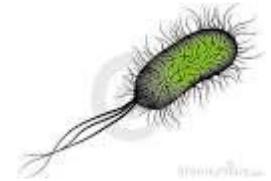


PROCEDURE OPERATIVE STANDARD

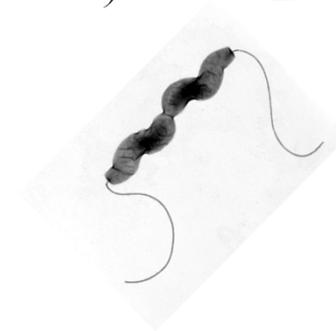
- *SALMONELLA* spp (REAL TIME PCR – RICERCA)



- *LISTERIA monocytogenes* (REAL TIME PCR – RICERCA)



- *CAMPYLOBACTER* (REAL TIME PCR – RICERCA)



TECNICA: PCR Real Time

Possibilità di multiamplicazioni per singola provetta di reazione. Multiplex con controllo interno per risultati affidabili.

Prevede l'uso di sonde (o Probe) fluorescenti che fungono da indicatori diretti del numero di ampliconi sintetizzati durante la PCR.

L'esame Real Time PCR avviene in termociclatori in grado di registrare la fluorescenza.

TECNICA : PCR Real Time

La fluorescenza emessa in fase di amplificazione è registrata da software dedicati che visualizzano il segnale di fluorescenza come curve di amplificazione riportate su monitor collegati al termociclatore.

L'emissione di fluorescenza è direttamente proporzionale alla quantità di DNA presente.

Ottenimento rapido dei risultati, perché conclusa la PCR l'analisi è terminata.

TECNICA: PCR Real Time

Rappresenta un'evoluzione della tecnica di PCR end point.

E' una tecnica semplice, riproducibile che permette mediante visualizzazione, la misurazione "in tempo reale" del DNA amplificato.

L'uso di questa tecnica consente la simultanea amplificazione e quantificazione del DNA target.

La PCR Real Time consente di abbandonare tutte le manipolazioni successive all'amplificazione, potenziali fonti di inquinamento del campione (carry over).

KIT IN USO

Sono test qualitativi rapidi e semplici

Possono essere processati fino a 94 campioni contemporaneamente con risultati affidabili in meno di 24 ore inclusa la fase di arricchimento.

Specificità rivelazione del DNA genomico del patogeno grazie a sonde specifiche.

Il rilevamento e l'analisi → termociclatore per la PCR in real-time



Principio di rivelazione che misura l'incremento di fluorescenza

POS LISTERIA MONOCYTOGENES (REAL TIME PCR-RICERCA)

- **SCOPO E PRINCIPIO DEL METODO:**

Metodo Real Time PCR per la rilevazione di sequenze di DNA specifico di *Listeria monocytogenes*

- **CAMPO DI APPLICAZIONE:**

Categoria	Matrice	Misurando	Campo di misura	Tecnica di prova
Alimenti destinati al consumo umano	Alimenti	<i>Listeria monocytogenes</i>	Presente / Assente	Real Time PCR
Campioni ambientali	Ambienti di produzione e manipolazione	<i>Listeria monocytogenes</i>	Presente/ Assente	Real Time PCR

POS CAMPYLOBACTER (REAL TIME PCR - RICERCA)

- **SCOPO E PRINCIPIO DEL METODO:**

Metodo Real Time PCR per la rilevazione di sequenze di DNA specifico di *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari*.

- **CAMPO DI APPLICAZIONE:**

Categoria	Matrice	Misurando	Campo di misura	Tecnica di prova
Alimenti destinati al consumo umano	Alimenti	<i>Campylobacter</i>	Presente/ Assente	Real Time PCR
Campioni ambientali	Ambienti di produzione e	<i>Campylobacter</i>	Presente/ Assente	Real Time PCR

POS *SALMONELLA* spp. (REAL TIME PCR – RICERCA)

- **SCOPO E PRINCIPIO DEL METODO:**

Metodo Real Time PCR per la rilevazione di sequenze di DNA specifico di *Salmonella* spp.

- **CAMPO DI APPLICAZIONE:**

Categoria	Matrice	Misurando	Campo di misura	Tecnica di prova
Alimenti destinati al consumo umano	Alimenti	<i>Salmonella</i> spp.	Presente / Assente	Real Time PCR
Alimenti destinati al consumo animale	Mangime	<i>Salmonella</i> spp.	Presente / Assente	Real Time PCR
Campioni ambientali	Ambienti di produzione e manipolazione	<i>Salmonella</i> spp.	Presente / Assente	Real Time PCR

POS LISTERIA MONOCYTOGENES (REAL TIME PC - RICERCA)

9. Modalità operative

Vedi la Norma di riferimento

iQ-Check® Listeria monocytogenes II Kit Catalog #: 357-8124 User Guide Test for the real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples. Rev. F - 02/2015

dal paragrafo: VII. Protocol **al paragrafo** VIII. Confirmation of positive results **con l'esclusione delle seguenti parti:** A. Sample Enrichment, paragrafi Easy protocol, for use only with LSB (all samples) e Easy protocol for environmental samples only; B. DNA extraction il paragrafo Easy protocol.

Dettaglio

In caso di positività confermare il risultato utilizzando il metodo di conferma **UNI EN ISO 11290-1:2005 – Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di *Listeria monocytogenes* - Metodo per la ricerca** partendo dal punto 9.2 di pag. 4.

POS CAMPYLOBACTER (REAL TIME PCR - RICERCA)

9. Modalità operative

Vedi la Norma di riferimento

iQ-Check® Campylobacter Catalog #: 357-8135 User Guide Test for the real-time PCR detection of Campylobacter jejuni, Campylobacter coli and Campylobacter lari in food and environmental sample Rev. G- 05/2015

dal paragrafo: VII. Protocol al paragrafo VIII. Confirmation of positive results

con l'esclusione delle seguenti parte: A. Sample Enrichment or Sample Preparation, paragrafi 2 - Carcass rinse sample enrichment; 3 - Carcass rinse sponge sample enrichment; 4 - Feces sample preparation

Dettagli

In caso di positività confermare il risultato come descritto nella norma di riferimento al punto VIII A1 pag.15, utilizzando come metodo di conferma: **UNI EN ISO 10272-1: 2006 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp - Parte 1: Detection method punto 9.2 di pag. 5.**

PRELIEVO: 25 gr in 225 ml

Utilizzare sempre buste per stomacher con filtro per non introdurre frammenti di residui alimentari



ARRICCHIMENTO:

Salmonella: Buffer peptone water 18h \pm 2h a 37°C

Listeria: 1/2 Fraser 25 h \pm 1h a 30°C

Campylobacter: Brodo Bolton 4h a 37°C e 21h a 41°C

ESTRAZIONE (1)

Per estrazione si intende isolamento, separazione di DNA o RNA da un tessuto, cellule, sangue, ecc.

Estrarre il DNA da alimenti \longrightarrow rottura delle membrane cellulari

Può essere effettuata :

- shock meccanico (macinazione o omogenizzazione del campione)
- shock termico (trattamenti termici con alte temperature)
- shock chimico (utilizzo di soluzioni di alcali forti e tensioattivi)
(Reagente di lisi a pH basico)

ESTRAZIONE (2)

La purificazione del DNA batterico coinvolge inizialmente la rottura della parete e delle membrane.

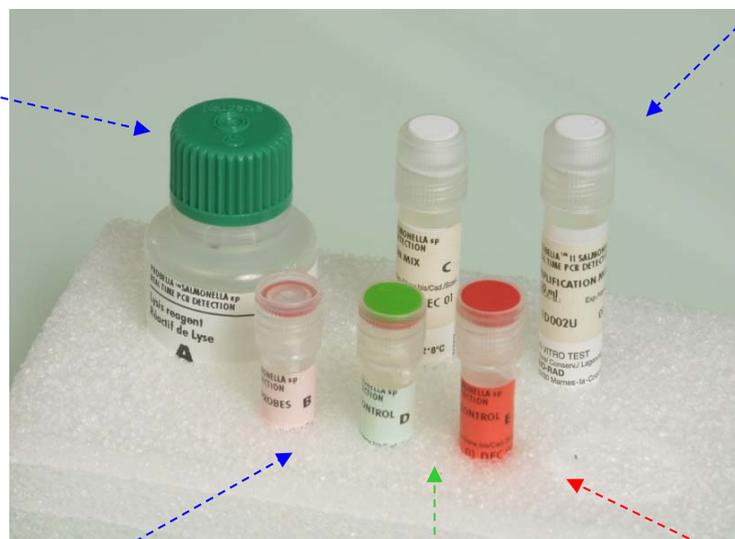
La lisi può avvenire mediante:

- trattamenti fisici (ultrasuoni)
- trattamenti chimici con enzimi (lisozima, proteasi K) capaci di degradare la parete cellulare attaccando diversi suoi componenti (proteine, peptidoglicano)

REAGENTI PER L'ESTRAZIONE E L'AMPLIFICAZIONE DEL DNA PRONTI ALL'USO

96 test/kit Reagenti per 110 reazioni

Reagente di Lisi (colorato)



Mix di amplificazione
(Controllo interno ottimizzato primers specifici, enzima UDG, Taq Polymerasi, dNTPs, Tampone, MgCl)

Sonde Fluorescenti (specifiche)

PCR Controllo Negativo

PCR Controllo positivo

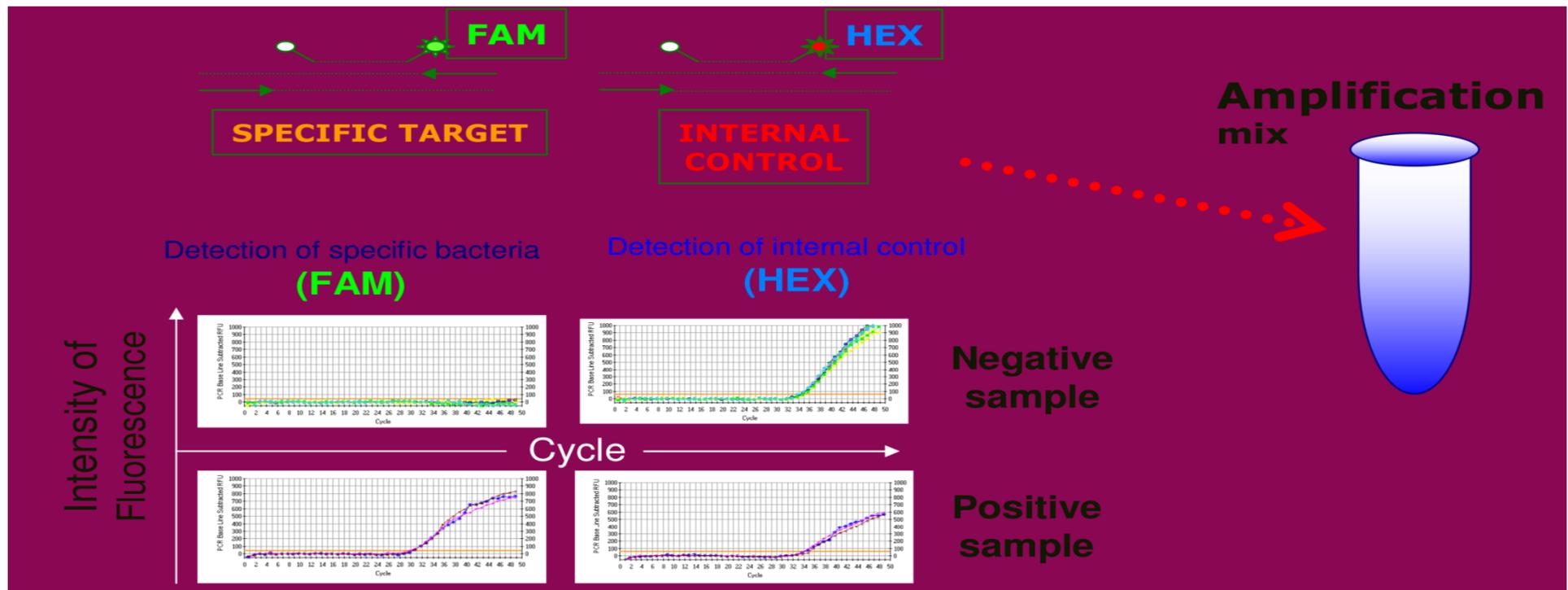
CONTROLLO INTERNO

E' un plasmide già presente nella mix di amplificazione.

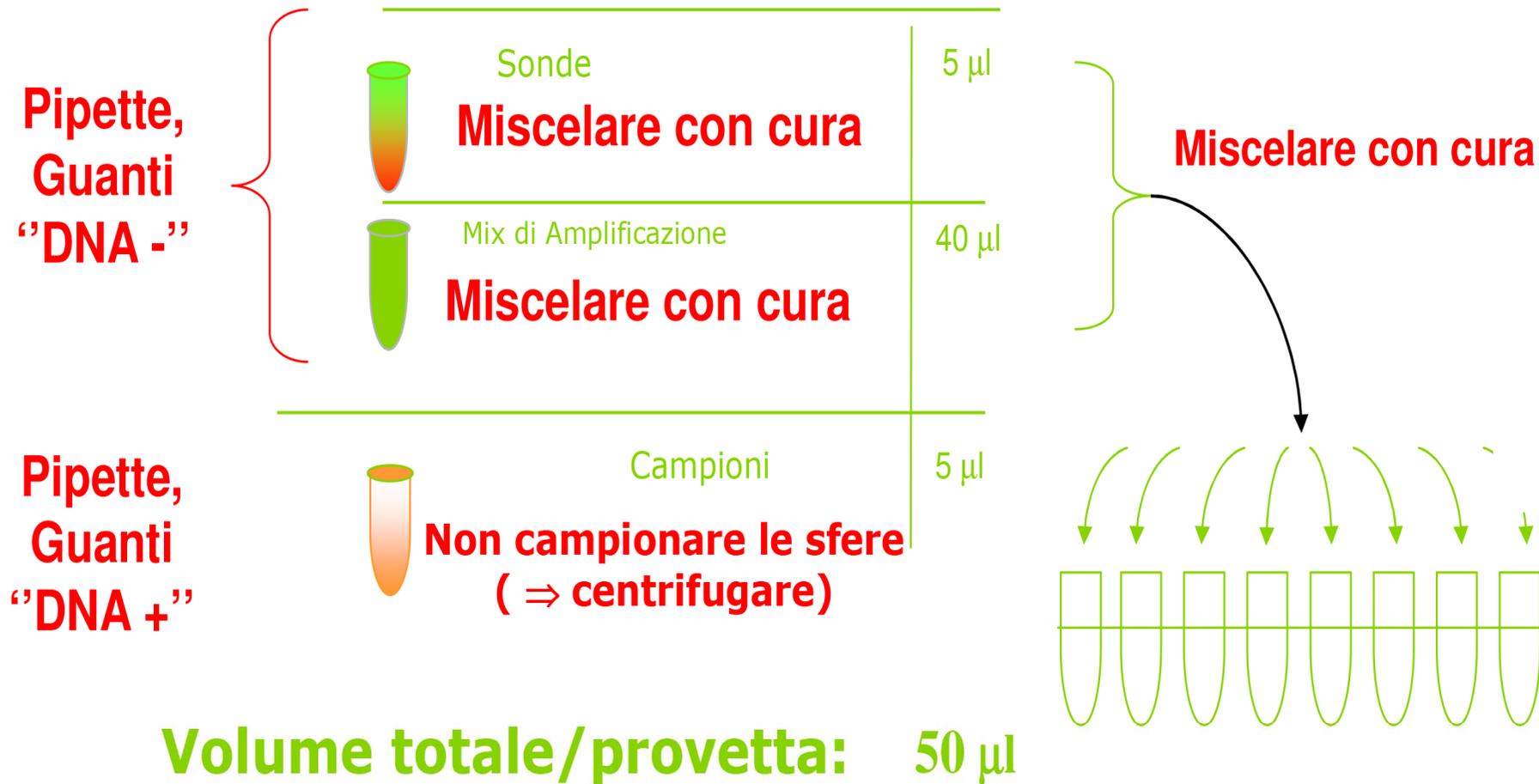
In questo plasmide è stato inserito un gene target amplificato dagli stessi primer utilizzati per l'amplificazione del DNA target, ma riconosciuto da una sonda diversa legata ad un altro fluoroforo (HEX).

Serve per:

- controllare l'assenza di sostanze inibenti la reazione di Real Time PCR.
- valida i risultati negativi
- compete con il campione



Raccomandazioni per la tecnica di PCR (1)



Attenzione alle contaminazioni

Raccomandazioni per la tecnica di PCR (2)



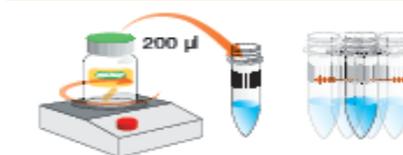
- Non scrivere sui tappi delle strip
- Rimuovere le bolle dal fondo dei pozzetti
- Orientare le strip (per esempio marcare una delle estremita')
- Una volta preparata mantenere la mix a 4°C max 1 ora oppure utilizzare al momento



- Eseguire l'arricchimento del campione in buffered peptone water (acqua peptonata tamponata) preriscaldata (25 g in 225 ml), 18 ore \pm 2 ore a 37°C
- Prelevare 1 ml di campione arricchito e trasferirlo in una provetta con tappo a vite da 1,5 ml
(Prestare attenzione a non introdurre frammenti di residui alimentari o agitare le buste per stomacher prima di effettuare il prelievo)



- Centrifugare a 10.000-12.000 g per 5 min
- Eliminare tutto il supernatante



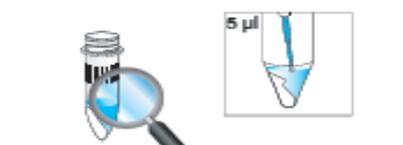
- Aggiungere 200 µl del reagente di lisi (reagente A)
- Il reagente di lisi deve essere costantemente agitato per rimanere in sospensione
- Rimettere in sospensione il pellet pipettando il reagente su e giù nella provetta
- Vortexare ad alta velocità



- Inserire la provetta nel blocco riscaldante
- Incubare a 95-100°C per 10 min



- Vortexare ad alta velocità
- Centrifugare a 10.000-12.000 g per 5 min



- Utilizzare 5 µl del surnatante ottenuto per la reazione di amplificazione
Non vortexare prima di prelevare 5 µl di campione



- Preparare la mix PCR (Vedere Appendice/Guida al calcolo della mix PCR)
- Distribuire la mix PCR (45 µl)
- Distribuire i campioni e i controlli (5 µl)
- Verificare l'assenza di bolle
- Sigillare la micropiastre



- Definire i parametri del software
- Definire le impostazioni della piastra
- Posizionare la micropiastre nel thermocycler
- Avviare l'amplificazione facendo clic su "Run" (Esegui)

POS SALMONELLA spp. (REAL TIME PCR - RICERCA)

9. Modalità operative

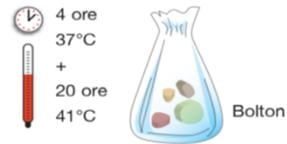
Vedi la Norma di riferimento:

iQ-Check® Salmonella II Kit Catalog #: 357-8123 User Guide “Test for the real-time PCR detection of Salmonella spp. in food, animal feed and environmental samples Rev. G – 02/2015“

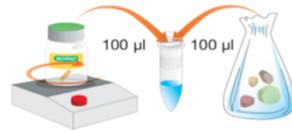
dal paragrafo: VII. Protocol al paragrafo VIII. Confirmation of positive results con l’esclusione delle seguenti parti: A. Sample Enrichment, paragrafo Further information; B. DNA extraction, paragrafi Standard II protocol (including grinding step), Easy I protocol e Easy II protocol (including grinding step).

Dettaglio

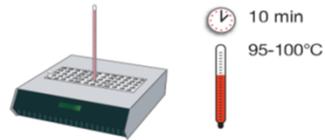
In caso di positività confermare il risultato utilizzando il metodo di conferma ISO 6579:2002 Cor 1 2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of Salmonella spp. partendo dal punto 4.2. di pag. 2.



- Eseguire l'arricchimento del campione nel brodo Bolton supplementato (25 g in 225 ml), 4 ore a 37°C
- Trasferirlo a 41°C per 21 ore



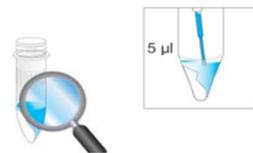
- Aggiungere 100 µl del reagente di lisi (reagente A) nella provetta con tappo a vite da 1,5 ml
- Il reagente di lisi deve essere costantemente agitato per rimanere in sospensione
- Prelevare 100 µl di campione arricchito e aggiungerlo nella provetta (Prestare attenzione a non introdurre frammenti di residui alimentari di grandi dimensioni)
- Vortexare ad alta velocità



- Inserire la provetta nel blocco riscaldante
- Incubare a 95-100°C per 10 min



- Vortexare ad alta velocità
- Centrifugare a 10.000-12.000 g per almeno 2 min



- Utilizzare 5 µl del surnatante ottenuto per la reazione di amplificazione
- Non vortexare prima di prelevare 5 µl di campione**



- Preparare la mix PCR (Vedere la Guida al calcolo della mix PCR)
- Distribuire la mix PCR (45 µl)
- Distribuire i campioni e i controlli (5 µl)
- Verificare l'assenza di bolle
- Sigillare la micropiastra



- Definire i parametri del software
- Definire le impostazioni della piastra
- Posizionare la micropiastra nel thermocycler
- Avviare l'amplificazione facendo clic su "Run" (Esegui)

N° Registrazione IZSLT _____

Estrazione dalla brodocoltura di arricchimento

Lotto: Reagente di lisi ricostituito (reagente A+ F): Scadenza:.....

Data inizio prova/...../.....	Firma.....
Data fine prova/...../.....	Firma.....

Preparazione miscela di reazione

Data preparazione miscela/...../.....	Firma.....
---------------------------	-------------------	------------

ESPRESSIONE DEI RISULTATI:

.....ingr. o ml o cm²

Inserimento dati

Data fine prova/...../.....	Firma.....
-----------------	-------------------	------------

Validazione dati

Data fine prova/...../.....	Firma.....
-----------------	-------------------	------------

iQ-Check® Salmonella

2.0.656.1201. APF v1

Current date: 12/31/2014 15:44

User: BioRad\admin

Base Serial Number: CC003234

Optical Head Serial Number: 785BR2011

PCR data file name: C:\Documents and Settings\Philips\Bureau\E_coli-salmo_CFX.pcrd

PCR data file created: 12/02/2009 11:42

PCR Kit lot number: 9j0048

DNA Extraction Lot Number:

Analysis Mode: Baseline Subtracted Curve Fit

Baseline Calculation: Target: set automatically -- Internal control: set automatically

Cq Determination: Single Threshold

Threshold: Target: 541.302 (set automatically) -- Internal control: 584.199 (set automatically)

Report Differs from Last Save: Yes

Report Components Show Options: Cqs(Yes), Plate Table View(Yes), Charts(Yes)

PCR Plate Barcode: N/A

Processed through the iQ-Check Prep System: No

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A						Neg Ctrl Valid Ctrl	Pos Ctrl Valid Ctrl	Sample10 Positive				
B						Sample1 Negative	Sample3 Inhibition	Sample11 Positive	Sample16 Positive			
C						Sample2 Negative	Sample4 Positive	Sample12 Positive	Sample17 Positive			
D							Sample5 Positive	Sample13 Negative	Sample18 Positive			
E							Sample6 Inhibition	Sample14 Positive	Sample19 Positive			
F							Sample7 Positive	Sample15 Negative	Sample20 Positive			
G							Sample8 Positive		Sample21 Positive			
H							Sample9 Positive					

Negative Control	
Criteria	Calculated Cq
Target Cq = N/A	N/A
Internal control 28 ≤ Cq ≤ 40	31.51
Valid	

Sample Interpretation		
Target	Internal control	Interpretation
Cq ≥ 10		Positive
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negative
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition

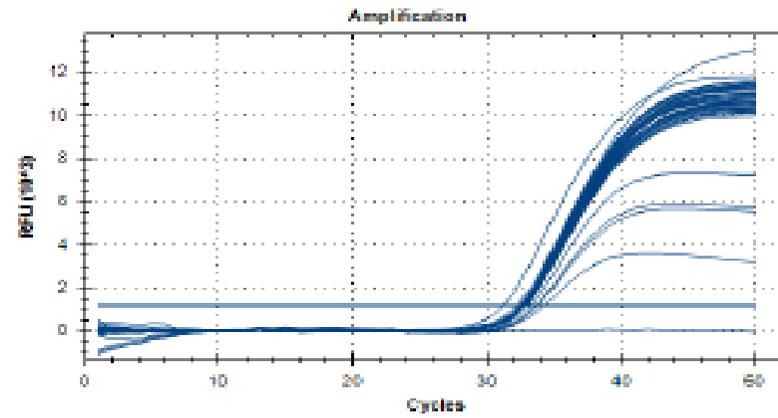
Positive Control	
Criteria	Calculated Cq
Target 26 ≤ Cq ≤ 36	31.26
Internal control	31.26
Valid	

Well	Sample Id	Cq Target	Cq Internal Control	Result
A06	Neg Ctrl	N/A	31.51	Valid Ctrl
B06	Sample1	N/A	33.51	Negative
C06	Sample2	N/A	31.23	Negative
A07	Pos Ctrl	31.26	31.26	Valid Ctrl
B07	Sample3	N/A	N/A	Inhibition
C07	Sample4	33.34	31.57	Positive
D07	Sample5	32.81	31.65	Positive
E07	Sample6	N/A	N/A	Inhibition
F07	Sample7	31.21	31.82	Positive

iQ-Check® Salmonella

3.1.1554.0821. APF v8

Current date: 01/20/2017 13:15

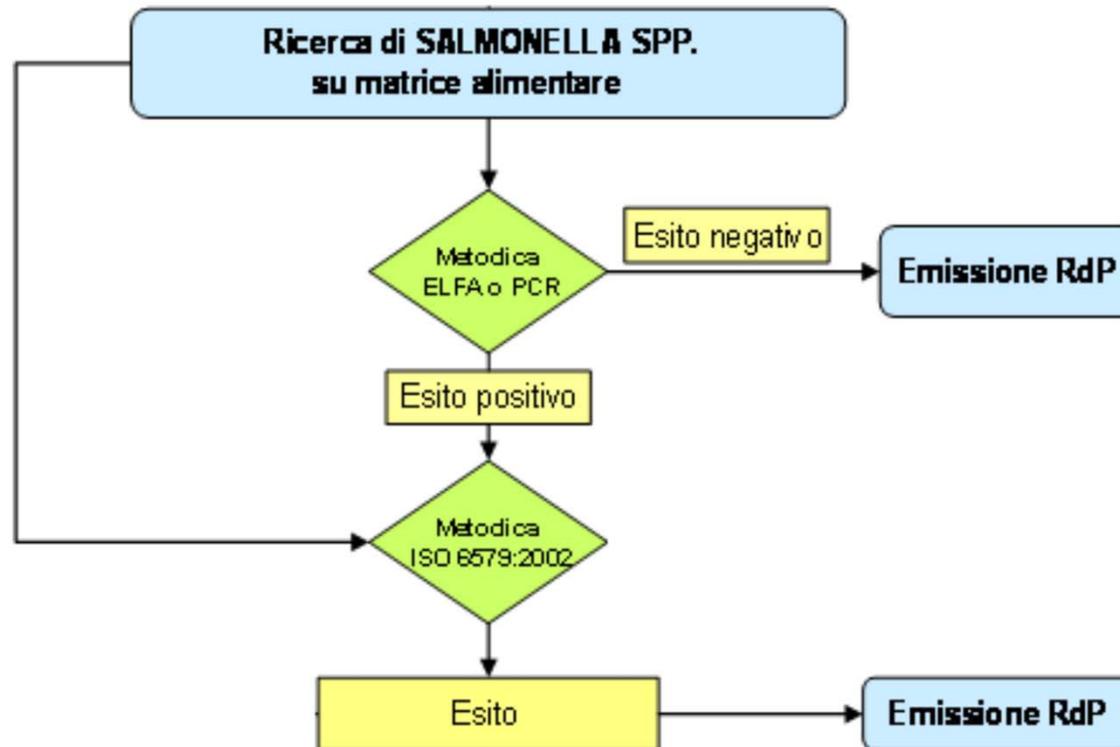


Punti di forza metodi in Real Time PCR

- Buona parte della procedura è automatizzata (minor errore umano)
- Sistema miniaturizzato riduce i rifiuti speciali in laboratorio
- Tempi di risposta migliorati
- Kit pronti all'uso (migliore gestione reagenti a magazzino)
- Lettura automatica (minor errore umano)

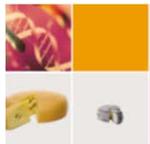
CRITICITÀ DEI METODI IN REAL TIME PCR

I positivi **devono** essere confermati con metodi tradizionali



GRAZIE

PER L'ATTENZIONE



Guida rapida

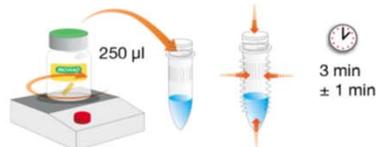
iQ-Check[™] *Listeria monocytogenes* II 357-8124 • Estrazione Standard



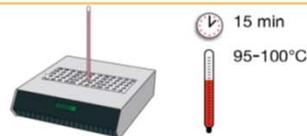
- Eseguire l'arricchimento del campione in ½ Fraser (25 g in 225 ml), 25 ore ± 1 ora o in LSB per 23 ore ± 1 ora a 30°C
- Prelevare 1,5 ml di campione arricchito e trasferirlo in una provetta con tappo a vite da 1,5 ml
(Prestare attenzione a non introdurre frammenti di residui alimentari o agitare le buste per stomacher prima di effettuare il prelievo)



- Centrifugare a 10.000-12.000 g per 5 min
- Eliminare tutto il surnatante



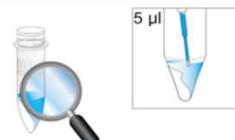
- Aggiungere 250 µl del reagente di lisi ricostituito (reagenti A + F) al pellet
- Il reagente di lisi deve essere costantemente agitato per rimanere in sospensione
- Rimettere in sospensione il pellet pipettando il reagente su e giù nella provetta
- Miscelare ad alta velocità per 3 min ± 1 min nel vortex disruptor



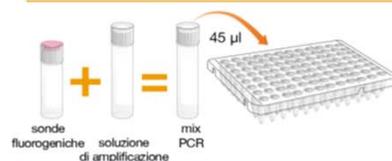
- Inserire la provetta nel blocco riscaldante
- Incubare a 95-100°C per 15 min



- Vortexare ad alta velocità
- Centrifugare a 10.000-12.000 g per 5 min



- Utilizzare 5 µl del surnatante ottenuto per la reazione di amplificazione
Non vortexare prima di prelevare 5 µl di campione



- Preparare la mix PCR (Vedere Appendice/Guida al calcolo della mix PCR)
- Distribuire la mix PCR (45 µl)
- Distribuire i campioni e i controlli (5 µl)
- Verificare l'assenza di bolle
- Sigillare la micropiastra



- Selezionare il protocollo termico
- Definire le impostazioni della piastra
- Posizionare la micropiastra nel thermocycler
- Avviare l'amplificazione facendo clic su "Run" (Esegui)