

---

# Kit iQ-Check *Salmonella* spp. II

## Ghid de utilizare

Test pentru detectarea PCR în timp real a bacteriei *Salmonella* spp. în probe din produse alimentare, furaje pentru animale și de mediu

Nr. de catalog 3578123

The logo for BIO-RAD, featuring the brand name in white, bold, uppercase letters inside a green rounded rectangular border.

# Cuprins

Secțiunea 1 Introducere .....	1
Secțiunea 2 Tehnologia iQ-Check <i>Salmonella</i> II .....	1
Secțiunea 3 Componentele kitului .....	2
Secțiunea 4 Perioada de valabilitate și condiții de păstrare .....	2
Secțiunea 5 Materiale necesare, dar neincluse .....	2
Echipamente .....	2
Consumabile .....	3
Secțiunea 6 Măsuri de siguranță și recomandări pentru cele mai bune rezultate .....	4
Secțiunea 7 Protocol .....	6
A. Îmbogățirea probei .....	7
B. Tratament de îndepărtare a ADN-ului liber 9	
C. Extragerea ADN-ului .....	9
D. PCR în timp real .....	12
E. Analiza datelor .....	13
Secțiunea 8 Confirmarea rezultatelor pozitive .....	14
Secțiunea 9 Confirmarea coloniilor individuale folosind kitul iQ-Check .....	15
Secțiunea 10 Performanțe de testare și validări .....	15
Secțiunea 11 Referințe .....	16
Secțiunea 12 Istoricul revizuirilor .....	17
Anexă - Ghid de calculare a amestecului PCR .....	18

## Secțiunea 1

### Introducere

Salmonellae reprezintă cea mai frecventă cauză a toxiinfecțiilor alimentare din lume, în ciuda numeroaselor măsuri preventive luate pentru controlul acestor organisme. Ouăle, produsele lactate, carnea, inclusiv carnea de pasăre, sunt alimentele asociate cel mai frecvent cu transmiterea *Salmonella* (65% din cazuri). Au fost identificate peste 2.500 de serotipuri, toate fiind potențial patogene pentru oameni. Ca urmare a dozei infecțioase reduse și a amenințării grave reprezentate pentru producătorii și consumatorii de alimente, mai multe țări impun acum absența totală a organismelor de *Salmonella* în produsele alimentare.

Metodele de cultură clasice sunt adesea consumatoare de timp și monotone. În comparație, kitul iQ-Check *Salmonella* II este un test calitativ simplu și rapid care permite detectarea secvențelor de ADN specifice *Salmonella* spp. găsite în probele din produsele alimentare, furajele animalelor și de mediu. Utilizând PCR în timp real, secvențele de ADN specifice organismelor *Salmonella* spp. sunt amplificate și detectate simultan prin intermediul sondelor fluorescente. Pot fi procesate până la 96 de probe în același timp, cu risc minim de contaminare, printr-o procedură ușor de utilizat. Acest kit este destinat personalului instruit de laborator care efectuează teste pentru a detecta *Salmonella* spp. Utilizarea acestui test permite obținerea rezultatelor în câteva ore după îmbogățirea unei probe.

## Secțiunea 2

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

Kitul iQ-Check *Salmonella* II se bazează pe amplificarea și detectarea genelor prin PCR în timp real. Reactivii PCR gata de utilizare din kit conțin oligonucleotide (amorse și sonde) specifice pentru *Salmonella* spp., precum și polimerază și nucleotide ADN. Detectarea și analiza datelor sunt optimizate pentru utilizare cu un instrument PCR în timp real Bio-Rad, cum ar fi sistemul CFX96 Touch Deep Well.

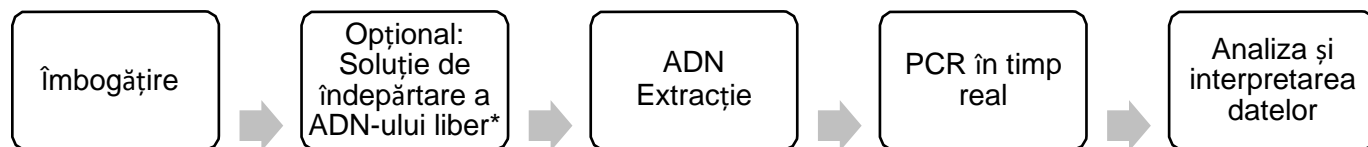
PCR este o tehnică puternică folosită pentru a genera multe copii ale ADN-ului țintă. În timpul reacției PCR, mai multe cicluri de încălzire și răcire permit denaturarea termică a ADN-ului, urmată de revenirea amorselor în regiunea țintă. Polimeraza ADN-ului folosește apoi aceste amorse și trifosfați deoxinucleotidici (dNTP) pentru a extinde ADN-ul, creând copii ale ADN-ului țintă. Aceste copii se numesc ampliconi.

În PCR în timp real, sunt utilizate sonde specifice pentru a detecta ADN-ul în timpul pasului de amplificare, prin hibridizare cu ampliconii. Aceste sonde sunt legate de un fluorofor care prezintă fluorescență numai atunci când este hibridizat cu secvența țintă. FAM este fluoroforul legat de sonda care se hibridizează cu secvența ADN specifică bacteriei *Salmonella* spp. În absența ADN-ului țintă, nu va fi detectată nicio fluorescență. Pe măsură ce numărul de ampliconi crește cu fiecare rundă de amplificare, crește și intensitatea fluorescenței. Modulul optic măsoară această fluorescență la pasul de refacere în timpul fiecărui ciclu PCR, iar software-ul asociat prezintă grafic intensitatea fluorescenței în funcție de numărul de cicluri.

Un martor intern ADN sintetic este inclus în amestecul de reacție pentru a valida eventualele rezultate negative. Acest martor este amplificat cu o sondă specifică în același timp cu secvența de ADN pentru *Salmonella* țintă și este detectat de un al doilea fluorofor.

Acest test permite detectarea calitativă a organismelor *Salmonella* spp. în probe selectate din produse alimentare, furajele animalelor și de mediu îmbogățite anterior prin cultură. Include următorii cinci pași principali:

### Secțiunea 3



\* Pentru condițiile de utilizare consultați ghidul de utilizare iQ-Check Free DNA Removal Solution (nr. 10000058391).

### Secțiunea 3

#### Componentele kitului

Kitul iQ-Check *Salmonella* spp. II conține suficienți reactivi pentru 96 de teste (94 de probe).

ID reactiv	Reactiv	Cantitate furnizată, ml
A	Reactiv de liză	1 flacon, 20
B	Sonde fluorescente	1 eprubetă, 0,55
C	Amestec amplificare	1 eprubetă, 4,4
D	Martor negativ PCR	1 eprubetă, 0,5
E	Martor pozitiv PCR	1 eprubetă, 0,25

### Secțiunea 4

#### Perioada de valabilitate și condiții de păstrare

După primire, kitul trebuie păstrat la temperaturi între 2-8 °C. Reactivii păstrați la această temperatură pot fi utilizați până la data de expirare indicată pe eprubete.

### Secțiunea 5

#### Materiale necesare, dar neincluse

##### Echipamente

- Mixer cu palete de laborator pentru omogenizarea probelor de testare
- Incubator pentru îmbogățirea microbiologică a probelor
- Specific pentru extracție în eprubete conice sterile de 1,5 ml, cu capac filetat:
  - Centrifugă de banc capabilă de 10.000-12.000 x g
  - Bloc de căldură uscată la 37 ± 2 °C și/sau 95-100 °C
  - Disruptor celular (de exemplu, Disruptor Genie, Scientific Industries, Inc.) - pentru Protocolul Standard II
- Specific pentru extracția în placă prevăzută cu godeuri adânci:
  - Agitator termic pentru încălzire\* capabil să mențină 37 ± 2 °C și/sau 95-100 °C, cu o viteză

de amestecare de cel puțin 1.300 rpm

- DW40 Deep Well Microplate Washer (nr. de catalog 90137) - pentru Protocolul Standard II
- Ciclon
- Placă de amestecare magnetică
- Micropipete de 20, 200 și 1.000 µl
- Vârfuri pentru pipetoare repetitive; sterile, ambalate individual.
- Sistem PCR în timp real Bio-Rad\*, de exemplu, CFX96 Touch Deep Well (nr. de catalog 3600037)
- Sistemul Bio-Rad iQ-Check Prep pentru extracția automată a ADN-ului și configurarea plăcii PCR (nr. de catalog 3594911)

**Notă:** Vă recomandăm să utilizați o sursă de alimentare neîntreruptă (UPS) cu termociclorul și cu sistemele iQ-Check Prep.

\*Contactați departamentul de asistență tehnică Bio-Rad pentru informații despre instrumentele recomandate.

## Consumabile

- Mediu de îmbogățire: Apa tamponată cu peptonă (de exemplu, BPW Plus, nr. de catalog 3564684, deshidratată, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 flacoane; 3555795, 3 l x 4 pungi; 3555790, 5 l x 2 pungi BPW Standard, nr. de catalog 12013259, deshidratată, 500 g; 12013258, deshidratată, 5 kg; 12013260, 5 l x 2 pungi)
- Specific pentru îmbogățirea probelor de producție primară de mediu: RAPID' *Salmonella* Capsule, (nr. de catalog 3564710, 1x concentrație, 100 capsule; 3564709, 10x concentrație, 100 capsule; 3564712, pulbere, 100 de teste)
- Supliment selectiv: Novobiocină
- Supliment PIF (nr. de catalog 12013322, 2 g)
- Soluție iQ-Check Free DNA Removal (nr. de catalog 3594970)
- Specific pentru probele de mediu:
  - Bureți de mediu
  - Tampoane de mediu
  - Bulion de neutralizare pentru bureți și tampoane, cum ar fi Dey-Engley (D/E), HiCap Neutralizing Broth sau Lethen Broth
- Specific pentru extracție în eprubete
  - Eprubete conice de 1,5 ml, cu capac filetat, sterile (de exemplu nr. de catalog 2240110XTU)

## Secțiunea 6 Măsuri de siguranță și recomandări pentru cele mai

- Specific pentru extracția într-o placă prevăzută cu godeuri adânci
  - Placă cu 96 de godeuri adânci (microplăci iQ-Check Deep Well, nr. de catalog 3594900)
  - Folie de etanșare din plastic (folie de etanșare din plastic TeSeE NSP, nr. de catalog 3590139)
  - Folie de etanșare pre-perforată (folii X-Pierce, nr. de catalog 3593977 sau folie de etanșare pre-perforată pentru plăci, 3600040, numai pentru America de Nord)
- Specific pentru sistemul iQ-Check Prep
  - Recipient de diluare de 60 ml (nr. de catalog 3594904)
  - Vârfuri de filtrare (nr. de catalog 3594902, 50  $\mu$ l x 5.760; nr. 3594903, 1.000  $\mu$ l x 3.840)
  - Eprubete de amestecare PCR (nr. de catalog 3594901, 5 ml x 50)
- Specific pentru protocoalele de extracție Standard II și Easy II:
  - Reactiv F granule de liză (nr. de catalog 3578136)
  - Vârfuri de pipetă cu deschidere largă de 200  $\mu$ l
- Agar RAPID'*Salmonella* (nr. de catalog 3563961, 90 mm x 20 vase; 3563963 90 mm x 120 vase; 3564705, deshidratat, 500 g)
- Plăci PCR, eprubete, bandă de etanșare și capace
- Vârfuri cu filtru sterile, adaptabile la micropipete de 20, 200 și 1000  $\mu$ l
- Vârfuri pentru pipete Combitip sau pipetoare repetitive echivalente, sterile, ambalate individual
- Pipete de 1 și 10 ml
- Eprubete de testare sterile de 2 și 5 ml
- Mănuși fără pulbere
- Apă sterilă distilată
- Înălbitor, 5%
- Agent de curățare, cum ar fi DNA AWAY sau RNase AWAY

## Secțiunea 6

### Măsuri de siguranță și recomandări pentru cele mai bune rezultate

- Acest test trebuie efectuat de către personal instruit
- Probele și culturile de îmbogățire trebuie manipulate ca material potențial infecțios și eliminate în conformitate cu normele și reglementările locale
- Toate materialele potențial infecțioase trebuie autoclavate înainte de eliminare

- Calitatea rezultatelor depinde de respectarea strictă a bunelor practici de laborator (de exemplu, standardul EN ISO 7218), în special în ceea ce privește PCR:
  - Nu mutați niciodată echipamentul de laborator (pipete, eprubete etc.) de la o stație de lucru la alta
  - Utilizați întotdeauna un martor pozitiv și un martor negativ pentru fiecare serie de reacții de amplificare
  - Nu utilizați reactivii după data de expirare a acestora
  - Agitați reactivii din kit înainte de a-i folosi pentru a asigura omogenitatea
  - Verificați periodic acuratețea și precizia pipetelor, precum și funcționarea corectă a instrumentelor
  - Schimbați mănușile des, mai ales dacă bănuți că sunt contaminate
  - Curățați periodic spațiile de lucru cu înălbitor 5% și alți agenți de decontaminare precum DNA AWAY
  - Folosiți mănuși fără pudră și evitați să lăsați amprente și să scrieți pe capacele eprubetelor. Ambele vor interfera cu achiziția datelor
- Se recomandă insistent să se respecte cerințele generale descrise în standardul EN ISO 22174:2005 (Microbiologia alimentelor și furajelor. Reacția polimerazei în lanț (PCR) pentru detectarea agenților patogeni alimentari. Cerințe generale și definiții)
- Kit iQ-Check *Salmonella* II
  - Toate substanțele sau amestecurile din kitul de testare sunt produse clasificate, conform Sistemului Global Armonizat (GHS). Contactul cu acizii poate provoca eliberarea de gaze toxice. Nu sunt necesare precauții speciale în cazul utilizării corecte. Dacă produsul este inhalat, furnizați aer proaspăt și consultați un medic în caz de reacții. După contactul produsului cu ochii, clătiți ochii deschiși timp de câteva minute sub jet de apă. Dacă produsele sunt înghițite, induceți vomă și solicitați ajutor medical
- Sistemul iQ-Check Prep
  - Utilizarea necorespunzătoare a sistemului iQ-Check Prep poate cauza vătămări corporale sau deteriorarea instrumentului. Unele componente pot prezenta un risc de vătămare corporală din cauza căldurii excesive dacă sunt manipulate necorespunzător. Pentru o utilizare în siguranță, sistemul iQ-Check Prep trebuie exploatat numai de personal calificat de laborator care a fost instruit corespunzător. Întreținerea instrumentului trebuie efectuată numai de către inginerii de service de teren Bio-Rad
- Sistemul de detectare PCR în timp real CFX96 Touch Deep Well
  - Utilizarea necorespunzătoare a sistemului de detectare PCR în timp real CFX96 Touch Deep Well poate cauza vătămări corporale sau deteriorarea instrumentului. Unele componente pot prezenta un risc de vătămare corporală din cauza căldurii excesive dacă sunt manipulate necorespunzător. Pentru o utilizare în siguranță, sistemul de detectare PCR în timp real CFX96 Touch Deep Well trebuie utilizat numai de personal calificat de laborator care a fost instruit corespunzător. Întreținerea instrumentului trebuie efectuată numai de către inginerii de service de teren Bio-Rad

## Secțiunea 7

### ▪ Îmbogățire

- Utilizatorul trebuie să citească, să înțeleagă și să urmeze toate informațiile de siguranță din instrucțiunile pentru kitul iQ-Check *Salmonella* II. Păstrați instrucțiunile de siguranță pentru consultare viitoare. Pentru a reduce riscurile asociate cu expunerea la substanțe chimice și pericole biologice, efectuați testarea agenților patogeni într-un laborator dotat corespunzător, sub controlul personalului instruit. Urmați întotdeauna practicile standard de siguranță de laborator, inclusiv purtarea de îmbrăcăminte de protecție adecvată și protecție a ochilor în timp ce manipulați reactivii și probele contaminate. Evitați contactul cu conținutul mediului de îmbogățire și al eprubetelor de reactiv după amplificarea. Aruncați probele îmbogățite conform standardelor actuale din domeniu
- *Salmonella* este un organism de nivel 2 din punct de vedere al securității biologice. Probele biologice, cum ar fi îmbogățirile, au potențialul de a transmite boli infecțioase. Respectați toate reglementările locale, statale/provinciale și/sau naționale aplicabile privind eliminarea deșeurilor biologice. Purtați echipament de protecție adecvat, care include, fără a se limita la, ochelari de protecție, scut de protecție, îmbrăcăminte/halat de laborator și mănuși. Toate activitățile trebuie să se desfășoare în unități echipate corespunzător, utilizând echipamentul de siguranță adecvat (de exemplu, dispozitive de izolare fizică). Înainte de a lucra cu materiale potențial infecțioase personalul trebuie să fie instruit în conformitate cu reglementările aplicabile și cu cerințele companiei/instituției
- La finalizarea testării, toate materialele și mediile care ar putea conține agenți patogeni trebuie decontaminate conform standardelor actuale din domeniu pentru eliminarea deșeurilor contaminate (anume, autoclavare timp de 20 de minute la 120 °C). Consultați Fișa cu date de securitate pentru informații suplimentare și reglementările locale privind eliminarea

## Secțiunea 7 Protocol

Se recomandă cu insistență să citiți întregul protocol înainte de a începe testul.

Următorul tabel prezintă diferitele protocoale care pot fi utilizate în funcție de aplicație și de sfera validării.

Domeniul de aplicare	Îmbogățire	Extragerea ADN-ului		Certificare
		Metodă	Format	
Probe de produse alimentare, furaje pentru animale și de mediu 1	BPW 20 ± 4 ore la 37 ± 1 °C	Standard I	Eprubetă	NF VALIDATION
	BPW 22 ± 2 ore la 37 ± 1 °C	Easy I	Eprubetă/godeu adânc	NF VALIDATION
Produse din carne crudă 2 25 g 375 g	BPW la 41,5 ± 1 °C 8-16 ore 10-18 ore	Easy II	Eprubetă/godeu adânc	NF VALIDATION
Probe de producție primară de mediu	BPW supl. 22 ± 4 ore la 41,5 ± 1 °C	Easy I	Eprubetă/godeu adânc	NF VALIDATION
	+ BPW 5 ± 1 ore la 37 ± 1 °C	Standard II 3	Eprubetă/godeu adânc	NF VALIDATION
Lapte praf și cereale pentru bebeluși, cu și fără probiotice, ingrediente 4 10-375 g	BPW + PIF sup. 22 ± 4 ore la 37 ± 1 °C	Easy I	Eprubetă/godeu adânc	NF VALIDATION



Produce lactate crude până la 50 g	BPW + novobiocină 22 ± 2 ore la 41,5 ± 1 °C	Easy I	Eprubetă/godeu adânc	NF VALIDATION
Produce alimentare și suprafețe de mediu selectate	BPW 21 ± 1 ore la 37 ± 1 °C	Easy I	Eprubetă/godeu adânc	AOAC OMA 2017.06
Ciocolată	Lapte degresat 20 ± 2 ore la 37 ± 1 °C	Easy I	Eprubetă/godeu adânc	AOAC OMA 2017.06
Clătirea carcaselor	BPW 21 ± 1 ore la 37 ± 1 °C	Easy I	Eprubetă/godeu adânc	AOAC OMA 2017.06
Carne tocată de vită, crudă <sup>2</sup>	BPW preîncălzit 10 ± 2 ore la 36 ± 1 °C	Standard II	Eprubetă/godeu adânc	AOAC-PTM 010803

<sup>1</sup> Cu excepția probelor de producție primară de mediu

<sup>2</sup> Protocol utilizat pentru detectarea simultană a *E coli* O157:H7

<sup>3</sup> Reactivul de liză utilizat este numai reactivul A (fără reactivul F)

<sup>4</sup> Validarea include și utilizarea soluției iQ-Check Free DNA Removal și fișierul protocolului aplicației „Salmo Fast” pentru un timp de rulare PCR redus. Contactați reprezentantul Bio-Rad pentru mai multe informații. Protocolul este armonizat cu kitul iQ-Check *Cronobacter* spp.

## A. Îmbogățirea probei

### Informații generale

Pentru îmbogățirea peste noapte, încălziți mediul la temperatura camerei (20-25 °C) înainte de utilizare.

Pentru o îmbogățire scurtă (8 ore), încălziți bulionul de îmbogățire la temperatura de incubare a probei înainte de utilizare. Timpul scurt de îmbogățire este sensibil la condițiile de incubație și temperaturile indicate trebuie respectate cu strictețe. Durata pregătirii probei (timpul dintre preîncălzirea bulionului de îmbogățire și începutul incubației probei de produs alimentar) nu trebuie să depășească 45 de minute. Se recomandă utilizarea unui incubator ventilat.

Se recomandă cu insistență utilizarea unei pungi de îmbogățire cu filtru încorporat.

Utilizarea alfa-amilazei este recomandată pentru îmbogățirea cerealelor sau a produselor cu amidon, așa cum este descris în standardul ISO 6887-4.

În scopul validării NF, respectați standardele ISO 6887-2 până la -6 pentru pregătirea probelor. Dacă nu este indicat în acest sens, nu au fost testate porțiuni de testare care cântăresc mai mult de 25 g. Incubați fără agitare conform duratelor și temperaturilor indicate în tabel. Protocolul de extracție ADN Standard I poate fi utilizat pentru toate matricele, cu excepția probelor de producție primară de mediu.

### Probe de produse alimentare, furaje pentru animale și de suprafețe de mediu

1. Omogenizați *n* g de probă de produse alimentare în 9 x *n* ml (de exemplu, 25 g în 225 ml) apă tamponată cu peptonă.

## Secțiunea 7

2. Pentru dimensiuni mai mari ale probelor, omogenizați  $n$  g de probă de produse alimentare în  $3 \times n$  ml (de exemplu, 375 g în 1.125 ml) apă tamponată cu peptonă.
3. Umeziți tampoanele și bureții cu un bulion neutralizant care nu conține complex de sulfonat de aril.
4. Pentru suprafețele care sunt analizate cu tampoane, prelevați probe de pe o zonă de  $1 \times 1''$  (2,54 x 2,54 cm). Pentru suprafețele care sunt analizate cu tampoane, prelevați probe de pe o zonă de  $4 \times 4''$  (10,16 x 10,16 cm).
5. Adăugați bureții sau tampoanele în apa tamponată cu peptonă.
6. Incubați fără agitare timp de  $20 \pm 4$  ore la  $37 \pm 1$  °C dacă se urmează protocolul de extracție Standard sau  $22 \pm 2$  ore la  $37 \pm 1$  °C dacă se urmează protocolul de extracție Easy.

### Produse de carne crudă, până la 25 g

1. Omogenizați  $n$  g de probă în  $9 \times n$  ml (de exemplu, 25 g în 225 ml) apă tamponată cu peptonă.
2. Incubați fără agitare timp de 8-16 ore la  $41,5 \pm 1$  °C.
3. Urmați Protocolul de extracție a ADN-ului Easy II.

**Notă:** Probele îmbogățite pot fi păstrate la 2-8 °C timp de 72 de ore după sfârșitul incubării la 41,5 °C.

### Produse de carne crudă, până la 375 g

1. Omogenizați  $n$  g de probă în  $3 \times n$  ml (de exemplu, 375 g în 1.125 ml) apă tamponată cu peptonă.
2. Incubați fără agitare timp de 10-18 ore la  $41,5 \pm 1$  °C.
3. Urmați Protocolul de extracție a ADN-ului Easy II.

**Notă:** Probele îmbogățite pot fi păstrate la 2-8 °C timp de 72 de ore după sfârșitul incubării la 41,5 °C.

### Probe de producție primară de mediu

1. Omogenizați proba în apă tamponată cu peptonă suplimentată cu RAPID' *Salmonella* Capsule (consultați tabelul de mai sus pentru condițiile de incubație).
2. Incubați timp de  $22 \pm 4$  ore la  $41,5 \pm 1$  °C, apoi transferați 100 μl în 900 μl apă tamponată cu peptonă proaspătă într-o eprubetă sau în godeurile unei plăci cu godeuri adânci.
3. Sigilați placa prevăzută cu godeuri adânci și incubați timp de  $5 \pm 1$  oră la  $37 \pm 1$  °C.
4. Urmați Protocolul de extracție a ADN-ului Easy I sau Standard II.

**Notă:** După încheierea incubării la 41,5 °C, îmbogățirea primară poate fi păstrată la 2-8 °C timp de 16 ore înainte de a trece la îmbogățirea secundară.

### **Probe de lapte praf și de cereale pentru sugari cu și fără probiotice și ingrediente, până la 375 g**

1. Omogenizați  $n$  g de probă în  $3 \times n$  ml (de exemplu, 300 g în 900 ml) apă tamponată cu peptonă suplimentată cu Supliment PIF (100  $\mu$ l/l, de exemplu, 120  $\mu$ l în 900 ml apă tamponată cu peptonă).
2. Incubați fără agitare timp de  $22 \pm 4$  ore la  $37 \pm 1$  °C.
3. Urmați Protocolul de extracție a ADN-ului Easy I.

**Notă:** În domeniul de aplicare al validării NF VALIDATION, nu au fost testate porțiuni de testare care cântăresc mai mult de 375 g.

**Notă:** Probele îmbogățite pot fi păstrate la 2-8 °C timp de 72 de ore după sfârșitul incubării la 37 °C.

### **Produse lactate crude, până la 50 g**

1. Omogenizați  $n$  g de probă în  $9 \times n$  ml (de exemplu, 50 g în 450 ml) apă tamponată cu peptonă, suplimentată cu novobiocină (20 mg/l).
2. Incubați fără agitare timp de  $22 \pm 2$  ore la  $41,5 \pm 1$  °C.
3. Urmați Protocolul de extracție a ADN-ului Easy I.

**Notă:** În domeniul de aplicare al validării NF VALIDATION, nu au fost testate porțiuni de testare care cântăresc mai mult de 50 g.

**Notă:** Probele îmbogățite pot fi păstrate la 2-8 °C timp de 72 de ore după sfârșitul incubării la 41,5 °C.

### **Ciocolată, 375 g, AOAC OMA 2017.06**

1. Omogenizați 375 g de probă în 3.000 ml mediu de lapte degresat.
2. Incubați fără agitare timp de  $20 \pm 2$  ore la  $37 \pm 1$  °C.
3. Urmați Protocolul de extracție a ADN-ului Easy I.

## **B. Tratament de îndepărtare a ADN-ului liber**

Soluția iQ-Check Free DNA Removal (nr. de catalog 3594970) oferă o modalitate ideală de a elimina ADN-ul liber. Urmați recomandările Bio-Rad din ghidul de utilizare.

## **C. Extragerea ADN-ului**

Recomandări generale:

1. Porniți blocul de căldură sau agitatorul termic pentru preîncălzire înainte de a începe testul. Setăți-l la 95-100 °C. Păstrați reactivul de liză în suspensie în timp ce pipetați prin agitare la viteză medie pe o placă de agitare magnetică.
2. În general, evitați agitarea pungii de îmbogățire și colectarea de fragmente mari de produse alimentare. Pentru probele din produse alimentare cu un supernatant gras, recoltați proba chiar sub acest strat.

## Secțiunea 7

3. Deschideți eprubetele și godeurile cu atenție pentru a evita orice posibilă contaminare încrucișată.
4. Răciți placa prevăzută cu godeuri adânci înainte de a pipeta direct prin folia de etanșare pre-perforată.
5. Utilizați bara magnetică pentru a menține reactivul de liză în suspensie. Pipetați în timp ce agitați la viteză medie.
6. Agitați ușor reactivul de liză, mai întâi cu mâna, pentru a resuspenda rășina. Pipetați în timp ce bara de amestecare magnetică agită conținutul flaconului la viteză medie pentru a menține conținutul în suspensie.
7. Pentru protocoalele Easy II și Standard II, reconstituiți reactivul de liză finală după cum urmează:
  - a. Turnați cu grijă tot conținutul din reactivul F (granulele de liză) în reactivul A (reactivul de liză).
  - b. Utilizați consumabile cu un vârf suficient de lat pentru a permite pipetarea reactivului de liză omogenizat.
  - c. Reactivul de liză amestecat cu granulele de liză (reactivii A+F) are o perioadă de valabilitate de 6 luni, când este depozitat la 4 °C.

### Protocolul Easy I

1. Alicotați 100 µl de reactiv de liză omogenizat (reactivul A) în eprubete sau în godeurile unei plăci cu godeuri adânci.
2. Adăugați 100 µl de probă îmbogățită.
3. Amestecați soluția prin pipetarea în sus și în jos până la omogenizare.
4. Închideți eprubetele sau sigilați placa prevăzută cu godeuri adânci cu folie de etanșare pre-perforată.
5. Incubați eprubetele în blocul termic la 95-100 °C timp de 15-20 minute. Incubați placa prevăzută cu godeuri adânci în agitatorul termic sub agitare la 1.300-1.600 rpm, la 95-100 °C, timp de 15-20 minute.
6. Agitați eprubetele la viteză mare, apoi centrifugați la 10.000-12.000 x g timp de cel puțin 2 minute. Centrifugarea nu este necesară pentru placa prevăzută cu godeuri adânci.

### Protocolul Easy II

1. Alicotați 100 µl de reactiv de liză omogenizat (reactivii A+F) în godeurile unei plăci cu godeuri adânci.

**Notă:** Agitați ușor reactivul de liză, mai întâi cu mâna, pentru a resuspenda granulele.

2. Adăugați 100 µl de probă îmbogățită.

**Notă:** Agitați suspensia pentru a omogeniza cultura și apoi lăsați orice resturi să se depună înainte de recoltarea probei.

3. Amestecați soluția prin pipetarea în sus și în jos până la omogenizare.
4. Închideți eprubetele sau sigilați placa prevăzută cu godeuri adânci cu folie de etanșare pre-perforată.
5. Puneți eprubetele în disruptorul celular timp de 3 ± 1 minute.

6. Incubați eprubetele în blocul termic la 95-100 °C timp de 10-15 minute. Incubați placa prevăzută cu godeuri adânci în agitatorul termic sub agitare la 1.300 rpm, la 95-100 °C, timp de 15-20 minute.
7. Agitați eprubetele la viteză mare, apoi centrifugați la 10.000-12.000 x g timp de cel puțin 2 minute. Centrifugarea nu este necesară pentru placa prevăzută cu godeuri adânci.

Acesta este punctul de oprire recomandat pentru întreruperea temporară a procedurii.

Supernatantul poate fi păstrat până la 1 an la -20 °C. Lăsați-l întotdeauna să se dezghețe și să se omogenizeze, apoi centrifugați la 10.000-12.000 x g timp de 5 minute înainte de reutilizare.

### Protocolul Standard I

1. Colectați 1 ml de probă decantată îmbogățită într-o eprubetă.
2. Centrifugați la 10.000-12.000 x g timp de 5 minute.
3. Aruncați tot supernatantul.
4. Adăugați 200 µl de reactiv de liză (reactivul A) la pelet.
5. Pipetați reactivul în eprubetă în sus și în jos de suficiente ori pentru a resuspenda peletul. Numărul va depinde de probă.
6. Agitați la viteză mare și puneți eprubeta în blocul termic la 95-100 °C timp de 10-15 minute.
7. Agitați la viteză mare și centrifugați la 10.000-12.000 x g timp de 5 minute.

Acesta este punctul de oprire recomandat pentru întreruperea temporară a procedurii.

Supernatantul poate fi păstrat până la 1 an la -20 °C. Lăsați-l întotdeauna să se dezghețe și să se omogenizeze, apoi centrifugați la 10.000-12.000 x g timp de 5 minute înainte de reutilizare.

### Protocolul Standard II

1. Recoltați 1 ml de probă îmbogățită decantată într-o eprubetă sau într-un godeu al unei plăci cu godeuri adânci. Sigilați placa prevăzută cu godeuri adânci folosind o folie de plastic.

**Notă:** Agitați suspensia pentru a omogeniza cultura și apoi lăsați orice resturi să se depună înainte de recoltarea probei.

2. Centrifugați eprubetele la 10.000-12.000 x g timp de 5 minute. Aruncați supernatantul. Centrifugați plăcile cu godeuri adânci la 2250 x g timp de 20 de minute și aruncați supernatantul manual sau folosiți DW40.
3. Adăugați 200 µl de reactiv de liză omogenizat (reactivii A+F) pe pelet și resuspendați peletul prin pipetarea reactivului în sus și în jos. Închideți eprubetele sau sigilați placa prevăzută cu godeuri adânci cu folie de etanșare pre-perforată.

**Notă:** Agitați ușor reactivul de liză, mai întâi cu mâna, pentru a resuspenda granulele. Pentru probele de producție primară, utilizați reactivul A fără reactivul F.

## Secțiunea 7

4. Puneți eprubeta în disruptorul celular timp de  $3 \pm 1$  minute sau agitați placa prevăzută cu godeuri adânci în agitatorul termic la 1.300-1.600 rpm, la 95-100 °C, timp de 15-20 minute.
5. Incubați eprubetele în blocul termic corespunzător la 95-100 °C timp de 10-15 minute.
6. Agitați eprubetele la viteză mare și centrifugați la 10.000-12.000 x g timp de 5 minute. Centrifugați placa prevăzută cu godeuri adânci la 2250 x g timp de 2 minute.

Acesta este punctul de oprire recomandat pentru întreruperea temporară a procedurii.

Supernatantul poate fi păstrat până la 1 an la -20 °C. Lăsați-l întotdeauna să se dezghețe și să se omogenizeze, apoi centrifugați la 10.000-12.000 x g timp de 5 minute înainte de reutilizare.

## D. PCR în timp real

### Configurarea instrumentului și a software-ului

Pentru configurarea instrumentului și a software-ului, urmați instrucțiunile din ghidul de utilizare al sistemului PCR în timp real pentru kiturile iQ-Check.

### Prepararea amestecului PCR

1. Preparați amestecul PCR conținând soluția de amplificare (reactivul C) și sondele fluorescente (reactivul B). Volumul de amestec PCR necesar depinde de numărul de probe și de martori care trebuie să se analizeze. Cel puțin un martor pozitiv și unul negativ trebuie să se includă la fiecare rulare PCR. Utilizați tabelul de pipetare din Anexă - Ghidul de calculare a amestecului PCR pentru a găsi volumele corecte de utilizat pentru fiecare reactiv.
2. Utilizați amestecul PCR (reactivii B+C) imediat după preparare. Este stabil timp de maxim 1 oră la 2-8 °C.
3. Pipetați 45 μl din amestecul PCR în fiecare godeu în funcție de configurația plăcii.
4. Adăugați 5 μl de extract de ADN, de reactiv D (martor negativ) sau de reactiv E (martor pozitiv). Nu agitați proba înainte de pipetare. Sigilați ermetic godeurile plăcii sau benzile. Este important să evitați formarea bulelor pe fundul godeurilor pipetând cu atenție. Ca pas opțional, centrifugați placa PCR sigilată sau benzile de eprubete (rotire rapidă) pentru a elimina orice bule.
5. Puneți placa sau benzile în termociclor. Asigurați-vă că ați plasat placa având godeul A1 în colțul din stânga sus. Închideți modulul de reacție.

### Rulați PCR

Pentru a porni rularea testului PCR, urmați instrucțiunile din ghidul de utilizare al sistemului PCR în timp real pentru kiturile iQ-Check. Fișierul protocolului din aplicația „Salmo Fast” a fost certificat de către NF Validation.

## E. Analiza datelor

Datele pot fi analizate direct la sfârșitul rulării testului PCR sau mai târziu, prin deschiderea fișierului de date stocat. Pentru deschiderea fișierelor de date și setarea parametrilor de analiză a datelor urmați instrucțiunile din manualul de utilizare al software-ului CFX Manager IDE.

### Interpretarea rezultatelor

Odată ce parametrii de analiză a datelor au fost stabiliți, rezultatele sunt interpretate prin analiza valorilor Cq ale fiecărei probe (ciclul la care curba de amplificare depășește pragul).

Software-ul CFX Manager IDE permite analiza automată completă pentru sistemele de detectare PCR în timp real Bio-Rad.

### Martori

Verificați martorii pozitivi și negativi înainte de a interpreta rezultatele probei.

Pentru ca experimentul să fie valid, martorii trebuie să aibă rezultatele rezumate în tabelul următor. În caz contrar, reacția PCR trebuie repetată.

	Deteția <i>Salmonella</i> spp. (canal FAM)	Deteția martorului intern (canal HEX)
Martor negativ	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Martor pozitiv	$26 \leq Cq \leq 36$	N/A

\* Software-ul indică o valoare Cq N/A (nu este cazul) atunci când fluorescența unei probe nu crește semnificativ peste zgomotul de fond și, prin urmare, nu depășește pragul.

Dacă rezultatele martorilor negativi și pozitivi diferă de cele din tabelul de mai sus (martor nevalid), repetați rularea și analiza descrise în paragraful D. PCR în timp real și E. Analiza datelor din Secțiunea 7 Protocol.

### Probe

O probă **pozitivă** pentru *Salmonella* spp. trebuie să aibă o valoare Cq  $\geq 10$  pentru fluoroforul FAM.

- Dacă valoarea Cq pentru ambele canale este sub 10, verificați dacă, pentru datele brute, curba este o curbă de amplificare obișnuită (cu o linie de bază plată, urmată de o creștere exponențială rapidă a fluorescenței și apoi o aplatizare). În cazul în care curba pare corectă, proba poate fi considerată pozitivă pentru *Salmonella* spp.

Dacă nu există o valoare Cq (Ct = N/A) pentru FAM sau curba nu este o curbă tipică de amplificare, trebuie analizat martorul intern pentru acea probă.

- Această probă este considerată **negativă** pentru *Salmonella* spp. dacă nu există o valoare Cq în canalul FAM, iar martorul intern are o valoare Ct  $\geq 28$
- Dacă martorul intern nu are nicio valoare Cq (Cq = N/A), aceasta indică probabil inhibarea reacției PCR. Proba trebuie diluată (folosind 10  $\mu$ l de extract de ADN; obțineți o diluție 1:10 în apă distilată sterilă și apoi testați 5  $\mu$ l din diluție) și repetați testul PCR

## Secțiunea 8 Confirmarea rezultatelor

- În cazul în care valoarea Cq pentru marorul intern este  $< 28$ , nu este posibilă interpretarea rezultatului. Verificați dacă pragul a fost plasat corect sau curba de date brute este o curbă obișnuită de amplificare. În cazul în care curba nu are o formă caracteristică, va fi necesar să se repete testul PCR.

Interpretarea rezultatelor probei este rezumată în următorul tabel:

Deteția <i>Salmonella</i> spp. (canal FAM)	Deteția marorului intern (canal HEX)	Interpretare
Cq $\geq 10$	N/A	Pozitiv
Cq = N/A	Cq $\geq 28$	Negativ
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibare*

\* Când atât deția probei, cât și a marorului intern dă o valoare Cq = N/A, proba trebuie diluată 1:10 și testată din nou.

O interpretare nevalidă poate fi dată atunci când criteriile de validare nu sunt îndeplinite. Verificați datele brute și procedați ca și cum proba ar fi fost inhibată.

## Secțiunea 8 Confirmarea rezultatelor pozitive

În contextul validării AOAC, un rezultat iQ-Check pozitiv pentru *Salmonella* II se presupune a fi pozitiv și se recomandă confirmarea conform unei metode de referință adecvate (de exemplu, USDA MLG, FDA BAM, ISO, MFHPB etc.).

În contextul metodei certificate VALIDARE NF, toate rezultatele pozitive ale kitului iQ-Check trebuie confirmate într-unul din următoarele moduri:

### Toate probele, cu excepția probelor de producție primară

1. Utilizând testele clasice descrise în metodele standardizate CEN sau ISO (inclusiv purificarea) direct din bulionul de îmbogățire BPW după îmbogățirea completă timp de  $18 \pm 2$  ore la  $37^\circ\text{C}$ .
2. Prin trasarea a  $10\ \mu\text{l}$  BPW îmbogățit (cu suplimente atunci când este cazul) direct către medii cromogene RAPID'*Salmonella* și incubarea timp de  $24 \pm 2$  ore la  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Când flora interferentă ar putea fi ridicată, transferați  $0,5\ \text{ml}$  BPW îmbogățit în  $10\ \text{ml}$  bulion de soia Rapaport Vassiliadis (RVS) și incubați timp de  $24 \pm 3$  ore la  $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ , apoi continuați cu trasarea a  $10\ \mu\text{l}$  RVS îmbogățit în medii cromogene RAPID'*Salmonella*.
3. Utilizând orice altă metodă certificată de NF VALIDATION bazată pe un principiu diferit de cel utilizat în testul PCR iQ-Check *Salmonella* II. Protocolul validat al acestei a doua metode trebuie urmat în întregime, inclusiv îmbogățirea selectivă cu RVS, atunci când este necesar. Confirmarea se efectuează din bulionul de îmbogățire BPW dacă acest pas este comun ambelor metode.



În cazul rezultatelor discrepante între kitul iQ-Check *Salmonella* II și oricare dintre opțiunile de confirmare enumerate mai sus, urmați pașii necesari pentru a asigura rezultate valide.

Este posibil să se păstreze BPW îmbogățit la 2-8 °C, timp de maximum 72 de ore, după incubare la 37 °C, cu excepția probelor de lactate și a suprafețelor de mediu.

### Probe de producție primară

Începeți procesul de confirmare de la îmbogățirea primară, urmând metoda MSR/V indicată în Anexa D la standardul ISO 6579/A1 și folosind mediul RAPID' *Salmonella* pentru izolare.

Neconcordanțele între rezultatele kitului iQ-Check *Salmonella* II și metoda de confirmare descrisă mai sus pot fi cauzate de prezența de organisme de *Salmonella* nemișcate. În acest caz, urmați protocolul RAPID' *Salmonella* de îmbogățire dublă (consultați ghidul de utilizare a produsului pentru instrucțiuni de utilizare). Acest protocol include o etapă de îmbogățire selectivă în mediu RVS.

În domeniul de aplicare al NF VALIDATION, pungile de îmbogățire primară pot fi păstrate până la 24 de ore la 2-8 °C înainte de a trece la confirmare.

## Secțiunea 9

### Confirmarea coloniilor individuale folosind kitul iQ-Check

iQ-Check *Salmonella* spp. II. Kitul poate fi folosit și pentru a confirma o singură colonie de *Salmonella* spp. izolată pe plăci de agar. Acest lucru este validat oficial de AFNOR Certification pe medii cromogene RAPID' *Salmonella*.

1. Alegeți o colonie izolată de pe o placă de agar selectivă sau neselectivă, folosind o scobitoare, o buclă sterilă sau alt consumabil adaptat (de exemplu, un vârf de pipetă).
2. Resuspendați colonia în 100 µl de sare de triptonă sau apă distilată sterilă, într-o eprubetă de microcentrifugă. Omogenizați folosind un ciclon.
3. Utilizați 5 µl de suspensie cu 45 µl de amestec PCR (a se vedea paragraful D. PCR în timp real din Secțiunea 7 Protocol) și urmați restul protocolului iQ-Check *Salmonella* II pentru interpretarea datelor și a rezultatelor.

## Secțiunea 10

### Performanțe de testare și validări

Kitul iQ-Check *Salmonella* II este specific pentru detectarea genului *Salmonella*.



#### NF Validation

Kitul iQ-Check *Salmonella* II este certificat de NF VALIDATION ca metodă alternativă la metoda de referință ISO 6579 -1 (2017), pentru detectarea *Salmonella* spp. în toate produsele destinate consumului uman și animal, precum și în probele de mediu. Validarea a urmat protocolul standardului ISO 16140: 2016 și include utilizarea sistemelor PCR în timp real CFX96 Touch și CFX96 Touch Deep Well. Utilizarea soluției iQ-Check Free DNA Removal este

## Secțiunea 11

validată pentru lapte praf și ingrediente pentru sugari. Software-ul asociat este CFX Manager IDE (versiunea 2.2 și versiuni ulterioare). FPA „Salmo Fast” este, de asemenea validat pentru toate probele. Număr de certificat: BRD 07/06 – 07/04. Valabil până la: Consultați certificatul disponibil pe site-ul AFNOR Certification.

OMA 2017.06



### Validarea AOAC

Kitul iQ-Check *Salmonella* II (Protocolul Easy) este validat de AOAC Research Institute sub OMA 2017.06 pentru detectarea *Salmonella* spp. în ouă (25 g), carne de pui tocată, crudă (25 și 375 g), carne de vită crudă (25 g), carne de porc crudă (25 g), spanac proaspăt (25 g), pepene galben (25 g), unt de arahide (25 g), șuncă de porc gata de consumat (375 g), suprafețe de mediu selectate, hrană pentru animale de companie. umedă (25 g) și uscată (25 și 375 g), ciocolată (375 g), brânză (375 g) și clătiri de carcasă. Protocolul Standard II este, de asemenea, validat de AOAC-PTM (010803) pentru detectarea simultană a *Salmonella* spp. și *E coli* O157:H7 în carnea de vită tocată, crudă. Un rezultat pozitiv cu kitul iQ-Check este considerat prezumtiv și se recomandă să fie confirmat prin metode standard de referință.



### Validarea Health Canada

Kitul iQ-Check *Salmonella* II (Protocolul Easy) a fost validat de Health Canada (MFLP-38) pentru detectarea *Salmonella* spp. dintr-o varietate de produse alimentare (25 g) și suprafețe de mediu selectate. Un rezultat pozitiv cu kitul iQ-Check ar trebui considerat prezumtiv și trebuie să fie confirmat conform MFHPB-20 (a se vedea secțiunea 11, referința 5).



### Validarea NordVal

Kitul iQ-Check *Salmonella* II este validat de NordVal pentru Protocoalele Standard I și Easy I (în microplăci) în produse alimentare, furaje și mediu, și pentru Protocoalele Standard II și Easy II (în microplăci) în carnea crudă și respectiv carnea de vită crudă. În plus, s-a demonstrat că nu este necesară confirmarea. Număr de certificat: 038. Valabil până la: Consultați certificatul disponibil pe site-ul NordVal.

## Secțiunea 11 Referințe

ISO 7218. Microbiologia alimentelor i furajelor. Cerințe generale și îndrumări pentru examinări microbiologice.

ISO 6887-4:2017. Microbiologia lanțului trofic. Pregătirea probelor de testat, suspensia inițială și diluții zecimale pentru examinarea microbiologică. Partea 4: Reguli specifice pentru prepararea produselor diverse.

ISO 6579-1 (2017). Microbiologia lanțului trofic. Metodă orizontală pentru detectarea, enumerarea și serotiparea organismelor *Salmonella*. Partea 1: Detectarea *Salmonella* spp.

ISO 16140-2 (2016). Microbiologia lanțului trofic. Validarea metodei. Partea 2: Protocol pentru validarea metodelor alternative (interne) în raport cu o metodă de referință.

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.

## Secțiunea 12

### Istoricul revizuirilor

Data lansării	Numărul documentului	Modificare
octombrie 2020	10000131519 Ver. A	<ul style="list-style-type: none"><li>- Reînnoirea și extinderea validării AFNOR: Utilizarea FDRS ca FSA opțional pentru „Salmo Fast”</li><li>- Design de document nou și actualizarea referințelor și a conținutului</li><li>- Modificarea numărului documentului (versiunea anterioară era 808463 Rev. G)</li></ul>

## Anexă - Ghid de calculare a amestecului PCR

Pentru a găsi volumele corecte de utilizat la prepararea amestecului PCR, adunați numărul total de probe și martori care trebuie să se analizeze și găsiți volumele corespunzătoare de reactiv B și reactiv C în tabel.

Număr total de probe și martori	Reactiv B sonde, µl	Amestec amplificare Reactiv C, µl	Număr total de probe și martori	Reactiv B sonde, µl	Amestec amplificare Reactiv C, µl	Număr total de probe și martori	Reactiv B sonde, µl	Amestec amplificare Reactiv 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

Vizitați [bio-rad.com/iqcheck](https://www.bio-rad.com/iqcheck) pentru informații suplimentare.

BIO-RAD este o marcă comercială aparținând Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK este o marcă comercială aparținând Europe GmbH în anumite jurisdicții.

Toate mărcile comerciale utilizate aici sunt proprietatea deținătorului de drept.

**BIO-RAD**

**Bio-Rad  
Laboratories, Inc.**

Life Science  
Group

---

**Website** [bio-rad.com](https://www.bio-rad.com) **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23  
**Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23  
**Finland** 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300  
**Hungary** 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000  
**Korea** 82 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 0220



10000131519 Ver. A US/EG

Anexă - Ghid de calculare a amestecului PCR Istoricul

Subsemnata, **ROXANA BROWN**, traducător și interpret autorizat pentru limba engleză, în temeiul autorizației nr. 31054/2011, eliberată de Ministerul Justiției din România, certific exactitatea traducerii efectuate din limba engleză în limba română.

