmonella</i>	Extracción Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar durante 18-24 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>Formato de tubo/ Deep Well</li> </ul>

Apartado 7 Protocolo

AOAC OMA 2017.06		
Alcance (matrices)	Preparación de las muestras	Enriquecimiento/ Extracción de ADN
Productos alimentarios y muestras ambientales seleccionadas	Muestras de pequeño tamaño: Dilución 1:10 <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogeneizar <math>n</math> g de alimento en <math>9 \times n</math> ml de APT (25 g en 225 ml)</li> </ul>	Extracción Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar durante 19-23 hr a <math>37 \pm 1</math> °C</li> <li>Formato de tubo/Deep Well</li> </ul>
	Tamaños de muestra grandes: Dilución de 1:4 <ul style="list-style-type: none"> <li>Homogeneizar <math>n</math> g de alimento en <math>3 \times n</math> ml de APT precalentada (375 g en 1.125 ml)</li> </ul>	
	Muestras ambientales <ul style="list-style-type: none"> <li>Humedecer los hisopos y las esponjas con un caldo neutralizante que no contenga complejo de sulfonato de arilo.</li> <li>Para las superficies que se analizan con hisopos, tome una muestra de una superficie de 1 x 1" (2,54 x 2,54 cm).</li> <li>Para las superficies que se analizan con esponjas, tome una muestra de una superficie de 4 x 4" (10,16 x 10,16 cm).</li> <li>Añadir a la APT una cantidad suficiente para cubrir el hisopo (10 ml) o la esponja (100 ml)</li> </ul>	
Chocolate con leche (375 g)	Homogeneizar 375 g de chocolate con leche en 3.000 ml de medio de leche desnatada	Extracción Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar durante 18-22 hr a <math>37 \pm 1</math> °C</li> <li>Formato de tubo/Deep Well</li> </ul>
Enjuagues de canal	Homogeneizar 30 ml de enjuague de la canal en 30 ml de APT	Extracción Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar durante 20-22 hr a <math>37 \pm 1</math> °C</li> <li>Formato de tubo/Deep Well</li> </ul>
AOAC PTM 010803		
Alcance (matrices)	Preparación de las muestras	Enriquecimiento/ Extracción de ADN
Carne picada cruda y recortes de carne cruda (375 g) <sup>5,7</sup>	Homogeneizar $n$ g de alimento en $3 \times n$ ml de APT precalentada (375 g en 1.125 ml)	Extracción Easy II <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar durante 8-22 hr a <math>41,5 \pm 1</math> °C</li> <li>Formato de tubo/Deep Well</li> </ul>
Espinacas frescas crudas (375 g) <sup>5,7</sup>	Homogeneizar $n$ g de alimento en $3 \times n$ ml de APT precalentada (375 g en 1.125 ml)	Extracción Easy II <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar durante 10-22 hr a <math>41,5 \pm 1</math> °C</li> <li>Formato de tubo/Deep Well</li> </ul>
Lácteos en polvo (375 g) <sup>7</sup>	Homogeneizar $n$ g de alimento en $3 \times n$ ml de APT (375 g en 1.125 ml)	Extracción Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar durante 18-26 hr a <math>37 \pm 1</math> °C</li> <li>Formato de tubo/Deep Well</li> </ul>
Licor de chocolate y chocolate blanco (375 g) <sup>6,7</sup>	Homogeneizar 375 g de alimento en 3.000 ml de APT precalentada	Extracción Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar durante 18-26 hr a <math>37 \pm 1</math> °C</li> <li>Formato de tubo/Deep Well</li> </ul>

Flor de cannabis (10 g) <sup>5,7</sup> y flor de cáñamo (25 g) <sup>5</sup>	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de APT (10 g en 90 ml de APT de flor de cannabis y 25 g en 225 ml de APT de flor de cáñamo)	Extracción Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar durante 20-22 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>▪ Formato de tubo/ Deep Well</li> </ul>
Chocolate y gominolas con cannabis (25 g) y concentrados derivados del cannabis (5 g) <sup>5,7</sup>	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de agua de peptona tamponada (25 g en 225 ml o 5 g en 45 ml).	Extracción Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar 18-22 h a 37 ± 1 °C</li> <li>▪ Formato tubo/ pocillo profundo</li> </ul>
Productos cárnicos de origen vegetal (375 g) <sup>7</sup>	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 3 x <i>n</i> ml de APT (375 g en 1.125 ml)	Extracción Easy I <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar durante 20-22 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>▪ Formato de tubo/ Deep Well</li> </ul>
Harina para todo uso (375 g) <sup>5,7</sup>	Dilución de 1:3 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 3 x <i>n</i> ml de APT precalentada + suplemento PIF (375 g en 1.125 ml + 150 µl de suplemento PIF preparado)</li> <li>▪ Después del enriquecimiento, transferir una alícuota de 1-5 ml a un tubo o placa de pocillos profundos y dejar reposar durante al menos 30 min. antes de proceder a la extracción de ADN</li> </ul> Dilución de 1:9 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de APT precalentada + suplemento PIF (375 g en 3.375 ml + 375 µl de suplemento PIF preparado)</li> </ul>	Extracción Easy II <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incubar durante 20-24 hr a 37 ± 1 °C</li> <li>▪ Formato de tubo/ Deep Well</li> </ul>

**Consulte MFLP-38 para conocer las matrices y protocolos aprobados por el Ministerio de Sanidad de Canadá**

<sup>1</sup> Salvo muestras ambientales de producción primaria

<sup>2</sup> Protocolo para la detección simultánea de *E. coli* O157:H7

<sup>3</sup> El reactivo de lisis utilizado es sólo el reactivo A (sin el reactivo F)

<sup>4</sup> El protocolo está armonizado con los kits iQ-Check *Cronobacter* spp. e iQ-Check *Enterobacteriaceae*

<sup>5</sup> Protocolo armonizado con los kits iQ-Check *E. coli* O157:H7 e iQ-Check STEC VirX

<sup>6</sup> La validación incluye la realización del ensayo con y sin el reactivo de purificación iQ-Check

<sup>7</sup> La validación incluye el muestreo directo en placas *RAPID Salmonella*

## B. Tratamiento de eliminación de ADN libre

iQ-Check Free DNA Removal Solution es la mejor forma de eliminar el ADN libre. Siga las recomendaciones de Bio-Rad descritas en el manual del usuario (documento #10000058391).

## C. Extracción de ADN

Recomendaciones generales:

1. Precaliente el bloque calefactor o mezclador térmico antes de iniciar el ensayo. Póngalo a 95-100 °C. Mantenga el reactivo de lisis en suspensión mientras pipetea agitando a velocidad media en una placa agitadora magnética.

## Apartado 7 Protocolo

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 para sellado preperforada.
5. Utilice la barra magnética para mantener el reactivo de lisis en suspensión. Pipetee mientras agita a velocidad media.
6. En primer lugar, agite el reactivo de lisis manualmente para resuspender la resina. Pipetee mientras la barra magnética agita el contenido del frasco a velocidad media para mantener el contenido en suspensión.
7. Para los protocolos Easy II y Standard II, reconstituya el reactivo de lisis final como se indica:
  - a. Vierta cuidadosamente todo el contenido del reactivo F (perlas de lisis) en el reactivo A (reactivo de lisis).
  - b. Utilice puntas con apertura suficientemente ancha para permitir el pipeteo homogeneizado del reactivo de lisis.
  - c. El reactivo de lisis mezclados con perlas de lisis (reactivos A + F) tiene una vida útil de 6 meses almacenado a una temperatura de 4 °C.

### Protocolo Easy I

1. Adicione una alícuota de 100 µl de reactivo de lisis homogeneizado (reactivo A) en los tubos o pocillos de una placa Deep Well.
2. Añada 100 µl de muestra enriquecida.
3. Homogeneice la solución pipeteando hacia arriba y hacia abajo hasta que se homogeneice.
4. Cierre los tubos o selle la placa Deep Well mediante la película pre-perforada de sellado.
5. Si trabaja con tubos, incúbelos en el bloque calefactor a 95-100 °C durante 15-20 min. Si trabaja con placa Deep Well, incúbela en el calefactor térmico con agitación, agitando simultáneamente a 1.300-1.600 rpm a 95-100 °C durante 15-20 min.
6. Si trabaja con tubos, agítelos con vórtex a alta velocidad y centrifugue a 10.000-12.000 x g durante al menos 2 min. La centrifugación no es necesaria para la placa Deep Well.

### Protocolo Easy II

1. Deposite una alícuota de 100 µl de reactivo de lisis homogeneizado (reactivos A + F) en los pocillos de una placa Deep Well.

**Nota:** en primer lugar, agite el reactivo de lisis manualmente para resuspender las perlas.

2. Añada 100 µl de muestra enriquecida.

**Nota:** agite la suspensión para homogeneizar el cultivo y seguidamente deje que los restos se asienten antes de recoger la muestra.

3. Homogeneice la solución pipeteando hacia arriba y hacia abajo hasta que se homogeneice.

4. Cierre los tubos o selle la placa Deep Well mediante la película pre-perforada de sellado.

5. Si trabaja con tubos, agítelos en el disruptor celular durante  $3 \pm 1$  min.

6. Incube los tubos en el bloque calefactor a 95-100 °C durante 10-15 min. Incube la placa Deep Well en el mezclador térmico bajo agitación a 1.300 rpm a 95-100 °C durante 15-20 min.

7. Si trabaja con tubos, agítelos con vórtex a alta velocidad y centrifugue a 10.000-12.000 x g durante al menos 2 min. La centrifugación no es necesaria para 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, homogenícelo y a continuación centrifúguelo a 10.000-12.000 x g durante 5 min.

### Protocolo Standard I

1. Recoja 1 ml de muestra enriquecida decantada en un tubo.

2. Centrifugue el tubo a 10.000-12.000 x g durante 5 min.

3. Descarte todo el sobrenadante.

4. Añada 200 µl de reactivo de lisis (reactivo A) al decantado o pellet.

5. Pipetee el reactivo en el tubo arriba y abajo lo suficiente para resuspender el decantado o pellet. El número de repeticiones dependerá de la muestra.

6. Agite (mediante vórtex) a alta velocidad y coloque el tubo en el bloque calefactor a 95-100 °C durante 10-15 min.

7. Agite con vórtex a alta velocidad y centrifugue a 10.000-12.000 x g durante 5 min.

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

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

### Protocolo Standard II

1. Recoja 1 ml de muestra enriquecida decantada en un tubo o en un pocillo de una placa Deep Well. Selle la placa Deep Well con una película o film plástico.

## Apartado 7 Protocolo

**Nota:** Agite la suspensión para homogeneizar el cultivo y seguidamente deje que los restos decanten antes de recoger la muestra.

2. Centrifugue el tubo a 10.000-12.000 x g durante 5 min. Descarte el sobrenadante. Centrifugue las placas Deep Well a 2.250 x g durante 20 min y descarte el sobrenadante manualmente o con el DW40.
3. Añada 200 µl de reactivo de lisis homogeneizado (reactivos A + F) al comprimido y re-suspéndalo pipeteando el reactivo hacia arriba y hacia abajo. Cierre los tubos o selle la placa Deep Well usando la película para sellado pre-perforada.

**Nota:** En primer lugar, agite el reactivo de lisis manualmente para resuspender las perlas. Para muestras de producción primaria, use el reactivo A sin reactivo F.

4. Coloque el tubo en el disruptor celular  $3 \pm 1$  min, o agite la placa Deep Well en el calefactor térmico con agitación a 1.300-1.600 rpm a 95-100 °C durante 15-20 min.
5. Incube los tubos en el bloque calefactor apropiado a 95-100 °C durante 10-15 min.
6. Agite los tubos con vórtex a alta velocidad y centrifugue a 10.000-12.000 x g durante 5 min. Centrifugue la placa Deep Well a 2.250 x g durante 2 min.

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

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

## D. PCR en tiempo real

### Configuración del software e instrumento

Para la configuración del instrumento y del software, siga las instrucciones del manual 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 contenga 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 ejecución de PCR. Utilice la tabla de pipeteo del Apéndice – Guía de cálculo de la mix PCR para obtener los volúmenes correctos a utilizar para cada reactivo.
2. 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.
3. Pipetee 45 µl de la mix de PCR en cada pocillo según la configuración de su placa.
4. Para purificar el ADN, combine 50 µl de ADN extraído de cada muestra con 200 µl de reactivo de purificación iQ-Check. Pipetee hacia arriba y hacia abajo 5 veces para homogeneizar. Como alternativa, se puede hacer una dilución 1:10 del ADN extraído utilizando agua estéril.

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

## Ejecución de la PCR

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

El archivo de protocolo de aplicación “Salmo Fast” ha sido certificado por NF Validation y AOAC PTM.

## E. Análisis de los datos

Los datos pueden ser analizados directamente al final de la ejecución de PCR o en un momento posterior abriendo el archivo de datos almacenados. Siga las instrucciones del correspondiente manual de 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 del ciclo de cuantificación (Cq) de cada muestra (el ciclo en el que la curva de amplificación cruza el umbral).

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

### Controles

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

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

	Detección de <i>Salmonella</i> spp. (Canal FAM)	Detección de control interno (canal HEX)
Control negativo	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Control positivo	$26 \leq Cq \leq 36$	N/A

\* 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.

## Apartado 7 Protocolo

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

### Muestras

Un resultado **positivo** de PCR iQ-Check *Salmonella* II debe mostrar una curva de amplificación típica y un valor Cq  $\geq 10$  para el fluoróforo FAM.

- Si el valor Cq de ambos canales está por debajo de 10, verifique que la curva presente una amplificación normal (con una línea de base plana, seguida de un rápido aumento exponencial de la fluorescencia, y luego un aplanamiento o fase meseta). Si la curva parece correcta, puede considerarse una muestra positiva para el ensayo *Salmonella* spp.

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

- Esta muestra se considera **negativa en *Salmonella* spp.** si no hay un valor Cq en el canal FAM y el control interno tiene un valor Cq  $\geq 28$
- 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 y a continuación analice 5  $\mu$ l de la dilución) y repita la PCR.
- Si el valor Cq del control interno es  $< 28$ , no es posible interpretar el resultado. Verifique el posicionamiento correcto del umbral, y que la curva presente una amplificación típica. Si la curva no tiene una forma característica, será necesario repetir el ensayo de PCR.

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

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

\* Si tanto la detección de la diana como del control interno dan un valor Cq = N/A, el extracto de ADN debe diluirse 1:10 y analizarse de nuevo.

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



## Apartado 8

### Confirmación de resultados positivos

En el contexto de la validación AOAC, un resultado positivo de iQ-Check *Salmonella* II es presuntivo de ser positivo y se recomienda su confirmación según un método de referencia apropiado (por ejemplo, USDA MLG, FDA, BAM, ISO, MFHPB, AOAC SMPR, etc.). Como alternativa, siembre 10 µl de APT enriquecida (con suplementos cuando proceda) directamente en el cromogénico RAPID' *Salmonella* e incube durante  $24 \pm 2$  hr a  $37 \pm 1$  °C (con excepción de la flor de cáñamo). Cuando el nivel de flora interferente pueda ser elevado, transfiera 0.5 ml de APT enriquecida a 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) e incube durante  $24 \pm 3$  hr a  $41.5 \pm 1$  °C y, a continuación, pase 10 µl de RVS enriquecido al medio cromogénico RAPID' *Salmonella*. Consulte el método de confirmación en el manual del usuario del medio cromogénico de RAPID' *Salmonella* (documento #10000126748).

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

#### Todas las muestras excepto las muestras de producción primaria

1. Utilizando los ensayos clásicos descritos en los métodos normalizados CEN o ISO (incluyendo la purificación) directamente desde el caldo de enriquecimiento de APT después del enriquecimiento completo de  $18 \pm 2$  hr a 37 °C.
2. Verter 10 µl de APT enriquecida (con suplementos, si procede) directamente en el medio cromogénico RAPID' *Salmonella* e incubar durante  $24 \pm 2$  hr a  $37 \pm 1$  °C. Cuando la flora interferente pueda ser elevada, transferir 0,5 ml de APT enriquecida a 10 ml de caldo Rapapport Vassiliadis Soy (RVS) e incubar durante  $24 \pm 3$  hr a  $41,5 \pm 1$  °C, y luego proceder a filtrar 10 µl de RVS enriquecido, en el medio cromogénico RAPID' *Salmonella*.
3. Utilizando cualquier otro método certificado por la validación NF basado en un principio diferente al utilizado en el ensayo de PCR iQ-Check *Salmonella* II. El protocolo validado de este segundo método debe ser seguido en su totalidad, incluyendo el enriquecimiento selectivo RVS cuando sea necesario. La confirmación se lleva a cabo partiendo del caldo de enriquecimiento de APT si este paso es común a ambos métodos.

El APT enriquecida se puede conservar a 2-8 °C durante 72 hr como máximo, después de la última incubación a 37 °C, salvo las muestras de productos lácteos y las muestras de superficies ambientales.

#### Muestras de producción primaria

Inicie el proceso de confirmación a partir del enriquecimiento primario, siguiendo el método MSRV indicado en el Anexo D de la norma ISO 6579/A1 y utilizando el medio RAPID' *Salmonella* para el aislamiento.

Los resultados que no concuerden entre el iQ-Check *Salmonella* II Kit y el método de confirmación antes descrito pueden deberse a la presencia de *Salmonella* no móvil. En ese caso, siga el protocolo de doble enriquecimiento de RAPID' *Salmonella* (consulte las instrucciones en el manual del usuario del producto). Este protocolo incluye un paso de enriquecimiento selectivo en medio RVS.

En el ámbito de la certificación NF VALIDATION, las bolsas de enriquecimiento primario se pueden conservar hasta 24 hr a 2-8 °C antes de proceder a la confirmación.

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

## Apartado 9

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

iQ-Check *Salmonella* spp. II Kit. también puede utilizarse para confirmar colonias de *Salmonella* spp. aisladas en placas de agar. Ello está validado oficialmente bajo certificación AFNOR para el medio cromogénico RAPID'*Salmonella*.

1. Recoja una colonia aislada en una placa de agar selectivo o no selectivo con un palillo, un lazo estéril u otro consumible 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 vórtex.
3. Analice 5 µl de la suspensión con 45 µl de mix de PCR (véase D. PCR en tiempo real en el apartado 7 Protocolo) y siga el resto del protocolo iQ-Check *Salmonella* II para la interpretación de los datos y los resultados.

## Apartado 10

### Aplicación del análisis y validaciones

iQ-Check *Salmonella* II Kit es específico para la detección del género *Salmonella*.



BRD 07/10 – 04/05

MÉTODOS DE ANÁLISIS  
ALTERNATIVOS PARA LA

#### NF Validation

iQ-Check *Salmonella* II Kit está certificado por la VALIDACIÓN NF como una alternativa al método ISO 6579 -1 (2017) para la detección de *Salmonella* spp. en todos los productos para consumo humano y animal, así como en muestras ambientales. La validación siguió el protocolo de la norma ISO 16140: 2016 e incluye el uso de los sistemas de PCR en tiempo real CFX96 Touch System, CFX96 Touch Deep Well System y CFX Opus Deepwell System. El uso de iQ-Check Free DNA Removal Solution está validado para fórmulas infantiles e ingredientes y alimentos para animales. El software asociado es el CFX Manager IDE (V2.2 y posteriores). El APF “Salmo Fast” también está validado para todas las muestras. Número de certificado: BRD 07/06 – 07/04. Consulte el certificado disponible en el sitio web de AFNOR Certification para obtener información sobre su validez.



## AOAC Validation

iQ-Check *Salmonella* II Kit (Protocolo Easy) está validado por el Instituto de Investigación de la AOAC bajo OMA 2017.06 para la detección de *Salmonella* spp. en huevos (25 g), pollo picado crudo (25 g y 375 g), carne de vacuno cruda (25 g), carne de cerdo cruda (25 g), espinacas frescas (25 g y 375 g), melón (25 g), mantequilla de cacahuete (25 g), jamón de charcutería listo para el consumo (375 g), superficies ambientales seleccionadas, alimentos para mascotas húmedos (25 g) y secos (25 y 375 g), chocolate con leche (375 g), queso (375 g), enjuagues de canales, licor de chocolate (375 g), chocolate blanco (375 g), NFDM (375 g) suero de leche en polvo (375 g), carne picada cruda (375 g), recortes de carne cruda (375 g), flor de cannabis (10 g), chocolate con cannabis (25 g), gominolas con cannabis (25 g), concentrados derivados del cannabis (5 g), flor de cáñamo (25 g), harina (375 g) y productos cárnicos de origen vegetal (375 g). Un resultado positivo con el kit iQ-Check debe considerarse como no definitivo y se recomienda que se confirme siguiendo las recomendaciones del apartado 8 más arriba. El “Salmo Fast” APF, el uso de la solución iQ-Check Free DNA Removal Solution, y el uso de los sistemas de PCR en tiempo real CFX96 Touch Deep Well System y CFX Opus Deepwell System están validados en todas las muestras. El software asociado es el CFX Manager IDE (versión 2.2 y posterior).



## Validación Health Canada

iQ-Check *Salmonella* II (protocolo Easy) ha sido validado por el Ministerio de sanidad de Canadá (MFLP-38) para la detección de *Salmonella* spp. Un resultado positivo con el kit iQ-Check se supone positivo y debe confirmarse de acuerdo con el MFHPB-20 (véase el apartado 11, referencia 5).



## Validación NordVal

iQ-Check *Salmonella* II Kit está validado por NordVal para los protocolos Standard I y Easy I (en microplacas) en muestras de alimentos para consumo humano y animal y muestras ambientales, y para los protocolos Easy II (en microplacas) en carne cruda. El APF “Salmo Fast” también está validado para todas las muestras. Número de certificado: 038. Consulte el certificado disponible en el sitio web de NordVal para obtener información sobre su validez.

## Apartado 11

### Referencias

ISO 7218. Microbiology of the food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examination.

ISO 6887-4. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.

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

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

Miras I et al. (1995). Nucleotide sequence of *iagA* and *iagB* genes involved in invasion of HeLa cells by *Salmonella* enteritica subsp. Enteritica ser. Typhi. Res Microbiol 46, 17–20.

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

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

Health Canada Health Products and Food Branch, MFHPB-20 Isolation and Identification of *Salmonella* from Food and Environmental Samples, Compendium of Analytical Methods, Volume 2, March 2009.

Health Canada Health Products and Food Branch, Part 4: Qualitative Methods, Procedure for the Development and Management of Food Microbiological Methods, Compendium of Analytical Methods, Volume 1.

## Apartado 12

### Historial de revisiones

Fecha de lanzamiento	Número de documento	Modificación
Octubre de 2020	10000131519 Ver A	<ul style="list-style-type: none"><li>- Renovación y ampliación de la validación AFNOR:<ul style="list-style-type: none"><li>Uso de FDRS como opción, "Salmo Fast" APF</li></ul></li><li>- Nuevo diseño del documento y actualización de las referencias y el contenido</li><li>- Cambio en el número de documento (la versión anterior era 808463 Rev G)</li></ul>
Febrero de 2023	10000131519 Ver B	<ul style="list-style-type: none"><li>- Se ha añadido una nueva referencia para los consumibles e instrumentos</li><li>- Aclaración del protocolo de interpretación de resultados</li><li>- Extensión AOAC: Nuevas matrices, FDRS, "Salmo Fast" APF</li><li>- Sustitución de la sección de protocolo por un cuadro resumen</li><li>- Actualización del ámbito de validación de NordVal</li><li>- Ampliación de las validaciones para el sistema de PCR en tiempo real CFX Opus Deepwell y actualización al software CFX Manager IDE versión 3.1</li><li>- Ampliación de la validación AFNOR en alimentos para animales</li></ul>

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

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

Número total de muestras y controles	Sondas reactivo B, µl	Mix de amplificación Reactivo C, µl	Número total de muestras y controles	Sondas reactivo B, µl	Mix de amplificación Reactivo C, µl	Número total de muestras y controles	Sondas reactivo B, µl	Mix de amplificación Reactivo C, µl
1	5	40	33	178	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 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 aquí indicadas son propiedad de sus respectivos propietarios.



**Bio-Rad  
Laboratories, Inc.**

*Life Science  
Group*

---

**Website** *bio-rad.com* **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23  
**Belgium** 00 800 00 24 67 23 **Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500  
**Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23 **Finland** 00 800 00 24 67 23  
**France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300  
**Hungary** 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23  
**Japan** 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23  
**Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280  
**Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23  
**Russian Federation** 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188  
**South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23 **Sweden** 00 800 00 24 67 23  
**Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311  
**United Arab Emirates** 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

---

Sig 0122



---

# iQ-Check *Salmonella* spp. II Kit

## 用户指南

可用于食物、动物饲料和环境样本中沙门氏菌属的实时荧光定量 PCR 检测

目录号 3578123





# 目录

第 1 部分	简介 .....	1
第 2 部分	iQ-Check <i>Salmonella</i> spp. II 技术 .....	1
第 3 部分	成分列表 .....	2
第 4 部分	保质期及储存条件 .....	3
第 5 部分	其他仪器、试剂与耗材 .....	3
	仪器 .....	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 .....	6
第 7 部分	操作方案 .....	8
	样本增菌 .....	8
	去除游离 DNA 处理 .....	11
	DNA 提取 .....	11
	实时荧光定量 PCR .....	14
	数据分析 .....	15
第 8 部分	阳性结果的确认 .....	16
第 9 部分	使用 iQ-Check Kit 确认单菌落 .....	18
第 10 部分	测试性能和验证 .....	18
第 11 部分	参考资料 .....	20
第 12 部分	修订记录 .....	21
	附录 — PCR 混合物计算指南 .....	22

## 第 1 部分

### 简介

尽管采取了许多预防措施来控制这些微生物，*沙门氏菌* (*Salmonellae*) 仍是世界上最常见的食物中毒原因。鸡蛋、乳制品、肉类和家禽是最常与*沙门氏菌*传播相关的食物（65% 的病例）。已鉴定超过 2500 种血清型，所有这些血清型都对人类具有潜在的致病性。由于感染剂量低和对食品生产者与消费者造成的严重威胁，一些国家和地区现在要求食品中完全消除*沙门氏菌*。

经典的培养方法往往耗时较长且复杂繁琐。相比之下，iQ-Check *Salmonella* II Kit 是一种简单快速的定性检测方法，可用于检测食品、动物饲料和环境样本中发现的*沙门氏菌*属特异性 DNA 序列。使用实时 PCR，通过荧光探针同时扩增和检测*沙门氏菌*属特异性 DNA 序列。一次可以处理多达 94 个样本，污染风险极低，流程简单方便。该试剂盒的预期使用者是进行*沙门氏菌*属检测试验的训练有素的实验室人员。使用该检测可以在样本增菌后的几个小时内获得结果。

## 第 2 部分

### iQ-Check *Salmonella* spp. II 技术

iQ-Check *Salmonella* II Kit 基于实时 PCR 的基因扩增和检测。该试剂盒的即用型 PCR 试剂包含*沙门氏菌*属特异性寡核苷酸（引物和探针），以及 DNA 聚合酶和核苷酸。我们将检测过程和数据分析进行了优化，可与 Bio-Rad 的实时荧光定量 PCR 仪器（例如 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，经过多次加热和冷却，可使 DNA 受热变性，然后退火，引物与目标 DNA 互补区结合，DNA 聚合酶使用这些引物和三磷酸脱氧核苷酸 (dNTP) 来扩增 DNA，从而生成目标 DNA 的扩增产物，也称“扩增子”。

在实时 PCR 中，特异性探针用于在扩增过程中与扩增子杂交，从而检测目标 DNA。这些探针与荧光基团相连，仅在与目标序列杂交时才会发出荧光。探针可与*沙门氏菌*属特异性 DNA 序列杂交，与该探针连接的荧光基团为 FAM。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 内部对照，可验证任何可能的阴性结果。该对照与 *沙门氏菌* 目标 DNA 序列同时用特异性探针扩增，并由第二个荧光团检测。

该检测方法可对预先通过培养增菌的特定食品、动物饲料和环境样本中的 *沙门氏菌属* 进行定性检测。其中主要包括以下五个步骤：



\* 使用条件请参阅 iQ-Check Free DNA Removal Solution (#10000058391) 的用户指南。

## 第 3 部分

### 成分列表

iQ-Check Salmonella spp. II Kit 包含足够进行 96 项检测 (94 份样本) 的试剂。

试剂编号	试剂	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

### 其他仪器、试剂与耗材

#### 仪器

- 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 10000 – 12000 x g）
  - 干式恒温器（可调至 37 ± 2°C 和/或 95 – 100°C）
  - 细胞破裂器（例如，Scientific Industries, Inc. 的 Disruptor Genie），用于 Standard II 方案
- 提取专用 Deep Well 板：
  - 加热振荡混合仪（可维持 37 ± 2°C 和/或 95 – 100°C 恒温，混合速度至少为 1300 rpm）
  - DW40 Deep Well Microplate Washer（目录号 90137），用于 Standard II 方案
- 涡旋振荡器
- 磁力搅拌板
- 微量移液枪 (20 µl，200 µl，1000 µl)

- 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 ( 目录号 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：缓冲蛋白胨水 ( 例如，BPW Plus，目录号 3564684，干粉，500 g；3554179，225 ml x 6 瓶；3555795，3 L x 4 袋；3555790，5 L x 2 袋；或 BPW 标准版，目录号 12013259，干粉，500 g；12013258，干粉，5 kg；12013260，5 L x 2 袋 )
- 特定于环境初级生产样本的增菌：RAPID'*Salmonella* Capsule，( 目录号 3564710，1 倍强度，100 粒胶囊；3564709，10 倍强度，100 粒胶囊；3564712，粉末，100 次检测 )
- 选择性添加剂：新生霉素
- PIF Supplement ( 目录号 12013322，2 g )
- iQ-Check Free DNA Removal Solution ( 目录号 3594970 )
- 专用于环境样本：
  - 采样海绵
  - 采样棉签
  - 用于海绵和拭子的中和肉汤，例如 Dey-Engley (D/E) 或 HiCap Neutralizing Broth，或 Letheen Broth
- 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 Deep Well 板内提取
  - 96 孔 Deep Well 板 ( iQ-Check Deep Well Microplates，目录号 3594900 )

## 第 5 部分 其他仪器、试剂与耗材

- 塑料密封膜 ( TeSeE NSP Plastic Sealing Film , 目录号 3590139 )
- 预穿孔密封膜 ( X-Pierce Films , 目录号 3593977 , 或 Pre-Pierced Plate Sealing Film , 目录号 3600040 , 仅限北美 )
- 专用于 iQ-Check Prep System
  - 60 ml 稀释容器 ( 目录号 3594904 或 12014473 )
  - 带滤芯移液器枪头 ( 目录号 3594902 或 12014486 , 50 µl x 5760 ; 3594903 或 12014483 , 1000 µl x 3840 )
  - PCR 混合管 ( 目录号 12016673 , 5 ml x 25 )
- 专用于 Standard II 和 Easy II 提取流程 :
  - Lysis beads reagent F ( 目录号 3578136 )
  - 200 µl 宽口移液器吸头
- RAPID'*Salmonella* Agar ( 产品目录号 3563961 , 90 mm x 20 个培养皿 ; 3563963 , 90 mm x 120 个培养皿;3564705 , 干粉 , 500 g )
- PCR 板、管子、密封胶带和盖子
- 适用于 20、200 和 1000 µl 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吸头 ; 无菌 , 独立包装
- 1 ml 和 10 ml 移液器
- 2 ml 和 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（Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food pathogens — General requirements and definitions, 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 *Salmonella* II Kit
  - 根据全球化学品统一分类和标签制度 (GHS)，测试试剂盒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，请马

## 第 6 部分 最佳实验结果的安全预防措施及建议

上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。仪器的维修只能由 Bio-Rad 现场服务工程师来完成
  
- 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，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。仪器的维修只能由 Bio-Rad 现场服务工程师来完成
  
- 增菌条件
  - 用户应阅读、理解并遵守 iQ-Check *Salmonella* II Kit 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。
  - *沙门氏菌*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 121°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

### 操作方案

强烈建议您在阅读完全部操作流程后才开始进行检测。

#### A. 样本增菌

对于过夜增菌，使用前将培养基加热至室温 (20 – 25°C)。对于短期增菌 (8 hr)，使用前将增菌液加热至样本培养温度。短时增菌对培养条件敏感，必须严格遵守指示的温度。样本制备的持续时间 (增菌肉汤预热和食品样本培养开始之间的时间) 不得超过 45 min。建议使用通风培养箱。

强烈建议使用带有过滤功能的增菌袋。

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

在 NF 验证的范围内，样本制备遵循 ISO 标准 6887-2 至 6。如果没有指明，尚未对重量超过 25 g 的样本进行过测试。根据表中所示的时间和温度，在不摇动的情况下培养。Standard I DNA 提取方案可用于除环境初级生产样本之外的所有基质。

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。

NF 验证 BRD 07/06 – 07/04 和 NordVal 038		
范围 (食品基质)	样本制备	增菌/DNA 提取
食品、动物饲料和环境样本 <sup>1</sup>	小样本量：1:10 稀释 <ul style="list-style-type: none"><li>在 9 x n ml BPW 中均匀混合 n g 食品 (225 ml 中混合 25 g)</li></ul>	<b>Standard I 提取</b> <ul style="list-style-type: none"><li>在 37±1°C 下培养 16–24 hr</li><li>管</li></ul> <b>Easy I 提取</b> <ul style="list-style-type: none"><li>在 37±1°C 下培养 20–24 hr</li><li>管/Deep Well</li></ul>
生肉制品 (25 g、375 g) <sup>2</sup>	25 g 样本量：1:10 稀释 <ul style="list-style-type: none"><li>在 225 毫升预热 BPW 中均匀混合 25 g 生肉</li></ul>	Easy II 用于提取 25 g 样本 <ul style="list-style-type: none"><li>在 41.5±1°C 下培养 8–16 hr</li><li>管/Deep Well</li></ul>
	375 g 样本量：1:4 稀释 <ul style="list-style-type: none"><li>在 1125 毫升预热 BPW 中均匀混合 375 g 生肉</li></ul>	Easy II 用于提取 375 g 样本 <ul style="list-style-type: none"><li>在 41.5±1°C 下培养 10–18 hr</li><li>管/Deep Well</li></ul>

## 第 7 部分 操作方案

环境初级生产样本	在补充了 RAPID' <i>Salmonella</i> 胶囊的 9 x <i>n</i> ml BPW 中均匀混合 <i>n</i> g 样本	Standard II <sup>3</sup> 或 Easy I 提取 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 41.5 ±1°C 条件下培养 18–26 hr</li> <li>将 100 µl 转移到 900 µl 新鲜 BPW 中</li> <li>在 37±1°C 下培养 4–6 hr</li> </ul>
含/不含益生菌的婴儿配方和谷类食品，配料 (50–375 g) <sup>4</sup>	在含 PIF 补充剂的 3 x <i>n</i> ml BPW 中均匀混合 <i>n</i> g 食品 ( 1125 ml 中混合 375 g )	Easy I 提取 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 37±1°C 下培养 18–26 hr</li> <li>管/Deep Well</li> </ul>
生乳制品 ( 最多 50 g )	在补充了 20 mg/L 新生霉素的 9 x <i>n</i> ml BPW 中均匀混合 <i>n</i> g 食品 ( 450 ml 中混合 50 g )	Easy I 提取 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 41.5±1°C 下培养 20–24 hr</li> <li>管/Deep Well</li> </ul>
宠物食品和动物饲料 (375g)	在补充了 RAPID' <i>Salmonella</i> 胶囊的 5 x <i>n</i> ml 预热 BPW 中均匀混合 <i>n</i> g 样本	Easy I 提取 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 37±1°C 下培养 18–24 hr</li> <li>管/Deep Well</li> </ul>
<b>AOAC OMA 2017.06</b>		
范围 ( 食品基质 )	样本制备	增菌/DNA 提取
精选食品和环境表面	小样本量：1:10 稀释 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 9 x <i>n</i> ml BPW 中均匀混合 <i>n</i> g 食品 ( 225 ml 中混合 25 g )</li> </ul>	Easy I 提取 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 37±1°C 下培养 19–23 hr</li> <li>管/Deep Well</li> </ul>
	大样本量：1:4 稀释 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 3 x <i>n</i> ml BPW 中均匀混合 <i>n</i> g 食品 ( 1125 ml 中混合 375 g )</li> </ul>	
	环境样本 <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棉签和海绵</li> <li>对于用棉签分析的表面，取样面积为 1 x 1 英寸 (2.54 x 2.54 cm)</li> <li>对于用棉签分析的表面，取样面积为 4 x 4 英寸 (10.16 x 10.16 cm)</li> <li>加入足够的 BPW 覆盖拭子 ( 10 ml ) 或海绵 ( 100 ml )</li> </ul>	
牛奶巧克力 (375 g)	在 3000 ml 毫升脱脂牛奶培养基中均匀混合 375 g 牛奶巧克力	Easy I 提取 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 37±1°C 下培养 18–22 hr</li> <li>管/Deep Well</li> </ul>
家禽胴体冲洗	在 30 ml BPW 中均匀混合 30 ml 畜体	Easy I 提取 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 37±1°C 下培养 20–22 hr</li> <li>管/Deep Well</li> </ul>

AOAC PTM 010803		
范围 (食品基质)	样本制备	增菌/DNA 提取
生碎牛肉和生牛肉边角料 (375 g) <sup>5,7</sup>	在 3 x n ml 预热 BPW 中均匀混合 n g 食品 ( 1125 ml 中混合 375 g )	Easy II 提取 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 41.5±1°C 下培养 8–22 hr</li> <li>管/Deep Well</li> </ul>
新鲜生菠菜 (375 g) <sup>5,7</sup>	在 3 x n ml 预热 BPW 中均匀混合 n g 食品 ( 1125 ml 中混合 375 g )	Easy II 提取 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 41.5±1°C 下培养 10–22 hr</li> <li>管/Deep Well</li> </ul>
奶粉 (375 g) <sup>7</sup>	在含 PIF 补充剂的 3 x n ml BPW 中均匀混合 n g 食品 ( 1125 ml 中混合 375 g )	Easy I 提取 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 37±1°C 下培养 18–26 hr</li> <li>管/Deep Well</li> </ul>
巧克力液和白巧克力 (375 g) <sup>6,7</sup>	在 3000 毫升预热 BPW 中均匀混合 375 g 食品	Easy I 提取 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 37±1°C 下培养 18–26 hr</li> <li>管/Deep Well</li> </ul>
大麻花 (10 g) <sup>5,7</sup> 和麻花 (25 g) <sup>5</sup>	在 9 x n ml BPW 中均匀混合 n g 食品 ( 90 ml BPW 大麻花中混合 10 g , 225 ml BPW 麻花中混合 25 g )	Easy I 提取 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 37±1°C 下培养 20–22 hr</li> <li>管/Deep Well</li> </ul>
大麻巧克力和软糖 (25 g) 以及大麻萃取浓缩物 (5 g) <sup>5,7</sup>	在 9 x n ml BPW 中均匀混合 n g 食品 ( 225 ml 中为 25 g · 45 ml 中为 5 g ) 。	Easy I 提取 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 37±1°C 下培养 18–22 hr</li> <li>管/Deep Well</li> </ul>
植物性肉制品 (375 g) <sup>7</sup>	在 3 x n ml BPW 中均匀混合 n g 食品 ( 1125 ml 中混合 375 g )	Easy I 提取 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 37±1°C 下培养 20–22 hr</li> <li>管/Deep Well</li> </ul>
通用面粉 (375 g) <sup>5,7</sup>	1:3 稀释 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 3 x n ml 预热 BPW + PIF 添加剂中均匀混合 n g 食品 ( 1125 ml + 150 µl 制备 PIF 添加剂中混合 375 g )</li> <li>增菌后, 将 1 - 5 ml 等量转移到试管或 Deep Well 板中, 静置至少 30 min, 然后进行 DNA 提取</li> </ul> 1:9 稀释 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 9 x n ml 预热 BPW + PIF 添加剂中均匀混合 n g 食品(</li> <li>3375 ml + 375 µl 制备 PIF 添加剂中混合 375 g )</li> </ul>	Easy II 提取 <ul style="list-style-type: none"> <li>在 37±1°C 下培养 20–24 hr</li> <li>管/Deep Well</li> </ul>

有关加拿大卫生部批准的基质和方案, 请参考 MFLP-38

<sup>1</sup> 环境初级生产样本除外

<sup>2</sup> 用于同时检测大肠杆菌 O157:H7 的方案

## 第 7 部分 操作方案

<sup>3</sup> 使用的裂解试剂仅为试剂 A ( 不含试剂 F ) <sup>4</sup> 该方案与 iQ-Check *Cronobacter* spp.和 iQ-Check *Enterobacteriaceae* Kits 一致

<sup>5</sup> 采用 iQ-Check *E. coli* O157:H7 和 iQ-Check STEC VirX Kit 的协调方案

<sup>6</sup> 验证包括使用和不使用 iQ-Check Purification Reagent 进行检测

<sup>7</sup> 验证包括直接划线到 *RAPID'Salmonella* 沙门氏菌培养基

### 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。使用过程中请遵守 Bio-Rad 用户指南 ( 文件编号 10000058391 ) 中的建议。

### 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 Deep Well 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。当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。
7. 对于 Easy II 和 Standard II 方案，按照以下步骤重组最终裂解液：
  - a. 小心将 F 试剂 ( 裂解珠 ) 中的所有内含物倒入 A 试剂 ( 裂解液 ) 中。
  - b. 使用带有足够宽吸头的耗材，以便对均质后的裂解液进行移液。
  - c. 裂解液与裂解珠混合后 ( 试剂 A + F ) 在 4°C 条件下保存可有 6 个月保质期。

#### Easy I 操作方案

1. 向离心管或 Deep Well 板中加入 100µl 混匀的裂解液 ( A 试剂 ) 。

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 Deep Well 板密封。
5. 将离心管置于恒温器中，在 95 – 100°C 条件下孵育 15–20 min。或将 Deep Well 板置于加热振荡混合仪中，在 95 – 100°C 条件下振荡孵育 15 – 20 min，转速为 1300 – 1600 rpm。
6. 将离心管高速涡旋振荡，然后在 10000–12000 x g 条件下至少离心 2 min。Deep Well 板不需要进行离心。

## Easy II 流程

1. 向 Deep Well 板的孔中加入 100  $\mu$ l 均质后的裂解液（试剂 A + F）。

注意：首先用手轻轻晃动裂解剂，使珠子悬浮。

2. 加入 100  $\mu$ l 增菌后的样品。

注意：晃动悬浮液使培养物混匀，然后等碎片沉淀后再采集样本。

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 Deep Well 板密封。
5. 将试管置于细胞破碎器中 3 $\pm$ 1 min。
6. 将离心管置于恒温器中，在 95 – 100°C 条件下孵育 10 – 15 min。或将 Deep Well 板置于加热振荡混合仪中，在 95 – 100°C 条件下振荡孵育 15 – 20 min，转速为 1300 rpm。
7. 将离心管高速涡旋振荡，然后在 10000 – 12000 x g 条件下至少离心 2 min。Deep Well 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 10000 – 12000 x g 5 min。

## 第 7 部分 操作方案

### Standard I 流程

1. 将 1 ml 倒出的增菌样本收集到试管中。
2. 以 10000 – 12000×g 离心 5 min。
3. 丢弃所有上清液。
4. 向颗粒中加入 200 µl 裂解液 ( 试剂 A ) 。
5. 在试管中上下吸取试剂足够的次数，以重新悬浮颗粒。次数将取决于样本。
6. 高速涡旋，并将试管置于 95 – 100°C 的恒温器中 10 – 15 min。
7. 高速涡旋，并以 10000 – 12000 x g 离心 5 min。

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，然后以 10000 – 12000 x g 离心 5 min。

### Standard II 流程

1. 将 1 ml 倒出的增菌样本收集到试管或 Deep Well 板的孔中。用塑料薄膜密封 Deep Well 板。

**注意：**晃动悬浮液使培养物混匀，然后等碎片沉淀后再采集样本。

2. 以 10000 – 12000 x g 离心试管 5 min。废弃上清液。以 2250 x g 离心 Deep Well 板 20 min，手动或使用 DW40 废弃上清液。
3. 向颗粒中加入 200 µl 均质后的裂解液 ( 试剂 A + F ) ，对试剂进行上下移液，使颗粒重新悬浮。关闭试管，或用预穿孔密封膜将 Deep Well 板密封。

**注意：**首先用手轻轻晃动裂解液，使珠子悬浮。对于初级生产样本，使用不含试剂 F 的试剂 A。

4. 将试管放入细胞破碎器中  $3 \pm 1$  min，或在 95–100°C 下以 1300 – 1600 rpm 的速度摇动加热振荡混合仪中的 Deep Well 板 15 – 20 min。
5. 在 95 – 100°C 的适当恒温器中孵育试管 10 – 15 min。

6. 高速涡旋试管，并以 10000 – 12000 x g 离心 5 min。以 2250 x g 离心 Deep Well 板 2 min。

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 10000 – 12000 x 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 混合物的准备

1. 准备 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。
2. 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 hr。
3. 根据您的实验设计方案，向每孔中加入 45 µl PCR 混合物。
4. 要纯化 DNA，将从每个样本中提取的 50µl DNA 与 200µl iQ-Check Purification Reagent 混合。上下吸取 5 次，使其均匀。或者，可以使用无菌水对提取的 DNA 进行 1:10 稀释。
5. 加入 5 µl 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。将上样孔密封。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。
6. 将 PCR 板或 PCR 联管放入热循环仪中。确保将 A1 孔放置在左上角的位置。最后关上 PCR 仪器盖。

### 运行 PCR

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

应用程序方案文件“Salmo Fast”已通过 NF 验证和 AOAC PTM 认证。

## 第 7 部分 操作方案

### E. 数据分析

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 软件用户手册中的说明，来打开数据文件并设置数据分析参数。

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

\* 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上表中的结果不同（无效对照），则重复第 7 部分“操作流程”中的“D. 实时 PCR”和“E. 数据分析”中描述的操作和分析。

#### 样本

**阳性** iQ-Check *Salmonella* II 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，则可视为沙门氏菌属阳性检测。

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



- 如果无 FAM Cq 值但内部对照 Cq 值  $\geq 28$ ，则可将样本视为阴性沙门氏菌属样本。
- 如果内部对照也无 Cq 值 ( Cq = N/A )，说明 PCR 反应未正常进行。需将样本进行稀释 ( 将 10  $\mu$ 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。

检测结果解释如下表所示：

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

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

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

## 第 8 部分

### 阳性结果的确认

如果是 AOAC 验证，iQ-Check *Salmonella* II 阳性结果应视为假定阳性，并建议按照适当的参考方法 ( 例如 USDA MLG、FDA BAM、ISO、MFHPB、AOAC SMPR 等方法 ) 进行确认。或者，将 10  $\mu$ l 增菌 BPW ( 适用时添加补充剂 ) 直接划线至 RAPID' *Salmonella* 显色培养基，并在  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  下培养  $24 \pm 2$  hr ( 麻花除外 )。当干扰菌群可能较高时，将 0.5 ml 增菌 BPW 转移至 10 ml Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) 肉汤，并在  $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$  下培养  $24 \pm 3$  hr，然后将 10  $\mu$ l 增菌 RVS 划线至 RAPID' *Salmonella* 显色培养基。请参见 RAPID' *Salmonella* 显色培养基用户指南 ( 文档编号 10000126748 ) 中的确认方法。

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

## 第 8 部分 阳性结果的确认

### 除初级生产样本外的所有样本

1. 使用标准 CEN 或 ISO 方法中描述的经典检测（包括纯化），在 37°C 下完全增菌 18±2 hr 后，直接从 BPW 增菌肉汤中提取。
2. 将 10 µl 增菌 BPW（适用时添加补充剂）直接划线至 RAPID'*Salmonella* 显色培养基，并在 37±1°C 下培养 24±2 hr。当干扰菌群可能较高时，将 0.5 ml 增菌 BPW 转移至 10 ml Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) 肉汤，并在 41.5±1°C 下培养 24±3 hr，然后将 10 µl 增菌 RVS 划线至 RAPID' *Salmonella* 显色培养基。
3. 使用经 NF 验证认证的不同于 iQ-Check *Salmonella* II PCR 检测原理的其他方法。必须完全遵循第二种方法的验证方案，包括需要时的 RVS 选择性增菌。如果这两种方法均使用该步骤，则从 BPW 增菌肉汤中进行确认。

最后一次在 37°C 下培养后，可将增菌 BPW 在 2–8°C 下最多储存 72 hr，但乳制品和环境表面样本除外。

### 初级生产样本

按照 ISO 6579/A1 标准附录 D 中所示的 MSRV 方法，并使用 RAPID'*Salmonella* 培养基进行分离，从初级增菌开始确认过程。

如果 iQ-Check *Salmonella* II Kit 与上述确认方法的结果之间不一致，可能是因为存在不运动的沙门氏菌。在这种情况下，遵循 RAPID'*Salmonella* 双重增菌方案（参考产品用户指南了解使用说明）。该方案包括在 RVS 培养基中的选择性增菌步骤。

在 NF 验证的范围内，在进行确认之前，初级增菌袋可以在 2 – 8°C 下储存长达 24 hr。

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

## 第 9 部分

### 使用 iQ-Check Kit 确认单菌落

iQ-Check *Salmonella* spp. II. 试剂盒也可用于确认琼脂平板上单个分离的 *沙门氏菌* 属菌落。该方法已获得 AFNOR 验证对 RAPID<sup>®</sup> *Salmonella* 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琼脂培养基上挑取一个单菌落。
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（参见第 7 部分“方案”中的 D.“实时荧光定量 PCR”），参照 iQ-Check *Salmonella* II 方案进行后续操作，获取数据并进行结果分析。

## 第 10 部分

### 测试性能和验证

iQ-Check *Salmonella* II Kit 专为检测 *Salmonella* 属而设计。



#### NF 验证

iQ-Check *Salmonella* II Kit 已通过 NF 验证认证，可作为参考方法 ISO 6579 -1 (2017) 的替代方法，用于检测人类和动物消费的所有产品以及环境样本中的 *沙门氏菌* 属。验证遵循 ISO 16140: 2016 标准和 CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well 及 CFX Opus Deepwell 实时 PCR 的使用 iQ-Check Free DNA Removal Solution 的使用已经过婴儿配方和配料、宠物食品和动物饲料的验证。相关软件是 CFX Manager Software IDE（版本 2.2 及更高版本）。“Salmo Fast” APF 针对所有样本进行了验证。证书编号：BRD 07/06 – 07/04.有关有效性信息，请参考 AFNOR 认证网站上提供的证书。

BRD 07/10 – 04/05

农业企业的替代分析方法

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

OMA 2017.06



## AOAC 验证

iQ-Check *Salmonella* II Kit ( Easy 方案 ) 经 AOAC 研究所根据 OMA 2017.06 验证 , 可用于检测鸡蛋 (25g)、生碎鸡肉 ( 25g 和 375g )、生牛肉 (25g)、生猪肉 (25g)、新鲜菠菜 ( 25g 和 375g )、哈密瓜 (25g)、花生酱 (25g)、即食熟食火腿 (375g)、选定的环境表面、湿 (25g) 和干 ( 25g 和 375g ) 宠物食品、牛奶巧克力 (375g)、奶酪 (375 g)、畜体漂洗、巧克力液 (375g)、白巧克力 (375g)、NFDM (375g)、乳清粉 (375g)、生碎牛肉 (375g)、生牛肉边角料 (375g)、大麻花 (10g)、大麻巧克力 (25 g)、大麻软糖 (25 g)、大麻萃取浓缩物 (5 g)、麻花 (25g)、面粉 (375g) 和植物性肉制品 (25g) 中的 *沙门氏菌属*。iQ-Check Kit 的阳性检测结果应视为推定结果 , 建议按照上方第 8 部分中的建议进行确认。“Lmono Fast” APF、iQ-Check Free DNA Removal Solution 的使用以及 CFX96 Touch Deep Well 和 CFX Opus Deepwell 实时 PCR 系统的使用针对所有样本进行了验证。相关软件是 CFX Manager IDE 软件 ( 版本 2.2 及更高版本 )。



## 加拿大卫生部验证

iQ-Check *Salmonella* II ( Easy 方案 ) 已由加拿大卫生部 (MFLP-38) 验证 , 用于 *沙门氏菌属* 的检测。iQ-Check Kit 的阳性结果为假定阳性 , 必须根据 MFHPB-20 进行确认 ( 见第 11 节 , 参考资料 5 )。



## NordVal 验证

iQ-Check *Salmonella* II Kit 已经过 NordVal 验证 , 适用于食品、饲料和环境中的 Standard I 和 Easy I 方案 ( 微孔板 ) , 以及生肉中的 Easy II 方案 ( 微孔板 )。 “Salmo Fast” APF 针对所有样本进行了验证。证书编号 : 038.有关有效性信息 , 请参考 NordVal 网站上提供的证书。

## 第 11 部分

### 参考资料

ISO 7218. Microbiology of the food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examination.

ISO 6887-4. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.

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

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

Miras I et al. (1995). Nucleotide sequence of *iagA* and *iagB* genes involved in invasion of HeLa cells by *Salmonella enteritica* subsp. *Enteritica* ser. Typhi. *Res Microbiol* 46, 17–20.

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

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

Health Canada Health Products and Food Branch, MFHPB-20 Isolation and Identification of *Salmonella* from Food and Environmental Samples, Compendium of Analytical Methods, Volume 2, March 2009.

Health Canada Health Products and Food Branch, Part 4: Qualitative Methods, Procedure for the Development and Management of Food Microbiological Methods, Compendium of Analytical Methods, Volume 1.

## 第 12 部分

### 修订记录

发布日期	文件编号	变更
2020 年 10 月	10000131519 Ver A	<ul style="list-style-type: none"><li>- AFNOR 验证的更新和扩展： FDRS 使用“Salmo Fast”APF 作为选项</li><li>- 新的文档设计和参考资料和内容的更新</li><li>- 文档编号变更 ( 先前版本为 808463 修订版 G )</li></ul>
2023 年 2 月	10000131519 Ver B	<ul style="list-style-type: none"><li>- 增加了耗材和仪器的新目录号</li><li>- 结果解释方案的澄清</li><li>- AOAC 扩展：新基质、FDRS、“Salmo Fast” APF</li><li>- 将方案部分替换为汇总表</li><li>- NordVal 验证范围的更新</li><li>- 扩展 CFX Opus Deepwell 实时 PCR 系统的验证， 并升级到 CFX Manager 软件 IDE 版本 3.1</li><li>- 对宠物食品和动物饲料的 AFNOR 验证扩展</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。

样本和对照物总数	探针试剂 B, µl	扩增混合液 试剂 C, µl	样本和对照物总数	探针试剂 B, µl	扩增混合液 试剂 C, µl	样本和对照物总数	探针试剂 B, µl	扩增混合液 试剂 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

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。

此处使用的所有商标均为其各自所有者的财产。



**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 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23  
**Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280  
**Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23  
**Russian Federation** 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188  
**South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23 **Sweden** 00 800 00 24 67 23  
**Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311  
**United Arab Emirates** 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

---

Sig 0122

