
iQ-Check *Campylobacter* Kit

User Guide

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

Catalog #3578135

BIO-RAD

Table of Contents

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

Section 1 Introduction

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

Section 2 The iQ-Check *Campylobacter* Technology

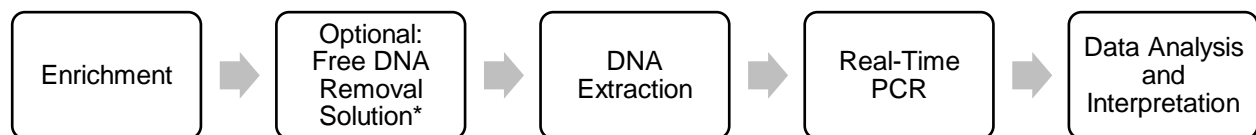
The iQ-Check *Campylobacter* Kit is a test based on gene amplification and detection by real-time PCR. The kit's ready-to-use PCR reagents contain oligonucleotides (primers and probes) specific for *C. jejuni*, *C. coli*, and *C. lari*, as well as DNA polymerase and nucleotides. Detection and data analysis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

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

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

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

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



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

Section 3

Kit Components

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

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

Section 4

Shelf Life and Storage

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

Section 5

Materials Required but Not Supplied

Equipment

- Lab paddle blender for homogenizing test samples
- Incubator for sample microbiological enrichment
- Specific for extraction in sterile 1.5 ml conical screwcap tubes
 - Benchtop centrifuge capable of 10,000–12,000 x g
 - Dry heat block at 37 ± 2°C and/or 95–100°C
- Specific for extraction in deep well plate
 - Heating thermoshaker* capable of maintaining 37 ± 2°C and/or 95–100°C, with a mixing speed of at least 1,300 rpm
- Vortexer
- 20, 200, and 1,000 µl micropipets
- Bio-Rad real-time PCR system*; for example, the CFX96 Touch Deep Well System (catalog #3600037)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System for automated DNA extraction and PCR plate setup (catalog #3594911)

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

Section 5 Materials Required but Not Supplied

Prep Systems.

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

Supplies

- Enrichment medium: Bolton broth, supplemented or double strength blood free
- Enrichment medium: buffered peptone water (for example, BPW Plus catalog #3564684, dehydrated, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 bottles; 3555790, 5 L x 2 bags; 3555795, 3 L x 4 bags. BPW Standard catalog #12013259, dehydrated, 500 g; 12013258 dehydrated, 5 kg; 12013260 5 L x 2 bags)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalog #3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (catalog #12012383)
- RAPID' *Campylobacter* Agar (catalog #12012036, 90 mm x 20 dishes; 3564295, dehydrated base, 500 g; 3564296, supplement, 10 vials)
- Specific for environmental samples
 - Environmental sponges
 - Neutralizing broth for sponges, such as Dey-Engley (D/E) or HiCap Neutralizing Broth, or Lethen broth
- Specific for extraction in tubes
 - 1.5 ml conical screwcap tubes, sterile (for example, catalog #2240110XTU)
- Specific for extraction in a deep well plate
 - 96-well deep well plate (iQ-Check Deep Well Microplates, catalog #3594900)
 - Plastic sealing film (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, catalog #3590139)
 - Pre-pierced sealing film (X-Pierce Films, catalog #3593977; or Pre-Pierced Plate Sealing Film, #3600040, North America only)
- Specific for iQ-Check Prep System
 - 60 ml dilution container (catalog #3594904)
 - Filter tips (catalog #3594902, 50 µl x 5,760; 3594903, 1,000 µl x 3,840)
 - PCR mix tubes (catalog #3594901, 5 ml x 50)
- PCR plates, tubes, sealing tape, and caps
- Sterile filter tips adaptable to 20, 200, and 1,000 µl micropipets
- Tips for Combitip pipets or equivalent repeat pipettors; sterile, individually packaged
- 5 ml sterile test tubes

- Powder-free gloves
- Distilled sterile water
- Bleach, 5%
- Cleaning agent such as DNA AWAY or RNase AWAY

Section 6

Safety Precautions and Recommendations for Best Results

- This test must be performed by trained personnel
- Samples and enrichment cultures must be handled as potentially infectious material and discarded according to local rules and regulations
- All potentially infectious material should be autoclaved before disposal
- The quality of results depends on strict compliance with Good Laboratory Practices (for example, the EN ISO 7218 standard), especially concerning PCR:
 - Never circulate laboratory equipment (pipets, tubes, etc.) from one workstation to another
 - Always use a positive control and a negative control for each series of amplification reactions
 - Do not use reagents after their expiration date
 - Vortex reagents from the kit before using them to ensure homogeneity
 - Periodically verify the accuracy and precision of pipets, as well as correct functioning of the instruments
 - Change gloves often, especially if you suspect they are contaminated
 - Clean work spaces periodically with 5% bleach and other decontaminating agents, such as DNA AWAY
 - Use powder-free gloves and avoid fingerprints and writing on tube caps. Both will interfere with data acquisition
- It is strongly advised to follow the general requirements described in the standard EN ISO 22174:2005 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food pathogens — General requirements and definitions)
- iQ-Check *Campylobacter* Kit
 - All substances or mixtures in the test kit are classified products, according to the Globally Harmonized System (GHS). Contact with acids may cause release of toxic gases. No special precautions are necessary if used correctly. If the product is inhaled, supply fresh air and consult a doctor in case of complaints. After eye contact with the product, rinse opened eye for several minutes under running water. If the products are swallowed, induce vomiting and call for medical help

Section 7 Protocol

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

Section 7 Protocol

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

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

Scope (matrices)	Enrichment	DNA Extraction		Certification
		Method	Format	
Raw ground chicken	Suppl. Bolton broth 4 hr at 37 ± 1°C 20 hr at 41.5 ± 1°C Microaerobic conditions	Easy I	Tube/Deep well	AOAC PTM
Carcass rinse	2x BF-BEB 24 hr at 42 ± 1°C Microaerobic conditions	Easy I	Tube/Deep well	AOAC PTM
Carcass sponge	2x BF-BEB 24 hr at 42 ± 1°C Microaerobic conditions	Easy I	Tube/Deep well	AOAC PTM
Feces	Suppl. Bolton Broth Direct detection	Easy I	Tube/Deep well	N/A
Food samples	Suppl. Bolton broth 4 hr at 37 ± 1°C 20 hr at 41.5 ± 1°C Microaerobic conditions	Easy I	Tube/Deep well	N/A

A. Sample Enrichment

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

Food samples

1. Homogenize n g of sample in 9 x n ml (for example, 25 g in 225 ml) supplemented Bolton broth in a stomacher bag with incorporated filter.
2. Incubate without shaking for 4 hr at 37 ± 1°C under microaerobic conditions, and then transfer to 41.5 ± 1°C for an additional 20 hr under microaerobic conditions.
3. Follow the Easy I DNA extraction protocol.

Carcass rinse samples

1. Rinse carcass in 400 ml buffered peptone water for 1 min.
2. Add 30 ml of rinse to 30 ml double strength blood free Bolton enrichment broth (2x BF-BEB). Mix gently.
3. Incubate for 24 hr at 42 ± 1°C under microaerobic conditions.
4. Follow the Easy I DNA extraction protocol.

Carcass swab samples

1. After sponging carcass, add 25 ml 2x BF-BEB.
2. Add 30 ml of rinse to 30 ml 2x BF-BEB. Mix gently.
3. Incubate for 24 hr at $42 \pm 1^\circ\text{C}$ under microaerobic conditions.
4. Follow the Easy I DNA extraction protocol.

Feces samples

1. Homogenize a w/v sample of feces in supplemented Bolton broth (for example, 10 g in 10 ml) in a stomacher bag with incorporated filter.
2. Allow to decant at room temperature for 10 min.
3. Follow the Easy I DNA extraction protocol.

B. Free DNA Removal Treatment

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

C. DNA Extraction

General recommendations:

1. Turn on the heat block or thermoshaker to preheat before starting the test. Set it to $95\text{--}100^\circ\text{C}$. Keep the lysis reagent in suspension while pipetting by stirring at medium speed on a magnetic stir plate.
2. In general, avoid shaking the enrichment bag and collecting large fragments of food debris. For food samples with a fatty supernatant, collect the sample just below this layer.
3. Open tubes and wells carefully to avoid any possible cross-contamination.
4. Cool the deep well plate before pipetting directly through pre-pierced sealing film.
5. Use the magnetic bar to keep the lysis reagent in suspension. Pipet while it is stirring at medium speed.
6. Gently shake the lysis reagent by hand first to resuspend the resin. Then pipet while it is stirring at medium speed with the magnetic bar in the bottle, in order to keep it in suspension.

Easy I protocol

1. Aliquot 100 μl of lysis reagent (reagent A) to tubes or the wells of a deep well plate.
2. Add 100 μl of enriched sample.
3. Mix the solution by pipetting up and down until homogenized.
4. Close the tubes or seal the deep well plate with pre-pierced sealing film.
5. Incubate the tubes in the heat block at $95\text{--}100^\circ\text{C}$ for 10–15 min. Incubate the deep well plate in the incubator under agitation at 1,300–1,600 rpm at $95\text{--}100^\circ\text{C}$ for 15–20 min.

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

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

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

D. Real-Time PCR

Instrument and software setup

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

PCR mix preparation

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

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

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

Run PCR

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

E. Data Analysis

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

Interpreting results

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

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

Controls

Verify the positive and negative controls before interpreting sample results.

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

	<i>Campylobacter</i> detection (FAM)	Internal control detection (HEX channel)
Negative control	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Positive control	26 ≤ Cq ≤ 36	Not significant

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

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

Samples

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

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

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

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

Interpretation of sample results is summarized in the following table:

<i>Campylobacter</i> Detection (FAM channel)	Internal control detection (HEX channel)	Interpretation
Cq ≥ 10	Not significant	Positive
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negative
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition*

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

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

Section 8

Confirmation of Positive Results

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

Section 9

Confirmation of Single Colonies Using iQ-Check Kit

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

1. Pick an isolated colony from a selective or nonselective agar plate with a toothpick, sterile loop, or other adapted consumable (for example, a pipet tip).
2. Resuspend the colony in 100 µl tryptone salt or distilled sterile water in a microcentrifuge tube. Homogenize using a vortexer.
3. Use 5 µl of the suspension with 45 µl of PCR mix (see Section 7 Protocol, D. Real-Time PCR) and follow the rest of the iQ-Check *Campylobacter* protocol for the data and result interpretation. DNA extraction is not necessary.

Section 10

Test Performance and Validation



AOAC Validation

The iQ-Check *Campylobacter* Kit has been validated by the AOAC Research Institute under the Performance Tested Method Program for detection of *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* from raw ground chicken, chicken carcass rinses and turkey sponges. A positive result with iQ-Check should be considered presumptive and it is recommended that it be confirmed by standard reference methods (see Section 8). Certificate number: 031209

Section 11

References

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

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2016). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 41.04. Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples

Section 12 Revision History

Release date	Document number	Change
August 2020	10000131520 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- New document design and update of content- Document number change – previous version 881039 REV G

Appendix — PCR Mix Calculation Guide

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

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

Visit [bio-rad.com/iqcheck](https://www.bio-rad.com/iqcheck) for more information.

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

IQ-CHECK is a trademark of Bio-Rad Europe GmbH in certain jurisdictions

All trademarks used herein are the property of their respective owner.



Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science
Group

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

10000131520 Ver A US/EG

Sig 0220



iQ-Check *Campylobacter* Kit

Guide d'utilisation

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

N° de référence 3578135

BIO-RAD

Sommaire

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

Section 1 Introduction

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

Section 2 Technologie iQ-Check *Campylobacter*

Le kit iQ-Check *Campylobacter* est un test basé sur l'amplification et la détection des gènes par PCR en temps réel. Les réactifs PCR prêts à l'emploi de ce kit contiennent des oligonucléotides (amorces et sondes) propres à *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*, ainsi que de l'ADN polymérase et des nucléotides. La détection et l'analyse des données sont optimisées pour l'utilisation avec un instrument de PCR en temps réel Bio-Rad, comme le système CFX96 Touch Deep Well System.

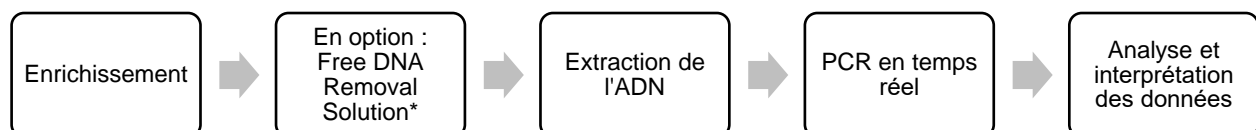
La PCR (amplification en chaîne par polymérase) est une technique puissante utilisée pour générer de nombreuses copies d'ADN cible. Durant la PCR, la succession de cycles de chauffage et de refroidissement permet une dénaturation de l'ADN, suivie par une hybridation des amorces à la région cible puis,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

Ces copies sont appelées amplicons.

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

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

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



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

Section 3

Composants du kit

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

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

Section 4

Durée de conservation et stockage

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

Section 5

Matériel requis non fourni

Matériel

- Stomacher de laboratoire pour homogénéiser les échantillons de test
- Incubateur pour l'enrichissement microbiologique des échantillons
- Matériel spécifique pour extraction en tubes coniques à bouchon fileté 1,5 ml stériles
 - Centrifugeuse de paillasse 10 000–12 000 x g
 - Bloc de chauffage à sec à 37 ± 2 °C et/ou 95–100 °C
- Matériel spécifique pour extraction en plaque Deep Well
 - Agitateur incubateur* capable de maintenir une température de 37 ± 2 °C et/ou 95–100 °C, avec une vitesse de mélange d'au moins 1 300 rpm
- Agitateur-mélangeur vortex
- Micropipettes de 20, 200 et 1 000 µl
- Système de PCR en temps réel de Bio-Rad* ; par exemple, CFX96 Touch Deep Well System (n° de référence 3600037)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System pour l'extraction automatisée d'ADN et la préparation des plaques de PCR (n° de référence 3594911)

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

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

Produits

- Milieu d'enrichissement : Bouillon Bolton, avec supplément ou doublement concentré et exempt de sang
- Milieu d'enrichissement : eau peptonée tamponnée (par exemple, BPW Plus n° de référence 3564684, base déshydratée, 500 g ; 3554179, 225 ml x 6 flacons ; 3555790, 5 L x 2 poches ; 3555795, 3 L x 4 poches. BPW Standard n° de référence 12013259, base déshydratée, 500 g ; 12013258 base déshydratée, 5 kg ; 12013260, 5 L x 2 poches)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (n° de référence 3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (n° de référence 12012383)
- RAPID'*Campylobacter* Agar (n° de référence 12012036, 90 mm x 20 boîtes ; 3564295, base déshydratée, 500 g ; 3564296, supplément, 10 flacons)
- Produits spécifiques pour les échantillons environnementaux
 - Éponges d'échantillonnage environnemental
 - Bouillon neutralisant pour éponges, par exemple, Dey-Engley (D/E), HiCap ou Lethen
- Produits spécifiques pour extraction en tubes
 - Tubes coniques à bouchon fileté 1,5 ml, stériles (par exemple, n° de référence 2240110XTU)
- Produits spécifiques pour extraction en plaque Deep Well
 - Plaque Deep Well, 96 puits (iQ-Check Deep Well Microplates, n° de référence 3594900)
 - Film à sceller en plastique (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, n° de référence 3590139)
 - Film à sceller préperforé (X-Pierce Film, n° de référence 3593977, ou 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)
 - Embouts à filtre (n° de référence 3594902, 50 µl x 5 760 ; 3594903, 1 000 µl x 3 840)
 - Tubes de mélange de PCR (n° de référence 3594901, 5 ml x 50)
- Plaques, tubes, ruban à sceller et bouchons pour PCR
- Embouts filtrants stériles adaptables pour micropipettes de 20, 200 et 1 000 µl
- Embouts pour pipettes Combitip ou pipettes à répétition équivalentes ; stériles, emballés individuellement
- Tubes à essai stériles de 5 ml
- Gants non poudrés
- Eau distillée stérile
- Eau de Javel, 5 %
- Agent nettoyant tel que DNA AWAY ou RNase AWAY

Section 6

Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux

- Ce test doit être réalisé par du personnel formé.
- Les échantillons et cultures d'enrichissement doivent être manipulés en tant que substances potentiellement infectieuses et éliminés conformément aux règles et réglementations locales.
- Tous les matériels potentiellement infectieux doivent être soumis à l'autoclave avant élimination.
- La qualité des résultats dépend du respect strict des bonnes pratiques de laboratoire (par exemple, la norme EN ISO 7218), particulièrement en ce qui concerne la PCR :
 - Ne jamais transférer du matériel de laboratoire (pipettes, tubes, etc.) d'un poste de travail à un autre.
 - Toujours utiliser un contrôle positif et un contrôle négatif pour chaque série de réactions d'amplification.
 - Ne pas utiliser les réactifs après leur date d'expiration.
 - Vortexer les réactifs du kit avant de les utiliser afin d'assurer leur homogénéité.
 - Vérifier périodiquement l'exactitude et la précision des pipettes, ainsi que le fonctionnement correct des instruments.
 - Changer de gants fréquemment, surtout si une contamination est suspectée.
 - Nettoyer les postes de travail périodiquement avec de l'eau de Javel à 5 % et d'autres agents de décontamination tels que DNA AWAY.
 - Utiliser des gants non poudrés et éviter les empreintes digitales et l'écriture sur les bouchons des tubes. En effet, l'acquisition des données peut en être affectée.
- Il est fortement recommandé de respecter les exigences générales décrites dans la norme EN ISO 22174:2005 (Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences générales et définitions).
- iQ-Check *Campylobacter* Kit
 - Tous les mélanges ou substances du kit de test sont des produits classés conformément au Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). Tout contact avec des acides peut entraîner la libération de gaz toxiques. Aucune précaution particulière n'est nécessaire si le kit est utilisé correctement. Si les produits sont inhalés, apporter de l'air frais et consulter un médecin en cas de troubles. En cas de contact avec les yeux, rincer l'œil ouvert pendant plusieurs minutes sous l'eau courante. Si les produits sont ingérés, provoquer le vomissement et appeler les secours médicaux.
- iQ-Check Prep System
 - Une utilisation incorrecte d'iQ-Check Prep System peut causer des blessures corporelles ou endommager l'instrument. En cas de manipulation incorrecte, certains composants peuvent

Section 7 Protocole

entraîner un risque de blessures corporelles causées par une chaleur excessive. Pour une utilisation en toute sécurité, iQ-Check Prep System doit être uniquement manipulé par du personnel de laboratoire qualifié et ayant reçu une formation adéquate. La maintenance de l'instrument doit être réalisée uniquement par des techniciens de maintenance de Bio-Rad.

- Système de détection par PCR en temps réel CFX96 Touch Deep Well
 - Une utilisation incorrecte du CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System peut causer des blessures corporelles ou endommager l'instrument. En cas de manipulation incorrecte, certains composants peuvent entraîner un risque de blessures corporelles causées par une chaleur excessive. Pour une utilisation en toute sécurité, CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System doit être uniquement manipulé par du personnel de laboratoire qualifié et ayant reçu une formation adéquate. La maintenance de l'instrument doit être réalisée uniquement par des techniciens de maintenance de Bio-Rad.
- Enrichissement
 - L'utilisateur doit lire, comprendre et suivre toutes les informations relatives à la sécurité dans les instructions du kit iQ-Check *Campylobacter*. Conserver les instructions relatives à la sécurité pour référence ultérieure. Afin de réduire les risques associés à l'exposition aux produits chimiques et biologiques, réaliser les analyses d'agents pathogènes dans un laboratoire convenablement équipé, sous le contrôle d'un personnel qualifié. Toujours suivre les bonnes pratiques en matière de sécurité en laboratoire, notamment porter des vêtements et lunettes ou masque de protection appropriés pour manipuler les réactifs et échantillons contaminés. Éviter tout contact avec le contenu du milieu d'enrichissement et des tubes de réactif après amplification. Éliminer les échantillons enrichis conformément aux normes actuelles de l'industrie.
 - *Campylobacter* est un organisme de niveau de biosécurité 2. Les échantillons biologiques tels que les enrichissements peuvent transmettre des maladies infectieuses. Respecter toutes les réglementations locales, étatiques/provinciales et/ou nationales applicables à l'élimination des déchets biologiques. Porter un équipement de protection approprié, ce qui comprend, sans s'y limiter : lunettes ou masque de protection, écran facial, vêtements de protection/blouse de laboratoire et gants. Tout travail doit être effectué dans des installations convenablement équipées, à l'aide des équipements de sécurité appropriés (par exemple, dispositifs de confinement physique). Le personnel doit être formé conformément aux exigences réglementaires et aux exigences de l'entreprise/de l'institution avant de travailler avec des substances potentiellement infectieuses.
 - Une fois l'analyse terminée, l'ensemble du matériel et les milieux de culture pouvant contenir des agents pathogènes doivent être décontaminés conformément aux normes actuelles de l'industrie pour l'élimination des déchets contaminés (c'est-à-dire, avec un passage à l'autoclave de 20 min à 120 °C). Consulter la fiche de données de sécurité pour obtenir des informations supplémentaires ainsi que les réglementations locales relatives à l'élimination.

Section 7 Protocole

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

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

Domaine (matrices)	Enrichissement	Extraction de l'ADN		Certification
		Méthode	Format	
Poulet haché cru	Bouillon Bolton suppl. 4 hr à 37 ± 1 °C 20 hr à 41,5 ± 1 °C Microaérobiose	Easy I	Tube/Deep Well	AOAC PTM
Rinçage de carcasse	2x Bolton exempt de sang 24 hr à 42 ± 1 °C Microaérobiose	Easy I	Tube/Deep Well	AOAC PTM
Éponge carcasse	2x Bolton exempt de sang 24 hr à 42 ± 1 °C Microaérobiose	Easy I	Tube/Deep Well	AOAC PTM
Fèces	Bouillon Bolton suppl. Détection directe	Easy I	Tube/Deep Well	N/A
Échantillons alimentaires	Bouillon Bolton suppl. 4 hr à 37 ± 1 °C 20 hr à 41,5 ± 1 °C Microaérobiose	Easy I	Tube/Deep Well	N/A

A. Enrichissement de l'échantillon

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

Échantillons alimentaires

1. Homogénéiser n g d'échantillon dans $9 \times n$ ml (par exemple, 25 g dans 225 ml) de bouillon Bolton supplémenté, dans une poche à filtre incorporé.
2. Incuber sans remuer pendant 4 hr à 37 ± 1 °C en microaérobiose, puis transférer à 41,5 ± 1 °C pendant 20 hr supplémentaires, en microaérobiose.
3. Suivre le Protocole Easy I d'extraction d'ADN.

Échantillons de rinçage - Carcasse

1. Rinçer une carcasse dans 400 ml d'eau peptonée tamponnée pendant 1 min.
2. Ajouter 30 ml du produit de rinçage à 30 ml de bouillon d'enrichissement Bolton doublement concentré et exempt de sang. Mélanger doucement.
3. Incuber pendant 24 hr à 42 ± 1 °C en microaérobiose.
4. Suivre le Protocole Easy I d'extraction d'ADN.

Échantillons d'éponge - Carcasse

1. Après avoir échantillonné la carcasse à l'aide d'une éponge, ajouter 25 ml de bouillon d'enrichissement Bolton doublement concentré et exempt de sang.
2. Ajouter 30 ml du produit de rinçage à 30 ml de bouillon d'enrichissement Bolton doublement concentré et exempt de sang. Mélanger doucement.

Section 7 Protocole

3. Incuber pendant 24 hr à 42 ± 1 °C en microaérobiose.
4. Suivre le Protocole Easy I d'extraction d'ADN.

Échantillons de fèces

1. Homogénéiser un échantillon poids/volume de fèces dans un bouillon Bolton supplémenté (par exemple, 10 g dans 10 ml), dans une poche à filtre incorporé.
2. Laisser décanter à température ambiante pendant 10 min.
3. Suivre le Protocole Easy I d'extraction d'ADN.

B. Traitement de l'ADN libre

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

C. Extraction de l'ADN

Recommandations générales :

1. Allumer le bloc de chauffage ou l'agitateur thermique afin de préchauffer avant de commencer le test. Le régler sur 95–100 °C. Garder le réactif de lyse en suspension pendant le pipettage en mélangeant à vitesse moyenne sur une plaque d'agitation magnétique.
2. De façon générale, éviter d'agiter la poche d'enrichissement et de prélever de gros fragments d'aliments. Pour les échantillons alimentaires présentant une couche grasse surnageante, prélever juste en dessous de cette couche.
3. Ouvrir les tubes et les puits avec précaution pour éviter les risques de contamination croisée.
4. Refroidir la plaque Deep Well avant de pipetter directement à travers le film préperforé.
5. Utiliser le barreau magnétique afin de maintenir le réactif de lyse en suspension. Pipetter en mélangeant à vitesse moyenne.
6. Dans un premier temps, agiter délicatement le réactif de lyse à la main pour remettre la résine en suspension. Garder le réactif de lyse en suspension pendant le pipettage en mélangeant à vitesse moyenne avec le barreau magnétique dans le flacon.

Protocole Easy I

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

6. Vortexer les tubes à grande vitesse et centrifuger à 10 000–12 000 x g pendant 2 min au moins. La centrifugation est inutile pour la plaque Deep Well.

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

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

D. PCR en temps réel

Configuration de l'instrument et du logiciel

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

Préparation du mélange de PCR

1. Préparer le mélange de PCR contenant la solution d'amplification (réactif C) et les sondes fluorescentes (réactif B). Le volume de mélange de PCR nécessaire dépend du nombre d'échantillons et de contrôles à analyser. Au moins un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque PCR. Utiliser le tableau de pipetage de l'annexe (Guide de calcul du mélange de PCR) pour trouver les volumes corrects pour chaque réactif.

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

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

Lancement de la PCR

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

E. Analyse des données

Les données peuvent être analysées directement à la fin de la PCR ou ultérieurement en ouvrant le fichier de données enregistré. Suivre les instructions du manuel d'utilisation CFX Manager IDE correspondant pour ouvrir les fichiers de données et régler les paramètres d'analyse des données.

Interprétation des résultats

Une fois que les paramètres d'analyse des données ont été définis, les résultats sont interprétés en analysant les valeurs C_q 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.

Section 7 Protocole

Contrôles

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

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

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

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

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

Échantillons

Un échantillon est considéré positif pour *Campylobacter* lorsqu'il présente 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, l'échantillon peut être considéré comme positif pour la présence de *Campylobacter*.

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

- Si aucune valeur Cq n'est obtenue pour FAM et si le contrôle interne présente une valeur $Cq \geq 28$, l'échantillon est considéré négatif pour *Campylobacter*.
- Un contrôle interne qui n'a pas non plus de valeur Cq ($Cq = N/A$) indique probablement un phénomène d'inhibition de la réaction de PCR. Diluer l'échantillon (réaliser une dilution à 1:10 dans de l'eau distillée stérile avec 10 µl d'extrait d'ADN), utiliser 5 µl de la dilution pour l'amplification, et répéter le test de PCR.
- Si la valeur Cq pour le contrôle interne est < 28 , il n'est pas possible d'interpréter le résultat. Vérifier que le seuil a été placé correctement et que la courbe de données brutes est une courbe d'amplification normale. Si la courbe n'a pas de forme caractéristique, répéter le test de PCR.

L'interprétation des résultats de l'échantillon est résumée dans le tableau suivant :

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

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

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

Section 8

Confirmation des résultats positifs

Un résultat iQ-Check *Campylobacter* positif est supposé être positif et une confirmation selon une méthode de référence appropriée est recommandée. Il est également possible d'utiliser le milieu chromogène RAPID' *Campylobacter*.

Section 9

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

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

1. Choisir une colonie isolée sur un milieu de culture gélosé sélectif ou non sélectif, avec un cure-dent, une anse stérile ou un autre consommable adapté (par exemple, un embout de pipette).
2. Remettre en suspension la colonie dans 100 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 Section 7 Protocole, D. PCR en temps réel) et suivre le reste du protocole iQ-Check *Campylobacter* pour l'interprétation des données et du résultat. L'extraction d'ADN n'est pas nécessaire.

Section 10 Performance du test et validation



Validation AOAC

Le kit iQ-Check *Campylobacter* est validé par AOAC Research Institute dans le cadre du programme « Performance Tested Methods » pour la détection de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* dans les éléments suivants : poulet haché cru, rinçages de carcasse de poulet et éponges d'échantillonnage de dinde. Il convient de considérer un résultat positif avec iQ-Check comme étant présumé et il est recommandé de le confirmer grâce aux méthodes de référence normalisées (voir Section 8). Numéro de certificat : 031209

Section 11 Références

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

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2016). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 41.04. Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples

Section 12 Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Août 2020	10000131520 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Nouvelle conception de document et mise à jour du contenu- Modification du numéro de document (version précédente 881039 REV G)

Annexe — Guide de calcul du mélange de PCR

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

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

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

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

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

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



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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

10000131520 Ver A US/EG

Sig 0220



iQ-Check *Campylobacter* Kit

Anwenderhandbuch

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

Katalog-Nr. 3578135



Inhaltsverzeichnis

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

Abschnitt 1 Einleitung

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

Abschnitt 2 Die iQ-Check *Campylobacter*-Technologie

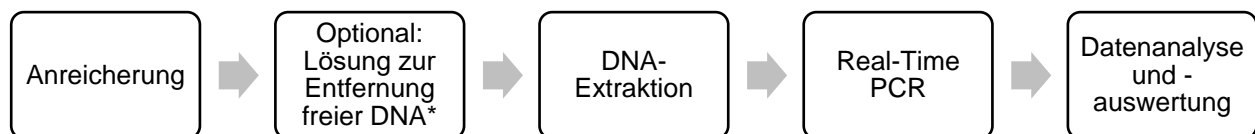
Das iQ-Check *Campylobacter* Kit ist ein Test, der auf der Amplifizierung und dem Nachweis von Genen mittels Real-Time PCR beruht. Die gebrauchsfertigen PCR-Reagenzien im Kit enthalten Oligonukleotide (Primer und Sonden), die für *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* spezifisch sind, sowie DNA-Polymerase und Nukleotide. Der Nachweis und die Datenanalyse sind für die Verwendung eines Real-Time PCR-Gerätes von Bio-Rad, z. B. des CFX96 Touch Deep Well Systems, optimiert.

Die PCR ist eine leistungsstarke Technik, mit der viele Kopien der Ziel-DNA erzeugt werden können. Während der PCR-Reaktion wird die DNA während mehrerer Zyklen des Erhitzens und Abkühlens denaturiert. Danach binden Primer an die Zielregion. Die DNA-Polymerase verwendet diese Primer und die Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) zur Verlängerung der DNA, wodurch Kopien der Ziel-DNA erzeugt werden. Diese Kopien werden als Amplikons bezeichnet.

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

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

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



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

Abschnitt 3

Zusammensetzung des Kits

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

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

Abschnitt 4

Haltbarkeit und Lagerung

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

Abschnitt 5

Zusätzlich benötigtes Material

Geräte

- Labor-Paddel-Blender zum Homogenisieren von Testproben
- Inkubator zur mikrobiologischen Anreicherung der Proben
- Speziell für die Extraktion in sterilen konischen 1,5 ml Röhrchen mit Schraubdeckel
 - Tischzentrifuge 10.000 – 12.000 x g
 - Heitzrockenblock mit 37 ± 2°C und/oder 95 – 100°C
- Speziell für die Extraktion in einer Deep Well-Platte
 - Thermoshaker mit Heizfunktion*, der eine Temperatur von 37 ± 2°C und/oder 95 – 100°C aufrecht erhalten kann, mit einer Mischgeschwindigkeit von mindestens 1.300 rpm
- Vortex
- Mikropipetten für 20 µl, 200 µl, 1.000 µl
- Real-Time PCR System von Bio-Rad*; z. B. das CFX96 Touch Deep Well System (Katalog-Nr. 3600037)
- iQ-Check Prep System von Bio-Rad für die automatisierte DNA-Extraktion und PCR-Plattenvorbereitung (Katalog-Nr. 3594911)

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

Abschnitt 5 Zusätzlich benötigtes Material

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

Zubehör

- Anreicherungsmedium: Bolton-Nährbouillon, mit Supplementen oder doppelt konzentriert, ohne Blut
- Anreicherungsmedium: gepuffertes Peptonwasser (z. B. BPW Plus Katalog-Nr. 3564684, dehydriert, 500 g; 3554179, 6 Flaschen x 225 ml; 3555790, 2 Beutel x 5 L; 3555795, 4 Beutel x 3 L. BPW Standard (Katalog-Nr. 12013259, dehydriert, 500 g; 12013258 dehydriert, 5 kg; 12013260 2 Beutel x 5 L)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (Lösung zur Entfernung von freier DNA, Katalog-Nr. 3594970)
- iQ-Check Reinigungsreagenz (Katalog-Nr. 12012383)
- RAPID'*Campylobacter* Agar (Katalog-Nr. 12012036, 20 Agarplatten x 90 mm; 3564295, dehydriertes Basismaterial, 500 g; 3564296, Supplement, 10 Fläschchen)
- Speziell für die Untersuchung von Umgebungsproben
 - Schwämme zur Gewinnung von Umweltproben
 - Neutralisierungsmedium für Probennahme-Schwämme, z. B. Dey-Engley (D/E) oder HiCap Neutralizing Broth oder Letheen Broth
- Speziell für die Extraktion in Röhrcchen
 - Konische, sterile 1,5 ml Röhrcchen mit Schraubdeckel (z. B. Katalog-Nr. 2240110XTU)
- Speziell für die Extraktion in einer Deep Well-Platte
 - Deep Well Platte mit 96 Wells (iQ-Check Deep Well Microplates, Katalog-Nr. 3594900)
 - Abdichtungsfolie aus Kunststoff (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, Katalog-Nr. 3590139)
 - Vorgestanzte Abdichtungsfolie (X-Pierce Films, Katalog-Nr. 3593977 oder Pre-Pierced Plate Sealing Film, Katalog-Nr. 3600040, nur in Nordamerika)
- Speziell für das iQ-Check Prep System
 - 60 ml Verdünnungsbehältnis (Katalog-Nr. 3594904)
 - Filterspitzen (Katalog-Nr. 3594902, 5.760 x 50 µl; 3594903, 3.840 x 1.000 µl)
 - PCR-Mix-Röhrcchen (Katalog-Nr. 3594901, 50 x 5 ml)
- PCR-Platten, -Röhrcchen, -Abdichtungsfolie und -Deckel
- Sterile Filterspitzen für 20 µl, 200 µl und 1.000 µl Mikropipetten
- Sterile, einzeln verpackte Spitzen für Combitip-Pipetten oder äquivalente Multipipetten
- Sterile 5 ml Teströhrcchen
- Ungepuderte Handschuhe
- Destilliertes steriles Wasser
- 5%ige Bleichlösung
- Reinigungsmittel wie DNA AWAY oder RNase AWAY

Abschnitt 6

Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse

- Dieser Test muss von geschultem Personal durchgeführt werden.
- Proben und Anreicherungskulturen sind bei der Handhabung als potenziell infektiös zu betrachten und im Einklang mit vor Ort geltenden Verordnungen und Bestimmungen zu entsorgen.
- Alle potenziell infektiösen Materialien sollten vor dem Entsorgen autoklaviert werden.
- Die Ergebnisqualität hängt von der strikten Einhaltung der guten Laborpraxis ab (zum Beispiel der Norm EN ISO 7218). In Bezug auf die PCR ist vor allem Folgendes zu beachten:
 - Laborgeräte (Pipetten, Röhrchen usw.) nie von einem Arbeitsplatz zu einem anderen bringen.
 - Bei jeder Serie von Amplifikationsreaktionen eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle verwenden.
 - Die Reagenzien nach Ablauf ihres Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
 - Die Reagenzien aus dem Kit vor dem Gebrauch auf dem Vortex mischen, um ihre Homogenität sicherzustellen.
 - Regelmäßig die Genauigkeit und Präzision der Pipetten sowie die ordnungsgemäße Funktion der Geräte überprüfen.
 - Handschuhe häufig wechseln, vor allem dann, wenn vermutet wird, dass sie kontaminiert sein könnten.
 - Die Arbeitsplätze regelmäßig mit 5%iger Bleichlösung und anderen Dekontaminationsmitteln, z. B. DNA AWAY, reinigen.
 - Ungepuderte Handschuhe verwenden, und Fingerabdrücke und Beschriftungen auf Röhrchendeckeln vermeiden, da dies die Datenerfassung beeinträchtigen würde.
- Es wird dringend empfohlen, die in der Norm EN ISO 22174:2005 „Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln - Allgemeine Anforderungen und Begriffe“ beschriebenen Anforderungen einzuhalten.
- iQ-Check *Campylobacter* Kit
 - Alle Substanzen oder Mischungen in dem Testkit sind klassifizierte Produkte gemäß dem globalen vereinheitlichten System (Global Harmonized System, GHS). Der Kontakt mit Säuren kann zur Freisetzung giftiger Gase führen. Bei korrekter Anwendung sind keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen erforderlich. Bei Einatmen des Produkts Frischluft zuführen und bei Beschwerden einen Arzt hinzuziehen. Nach Augenkontakt mit dem Produkt das geöffnete Auge mehrere Minuten unter fließendem Wasser ausspülen. Wenn die Produkte verschluckt werden, Erbrechen herbeiführen und ärztliche Hilfe anfordern.
- iQ-Check Prep System
 - Die unsachgemäße Verwendung des iQ-Check Prep Systems kann zu Personenverletzungen oder Schäden am Gerät führen. Einige Komponenten können bei

unsachgemäßer Handhabung aufgrund übermäßiger Hitze zu Personenverletzungen führen. Zur sicheren Verwendung darf das iQ-Check Prep System nur von qualifiziertem Laborpersonal verwendet werden, das entsprechend geschult wurde. Die Instrumente dürfen nur von Kundendiensttechnikern im Außendienst gewartet werden.

- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Nachweissystem
 - Die unsachgemäße Verwendung des CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Nachweissystems kann zu Personenverletzungen oder Schäden am Gerät führen. Einige Komponenten können bei unsachgemäßer Handhabung aufgrund übermäßiger Hitze zu Personenverletzungen führen. Für eine sichere Nutzung darf das CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Nachweissystem nur von qualifiziertem Laborpersonal bedient werden, das entsprechend geschult wurde. Das Instrument darf nur von Kundendiensttechnikern von Bio-Rad im Außendienst gewartet werden.
- Anreicherung
 - Der Benutzer sollte alle Sicherheitsinformationen in der Anweisung des iQ-Check *Campylobacter* Kits lesen, verstanden haben und beachten. Die Sicherheitshinweise zum späteren Nachschlagen aufbewahren. Um die mit der Exposition gegenüber Chemikalien und biologischen Gefahren verbundenen Risiken zu verringern, sind Pathogentests in einem ordnungsgemäß ausgestatteten Labor unter der Kontrolle von geschultem Personal durchzuführen. Beim Umgang mit Reagenzien und kontaminierten Proben sind stets die üblichen Laborsicherheitspraktiken einzuhalten, beispielsweise sind geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille zu tragen. Den Kontakt mit dem Inhalt des Anreicherungsmediums und der Reagenzröhrchen nach der Anreicherung vermeiden. Angereicherte Proben im Einklang mit den aktuellen Branchenstandards entsorgen.
 - *Campylobacter* ist ein Organismus der Biosicherheitsstufe 2. Biologische Proben, z. B. Anreicherungen, können Infektionskrankheiten übertragen. Es sind alle geltenden lokalen, staatlichen/regionalen und/oder nationalen Vorschriften zur Entsorgung von biologischen Abfällen einzuhalten. Geeignete Schutzausrüstung tragen, einschließlich unter anderem Schutzbrille, Gesichtsschutz, Kleidung/Laborkittel und Handschuhe. Alle Arbeiten sollten in ordnungsgemäß ausgestatteten Einrichtungen unter Verwendung der entsprechenden Sicherheitsausrüstung (z. B. physikalische Eindämmungsvorrichtungen) durchgeführt werden. Personen sollten im Einklang mit den geltenden behördlichen Vorschriften und den Anforderungen des Unternehmens/der Einrichtung geschult werden, bevor sie mit potenziell infektiösen Materialien arbeiten.
 - Nach Abschluss der Tests sind alle Materialien und Medien, die möglicherweise Krankheitserreger enthalten, im Einklang mit den geltenden Branchenstandards für die Entsorgung kontaminierter Abfälle zu dekontaminieren (d. h. 20 min bei 120°C autoklavieren). Weitere Informationen und vor Ort geltende Entsorgungsvorschriften sind im Sicherheitsdatenblatt aufgeführt.

Abschnitt 7 Protokoll

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

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

mfang (Matrizes)	Anreicherung	DNA-Extraktion		Zertifizierungsstelle
		Methode	Format	
Rohes Hühnerhackfleisch	Bolton-Nährbouillon mit Supplement 4 hr bei 37 ± 1°C 20 hr bei 41,5 ± 1°C Mikroaerobe Bedingungen	Easy I	Röhrchen/Deep Well	AOAC PTM
Schlachtkörper-Abspülflüssigkeit	2x BF-BEB 24 hr bei 42 ± 1°C Mikroaerobe Bedingungen	Easy I	Röhrchen/Deep Well	AOAC PTM
Schwamm mit Schlachtkörperflüssigkeit	2x BF-BEB 24 hr bei 42 ± 1°C Mikroaerobe Bedingungen	Easy I	Röhrchen/Deep Well	AOAC PTM
Kot	Bolton-Nährbouillon mit Supplement Direktnachweis	Easy I	Röhrchen/Deep Well	N/A
Lebensmittelproben	Bolton-Nährbouillon mit Supplement 4 hr bei 37 ± 1°C 20 hr bei 41,5 ± 1°C Mikroaerobe Bedingungen	Easy I	Röhrchen/Deep Well	N/A

A. Probenanreicherung

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

Lebensmittelproben

1. n g der Probe in $9 \times n$ ml vorgewärmter Bolton-Nährbouillon mit Supplement (z. B. 25 g in 225 ml) in einem Stomacherbeutel mit integriertem Filter homogenisieren.
2. 4 hr bei 37 ± 1°C unter mikroaeroben Bedingungen ohne Schütteln inkubieren und dann weitere 20 hr unter mikroaeroben Bedingungen bei 41,5 ± 1°C inkubieren.
3. Das DNA-Extraktionsprotokoll Easy I befolgen.

Proben aus Schlachtkörper-Abspülflüssigkeit

1. Den Schlachtkörper 1 min in 400 ml gepuffertem Peptonwasser abspülen.
2. 30 ml der Abspülflüssigkeit zu 30 ml doppelt konzentrierter blutfreier Bolton-Anreicherungsbouillon (2x BF-BEB) geben. Vorsichtig mischen.
3. 24 hr bei 42 ± 1°C unter mikroaeroben Bedingungen inkubieren.
4. Das DNA-Extraktionsprotokoll Easy I befolgen.

Schlachtkörper-Abstrichproben

1. Einen Probenschwamm über den Schlachtkörper führen und in 25 ml 2x BF-BEB geben.
2. 30 ml der Flüssigkeit zu 30 ml 2x BF-BEB geben. Vorsichtig mischen.
3. 24 hr bei $42 \pm 1^\circ\text{C}$ unter mikroaeroben Bedingungen inkubieren.
4. Das DNA-Extraktionsprotokoll Easy I befolgen.

Kotproben

1. Eine w/v Kotprobe in Bolton-Nährbouillon mit Supplement (z. B. 10 g in 10 ml) in einem Stomacherbeutel mit integriertem Filter homogenisieren.
2. 10 min bei Raumtemperatur absetzen lassen.
3. Das DNA-Extraktionsprotokoll Easy I befolgen.

B. Behandlung zur Entfernung freier DNA

Die iQ-Check Lösung zur Entfernung freier DNA (Katalog-Nr. 3594970) eignet sich bestens zur Entfernung freier DNA. Es sind die Empfehlungen von Bio-Rad im Anwenderhandbuch zu beachten.

C. DNA-Extraktion

Allgemeine Empfehlungen:

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

Protokoll Easy I

1. 100 μl Lyseagens (Reagenz A) in Röhrchen oder die Wells einer Deep Well-Platte aliquotieren.
2. 100 μl der angereicherten Probe dazugeben.
3. Die Lösung durch Auf- und Abpipettieren mischen, bis sie homogen ist.

4. Die Röhrchen verschließen bzw. die Deep Well Platte mit vorpunktierter Abdichtungsfolie verschließen.
5. Die Röhrchen 10 bis 15 min in den auf 95°C – 100°C vorgeheizten Heizblock stellen bzw. die Deep Well Platte 15 bis 20 min unter Agitation bei 1.300 – 1.600 rpm bei 95°C – 100°C in den Inkubator stellen.
6. Die Röhrchen bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortex mischen und dann 2 min bei 10.000 – 12.000 x g zentrifugieren.
Die Deep Well-Platte braucht nicht zentrifugiert zu werden.

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

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

D. Real-Time PCR

Konfiguration des Gerats und der Software

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

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

2. Aus diesem PCR-Reaktionsgemisch dem jeweils verwendeten Platten-Layout entsprechend 45 µl in jedes Well pipettieren.
3. 5 µl DNA-Extrakt, Reagenz D (Negativkontrolle) oder Reagenz E (Positivkontrolle) zugeben. Die Probe vor dem Pipettieren nicht vortexen. Die Wells der PCR-Platte oder der PCR-R hrchenstreifens 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-R hrchenstreifen zur Beseitigung etwaiger Luftblasen kurz zentrifugiert werden.
4. Die PCR-Platte bzw. die PCR-R hrchenstreifen in den Thermocycler stellen. Auf die korrekte Ausrichtung der Platte achten, d. h. das Well A1 muss sich oben links befinden. Das Reaktionsmodul schließen.

Die PCR durchführen

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

E. Datenanalyse

Die Datenanalyse kann direkt am Ende des PCR-Laufs oder später durch Öffnen der gespeicherten Datendatei durchgeführt werden. Für das Öffnen von Datendateien und die Festlegung der Datenanalyseparameter sind die Anweisungen im Benutzerhandbuch der Software CFX Manager IDE befolgen.

Ergebnisinterpretation

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

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

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.

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

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

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

Proben

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

- Liegt der Cq-Wert für beide Kanäle unter 10, muss in den Rohdaten überprüft werden, ob es sich bei der Kurve um eine normale Amplifikationskurve handelt (d. h. um eine Kurve mit flacher Basislinie, gefolgt von einem raschen exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz und anschließender Abflachung). Wenn die Kurve korrekt aussieht, ist die Probe möglicherweise positiv auf *Campylobacter*. Wenn kein Cq-Wert für FAM vorliegt (Cq = N/A) oder es sich bei der Kurve nicht um eine typische Amplifikationskurve handelt, muss die interne Kontrolle für die entsprechende Probe analysiert werden:
- Wenn kein Cq-Wert für FAM vorliegt und der Cq-Wert für die interne Kontrolle ≥ 28 beträgt, gilt die Probe als negativ auf *Campylobacter*.

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

Die Interpretation der Probenergebnisse ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

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

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

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

Abschnitt 8

Bestätigung positiver Ergebnisse

Ein positives iQ-Check *Campylobacter*-Ergebnis gilt als vermutlich positiv, und es wird die Bestätigung mit einer geeigneten Referenzmethode empfohlen. Es kann auch das chromogene RAPID[®] *Campylobacter* Medium verwendet werden.

Abschnitt 9

Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit

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

1. Mit einem Zahnstocher, einer sterilen Impföse oder einem anderen geeigneten Verbrauchsartikel (z. B. einer Pipettenspitze) eine isolierte Kolonie aus einer Platte mit selektivem oder nichtselektivem Agar aufnehmen.
2. Die Kolonie in 100 µl Tryptonsalz-Medium oder destilliertem, sterilem Wasser in einem Mikrozentrifugenröhrchen resuspendieren. Auf dem Vortex homogenisieren.
3. 5 µl der Suspension zu 45 µl PCR-Reaktionsgemisch geben (siehe Abschnitt 7 Protokoll D. Real-Time PCR), und zur Daten- und Ergebnisinterpretation die übrigen Schritte des iQ-Check *Campylobacter*-Protokolls befolgen. Eine DNA-Extraktion ist nicht erforderlich.

Abschnitt 10 Testleistung und Testvalidierung



AOAC-Validierung

Das iQ-Check *Campylobacter* Kit wurde vom AOAC Research Institute im Rahmen des Performance Tested Method-Programms zum Nachweis von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* in rohem Hühnerhackfleisch, Abspülflüssigkeit von Hühnerschlachtkörpern und Schwämmen mit Abspülflüssigkeit von Truthahnschlachtkörpern validiert. Ein positives Ergebnis mit dem iQ-Check Kit ist als vorläufig positiv zu betrachten und sollte mit Standardreferenzmethoden bestätigt werden (siehe Abschnitt 8).
Zertifikatnummer: 031209

Abschnitt 11 Literatur

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

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2016). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 41.04. Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples

Abschnitt 12 Revisionshistorie

Freigabedatum	Dokumentnummer	Änderung
August 2020	10000131520 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Neues Dokumentdesign und Aktualisierung des Inhalts- Änderung der Dokumentnummer - vorhergehende Version 881039 REV G

Anhang — Pipettiertabelle für das PCR Reaktionsgemisch

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

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

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

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

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

Alle hier genannten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.



**Bio-Rad
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

10000131520 Ver A US/EG

Sig 0220



iQ-Check *Campylobacter* Kit

Manuale utente

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

Catalogo #3578135

BIO-RAD

Indice

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

Sezione 1 Introduzione

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

Sezione 2 La tecnologia iQ-Check *Campylobacter*

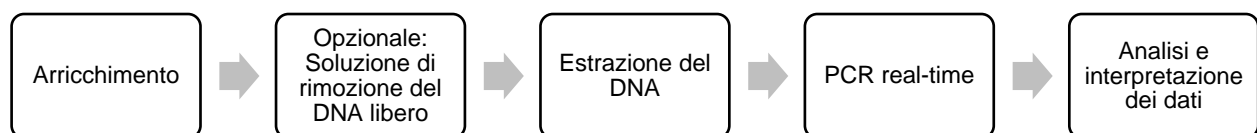
Il kit iQ-Check *Campylobacter* è un test basato sull'amplificazione genica e la rilevazione mediante PCR real-time. I reagenti PCR pronti all'uso inclusi nel kit contengono oligonucleotidi (primer e sonde) specifici per *C. jejuni*, *C. coli*, e *C. lari*, oltre a DNA polimerasi e nucleotidi. La rilevazione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

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

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

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

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



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

Sezione 3

Componenti del kit

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

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

Sezione 4

Durata e conservazione

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

Sezione 5

Materiali necessari ma non forniti

Apparecchiatura

- Omogeneizzatore da laboratorio per i campioni dei test
- Incubatore per l'arricchimento microbiologico dei campioni
- Materiali specifici per l'estrazione in provette da 1,5 ml coniche, sterili e con tappo a vite
 - Centrifuga da banco 10.000-12.000 x g
 - Blocco termico a secco a 37 ± 2°C e/o 95–100°C
- Materiali specifici per l'estrazione in una piastra Deep Well
 - Termoagitatore* in grado di mantenere 37 ± 2°C e/o 95–100°C con una velocità di miscelazione di almeno 1300 rpm
- Vortex
- Micropipette da 20, 200, e 1.000 µl
- Sistema PCR real-time di Bio-Rad*, ad esempio CFX96 Touch Deep Well (catalogo #3600037)
- Sistema Bio-Rad iQ-Check Prep per l'estrazione automatizzata di DNA e la preparazione della piastra PCR (catalogo #3594911)

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

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

Materiali

- Terreno di arricchimento: brodo Bolton, supplementato o a doppia concentrazione senza sangue
- Terreno di arricchimento: acqua peptonata tamponata APT (ad esempio, BPW Plus catalogo #3564684, in forma disidratata, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 flaconi; 3555790, 5 L x 2 sacche; 3555795, 3 L x 4 sacche. BPW Standard catalogo #12013259, in forma disidratata, 500 g; 12013258 in forma disidratata, 5 kg; 12013260 5 L x 2 sacche)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalogo #3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (catalogo #12012383)
- Agar RAPID' *Campylobacter* (catalogo #12012036, 90 mm x 20 piastre; 3564295, base disidratata, 500 g; 3564296, supplemento, 10 fiale)
- Materiali specifici per campioni ambientali
 - Spugne ambientali
 - Brodo neutralizzante per spugne come Dey-Engley (D/E), HiCap Neutralizing Broth, o Lethen Broth
- Materiali specifici per l'estrazione in provette
 - Provette coniche sterili con tappo a vite da 1,5 ml (ad esempio, catalogo #2240110XTU)
- Materiali specifici per l'estrazione in una piastra Deep Well
 - Piastra da 96 pozzetti profondi (iQ-Check Deep Well Microplate, catalogo #3594900)
 - Pellicola sigillante in plastica (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, catalogo #3590139)
 - Pellicola sigillante preforata (X-Pierce Film, catalogo #3593977, o Pre-Pierced Plate Sealing Film, #3600040, solo Nord America)
- Materiali specifici per il sistema iQ-Check Prep
 - Contenitore per la diluizione da 60 ml (catalogo #3594904)
 - Puntali con filtro (catalogo #3594902, 50 µl x 5.760; 3594903, 1.000 µl x 3.840)
 - Provette per miscela di PCR (catalogo #3594901, 5 ml x 50)
- Piastre PCR, provette, nastro sigillante e tappi
- Puntali sterili con filtro adattabili a micropipette da 20, 200 e 1.000 µl
- Puntali per pipette Combitip o pipettatori a ripetizione equivalenti, sterili e confezionati singolarmente
- Provette per test sterili da 5 ml
- Guanti senza polvere
- Acqua distillata sterile
- Candeggina, 5%
- Detergente come DNA AWAY o RNase AWAY

Sezione 6

Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali

- Il presente test deve essere eseguito da personale addestrato
- I campioni e le colture di arricchimento devono essere manipolati come materiali potenzialmente infetti ed eliminati nel rispetto delle direttive e normative locali
- Tutti i materiali potenzialmente infetti devono essere collocati in autoclave prima dello smaltimento
- La qualità dei risultati si basa sulla rigorosa osservanza delle buone pratiche di laboratorio (ad esempio, la norma EN ISO 7218), soprattutto in materia di PCR:
 - Non spostare mai apparecchiature da laboratorio (pipette, provette, ecc.) da una postazione di lavoro all'altra.
 - Utilizzare sempre un controllo positivo e un controllo negativo per ogni serie di reazioni di amplificazione
 - Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza
 - Per garantirne l'omogeneità, miscelare i reagenti nel vortex prima di utilizzarli
 - Verificare periodicamente l'accuratezza e la precisione delle pipette, nonché il corretto funzionamento degli strumenti
 - Cambiare i guanti di frequente, in particolare se si sospetta la presenza di contaminazione
 - Pulire gli spazi di lavoro periodicamente con candeggina al 5% e altri prodotti disinfettanti come DNA AWAY
 - Utilizzare guanti senza polvere e non lasciare impronte digitali e scritte sui tappi delle provette. Entrambi interferiscono con l'acquisizione dei dati
- Si consiglia vivamente di osservare i requisiti generali illustrati nella norma EN ISO 22174:2005 (Microbiologia di alimenti e mangimi per animali — Reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca dei microrganismi patogeni degli alimenti — Requisiti generali e definizioni)
- Kit iQ-Check *Campylobacter*
 - Tutte le sostanze o miscele contenute nel kit per il test sono classificate come prodotti in conformità al sistema mondiale armonizzato (GHS). Il contatto con acidi potrebbe causare il rilascio di gas tossici. Se utilizzato correttamente, non sono necessarie precauzioni particolari. In caso di inalazione del prodotto, spostarsi in una zona ben areata e rivolgersi a un medico in caso di disturbi. Se il prodotto viene a contatto con gli occhi, sciacquarli mantenendoli aperti sotto l'acqua corrente per diversi minuti. In caso di ingestione del prodotto, indurre il vomito e contattare un medico
- Sistema iQ-Check Prep
 - L'utilizzo improprio del sistema iQ-Check Prep potrebbe causare lesioni personali o danni allo strumento. Se manipolati in modo improprio, alcuni componenti potrebbero presentare un rischio di lesioni personali dovuto al calore eccessivo. Per garantire sicurezza, il sistema iQ-

Check Prep deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato e opportunamente addestrato. La manutenzione dello strumento deve essere eseguita esclusivamente da tecnici Bio-Rad

- Sistema di rilevazione mediante PCR real-time CFX96 Touch Deep Well
 - L'utilizzo improprio del sistema di rilevazione mediante PCR real-time CFX96 Touch Deep Well potrebbe causare lesioni personali o danni allo strumento. Se manipolati in modo improprio, alcuni componenti potrebbero presentare un rischio di lesioni personali dovuto al calore eccessivo. Per garantire sicurezza, il sistema di rilevazione mediante PCR real-time CFX96 Touch Deep Well deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato e opportunamente addestrato. La manutenzione dello strumento deve essere eseguita esclusivamente da tecnici Bio-Rad

- Arricchimento
 - L'utente è tenuto a leggere, comprendere e osservare le informazioni relative alla sicurezza contenute nelle istruzioni del kit iQ-Check *Campylobacter*. Conservare le istruzioni di sicurezza per consultazioni future. Al fine di ridurre i rischi biologici e legati all'esposizione a sostanze chimiche, eseguire i test degli agenti patogeni in un laboratorio adeguatamente attrezzato sotto la supervisione di personale addestrato. Seguire sempre le pratiche di laboratorio standard sulla sicurezza, indossando ad esempio indumenti protettivi e una protezione per gli occhi durante la manipolazione di reagenti e campioni contaminati. Evitare il contatto con il contenuto dei terreni di arricchimento e delle provette di reagenti al termine dell'amplificazione. Smaltire i campioni arricchiti in conformità alle norme di settore vigenti

 - *Campylobacter* è un organismo che richiede il livello di biosicurezza 2. I campioni biologici come gli arricchimenti sono in grado di trasmettere malattie infettive. Osservare ogni normativa locale, statale/provinciale e/o nazionale applicabile in materia di smaltimento di rifiuti biologici. Indossare i dispositivi di protezione individuale, inclusi, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, protezioni per gli occhi, schermi per il viso, camici da laboratorio e guanti. Il lavoro deve essere svolto presso strutture adeguatamente attrezzate e utilizzando i dispositivi di sicurezza opportuni (ad esempio, quelli per il contenimento fisico). Prima di operare con materiali potenzialmente infetti, gli addetti devono essere addestrati in conformità ai requisiti normativi aziendali/dell'ente applicabili

 - Al termine del test, tutti i materiali e i terreni che potrebbero contenere agenti patogeni devono essere decontaminati in linea con le attuali norme industriali in materia di smaltimento dei rifiuti contaminati (ovvero, collocarli in autoclave per 20 min a 120°C). Per maggiori informazioni relative alle normative locali in materia di smaltimento, consultare la scheda di sicurezza

Sezione 7 Protocollo

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

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

Oggetto (matrici)	Arricchimento	Estrazione del DNA		Certificazione
		Metodo	Formato	
Pollo macinato crudo	Brodo Bolton suppl. 4 hr a 37 ± 1°C 20 hr a 41,5 ± 1°C Condizioni microaerobiche	Easy I	Provetta/Deep Well	AOAC PTM
Risciacquo della carcassa	2x BF-BEB 24 hr a 42 ± 1°C Condizioni microaerobiche	Easy I	Provetta/Deep Well	AOAC PTM
Spugna per il campionamento della carcassa	2x BF-BEB 24 hr a 42 ± 1°C Condizioni microaerobiche	Easy I	Provetta/Deep Well	AOAC PTM
Feci	Brodo Bolton suppl. Rilevazione diretta	Easy I	Provetta/Deep Well	N/A
Campioni alimentari	Brodo Bolton suppl. 4 hr a 37 ± 1°C 20 hr a 41,5 ± 1°C Condizioni microaerobiche	Easy I	Provetta/Deep Well	N/A

A. Arricchimento del campione

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

Campioni alimentari

1. Omogeneizzare n g di campione in $9 \times n$ ml (ad esempio, 25 g in 225 ml) di brodo Bolton supplementato in un sacco Stomacher con filtro incorporato.
2. Incubare per 4 hr a 37 ± 1°C in condizioni microaerobiche senza agitare, e passare successivamente a 41,5 ± 1°C per altre 20 hr in condizioni microaerobiche.
3. Seguire il protocollo Easy I per l'estrazione del DNA.

Campioni del risciacquo della carcassa

1. Sciacquare la carcassa in 400 ml di acqua peptonata tamponata per 1 min.
2. Aggiungere 30 ml ai 30 ml di brodo di arricchimento Bolton a doppia concentrazione senza sangue (2x BF-BEB). Miscelare delicatamente.
3. Incubare per 24 hr a 42 ± 1°C in condizioni microaerobiche.
4. Seguire il protocollo Easy I per l'estrazione del DNA.

Campioni di tamponi della carcassa

1. Dopo aver effettuato la spugnatura per il campionamento della carcassa, aggiungere 25 ml di 2x BF-BEB.
2. Aggiungere 30 ml di risciacquo ai 30 ml di 2x BF-BEB. Miscelare delicatamente.
3. Incubare per 24 hr a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ in condizioni microaerobiche.
4. Seguire il protocollo Easy I per l'estrazione del DNA.

Campioni di feci

1. Omogeneizzare un campione di feci p/v nel brodo Bolton supplementato (ad esempio, 10 g in 10 ml) in un sacco Stomacher con filtro incorporato.
2. Lasciar decantare a temperatura ambiente per 10 min.
3. Seguire il protocollo Easy I per l'estrazione del DNA.

B. Trattamento per la rimozione del DNA libero

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

C. Estrazione del DNA

Raccomandazioni generali:

1. Prima di iniziare il test, accendere il blocco termico o il thermoshaker con la funzione di preriscaldamento. Impostare a $95-100^\circ\text{C}$. Durante il pipettaggio, mantenere in sospensione il reagente di lisi agitando a media velocità su una piastra di agitazione magnetica.
2. Di norma, evitare l'agitazione del sacco di arricchimento e la raccolta di grossi frammenti di residui alimentari. Per i campioni alimentari aventi un surnatante grasso, raccogliere il campione appena al di sotto di questo strato.
3. Aprire le provette e i pozzetti con attenzione per evitare eventuali contaminazioni crociate.
4. Raffreddare la piastra Deep Well prima di pipettare direttamente nella pellicola sigillante preforata.

Utilizzare la barra magnetica per mantenere in sospensione il reagente di lisi.

5. Per risospendere la resina, per prima cosa agitare delicatamente a mano il reagente di lisi. Al fine di mantenerlo in sospensione, pipettare mentre è in atto un'agitazione a media velocità mediante la barra magnetica contenuta nel flacone.

Protocollo Easy I

1. Aliquotare 100 μl di reagente di lisi (reagente A) nelle provette o nei pozzetti di una piastra a pozzetti profondi.
2. Aggiungere 100 μl di campione arricchito.
3. Miscelare la soluzione pipettando in alto e in basso fino a che non si completa l'omogeneizzazione.
4. Chiudere le provette o sigillare la piastra a pozzetti profondi con la pellicola sigillante preforata.

5. Incubare le provette nel blocco termico a 95-100°C per 10–15 min. Collocare nell'incubatore la piastra a pozzetti profondi con agitazione a 1300-1600 rpm a 95-100°C per 15–20 min.
6. Miscelare la provetta nel vortex ad alta velocità e centrifugare a 10.000-12.000 x g per almeno 2 min. La centrifugazione non è necessaria per la piastra a pozzetti profondi.

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

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

D. PCR real-time

Installazione strumento e software

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

Preparazione della miscela di PCR

1. Preparare la miscela di PCR contenente la soluzione di amplificazione (reagente C) e le sonde fluorescenti (reagente B). Il volume della miscela di PCR necessario dipende dal numero di campioni e controlli da analizzare. In ogni ciclo PCR devono essere inclusi almeno un controllo positivo e un controllo negativo. Utilizzare la tabella relativa al pipettaggio riportata nell'Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR per verificare i corretti volumi da impiegare per ogni reagente.

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

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

Eeguire la PCR

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

E. Analisi dei dati

È possibile analizzare i dati direttamente al termine del ciclo PCR o in un secondo momento tramite l'apertura del file di dati memorizzato. Per aprire i file di dati e impostare i parametri dell'analisi, seguire le istruzioni contenute nel manuale d'uso del software CFX Manager IDE.

Interpretazione dei risultati

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

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

Controlli

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

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

	Rilevazione di <i>Campylobacter</i> (FAM)	Rilevazione controllo interno (canale HEX)
Controllo negativo	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Controllo positivo	$26 \leq Cq \leq 36$	Non significativo

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

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

Campioni

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

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

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

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

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

Rilevazione di <i>Campylobacter</i> (canale FAM)	Rilevazione controllo interno (canale HEX)	Interpretazione
Cq ≥ 10	Non significativo	Positivo
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Inibizione*

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

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

Sezione 8

Conferma dei risultati positivi

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

Sezione 9

Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check

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

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

Sezione 10 Prestazioni del test e validazione



Validazione AOAC

Il kit iQ-Check *Campylobacter* è stato validato dall'AOAC Research Institute nell'ambito del programma Performance Tested Methods per la rilevazione di *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* nel pollo macinato crudo, nei risciacqui delle carcasse di pollo e nelle spugne per il campionamento di carcasse di tacchino. Un risultato positivo con iQ-Check deve essere considerato come presunto, si raccomanda pertanto di effettuare la conferma tramite metodi standard di riferimento (vedere Sezione 8). Numero di certificato: 031209

Sezione 11 Riferimenti

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

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2016). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 41.04. Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples

Sezione 12 Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero di documento	Modifica
Agosto 2020	10000131520 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Nuova struttura del documento e aggiornamento del contenuto- Modifica al numero di documento – versione precedente 881039 REV G

Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR

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

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

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

Bio-Rad è un marchio registrato di Bio-Rad Laboratories, Inc.
IQ-CHECK è un marchio registrato di Bio-Rad Europe, GmbH in alcune giurisdizioni
Tutti i marchi registrati qui utilizzati sono di proprietà dei rispettivi titolari.



Bio-Rad
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

10000131520 Ver A US/EG

Sig 0220



iQ-Check *Campylobacter* Kit

Guia do usuário

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

Nº do catálogo 3578135

BIO-RAD

Índice

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

Seção 1 Introdução

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

Seção 2 Tecnologia iQ-Check *Campylobacter*

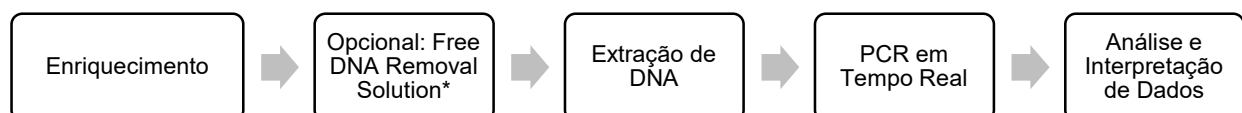
O kit iQ-Check *Campylobacter* é um teste baseado na amplificação e detecção genética através de PCR em tempo real. Os reagentes de PCR prontos para uso do kit contêm oligonucleotídeos (iniciadores e sondas) específicos para *C. jejuni*, *C. coli*, and *C. lari*, bem como DNA polimerase e nucleotídeos.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

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

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

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

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



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

Seção 3

Componentes do Kit

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

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

Seção 4

Prazo de validade e armazenamento

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

Seção 5

Materiais necessários, mas não fornecidos

Equipamento

- Liquidificador de laboratório para homogeneizar amostras de teste
- Incubadora para enriquecimento microbiológico de amostras
- Específico para extração em tubos estéreis de tampa de rosca cônica de 1,5 ml
 - Centrífuga de bancada capaz de 10.000–12.000 x g
 - Bloco para banho seco a 37 ± 2 °C e/ou 95–100°C
- Específico para extração em placa Deep Well
 - Termocortador de aquecimento* capaz de manter 37 ± 2 °C e/ou 95–100 °C, com uma velocidade de mistura de pelo menos 1.300 rpm
- Vortexer
- Micropipetas de 20, 200 e 1.000 µl
- Sistema de PCR em tempo real da Bio-Rad*, por exemplo, CFX96 Touch Deep Well System (número do catálogo 3600037)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System para extração automatizada de DNA e configuração de placas de PCR (nº do catálogo 3594911)

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

Seção 5 Materiais necessários, mas não fornecidos

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

Suprimentos

- Meio de enriquecimento: Caldo Bolton sem sangue, concentração dupla ou suplementado
- Meio de enriquecimento: água peptonada tamponada (por exemplo, BPW Plus nº do catálogo 3564684, desidratado, 500 g, 3554179, 6 frascos de 225 ml, 3555790, 2 sacos de 5 L, 3555795, 4 sacos de 3 L. BPW Standard, nº do catálogo 12013259, desidratado, 500 g, 12013258 desidratado, 5 kg, 12013260 5 L x 2 sacos)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (nº do catálogo 3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (nº do catálogo 12012383)
- RAPID[®] *Campylobacter* Agar (12012036, 90 mm x 20 placas, 3564295, base desidratada, 500 g, 3564296, suplemento, 10 ampolas)
- Específico para amostras ambientais
 - Esponjas ambientais
 - Caldo neutralizante para esponjas, como Dey-Engley (D/E) ou HiCap Neutralizing Broth ou 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 3600040, apenas América do Norte)
- Específico para o sistema iQ-Check Prep System
 - Recipiente de diluição de 60 ml (nº do catálogo 3594904)
 - Pontas de filtro (nº do catálogo 3594902, 50 µl x 5.760, 3594903, 1.000 µl x 3.840)
 - Tubos de mistura de PCR (nº do catálogo 3594901, 5 ml x 50)
- Placas de PCR, tubos, fitas e tampas de vedação
- Pontas de filtro estéreis adaptáveis a micropipetas de 20, 200 e 1.000 µl
- Pontas para Pipetas Combitip ou pipetadores de repetição equivalentes, estéreis, embalados individualmente
- Tubos de ensaio estéreis de 5 ml
- Luvas sem talco
- Água estéril destilada
- Alvejante, 5%
- Agente de limpeza, como o DNA AWAY ou o RNase AWAY

Seção 6

Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados

- Este teste deve ser realizado por pessoal treinado
- Amostras e culturas de enriquecimento devem ser manuseadas como material potencialmente infeccioso e descartadas de acordo com as regras e regulamentos locais
- Todos os materiais potencialmente infecciosos devem passar por autoclavagem antes do descarte
- A qualidade dos resultados depende do estrito cumprimento das Boas Práticas de Laboratório (por exemplo, a norma EN ISO 7218), especialmente em relação à PCR:
 - Nunca circule equipamentos de laboratório (pipetas, tubos etc.) de uma estação de trabalho para outra
 - Sempre use um controle positivo e um controle negativo para cada série de reações de amplificação
 - Não utilize reagentes após a expiração de suas datas de validade
 - Agite os reagentes do kit antes de utilizá-los, de modo a garantir a homogeneidade
 - Verifique periodicamente a exatidão e precisão das pipetas, bem como o correto funcionamento dos instrumentos
 - Troque frequentemente de luvas, especialmente se suspeitar que estão contaminadas
 - Limpe os espaços de trabalho periodicamente com alvejante a 5% e outros agentes descontaminantes, como o DNA AWAY
 - Utilize luvas sem talco e evite escrever ou deixar impressões digitais nas tampas dos tubos. Ambos interferem com a aquisição de dados
- Recomenda-se fortemente o cumprimento dos requisitos gerais descritos na norma EN ISO 22174:2005 “Microbiologia de alimentos para consumo humano e para alimentação animal – reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de patógenos alimentares – Requisitos e definições gerais” (Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food pathogens – General requirements and definitions.)
- Kit iQ-Check *Campylobacter*
 - Todas as substâncias ou misturas no kit de teste são produtos classificados, de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado (GHS). O contato com ácidos pode causar a liberação de gases tóxicos. Nenhuma precaução especial é necessária, se usado corretamente. Se o produto for inalado, forneça ar fresco e consulte um médico em caso de queixas. Após o contato dos olhos com o produto, enxágue os olhos abertos por vários minutos em água corrente. Se os produtos forem ingeridos, provoque vômito e procure ajuda médica
- Sistema iQ-Check Prep System
 - O uso inadequado do sistema iQ-Check Prep System pode causar ferimentos ou danos ao instrumento. Alguns componentes podem representar um risco de ferimentos pessoais

Seção 7 Protocolo

devido ao calor excessivo, se manuseados incorretamente. Para uso seguro, o sistema iQ-Check Prep System deve ser operado somente por pessoal qualificado do laboratório que tenha sido treinado adequadamente. A manutenção do instrumento deve ser realizada apenas pelos engenheiros de serviço de campo da Bio-Rad

- Sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well
 - O uso inadequado do Sistema de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well pode causar ferimentos ou danos ao instrumento. Alguns componentes podem representar um risco de ferimentos pessoais devido ao calor excessivo, se manuseados incorretamente. Para uso seguro, o Sistema de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well deve ser operado somente por pessoal qualificado do laboratório que tenha sido treinado adequadamente. A manutenção do instrumento deve ser realizada apenas pelos engenheiros de serviço de campo da Bio-Rad

- Enriquecimento
 - O usuário deve ler, entender e seguir todas as informações de segurança nas instruções do kit iQ-Check *Campylobacter*. Guarde as instruções de segurança para referência futura. Para reduzir os riscos associados à exposição a produtos químicos e riscos biológicos, realize testes de patógenos em um laboratório devidamente equipado, sob o controle de pessoal treinado. Sempre siga as práticas padrão de segurança do laboratório, incluindo o uso de vestuário de proteção e proteção ocular adequados ao manusear reagentes e amostras contaminadas. Evite o contato com o conteúdo do meio de enriquecimento e dos tubos de reagentes após a amplificação. Descarte amostras enriquecidas de acordo com as normas atuais do setor

 - O *Campylobacter* é um organismo de nível 2 de biossegurança. Amostras biológicas, como enriquecimentos, têm o potencial de transmitir doenças infecciosas. Siga todos os regulamentos locais, estaduais/provinciais e/ou nacionais aplicáveis sobre o descarte de resíduos biológicos. Use equipamento de proteção adequado, que inclua, entre outros, óculos de proteção, proteção facial, roupas/jaleco e luvas. Todo o trabalho deve ser realizado em instalações adequadamente equipadas, utilizando o equipamento de segurança apropriado (por exemplo, dispositivos de contenção física). Os indivíduos devem ser treinados de acordo com os requisitos regulamentares e da empresa/instituição aplicáveis antes de trabalhar com materiais potencialmente infecciosos

 - Quando o teste estiver concluído, todos os materiais e meios possivelmente contendo patógenos devem ser descontaminados, seguindo as normas atuais da indústria para o descarte de resíduos contaminados (ou seja, autoclave por 20 min a 120 °C). Consulte a folha de dados de segurança para obter informações adicionais e regulamentos locais para descarte

Seção 7 Protocolo

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

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

Escopo (matrizes)	Enriquecimento	Extração de DNA		Certificação
		Método	Formato	
Frango moído cru	Caldo Bolton Supl. 4 hr em 37 ± 1°C 20 hr em 41,5 ± 1°C Condições microaeróbicas	Easy I	Tubo/Deep Well	AOAC PTM
Enxágue de carcaça	2x BF-BEB 24 hr em 42 ± 1°C Condições microaeróbicas	Easy I	Tubo/Deep Well	AOAC PTM
Esponja de carcaça	2x BF-BEB 24 hr em 42 ± 1°C Condições microaeróbicas	Easy I	Tubo/Deep Well	AOAC PTM
Fezes	Caldo Bolton Supl. Detecção direta	Easy I	Tubo/Deep Well	N/A
Amostras de alimentos	Caldo Bolton Supl. 4 hr em 37 ± 1°C 20 hr em 41,5 ± 1°C Condições microaeróbicas	Easy I	Tubo/Deep Well	N/A

A. Enriquecimento da amostra

O meio de enriquecimento deve estar na temperatura de incubação adequada (ambiente, 37 °C ou 41,5 °C, quando necessário) antes do uso.

Amostras de alimentos

1. Homogeneíze n g de amostra em $9 \times n$ ml (por exemplo, 25 g em 225 ml) de caldo Bolton suplementado em um saco stomacher com filtro incorporado.
2. Incube sem agitação por 4 hr a 37 ± 1 °C em condições microaeróbicas e, em seguida, transfira para 41,5 ± 1 °C por mais 20 hr em condições microaeróbicas.
3. Siga o protocolo de extração de DNA Easy I.

Amostras de enxágue de carcaça

1. Enxágue a carcaça em 400 ml de água peptonada tamponada por 1 min.
2. Adicione 30 ml de enxágue a 30 ml de caldo Bolton de enriquecimento sem sangue e com concentração dupla (2x BF-BEB). Misture delicadamente.
3. Incube por 24 hr em 42 °C ± 1 °C sob condições microaeróbicas.
4. Siga o protocolo de extração de DNA Easy I.

Amostras de esfregaço de carcaça

1. Após esponjar a carcaça, adicione 25 ml de 2X BF-BEB.
2. Adicione 30 ml de enxágue a 30 ml de 2x BF-BEB. Misture delicadamente.

3. Incube por 24 hr em 42 °C ± 1 °C sob condições microaeróbicas.
4. Siga o protocolo de extração de DNA Easy I.

Amostras de fezes

1. Homogeneíze uma amostra p/v de fezes em caldo Bolton suplementado (por exemplo, 10 g em 10 ml) em um saco stomacher com filtro incorporado.
2. Deixe decantar em temperatura ambiente por 10 min.
3. Siga o protocolo de extração de DNA Easy I.

B. Tratamento de remoção de DNA livre

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

C. Extração de DNA

Recomendações gerais:

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

Protocolo Easy I

1. Aliquote 100 µl de reagente de lise (reagente A) para tubos ou poços de uma placa Deep Well.
2. Adicione 100 µl de amostra enriquecida.
3. Misture a solução pipetando para cima e para baixo até homogeneizar.
4. Feche os tubos ou sele a placa Deep Well com filme de vedação pré-perfurado.
5. Incube os tubos no bloco de calor a 95–100 °C por 10–15 minutos. Incube a placa Deep Well na incubadora sob agitação a 1.300–1.600 rpm a 95–100 °C por 15–20 minutos.

6. Agite no vortex os tubos em alta velocidade e em seguida centrifugue a 10.000–12.000 x g por 2 min. A centrifugação não é necessária para a placa Deep Well.

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

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

D. PCR em Tempo Real

Configuração do instrumento e do software

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

Preparação da mistura de PCR

1. Prepare a mistura de PCR contendo a solução de amplificação (reagente C) e as sondas fluorescentes (reagente B). O volume de mistura de PCR necessário depende do número de amostras e controles a serem analisados. Devem ser incluídos pelo menos um controle positivo e um controle negativo em cada execução da PCR. Use a tabela de pipetagem no Apêndice — Guia de cálculo da mistura de PCR para encontrar os volumes corretos a serem usados para cada reagente.

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

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

Execute a PCR

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

E. Análise de dados

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

Interpretação de resultados

Seção 7 ProtocoloProtocolo

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

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

Controles

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

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

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

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

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

Amostras

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

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

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

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

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

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

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

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

Seção 8 Confirmação de Resultados Positivos

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

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

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

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

Seção 10

Desempenho e Validação do Teste



Validação AOAC

O kit iQ-Check *Campylobacter* foi validado pelo AOAC Research Institute no âmbito do Performance Tested Method Program para detecção de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* de frango moído cru, enxágue de carcaça de frango e esponjas de peru. Um resultado positivo com o iQ-Check deve ser considerado presumido e é recomendável que seja confirmado por métodos de referência padrão (consulte a Seção 8). Número do certificado: 031209

Seção 11

Referências

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

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2016). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 41.04. Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coliformari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples

Seção 12

Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Agosto de 2020	10000131520 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Novo design de documento e atualização de conteúdo- Alteração do número do documento - versão anterior 881039 REV G

Apêndice - Guia de Cálculo da Mistura de PCR

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

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

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

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

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

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



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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

10000131520 Ver A US/EG

Sig 0220



iQ-Check *Campylobacter* Kit

Manual del usuario

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

Referencia #3578135



Tabla de Contenidos

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

Apartado 1 Introducción

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

Apartado 2 Tecnología de iQ-Check *Campylobacter*

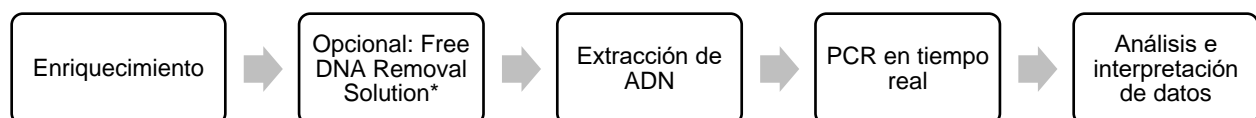
El kit iQ-Check *Campylobacter* es un ensayo basado en la detección y amplificación de genes por PCR en tiempo real. Los reactivos de PCR listos para su uso incluidos en el kit contienen oligonucleótidos (cebadores y sondas) específicos para *C. jejuni*, *C. coli*, y *C. lari*, así como ADN polimerasa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

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

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

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

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



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

Apartado 3

Componentes del kit

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

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

Apartado 4

Vida útil y conservación

Una vez recibido, el kit debe ser almacenado a 2 – 8°C. Los reactivos almacenados a esta temperatura pueden usarse hasta la fecha de caducidad indicada en los tubos.

Apartado 5

Materiales necesarios, no suministrados

Equipos

- Homogeneizador de palas para homogeneizar las muestras de ensayo
- Incubador para el enriquecimiento microbiológico de muestras
- Instrumentos específicos para la extracción en tubos cónicos estériles de 1,5mL y tapa de rosca
 - Centrífuga de sobremesa con capacidad de 10.000-12.000 x g
 - Bloque calefactor seco a 37 ± 2°C y/o 95–100°C
- Instrumentos específicos para la extracción en placa Deep Well
 - Calefactor térmico con agitación* con capacidad para mantener 37 ± 2°C y/o 95–100°C, con una velocidad de agitación de al menos 1.300 rpm
- Agitador vortex
- Placa agitadora magnética
- Micropipetas de 20, 200 y 1.000 µl
- Sistema PCR en tiempo real Bio-Rad*; por ejemplo, el CFX96 Touch Deep Well System (referencia #3600037)
- iQ-Check Prep System de Bio-Rad para el procedimiento de extracción automático de ADN y configuración de la placa de PCR (referencia #3594911)

Apartado 5 Materiales necesarios, no suministrados

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

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

Fungibles

- Medio de enriquecimiento: Caldo Bolton, suplementado o de doble fuerza libre de sangre
- Medio de enriquecimiento: agua de peptona tamponada (por ejemplo, BPW Plus referencia #3564684, deshidratado, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 frascos; 3555790, 5 L x 2 bolsas; 3555795, 3 L x 4 bolsas. BPW Standard (referencia #12013259, deshidratado, 500 g; 12013258 deshidratado, 5 kg; 12013260 5 L x 2 bolsas)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (referencia #3594970)
- iQ-Check Purification Reagent (referencia #12012383)
- RAPID' *Campylobacter* Agar (referencia #12012036, 90 mm x 20 placas; 3564295, base deshidratada, 500 g; 3564296, suplemento, 10 viales)
- Materiales específicos para muestras ambientales
 - Esponjas ambientales
 - Caldo neutralizante para esponjas, como el caldo neutralizante Dey-Engley (D/E) o HiCap o el caldo Lethen
- Materiales específicos para la extracción en tubos
 - Tubos cónicos estériles de 1,5 ml y tapa de rosca (por ejemplo, referencia #2240110XTU)
- Materiales específicos para la extracción en placa Deep Well
 - Placa Deep Well de 96 pocillos (iQ-Check Deep Well Microplates, referencia #3594900)
 - Película o film plástico de sellado (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, referencia #3590139)
 - Película pre-perforada de sellado para placas Deep Well (X-Pierce Films, referencia #3593977; o Pre-Pierced Plate Sealing Film, #3600040, solo en Norteamérica)
- Materiales específicos para el iQ-Check Prep System
 - Recipiente de 60 ml para dilución (referencia #3594904)
 - Puntas con filtro (referencia #3594902, 50 µl x 5.760; 3594903, 1.000 µl x 3.840)
 - Tubos para mix de PCR (referencia #3594901, 5 ml x 50)
- Placas, tubos, film de sellado y tapas de PCR
- Puntas con filtro estériles adaptables a micropipetas de 20, 200 y 1.000 µl
- Puntas para pipeta Combitip o pipetas de repetición equivalentes; estériles, empaquetadas individualmente
- Tubos de ensayo estériles de 5 ml
- Guantes sin polvo
- Agua destilada estéril

- Lejía, 5 %
- Descontaminante, como DNA AWAY o RNase AWAY

Apartado 6

Precauciones y recomendaciones de seguridad para la obtención de resultados óptimos

- Este análisis debe ser realizado por personal capacitado
- Las muestras y los cultivos enriquecidos deben manipularse como material potencialmente infeccioso y desecharse de acuerdo con las normas y reglamentos locales
- Todo el material potencialmente infeccioso debe ser esterilizado en autoclave antes de su eliminación
- La calidad de los resultados depende del estricto cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio (por ejemplo, la norma EN ISO 7218), especialmente en lo que respecta a la PCR:
 - El material de laboratorio (pipetas, tubos, etc.) no debe intercambiarse entre un puesto de trabajo y otro.
 - Utilice siempre un control positivo y un control negativo para cada serie de reacciones de amplificación
 - No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad
 - Agite (mediante vórtex) los reactivos del kit antes de usarlos para asegurar su homogeneidad
 - Verifique periódicamente la exactitud y la precisión de las pipetas, así como el correcto funcionamiento de los instrumentos
 - Cámbiese los guantes a menudo, especialmente si sospecha que están contaminados
 - Limpie los espacios de trabajo periódicamente con un 5 % de lejía y otros agentes descontaminantes, como DNA AWAY
 - Use guantes sin polvo y evite las huellas dactilares y escribir en las tapas de los tubos. Ambos interferirán con la adquisición de datos
- Se recomienda encarecidamente seguir los requisitos generales descritos en la norma EN ISO 22174:2005 (Microbiología de los alimentos y piensos - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en alimentos - Requisitos generales y definiciones)
- iQ-Check *Campylobacter* Kit
 - Todas las sustancias o mezclas del kit de análisis son productos clasificados, según el Sistema Global Armonizado de Clasificación y Rotulado de Productos Químicos (SGA). El contacto con los ácidos puede causar la liberación de gases tóxicos. No es necesario tomar precauciones especiales si se utiliza correctamente. Si se inhala el producto, suministre aire fresco y consulte a un médico en caso de presentar molestias. En caso de contacto del producto con los ojos, enjuague el ojo abierto durante varios minutos con agua corriente. En caso de ingestión de los productos, induzca el vómito y solicite ayuda médica.

Apartado 7 Protocolo

- iQ-Check Prep System
 - El uso inadecuado del iQ-Check Prep System puede causar lesiones personales o daños en el instrumento. Algunos componentes pueden suponer un riesgo de lesiones personales debido al calor excesivo si se manejan de forma inadecuada. Para un uso seguro, el iQ-Check Prep System debe ser manipulado y utilizado sólo por personal de laboratorio cualificado que haya sido instruido para tal fin. El mantenimiento del instrumento debe correr a cargo exclusivamente de los ingenieros del servicio técnico de Bio-Rad.
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System
 - El uso inadecuado del CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System puede causar lesiones personales o daños en el instrumento. Algunos componentes pueden suponer un riesgo de lesiones personales debido al calor excesivo si se manejan de forma inadecuada. Para un uso seguro, el CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System debe ser manipulado y utilizado sólo por personal de laboratorio cualificado y que haya sido instruido para tal fin. El mantenimiento del instrumento debe correr a cargo exclusivamente de los ingenieros del Servicio Técnico de Bio-Rad.
- Enriquecimiento
 - El usuario debe leer, comprender y seguir toda la información de seguridad en las instrucciones del kit iQ-Check *Campylobacter*. Conserve las instrucciones de seguridad para futuras consultas. Para reducir los riesgos asociados a la exposición a productos químicos y a riesgos biológicos, los análisis de patógenos deben ser realizados en un laboratorio debidamente equipado y bajo el control de personal capacitado. Siga siempre las prácticas reguladas de seguridad de los laboratorios, incluido el uso de vestimenta protectora adecuada y protección ocular al manipular reactivos y muestras contaminadas. Evite el contacto con el contenido de los medios de enriquecimiento y los tubos de reactivos después de la amplificación. Deseche las muestras enriquecidas de acuerdo con las normas vigentes aplicables a la industria
 - La *Campylobacter* es un organismo considerado en el nivel de bioseguridad 2. Las muestras biológicas como los enriquecimientos tienen potencial de transmitir enfermedades infecciosas. Siga todos los reglamentos locales, estatales/provinciales y/o nacionales aplicables para la eliminación de desechos biológicos. Use el equipo de protección apropiado, que incluya, pero no se limite a, gafas protectoras, protector facial, vestimenta/bata de laboratorio y guantes. Todos los trabajos deben realizarse en instalaciones debidamente equipadas, utilizando el equipo de seguridad adecuado (por ejemplo, dispositivos de contención física). Las personas deben ser instruidas y estar capacitadas de acuerdo con los requisitos reglamentarios y de la empresa/institución aplicables antes de trabajar con materiales potencialmente infecciosos
 - Una vez finalizados los análisis, todos los materiales y medios que puedan contener patógenos deberán descontaminarse siguiendo las normas actuales de la industria para la eliminación de desechos contaminados (es decir, en autoclave durante 20 minutos a 120 °C). Consulte la Ficha de Datos de Seguridad para obtener información adicional y los reglamentos locales para la eliminación

Apartado 7 Protocolo

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

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

Alcance (matrices)	Enriquecimiento	Extracción de ADN		Certificación
		Método	Formato	
Carne de pollo picada cruda	Caldo Bolton supl. 4 hr a 37 ± 1°C 20 hr a 41,5 ± 1°C Condiciones microaeróbicas	Easy I	Tubo/Deep Well	AOAC PTM
Enjuague de canal	2x BF-BEB 24 hr a 42 ± 1°C Condiciones microaeróbicas	Easy I	Tubo/Deep Well	AOAC PTM
España de canal	2x BF-BEB 24 hr a 42 ± 1°C Condiciones microaeróbicas	Easy I	Tubo/Deep Well	AOAC PTM
Heces	Caldo Bolton supl. Detección directa	Easy I	Tubo/Deep Well	N/A
Muestras de alimentos	Caldo Bolton supl. 4 hr a 37 ± 1°C 20 hr a 41,5 ± 1°C Condiciones microaeróbicas	Easy I	Tubo/Deep Well	N/A

A. Enriquecimiento de la muestra

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

Muestras de alimentos

1. Homogeneice n g de muestra en $9 \times n$ ml (por ejemplo, 25 g en 225 ml) de caldo Bolton suplementado en una bolsa de stomacher con filtro incorporado.
2. Incube sin agitar durante 4 hr a 37 ± 1°C en condiciones microaeróbicas, y luego transfiera a 41,5 ± 1°C otras 20 hr en condiciones microaeróbicas.
3. Siga el protocolo de extracción de ADN Easy I.

Muestras de enjuagado de canal

1. Enjuague la canal en 400 ml de agua peptona tamponada durante 1 min.
2. Añada 30 ml del enjuagado a 30 ml de caldo de enriquecimiento Bolton de doble fuerza libre de sangre (2x BF-BEB). Mezcle poco a poco.
3. Incube durante 24 hr a 42 ± 1°C en condiciones microaeróbicas.
4. Siga el protocolo de extracción de ADN Easy I.

Muestras de esponja de canal

1. Tras pasar la esponja por la canal, añada 25 ml 2x BF-BEB
2. Añada 30 ml del enjuague a 30 ml 2x BF-BEB. Mezcle con cuidado.

Apartado 7 Protocolo

3. Incube durante 24 hr a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ en condiciones microaeróbicas.
4. Siga el protocolo de extracción de ADN Easy I.

Muestras de heces

1. Homogeneice una muestra en p/v en caldo Bolton suplementado (por ejemplo, 10 g en 10 ml) en una bolsa de stomacher con filtro incorporado.
2. Espere a que decante a temperatura ambiente durante 10 min.
3. Siga el protocolo de extracción de ADN Easy I.

B. Tratamiento de eliminación de ADN libre

La solución iQ-Check Free DNA Removal Solution (referencia #3594970) proporciona una forma ideal de eliminación de ADN libre. Siga las recomendaciones de Bio-Rad descritas en la guía del usuario.

C. Extracción de ADN

Recomendaciones generales:

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

Protocolo Easy I

1. Deposite una alícuota de 100 μl de reactivo de lisis (reactivo A) en los tubos o pocillos de una placa Deep Well.
2. Añada 100 μl de muestra enriquecida.
3. Mezcle la solución pipeteando hacia arriba y hacia abajo hasta que se homogeneice.
4. Cierre los tubos o selle la placa Deep Well mediante la película pre-perforada desellado

5. Si trabaja con tubos, incúbelos en el bloque calefactor a 95 - 100°C durante 10 - 15 min. Si trabaja con placa Deep Well, incúbela en el incubador agitando simultáneamente a 1.300 - 1.600 rpm a 95 - 100°C durante 15 - 20 min.
6. Agite los tubos con vórtex a alta velocidad y a continuación centrifugue a 10.000 - 12.000 x g durante al menos 2 min.
La centrifugación no es necesaria en el caso de la placa Deep Well.

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

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

D. PCR en tiempo real

Configuración del software e instrumento

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

Preparación de la mix de PCR

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

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

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

Run de PCR

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

E. Análisis de los datos

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

Interpretación de los resultados

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

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

Controles

Verifique los controles positivo y negativo antes de interpretar los resultados de las muestras.

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

	Detección de <i>Campylobacter</i> (canal FAM)	Detección de control interno (canal HEX)
Control negativo	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Control positivo	$26 \leq Cq \leq 36$	No significativo

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

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

Muestras

Una muestra de *Campylobacter* debe presentara a un valor Cq ≥ 10 relativo al fluoróforo FAM.

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

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

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

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

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

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

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

Apartado 8

Confirmación de resultados positivos

Un resultado positivo con el kit iQ-Check *Campylobacter* se presume que es positivo y se recomienda su confirmación mediante un método de referencia apropiado. También se puede usar el medio cromogénico RAPID' *Campylobacter*.

Apartado 9

Confirmación de colonias aisladas usando el kit iQ-Check

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

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

Apartado 10

Aplicación del ensayo y validaciones



Validación AOAC

El kit iQ-Check *Campylobacter* está validado por el Instituto de Investigación de la AOAC en el marco del Programa "Performance Tested Methods" para la detección de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* en pollo crudo triturado, enjuagues de canal de pollo y esponjas de pavo. Un resultado positivo con iQ-Check debe considerarse como no definitivo y se recomienda que se confirme mediante métodos de referencia normalizados (véase el apartado 8). Número de certificado: 031209

Apartado 11

Referencias

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

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2016). Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 41.04. Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples

Apartado 12

Historial de revisiones

Fecha de publicación	N.º de documento	Cambio
Agosto 2020	10000131520 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Nuevo diseño del documento y actualización del contenido- Cambio en el número de documento - versión anterior 881039 REV G

Apéndice — Tabla de cálculo de la mix de PCR

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

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

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

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

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

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



Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science
Group

Website bio-rad.com **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

10000131520 Ver A US/CE

Sig 0220

