
iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit

User Guide

Test for the real-time PCR detection of *Cronobacter* spp. in infant formula, infant cereal, and environmental samples

Catalog #3578137

BIO-RAD

Table of Contents

Section 1. Introduction	1
Section 2. iQ-Check <i>Cronobacter</i> spp. Technology	1
Section 3. Kit Components.....	2
Section 4. Shelf Life and Storage	3
Section 5. Materials Required but Not Supplied.....	3
Equipment	3
Supplies.....	4
Section 6. Safety Precautions and Recommendations for Best Results	5
Section 7. Protocol	7
Sample Enrichment	7
Free DNA Removal Treatment.....	8
DNA Extraction.....	8
Real-Time PCR	9
Data Analysis.....	9
Section 8. Confirmation of Positive Results	11
Section 9. Confirmation of Single Colonies Using iQ-Check Kit.....	12
Section 10. Test Performance and Validations	12
Section 11. References	13
Section 12. Revision History	13
Appendix — PCR Mix Calculation Guide	14

Section 1

Introduction

Cronobacter spp., formerly named *Enterobacter sakazakii*, is a ubiquitous pathogen that has been isolated from food, environmental, and clinical sources. It is associated with rare but fatal infant infections linked to the consumption of reconstituted powdered infant formula. Low birth weight and immunocompromised newborns, as well as neonates (infants less than four weeks old), are particularly at risk because of the high mortality rate (up to 80%) but the largest number of cases occurs in older populations.

The resistance of the organism to desiccation, the low cell numbers that have been reported to cause disease, and the high volume of baby milk product sales have led many authorities to monitor for the pathogen. For example, the EU regulation requires absence of the bacteria in 10 g of sample. To comply with regulations and to fulfill Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) programs, industrial companies have stricter targets and need to select highly sensitive and specific methods. The classical microbiological methods offer standardized results. They are, however, long and tedious.

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit is a simple and rapid qualitative test allowing the detection of specific *Cronobacter* spp. DNA sequences in infant formula and environmental samples. Up to 94 samples can be processed to obtain a reliable result in less than 24 hr. This allows a more flexible workflow and a higher throughput to implement effective measures to improve safety and hygiene.

Section 2

iQ-Check *Cronobacter* spp. Technology

The iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit is a test based on gene amplification and detection by real-time PCR. Ready-to-use PCR reagents contain DNA primers and a DNA probe specific for *Cronobacter* spp., as well as DNA polymerase and nucleotides. Detection and data analysis are optimized for use with a Bio-Rad real-time PCR instrument, such as the CFX96 Touch Deep Well or CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Detection 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.

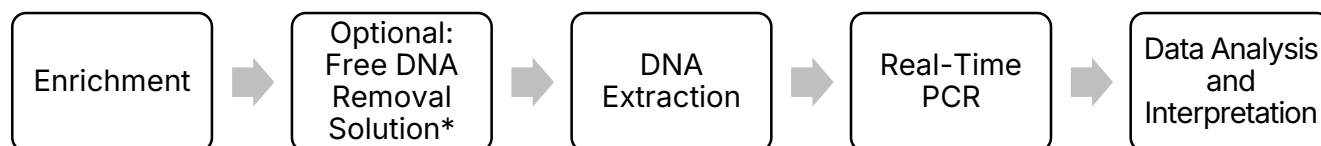
In real-time PCR, specific probes detect the DNA during amplification by hybridizing to the amplicons. These probes are linked to a fluorophore that fluoresces only when hybridized to the target sequence. FAM is the fluorophore linked to the probe in this kit that hybridizes to the

Section 3 Kit Components

Cronobacter spp.–specific DNA sequence. In the absence of target DNA, no fluorescence will be detected. As the number of amplicons increases with each round of amplification, fluorescence intensity also increases. At the annealing step of each PCR cycle, the optical module or detector measures this fluorescence. The software associated with the instrument plots fluorescence intensity against number of cycles. This method allows a simple determination of the presence or absence of *Cronobacter* spp. in a sample.

A synthetic DNA internal control is included in the reaction mix. This control is amplified with a specific probe at the same time as the *Cronobacter* target DNA sequence and is detected by a second fluorophore. This allows for the validation of any negative result.

The iQ-Check test can detect *Cronobacter* spp. in all infant formula, infant cereals, and environmental samples previously enriched by culture in buffered peptone water with or without supplement. See Section 7 for a list of matrices associated with all validations. The test includes five main steps:



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

Section 3

Kit Components

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

Reagent ID	Reagent	Quantity Provided, ml
A	Lysis II 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 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ and/or 95–100°C
 - Cell disruptor, such as a Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)
- Specific for extraction in deep well plate
 - Heating thermoshaker* capable of maintaining $37 \pm 2^\circ\text{C}$ and/or 95–100°C, with a mixing speed of at least 1,300 rpm
- Vortexer
- Magnetic stir plate
- 20, 200, and 1,000 μl micropipets
- Tips for repeat pipettors; sterile, individually packaged
- Bio-Rad real-time PCR system,* for example, the CFX96 Touch Deep Well (catalog #3600037) or CFX Opus Deepwell (catalog # 17007991) Real-Time PCR Systems
- Bio-Rad iQ-Check Prep System for automated DNA extraction and PCR plate setup (catalog #3594911)

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

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

Supplies

- Enrichment medium: Buffered Peptone Water (for example, BPW Plus, catalog #3564684, dehydrated, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 bottles; 3555790, 5 L x 2 bags; 3555795, 3 L x 4 bags; or BPW Standard, catalog #12013259, dehydrated, 500 g; 12013258, dehydrated, 5 kg; 12013260, 5 L x 2 bags)
- Selective supplement: Vancomycin (catalog #3564145, 5 g or equivalent)
- PIF Supplement (catalog #12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalog #3594970)
- Specific for environmental samples
 - Environmental sponges
 - Environmental swabs
 - Neutralizing broth for sponges and swabs, such as Dey-Engley (D/E) or HiCap Neutralizing Broth, or Letheen broth
- Specific for extraction in tubes
 - 1.5 ml conical screwcap tubes, sterile (catalog #17010678)
- 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)
 - PCR plate 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 #12014486, 50 μ l x 5,760; #12014483, 1,000 μ l x 3,840)
 - PCR mix tubes (catalog #12016673, 5 ml x 25)
- RAPID'Sakazakii Agar (catalog #3563971, 90 mm x 20 dishes; 3564976, dehydrated, 500 g)
- PCR plates, tubes, sealing tape, and caps
- Sterile filter tips adaptable to 20, 200, and 1,000 μ l micropipets
- Tips for Combitip pipets or equivalent repeat pipettors; sterile, individually packaged
- 1 and 10 ml pipets
- 2 and 5 ml sterile test tubes

Section 6 Safety Precautions and Recommendations for Best Results

- 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
- Pregnant women, children, the elderly, and immunocompromised individuals should not perform this method
- 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 22174:2024 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food pathogens — General requirements and definitions)

Section 6 Safety Precautions and Recommendations for Best Results

- iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit
 - All substances or mixtures in the test kit are classified products, according to the Globally Harmonized System (GHS). Contact with acids may cause release of toxic gases. No special precautions are necessary if used correctly. If the product is inhaled, supply fresh air and consult a doctor in case of complaints. After eye contact with the product, rinse opened eye for several minutes under running water. If the products are swallowed, induce vomiting and call for medical help
- iQ-Check Prep System
 - Improper use of the iQ-Check Prep System may cause personal injury or damage to the instrument. Some components may pose a risk of personal injury due to excessive heat if improperly handled. For safe use, the iQ-Check Prep System must be operated only by qualified laboratory personnel who have been appropriately trained. Servicing of the instrument must be performed only by Bio-Rad field service engineers
- CFX96 Touch Deep Well or CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Detection System
 - Improper use of the CFX96 Touch or CFX Opus 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 or CFX Opus Deep Well Real-Time PCR Detection System must be operated only by qualified laboratory personnel who have been appropriately trained. Servicing of 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 *Cronobacter* spp. 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
 - *Cronobacter* spp. are Biosafety Level 2 organisms. 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

Section 7 Protocol

- When testing is complete, all materials and media possibly containing pathogens should be decontaminated following current industry standards for the disposal of contaminated waste (that is, autoclave for 20 min at 120°C). Consult the Safety Data Sheet for additional information and local regulations for disposal

Section 7

Protocol

A. Sample Enrichment

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

Enrichment media must be at the appropriate incubation temperature (ambient or 37°C when required) before use. The use of alpha-amylase is recommended for cereals or starch products enrichment as described in the ISO 6887-4 standard.

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

NF VALIDATION BRD 7/23-01/13		
Scope (Matrices)	Sample Preparation	Enrichment/DNA Extraction
Environmental samples ^{1,2,3}	Homogenize <i>n</i> g sample in 9 x <i>n</i> ml BPW	Easy I extraction <ul style="list-style-type: none">▪ Incubate 16-20 hr at 37 ± 1°C▪ Tube/deep well format
Infant formula and cereal w/ and w/o probiotics (30 g) ^{1,2,3}	Homogenize <i>n</i> g food in 9 x <i>n</i> ml BPW + vancomycin then subculture in BPW	Easy I extraction <ul style="list-style-type: none">▪ Incubate BPW + vancomycin 18-22 hr at 37 ± 1°C▪ Subculture in BPW 3-5 hr at 37 ± 1°C▪ Tube/deep well format
Infant formula and cereals w/ and w/o probiotics, ingredients (up to 375 g) ^{1,4}	Homogenize <i>n</i> g food in 3 x <i>n</i> ml prewarmed BPW + PIF Supplement	Easy I extraction <ul style="list-style-type: none">▪ Incubate 18-26 hr at 37 ± 1°C▪ Tube/deep well format

¹ Validation also includes the use of the iQ-Check Free DNA Removal Solution and of the "Crono Fast" Application Protocol File for a reduced PCR run time. Contact your Bio-Rad representative for more information

² Within the scope of the NF VALIDATION, test portions weighing more than 30 g have not been tested

³ The enriched samples can be stored at 2-8°C for 48 hr following the end of the incubation at 37°C. Standard DNA extraction protocol must then be applied. Contact your Bio-Rad representative for more information

⁴ The enriched samples can be stored at 2-8°C for 72 hr following the end of the incubation at 37°C

B. Free DNA Removal Treatment

The iQ-Check Free DNA Removal Solution provides an ideal way to remove free DNA. Follow Bio-Rad's recommendations in the user guide.

C. DNA Extraction

General recommendations:

- Turn on the heat block or thermoshaker to preheat before starting the test. Set it to 95–100°C. Keep the lysis reagent in suspension while pipetting by stirring at medium speed on a magnetic stir plate
- 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
- Open tubes and wells carefully to avoid any possible cross contamination
- Cool the deep well plate before pipetting directly through pre-pierced sealing film
- Use the magnetic bar to keep the lysis reagent in suspension. Pipet while it is stirring at medium speed
- Gently shake the lysis reagent by hand first to resuspend the resin. Then pipet while the magnetic stir bar is stirring the bottle contents at medium speed in order to keep the contents in suspension

Easy I Protocol

1. Aliquot 100 µl of homogenized lysis reagent (reagent A) to tubes or wells of a deep well plate.

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

2. Add 100 µl of enriched sample.

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

3. Mix the solution by pipetting up and down until homogenized.
4. Close the tubes or seal the deep well plate with pre-pierced sealing film.
5. Incubate tubes in the heat block at 95–100°C for 15 - 20 min. Incubate deep well plate in the thermoshaker under agitation at 1,300–1,600 rpm at 95–100°C for 15–20 min.
6. Vortex tubes at high speed, and then centrifuge at 10,000–12,000 x g for at least 2 min. Centrifugation is not needed for deep well plate.

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

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

D. Real-Time PCR

Instrument and Software Setup

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

PCR Mix Preparation

1. Prepare PCR mix containing the amplification solution (reagent C) and the fluorescent probes (reagent B). Volume of PCR mix needed depends on the number of samples and controls to be analyzed. At least one positive and one negative control must be included in each PCR run. Use the pipetting table in the Appendix to find the correct volumes to use for each reagent.
2. Use the PCR mix (reagents B + C) immediately after preparation. It is stable for 1 hr maximum at $2-8^{\circ}\text{C}$.
3. Pipet 45 μl of PCR mix into each well according to your plate setup.
4. Add 5 μl of DNA extract, reagent D (negative control), or reagent E (positive control). Do not vortex the sample before pipetting. Hermetically seal the wells of the plate or strips. It is important to avoid bubbles at the bottom of the wells by pipetting carefully. As an optional step to eliminate any bubbles, centrifuge the sealed PCR plate or the PCR strips (quick spin).
5. Place the plate or strips in the thermal cycler. Be sure to place the plate with the A1 well at the upper left corner. Close the reaction module.

Run PCR

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

The Application Protocol File "Crono Fast" has been NF Validated on production environmental samples category only.

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 or CFX Maestro 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 C_q values of each sample (the cycle at which the amplification curve crosses the threshold).

Section 7 Protocol

CFX Manager IDE Software or CFX Maestro IDE Software allows complete automated analysis for Bio-Rad real-time PCR detection systems. Verification of the typical characteristics of the amplification curves should be performed prior to releasing results. Contact your local Bio-Rad technical support team for additional support.

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>Cronobacter</i> spp. Detection (FAM channel)	Internal Control Detection (HEX channel)
Negative control	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Positive control	$26 \leq Cq \leq 36$	N/A

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

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

Samples

A positive iQ-Check *Cronobacter* spp. PCR test must show a typical amplification curve and a Cq value ≥ 10 for the FAM fluorophore.

- If the Cq value for both channels is below 10, verify that the raw data the 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 *Cronobacter* spp. test

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

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

Section 8 Confirmation of Positive Results

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>Cronobacter</i> spp. Detection (FAM channel)	Internal Control Detection (HEX channel)	Interpretation
Cq ≥ 10	N/A	Positive
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negative
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition*

* When both target 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

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

- Using classic tests described in the standardized methods ISO 22964:2017 by going back to the sample
- Using RAPID'Sakazakii chromogenic medium. Refer to the confirmation method in the RAPID'Sakazakii Agar user guide (document #10000127307)
 - For environmental samples, use the RAPID'Sakazakii method. Sub-culture 0.1 ml of sample in 10 ml of mLST prior to streaking on RAPID'Sakazakii Agar
 - For infant formula and cereal samples with and without probiotics (30 g), streak 10 µl of last enriched sample enrichment onto RAPID'Sakazakii Agar
 - For infant formula and cereal samples using PIF supplement (375 g), streak a 10 µl loop of the sample enriched in BPW + PIF supplement on RAPID'Sakazakii Agar
- Using any other method certified by NF VALIDATION based on a principle different from that used in the iQ-Check *Cronobacter* spp. PCR test. The validated protocol of this second method must be followed entirely
- In the case of discrepant results between the iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit and any of the confirmation options listed above, follow necessary steps to ensure valid results
- The enriched BPW + PIF supplement may be stored at 2–8°C for 72 hr maximum following the incubation at 37°C before carrying out the confirmation.

Section 9

Confirmation of Single Colonies Using iQ-Check Kit

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit may also be used for confirming single isolated *Cronobacter* spp. colonies on agar plates. This is officially validated by AFNOR Certification on RAPID[®] *Sakazakii* Agar.

1. Pick an isolated colony from a selective or nonselective agar plate with a toothpick, sterile loop, or other adapted consumable (for example, a pipet tip).
2. Resuspend the colony in 100 µl tryptone salt or distilled sterile water in a microcentrifuge tube. Homogenize using a vortexer.
3. Use 5 µl of the suspension with 45 µl of PCR mix (see D. Real-Time PCR, in Section 7 Protocol) and follow the rest of the iQ-Check *Cronobacter* spp. protocol for the data and result interpretation.

Section 10

Test Performance and Validations

The iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit is specific for the *Cronobacter* genus.

NF Validation



BRD 07/23 – 01/13

ALTERNATIVE ANALYTICAL
METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

iQ-Check *Cronobacter* spp. is certified NF VALIDATION as an alternative method to the reference method EN ISO 22964 (2017), for the detection of *Cronobacter* spp. in infant formulae and cereals and environmental samples. The validation followed the protocol of the NF EN ISO 16140: part 2 2016 standard and includes the use of the CFX96 and CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Detection Systems. The use of the iQ-Check Free DNA Removal Solution is validated. The associated software is the CFX Manager IDE Software (V2.2 and later) or CFX Maestro IDE Software (version 4.0 and later). The "Crono Fast" APF is also validated for all samples. Certificate number: BRD 07/23 – 01/13. Valid until: refer to the certificate available on the AFNOR Certification website.

Section 11

References

ISO 7218:2024. Microbiology of the food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination

ISO 22964. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.

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

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

Section 12

Revision History

Release date	Document number	Change
May 2020	10000128585 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Renewal and extension of AFNOR validation for: 375 g samples FDRS use as an option "Crono Fast" APF - New document design and update of references and content - Document number change – previous version 808473 REV D
December 2022	10000128585 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - AFNOR extension: CFX Opus Deepwell Real-Time PCR System and upgrade to CFX Manager Software IDE version 3.1 - Clarification of result interpretation protocol - Added new catalog numbers for consumables - Replaced protocol section with summary table - General content updates
December 2023	10000128585 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - Updated protocol table and confirmation method
December 2024	10000128585 Ver D	<ul style="list-style-type: none"> - Clarification of the infant formula and cereal w/ and w/o probiotics protocol
April 2025	10000128585 Ver E	<ul style="list-style-type: none"> - Validation extension for CFX Maestro Software IDE version 4.0 - Added the option to use an equivalent reference for vancomycin

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, μl	Amplification Mix Reagent C, μl	Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, μl	Amplification Mix Reagent C, μl	Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, μl	Amplification Mix Reagent 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

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

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit

Guide d'utilisation

Test pour la détection par PCR en temps réel de *Cronobacter* spp. dans les substituts de lait maternel, les céréales infantiles et les échantillons environnementaux

Référence — N° 3578137

BIO-RAD

Sommaire

Apartado 1.	Introduction.....	1
Apartado 2.	Technologie iQ-Check <i>Cronobacter</i> spp.....	1
Apartado 3.	Composants du kit.....	2
Apartado 4.	Durée de conservation et stockage	2
Apartado 5.	Matériel requis non fourni.....	3
	Matériel	3
	Produits.....	3
Apartado 6.	Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux	5
Apartado 7.	Protocole.....	7
	Enrichissement de l'échantillon.....	7
	Traitement de l'ADN libre.....	7
	Extraction de l'ADN	8
	PCR en temps réel.....	9
	Analyse des données.....	9
Apartado 8.	Confirmation des résultats positifs.....	11
Apartado 9.	Confirmation de colonies isolées à l'aide du kit iQ-Check	12
Apartado 10.	Performance du test et validations	12
Apartado 11.	Références.....	13
Apartado 12.	Historique des révisions.....	13
	Annexe — Guide de calcul du mélange de PCR	14

Section 1

Introduction

Cronobacter spp., initialement appelé *Enterobacter sakazakii*, est un agent pathogène ubiquitaire qui a été isolé à partir de sources alimentaires, environnementales et cliniques. Il est associé à de rares cas d'infection mortelle du nourrisson, en lien avec la consommation de substituts de lait maternel en poudre reconstitués. Les nourrissons avec un faible poids à la naissance et immunodéprimés, ainsi que les nouveau-nés (moins de quatre semaines), sont particulièrement exposés, compte tenu du taux de mortalité élevé (jusqu'à 80 %). Toutefois, les cas apparaissent le plus souvent chez les adultes.

La résistance du micro-organisme à la dessiccation, le faible nombre de cellules à l'origine de la maladie et le volume élevé de ventes de substituts de lait maternel ont amené de nombreuses autorités à surveiller l'agent pathogène. Par exemple, la réglementation européenne exige l'absence de la bactérie dans 10 g d'échantillon. De façon à respecter ces réglementations ainsi que les programmes HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points, système d'analyse des risques aux points critiques), les sociétés industrielles sont soumises à des cibles plus strictes et doivent sélectionner des méthodes spécifiques, à haute sensibilité. Les méthodes microbiologiques classiques offrent des résultats normalisés. Cependant, elles sont souvent longues et fastidieuses.

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit constitue un test qualitatif simple et rapide qui permet de détecter des séquences d'ADN propres à *Cronobacter* spp. dans les substituts du lait maternel et les échantillons environnementaux. Il est possible de traiter jusqu'à 94 échantillons pour obtenir un résultat fiable en moins de 24 hr. La souplesse du processus et la capacité élevée permettent alors de mettre en œuvre des mesures efficaces pour améliorer la sécurité et l'hygiène.

Section 2

Technologie iQ-Check *Cronobacter* spp.

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit est fondé sur l'amplification et la détection des gènes par PCR en temps réel. Les réactifs de PCR prêts à l'emploi contiennent des amorces d'ADN et une sonde d'ADN propre à *Cronobacter* spp., ainsi que de l'ADN polymérase et des nucléotides. La détection et l'analyse des données sont optimisées pour l'utilisation avec un instrument de PCR en temps réel Bio-Rad, comme le CFX96 Touch Deep Well System ou le CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Detection 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.

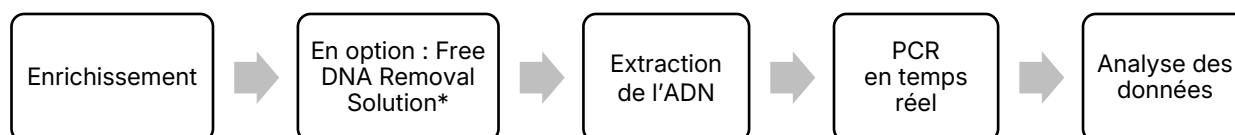
Au cours de la PCR en temps réel, des sondes spécifiques sont utilisées pour détecter l'ADN en s'hybridant avec les amplicons. Ces sondes sont liées à un fluorophore qui produit une

Section 3 Composants du kit

fluorescence uniquement lors d'une hybridation avec la séquence cible. Dans ce kit, FAM est le fluorophore qui s'hybride à la séquence d'ADN propre à *Cronobacter* spp. En l'absence d'ADN cible, aucune fluorescence ne sera détectée. Étant donné que le nombre d'amplicons augmente avec chaque cycle d'amplification, l'intensité de la fluorescence augmente également. Le module optique ou détecteur de l'instrument mesure cette fluorescence à l'étape d'hybridation pour chaque cycle de PCR. Le logiciel associé trace l'intensité de la fluorescence par rapport au nombre de cycles. Cette méthode permet une détermination aisée de la présence ou de l'absence de *Cronobacter* spp. dans un échantillon.

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

Le test iQ-Check peut détecter *Cronobacter* spp. dans les substituts du lait maternel, les céréales infantiles et les échantillons environnementaux préalablement enrichis en culture dans une eau peptonée tamponnée avec ou sans supplément. Voir Section 7 pour obtenir la liste des matrices associées à toutes les validations. Ce test comprend cinq étapes principales :



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

Section 3

Composants du kit

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit contient suffisamment de réactifs pour 96 tests (94 échantillons).

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

Section 4

Durée de conservation et stockage

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

Section 5

Matériel requis non fourni

Matériel

- Stomacher pour homogénéiser les échantillons de test
- Incubateur pour l'enrichissement microbiologique des échantillons
- Matériel spécifique pour extraction en tubes coniques stériles à bouchon fileté 1,5 ml
 - Centrifugeuse de paillasse (10 000–12 000 x g)
 - Bloc de chauffage à sec à 37 ± 2 °C et/ou 95–100 °C
 - Agitateur vibrant, tel que Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)
- 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
- Plaque d'agitation magnétique
- Micropipettes de 20, 200 et 1 000 µl
- Embouts pour pipettes à répétition ; stériles, emballés individuellement
- Système de PCR en temps réel de Bio-Rad*, par exemple CFX96 Touch Deep Well System (n° de référence 3600037) ou CFX Opus Deepwell System (n° de référence 17007991)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System pour l'extraction automatisée d'ADN et la préparation des plaques de PCR (n° de référence 3594911)

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

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

Produits

- Milieu d'enrichissement : Eau peptonée tamponnée (EPT) (par exemple BPW Plus, n° de référence 3564684, base déshydratée, 500 g ; n° de référence 3554179, 225 ml x 6 flacons ; n° de référence 3555790, 5 L x 2 poches ; n° de référence 3555795, 3 L x 4 poches ; ou BPW Standard, n° de référence 12013259, base déshydratée, 500 g ; n° de référence 12013258, base déshydratée, 5 kg ; n° de référence 12013260, 5 L x 2 poches)
- Supplément sélectif : Vancomycine (n° de référence 3564145, 5 g ou équivalent)
- PIF Supplement (n° de référence 12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (n° de référence 3594970)

Section 5 Matériel requis non fourni

- Produits spécifiques pour les échantillons environnementaux
 - Éponges d'échantillonnage environnemental
 - Écouvillons d'échantillonnage environnemental
 - Bouillon neutralisant pour éponges et écouvillons, par exemple, Dey-Engley (D/E), HiCap ou Lethen
- Produits spécifiques pour extraction en tubes
 - Tubes coniques à bouchon fileté 1,5 ml, stériles (n° de référence 17010678)
- Produits spécifiques pour extraction en plaque Deep Well
 - Plaque Deep Well de 96 puits (iQ-Check Deep Well Microplates, n° de référence 3594900)
 - Film à sceller en plastique (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, n° de référence 3590139)
 - Film à sceller préperforé (X-Pierce Films, n° de référence 3593977 ou Pre-Pierced Plate Sealing Film, 3600040, Amérique du Nord uniquement)
- Matériel spécifique pour iQ-Check Prep System
 - Récipient de dilution 60 ml (n° de référence 3594904)
 - Embouts à filtre (n° de référence 3594902 ou 12014486, 50 µl x 5 760 ; n° de référence 3594903 ou 12014483, 1 000 µl x 3 840)
 - Tubes de mélange de PCR (n° de référence 12016673, 5 ml x 25)
- RAPID'Sakazakii Agar (n° de référence 3563971, 90 mm x 20 boîtes ; n° de référence 3564976, 500 g)
- Plaques, tubes, ruban à sceller et bouchons pour PCR
- Embouts filtrants stériles adaptables pour micropipettes de 20, 200 et 1 000 µl
- Embouts pour pipettes Combitip ou pipettes à répétition équivalentes ; stériles, emballés individuellement
- Pipettes 1 et 10 ml
- Tubes à essai stériles de 2 et 5 ml
- Gants non poudrés
- Eau distillée stérile
- Eau de Javel, 5 %
- Agent nettoyant tel que DNA AWAY ou RNase AWAY

Section 6

Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux

- Ce test doit être réalisé par du personnel formé.
- Les femmes enceintes, enfants, personnes âgées et sujets immunodéprimés ne doivent pas être en contact avec ce test.
- 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: 2024 (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 *Cronobacter* spp. 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.

Section 6 Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux

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

Section 7

Protocole

A. Enrichissement de l'échantillon

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

Les milieux d'enrichissement doivent être portés à la température d'incubation appropriée (ambiante ou 37 °C selon le cas) avant utilisation. L'utilisation d'alpha-amylase est recommandée pour l'enrichissement des céréales et des produits amidonnés, conformément à la description de la norme ISO 6887-4.

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

NF VALIDATION BRD 7/23-01/13		
Domaine (matrices)	Préparation des échantillons	Enrichissement/Extraction de l'ADN
Échantillons environnementaux ^{1,2,3}	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon dans 9 x <i>n</i> ml d'EPT	Extraction Easy I <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incuber pendant 16–20 hr à 37 ± 1 °C ▪ Format tube/Deep Well
Substituts du lait maternel et céréales infantiles avec ou sans probiotiques (30 g) ^{1,2,3}	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml d'EPT + vancomycine puis procéder à une sous-culture dans l'EPT.	Protocole d'extraction Easy I <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incuber l'ETP + vancomycine pendant 18–22 hr à 37 ± 1 °C ▪ Réaliser une sous-culture dans l'ETP pendant 3–5 hr à 37 ± 1 °C ▪ Format tube/Deep Well
Substituts du lait maternel et céréales infantiles avec et sans probiotiques (jusqu'à 375 g) ^{1,4}	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 3 x <i>n</i> ml d'EPT + PIF Supplement préchauffé	Extraction Easy I <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incuber pendant 18–26 hr à 37 ± 1 °C ▪ Format tube/Deep Well

¹ La validation inclut également l'utilisation d'iQ-Check Free DNA Removal Solution et du fichier de protocole d'application « Crono Fast » pour un temps d'exécution PCR réduit. Contacter le représentant Bio-Rad pour obtenir davantage d'informations

² Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, les portions d'essai supérieures à 30 g n'ont pas été testées

³ Les échantillons enrichis peuvent être stockés à 2–8 °C pendant 48 hr après la fin de l'incubation à 37 °C. Le protocole d'extraction d'ADN Standard doit alors être appliqué. Contacter le représentant Bio-Rad pour obtenir davantage d'informations

⁴ Les échantillons enrichis peuvent être stockés à 2–8 °C pendant 72 hr après la fin de l'incubation à 37 °C

B. Traitement de l'ADN libre

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

C. Extraction de l'ADN

Recommandations générales :

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

Protocole Easy I

1. Aliquoter 100 µl du réactif de lyse homogénéisé (réactif A) dans des tubes ou dans les puits d'une plaque Deep Well.

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

2. Ajouter 100 µl d'échantillon enrichi.

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

3. Mélanger la solution par aspiration/refoulement avec la pipette jusqu'à homogénéisation.
4. Fermer les tubes ou sceller la plaque Deep Well avec un film préperforé.
5. Incuber les tubes dans le bloc de chauffage à 95–100 °C pendant 15– 20 min. Incuber la plaque Deep Well 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 au moins 2 min. La centrifugation est inutile pour les plaques Deep Well.

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

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

D. PCR en temps réel

Configuration de l'instrument et du logiciel

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

Préparation du mélange de PCR

1. Préparer le mélange de PCR contenant la solution d'amplification (réactif C) et les sondes fluorescentes (réactif B). Le volume de mélange de PCR nécessaire dépend du nombre d'échantillons et de contrôles à analyser. Au moins un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque PCR. Utiliser le tableau de pipettage de l'annexe pour trouver les volumes corrects pour chaque réactif.
2. Le mélange de PCR (réactifs B + C) doit être utilisé immédiatement après la préparation. Il est stable pendant 1 hr maximum à une température de 2–8 °C.
3. Pipetter 45 µl de ce mélange de PCR dans chaque puits en fonction de la plaque préparée.
4. Ajouter 5 µl d'extrait d'ADN, de réactif D (contrôle négatif) ou de réactif E (contrôle positif). Ne pas vortexer l'échantillon avant le pipettage. Sceller hermétiquement les puits de la plaque ou les bandes de tubes. Pipetter avec précaution afin d'éviter la formation de bulles au fond des puits. Étape facultative : centrifuger la plaque de PCR scellée ou les bandes de tubes (rotation rapide) afin d'éliminer les bulles éventuelles.
5. Placer la plaque ou les bandes de tubes dans le thermocycleur. Veiller à placer la plaque correctement, le puits A1 dans le coin supérieur gauche. Fermer le module réactionnel.

Lancement de la PCR

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

Le fichier de protocole d'application « Crono Fast » a été certifié par NF VALIDATION uniquement dans la catégorie d'échantillons environnementaux de production.

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 du logiciel CFX Manager IDE ou CFX Maestro IDE 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 ou CFX Maestro IDE assure une analyse automatisée complète des systèmes de détection par PCR en temps réel de Bio-Rad. Une vérification des caractéristiques typiques des courbes d'amplification doit être réalisée avant la publication des résultats. Contacter l'équipe d'assistance technique de Bio-Rad pour obtenir plus d'aide.

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

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

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

Échantillons

Un test PCR iQ-Check *Cronobacter* spp. **positif** doit présenter une courbe d'amplification typique et une valeur Cq ≥ 10 pour le fluorophore FAM.

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

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

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

Section 8 Confirmation des résultats positifs

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

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

*Lorsque la détection pour l'échantillon 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

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

- Mise en œuvre des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées ISO 22964:2017, directement à partir de l'échantillon.
- Utilisation du milieu chromogène RAPID'*Sakazakii*. Se reporter à la méthode de confirmation du guide d'utilisation RAPID'*Sakazakii* (document n° 10000127307)
 - Pour les échantillons environnementaux, utiliser la méthode RAPID'*Sakazakii*. Prélever 0,1 ml d'échantillon et l'ajouter à un tube de bouillon de mLST 10 ml avant de strier sur RAPID'*Sakazakii* Agar
 - Pour les échantillons de substituts de lait maternel et céréales infantiles avec et sans probiotiques (30 g), strier 10 µl du dernier enrichissement de l'échantillon sur la gélose RAPID'*Sakazakii*.
 - Pour les échantillons de de substituts de lait maternel et céréales infantiles utilisant le supplément PIF (375 g), étalez avec une öse de 10 µl l'échantillon enrichi en supplément EPT + PIF sur la gélose RAPID'*Sakazakii*.
- Utilisation de toute autre méthode certifiée par NF VALIDATION et basée sur un principe différent de celui utilisé dans le test PCR iQ-Check *Cronobacter* spp. Le protocole validé de cette seconde méthode doit être suivi dans sa totalité.
- En cas de résultats discordants entre iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit et l'une des options de confirmation énumérées ci-dessus, mettre en œuvre les étapes nécessaires pour garantir la validité des résultats
- Avant d'effectuer la confirmation, il est possible de stocker le mélange EPT + PIF Supplement enrichi à 2-8 °C pendant 72 hr maximum, à la suite de l'incubation à 37 °C.

Section 9

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

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit peut également être utilisé pour confirmer des colonies isolées de *Cronobacter* spp. sur milieux de culture gélosés. Cette méthode est officiellement validée par la certification AFNOR du milieu gélosé *RAPID'Sakazakii*.

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

Section 10

Performance du test et validations

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit est spécifiquement destiné à la détection du genre *Cronobacter*.



BRD 07/23 – 01/13

MÉTHODES ANALYTIQUES
ALTERNATIVES POUR
L'AGROALIMENTAIRE

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

NF VALIDATION

iQ-Check *Cronobacter* spp. est certifié NF VALIDATION comme méthode alternative à la méthode de référence EN ISO 22964 (2017) pour la détection de *Cronobacter* spp. dans les substituts du lait maternel, les céréales infantiles et les échantillons environnementaux. La validation respecte le protocole de la norme NF EN ISO 16140-2:2016 et inclut l'utilisation du système de détection par PCR en temps réel CFX96 et CFX Opus Deepwell. L'utilisation de iQ-Check Free DNA Removal Solution est validée. Le logiciel associé est CFX Manager IDE (version 2.2 et ultérieure) ou CFX Maestro IDE (version 4.0 et ultérieure). Le fichier de protocole d'application « Crono Fast » est également validé pour tous les échantillons. Numéro de certificat : BRD 07/23 – 01/13. Fin de validité : se reporter au certificat disponible sur le site Web AFNOR Certification.

Section 11

Références

ISO 7218 :2024 Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations.

ISO 22964 : Microbiologie de la chaîne alimentation – Méthode horizontale pour la recherche de *Cronobacter* spp.

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

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

Section 12

Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Mai 2020	10000128585 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Renouvellement et extension de la validation AFNOR pour : Échantillons de 375 g iQ-Check Free DNA Removal Solution (FDRS) en option Fichier de protocole d'application « Crono Fast » - Nouvelle conception de document et mise à jour des références et du contenu - Modification du numéro de document (version précédente 808473 REV D)
Décembre 2022	10000128585 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Extension AFNOR : Système de PCR en temps réel CFX Opus CFX Opus et mise à niveau vers CFX Manager Software IDE version 3.1 - Clarification du protocole d'interprétation des résultats - Ajout de nouvelles références pour les consommables - Remplacement de la section protocole avec un tableau récapitulatif - Mises à jour générales du contenu
Décembre 2023	10000128585 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - Tableau de protocole et méthode de confirmation mis à jour
Décembre 2024	10000128585 Ver D	<ul style="list-style-type: none"> - Clarification du protocole pour les substituts du lait maternel et céréales infantiles avec ou sans probiotiques
Avril 2025	10000128585 Ver E	<ul style="list-style-type: none"> - Extension de la validation pour le logiciel CFX Maestro IDE version 4.0 - Ajout de la possibilité d'utiliser une référence équivalente pour la vancomycine

Annexe — Guide de calcul du mélange de PCR

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

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

Visitez bio-rad.com/iqcheck pour plus d'informations.

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

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

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



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

*Life Science
Group*

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

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit

Anwenderhandbuch

Test zum Nachweis von *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrung und -zerealien sowie Umgebungsproben durch die Real-Time PCR

Katalog-Nr. 3578137

BIO-RAD

Inhaltsverzeichnis

Abschnitt 1.	Einleitung.....	1
Abschnitt 2.	Die iQ-Check <i>Cronobacter</i> spp.-Technologie.....	1
Abschnitt 3.	Zusammensetzung des Kits.....	2
Abschnitt 4.	Haltbarkeit und Lagerung.....	3
Abschnitt 5.	Zusätzlich benötigtes Material.....	3
	Geräte	3
	Zubehör	4
Abschnitt 6.	Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse	5
Abschnitt 7.	Protokoll	7
	Probenanreicherung.....	7
	Behandlung zur Entfernung freier DNA	8
	DNA-Extraktion	8
	Real-Time PCR.....	9
	Datenanalyse	9
Abschnitt 8.	Bestätigung positiver Ergebnisse	11
Abschnitt 9.	Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit.....	12
Abschnitt 10.	Testleistung und Testvalidierungen	12
Abschnitt 11.	Literatur	13
Abschnitt 12.	Revisionshistorie.....	14
	Anhang — Pipettiertabelle für das PCR-Reaktionsgemisch	15

Abschnitt 1

Einleitung

Cronobacter spp., vormals *Enterobacter sakazakii*, ist ein ubiquitär vorkommender Erreger, der aus Lebensmitteln, Umgebungsproben und klinischen Proben isoliert wurde. Er wird mit selten auftretenden, aber tödlichen Säuglingsinfektionen in Zusammenhang gebracht, die durch den Verzehr von Säuglingsnahrung, das aus Pulver hergestellt wird, ausgelöst werden.

Immungeschwächte Neugeborene mit niedrigem Geburtsgewicht und Neugeborene (Säuglinge unter vier Wochen) sind aufgrund der hohen Sterblichkeit (bis zu 80 %) besonders gefährdet, aber die meisten Fälle treten bei älteren Kindern auf.

Die Resistenz des Organismus gegen Trockenheit, die niedrigen Zellzahlen, die ausreichen, um eine Krankheit hervorzurufen, und das hohe Absatzvolumen von Babymilchprodukten haben viele Behörden zu entsprechenden Kontrollen in Bezug auf das Vorhandensein des Erregers veranlasst. Beispielsweise darf das Bakterium laut EU-Verordnung in 10 g Probe nicht nachweisbar sein. Zur Einhaltung der Vorschriften und der HACCP-Programme (Hazard Analysis and Critical Control Points) unterliegen Industrieunternehmen strengeren Sollwerten und müssen hochsensible und spezifische Methoden auswählen. Die klassischen mikrobiologischen Methoden liefern standardisierte Ergebnisse. Sie sind jedoch zeit- und arbeitsintensiv.

Das iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit ist ein einfacher und schneller qualitativer Test, der den Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen von *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrung und Umgebungsproben ermöglicht. Bis zu 94 Proben können gleichzeitig bearbeitet werden und zuverlässige Ergebnisse lassen sich in weniger als 24 hr erzielen. Dies ermöglicht einen flexibleren Arbeitsablauf und einen höheren Durchsatz zur Umsetzung wirksamer Maßnahmen zur Verbesserung von Sicherheit und Hygiene.

Abschnitt 2

Die iQ-Check *Cronobacter* spp.-Technologie

Das iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit beruht auf der Amplifizierung und dem Nachweis von Genen mittels Real-Time PCR. Die gebrauchsfertigen PCR-Reagenzien enthalten für *Cronobacter* spp. spezifische DNA-Primer und eine spezifische DNA-Sonde 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 oder CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Nachweissystems, 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.

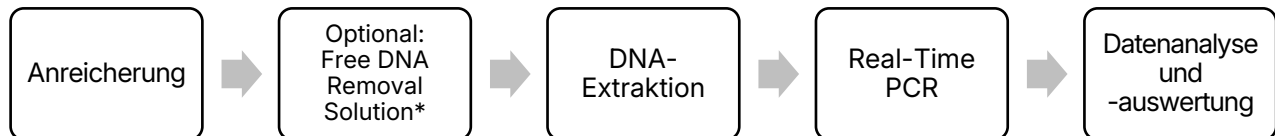
Bei der Real-Time PCR beruht der DNA-Nachweis auf der Hybridisierung spezifischer Sonden an die Amplikons während der Amplifikation. An diese Sonden ist ein Fluorophor gebunden, der nur

Abschnitt 3 Zusammensetzung des Kits

fluoresziert, wenn die Sonde an die Zielsequenz hybridisiert. Bei dem Fluorophor, der in diesem Kit an die Sonde gebunden ist, die mit der *Cronobacter* spp. spezifischen DNA-Sequenz hybridisiert, handelt es sich um FAM. Wenn keine Ziel-DNA vorhanden ist, ist keine Fluoreszenz nachweisbar. Da sich die Zahl der Amplikons mit jeder Amplifizierungsrunde erhöht, verstärkt sich auch die Fluoreszenzintensität. Beim Anlagerungs- bzw. Annealing-Schritt in jedem PCR-Zyklus misst das optische Modul bzw. der Detektor diese Fluoreszenz. Die Gerätesoftware trägt die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zyklen auf. Diese Methode ermöglicht eine einfache Bestimmung des Vorhandenseins bzw. Nichtvorhandenseins von *Cronobacter* spp. in einer Probe.

Das Reaktionsgemisch enthält eine interne DNA-Kontrolle aus synthetischer DNA. Diese Kontrolle wird gleichzeitig mit der *Cronobacter*-DNA-Zielsequenz mit einer spezifischen Sonde amplifiziert und durch einen zweiten Fluorophor nachgewiesen. Dies dient der Validierung eines etwaigen negativen Ergebnisses.

Mit dem iQ-Check Test kann *Cronobacter* spp. in allen Proben von Säuglingsnahrung- und -zerealien sowie Umgebungsproben nachgewiesen werden, die zuvor durch Kultur in gepuffertem Peptonwasser mit oder ohne Supplemente angereichert wurden. Abschnitt 7 enthält eine Auflistung aller Matrices mit den entsprechenden Validierungen. Der Test besteht aus fünf Hauptschritten:



* 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 *Cronobacter* spp. Kit enthält ausreichende Reagenzien für 96 Tests (94 Proben).

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

Abschnitt 4

Haltbarkeit und Lagerung

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

Abschnitt 5

Zusätzlich benötigtes Material

Geräte

- Labor-Paddel-Blender zum Homogenisieren von Testproben
- Inkubator zur mikrobiologischen Anreicherung der Proben
- Speziell für die Extraktion in sterilen konischen 1,5 ml Röhren mit Schraubdeckel
 - Tischzentrifuge (10.000–12.000 x g)
 - Heizzrockenblock mit 37 ± 2 °C und/oder 95–100 °C
 - Zellaufschlussgerät, z. B. Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)
- 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
- Magnetrührer
- Mikropipetten für 20 µl, 200 µl, 1.000 µl
- Spitzen für Mehrfachpipetten, steril, einzeln verpackt
- Bio-Rad Real-Time PCR System,* zum Beispiel das CFX96 Touch Deep Well (Katalog-Nr. 3600037) oder CFX Opus Deep Well (Katalog-Nr. 17007991)
- iQ-Check Prep System von Bio-Rad für die automatisierte DNA-Extraktion und PCR-Plattenvorbereitung (Katalog-Nr. 3594911)

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

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

Zubehör

- Anreicherungsmedium: Gepuffertes Peptonwasser (GPW; Buffered Peptone Water, z. B. BPW Plus, Katalog-Nr. 3564684, dehydriert, 500 g; Katalog-Nr. 3554179, 6 Flaschen x 225 ml; Katalog-Nr. 3555790, 2 Beutel x 5 L; Katalog-Nr. 3555795, 4 Beutel x 3 L; oder BPW Standard, Katalog-Nr. 12013259, dehydriert, 500 g; Katalog-Nr. 12013258, dehydriert, 5 kg; Katalog-Nr. 12013260, 2 Beutel x 5 L)
- Selektives Supplement: Vancomycin (Katalog-Nr. 3564145, 5 g oder gleichwertig)
- PIF Supplement (Katalog-Nr. 12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (Katalog-Nr. 3594970)
- Speziell für die Untersuchung von Umgebungsproben
 - Schwämme zur Gewinnung von Umgebungsproben
 - Tupfer zur Gewinnung von Umgebungsproben
 - Neutralisierungsmedium für Probennahme-Schwämme und -Tupfer, z. B. Dey-Engley (D/E) oder HiCap Neutralizing Broth oder Lethen Broth
- Speziell für die Extraktion in Röhrchen
 - Konische sterile 1,5 ml Röhrchen mit Schraubdeckel (Katalog-Nr. 17010678)
- 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)
 - Abdichtungsfolie für die PCR-Platte (X-Pierce Films, Katalog-Nr. 3593977 oder Pre-Pierced Plate Sealing Film, Katalog-Nr. 3600040, nur Nordamerika)
- Speziell für iQ-Check Prep System
 - 60 ml Verdünnungsbehälter (Katalog-Nr. 3594904)
 - Filterspitzen (Katalog-Nr. 3594902 oder 12014486, 5.760 x 50 µl; Katalog-Nr. 3594903 oder 12014483, 3.840 x 1.000 µl)
 - PCR-Mix Röhrchen (Katalog-Nr. 12016673, 25 x 5 ml)
- RAPID'*Sakazakii* Agar (Katalog-Nr. 3563971, 20 Agarplatten x 90 mm; Katalog-Nr. 3564976, dehydriert, 500 g)
- PCR-Platten, -Röhrchen, -Abdichtungsfolie und -Deckel
- Sterile Filterspitzen für 20 µl, 200 µl und 1.000 µl Mikropipetten
- Sterile, einzeln verpackte Spitzen für Combitip-Pipetten oder äquivalente Mehrfachpipetten
- 1 ml und 10 ml Pipetten
- Sterile 2 ml und 5 ml Teströhrchen

- Ungepuderte Handschuhe
- Destilliertes steriles Wasser
- 5%ige Bleichlösung
- Reinigungsmittel wie DNA AWAY oder RNase AWAY

Abschnitt 6

Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse

- Dieser Test muss von geschultem Personal durchgeführt werden.
- Schwangere, Kinder, ältere Menschen und immungeschwächte Personen sollten diese Methode nicht durchführen.
- 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 22174:2024 „Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln - Allgemeine Anforderungen und Begriffe“ beschriebenen Anforderungen einzuhalten.

- iQ-Check *Cronobacter* spp. 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 System kann zu Personenverletzungen oder Schäden am Gerät führen. Einige Komponenten können bei unsachgemäßer Handhabung aufgrund übermäßiger Hitze zu Personenverletzungen führen. Zur sicheren Verwendung darf das iQ-Check Prep System nur von qualifiziertem Laborpersonal verwendet werden, das entsprechend geschult wurde. Die Instrumente dürfen nur von Kundendiensttechnikern im Außendienst gewartet werden.
- Real-Time PCR Nachweissystem CFX96 Touch Deep Well oder CFX Opus Deepwell
 - Die unsachgemäße Verwendung des Real-Time PCR Nachweissystems CFX96 Touch oder CFX Opus Deep Well 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 Real-Time PCR Nachweissystem CFX96 Touch oder CFX Opus Deep Well nur von qualifiziertem Laborpersonal bedient werden, das entsprechend geschult wurde. Die Wartung des Geräts darf nur von Außendiensttechnikern von Bio-Rad durchgeführt werden.
- Anreicherung
 - Benutzer sollte alle Sicherheitsinformationen in der Anweisung des iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit lesen, verstehen und beachten. Die Sicherheitshinweise zum späteren Nachschlagen aufbewahren. Um die mit der Exposition gegenüber Chemikalien und biologischen Gefahren verbundenen Risiken zu verringern, sind Pathogentests in einem ordnungsgemäß ausgestatteten Labor unter der Kontrolle von geschultem Personal durchzuführen. Beim Umgang mit Reagenzien und kontaminierten Proben sind stets die üblichen Laborsicherheitspraktiken einzuhalten, beispielsweise sind geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille zu tragen. Den Kontakt mit dem Inhalt des Anreicherungsmediums und der Reagenzröhrchen nach der Anreicherung vermeiden. Angereicherte Proben im Einklang mit den aktuellen Branchenstandards entsorgen.
 - *Cronobacter* spp. ist ein Organismus der Biosicherheitsstufe 2. Biologische Proben, z. B. Anreicherungen, können Infektionskrankheiten übertragen. Es sind alle geltenden lokalen, staatlichen/regionalen und/oder nationalen Vorschriften zur Entsorgung von biologischen Abfällen einzuhalten. Geeignete Schutzausrüstung tragen. Dazu zählen u. a. Schutzbrille, Gesichtsschutz, Kleidung/Laborkittel und Handschuhe. Alle Arbeiten sollten in ordnungsgemäß ausgestatteten Einrichtungen unter Verwendung der entsprechenden Sicherheitsausrüstung (z. B. physikalische Eindämmungsvorrichtungen) durchgeführt werden. Mitarbeiter sollten vor der Arbeit mit potenziell infektiösen Materialien nach den geltenden Bestimmungen und Anforderungen der Firma/Institution geschult werden.

- Nach Abschluss der Tests sind alle Materialien und Medien, die möglicherweise Krankheitserreger enthalten, im Einklang mit den geltenden Industriestandards für die Entsorgung kontaminierter Abfälle zu dekontaminieren (d. h. 20 min bei 120 °C autoklavieren). Weitere Informationen und vor Ort geltende Entsorgungsvorschriften sind im Sicherheitsdatenblatt aufgeführt.

Abschnitt 7

Protokoll

A. Probenanreicherung

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

Das Anreicherungsmedium muss vor der Verwendung die geeignete Inkubationstemperatur (Umgebungstemperatur oder 37 °C, falls erforderlich) aufweisen. Für die Anreicherung von Zerealien oder Stärkeprodukten wird den Angaben in der Norm ISO 6887-4 entsprechend die Verwendung von Alpha-Amylase empfohlen.

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

NF VALIDATION BRD 7/23-01/13		
Umfang (Matrices)	Probenvorbereitung	Anreicherung/DNA-Extraktion
Umgebungsproben ^{1,2,3}	n g Probe in $9 \times n$ ml GPW homogenisieren.	Easy I Extraktion <ul style="list-style-type: none"> ▪ Für 16–20 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren. ▪ Röhrchen/Deep Well-Format
Säuglingsnahrung und -zerealien mit und ohne Probiotika (30 g) ^{1,2,3}	n g Lebensmittel in $9 \times n$ ml GPW + Vancomycin homogenisieren, dann Subkulturen in BPW anlegen.	Easy I- Extraktion <ul style="list-style-type: none"> ▪ BPW + Vancomycin für 18–22 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren. ▪ Für 3 – 5 h bei 37 ± 1 °C Subkulturen in BPW anlegen ▪ Röhrchen/Deep Well-Format
Säuglingsnahrung und -zerealien mit und ohne Probiotika, Zutaten (bis zu 375 g) ^{1,4}	n g Lebensmittel in $3 \times n$ ml vorgewärmtem GPW + PIF Supplement homogenisieren.	Easy I Extraktion <ul style="list-style-type: none"> ▪ Für 18–26 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren. ▪ Röhrchen/Deep Well-Format

¹ Die Validierung umfasst auch die Verwendung der iQ-Check Free DNA Removal Solution und der Anwendungsprotokolldatei „Crono Fast“ für eine kürzere PCR-Laufzeit. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihre Bio-Rad-Vertretung.

² Im Rahmen der NF VALIDATION wurden keine Mengen über 30 g getestet.

³ Die angereicherten Proben können nach dem Abschluss der Inkubation bei 37 °C für 48 hr bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Danach ist das Standardprotokoll zur DNA-Extraktion zu befolgen. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihre Bio-Rad-Vertretung.

⁴ Die angereicherten Proben können nach dem Abschluss der Inkubation bei 37 °C für 72 hr bei 2–8 °C aufbewahrt werden.

B. Behandlung zur Entfernung freier DNA

Das iQ-Check Free DNA Removal Solution ist eine ideale Methode zur Entfernung freier DNA. Es sind die Empfehlungen von Bio-Rad im Anwenderhandbuch zu beachten.

C. DNA-Extraktion

Allgemeine Empfehlungen:

- Den Heizblock oder den Thermoshaker zum Vorheizen einschalten, bevor mit dem Test begonnen wird. Auf 95–100 °C einstellen. Das Lysereagenz während des Pipettierens durch Rühren bei mittlerer Geschwindigkeit auf einer Magnetrührplatte in Suspension halten.
- Generell sollte vermieden werden, den Anreicherungsbeutel zu schütteln und große Lebensmittelfragmente in der Probe zu entnehmen. Bei Lebensmittelproben mit fettigem Überstand sollte die Probe knapp unterhalb dieser Schicht entnommen werden.
- Beim Öffnen von Röhrchen und Wells vorsichtig vorgehen, um eine mögliche Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Die Deep Well Platte kühlen, bevor direkt durch die vorpunktierte Abdichtungsfolie pipettiert wird.
- Den Magnetrührer verwenden, um das Lysereagenz in Suspension zu halten. Den Pipettiervorgang durchführen, während es bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt wird.
- Das Lysereagenz zuerst vorsichtig per Hand schütteln, um das Harz zu resuspendieren. Dann pipettieren, während der Flascheninhalt mit dem Magnetrührstäbchen bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt wird, um ihn in Suspension zu halten.

Protokoll Easy I

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

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

2. 100 µl der angereicherten Probe dazugeben.

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

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

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

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

D. Real-Time PCR

Konfiguration des Geräts und der Software

Zur Konfiguration von Gerät und Software sind die Anleitungen im Anwenderhandbuch des Real-Time PCR Systems für iQ-Check Kits zu beachten.

Vorbereitung des PCR-Reaktionsgemisches

1. Das PCR-Reaktionsgemisch mit der Amplifikationslösung (Reagenz C) und den fluoreszierenden Sonden (Reagenz B) vorbereiten. Das benötigte Volumen des PCR-Reaktionsgemisches hängt von der Anzahl der zu analysierenden Proben und Kontrollen ab. In jedem PCR-Lauf müssen mindestens eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden. Die korrekten Mengen jedes Reagenzes sind der Pipettiertabelle im Anhang zu entnehmen.
2. Das PCR-Reaktionsgemisch (Reagenz B + C) sofort nach der Zubereitung verwenden. Es ist bei 2–8 °C maximal 1 hr stabil.
3. Aus diesem PCR-Reaktionsgemisch dem jeweils verwendeten Platten-Layout entsprechend 45 µl in jedes Well pipettieren.
4. 5 µl DNA-Extrakt, Reagenz D (Negativkontrolle) oder Reagenz E (Positivkontrolle) zugeben. Die Probe vor dem Pipettieren nicht vortexen. Die Wells der Platte bzw. die Teststreifen hermetisch abdichten. Es ist wichtig, Luftblasen am Boden der Wells zu vermeiden, indem behutsam pipettiert wird. Optional kann die verschlossene PCR-Platte bzw. können die verschlossenen PCR-Streifen zur Beseitigung etwaiger Luftblasen kurz zentrifugiert werden.
5. Die Platte bzw. die Streifen in den Thermocycler stellen. Die Platte so positionieren, dass sich das Well A1 oben links befindet. Das Reaktionsmodul schließen.

Die PCR durchführen

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

Die Datei für das Anwendungsprotokoll „Crono Fast“ wurde lediglich in der Kategorie „Proben aus dem Erzeugungsumfeld“ nach der NF Validation-Methode validiert.

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 oder CFX Maestro IDE zu befolgen.

Ergebnisinterpretation

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

Die Software CFX Manager IDE oder CFX Maestro IDE ermöglicht eine vollständige automatisierte Analyse bei Verwendung von Real-Time PCR-Nachweissystemen von Bio-Rad. Vor der Freigabe der Ergebnisse sollten die typischen Charakteristika der Amplifikationskurven verifiziert werden. Wenn zusätzlicher Support gewünscht wird, ist der zuständige technische Kundendienst von Bio-Rad zu kontaktieren.

Kontrollen

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

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

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

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

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

Proben

Ein **positiver** iQ-Check *Cronobacter* spp. PCR-Test muss eine typische Amplifikationskurve und für den FAM-Fluorophor einen Cq-Wert von ≥ 10 ergeben.

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

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

- Die Probe gilt als **negativ** auf *Cronobacter* spp. wenn kein Cq-Wert im FAM-Kanal vorliegt und die interne Kontrolle einen Cq-Wert ≥ 28 aufweist.
- Falls auch für die interne Kontrolle kein Cq-Wert vorliegt (Cq = N/A), bedeutet dies, dass die PCR-Reaktion vermutlich gehemmt war. Die Probe muss verdünnt (mit 10 µl DNA-Extrakt eine 1:10-Verdünnung in destilliertem sterilem Wasser durchführen und dann 5 µl der Verdünnung testen) und die PCR wiederholt werden.
- Falls der Cq-Wert für die interne Kontrolle < 28 liegt, ist keine Interpretation des Ergebnisses möglich. Es ist zu überprüfen, ob der Schwellenwert korrekt platziert wurde oder ob es sich bei der Kurve 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:

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

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

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

Abschnitt 8

Bestätigung positiver Ergebnisse

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

- Durchführung klassischer Tests, die in den standardisierten ISO 22964:2017-Methoden beschrieben sind, unter Verwendung der Ausgangsprobe
- Verwendung des chromogenen RAPID'*Sakazakii* Mediums Es wird eine Bestätigung mit der im Anwenderhandbuch für RAPID'*Sakazakii* Agar genannten Methode empfohlen (Dokument-Nr. 10000127307)
 - Bei Umgebungsproben ist die RAPID'*Sakazakii* Methode anzuwenden. Anlegen einer Subkultur 0,1 ml Probe in 10 ml mLST vor dem Ausstreichen auf RAPID'*Sakazakii*-Agar
 - Für Säuglingsanfangsnahrung und Getreideproben mit und ohne Probiotika (30 g): 10 μ l der letzten angereicherten Probenanreicherung auf RAPID'*Sakazakii*-Agar ausstreichen
 - Für Säuglingsnahrungs- und Getreideproben mit PIF-Supplement (375 g): eine 10- μ l Impföse von der mit GPW + PIF-Supplement angereicherten Probe auf RAPID'*Sakazakii*-Agar ausstreichen
- Verwendung einer anderen von NF VALIDATION zertifizierten Methode, die auf einem anderen Prinzip als dem des iQ-Check *Cronobacter* spp. PCR-Tests beruht. Das validierte Protokoll dieser zweiten Methode muss vollständig durchgeführt werden.
- Bei abweichenden Ergebnissen zwischen dem iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit und einer der oben aufgeführten Bestätigungsmethoden sind die erforderlichen Schritte zu befolgen, um gültige Ergebnisse sicherzustellen.
- Das angereicherte GPW + PIF Supplement kann nach der Inkubation bei 37 °C maximal 72 hr bei 2–8 °C aufbewahrt werden, bevor die Bestätigung durchgeführt wird.

Abschnitt 9

Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit auch zum Bestätigen isolierter *Cronobacter* spp.-Einzelkolonien auf Agarplatten verwendet werden. Dies wurde von AFNOR Certification auf RAPID'Sakazakii Agar offiziell validiert.

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

Abschnitt 10

Testleistung und Testvalidierungen

Das iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit ist für die Gattung *Cronobacter* spezifisch.



BRD 07/23 – 01/13

ALTERNATIVE ANALYTICAL
METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

NF Validation

iQ-Check *Cronobacter* spp. ist von NF VALIDATION als alternative Methode zur Referenzmethode EN ISO 22964 (2017) zum Nachweis von *Cronobacter* spp. In Proben von Säuglingsnahrung und -zerealien sowie in Umgebungsproben zertifiziert. Die Validierung erfolgte nach der Norm NF EN ISO 16140: Teil 2 2016 und umfasst die Verwendung der Real-Time PCR Nachweissysteme CFX96 und CFX Opus Deepwell. Die Verwendung der iQ-Check Free DNA Removal Solution ist validiert. Die zugehörige Software ist die Software CFX Manager IDE oder die CFX Maestro IDE (ab Version 4.0). Die „Crono Fast“-APF ist ebenso für alle Proben validiert. Zertifikatnummer: BRD 07/23 – 01/13. Gültig bis: siehe das Zertifikat auf der Website von AFNOR Certification.

Abschnitt 11

Literatur

ISO 7218:2024. Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen

ISO 22964: Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Cronobacter* spp.

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

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

Abschnitt 12

Revisionshistorie

Freigabedatum	Dokumentnummer	Änderung
Mai 2020	10000128585 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Verlängerung und Erweiterung der AFNOR-Validierung für: 375 g Proben - Verwendung von FDRS als Option „Crono Fast“ APF - Neues Dokumentdesign und Aktualisierung der Quellenangaben und des Inhalts - Änderung der Dokumentnummer - vorhergehende Version 808473 REV D
Dezember 2022	10000128585 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - AFNOR Erweiterung: Real-Time PCR System CFX Opus Deepwell und Aktualisierung auf CFX Manager IDE Software Version 3.1 - Klarstellung des Ergebnisinterpretationsprotokolls - Neue Katalognummern für Verbrauchsmaterialien hinzugefügt - Protokollabschnitt durch Übersichtstabelle ersetzt - Generelle Aktualisierungen des Inhalts
Dezember 2023	10000128585 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - Aktualisierte Protokolltabelle und Bestätigungsmethode
Dezember 2024	10000128585 Ver D	<ul style="list-style-type: none"> - Klärung des Protokolls für Säuglingsnahrung und -zerealien mit und ohne Probiotika
April 2025	10000128585 Ver E	<ul style="list-style-type: none"> - Erweiterung der Validierung für Software CFX Maestro IDE Version 4.0 - Es wurde die Option hinzugefügt, eine gleichwertige Referenz für Vancomycin zu verwenden

Anhang — Pipettiertabelle für das PCR-Reaktionsgemisch

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

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

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

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

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

Alle hier genannten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit

Manuale d'uso

Test per la rilevazione PCR real-time del *Cronobacter* spp. nel latte artificiale, nei cereali per neonati e in campioni ambientali

Numero catalogo 3578137

BIO-RAD

Indice

Sezione 1.	Introduzione	1
Sezione 2.	Tecnologia iQ-Check <i>Cronobacter</i> spp.....	1
Sezione 3.	Componenti del kit	2
Sezione 4.	Validità e conservazione	2
Sezione 5.	Materiali necessari ma non inclusi	3
	Apparecchiatura.....	3
	Materiali	3
Sezione 6.	Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali	5
Sezione 7.	Protocollo	7
	Arricchimento del campione.....	7
	Trattamento per la rimozione del DNA libero	7
	Estrazione del DNA	8
	PCR real-time	9
	Analisi dei dati	9
Sezione 8.	Conferma dei risultati positivi	11
Sezione 9.	Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check.....	12
Sezione 10.	Esecuzione e convalida del test	12
Sezione 11.	Riferimenti bibliografici	13
Sezione 12.	Cronologia delle revisioni.....	13
	Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR.....	14

Sezione 1

Introduzione

Il *Cronobacter* spp., precedentemente noto come *Enterobacter sakazakii*, è un patogeno ubiquitario che è stato isolato da fonti alimentari, ambientali e cliniche. Viene associato a infezioni neonatali rare ma letali, correlate al consumo di latte artificiale in polvere ricostituito. I neonati e i bambini (con un'età inferiore alle quattro settimane) con una storia di scarso peso alla nascita e immunodepressione sono particolarmente a rischio a causa dell'elevato tasso di mortalità (fino all'80%), sebbene il maggior numero di casi si verifichi nella popolazione più anziana.

La resistenza dell'organismo alla disidratazione, lo scarso numero di cellule che è risultato essere la causa della malattia e l'elevato volume di vendite dei prodotti a base di latte per bambini hanno spinto diverse autorità a monitorare il patogeno. Ad esempio, il regolamento UE impone l'assenza di batteri in un campione da 10 g. Per ottemperare ai regolamenti e rispettare i programmi di analisi dei rischi e dei punti critici di controllo (HACCP), le aziende si prefiggono obiettivi più rigorosi e necessitano di selezionare metodi altamente sensibili e specifici. I metodi microbiologici classici producono risultati standardizzati ma sono tuttavia lunghi e noiosi.

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit è un test qualitativo semplice e rapido, che consente di rilevare sequenze specifiche di DNA di *Cronobacter* spp. nel latte artificiale e nei campioni ambientali. È possibile elaborare fino a 94 campioni per ottenere un risultato affidabile in meno di 24 hr. Ciò consente di contare su un flusso di lavoro più flessibile e su una produttività più elevata al fine di mettere in atto misure efficaci in grado di migliorare i livelli di sicurezza e igiene.

Sezione 2

Tecnologia iQ-Check *Cronobacter* spp.

Il iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit è un test basato sull'amplificazione e sulla rilevazione genica mediante PCR real-time. I reagenti per PCR pronti all'uso contengono primer di DNA e una sonda da DNA specifici per *Cronobacter* spp., oltre a una 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 di rilevazione tramite PCR real-time CFX96 Touch Deep Well System o CFX Opus Deepwell System.

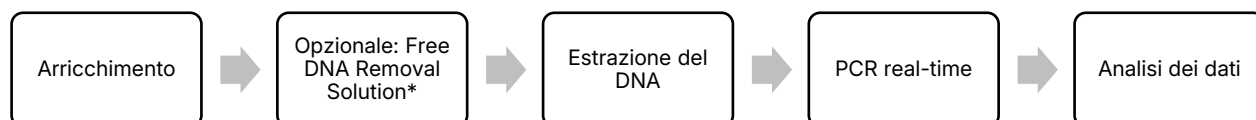
La PCR è una tecnica di grande efficacia impiegata per generare molteplici copie di DNA target. Durante la reazione PCR, diversi cicli di riscaldamento e raffreddamento consentono la denaturazione del DNA, con successivo appaiamento dei primer ad una regione target specifica. A questo punto la DNA polimerasi 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, determinate sonde rilevano il DNA durante l'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 in questo kit che esegue l'ibridazione alla sequenza di DNA specifica di *Cronobacter* spp. In assenza di DNA target, non verrà rilevata alcuna fluorescenza. Man mano che il numero di ampliconi aumenta a ogni ciclo

di amplificazione, l'intensità della fluorescenza aumenta a sua volta. Nella fase di appaiamento di ogni ciclo PCR, il modulo o rilevatore ottico misura questa fluorescenza. Il software associato allo strumento rileva l'intensità della fluorescenza rispetto al numero di cicli. Questo metodo consente di determinare in modo semplice la presenza o l'assenza di *Cronobacter* spp. in un campione.

Nella miscela di reazione è incluso un controllo interno del DNA sintetico. Tale controllo viene amplificato da una sonda specifica contemporaneamente alla sequenza di DNA target di *Cronobacter* e viene rilevato da un secondo fluoroforo. Ciò consente di convalidare eventuali risultati negativi.

Il test iQ-Check è in grado di rilevare la presenza di *Cronobacter* spp. in ogni tipo di latte artificiale, cereali per neonati e campioni ambientali precedentemente arricchiti da colture in acqua peptonata tamponata, con o senza supplemento. Consultare la sezione 7 per un elenco di matrici associate a tutte le convalide. Il test si articola in cinque fasi principali:



* Per le condizioni di utilizzo, si prega di consultare il manuale d'uso relativo all'iQ-Check Free DNA Removal Solution (numero 10000058391).

Sezione 3

Componenti del kit

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit contiene un numero di reagenti sufficiente per 96 test (94 campioni).

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

Sezione 4

Validità e conservazione

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

Sezione 5

Materiali necessari ma non inclusi

Apparecchiatura

- Omogeneizzatore da laboratorio per i campioni dei test
- Incubatore per l'arricchimento microbiologico dei campioni
- Materiali specifici per l'estrazione in provette da 1,5 ml coniche, sterili e con tappo a vite
 - Centrifuga da banco (10.000-12.000 x g)
 - Blocco termico a secco a 37 ± 2 °C e/o 95-100 °C
 - Dispositivo per il frazionamento cellulare, come Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)
- Materiali specifici per l'estrazione in una piastra Deep Well
 - Thermoagitatore* in grado di mantenere 37 ± 2 °C e/o 95-100 °C con una velocità di miscelazione di almeno 1300 rpm
- Vortex
- Piastra di agitazione magnetica
- Micropipette da 20 µl, 200 µl e 1000 µl
- Puntali per pipettatori a ripetizione, in confezione sterile e singola.
- Sistema PCR real-time di Bio-Rad;* ad esempio, i sistemi PCR real-time CFX96 Touch Deep Well System (n. catalogo 3600037) o CFX Opus Deepwell System (n. catalogo 17007991)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System per l'estrazione automatizzata del DNA e il setup delle piastre PCR (n. catalogo 3594911)

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

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

Materiali

- Terreno di arricchimento: Acqua peptonata tamponata (ad esempio, BPW Plus, n. catalogo 3564684, in forma disidratata, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 flaconi; 3555790, 5 L x 2 sacche; 3555795, 3 L x 4 sacche; BPW Standard, n. catalogo 12013259, in forma disidratata, 500 g; 12013258, in forma disidratata, 5 kg; 12013260, 5 L x 2 sacche)
- Supplemento selettivo: vancomicina (n. catalogo 3564145, 5 g o equivalente)
- PIF Supplement (n. catalogo 12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (n. catalogo 3594970)

Sezione 5 Materiali necessari ma non inclusi

- Materiali specifici per campioni ambientali
 - Spugne ambientali
 - Tamponi ambientali
 - Brodo neutralizzante per spugne e tamponi come Dey-Engley (D/E), HiCap Neutralizing Broth, o Letheen Broth
- Materiali specifici per l'estrazione in provette
 - Provette coniche sterili con tappo a vite da 1,5 ml (n. catalogo 17010678)
- Materiali specifici per l'estrazione in una piastra Deep Well
 - Piastra a 96 pozzetti profondi (iQ-Check Deep Well Microplates, n. catalogo 3594900)
 - Pellicola sigillante in plastica (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, n. catalogo 3590139)
 - Pellicola sigillante per piastre PCR (X-Pierce Films, n. catalogo 3593977 o Pre-Pierced Plate Sealing Film, n. catalogo 3600040, solo Nord America)
- Specifico per iQ-Check Prep System
 - Contenitore per la diluizione da 60 ml (n. catalogo 3594904)
 - Puntali con filtro (n. catalogo 3594902 o 12014486, 50 µl x 5.760; 3594903 o 12014483, 1.000 µl x 3.840)
 - Provette per miscela di PCR (n. catalogo 12016673, 5 ml x 25)
- RAPID'Sakazakii Agar (n. catalogo 3563971, 90 mm x 20 piastre; 3564976, in forma disidratata, 500 g)
- Piastre PCR, provette, nastro isolante 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
- Pipette da 1 e 10 ml
- Provette sterili per test da 2 e 5 ml
- Guanti senza polvere
- Acqua distillata sterile
- Candeggina, 5%
- Detergenti come DNA AWAY o RNase AWAY

Sezione 6

Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali

- Il presente test deve essere eseguito da personale addestrato
- Donne in stato di gravidanza, bambini, anziani e soggetti immunodepressi non devono eseguire il test
- I campioni e le colture di arricchimento devono essere manipolati come materiali potenzialmente infetti ed eliminati nel rispetto delle regole e normative locali
- Tutti i materiali potenzialmente infetti devono essere collocati in autoclave prima dello smaltimento
- La qualità dei risultati si basa sulla rigorosa osservanza delle buone pratiche di laboratorio (ad esempio, la norma EN ISO 7218), soprattutto in materia di PCR:
 - Non spostare mai apparecchiature da laboratorio (pipette, provette, ecc.) da una postazione di lavoro all'altra
 - Utilizzare sempre un controllo positivo e un controllo negativo per ciascuna serie di reazioni di amplificazione
 - Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza
 - Per garantire l'omogeneità dei reagenti del kit, miscelarli nel vortex prima di utilizzarli
 - Verificare periodicamente l'accuratezza e la precisione delle pipette, nonché il corretto funzionamento degli strumenti
 - Cambiare i guanti di frequente, in particolare se si sospetta la presenza di contaminazione
 - Pulire gli spazi di lavoro periodicamente con candeggina al 5% e altri prodotti disinfettanti come DNA AWAY
 - Utilizzare guanti senza polvere e non lasciare impronte digitali e scritte sui tappi delle provette. Entrambi interferiscono con l'acquisizione dei dati
- Si raccomanda vivamente di seguire i requisiti generali descritti nella norma EN ISO 22174:2024 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food pathogens — General requirements and definitions)
- iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit
 - Tutte le sostanze o miscele contenute nel kit per il test sono classificate come prodotti in conformità al sistema mondiale armonizzato (GHS). Il contatto con acidi potrebbe causare il rilascio di gas tossici. Se utilizzato correttamente, non sono necessarie precauzioni particolari. Se il prodotto viene inalato, portare il soggetto in una zona ben aerata e in caso di disturbi consultare un medico. Se il prodotto viene a contatto con gli occhi, sciacquarli mantenendoli aperti sotto l'acqua corrente per diversi minuti. In caso di ingestione del prodotto, indurre il vomito e contattare un medico

- iQ-Check Prep System
 - L'utilizzo improprio del iQ-Check Prep System potrebbe causare lesioni personali o danni allo strumento. Se manipolati in modo improprio, alcuni componenti potrebbero presentare un rischio di lesioni personali dovuto al calore eccessivo. Per garantire sicurezza, iQ-Check Prep System deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato e opportunamente addestrato. La manutenzione dello strumento deve essere eseguita solo dai tecnici di assistenza Bio-Rad
- Sistema di rilevazione mediante PCR real-time CFX96 Touch Deep Well System o CFX Opus Deepwell System
 - L'uso improprio del sistema di rilevazione tramite PCR real-time CFX96 Touch System o CFX Opus Deepwell System può 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 la sicurezza, il sistema di rilevazione tramite PCR real-time CFX96 Touch Deep Well System o CFX Opus Deep Well System deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio specializzato opportunamente addestrato. La manutenzione dello strumento deve essere eseguita solo dai tecnici di assistenza Bio-Rad
- Arricchimento
 - L'utente è tenuto a leggere, comprendere e osservare le informazioni relative alla sicurezza contenute nelle istruzioni del iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit. Conservare le istruzioni di sicurezza per consultazioni future. Per ridurre i rischi biologici e i rischi legati all'esposizione ai prodotti chimici, eseguire il test dei patogeni in un laboratorio adeguatamente attrezzato sotto il controllo di personale qualificato. Seguire sempre le pratiche di laboratorio standard sulla sicurezza, tra cui indossare gli indumenti protettivi e la protezione per gli occhi durante la manipolazione di reagenti e campioni contaminati. Evitare il contatto con il contenuto dei terreni di arricchimento e delle provette con i reagenti al termine dell'amplificazione. Smaltire i campioni arricchiti in conformità alle attuali norme industriali
 - I *Cronobacter* spp. sono organismi con livello di biosicurezza 2. I campioni biologici come gli arricchimenti sono in grado di trasmettere malattie infettive. Osservare ogni normativa locale, statale/provinciale e/o nazionale applicabile in materia di smaltimento di rifiuti biologici. Indossare dispositivi di protezione adeguati, che includono, a titolo esemplificativo, dispositivi di protezione per gli occhi, schermi per il viso, indumenti/camici da laboratorio e guanti. Tutti le operazioni devono essere eseguite in strutture adeguatamente attrezzate utilizzando gli idonei dispositivi di sicurezza (ad esempio, i dispositivi di contenimento fisico). Prima di lavorare con materiali potenzialmente infettivi, gli addetti devono ricevere una formazione che sia conforme alle disposizioni regolamentari in vigore e ai requisiti dell'azienda/ente
 - Una volta completati i test, tutti i materiali e i mezzi che potrebbero contenere patogeni devono essere decontaminati seguendo gli attuali standard di settore per lo smaltimento dei rifiuti contaminati (ossia, sterilizzazione in autoclave per 20 min a 120 °C). Per maggiori informazioni relative alle normative locali in materia di smaltimento, consultare la scheda di sicurezza

Sezione 7

Protocollo

A. Arricchimento del campione

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

Prima dell'uso i mezzi di arricchimento devono trovarsi alla giusta temperatura di incubazione (temperatura ambiente o 37 °C ove richiesto). Per l'arricchimento dei cereali o dei prodotti della fecola si consiglia di utilizzare l'alfa-amilasi, come descritto nella norma ISO 6887-4.

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

VALIDAZIONE NF BRD 7/23-01/13		
Oggetto (matrici)	Preparazione dei campioni	Arricchimento/Estrazione del DNA
Campioni ambientali ^{1,2,3}	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione in 9 x <i>n</i> ml di ATP	Estrazione Easy I <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubare per 16-20 hr a 37 ± 1 °C ▪ Formato provetta/Deep Well
Latte artificiale e cereali con e senza probiotici (30 g) ^{1,2,3}	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 9 x <i>n</i> ml di ATP + vancomicina poi subcoltivare in ATP	Estrazione Easy I <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubare in ATP + vancomicina per 18-22 hr a 37 ± 1 °C ▪ Subcoltivare in ATP per 3-5 hr a 37 ± 1 °C ▪ Formato provetta/Deep Well
Latte artificiale e cereali con e senza probiotici, ingredienti (fino a 375 g) ^{1,4}	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 3 x <i>n</i> ml di APT preriscaldata + supplemento PIF	Estrazione Easy I <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubare per 18-26 hr a 37 ± 1 °C ▪ Formato provetta/Deep Well

¹ La convalida include anche l'utilizzo della soluzione iQ-Check Free DNA Removal Solution e del file del protocollo applicativo "Crono Fast" per ridurre i tempi di esecuzione della PCR. Per ulteriori informazioni contattare il rappresentante Bio-Rad locale

² Nell'ambito della VALIDAZIONE NF, le aliquote di peso superiore a 30 g non sono state testate

³ I campioni arricchiti possono essere conservati a una temperatura tra 2-8 °C per 48 hr dopo la fine dell'incubazione a 37 °C. A questo punto occorre applicare il protocollo standard per l'estrazione del DNA. Per ulteriori informazioni contattare il rappresentante Bio-Rad locale

⁴ I campioni arricchiti possono essere conservati a una temperatura tra 2-8 °C per 72 hr dopo la fine dell'incubazione a 37 °C.

B. Trattamento per la rimozione del DNA libero

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

C. Estrazione del DNA

Raccomandazioni generali:

- Prima di iniziare il test, accendere il blocco termico o il thermoshaker per la funzione di preriscaldamento. Impostare a 95-100 °C. Durante il pipettaggio, mantenere in sospensione il reagente di lisi agitando a media velocità su una piastra di agitazione magnetica
- Di norma, evitare l'agitazione del sacco di arricchimento e la raccolta di grossi frammenti di residui alimentari. Per i campioni alimentari con un surnatante di grasso, raccogliere il campione appena al di sotto di questo strato
- Aprire con cautela le provette e i pozzetti per evitare possibili contaminazioni incrociate
- Raffreddare la piastra a pozzetti profondi pipettando direttamente attraverso la pellicola sigillante preforata
- Utilizzare la barra magnetica per mantenere in sospensione il reagente di lisi. Pipettare continuando a mescolare a velocità media
- Per risospendere la resina, per prima cosa agitare delicatamente a mano il reagente di lisi. Quindi pipettare mentre la barra magnetica di agitazione continua a mescolare il contenuto dei flaconi a velocità media, al fine di mantenerlo in sospensione

Protocollo Easy I

1. Trasferire un'aliquota di 100 µl di reagente di lisi omogeneizzato (reagente A) nelle provette o nei pozzetti di una piastra a pozzetti profondi

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

2. Aggiungere 100 µl di campione arricchito.

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

3. Miscelare la soluzione pipettando su e giù fino a ottenere l'omogeneizzazione.
4. Chiudere le provette o sigillare la piastra a pozzetti profondi con la pellicola sigillante preforata.
5. Incubare le provette nel blocco termico a 95-100 °C per 15-20 min. Incubare nel termoagitatore la piastra Deep Well con agitazione a 1300-1600 rpm a 95-100 °C per 15-20 min.
6. Miscelare le provette nel vortex ad alta velocità e centrifugare a 10.000-12.000 x g per almeno 2 min. La centrifugazione per la piastra Deep Well non è necessaria.

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

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

D. PCR real-time

Installazione strumento e software

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

Preparazione della miscela di PCR

1. Preparare la miscela di PCR contenente la soluzione di amplificazione (reagente C) e le sonde fluorescenti (reagente B). Il volume della miscela di PCR necessario dipende dal numero di campioni e controlli da analizzare. In ogni ciclo PCR devono essere inclusi almeno un controllo positivo e un controllo negativo. Per verificare i corretti volumi da impiegare per ogni reagente, consultare la tabella relativa al pipettaggio riportata in Appendice.
2. Utilizzare la miscela di PCR (reagenti B + C) immediatamente in seguito alla preparazione. Essa rimane stabile per massimo 1 hr a 2-8 °C.
3. Pipettare 45 µl di miscela di PCR in ogni pozzetto secondo lo schema analitico scelto.
4. Aggiungere 5 µl di estratto di DNA, reagente D (controllo negativo) o reagente E (controllo positivo). Non miscelare nel vortex il campione prima del pipettaggio. Sigillare ermeticamente i pozzetti della piastra o le strip. Pipettare con attenzione per evitare la formazione di bolle sul fondo dei pozzetti. Il passaggio opzionale per eliminare eventuali bolle consiste nel centrifugare la piastra PCR sigillata o le strip per PCR (rotazione rapida).
5. Posizionare la piastra o le strip nel termociclatore. Accertarsi di posizionare la piastra con il pozzetto A1 nell'angolo superiore sinistro. Chiudere il modulo di reazione.

Eeguire un ciclo PCR

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

Il file di protocollo applicativo "Crono Fast" ha ricevuto la convalida NF esclusivamente in riferimento alla categoria di campioni di produzione ambientale.

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 o CFX Maestro IDE.

Interpretazione dei risultati

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

Il software CFX Manager IDE o CFX Maestro IDE consente di completare un'analisi automatizzata per i sistemi di rilevazione PCR real-time Bio-Rad. È necessario eseguire la verifica delle caratteristiche

tipiche della curva di amplificazione prima di rilasciare i risultati. Per ulteriore supporto, contattare il proprio team di supporto tecnico Bio-Rad.

Controlli

Prima di interpretare i risultati dei campioni, verificare i controlli positivo e negativo.

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

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

* Il software indica un valore Cq (il ciclo in cui la curva di amplificazione supera la soglia) di N/A (non applicabile) quando la fluorescenza di un campione non aumenta in modo significativo al di sopra del rumore di fondo e di conseguenza non supera la soglia.

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

Campioni

Un test di PCR **positivo** iQ-Check *Cronobacter* spp. deve mostrare una curva di amplificazione tipica e 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, il test per *Cronobacter* spp. può essere considerato 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:

- Questo campione di *Cronobacter* spp. viene considerato **negativo** se non è presente alcun valore Cq nel canale FAM e il controllo interno ha un valore Cq ≥ 28
- Se il controllo interno non presenta a sua volta un valore Cq (Cq = N/A), ciò indica probabilmente un'inibizione della reazione PCR. È necessario diluire il campione (utilizzando 10 μ l di estratto di DNA, effettuare una diluizione 1:10 in acqua distillata sterile e quindi analizzare 5 μ l di diluizione) e ripetere la PCR
- Se il valore Cq per il controllo interno è < 28 , non è possibile interpretare il risultato. Verificare se la soglia è stata collocata correttamente o se la curva che deriva dai dati non elaborati è una regolare curva di amplificazione. Se la curva non possiede una forma caratteristica, sarà necessario ripetere il test PCR

L'interpretazione dei risultati dei campioni è riassunta nella seguente tabella:

Rilevazione <i>Cronobacter</i> spp. (canale FAM)	Rilevazione controllo interno (canale HEX)	Interpretazione
Cq ≥ 10	N/A	Positivo
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Inibizione*

* Quando sia il target che la rilevazione del controllo interno danno un valore Cq = N/A, occorre diluire il campione 1:10 e analizzarlo di nuovo.

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

Sezione 8

Conferma dei risultati positivi

Nell'ambito del metodo di certificazione di CONVALIDA NF, è necessario confermare tutti i risultati positivi dei kit iQ-Check nei seguenti modi:

- Utilizzando i classici test descritti nei metodi standardizzati ISO 22964:2017 risalendo al campione
- Utilizzando il terreno cromogenico RAPID'Sakazakii. Fare riferimento al metodo di conferma nel manuale d'uso per RAPID'Sakazakii Agar (documento 10000127307)
 - Per i campioni ambientali, usare il metodo RAPID'Sakazakii. Subcoltura 0,1 ml di campione in 10 ml di mLST prima dello striscio su RAPID'Sakazakii Agar
 - Per campioni di latte artificiale e cereali con e senza probiotici (30 g), strisciare 10 µl dell'ultimo step di arricchimento del campione su RAPID'Sakazakii Agar
 - Per i campioni di latte artificiale e cereali che arricchiti con il supplemento PIF (375 g), strisciare un'ansa da 10 µl del campione arricchito in APT + supplemento PIF su RAPID'Sakazakii Agar
- Utilizzando qualsiasi altro metodo certificato dalla CONVALIDA NF in base a un principio diverso da quello alla base del test PCR iQ-Check *Cronobacter* spp. È necessario seguire interamente il protocollo convalidato di questo secondo metodo
- In caso di risultati discrepanti tra il iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit e una qualunque delle opzioni di conferma sopraelencate, seguire i passaggi necessari al fine di garantire risultati validi.
- Prima di procedere con la conferma, è possibile conservare APT arricchito + supplemento PIF a 2-8 °C per un massimo di 72 hr in seguito a incubazione a 37 °C.

Sezione 9

Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit può essere utilizzato anche per la conferma di singole colonie isolate di *Cronobacter* spp. su piastre di agar. La conferma ufficiale proviene dalla certificazione AFNOR su RAPID'Sakazakii Agar.

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

Sezione 10

Esecuzione e convalida del test

Il iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit è specifico per il gene del *Cronobacter*.



BRD 07/23 – 01/13

METODI ANALITICI
ALTERNATIVI
PER IL SETTORE
AGROALIMENTARE

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

Validazione NF

iQ-Check *Cronobacter* spp. è certificato con la CONVALIDA NF come metodo alternativo al metodo di riferimento EN ISO 22964 (2017), per la rilevazione del *Cronobacter* spp. nel latte artificiale, nei cereali per neonati e nei campioni ambientali. La convalida ha seguito il protocollo della norma NF EN ISO 16140: parte 2 2016 e comprende l'utilizzo dei sistemi di rilevazione PCR real-time CFX96 e CFX Opus Deepwell. L'uso del iQ-Check Free DNA Removal Solution è stato validato. Il software associato è il software CFX Manager IDE Software (V2.2. e successive) o CFX Maestro IDE (versione 4.0 e successive). Anche l'APF "Crono Fast" è convalidato per tutti i campioni. Numero di certificato: BRD 07/23 – 01/13. Validità fino a: fare riferimento al certificato disponibile sul sito Web della certificazione AFNOR.

Sezione 11

Riferimenti bibliografici

ISO 7218:2024. Microbiology of the food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination

ISO 22964. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.

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

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

Sezione 12

Cronologia delle revisioni

Data di rilascio	Numero di documento	Modifica
Maggio 2020	10000128585 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Rinnovo ed estensione della validazione AFNOR per: Campioni 375 g Utilizzo di FDRS come opzione APF "Crono Fast" - Nuova struttura del documento e aggiornamento di riferimenti e contenuto - Modifica al numero di documento – versione precedente 808473 REV D
Dicembre 2022	10000128585 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Estensione AFNOR: Sistema di PCR real-time CFX Opus Deepwell e aggiornamento alla versione 3.1 del software CFX Manager IDE Software - Chiarimento del protocollo di interpretazione dei risultati - Aggiunti nuovi numeri di catalogo per i materiali di consumo - Sostituita sezione del protocollo con tabella di riepilogo - Aggiornamenti generali dei contenuti
Dicembre 2023	10000128585 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - Aggiornamento della tabella dei protocolli e del metodo di conferma
Dicembre 2024	10000128585 Ver D	<ul style="list-style-type: none"> - Chiarimenti sul protocollo per il latte artificiale e i cereali con e senza probiotici
Aprile 2025	10000128585 Ver E	<ul style="list-style-type: none"> - Estensione di convalida per il software CFX Maestro IDE versione 4.0 - È stata aggiunta l'opzione di utilizzare un riferimento equivalente per la vancomicina

Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR

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

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

Per maggiori informazioni, visitare il sito bio-rad.com/iqcheck.

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

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

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



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit

Guia do usuário

Teste para a detecção por PCR em tempo real de *Cronobacter* spp. na fórmula infantil, cereal infantil e amostras ambientais

Nº do catálogo 3578137

BIO-RAD

Índice

Seção 1.	Introdução	1
Seção 2.	Tecnologia iQ-Check <i>Cronobacter</i> spp.....	1
Seção 3.	Componentes do kit	2
Seção 4.	Prazo de validade e armazenamento	2
Seção 5.	Materiais necessários, mas não fornecidos	3
	Equipamento	3
	Suprimentos	3
Seção 6.	Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados	5
Seção 7.	Protocolo	7
	Enriquecimento da amostra	7
	Tratamento de remoção de DNA livre.....	7
	Extração de DNA	7
	PCR em Tempo Real	8
	Análise de dados	9
Seção 8.	Confirmação de Resultados Positivos.....	11
Seção 9.	Confirmação de Colônias Isoladas usando o iQ-Check Kit	11
Seção 10.	Desempenho e validação do teste	12
Seção 11.	Referências	12
Seção 12.	Histórico de Revisão	13
	Apêndice – Guia de Cálculo da Mistura de PCR	14

Seção 1

Introdução

O *Cronobacter* spp., anteriormente denominado *Enterobacter sakazakii*, é um patógeno onipresente que foi isolado a partir de fontes alimentares, ambientais e clínicas. Ele está associado a infecções infantis raras, mas fatais, ligadas ao consumo de fórmula infantil em pó reconstituída. Recém-nascidos com baixo peso ao nascer e imunocomprometidos, assim como neonatos (bebês com menos de quatro semanas de idade), estão particularmente em risco devido à alta taxa de mortalidade (até 80%), mas o maior número de casos ocorre em populações mais velhas.

A resistência do organismo à dessecação, os baixos números de células que causam doenças e o alto volume de vendas de leite industrializado para bebês levaram muitas autoridades a monitorar o patógeno. Por exemplo, o regulamento da UE exige ausência da bactéria em 10 g de amostra. Para cumprir os regulamentos e os programas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), as empresas industriais têm metas mais rígidas e precisam selecionar métodos altamente sensíveis e específicos. Os métodos microbiológicos clássicos oferecem resultados padronizados. Eles são, no entanto, longos e tediosos.

O iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit é um teste qualitativo simples e rápido que permite a detecção de sequências de DNA específicas do *Cronobacter* spp. em fórmulas infantis e amostras ambientais. Até 94 amostras podem ser processadas para obter um resultado confiável em menos de 24 hr. Isso permite um fluxo de trabalho mais flexível e uma taxa de transferência mais alta para implementar medidas eficazes para melhorar a segurança e a higiene.

Seção 2

Tecnologia iQ-Check *Cronobacter* spp.

O iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit é um teste baseado na amplificação de genes e detecção por PCR em tempo real. Os reagentes de PCR prontos para uso contêm iniciadores de DNA e uma sonda de DNA específica para *Cronobacter* spp., bem como DNA polimerase e nucleotídeos. A detecção e a análise de dados são otimizadas para uso com um instrumento de PCR em tempo real da Bio-Rad, como o sistema de detecção PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well System ou CFX Opus Deepwell System.

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

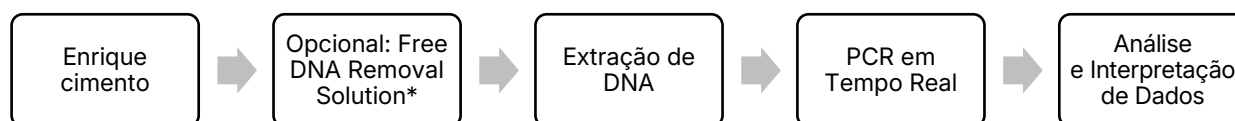
Na PCR em tempo real, sondas específicas detectam o DNA durante a amplificação por hibridação dos amplicons. Estas sondas estão ligadas a um fluoróforo, que apresenta fluorescência apenas quando hibridizado à sequência-alvo. FAM é o fluoróforo ligado à sonda neste kit que hibrida com a sequência de DNA específica de *Cronobacter* spp. Na ausência de DNA-alvo, não será observada fluorescência. Como o número de amplicons aumenta em cada rodada de amplificação, a intensidade da fluorescência aumenta também. Na fase de hibridação (annealing) de cada ciclo de PCR, o módulo

Seção 3 Componentes do kit

óptico ou detector mede essa fluorescência. O software associado ao instrumento plota a intensidade da fluorescência em relação ao número de ciclos. Esse método permite uma determinação simples da presença ou ausência da *Cronobacter* spp. em uma amostra.

Um controle interno de DNA sintético é incluído na mistura da reação. Este controle é amplificado com uma sonda específica ao mesmo tempo que a sequência-alvo de *Cronobacter*, e é detectado por um segundo fluoróforo. Isso permite a validação de qualquer resultado negativo.

O teste iQ-Check pode detectar *Cronobacter* spp. em todas as fórmulas infantis, cereais infantis e amostras ambientais previamente enriquecidas por cultura em água peptonada tamponada com ou sem suplemento. Consulte a Seção 7 para obter uma lista de matrizes associadas a todas as validações. O teste inclui cinco etapas principais:



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

Seção 3

Componentes do kit

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

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

Seção 4

Prazo de validade e armazenamento

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

Seção 5

Materiais necessários, mas não fornecidos

Equipamento

- Liquidificador de laboratório para homogeneizar amostras de teste
- Incubadora para enriquecimento microbiológico de amostras
- Específico para extração em tubos estéreis de tampa de rosca cônica de 1,5 ml
 - Centrífuga de bancada (capaz de 10.000–12.000 x g)
 - Bloco para banho seco a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ e/ou $95\text{--}100^\circ\text{C}$
 - Disruptor celular, como um Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)
- Específico para extração em placa Deep Well
 - Agitador térmico de aquecimento* capaz de manter $37 \pm 2^\circ\text{C}$ e/ou $95\text{--}100^\circ\text{C}$, com uma velocidade de mistura de pelo menos 1.300 rpm
- Vortexer
- Placa de agitação magnética
- Micropipetas de 20, 200 e 1.000 μl
- Pontas para pipetadores de repetição, estéreis, embalagem individual
- Sistema de PCR em tempo real da Bio-Rad*; por exemplo, os sistemas de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well (nº do catálogo 3600037) ou CFX Opus Deepwell (nº do catálogo 17007991)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System para extração automatizada de DNA e configuração de placas de PCR (nº do catálogo 3594911)

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

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

Suprimentos

- Meio de enriquecimento: Água Peptonada Tamponada (APT) (por exemplo, BPW Plus, nº do catálogo 3564684, desidratado, 500 g, 3554179, 225 ml x 6 frascos, 3555790, 5 L x 2 sacos, 3555795, 3 L x 4 sacos, ou BPW Standard, nº do catálogo 12013259, desidratado, 500 g, 12013258, desidratado, 5 kg, 12013260, 5 L x 2 sacos)
- Suplemento seletivo: Vancomicina (nº 3564145, 5 g ou equivalente)
- PIF Supplement (nº do catálogo 12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (nº do catálogo 3594970)

Seção 5 Materiais necessários, mas não fornecidos

- Específico para amostras ambientais
 - Esponjas ambientais
 - Esfregãos ambientais
 - Caldo neutralizante para esponjas e cotonetes, como Dey-Engley (D/E) ou HiCap Neutralizing Broth ou Lethen Broth
- Específico para extração em tubos
 - Tubos com tampa cônica de rosca de 1,5 ml, estéreis (nº do catálogo 17010678)
- 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 de placa PCR (X-Pierce Films, nº do catálogo 3593977, ou Pre-Pierced Plate Sealing Film, nº do catálogo 3600040, somente América do Norte)
- Específico para iQ-Check Prep System
 - Recipiente de diluição de 60 ml (nº do catálogo 3594904)
 - Pontas de filtro (nº do catálogo 3594902 ou 12014486, 50 µl x 5.760; 3594903 ou 12014483, 1.000 µl x 3.840)
 - Tubos de mistura de PCR (nº do catálogo 12016673, 5 ml x 25)
- RAPID'Sakazakii Agar(nº do catálogo 3563971, 90 mm x 20 placas; 3564976, desidratado, 500 g)
- Placas de PCR, tubos, fitas e tampas de vedação
- Pontas de filtro estéreis adaptáveis a micropipetas de 20, 200 e 1.000 µl
- Pontas para Pipetas Combitip ou pipetadores de repetição equivalentes, estéreis, embalados individualmente
- Pipetas de 1 e 10 ml
- Tubos de ensaio estéreis de 2 e 5 ml
- Luvas sem talco
- Água estéril destilada
- Alvejante, 5%
- Agente de limpeza, como o DNA AWAY ou o RNase AWAY

Seção 6

Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados

- Este teste deve ser realizado por pessoal treinado
- Gestantes, crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos não devem realizar esse método
- Amostras e culturas de enriquecimento devem ser manuseadas como material potencialmente infeccioso e descartadas de acordo com as regras e regulamentos locais
- Todos os materiais potencialmente infecciosos devem passar por autoclavagem antes do descarte
- A qualidade dos resultados depende do estrito cumprimento das Boas Práticas de Laboratório (por exemplo, a norma EN ISO 7218), especialmente em relação ao PCR:
 - Nunca circule equipamentos de laboratório (pipetas, tubos etc.) de uma estação de trabalho para outra
 - Sempre use um controle positivo e um controle negativo para cada série de reações de amplificação
 - Não utilize reagentes após a expiração de suas datas de validade
 - Agite os reagentes do kit antes de utilizá-los, de modo a garantir a homogeneidade
 - Verifique periodicamente a exatidão e precisão das pipetas, bem como o correto funcionamento dos instrumentos
 - Troque frequentemente de luvas, especialmente se suspeitar que estão contaminadas
 - Limpe os espaços de trabalho periodicamente com 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 na aquisição de dados
- Recomenda-se fortemente o cumprimento dos requisitos gerais descritos na norma EN ISO 22174:2024 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food pathogens — General requirements and definitions)
- iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit
 - Todas as substâncias ou misturas no kit de teste são produtos classificados, de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado (GHS). O contato com ácidos pode causar a liberação de gases tóxicos. Nenhuma precaução especial é necessária, se usado corretamente. Se o produto for inalado, forneça ar fresco e consulte um médico em caso de queixas. Após o contato dos olhos com o produto, enxágue os olhos abertos por vários minutos em água corrente. Se os produtos forem ingeridos, provoque vômito e procure ajuda médica.

Seção 6 Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados

- iQ-Check Prep System
 - O uso inadequado do iQ-Check Prep System pode causar ferimentos pessoais ou danos ao instrumento. Alguns componentes podem representar um risco de ferimentos pessoais devido ao calor excessivo, se manuseados incorretamente. Para uso seguro, o 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 System ou CFX Opus Deepwell System
 - O uso inadequado do Sistema de PCR em tempo real CFX96 Touch ou CFX Opus 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 ou CFX Opus 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, compreender e seguir todas as informações de segurança contidas nas instruções do iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit. Guarde as instruções de segurança para referência futura. Para reduzir os riscos associados à exposição a produtos químicos e riscos biológicos, realize testes de patógenos em um laboratório devidamente equipado, sob o controle de pessoal treinado. Sempre siga as práticas padrão de segurança do laboratório, incluindo o uso de vestuário de proteção e proteção ocular adequados ao manusear reagentes e amostras contaminadas. Evite o contato com o conteúdo do meio de enriquecimento e dos tubos de reagentes após a amplificação. Descarte amostras enriquecidas de acordo com as normas atuais do setor
 - *Cronobacter* spp. são organismos de nível 2 de biossegurança. Amostras biológicas, como enriquecimentos, têm o potencial de transmitir doenças infecciosas. Siga todos os regulamentos locais, estaduais/provinciais e/ou nacionais aplicáveis sobre o descarte de resíduos biológicos. Use equipamento de proteção adequado, que inclua, entre outros, óculos de proteção, proteção facial, roupas/jaleco e luvas. Todo o trabalho deve ser realizado em instalações adequadamente equipadas, utilizando o equipamento de segurança apropriado (por exemplo, dispositivos de contenção física). Os indivíduos devem ser treinados de acordo com os requisitos regulamentares e da empresa/instituição aplicáveis antes de trabalhar com materiais potencialmente infecciosos
 - Quando o teste estiver concluído, todos os materiais e meios possivelmente contendo patógenos devem ser descontaminados, seguindo as normas atuais da indústria para o descarte de resíduos contaminados (ou seja, autoclave por 20 min a 120°C). Consulte a folha de dados de segurança para obter informações adicionais e regulamentos locais para descarte

Seção 7

Protocolo

A. Enriquecimento da amostra

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

O meio de enriquecimento deve estar na temperatura de incubação adequada (ambiente ou 37°C, quando necessário) antes do uso. O uso de alfa-amilase é recomendado para enriquecimento de cereais ou produtos amiláceos, conforme descrito na norma ISO 6887-4.

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

NF VALIDATION BRD 7/23-01/13		
Escopo (Matrizes)	Preparação da amostra	Enriquecimento/Extração de DNA
Amostras ambientais ^{1,2,3}	Homogeneize <i>n</i> g de amostra em 9 x <i>n</i> ml de APT	Extração Easy I <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar por 16–20 hr a 37 ± 1°C ▪ Formato do tubo/Deep Well
Fórmula infantil e cereais com e sem probióticos (30 g) ^{1,2,3}	Homogeneize <i>n</i> g de alimento em 9 x <i>n</i> ml em APT+ vancomicina em seguida, faça uma subcultura em APT	Extração Easy I <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar APT+ vancomicina por 18–22 hr a 37 ± 1°C ▪ Realizar subcultura em APT 3-5 hr a 37 ± 1°C ▪ Formato do tubo/Deep Well
Fórmula infantil e cereais com e sem probióticos, ingredientes (até 375 g) ^{1,4}	Homogeneize <i>n</i> g de alimento em 3 x <i>n</i> ml de APT pré-aquecida + suplemento PIF	Extração Easy I <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar por 18–26 hr a 37 ± 1°C ▪ Formato do tubo/Deep Well

¹ A validação também inclui o uso da Free DNA Removal Solution e do arquivo de protocolo de aplicação "Crono Fast" para um tempo de execução de PCR reduzido. Entre em contato com seu representante da Bio-Rad para obter mais informações

² No escopo da NF VALIDATION, porções de teste pesando mais de 30 g não têm sido testadas

³ As amostras enriquecidas podem ser armazenadas de 2 a 8°C por 48 hr após o final da incubação a 37°C (o protocolo padrão de extração de DNA deve ser aplicado). Entre em contato com seu representante da Bio-Rad para obter mais informações

⁴ As amostras enriquecidas podem ser armazenadas de 2 a 8°C por 72 hr após o final da incubação a 37°C

B. Tratamento de remoção de DNA livre

O iQ-Check Free DNA Removal Solution fornece uma maneira ideal de remover DNA livre. Siga as recomendações da Bio-Rad no guia do usuário.

C. Extração de DNA

Recomendações gerais:

- 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.
- 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

Seção 7 Protocolo

- Abra os tubos e os poços com cuidado para evitar possíveis contaminações cruzadas
- Resfrie a placa Deep Well antes de pipetar diretamente através do filme de vedação pré-perfurado
- Use a barra magnética para manter o reagente de lise em suspensão. Pipete enquanto estiver mexendo em velocidade média
- Agite suavemente o reagente de lise manualmente primeiro para ressuspender a resina. Pipete enquanto a barra de agitação magnética mexe o conteúdo da ampola a uma velocidade média para manter o conteúdo em suspensão

Protocolo Easy I

1. Alíquote 100 µl de reagente lise homogeneizado (reagente A) para tubos ou poços de uma placa Deep Well.

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

2. Adicione 100 µl de amostra enriquecida.

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

3. Misture a solução pipetando para cima e para baixo até homogeneizar.
4. Feche os tubos ou sele a placa Deep Well com filme de vedação pré-perfurado.
5. Incube os tubos no bloco de calor a 95–100°C por 15–20 min. Incube a placa Deep Well na incubadora sob agitação a 1.300–1.600 rpm a 95–100°C por 15–20 min.
6. Agite no vórtex os tubos em alta velocidade e depois centrifugue a 10.000–12.000 x g por pelo menos 2 min. A centrifugação não é necessária para a placa Deep Well.

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

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

D. PCR em Tempo Real

Configuração do instrumento e do software

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

Preparação da mistura de PCR

1. Prepare a mistura de PCR contendo a solução de amplificação (reagente C) e as sondas fluorescentes (reagente B). O volume de mistura de PCR necessário depende do número de amostras e controles a serem analisados. Devem ser incluídos pelo menos um controle positivo e um controle negativo em cada execução da PCR. Use a tabela de pipetagem no apêndice para encontrar os volumes corretos a serem usados para cada reagente.
2. Use a mistura de PCR (reagentes B + C) imediatamente após a preparação. Ela é estável por 1 hr no máximo a 2–8°C.

Seção 7 Protocolo

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

Execute o PCR

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

O arquivo do protocolo de aplicação "Crono Fast" foi validado pela NF apenas na categoria de amostras ambientais de produção.

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 ou CFX Maestro IDE correspondente para abrir arquivos de dados e definir os parâmetros de análise de dados.

Interpretação de resultados

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

O software CFX Manager IDE ou CFX Maestro IDE permite análises automatizadas completas para sistemas de detecção de PCR em tempo real da Bio-Rad. Uma verificação das características típicas das curvas de amplificação deve ser realizada antes da liberação dos resultados. Entre em contato com a equipe de suporte técnico da Bio-Rad se for necessário suporte adicional.

Controles

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

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

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

* O software indica um valor de Cq (o ciclo no qual a curva de amplificação ultrapassa o limite) de N/A (não aplicável) quando a fluorescência de uma amostra não aumenta significativamente acima do ruído de fundo e, portanto, não ultrapassa o limite.

Seção 7 Protocolo

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

Amostras

Um teste de PCR **positivo** iQ-Check *Cronobacter* spp. deve mostrar uma curva de amplificação típica e um valor de Cq ≥ 10 para o fluoróforo FAM.

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

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

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

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

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

* Quando a detecção do alvo 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

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

- Utilizando testes clássicos descritos nos métodos padronizados ISO 22964:2017, retornando à amostra
- Usando meio cromogênico RAPID'Sakazakii Consulte o guia do usuário RAPID'Sakazakii Agar (nº do documento 10000127307)
 - Para amostras ambientais, use o método RAPID'Sakazakii. Faça sub-cultura de 0,1mL de amostras de subcultura em 10 mL de mLST antes de estriar no Ágar RAPID'Sakazakii
 - Para fórmulas infantis e amostras de cereais com e sem probióticos (30 g), espalhe 10 µl da última amostra enriquecida no RAPID'Sakazakii Agar
 - Para fórmulas infantis e amostras de cereais usando suplemento PIF (375 g), semeie uma alça de 10 µl da amostra enriquecida em APT + suplemento PIF no Ágar RAPID'Sakazakii
- Utilizando qualquer outro método certificado pela NF VALIDATION, com base em um princípio diferente daquele usado no Teste de PCR iQ-Check *Cronobacter* spp. O protocolo validado deste segundo método deve ser seguido inteiramente
- No caso de resultados discrepantes entre o iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit e qualquer uma das opções de confirmação listadas acima, siga as etapas necessárias para garantir resultados válidos.
- O suplemento de APT + PIF enriquecido pode ser armazenado a 2–8°C por 72 hr no máximo após a incubação a 37°C antes de realizar a confirmação.

Seção 9

Confirmação de Colônias Isoladas usando o iQ-Check Kit

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit O kit iQ-Check *Cronobacter* spp. também pode ser usado para confirmar colônias isoladas de *Cronobacter* spp. em placas de cultura de ágar. Isso é validado oficialmente pela Certificação AFNOR no Ágar RAPID'Sakazakii.

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

Seção 10

Desempenho e validação do teste

O iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit é específico para o gênero *Cronobacter*.



BRD 07/23 – 01/13

MÉTODOS ANALÍTICOS
ALTERNATIVOS PARA
O AGRONEGÓCIO

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

NF Validation

iQ-Check *Cronobacter* spp. é certificado como NF VALIDATION ao método de referência EN ISO 22964 (2017), para a detecção de *Cronobacter* spp. em fórmulas para lactentes e cereais e amostras ambientais. A validação seguiu o protocolo da norma NF EN ISO 16140: parte 2 2016 e CFX Opus Deepwell incluiu o uso dos sistemas de detecção de PCR em tempo real CFX96. O uso de iQ-Check Free DNA Removal Solution é validado. Os programas de software associados são o CFX Manager IDE (versão 2.2 e posterior) ou CFX Maestro IDE (versão 4.0 e posterior). O "Crono Fast" APF também é validado para todas as amostras. Número do certificado: BRD 07/23 – 01/13. Válido até: consulte o certificado disponível no site de certificação da AFNOR.

Seção 11

Referências

ISO 7218:2024. Microbiology of the food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination

ISO 22964. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.

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

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

Seção 12

Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Maio de 2020	10000128585 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Renovação e extensão da validação AFNOR para: Tamanhos de amostra de 375 g Uso FDRS como uma opção “Salmo Fast” APF - Novo design de documento e atualização de referências e conteúdo - Alteração do número do documento – versão anterior 808473 REV D
Dezembro de 2022	10000128585 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Extensão AFNOR: CFX Opus Deepwell Sistema de PCR em tempo real e atualização para CFX Manager Software IDE versão 3.1 - Esclarecimento do protocolo de interpretação de resultados - Adicionado novo nº do catálogo para consumíveis - Seção de protocolo substituída por tabela de resumo - Atualizações do conteúdo geral
Dezembro de 2023	10000128585 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - Tabela de protocolo atualizada e método de confirmação
Dezembro de 2024	10000128585 Ver D	<ul style="list-style-type: none"> - Esclarecimento do protocolo de fórmula infantil e cereais com e sem probióticos
Abril de 2025	10000128585 Ver E	<ul style="list-style-type: none"> - Extensão de validação para o software CFX Maestro IDE versão 4.0 - Adicionada a opção de utilizar uma referência equivalente para a vancomicina

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 maiores informações.

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

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

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



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit

Manual de usuario

Análisis de detección por PCR en tiempo real de *Cronobacter* spp. en la fórmula para lactantes, cereales infantiles y muestras ambientales

Referencia #3578137

BIO-RAD

Tabla de Contenidos

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

Apartado 1

Introducción

Cronobacter spp., conocido anteriormente como *Enterobacter sakazakii*, es un patógeno ubicuo que ha sido aislado de muestras alimentarias, ambientales y clínicas. Se asocia con infecciones infantiles poco comunes, pero mortales relacionadas con el consumo de reconstituidos a base de preparados infantiles en polvo. Los recién nacidos con bajo peso al nacer y los recién nacidos inmunocomprometidos, así como los neonatos (bebés de menos de cuatro semanas), corren un riesgo especial debido a la elevada tasa de mortalidad (hasta el 80 %), aunque el mayor número de casos se observa en las poblaciones de mayor edad.

La resistencia del organismo a la desecación, el bajo número de células que, según se ha informado, causan enfermedades y el alto volumen de ventas de productos lácteos para bebés han llevado a muchas autoridades a vigilar la presencia del patógeno. Por ejemplo, el reglamento de la UE exige la ausencia de la bacteria en 10 g de muestra. Para cumplir con las regulaciones y con los programas de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) las industrias tienen objetivos más estrictos y necesitan seleccionar métodos altamente sensibles y específicos. Los métodos microbiológicos clásicos ofrecen resultados normalizados, sin embargo, son largos y tediosos.

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit, es un ensayo cualitativo simple y rápido que permite la detección de secuencias de ADN específicas de *Cronobacter* spp. en fórmula infantil y muestras ambientales. Se pueden procesar hasta 94 muestras para obtener un resultado fiable en menos de 24 hr. Esto permite un flujo de trabajo más flexible y un mayor rendimiento para la implementación de medidas efectivas que mejoran la seguridad y la higiene.

Apartado 2

Tecnología de iQ-Check *Cronobacter* spp.

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

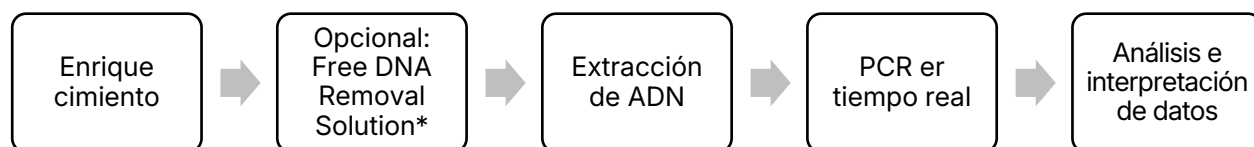
En el PCR en tiempo real, se utilizan sondas específicas para detectar el ADN durante la amplificación, mediante la hibridación de los amplicones. Estas sondas están unidas a un fluoróforo que sólo se vuelve fluorescente cuando se hibrida con la secuencia diana. FAM es el fluoróforo unido a la sonda de este kit, que hibrida con la secuencia de ADN específica

Apartado 3 Componentes del kit

de *Cronobacter* spp. En ausencia de ADN diana, no se detectará ninguna fluorescencia. A medida que el número de amplicones aumenta con cada ciclo de amplificación, la intensidad de la fluorescencia también aumenta. En el paso de hibridación de cada ciclo de PCR, el módulo óptico o detector mide esta fluorescencia. El software asociado al instrumento traza la intensidad de la fluorescencia en función del número de ciclos. Este método permite una simple determinación de la presencia o ausencia de *Cronobacter* spp. en una muestra.

En la mix de la reacción se incluye un control interno de ADN sintético. Este control se amplifica con una sonda específica al mismo tiempo que la secuencia de ADN diana de *Cronobacter* y se detecta por un segundo fluoróforo. Esto permite la validación de cualquier resultado negativo.

El ensayo iQ-Check puede detectar el *Cronobacter* spp. en todos los productos de fórmula infantil, cereales infantiles y muestras ambientales previamente enriquecidas por cultivo en agua de peptona tamponada con o sin suplemento. Véase el apartado 7 para una lista de matrices asociadas con todas las validaciones. El ensayo incluye cinco pasos principales:



* Por favor, consulte el manual del usuario de iQ-Check Free DNA Removal Solution (#1000058391), para conocer las condiciones de uso.

Apartado 3

Componentes del kit

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

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

Apartado 4

Vida útil y conservación

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

Apartado 5

Materiales necesarios, no suministrados

Equipos

- Mezcladora de paletas de laboratorio para homogeneizar las muestras de ensayo
- Incubadora para el enriquecimiento microbiológico de muestras
- Materiales específicos para la extracción en tubos estériles de tapón de rosca cónico de 1,5 ml:
 - Centrífuga de sobremesa (capacidad de 10.000-12.000 x g)
 - Calentador de bloque seco a 37 ± 2 °C y/o 95-100 °C
 - Disruptor celular, como el Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)
- 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 vórtex
- Placa agitadora magnética
- Micropipetas de 20, 200 y 1.000 µl
- Puntas para pipetas de repetición; estériles, empaquetadas individualmente
- Sistema de PCR en tiempo real de Bio-Rad*, por ejemplo, los sistemas de PCR en tiempo real CFX96 Touch Deep Well System (referencia #3600037) o CFX Opus Deepwell System (referencia #17007991)
- iQ-Check Prep System de Bio-Rad para el procedimiento de extracción automático de ADN y configuración de la placa PCR (referencia #3594911)

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

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

Consumibles

- Caldo de enriquecimiento: Agua de peptona tamponada (por ejemplo, BPW Plus, referencia #3564684, deshidratado, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 frascos; 3555790, 5 L x 2 bolsas; 3555795, 3 L x 4 bolsas; o BPW Standard, referencia #12013259, deshidratado, 500 g; 12013258, deshidratado, 5 kg; 12013260, 5 L x 2 bolsas)
- Agentes selectivos: Vancomicina (referencia #3564145, 5 g o equivalente)
- PIF Supplement (referencia #12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (referencia #3594970)

Apartado 5 Materiales necesarios, no suministrados

- Materiales específicos para muestras ambientales
 - Esponjas ambientales
 - Hisopos ambientales
 - Caldo neutralizante para esponjas e hisopos, como el caldo neutralizante Dey-Engley (D/E) o HiCap Neutralizing Broth o Letheen Broth
- Materiales específicos para la extracción en tubos
 - Tubos cónicos estériles de 1,5 ml y tapa de rosca (referencia #17010678)
- Materiales específicos para la extracción en una placa Deep Well
 - Placa Deep Well de 96 pocillos (iQ-Check Deep Well Microplates, referencia #3594900)
 - Película de sellado de plástico (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, referencia #3590139)
 - Película de sellado de placas de PCR (X-Pierce Films, referencia #3593977, o Pre-Pierced Plate Sealing Film, #3600040, sólo en Norteamérica)
- Específico para iQ-Check Prep System
 - Recipiente de 60 ml para dilución (referencia #3594904)
 - Puntas con filtro (referencia #3594902 o 12014486, 50 µl x 5760; 3594903 o 12014483, 1000 µl x 3840)
 - Tubos de mix de PCR (referencia #12016673, 5 ml x 25)
- RAPID'Sakazakii Agar (referencia #3563971, 90 mm x 20 placas; 3564976, deshidratado 500 g)
- Placas PCR, tubos, film adhesivo y tapas
- Puntas estériles con filtro adaptables a micropipetas de 20, 200 y 1.000 µl
- Puntas de pipeta Combitip o pipetas de repetición equivalente; estériles, empaquetadas individualmente
- Pipetas de 1 y 10 ml
- Tubos de ensayo estériles de 2 y 5 ml
- Guantes sin talco
- Agua destilada estéril
- Lejía, 5 %
- Agente descontaminante, como DNA AWAY o RNase AWAY

Apartado 6

Seguridad, precauciones y recomendaciones para la obtención de resultados óptimos

- Este análisis debe ser realizado por personal capacitado
- Mujeres embarazadas, niños, ancianos y personas inmunocomprometidas no deben realizar este método
- Las muestras y los cultivos enriquecidos deben manipularse como material potencialmente infeccioso y desecharse de acuerdo con las normas y reglamentos locales
- Todo el material potencialmente infeccioso debe ser esterilizado en autoclave antes de su eliminación
- La calidad de los resultados depende del estricto cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio (por ejemplo, la norma EN ISO 7218), especialmente en lo que respecta a la PCR:
 - Nunca haga circular el material de laboratorio (pipetas, tubos, etc.) de una estación de trabajo a otra
 - Utilice siempre un control positivo y un control negativo para cada serie de reacciones de amplificación
 - No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad
 - Agite (mediante vórtex) los reactivos del kit antes de usarlos para asegurar su homogeneidad
 - Verifique periódicamente la exactitud y la precisión de las pipetas, así como el correcto funcionamiento de los instrumentos
 - Cámbiese los guantes a menudo, especialmente si sospecha que están contaminados
 - Limpie los espacios de trabajo periódicamente con un 5 % de lejía y otros agentes descontaminantes, como DNA AWAY
 - Use guantes sin talco y evite las huellas dactilares y escribir en los tapones de los tubos. Ello podría interferir en la correcta adquisición de datos
- Se recomienda encarecidamente seguir los requisitos generales descritos en la norma EN ISO 22174:2024 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions)
- iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit
 - Todas las sustancias o mezclas del equipo de ensayo son productos clasificados, según el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS en inglés por el acrónimo de Globally Harmonized System). El contacto con ácidos puede causar la liberación de gases tóxicos. No es necesario tomar precauciones especiales si se utiliza correctamente. Si se inhala el producto, suministre aire fresco y consulte a un médico en caso de presentar molestias. En caso de contacto del producto con los ojos, enjuague el ojo abierto durante varios minutos con agua corriente. En caso de ingestión de los productos, induzca el vómito y solicite ayuda médica.

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

- 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 ser realizado sólo por los ingenieros del servicio técnico de Bio-Rad
- Sistema de detección mediante PCR en tiempo real CFX96 Touch Deep Well System o CFX Opus Deepwell System
 - El uso inadecuado del sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch System o CFX Opus Deep Well 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, los sistemas de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch System o CFX Opus Deep Well System deben ser manipulados y utilizados sólo por personal de laboratorio cualificado y que haya sido instruido para tal fin. El mantenimiento del instrumento debe ser realizado sólo por los ingenieros del servicio de técnico de Bio-Rad.
- Enriquecimiento
 - El usuario debe leer, comprender y seguir toda la información de seguridad en las instrucciones del iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit. Conserve las instrucciones de seguridad para futuras consultas. Para reducir los riesgos asociados a la exposición a productos químicos y a riesgos biológicos, los análisis de patógenos deben ser realizados en un laboratorio debidamente equipado y bajo el control de personal capacitado. Siga siempre las prácticas normalizadas de seguridad de los laboratorios, incluido el uso de vestimenta protectora adecuada y protección ocular al manipular reactivos y muestras contaminadas. Evite el contacto con el contenido de los medios de enriquecimiento y los tubos de reactivos después de la amplificación. Deseche las muestras enriquecidas de acuerdo con las normas vigentes aplicables a la industria.
 - *Cronobacter* spp. es un microorganismo de bioseguridad de nivel 2. Las muestras biológicas como los enriquecimientos tienen potencial de transmitir enfermedades infecciosas. Siga todos los reglamentos locales, estatales/provinciales y/o nacionales aplicables para la eliminación de desechos biológicos. Use el equipo de protección apropiado, que incluya, pero no se limite a, gafas protectoras, protector facial, ropa/bata de laboratorio y guantes. Todos los trabajos deben realizarse en instalaciones debidamente equipadas, utilizando el equipo de seguridad adecuado (por ejemplo, dispositivos de contención física). Las personas deben ser instruidas y estar capacitadas de acuerdo con los requisitos reglamentarios y de la empresa/institución aplicables antes de trabajar con materiales potencialmente infecciosos
 - Una vez finalizados los análisis, todos los materiales y medios que puedan contener patógenos deberán descontaminarse siguiendo las normas actuales de la industria para la eliminación de desechos contaminados (es decir, en autoclave durante 20 min a 121 °C). Consulte la Ficha de Datos de Seguridad para obtener información adicional y los reglamentos locales para la eliminación

Apartado 7

Protocolo

A. Enriquecimiento de la muestra

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

El medio de enriquecimiento debe encontrarse a la temperatura de incubación apropiada (ambiente o 37 °C cuando sea necesario) antes de su uso. Se recomienda el uso de alfa-amilasa para el enriquecimiento de cereales o productos de almidón, tal como se describe en la norma ISO 6887-4.

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

VALIDACIÓN NF BRD 7/23-01/13		
Alcance (matrices)	Preparación de las muestras	Enriquecimiento/Extracción de ADN
Muestras ambientales ^{1,2,3}	Homogeneizar <i>n</i> g de muestra en 9 x <i>n</i> ml de APT	Extracción Easy I <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 16-20 hr a 37 ± 1 °C ▪ Formato de tubo/Deep Well
Fórmulas infantiles y cereal con o sin probióticos (30 g) ^{1,2,3}	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de APT + vancomicina y a continuación hacer un subcultivo en APT	Extracción Easy I <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar ATP + vancomicina durante 18-22 hr a 37 ± 1 °C ▪ Subcultivar en ATP durante 3-5 hr a 37 ± 1 °C ▪ Formato de tubo/Deep Well
Fórmulas infantiles y cereales con o sin probióticos, ingredientes (hasta 375 g) ^{1,4}	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 3 x <i>n</i> ml de APT precalentada + suplemento PIF	Extracción Easy I <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 18-26 hr a 37 ± 1 °C ▪ Formato de tubo/Deep Well

¹ Esta validación también incluye el uso del iQ-Check Free DNA Removal Solution y el archivo de aplicación del protocolo "Crono Fast" para un tiempo de ejecución de PCR reducido. Póngase en contacto con su representante de Bio-Rad para más información

² En el alcance de VALIDACIÓN NF, las porciones de muestra que pesan más de 30 g no han sido probadas.

³ Las muestras enriquecidas pueden almacenarse a 2-8 °C durante 48 hr tras finalizar la incubación a 37 °C. A continuación, debe aplicarse el protocolo Standard de extracción de ADN. Póngase en contacto con su representante de Bio-Rad para más información

⁴ Al finalizar la incubación a 37 °C, las muestras enriquecidas pueden almacenarse a 2-8 °C durante 72 hr.

B. Tratamiento de eliminación de ADN libre

iQ-Check Free DNA Removal Solution proporciona una forma ideal de eliminar el ADN libre. Siga las recomendaciones de Bio-Rad en el manual del usuario.

C. Extracción de ADN

Recomendaciones generales:

- Precaliente el bloque calefactor o mezclador térmico antes de iniciar el ensayo. Póngalo a 95-100 °C. Mantenga el reactivo de lisis en suspensión mientras pipetea agitando a velocidad media en una placa agitadora magnética.
- 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.
- Abra los tubos y pocillos con cuidado para evitar cualquier posible contaminación cruzada.

Apartado 7 Protocolo

- Enfríe la placa de Deep Well antes de pipetear directamente a través de la película pre-perforada de sellado.
- Utilice la barra magnética para mantener el reactivo de lisis en suspensión. Pipetee mientras se agita a velocidad media.
- En primer lugar, agite el reactivo de lisis manualmente para resuspender la resina. Seguidamente, pipetee mientras se agita a media velocidad con la barra magnética contenida en el frasco, para mantener el reactivo en suspensión.

Protocolo Easy I

1. Adicione una alícuota de 100 µl de reactivo de lisis homogeneizado (reactivo A) en los tubos o pocillos de una placa Deep Well.

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

2. Añada 100 µl de muestra enriquecida.

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

3. Homogeneice la solución pipeteando hacia arriba y hacia abajo hasta que se homogeneice.
4. Cierre los tubos o selle la placa Deep Well mediante la película pre-perforada de sellado.
5. Incube los tubos en el bloque calefactor a 95-100 °C durante 15-20 min. Incube la placa Deep Well en el mezclador térmico bajo agitación entre 1.300 y 1.600 rpm a 95-100 °C durante 15-20 min.
6. Si trabaja con tubos, agítelos con vórtex a alta velocidad y centrifugue a 10.000-12.000 x g durante al menos 2 min. La centrifugación no es necesaria para la placa Deep Well.

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

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

D. PCR en tiempo real

Configuración del software e instrumento

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

Preparación de la mix de PCR

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

Apartado 7 Protocolo

2. Utilice la mix de PCR (reactivos B + C) inmediatamente después de su preparación. La mix permanecerá estable durante 1 hr como máximo a 2-8 °C.
3. Pipetee 45 µl de la mix de PCR en cada pocillo según la configuración de su placa.
4. Añada 5 µl de extracto de ADN, reactivo D (control negativo) o reactivo E (control positivo). No agite con vórtex la muestra antes del pipeteo. Selle herméticamente los pocillos de la placa o las tiras de PCR. Es importante evitar las burbujas en el fondo de los pocillos pipeteando con cuidado. Como paso opcional para eliminar cualquier burbuja, centrifugue la placa sellada de PCR o las tiras de PCR (quick spin).
5. Coloque la placa de PCR o las tiras de tubos en el termociclador. Asegúrese de colocar la placa con el pocillo A1 en la esquina superior izquierda. Cierre el módulo de reacción.

Ejecución de la PCR

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

El archivo del protocolo de aplicación "Crono Fast" ha sido validado por el NF sólo en la categoría de muestras ambientales de producción.

E. Análisis de los datos

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

Interpretación de los resultados

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

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

Controles

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

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

	Detección de <i>Cronobacter</i> spp. (canal FAM)	Detección de control interno (canal HEX)
Control negativo	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Control positivo	26 ≤ Cq ≤ 36	N/A

* El programa informático indica un valor Cq (el ciclo en el que la curva de amplificación cruza el umbral) 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 negativos y positivos difieren de los de la tabla anterior (control inválido), repita la ejecución y el análisis que se describen en D. PCR en tiempo real y E. Análisis en el apartado 7 Protocolo.

Muestras

Un resultado **positivo** de PCR iQ-Check *Cronobacter* spp. debe mostrar una curva de amplificación típica y un valor Cq ≥10 para el fluoróforo FAM.

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

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

- Si no hay un valor Cq para el canal FAM y el control interno tiene un valor Cq ≥28, esta muestra se considera como una muestra **negativa** de *Cronobacter* spp.
- 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 µl de extracto de ADN y a continuación analice 5 µl de la dilución) y repita la PCR.
- Si el valor Cq del control interno es <28, no es posible interpretar el resultado. Verifique que el umbral se colocó correctamente, o que la curva de datos en bruto es una curva de amplificación regular. Si la curva no tiene una forma característica, será necesario repetir el ensayo de PCR.

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

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

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

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

Apartado 8

Confirmación de resultados positivos

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

- Utilizando los ensayos clásicos descritos en los métodos estandarizados ISO 22964:2017 partiendo desde la muestra.
- Utilizando el medio cromogénico RAPID'*Sakazakii*. Consulte el método de confirmación en el manual del usuario de RAPID'*Sakazakii* Agar (referencia #10000127307)
 - Para muestras ambientales, utilice el método RAPID'*Sakazakii*. Resiembre 0,1 ml de muestra en
10 ml de mLST antes de sembrar en Agar RAPID'*Sakazakii*
 - Para muestras de fórmula infantil y cereales con y sin probióticos (30 g), añada 10 µl de la última muestra enriquecida en agar RAPID'*Sakazakii*.
 - Para muestras de fórmula infantil y cereales que utilizan suplemento PIF (375 g), siembre un asa de 10 µl de la muestra enriquecida con suplemento APT + PIF en agar RAPID'*Sakazakii*.
- Utilizando cualquier otro método certificado por la validación NF basado en un principio diferente al utilizado en el ensayo de PCR iQ-Check *Cronobacter* spp. El protocolo validado de este segundo método debe ser seguido en su totalidad.
- En caso de resultados discrepantes entre el iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit y cualquiera de las opciones de confirmación enumeradas anteriormente, siga los pasos necesarios para asegurar resultados válidos
- Antes de llevar a cabo la confirmación, es posible almacenar el agua de peptona tamponada (APT) + el suplemento PIF a 2-8 °C durante 72 hr como máximo, después de la incubación a 37 °C.

Apartado 9

Confirmación de colonias aisladas usando el kit iQ-Check

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit puede utilizarse para confirmar colonias de *Cronobacter* spp. aisladas en placas de agar. Esto está validado oficialmente por la certificación AFNOR con el medio *RAPID'Sakazakii* Agar.

1. Recoja una colonia aislada en una placa de agar selectivo o no selectivo con un palillo, un lazo estéril u otro consumible adaptado (por ejemplo, una punta de pipeta).
2. Resuspenda la colonia en 100 µl de sal triptona o agua destilada estéril en un tubo de microcentrífuga. Homogenice con vórtex.
3. Analice 5 µl de la suspensión con 45 µl de mix de PCR (véase D. PCR en tiempo real en el apartado 7 Protocolo) y siga el resto del protocolo iQ-Check *Cronobacter* spp. para la interpretación de los datos y los resultados.

Apartado 10

Aplicación del análisis y validaciones

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit es específico para la detección del género *Cronobacter*.



BRD 07/23 – 01/13

MÉTODOS ANALÍTICOS
ALTERNATIVOS PARA
LA AGROINDUSTRIA

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

NF Validation

iQ-Check *Cronobacter* spp. Cuenta con la certificación NF VALIDATION como un método alternativo al método de referencia EN ISO 22964 (2017) para la detección de *Cronobacter* spp. en fórmulas infantiles, cereales y muestras ambientales. La validación siguió el protocolo de la norma NF EN ISO 16140-2:2016 e incluye el uso del sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 y CFX Opus Deepwell. El uso del iQ-Check Free DNA Removal Solution está validado. El software asociado es el CFX Manager IDE (versión 2.2 y posteriores) o el CFX Maestro IDE (versión 4.0 y posteriores). El APF "Crono Fast" también está validado para todas las muestras. Número de certificado: BRD 07/23 – 01/13. Válido hasta: consulte el certificado disponible en el sitio web de AFNOR Certification.

Apartado 11

Referencias

ISO 7218:2024. Microbiology of the food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination

ISO 22964. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.

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

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

Apartado 12

Historial de revisiones

Fecha de lanzamiento	Número de documento	Modificación
Mayo de 2020	10000128585 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Renovación y ampliación de la validación AFNOR para: - Muestras de 375 g - Uso opcional de FDRS - APF "Crono Fast" - Nuevo diseño del documento y actualización de las referencias y el contenido - Cambio en el número de documento–versión anterior 808473 REV D
Diciembre 2022	10000128585 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Extensión AFNOR: Sistema PCR en tiempo real CFX Opus Deepwell y actualización al software CFX Manager IDE versión 3.1 - Aclaración del protocolo de interpretación de resultados - Se han añadido nuevas referencias para los consumibles - Sustitución de la sección de protocolo por un cuadro resumen - Actualización de contenidos generales
Diciembre 2023	10000128585 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - Tabla de protocolo actualizada y método de confirmación.
Diciembre 2024	10000128585 Ver D	<ul style="list-style-type: none"> - Aclaración del protocolo sobre preparados para Fórmulas infantiles y cereal con y sin probióticos.
Abril de 2025	10000128585 Ver E	<ul style="list-style-type: none"> - Extensión de validación para el software CFX Maestro IDE versión 4.0 - Se ha añadido la opción de utilizar una referencia equivalente para la vancomicina

Apéndice — Tabla de cálculo de la mix de PCR

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

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

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

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

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

Todas las marcas comerciales aquí indicadas son propiedad de sus respectivos propietarios.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit

用户指南

可用于婴儿配方奶粉、谷物和环境样本中*克罗诺杆菌*的实时荧光定量 PCR 检测

目录号 3578137

BIO-RAD

目录

第 1 部分	简介	1
第 2 部分	iQ-Check <i>Cronobacterspp.</i> 技术.....	1
第 3 部分	成分列表.....	2
第 4 部分	保质期及储存条件	2
第 5 部分	其他仪器、试剂与耗材	2
	仪器	2
	试剂和耗材	3
第 6 部分	最佳实验结果的安全预防措施及建议	4
第 7 部分	操作方案.....	6
	样本增菌.....	6
	去除游离 DNA 处理	6
	DNA 提取.....	7
	实时荧光定量 PCR.....	7
	数据分析.....	8
第 8 部分	阳性结果的确认	9
第 9 部分	使用 iQ-Check Kit 确认单菌落	10
第 10 部分	测试性能和验证	11
第 11 部分	参考资料.....	11
第 12 部分	修订记录.....	12
	附录 — PCR 混合物计算指南	13

第 1 部分 简介

第 1 部分

简介

克罗诺杆菌，原名阪崎肠杆菌，是一种广泛存在于食品、环境和临床的病原体。该病原体与婴儿食用重组配方奶粉后引起的罕见但致命的感染有关。该感染死亡率高达 80%，因此对于出生体重较低、免疫功能受损的新生儿及 4 周以下婴儿尤其危险，但大多数病例发生在老年人群中。

该细菌可耐受干燥环境，并且据报道低细胞数量就可致病，而婴儿奶制品的销量很大，因此多方机构已对该细菌进行监测。例如，欧盟法规规定 10 克样品中不含该菌。为遵守法规、实现危害分析和关键控制点（HACCP）体系，工业公司制定了更为严苛的目标，并需要寻找高敏感、高特异性的方法。通过采用经典的微生物学方法可提供标准的结果。但该方法耗时久且过程繁琐。

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit 检测是一种简便、快捷的定性检测，可检测婴儿配方奶粉和环境样本中克罗诺杆菌的特定 DNA 序列。最多可在 24 hr 内实现 94 个样本的检测，并获得可靠结果。可使工作流程更加灵活、产量更高，从而实施有效措施，改善安全和卫生。

第 2 部分

iQ-Check *Cronobacter* spp. 技术

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit 是一种基于实时 PCR 的基因扩增和检测的测试。PCR 试剂包含靶标 DNA 引物及探针、DNA 聚合酶和核苷酸。优化了检测和数据分析，以用于 Bio-Rad 实时 PCR 仪，例如 CFX96 Touch Deep Well 或 CFX Opus Deepwell 实时 PCR 检测系统。

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

在实时 PCR 中，特异性探针可在扩增过程中与扩增子杂交，从而检测目标 DNA。这些探针与荧光基团相连，仅在与目标序列杂交时才会发出荧光。该试剂盒中的探针可与克罗诺杆菌特定 DNA 序列杂交，与该探针连接的荧光基团为 FAM。当不存在目标 DNA 时，无法检测到荧光。随着每轮扩增后扩增量的增加，荧光强度也随之增强。在每轮 PCR 循环的退火过程中，光学组件或检测器会测量荧光强度。与仪器关联的软件可以循环次数为坐标轴绘制荧光强度曲线。通过该方法可简单确定样本中是否存在*克罗诺杆菌属*。

反应混合物中包含合成的 DNA 内部质控。该对照在*克罗诺杆菌*目标 DNA 序列同时使用特定探针扩增，并由第二种荧光基团检测。用于验证阴性结果。

第 3 部分 成分列表

iQ-Check 检测可以检测经缓冲蛋白胨水（有或无添加剂）增菌后的所有婴儿配方奶粉、婴儿谷物和环境样本中的 *克罗诺杆菌属*。有关所有验证相关的食品基质，请参阅第 7 节。该检测包含 5 个主要步骤：



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

第 3 部分

成分列表

iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit 所含试剂可进行 96 次检测（共 94 个样本）。

试剂编号	试剂	数量, ml
A	裂解 II 液	1 瓶, 20
B	荧光探针	1 管, 0.55
C	扩增混合液	1 管, 4.4
D	PCR 阴性对照	1 管, 0.5
E	PCR 阳性对照	1 管, 0.25

第 4 部分

保质期及储存条件

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

第 5 部分

其他仪器、试剂与耗材

仪器

- 实验室专用拍打式无菌均质器：用于检测样本的混匀处理
- 恒温箱：用于微生物增菌
- 专用于在无菌 1.5 ml 锥形螺帽管中提取
 - 台式离心机（可调至 10000–12000 x g）
 - 干式恒温器（可调至 37 ± 2°C 和/或 95–100°C）

第 5 部分 其他仪器、试剂与耗材

- 细胞破碎器, 如 Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)
- 提取专用 Deep Well 板
 - 加热振荡混合仪 (可维持 $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 和/或 $95\text{--}100^{\circ}\text{C}$ 恒温, 混合速度至少为 1300 rpm)
- 涡旋振荡器
- 磁力搅拌板
- 微量移液枪 (20 μl , 200 μl , 1000 μl)
- 移液枪枪头 (灭菌, 独立包装)
- Bio-Rad 实时 PCR 系统, * 例如 CFX96 Touch Deep Well (目录号 3600037) 或 CFX Opus Deepwell (目录号 17007991) 实时 PCR 系统
- Bio-Rad iQ-Check Prep System: 用于全自动 DNA 提取和 PCR 板设置 (目录号 3594911)

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

* 请联系 Bio-Rad 技术支持获取推荐仪器的信息。

试剂和耗材

- 培养基: 缓冲蛋白胨水 (例如, BPW Plus, 目录号 3564684, 干粉, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 瓶; 3555790, 5 L x 2 袋; 3555795, 3 L x 4 袋; 或 BPW Standard, 目录号 12013259, 干粉, 500 g; 12013258, 干粉, 5 kg; 12013260, 5 L x 2 袋)
- 选择性添加剂: 万古霉素 (目录号 3564145, 5 g 等效产品)
- PIF Supplement (目录号 12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (目录号 3594970)
- 环境样本专用:
 - 采样海绵
 - 采样棉签
 - 用于海绵和拭子的中和肉汤, 例如 Dey-Engley (D/E) 或 HiCap Neutralizing Broth, 或 Lethen broth
- 专用于管内提取
 - 1.5 ml 锥形螺旋盖管, 无菌 (目录号 17010678)
- 专用于在 Deep Well 板内提取
 - 96 孔 Deep Well 板 (iQ-Check Deep Well Microplates, 目录号 3594900)
 - 塑料密封膜 (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, 目录号 3590139)
 - PCR 板密封膜 (X-Pierce Films, 目录号 3593977 或 Pre-Pierced Plate Sealing Film, 目录号 3600040, 仅限北美)
- 专门针对 iQ-Check Prep System
 - 60 ml 稀释容器 (目录号 3594904)

第 6 部分 最佳实验结果的安全预防措施及建议

- 带滤芯移液器枪头（目录号 3594902 或 12014486，50 µl x 5,760；3594903 或 12014483，1000 µl x 3840）
- PCR 混合管（目录号 12016673，5 ml x 25）
- RAPID[®] *Sakazakii* Agar（目录号 3563971，90 mm x 20 个培养皿；3564976，干粉，500 g）
- PCR 板、管子、密封胶带和盖子
- 适用于 20、200 和 1000 µl 微量移液管的无菌带滤芯移液器枪头
- Combitip 移液器或等效重复移液器的吸头；无菌，独立包装
- 1 ml 和 10 ml 移液器
- 2 ml 和 5 ml 无菌试管
- 无粉手套
- 蒸馏无菌水
- 漂白剂，5%
- DNA AWAY 或 RNase AWAY 等清洁剂

第 6 部分

最佳实验结果的安全预防措施及建议

- 此测试必须由经过专门培训的人员操作
- 孕妇、儿童、老人和免疫功能受损的人员不建议操作此方法
- 样品和增菌培养物必须作为潜在传染性材料处理，并根据当地法规和规定进行废弃物处理
- 所有具有潜在传染性的材料在处置前都应进行高压灭菌
- 最后的实验结果取决于严格遵守良好实验室规范（例如，EN ISO 7218 标准），尤其是 PCR 操作：
 - 切勿将实验室设备（移液管、试管等）从一个工作站重复使用到另一个工作站
 - 对于每个系列的扩增反应，始终使用阳性对照及阴性对照
 - 试剂过期后请勿使用
 - 使用前涡旋试剂盒中的试剂以确保均匀
 - 定期验证移液器的准确度和精密度，以及仪器的正常功能
 - 经常更换手套，尤其是当您怀疑它们被污染时
 - 使用 5% 的漂白剂和其他去污剂（例如 DNA AWAY）定期清洁工作空间
 - 使用无粉手套并避免在管帽上留下指纹和墨迹。两者都会干扰数据采集
- 强烈建议遵守标准 EN ISO 22174:2024（Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food pathogens — General requirements and definitions, 食品和动物饲料微生物学 — 用于检测食品病原体的聚合酶链反应 (PCR) — 一般要求和定义）中描述的一般要求

第 6 部分 最佳实验结果的安全预防措施及建议

- iQ-Check *Cronobacterspp.* Kit
 - 根据全球化学品统一分类和标签制度 (GHS)，测试试剂盒中的所有物质或混合物均属于分类产品。与酸接触可能会释放有毒气体。如果使用得当，则不需要特别的预防措施。如果产品被吸入，请马上吸入新鲜空气并在出现投诉时咨询医生。眼睛接触产品后，用流水冲洗睁开的眼睛几分钟。如果吞下产品，请催吐并寻求医疗帮助。
- iQ-Check Prep System
 - iQ-Check Prep System 的不当使用可能会导致身体伤害或仪器损坏。如果处理不当，某些组件可能会有因过热而造成人身伤害的风险。为安全使用，iQ-Check Prep System 只能由经过适当培训的合格实验室人员操作。仪器的维修只能由 Bio-Rad 现场服务工程师来完成
- CFX96 Touch Deep Well 或 CFX Opus Deepwell 实时 PCR 检测系统
 - CFX96 Touch 或 CFX Opus Deep Well 实时 PCR 检测系统使用不当可能会导致人身伤害或仪器损坏。如果处理不当，某些组件可能会有因过热而造成人身伤害的风险。为安全使用，CFX96 Touch 或 CFX Opus Deep Well 实时 PCR 检测系统只能由经过适当培训的合格实验室人员操作。只能由 Bio-Rad 现场服务工程师执行仪器维修
- 增菌条件
 - 用户应阅读、理解并遵守 iQ-Check *Cronobacterspp.* Kit 说明中的所有安全信息。保留安全说明以备将来参考。为降低与接触化学品和生物危害相关的风险，请在经过培训的人员控制下，在配备适当的实验室进行病原体检测。始终遵循标准的实验室安全规范，包括在处理试剂和受污染的样品时穿戴适当的防护服和护目镜。扩增后避免接触增菌培养液和试剂管。根据当前行业标准处理增菌样品。
 - *克罗诺杆菌*属于生物安全 2 级微生物。增菌生物样本具有传播传染病的潜力。遵守所有适用的地方、州/省和/或国家有关生物废物处置的法规。穿戴合适的防护设备，包括但不限于：防护眼镜、面罩、衣服/实验服和手套。所有工作都应在配备适当安全设备（例如隔离装置）的设施中进行。在处理潜在传染性材料之前，个人应根据适用的法规和公司/机构要求接受培训
 - 测试完成后，所有可能含有病原体的材料和介质都应按照当前处理污染废弃物的行业标准进行净化（即在 120°C 下高压灭菌 20 min）。有关更多信息和当地处理法规，请参阅安全数据表

第 7 部分 操作方案

A. 样本增菌

强烈建议您在阅读完全部操作流程后才开始进行检测。

使用前请将增菌液根据需求放置于适当的孵育温度下（室温或 37°C）。如 ISO 6887-4 标准所述，建议将 α-淀粉酶用于谷物或淀粉产品的增菌。

下表概述了可供使用的不同方案，具体取决于应用和验证范围。

NF 验证 BRD 7/23-01/13		
范围（食品基质）	样本制备	增菌/DNA 提取
环境样本 ^{1,2,3}	在 9 x <i>n</i> ml BPW 中均匀混合 <i>ng</i> 样本	Easy I 提取 <ul style="list-style-type: none"> 在 37±1°C 下培养 16 - 20 hr 管/Deep Well
有或无益生菌的婴儿配方奶粉和谷物 (30 g) ^{1,2,3}	在 9 x <i>n</i> ml BPW + 万古霉素中均匀混合 <i>ng</i> 食品，然后在 BPW 进行继代培养	Easy II 提取 <ul style="list-style-type: none"> 将 BPW + 万古霉素在 37±1°C 下培养 18-22 hr 在 37±1°C 下在 BPW 中继代培养 3-5 hr 管/Deep Well
有或无益生菌的婴儿配方奶粉和谷物 (最多 375 g) ^{1,4}	在 3 x <i>n</i> ml 预热 BPW + PIF 添加剂中均匀混合 <i>ng</i> 食品	Easy I 提取 <ul style="list-style-type: none"> 在 37±1°C 下培养 18-26 hr 管/Deep Well

¹ 验证时也需用到 iQ-Check Free DNA Removal Solution 和 “Crono Fast” Application Protocol File，以缩短 PCR 扩增时间。可联系您的 Bio-Rad 销售代表获取更多信息

² 在 NF 验证范围内，尚未对重量超过 30 g 的样本进行过测试

³ 增菌后的样本可在 37°C 下孵育结束后置于 2-8°C 条件下储存 48 hr。随后必须根据标准 DNA 提取方案进行 DNA 提取。可联系您的 Bio-Rad 销售代表获取更多信息

⁴ 增菌后的样本可在 37°C 下孵育结束后置于 2-8°C 条件下储存 72 hr。

B. 去除游离 DNA 处理

iQ-Check Free DNA Removal Solution 提供了一种去除游离 DNA 的理想方法。使用过程中请遵守 Bio-Rad 用户指南中的建议。

第 7 部分 操作方案

C. DNA 提取

以下是我们的建议：

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

Easy I 流程

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

注意：首先用手轻轻晃动裂解剂，使珠子悬浮。

2. 加入 100 µl 增菌后的样品。

注意：晃动悬浮液使培养物混匀，然后等碎片沉淀后再采集样本。

3. 用移液枪上下吹打溶液，直至安全混合均匀。
4. 盖上离心管盖，或用预穿孔密封膜将 Deep Well 板密封。
5. 将离心管置于恒温器中，在 95–100°C 条件下孵育 15 - 20 min。或将 Deep Well 板置于加热振荡混合仪中，在 95–100°C 条件下振荡孵育 15 - 20 min，转速为 1300–1600 rpm。
6. 将离心管高速涡旋振荡，然后在 10,000 - 12000 x g 条件下至少离心 2 min。
Deep Well 板不需要进行离心。

如需暂时停止检测，推荐在此步骤暂停。

上清液可在 -20°C 条件下保存长达 1 年。再次使用前，将其解冻、混匀，然后离心 10000–12000 x g 5 min。

D. 实时荧光定量 PCR

仪器和软件设置

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

PCR 混合物的准备

1. 准备 PCR 混合物需用到扩增液（C 试剂）和荧光探针（B 试剂）。所需 PCR 混合物的体积取决于待分析的样本和对照的数目。每次运行的 PCR 中必须至少包含阳性对照和阴性对照各一个。通过查阅附录中的表格，明确每种试剂的所需体积。

第 7 部分 操作方案

2. PCR 混合物 (B 试剂 + C 试剂) 准备完后, 应立即使用。在 2–8°C 条件下最多可稳定保存 1 hr。
3. 根据您的实验设计方案, 向每孔中加入 45 µl PCR 混合物。
4. 加入 5 µl DNA 提取物, 或试剂 D (阴性对照) 或试剂 E (阳性对照)。移液前不要涡旋振荡样品。将上样孔密封。请小心移液, 避免孔底部产生气泡。如需消除气泡, 可将密封后的 PCR 板或 PCR 联管离心 (快速旋转)。
5. 将 PCR 板或 PCR 联管放入热循环仪中。确保将 A1 孔放置在左上角的位置。最后关上 PCR 仪器盖。

运行 PCR

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

应用程序协议文件 “Crono Fast” 仅在生产环境样本类别上进行了 NF 验证。

E. 数据分析

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

结果解释

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

借助 CFX Manager IDE 软件或 CFX Maestro IDE 软件, 可以对 Bio-Rad 实时 PCR 检测系统进行完整的自动化分析。

在发布结果之前, 应验证扩增曲线的典型特征。如果需要额外支持, 请联系您的 Bio-Rad 技术支持团队。

对照

在解释样本结果之前, 需核实阳性和阴性对照。

当对照出现下表所示结果时, 表示实验有效。否则必须重新进行 PCR 反应。

	克罗诺杆菌检测 (FAM 通道)	内部对照检测 (HEX 通道)
阴性对照	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
阳性对照	$26 \leq Cq \leq 36$	N/A

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

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

第 8 部分 阳性结果的确认

样本

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

- 如果两个通道的 Cq 值均小于 10，请核实原始数据曲线是否是正常的扩增曲线（具有平坦的基线，随后荧光发射呈指数快速增加，最后趋于平坦）。如果曲线正常，则可视为 *克罗诺杆菌属* 阳性检测。如果没有 FAM Cq 值（Cq = N/A），或曲线不是典型扩增曲线，则必须分析该样本的内部质控：
- 如果无 FAM Cq 值但内部对照 Cq 值 ≥ 28 ，则为 *克罗诺杆菌属* 阴性样本。
- 如果内部对照也无 Cq 值（Cq = N/A），说明 PCR 反应未正常进行。需将样本进行稀释（将 10 μ l DNA 提取物用无菌蒸馏水 1:10 稀释后，取 5 μ l 稀释液进行检测）并重新进行 PCR。
- 如果内部对照 Cq 值 < 28 ，则无法解释结果。需核实阈值是否设置正确，或原始数据曲线是否为正常扩增曲线。如果曲线不具有典型形状，则需重新进行 PCR 检测

样本结果解释如下表所示：

<i>Cronobacterspp.</i> 检测 (FAM 通道)	内部对照检测 (HEX 通道)	结果解释
Cq ≥ 10	N/A	阳性
Cq = N/A	Cq ≥ 28	阴性
Cq = N/A	Cq = N/A	反应抑制*

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

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

第 8 部分

阳性结果的确认

在 NF 验证认证方法的下，所有 iQ-Check Kit 的阳性检测结果必须通过下列方法证实：

- 从采样开始，使用标准化方法 ISO 22964:2017 中描述的经典检测方法进行证实。
- 使用 RAPID' *Sakazakii* 显色培养基证实。请参见 RAPID' *Sakazakii* 琼脂用户指南（文档编号 10000127307）中的确认方法。
 - 对于环境样品，可使用 RAPID ' *Sakazakii* 方法。首先将 0.1ml 的样本传代培养到 10 ml mLST 溶液，然后将增菌液涂布到 RAPID ' *Sakazakii* 平板上划线分离培养。

第 9 部分 使用 iQ-Check Kit 确认单菌落

- 对于有或无益生菌（30 g）的婴儿配方奶粉和谷物样品，将 10µl 浓缩样本涂布到 RAPID 'Sakazakii' 平板上划线分离培养。
- 对于含 PIF 添加剂（375 g）的婴儿配方奶粉和谷物样品，将 10µl 含有 BPW+PIF 添加剂的样品接种环涂布到 RAPID 'Sakazakii' 平板上划线分离培养。
- 使用经 NF 验证认证的不同于 iQ-Check *Cronobacterspp.* PCR 检测原理的其他方法。必须完全遵循第二种方法的验证方案
- 如果 iQ-Check *Cronobacterspp.* Kit 和上面列出的任何确认选项之间的结果不一致，请遵循必要的步骤以确保结果有效
- 在进行确认之前，在 37°C 下孵育后，增菌后的 BPW + PIF 添加剂可以在 2-8°C 下最多储存 72 hr。

第 9 部分

使用 iQ-Check Kit 确认单菌落

iQ-Check *Cronobacterspp.* Kit 也可用于确认琼脂平板上单个分离的 *克罗诺杆菌属* 菌落。该方法已获得 AFNOR 对 RAPID' *Sakazakii* 琼脂方法的正式确认。

1. 用牙签、无菌环或其他合适耗材（如移液枪枪头）从选择性或非选择性琼脂培养基上挑取一个单菌落。
2. 用 100 µl 胰蛋白胍盐或无菌蒸馏水在微量离心管中重悬菌落，并使用涡旋振荡器混匀。
3. 取 5 µl 悬浮液，加入 45 µl PCR 混合物（参见第 7 部分“操作流程”中的 D. “实时荧光定量 PCR”），参照 iQ-Check *Cronobacterspp.* 操作流程进行后续操作，获取数据并进行结果分析。

第 10 部分

测试性能和验证

iQ-Check *Cronobacterspp.* Kit 专为检测 *克罗诺杆菌属* 而设计。



BRD 07/23 – 01/13

农业企业的替代分析方法

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

NF 验证

iQ-Check *Cronobacterspp.* 已通过 NF 验证认证，作为参考方法 EN ISO 22964 (2017) 的替代方法，用于在婴儿配方奶粉，谷物以及环境样品中检测 *克罗诺杆菌属*。验证遵循 NF EN ISO 16140: 第 2 部分 2016 标准的方案，包括使用 CFX96 和 CFX Opus Deepwell 实时 PCR 检测系统。iQ-Check Free DNA Removal Solution 的使用已得到验证。相关软件为 CFX Manager IDE 软件（V2.2 及更高版本）或 CFX Maestro IDE 软件（版本 4.0 及更高版本）。“Crono Fast” APF 还针对所有样品进行了验证。证书编号：BRD 07/23 – 01/13.有效期至：参见 AFNOR 认证网站上提供的证书。

第 11 部分

参考资料

ISO 7218:2024. Microbiology of the food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination

ISO 22964 Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection of *Cronobacter spp.*

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

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

第 12 部分

修订记录

发布日期	文件编号	变更
2020 年 5 月	10000128585 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - AFNOR 验证的更新和延期： 375 g 样本 使用 FDRS 作为一个选项 “Crono Fast” APF - 新的文档设计和参考资料和内容的更新 - 文件编号更改 – 先前版本 808473 REV D
2022 年 12 月	10000128585 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - AFNOR 扩展：CFX Opus Deepwell 实时 PCR 系统，并升级到 CFX Manager 软件 IDE 版本 3.1 - 结果解释方案的澄清 - 增加了耗材的新目录号 - 将方案部分替换为汇总表 - 一般内容更新
2023 年 12 月	10000128585 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - 更新的操作流程表及确认方法
2024 年 12 月	10000128585 Ver D	<ul style="list-style-type: none"> - 澄清含益生菌和不含益生菌的婴儿配方奶粉和谷物食品协议
2025 年 4 月	10000128585 Ver E	<ul style="list-style-type: none"> - CFX Maestro 软件 IDE 版本 4.0 的验证扩展 - 新增了可使用万古霉素等效参考的选项

附录 — PCR 混合物计算指南

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

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

请访问 bio-rad.com/iqcheck 了解更多信息。

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

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

此处使用的所有商标均为其各自所有者的财产。



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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