
iQ-Check STEC VirX Kit

User Guide

Test for the real-time PCR detection of virulence genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

Catalog # 3578139



Table of Contents

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

Section 1

Introduction

Escherichia coli bacteria are normal flora in human and animal intestines and are usually harmless. However, some strains can cause diseases to humans. Among them, Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) are known to be highly pathogenic to humans. They can lead to hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome (HUS). STECs are defined by the presence of the *stx1* or *stx2* (Shiga toxin genes) in their genome. The *eae* (intimin) gene is an additional virulence marker. The most known of these STEC strains is *E. coli* O157:H7, although other non-O157 STEC strains have been linked to outbreaks, including O26, O45, O103, O111, O121, and O145.

STEC outbreaks are commonly associated with the consumption of raw meat, particularly beef, but also with dairy products and, more recently, with fresh produce. A sample positive for both *stx1/stx2* and *eae* targets typically requires further testing for the identification of the major *E. coli* serogroups.

The iQ-Check STEC VirX Kit, based on a multiplex real-time PCR system, allows the detection of the *stx1/stx2* and *eae* virulence genes in one well within a few hours after microbiological enrichment. A sample that would be positive for *stx1/stx2* and/or *eae* could then be tested with the iQ-Check STEC SerO Real-Time PCR Kit, depending on local requirements.

Section 2

The iQ-Check STEC VirX Technology

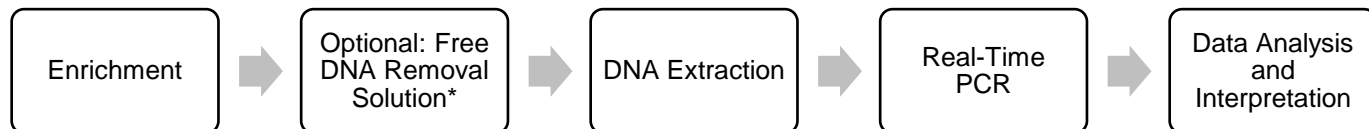
The iQ-Check STEC VirX Kit is a test based on gene amplification and detection by real-time PCR. The kit's ready-to-use PCR reagents contain oligonucleotides (primers and probes) specific for *stx1/stx2* and *eae* virulence genes, as well as DNA polymerase and nucleotides. Detection and data analysis are optimized for use with a Bio-Rad real-time PCR instrument, such as the CFX96 Touch Deep Well 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 allow DNA denaturation by heat followed by primers annealing to the target region. The DNA polymerase then uses these primers and deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) to extend the DNA, creating copies of the target DNA. These copies are called amplicons.

In real-time PCR, specific probes are used to detect DNA during the amplification step by hybridizing to the amplicons. These probes are linked to a fluorophore that fluoresces only when hybridized to the target sequence. FAM is the fluorophore linked to the probe hybridizing to the *stx1/stx2*-specific DNA sequence while Cy5 is linked to the probe hybridizing to the *eae* gene. In the absence of target DNA, no fluorescence will be detected. As the amount of amplicons increases with each round of amplification, fluorescence intensity also increases. The optical module measures this fluorescence at the annealing step during each PCR cycle while the associated software plots the fluorescence intensity versus number of cycles.

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

This test allows the qualitative detection of STEC virulence genes in select foods and environmental samples previously enriched by culture. It includes the following five main steps:



Section 3 Kit Components

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

Reagent ID	Reagent	Quantity Provided, ml
A	Lysis reagent	1 bottle, 20
B	Fluorescent probes	1 tube, 0.55
C	Amplification mix	1 tube, 4.4
D	PCR negative control	1 tube, 0.5
E	PCR positive control	1 tube, 0.25
F	Lysis beads	1 bottle, 17.6 g

Section 4 Shelf Life and Storage

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

Section 5 Materials Required but Not Supplied

Equipment

- Lab paddle blender for homogenizing test samples
- Incubator for sample microbiological enrichment
- Specific for extraction in sterile 1.5 ml conical screwcap tubes
 - Benchtop centrifuge capable of 10,000–12,000 x g
 - Dry heat block at 37 ± 2°C and/or 95–100°C
- Specific for extraction in deep well plate
 - Heating thermoshaker* capable of maintaining 37 ± 2°C and/or 95–100°C, with a mixing speed of at least 1,300 rpm
- Vortexer
- Magnetic stir plate

Section 5

- 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 System (catalog #3600037)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System for automated DNA extraction and PCR plate setup (catalog #3594911)

Note: We recommend using an uninterrupted power supply (UPS) with the thermal cycler and iQ-Check 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; 3555789, 2.3 L x 5 bags; 3555790, 5 L x 2 bags. BPW Standard catalog #12013259, dehydrated, 500 g; 12013258 dehydrated, 5 kg; 12013260 5L x 2 bags)
- Enrichment medium: STEC Enrichment Broth (SEB catalog #3564001, dehydrated, 500g)
- Enrichment medium (optional USDA standard enrichment): mTSB (for example, catalog #3564426, dehydrated, 500g) plus casamino acids and novobiocin
- Selective STEC Supplement (catalog #3564005)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalog #3594970)
- iQ-Check STEC SerO PCR Detection Kit (catalog #3578140) or iQ-Check STEC SerO II PCR Detection Kit (catalog #12013174)
- iQ-Check Purification Reagent (catalog #12012383)
- Specific for environmental samples
 - Environmental sponges
 - Environmental swabs
 - Neutralizing broth for sponges and swabs, such as Dey-Engley (D/E) or HiCap Neutralizing Broth, or Lethen broth
- Specific for extraction in tubes
 - 1.5 ml conical screwcap tubes, sterile (for example, catalog #2240110XTU)
- Specific for extraction in a deep well plate
 - 96-well deep well plate (iQ-Check Deep Well Microplates, catalog #3594900)
 - Plastic sealing film (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, catalog #3590139)
 - 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 #3594902, 50 µl x 5,760; 3594903, 1,000 µl x 3,840)
 - PCR Mix (catalog #3594901, 5 ml x 50)
- PCR plates, tubes, sealing tape, and caps
- Sterile filter tips adaptable to 20, 200, and 1,000 µl micropipets
- Tips for Combitip pipets or equivalent repeat pipettors; sterile, individually packaged
- 1 and 10 ml pipets
- 2 and 5 ml sterile test tubes
- Powder-free gloves
- Distilled sterile water
- Bleach, 5%
- Cleaning agent such as DNA AWAY or RNase AWAY

Section 6

Safety Precautions and Recommendations for Best Results

- This test must be performed by trained personnel
- 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

Section 6

- Clean work spaces periodically with 5% bleach and other decontaminating agents such as DNA AWAY
- Use powder-free gloves and avoid fingerprints and writing on tube caps. Both will interfere with data acquisition
- It is strongly advised to follow the general requirements described in the standard EN ISO 22174:2005 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food pathogens — General requirements and definitions)
- iQ-Check STEC VirX 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 instrument must be performed only by Bio-Rad field service engineers
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System
 - Improper use of the CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System may cause personal injury or damage to the instrument. Some components may pose a risk of personal injury due to excessive heat if improperly handled. For safe use, the CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System must be operated only by qualified laboratory personnel who have been appropriately trained. Servicing of 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 STEC VirX 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
 - Depending on local regulations, pathogenic *E. coli* is a Biosafety Level 2 or Level 3 organism. Biological samples such as enrichments have the potential to transmit infectious diseases. Follow all applicable local, state/provincial, and/or national regulations on disposal of biological waste. Wear appropriate protective equipment, which includes but is not limited to: protective eyewear, face shield, clothing/lab coat, and gloves. All work should be conducted in properly equipped facilities utilizing the appropriate safety equipment (for example, physical containment devices). Individuals should be trained in accordance with applicable regulatory and company/institution requirements before working with potentially infectious materials

- When testing is complete, all materials and media possibly containing pathogens should be decontaminated following current industry standards for the disposal of contaminated waste (that is, autoclave for 20 min at 121°C). Consult the Safety Data Sheet for additional information and local regulations for disposal.

Section 7 Protocol

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

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

Scope (matrices)	Enrichment	DNA Extraction		Certification
		Method	Format	
Raw ground beef and raw beef trim (375 g)	Prewarmed BPW 8–22 hr at 41.5 ± 1°C	Easy II	Tube/deep well	AOAC PTM*
Fresh spinach (375 g)	Prewarmed BPW 10–22 hr at 41.5 ± 1°C	Easy II	Tube/deep well	AOAC PTM*
MicroTally Swab	Prewarmed BPW 8–22 hr at 41.5 ± 1°C	Easy II	Tube/deep well	AOAC PTM*
Cannabis flower	BPW 20–22 hr at 37 ± 1°C	Easy I	Tube/deep well	AOAC PTM*
Meat products (325 g), environmental and carcass sponges	mTSB or mTSB+n 15–24 hr at 42 ± 1°C,	Easy II	Tube/deep well	USDA-FSIS MLG 5C.00
Raw milk products (25 g)	Prewarmed BPW + STEC Supplement 16–20 hr at 37 ± 1°C	Easy I	Tube/deep well	N/A
Environmental surface samples	Prewarmed BPW 8–22 hr at 41.5 ± 1°C	Easy II	Tube/deep well	N/A

* Validation also includes the use of the iQ-Check Free DNA Removal Solution and of the “STEC VirX MLG Fast” Application Protocol File for a reduced PCR run time. For ISO interpretation, use the “STEC VirX ISO Fast” (outside the scope of AOAC PTM Validation). Contact your Bio-Rad representative for more information.

A. Sample Enrichment

Enrichment media must be at the appropriate incubation temperature (37°C or 41.5°C when required) before use. For select matrices, selective STEC Supplement can be used with BPW. Prepare Selective STEC Supplement per instructions provided in the user guide. Add 2.5 ml of STEC Supplement to 225 ml of BPW (for 1,125 ml add 15 ml of STEC Supplement).

Smaller Sample Sizes (1–25 g)

1. Homogenize *n* g of sample in 9 x *n* ml prewarmed BPW or BPW + STEC Supplement (for example, 25 g in 225 ml) in a stomacher bag with incorporated filter.
2. Incubate for 18 ± 2 hr at 37°C or 41.5°C.
3. Follow the Easy II DNA extraction protocol.

Larger Sample Sizes (>25–375 g)

1. Homogenize *n* g of sample in 3 x *n* prewarmed BPW or BPW + STEC Supplement (for example,

Section 7

375 g in 1,125 ml), in a stomacher bag with incorporated filter.

2. Incubate for 20 ± 2 hr at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Follow the Easy II DNA extraction protocol.

MicroTally Swabs

1. Homogenize swab in 200 ml prewarmed BPW.
2. Incubate for 20 ± 2 hr at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Follow the Easy II DNA extraction protocol.

Environmental Swabs and Sponges

1. Homogenize swabs in 10 ml and sponges in 90 ml of prewarmed BPW. It is recommended to use neutralizing broth that does not contain aryl sulfonate complex. Neutralizing broths containing aryl sulfonate complex may require additional dilutions of the DNA extract.
2. Incubate for 20 ± 2 hr at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Follow the Easy II DNA extraction protocol.

Cannabis flower (10 g)

1. Homogenize 10 g of sample in 90 ml BPW.
2. Incubate for 21 ± 1 hr at $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Follow the Easy I DNA extraction protocol.

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:

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

6. Gently shake the lysis reagent by hand first to resuspend the resin. Then pipet while it is stirring at medium speed with the magnetic bar contained in the bottle, in order to keep it in suspension.
7. Reconstitute the final lysis reagent as follows:
 - a. Carefully pour all the contents from reagent F (lysis beads) into reagent A (lysis reagent).
 - b. Use consumables with a wide enough tip to allow pipetting of the homogenized lysis reagent.
 - c. Lysis reagent mixed with lysis beads (reagents A + F) has a shelf life of 6 months when stored at 4°C.

Easy I Protocol

1. Aliquot 100 µl of homogenized lysis (reagent A) to tubes or wells of a deep well plate.
2. Add 100 µl of enriched sample. Mix by pipetting up and down and close the tube with caps or seal the deep well plate with pre-pierced sealing film.
3. Incubate in the appropriate heat block at 95–100°C for 10–15 min or in the thermoshaker for 15–20 min at 1,300 rpm.
4. Vortex tubes at high speed.
5. If using a deep well plate, allow it to cool to room temperature (20–25°C).
6. Centrifuge tubes at 10,000–12,000 x g 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.

Easy II Protocol

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

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

2. Add 100 µl of enriched sample.

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

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

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

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

D. Real-Time PCR

Instrument and Software Setup

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

PCR mix preparation

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

Note: Use the PCR mix (reagent B + C) immediately after preparation. It is stable for 1 hr maximum at $2-8^{\circ}\text{C}$.

2. Pipet 20 μl of the PCR mix into each well according to your plate setup.
3. Add 5 μl of DNA extract, reagent D (negative control), or reagent E (positive control). Do not vortex the sample before pipetting. Hermetically seal the wells of the plate or strips. It is important to avoid bubbles at the bottom of the wells by pipetting carefully. As an optional step, centrifuge the sealed PCR plate or tube strips (quick spin) to eliminate any bubbles.
4. Place the PCR plate or tube 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.

E. Data Analysis

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

Interpreting results

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

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

Controls

Verify the positive and negative controls before interpreting sample results.

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

	<i>stx1/stx2</i> Detection (FAM channel)	<i>eae</i> Detection (Cy5 channel)	Internal Control Detection (HEX channel)
Negative control	Cq = N/A*	Cq = N/A*	26 ≤ Cq ≤ 36
Positive control	26 ≤ Cq ≤ 36	26 ≤ Cq ≤ 36	NA

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

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

Samples

A positive STEC virulence gene sample must have a Cq value ≥10 in both FAM and Cy5 channels.

- If the Cq value for both channels is less than 10, verify the raw data curve is a regular amplification curve (with a flat baseline, followed by a rapid exponential increase of fluorescence, and then a flattening out). If the curve seems correct, it may be considered a positive STEC virulence gene sample
- If the Cq value for FAM is ≥10 and Cq value for Cy5 is N/A, the sample is positive for *stx1/stx2* virulence genes
- If the Cq value for FAM is N/A and Cq value for Cy5 is ≥10, the sample is positive for *eae* virulence gene

If there is no Cq value (Cq = N/A) for FAM or Cy5, or if the curve is not a typical amplification curve, the internal control for that sample must then be analyzed:

- If there is no Cq value for FAM or Cy5 and the internal control has a Cq ≥26, this sample is considered a negative STEC virulence gene sample
- If the internal control also has no Cq value (Cq = N/A), this probably indicates inhibition of the PCR reaction. Dilute the sample (perform a 1:10 dilution in distilled sterile water using 10 µl of DNA extract), use 5 µl of the dilution for amplification, and repeat the PCR test
- If the Cq value for the internal control is <26, it is not possible to interpret the result. Verify that the threshold was correctly placed, or that the raw data curve is a regular amplification curve. If the curve does not have a characteristic shape, it will be necessary to repeat the PCR test

Interpretation of sample results is summarized in the following table:

<i>stx1/stx2</i> Detection (FAM channel)	<i>eae</i> Detection (Cy5 channel)	Internal Control Detection (HEX channel)	Interpretation
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	NA	Positive – Test with iQ-Check STEC SerO or iQ-Check SerO II Kit
Cq ≥ 10	Cq = N/A	NA	Positive for <i>stx1/stx2</i> , negative for <i>eae</i> . Stop sample analysis
Cq = N/A	Cq ≥ 10	NA	Positive for <i>eae</i> , negative for <i>stx1/stx2</i> . Stop sample analysis
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 26	Negative
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition*

* When all *stx1/stx2* and *eae* virulence genes and internal control detection give a Cq value = N/A, the sample must be tested again but diluted (1:10).

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

Section 8 Confirmation of Positive Results

Positive iQ-Check STEC VirX Kit results should be tested for identification of the seven major *E. coli* serogroups (O157, O26, O45, O103, O111, O121, and O145) with iQ-Check STEC SerO or iQ-Check STEC SerO II Kit.

For cannabis flower, follow AOAC SMPR 2020.012.

Section 9 Confirmation of Single Colonies Using iQ-Check Kit

The iQ-Check STEC VirX Kit may also be used to confirm single isolated STEC colonies on agar plates.

1. Pick an isolated colony, selective or nonselective, from an 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 20 µl of PCR mix (see Section 7 D. Real-Time PCR) and follow the rest of the iQ-Check STEC VirX protocol for the data and results interpretation. DNA extraction is not necessary.

Section 10

Test Performance and Validations



The iQ-Check STEC VirX Kit is validated by the AOAC Research Institute under the Performance Tested Method Program for detection of *stx1/stx2* and *eae* in raw ground beef, raw beef trim, fresh spinach, MicroTally Swabs, and cannabis flower. A positive result with iQ-Check should be considered presumptive and it is recommended it be confirmed by standard reference methods. Certificate number: 121203.

Section 11

References

Centers for Disease Control and Prevention. Bacterial Foodborne and Diarrheal Disease National Case Surveillance. Annual Report, 2005. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2007.

Scientific Report of European Food Safety Authority (2009). Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food). EFSA Journal 7, 1366 [43 pp.].

Food Safety and Inspection Service (2011). Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Certain Raw Beef Products

ISO/TS 13136:2011 (E), Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups – Qualitative Method.

United States Department of Agriculture Federal Register, Vol. 76, No. 182, 9 CFR Parts 416, 417, and 430, [Docket No. FSIS–2010–0023].

United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science (2019). Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. MLG 5C.00, Laboratory Guidebook Notice of Change, new chapter.

Section 12

Revision History

Release date	Document number	Change
March 2021	10000131516 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - New document design and update of references and content - Renewal and extension of AOAC validation for MicroTally Swabs, cannabis flower and “STEC VirX MLG Fast” APF - Included “STEC VirX ISO Fast” APF for ISO interpretation - Update of the colony confirmation protocol - Integration of the MLG FSIS 5C.00 reference - Document number change – previous version 808474 REV C

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)
1	5	15	49	265	795
2	11	33	50	270	810
3	16	48	51	275	825
4	22	66	52	281	845
5	27	81	53	286	860
6	32	96	54	292	880
7	38	115	55	297	890
8	43	130	56	302	905
9	49	147	57	308	925
10	54	160	58	313	940
11	59	177	59	319	960
12	65	195	60	324	970
13	70	210	61	329	990
14	76	230	62	335	1000
15	81	245	63	340	1020
16	86	260	64	346	1040
17	92	275	65	351	1050
18	97	290	66	356	1070
19	103	310	67	362	1090
20	108	325	68	367	1100
21	113	340	69	373	1120
22	119	357	70	378	1130
23	124	370	71	383	1150
24	130	390	72	389	1170
25	135	405	73	394	1180
26	140	420	74	400	1200
27	146	440	75	405	1210
28	151	450	76	410	1230
29	157	470	77	416	1250
30	162	485	78	421	1260
31	167	500	79	427	1280
32	173	520	80	432	1300
33	178	535	81	437	1310
34	184	550	82	443	1330
35	189	565	83	448	1340
36	194	580	84	454	1360
37	200	600	85	459	1380
38	205	615	86	464	1390
39	211	635	87	470	1410
40	216	650	88	475	1420
41	221	665	89	481	1445
42	227	680	90	486	1460
43	232	696	91	491	1470
44	238	715	92	497	1490
45	243	730	93	502	1510
46	248	745	94	508	1520
47	254	760	95	513	1540
48	259	777	96	518	1550

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



iQ-Check STEC VirX Kit

Guide d'utilisation

Test pour la détection par PCR en temps réel des gènes de virulence des *Escherichia coli* productrices de shigatoxines

N° de référence 3578139

BIO-RAD

Sommaire

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

Section 1

Introduction

Escherichia coli est une bactérie qui s'établit dans le tube digestif de l'homme et des animaux. Elle est généralement inoffensive. Toutefois, certaines souches peuvent provoquer des maladies chez l'homme. C'est le cas notamment des *E. coli* productrices de shigatoxines (STEC), hautement pathogènes. Elles sont susceptibles d'entraîner une colite hémorragique et un syndrome hémolytique et urémique (SHU). Les STEC sont définies par la présence du gène *stx1* ou *stx2* (gène de shigatoxine) dans leur génome. Le gène *eae* (codant pour l'intimine) constitue un marqueur de virulence supplémentaire. La souche STEC la plus connue est *E. coli* O157:H7. Toutefois, d'autres souches STEC non O157 sont également au centre d'intoxication alimentaire, notamment O26, O45, O103, O111, O121 et O145.

L'intoxication alimentaire survient majoritairement lors de la consommation de viande crue (le bœuf en particulier), mais également de produits laitiers et plus récemment de produits frais. Un échantillon positif à la fois pour les cibles *stx1/stx2* et *eae* nécessite généralement un test supplémentaire pour l'identification des principaux sérogroupes d'*E. coli*.

Le kit iQ-Check STEC VirX, basé sur un système multiplex par PCR en temps réel, permet la détection des gènes de virulence *stx1/stx2* et *eae* dans un puits, en quelques heures, après un enrichissement microbiologique. Un échantillon positif pour *stx1/stx2* et/ou *eae* peut alors être testé avec le kit de détection par PCR en temps réel iQ-Check STEC SerO, en fonction des exigences locales.

Section 2

Technologie iQ-Check STEC VirX

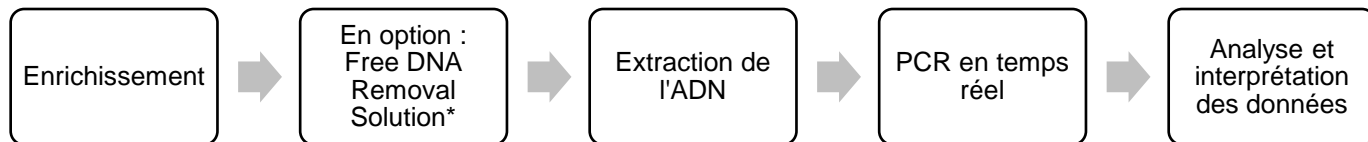
Le kit iQ-Check STEC VirX est un test basé sur l'amplification et la détection des gènes par PCR en temps réel. Les réactifs PCR prêts à l'emploi de ce kit contiennent des oligonucléotides (amorces et sondes) propres aux gènes de virulence *stx1/stx2* et *eae*, ainsi que de l'ADN polymérase et des nucléotides. La détection et l'analyse des données sont optimisées pour l'utilisation avec un instrument de PCR en temps réel Bio-Rad, comme le système CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System.

La PCR est une technique performante utilisée pour générer de nombreuses copies d'ADN cible. La réaction de PCR se compose de cycles de chauffage et de refroidissement pour dénaturer l'ADN, suivis de l'hybridation d'amorces avec la région cible. L'ADN polymérase utilise alors ces amorces et désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) pour allonger l'ADN, et crée ainsi des copies de l'ADN cible. Ces copies sont appelées amplicons.

Au cours de la PCR en temps réel, des sondes spécifiques détectent l'ADN en s'hybridant avec les amplicons. Ces sondes sont liées à un fluorophore qui produit une fluorescence uniquement lors d'une hybridation avec la séquence cible. FAM est le fluorophore lié à la sonde qui s'hybride à la séquence d'ADN propre à *stx1/stx2*, tandis que Cy5 est lié à la sonde qui s'hybride au gène *eae*. En l'absence d'ADN cible, aucune fluorescence ne sera détectée. Étant donné que le nombre d'amplicons augmente avec chaque cycle d'amplification, l'intensité de la fluorescence augmente également. Le module optique mesure cette fluorescence à l'étape d'hybridation pour chaque cycle de PCR tandis que le logiciel associé enregistre l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles.

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

Ce test permet la détection qualitative des gènes de virulence STEC dans les échantillons alimentaires et environnementaux préalablement enrichis par culture. Il comprend cinq étapes principales :



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

Section 3 Composants du kit

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

ID réactif	Réactif	Quantité fournie, ml
A	Réactif de lyse	1 flacon, 20
B	Sondes fluorescentes	1 tube, 0,55
C	Mélange d'amplification	1 tube, 4,4
D	Contrôle négatif PCR	1 tube, 0,5
E	Contrôle positif PCR	1 tube, 0,25
F	Billes de lyse	1 flacon, 17,6 g

Section 4 Durée de conservation et stockage

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

Section 5 Matériel requis non fourni

Matériel

- Stomacher pour homogénéiser les échantillons de test
- Incubateur pour l'enrichissement microbiologique des échantillons
- Matériel spécifique pour extraction en tubes coniques à bouchon fileté 1,5 ml stériles
 - Centrifugeuse de paillasse 10 000–12 000 x g
 - Bloc de chauffage à sec à 37 ± 2 °C et/ou 95–100 °C
- Matériel spécifique pour extraction en plaque Deep Well
 - Agitateur incubateur* capable de maintenir une température de 37 ± 2 °C et/ou 95–100 °C, avec une vitesse de mélange d'au moins 1 300 rpm

Section 5

- 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)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System pour l'extraction automatisée d'ADN et la préparation des plaques de PCR (n° de référence 3594911)

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

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

Produits

- Milieu d'enrichissement: eau peptonée tamponnée (par exemple, BPW Plus n° de référence 3564684, base déshydratée, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 flacons; 3555789, 2,3 L x 5 poches; 3555790, 5 L x 2 poches. BPW Standard n° de référence 12013259, base déshydratée, 500 g; 12013258 base déshydratée, 5 kg; 12013260 5 L x 2 poches)
- Milieu d'enrichissement: STEC Enrichment Broth (SEB n° de référence 3564001, base déshydratée, 500 g)
- Milieu d'enrichissement (en option enrichissement standard USDA): mTSB (par exemple, n° de référence 3564426, base déshydratée, 500 g) plus casamino acides et novobiocine
- Selective STEC Supplement (n° de référence 3564005)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (n° de référence 3594970)
- iQ-Check SerO PCR Detection Kit (n° de référence 3578140) ou iQ-Check STEC SerO II PCR Detection Kit (n° de référence 12013174)
- iQ-Check Purification Reagent (n° de référence 12012383)
- Produits spécifiques pour les échantillons environnementaux
 - Éponges d'échantillonnage
 - Écouvillons d'échantillonnage
 - Bouillon neutralisant pour éponges et écouvillons, par exemple, Dey-Engley (D/E) HiCap ou Letheen
- Produits spécifiques pour extraction en tubes
 - Tubes coniques à bouchon fileté 1,5 ml, stériles (par exemple, n° de référence 2240110XTU)
- Produits spécifiques pour extraction en plaque Deep Well
 - Plaque Deep Well, 96 puits (iQ-Check Deep Well Microplates, n° de référence 3594900)
 - Film à sceller en plastique (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, n° de référence 3590139)
 - Film à sceller pour plaque PCR (film X-Pierce, n° de référence 3593977, ou film à sceller préperforé pour plaque, n° de référence 3600040, Amérique du Nord uniquement)

- Produits spécifiques pour iQ-Check Prep System
 - Conteneur de dilution 60 ml (n° de référence 3594904)
 - Embouts à filtre (n° de référence 3594902, 50 µl x 5 760; 3594903, 1 000 µl x 3 840)
 - Tubes de mélange de PCR (n° de référence 3594901, 5 ml x 50)
- Plaques, tubes, ruban à sceller et bouchons pour PCR
- Embouts filtrants stériles adaptables pour micropipettes de 20, 200 et 1 000 µl
- Embouts pour pipettes Combitip ou pipettes à répétition équivalentes ; stériles, emballés individuellement
- Pipettes 1 et 10 ml
- Tubes à essai stériles de 2 et 5 ml
- Gants non poudrés
- Eau distillée stérile
- Eau de Javel, 5 %
- Agent nettoyant tel que DNA AWAY ou RNase AWAY

Section 6

Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux

- Ce test doit être réalisé par du personnel formé.
- Les échantillons et cultures d'enrichissement doivent être traités en tant que substances potentiellement infectieuses et éliminés conformément aux règles et réglementations locales.
- Tous les éléments 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 de 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.

Section 6

- Utiliser des gants non poudrés et éviter les empreintes digitales et l'écriture sur les bouchons des tubes. En effet, l'acquisition des données peut en être affectée.
- Il est fortement recommandé de respecter les exigences générales décrites dans la norme EN ISO 22174:2005 (Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences générales et définitions).
- Kit iQ-Check STEC VirX
 - 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 (GHS). Tout contact avec des acides peut entraîner la libération de gaz toxiques. Aucune précaution particulière n'est nécessaire si le kit est utilisé correctement. Si les produits sont inhalés, apporter de l'air frais et consulter un médecin en cas de troubles. En cas de contact avec les yeux, rincer l'œil ouvert pendant plusieurs minutes sous l'eau courante. Si les produits sont ingérés, provoquer le vomissement et appeler les secours médicaux.
- iQ-Check Prep System
 - Une utilisation incorrecte d'iQ-Check Prep System peut causer des blessures corporelles ou endommager l'instrument. En cas de manipulation incorrecte, certains composants peuvent entraîner un risque de blessures corporelles causées par une chaleur excessive. Pour une utilisation en toute sécurité, iQ-Check Prep System doit être uniquement manipulé par du personnel de laboratoire qualifié et ayant reçu une formation adéquate. La maintenance de l'instrument doit être réalisée uniquement par des techniciens de maintenance de Bio-Rad.
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System
 - Une utilisation incorrecte de CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System peut causer des blessures corporelles ou endommager l'instrument. En cas de manipulation incorrecte, certains composants peuvent entraîner un risque de blessures corporelles causées par une chaleur excessive. Pour une utilisation en toute sécurité, CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System doit être uniquement manipulé par du personnel de laboratoire qualifié et ayant reçu une formation adéquate. La maintenance de l'instrument doit être réalisée uniquement par des techniciens de maintenance de Bio-Rad.
- Enrichissement
 - L'utilisateur doit lire, comprendre et suivre toutes les informations relatives à la sécurité dans les instructions du kit iQ-Check STEC VirX. 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 ou masque de protection appropriés pour manipuler les réactifs et échantillons contaminés. Éviter tout contact avec le contenu du milieu d'enrichissement et des tubes de réactif après amplification. Éliminer les échantillons enrichis conformément aux normes actuelles de l'industrie.
 - En fonction des réglementations locales, les *E. coli* pathogènes sont des organismes de niveau de biosécurité 2 ou 3. Les échantillons biologiques tels que les enrichissements peuvent transmettre des maladies infectieuses. Suivre 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 et en utilisant les 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 121 °C). Consulter la fiche de données de sécurité pour obtenir des informations supplémentaires ainsi que les réglementations locales relatives à l'élimination.

Section 7

Protocole

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

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

Domaine (matrices)	Enrichissement	Extraction de l'ADN		Certification
		Méthode	Format	
Bœuf cru haché et bœuf cru en morceaux (375 g)	EPT préchauffée 8–22 hr à 41,5 ± 1 °C	Easy II	Tube/Deep Well	AOAC PTM*
Épinards frais (375 g)	EPT préchauffée 10–22 hr à 41,5 ± 1 °C	Easy II	Tube/Deep Well	AOAC PTM*
Tampon d'échantillonnage MicroTally	EPT préchauffée 8–22 hr à 41,5 ± 1 °C	Easy II	Tube/Deep Well	AOAC PTM*
Fleur de cannabis	EPT 20–22 hr à 37 ± 1 °C	Easy I	Tube/Deep Well	AOAC PTM*
Produits carnés (325 g), éponges pour échantillonnage de carcasses et de surfaces	mTSB ou mTSB+n 15–24 hr à 42 ± 1 °C	Easy II	Tube/Deep Well	USDA-FSIS MLG 5C.00
Produits à base de lait cru (25 g)	EPT préchauffée + STEC Supplement 16–20 hr à 37 ± 1 °C	Easy I	Tube/Deep Well	N/A
Échantillons de surface environnementale	EPT préchauffée 8–22 hr à 41,5 ± 1 °C	Easy II	Tube/Deep Well	N/A

* La validation inclut également l'utilisation d'iQ-Check Free DNA Removal Solution et le fichier de protocole d'application «STEC VirX MLG Fast» pour un temps d'exécution PCR réduit. Pour l'interprétation ISO, utilisez «STEC VirX ISO Fast» (utilisable hors validation AOAC PTM). Contacter le représentant Bio-Rad pour obtenir davantage d'informations.

A. Enrichissement de l'échantillon

Les milieux d'enrichissement doivent être portés à la température d'incubation appropriée (37 °C ou 41,5 °C selon le cas) avant utilisation. Pour les matrices sélectives, il est possible d'utiliser Selective STEC Supplement avec l'EPT. Préparer le supplément conformément aux instructions du guide d'utilisation. Ajouter 2,5 ml de supplément STEC à 225 ml d'EPT (pour 1 125 ml, ajouter 15 ml de supplément STEC).

Échantillons de petite taille (1–25 g)

1. Homogénéiser n g d'échantillon dans $9 \times n$ ml d'EPT préchauffée ou d'EPT + supplément STEC (par exemple, 25 g dans 225 ml) dans une poche à filtre incorporé.
2. Incuber pendant 18 ± 2 hr à 37 °C ou 41,5 °C.
3. Suivre le Protocole Easy II d'extraction d'AND.

Échantillons de grande taille (> 25–375 g)

1. Homogénéiser n g d'échantillon dans 3 x n d'EPT préchauffée ou d'EPT + supplément STEC (par exemple, 375 g dans 1 125 ml) dans une poche à filtre incorporé.
2. Incuber pendant 20 ± 2 hr à $41,5 \pm 1$ °C.
3. Suivre le Protocole Easy II d'extraction d'ADN.

Tampons d'échantillonnage MicroTally

1. Homogénéiser le tampon d'échantillonnage dans 200 ml d'EPT préchauffée.
2. Incuber pendant 20 ± 2 hr à $41,5 \pm 1$ °C.
3. Suivre le Protocole Easy II d'extraction d'ADN.

Écouvillons et éponges d'échantillonnage environnemental

1. Homogénéiser les écouvillons dans 10 ml d'EPT préchauffée et les éponges dans 90 ml d'EPT préchauffée. Il est recommandé d'utiliser un bouillon neutralisant qui ne contient pas de complexe aryle-sulfonate. Les bouillons neutralisants qui contiennent un complexe aryle-sulfonate peuvent nécessiter des dilutions supplémentaires de l'extrait d'ADN.
2. Incuber pendant 20 ± 2 hr à $41,5 \pm 1$ °C.
3. Suivre le Protocole simplifié II d'extraction d'ADN.

Fleur de cannabis (10 g)

1. Homogénéiser 10 g d'échantillon dans 90 ml d'EPT.
2. Incuber pendant 21 ± 1 hr à 37 ± 1 °C.
3. Suivre le Protocole Easy I d'extraction d'ADN.

B. Traitement de l'ADN libre

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

C. Extraction de l'ADN

Recommandations générales :

1. Allumer le bloc de chauffage ou l'agitateur thermique afin de préchauffer avant de commencer le test. Le régler sur 95–100 °C. Garder le réactif de lyse en suspension pendant le pipetage en mélangeant à vitesse moyenne sur une plaque d'agitation magnétique.
2. De façon générale, éviter d'agiter le sac 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.
3. Ouvrir les tubes et les puits avec précaution pour éviter les risques de contamination croisée.
4. Refroidir la plaque Deep Well avant de pipetter directement à travers le film préperforé.
5. Utiliser le barreau magnétique afin de maintenir le réactif de lyse en suspension. Pipetter en mélangeant à vitesse moyenne.

6. Dans un premier temps, agiter délicatement le réactif de lyse à la main pour remettre la résine en suspension. Garder le réactif de lyse en suspension pendant le pipettage en mélangeant à vitesse moyenne avec le barreau magnétique contenu dans le flacon.
7. Reconstituer le réactif de lyse final de la façon suivante :
 - a. Verser soigneusement tout le contenu du réactif F (billes de lyse) dans le réactif A (réactif de lyse).
 - b. Utiliser des consommables adaptés, avec un embout à large ouverture, pour permettre le pipettage du réactif de lyse homogénéisé.
 - c. Le réactif de lyse mélangé aux billes de lyse (réactifs A + F) présente une durée de conservation de 6 mois pour un stockage à 4 °C.

Protocole simplifié I

1. Aliquoter 100 µl du réactif de lyse homogénéisé (réactif A) dans des tubes ou dans les puits d'une plaque Deep Well.
2. Ajouter 100 µl d'échantillon enrichi. Mélanger en pipettant de haut en bas puis fermer les tubes avec leur bouchon ou sceller la plaque Deep Well avec du film préperforé.
3. Incuber dans le bloc de chauffage approprié à 95–100 °C pendant 10–15 min ou dans l'agitateur thermique pendant 15–20 min à une vitesse de 1 300 rpm.
4. Vortexer les tubes à grande vitesse.
5. Dans le cas d'une plaque Deep Well, laisser refroidir à température ambiante (20–25 °C).
6. Centrifuger les tubes à 10 000–12 000 x g pendant au moins 2 min. La centrifugation est inutile pour les plaques Deep Well.

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

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

Protocole Easy II

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

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

2. Ajouter 100 µl d'échantillon enrichi.

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

3. Mélanger la solution par aspiration/refoulement avec la pipette jusqu'à homogénéisation.
4. Fermer les tubes ou sceller la plaque Deep Well avec un film préperforé.
5. Placer les tubes dans le Cell Disruptor pendant 3 ± 1 min.
6. Incuber les tubes dans le bloc de chauffage à 95–100 °C pendant 10–15 min. Incuber la plaque Deep Well dans l'agitateur-incubateur à 1 300 rpm et 95–100 °C pendant 15–20 min.
7. Vortexer les tubes à grande vitesse et centrifuger à 10 000–12 000 x g pendant au moins 2 min. La centrifugation est inutile pour les plaques Deep Well.

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

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

D. PCR en temps réel

Configuration de l'instrument et du logiciel

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

Préparation du mélange de PCR

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

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

2. Pipetter 20 µl de ce mélange de PCR dans chaque puits en fonction de la plaque préparée.
3. Ajouter 5 µl d'extrait d'ADN, de réactif D (contrôle négatif) ou de réactif E (contrôle positif). Ne pas vortexer l'échantillon avant le 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.
4. Placer la plaque de PCR ou les bandes de tubes dans le thermocycleur. Veiller à placer la plaque correctement, le puits A1 dans le coin supérieur gauche. Fermer le module réactionnel.

Lancement de la PCR

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

E. Analyse des données

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

Interprétation des résultats

Une fois que les paramètres d'analyse des données ont été définis, les résultats sont interprétés en analysant les valeurs C_q de chaque échantillon (le cycle auquel la courbe d'amplification dépasse le seuil).

Le logiciel CFX Manager IDE assure une analyse automatisée complète des systèmes de détection par PCR en temps réel de Bio-Rad.

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 est nécessaire de répéter la réaction de PCR.

	Détection <i>stx1/stx2</i> (canal FAM)	Détection <i>eae</i> (canal Cy5)	Détection contrôle interne (canal HEX)
Contrôle négatif	Cq = N/A*	Cq = N/A*	26 ≤ Cq ≤ 36
Contrôle positif	26 ≤ Cq ≤ 36	26 ≤ Cq ≤ 36	NA

* Le logiciel indique une valeur Cq N/A (non applicable) lorsque la fluorescence d'un échantillon ne dépasse pas significativement le bruit de fond, et par conséquent ne 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 échantillon est considéré positif pour un gène de virulence STEC lorsqu'il présente une valeur Cq ≥ 10 pour les deux canaux FAM et Cy5.

- 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 du gène de virulence STEC.
- Si la valeur Cq pour FAM est ≥ 10 et si la valeur Cq pour Cy5 est N/A, l'échantillon est positif pour les gènes de virulence *stx1/stx2*.
- Si la valeur Cq pour FAM est N/A et si la valeur Cq pour Cy5 est ≥ 10, l'échantillon est positif pour le gène de virulence *eae*.

S'il n'y a pas de valeur Cq (Cq = N/A) pour FAM ni pour Cy5, 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 ni pour Cy5 et si le contrôle interne présente une valeur Cq ≥ 26, l'échantillon est considéré négatif pour les gènes de virulence STEC.
- Un contrôle interne qui n'a pas non plus de valeur Cq (Cq = N/A) indique probablement un phénomène d'inhibition de la réaction de PCR. Diluer l'échantillon (réaliser une dilution à 1:10 dans de l'eau distillée stérile avec 10 µl d'extrait d'ADN), utiliser 5 µl de la dilution pour l'amplification, et répéter le test de PCR.
- Si la valeur Cq pour le contrôle interne est < 26, 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

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

Détection <i>stx1/stx2</i> (canal FAM)	Détection <i>eae</i> (canal Cy5)	Détection contrôle interne (canal HEX)	Interprétation
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	NA	Positif – Tester avec le kit iQ-Check STEC SerO ou iQ-Check STEC SerO II
Cq ≥ 10	Cq = N/A	NA	Positif pour <i>stx1/stx2</i> , négatif pour <i>eae</i> . Arrêter l'analyse de l'échantillon
Cq = N/A	Cq ≥ 10	NA	Positif pour <i>eae</i> , négatif pour <i>stx1/stx2</i> . Arrêter l'analyse de l'échantillon
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 26	Négatif
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition*

* Lorsque la détection des gènes de virulence *stx1/stx2* et *eae* et du contrôle interne présente une valeur Cq = N/A, il est nécessaire de tester de nouveau l'échantillon, avec une dilution (1:10).

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

Il convient de tester les résultats positifs du kit iQ-Check STEC VirX à l'aide du kit iQ-Check STEC SerO ou iQ-Check STEC SerO II, en vue de l'identification des sept principaux sérogroupes *E. coli* (O157, O26, O45, O103, O111, O121 et O145).

Pour la fleur de cannabis, suivez AOAC SMPR 2020.012.

Section 9

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

Le kit iQ-Check STEC VirX peut également être utilisé pour confirmer des colonies isolées de STEC sur milieux de culture gélosés.

1. Choisir une colonie isolée, sur milieu de culture gélosé sélectif ou non sélectif, avec un cure-dent, une öse 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 20 µl de mélange de PCR (voir D. PCR en temps réel - Section 7) et suivre le reste du protocole iQ-Check STEC VirX pour l'interprétation des données et des résultats. L'extraction d'ADN n'est pas nécessaire.

Section 10

Performance du test et validations



Le kit iQ-Check STEC VirX est validé par AOAC Research Institute dans le cadre du programme « Performance Tested Methods » pour la détection de *stx1/stx2* et *eae* dans le bœuf cru haché, le bœuf cru en morceaux, les épinards frais, les tampons d'échantillonnage MicroTally, et la fleur de cannabis. Il convient de considérer un résultat positif avec iQ-Check comme étant présumé et il est recommandé de le confirmer grâce aux méthodes de référence standard. Numéro de certificat : 121203.

Section 11

Références

Centers for Disease Control and Prevention. Bacterial Foodborne and Diarrheal Disease National Case Surveillance. Annual Report, 2005. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2007.

Scientific Report of European Food Safety Authority (2009). Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food). EFSA Journal 7, 1366 [43 pp.].

Food Safety and Inspection Service (2011). Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Certain Raw Beef Products

ISO/TS 13136:2011 (E), Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups – Qualitative Method.

United States Department of Agriculture Federal Register, Vol. 76, No. 182, 9 CFR Parts 416, 417, and 430, [Docket No. FSIS–2010–0023].

United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science (2019). Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. MLG 5C.00, Laboratory Guidebook Notice of Change, new chapter.

Section 12

Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Mars 2021	10000131516 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Nouvelle conception de document et mise à jour des références et du contenu- Renouvellement et extension de la validation AOAC pour les tampons d'échantillonnage MicroTally, et la fleur de cannabis, ainsi que le fichier de protocole d'application «STEC VirX MLG Fast »- «STEC VirX ISO Fast » le fichier de protocole d'application inclus par l'interprétation ISO- Mise à jour du protocole de confirmation de colonie- Intégration de la référence MLG FSIS 5C.00- Modification du numéro de document (version précédente 808474 REV C)

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)
1	5	15	49	265	795
2	11	33	50	270	810
3	16	48	51	275	825
4	22	66	52	281	845
5	27	81	53	286	860
6	32	96	54	292	880
7	38	115	55	297	890
8	43	130	56	302	905
9	49	147	57	308	925
10	54	160	58	313	940
11	59	177	59	319	960
12	65	195	60	324	970
13	70	210	61	329	990
14	76	230	62	335	1000
15	81	245	63	340	1020
16	86	260	64	346	1040
17	92	275	65	351	1050
18	97	290	66	356	1070
19	103	310	67	362	1090
20	108	325	68	367	1100
21	113	340	69	373	1120
22	119	357	70	378	1130
23	124	370	71	383	1150
24	130	390	72	389	1170
25	135	405	73	394	1180
26	140	420	74	400	1200
27	146	440	75	405	1210
28	151	450	76	410	1230
29	157	470	77	416	1250
30	162	485	78	421	1260
31	167	500	79	427	1280
32	173	520	80	432	1300
33	178	535	81	437	1310
34	184	550	82	443	1330
35	189	565	83	448	1340
36	194	580	84	454	1360
37	200	600	85	459	1380
38	205	615	86	464	1390
39	211	635	87	470	1410
40	216	650	88	475	1420
41	221	665	89	481	1445
42	227	680	90	486	1460
43	232	696	91	491	1470
44	238	715	92	497	1490
45	243	730	93	502	1510
46	248	745	94	508	1520
47	254	760	95	513	1540
48	259	777	96	518	1550

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



iQ-Check STEC VirX Kit

Anwenderhandbuch

Test für den Nachweis von Virulenzgenen in Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* durch Real-Time PCR

Katalog-Nr. 3578139



Inhaltsverzeichnis

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

Abschnitt 1

Einleitung

Escherichia coli-Bakterien zählen zur normalen Darmflora von Menschen und Tieren und sind in der Regel harmlos. Einige Stämme können jedoch beim Menschen Krankheiten verursachen. Dazu gehören auch Shiga-Toxin bildende *E. coli* (STEC), von denen bekannt ist, dass sie für den Menschen hoch pathogen sind. Sie können eine hämorrhagische Kolitis und das hämolytisch urämisches Syndrom (HUS) hervorrufen. STECs werden durch das Vorhandensein von *stx1* oder *stx2* (Shiga-Toxin-Gene) in ihrem Genom definiert. Das *eae* (Intimin)-Gen ist ein zusätzlicher Virulenzmarker. Der bekannteste dieser STEC-Stämme ist *E. coli* O157:H7, wengleich auch andere STEC-Stämme mit Krankheitsausbrüchen in Verbindung gebracht worden sind, darunter O26, O45, O103, O111, O121 und O145.

STEC-Ausbrüche sind häufig mit dem Verzehr von rohem Fleisch, insbesondere Rindfleisch, aber auch von Milcherzeugnissen und in letzter Zeit von Frischwaren, verbunden. Bei einer Probe, die sowohl für *stx1/stx2* als auch für *eae* positiv ist, sind üblicherweise weitere Tests zur Identifizierung der wichtigsten *E. coli*-Serogruppen erforderlich.

Das iQ-Check STEC VirX Kit basiert auf einem Multiplex Real-Time PCR System und ermöglicht den Nachweis der Virulenzgene *stx1/stx2* und *eae* in einem Well innerhalb weniger Stunden nach der mikrobiologischen Anreicherung. Eine Probe, die für *stx1/stx2* und/oder *eae* positiv ist, könnte dann je nach den vor Ort bestehenden Anforderungen mit dem iQ-Check STEC SerO Real-Time PCR Kit getestet werden.

Abschnitt 2

Die iQ-Check STEC VirX Technologie

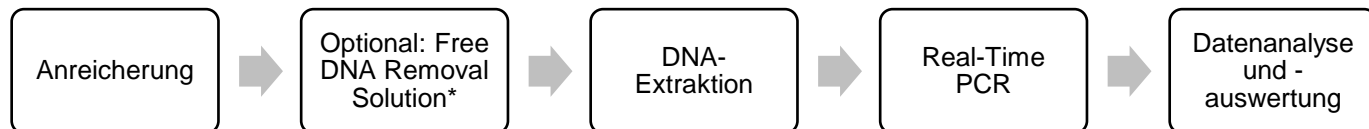
iQ-Check STEC VirX Kit ist ein Test, der auf der Amplifizierung und dem Nachweis von Genen mittels Real-Time PCR beruht. Die gebrauchsfertigen PCR-Reagenzien im Kit enthalten Oligonukleotide (Primer und Sonden), die für die Virulenzgene *stx1/stx2* und *eae* spezifisch sind, sowie DNA-Polymerase und Nukleotide. Der Nachweis und die Datenanalyse sind für die Verwendung mit einem Real-Time PCR Gerät von Bio-Rad optimiert, z. B. des CFX96 Touch Deep Well 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 in mehreren Erwärmungs- und Abkühlzyklen durch Hitze denaturiert, um es den Primern zu ermöglichen, an die Zielregion zu binden. Die DNA-Polymerase verwendet diese Primer und die Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) zur Verlängerung der DNA, wodurch Kopien der Ziel-DNA erzeugt werden. Diese Kopien werden als Amplikons bezeichnet.

Bei der Real Time-PCR beruht der DNA-Nachweis auf der Hybridisierung spezifischer Sonden an die Amplikons während der Amplifikation. An diese Sonden ist ein Fluorophor gebunden, das nur fluoresziert, wenn die Sonde an die Zielsequenz hybridisiert. Bei dem Fluorophor, das an die Sonde gebunden, die mit der *stx1/stx2*-spezifische DNA-Sequenz hybridisiert, handelt es sich um FAM, während die an das *eae*-Gen hybridisierende Sonde mit Cy5 verknüpft ist. Wenn keine Ziel-DNA vorhanden ist, ist keine Fluoreszenz nachweisbar. Da sich die Zahl der Amplikons mit jeder Amplifizierungsrunde erhöht, verstärkt sich auch die Fluoreszenzintensität. Beim Annealing-Schritt jedes PCR-Zyklus misst das optische Modul diese Fluoreszenz, während die zugehörige Software die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zyklen aufträgt.

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

Dieser Test gestattet den qualitativen Nachweis von STEC-Virulenzgenen in ausgewählten Lebensmittel- und Umgebungsproben, die zuvor durch Kultur angereichert wurden. Er umfasst die folgenden fünf Hauptschritte:



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

Abschnitt 3 Zusammensetzung des Kits

Das iQ-Check STEC VirX Kit enthält ausreichende Reagenzien für 96 Tests (94 Proben).

Reagenz ID	Reagenz	Menge
A	Lysereagenz	1 Flasche, 20 ml
B	Fluoreszenzsonden	1 Röhrchen, 0,55 ml
C	Amplifikationsmix	1 Röhrchen, 4,4 ml
D	PCR-Negativkontrolle	1 Röhrchen, 0,5 ml
E	PCR-Positivkontrolle	1 Röhrchen, 0,25 ml
F	Lysis Beads	1 Flasche, 17,6 g

Abschnitt 4 Haltbarkeit und Lagerung

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

Abschnitt 5 Zusätzlich benötigte Materialien

Geräte

- Labor-Paddel-Blender zum Homogenisieren von Testproben
- Inkubator zur mikrobiologischen Anreicherung der Proben
- Speziell für die Extraktion in sterilen konischen 1,5 ml Röhrchen mit Schraubdeckel
 - Tischzentrifuge 10.000 – 12.000 x g
 - Heitzrockenblock mit 37 ± 2°C und/oder 95–100°C
- Speziell für die Extraktion in einer Deep Well-Platte
 - Thermoshaker mit Heizfunktion*, der eine Temperatur von 37 ± 2°C und/oder 95–100°C aufrecht erhalten kann, mit einer Mischgeschwindigkeit von mindestens 1.300 rpm

Abschnitt 5

- Vortex
- Magnetrührer
- Mikropipetten für 20 µl, 200 µl, 1.000 µl
- Spitzen für Multipipetten, steril, einzeln verpackt
- Real-Time PCR System von Bio-Rad*; z. B. das CFX96 Touch Deep Well System (Katalog-Nr. 3600037)
- iQ-Check Prep System von Bio-Rad für die automatisierte DNA-Extraktion und PCR-Plattenvorbereitung (Katalog-Nr. 3594911)

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

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

Zubehör

- Anreicherungsmedium: gepuffertes Peptonwasser (z. B. BPW Plus Katalog-Nr. 3564684, dehydriert, 500 g; 3554179, 6 Flaschen x 225 ml; 3555789, 5 Beutel x 2,3 L; 3555790, 2 Beutel x 5 L. BPW Standard Katalog-Nr. 12013259, dehydriert, 500 g; 12013258 dehydriert, 5 kg; 12013260 2 Beutel x 5 L)
- Anreicherungsmedium: STEC Enrichment Broth (SEB Katalog-Nr.3564001, dehydriert, 500 g)
- Anreicherungsmedium (optional USDA-Standardanreicherung): mTSB (zum Beispiel Katalog-Nr. 3564426, dehydriert, 500 g) plus Casaminsäuren und Novobiocin
- Selektives STEC Supplement (Katalog-Nr. 3564005)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (Lösung zur Entfernung von freier DNA, Katalog-Nr. 3594970)
- iQ-Check SerO PCR Detection Kit (Katalog-Nr. 3578140) oder iQ-Check SerO II PCR Detection Kit (Katalog-Nr. 12013174)
- iQ-Check Purification Reagent (iQ-Check Reinigungsreagenz, Katalog-Nr. 12012383)
- Speziell für Umweltproben
 - Schwämme zur Gewinnung von Umweltproben
 - Tupfer zur Gewinnung von Umweltproben
 - Neutralisierungsmedium für Probennahme-Schwämme und -Tupfer, z. B. Dey-Engley (D/E) oder HiCap Neutralizing Broth oder Lethen Broth
- Speziell für die Extraktion in Röhren
 - Konische, sterile 1,5 ml Röhren mit Schraubdeckel (z. B. Katalog-Nr. 2240110XTU)
- Speziell für die Extraktion in einer Deep Well-Platte
 - Deep Well Platte mit 96 Wells (iQ-Check Deep Well Microplates, Katalog-Nr. 3594900)
 - Abdichtungsfolie aus Kunststoff (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, Katalog-Nr. 3590139)

- Abdichtungsfolie für PCR-Platten (X-Pierce Films, Katalog-Nr. 3593977 oder Pre-Pierced Plate Sealing Film, Katalog-Nr. 3600040, nur in Nordamerika)
- Speziell für das iQ-Check Prep System
 - 60 ml Verdünnungsbehälter (Katalog-Nr. 3594904)
 - Filterspitzen (Katalog-Nr. 3594902, 5.760 x 50 µl; 3594903, 3.840 x 1.000 µl)
 - PCR Mix tubes (Katalog-Nr. 3594901, 50 x 5 ml)
- PCR-Platten, -Röhrchen, -Abdichtungsfolie und -Deckel
- Sterile Filterspitzen für 20 µl, 200 µl und 1.000 µl Mikropipetten
- Sterile, einzeln verpackte Spitzen für Kombitip-Pipetten oder äquivalente Multipipetten
- 1 ml und 10 ml Pipetten
- Sterile 2 ml und 5 ml Teströhrchen
- Ungepuderte Handschuhe
- Destilliertes steriles Wasser
- 5%ige Bleichlösung
- Reinigungsmittel wie DNA AWAY oder RNase AWAY

Abschnitt 6

Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse

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

Abschnitt 6

- Die Arbeitsplätze regelmäßig mit 5%iger Bleichlösung und anderen Dekontaminationsmitteln, z. B. DNA AWAY, reinigen.
- Ungepuderte Handschuhe verwenden, und Fingerabdrücke und Beschriftungen auf Röhrchendeckeln vermeiden, da dies die Datenerfassung beeinträchtigen würde.
- Es wird dringend empfohlen, die in der Norm EN ISO 22174:2005 „Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln - Allgemeine Anforderungen und Begriffe“ beschriebenen Anforderungen einzuhalten.
- iQ-Check STEC VirX Kit
 - Alle Substanzen oder Mischungen in dem Testkit sind klassifizierte Produkte gemäß dem globalen vereinheitlichten System (Global Harmonized System, GHS). Der Kontakt mit Säuren kann zur Freisetzung giftiger Gase führen. Bei korrekter Anwendung sind keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen erforderlich. Bei Einatmen des Produkts Frischluft zuführen und bei Beschwerden einen Arzt hinzuziehen. Nach Augenkontakt mit dem Produkt das geöffnete Auge mehrere Minuten unter fließendem Wasser ausspülen. Wenn die Produkte verschluckt werden, Erbrechen herbeiführen und ärztliche Hilfe anfordern.
- iQ-Check Prep System
 - Die unsachgemäße Verwendung des iQ-Check Prep Systems kann zu Personenverletzungen oder Schäden am Gerät führen. Einige Komponenten können bei unsachgemäßer Handhabung aufgrund übermäßiger Hitze zu Personenverletzungen führen. Zur sicheren Verwendung darf das iQ-Check Prep System nur von qualifiziertem Laborpersonal verwendet werden, das entsprechend geschult wurde. Die Wartung des Geräts darf nur von Außendiensttechnikern von Bio-Rad durchgeführt werden.
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Nachweissystem
 - Die unsachgemäße Verwendung des CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Nachweissystems kann zu Personenverletzungen oder Schäden am Gerät führen. Einige Komponenten können bei unsachgemäßer Handhabung aufgrund übermäßiger Hitze zu Personenverletzungen führen. Für eine sichere Nutzung darf das CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Nachweissystem nur von qualifiziertem Laborpersonal bedient werden, das angemessen geschult wurde. Die Wartung des Geräts darf nur von Außendiensttechnikern von Bio-Rad durchgeführt werden.
- Anreicherung
 - Der Benutzer sollte alle Sicherheitshinweise in den Anweisungen für das iQ-Check STEC VirX Kit lesen, verstanden haben und befolgen. 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.
 - Pathogene *E. coli* sind Organismen der biologischen Sicherheitsstufe 2 oder 3 (abhängig von den vor Ort geltenden Regelungen). 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 Branchenstandards für die Entsorgung kontaminierter Abfälle zu dekontaminieren (d. h. 20 min bei 121°C autoklavieren). Weitere Informationen und lokale Bestimmungen zur Entsorgung entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt.

Abschnitt 7

Protokoll

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

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

Umfang (Matrizes)	Anreicherung	DNA-Extraktion		Zertifizierungsstelle
		Methode	Format	
Rohes Rinderhackfleisch und rohes Rindfleisch (375 g)	Vorgewärmtes BPW 8–22 hr bei 41,5 ± 1°C	Easy II	Röhrchen/Deep Well	AOAC PTM*
Roher Spinat (375 g)	Vorgewärmtes BPW 10–22 hr bei 41,5 ± 1°C	Easy II	Röhrchen/Deep Well	AOAC PTM*
MicroTally-Abstrich	Vorgewärmtes BPW 8–22 hr bei 41,5 ± 1°C	Easy II	Röhrchen/Deep Well	AOAC PTM*
Cannabisblume	BPW 20–22 hr bei 37 ± 1°C	Easy I	Röhrchen/Deep Well	AOAC PTM*
Fleischerzeugnisse (325 g), Schwämme mit Umgebungs- und Schlachtkörperproben	mTSB oder mTSB+n 15–24 hr bei 42 ± 1°C	Easy II	Röhrchen/Deep Well	USDA-FSIS MLG 5C.00
Rohmilcherzeugnisse (25 g)	Vorgewärmtes BPW + STEC Supplement 16–20 hr bei 37 ± 1°C	Easy I	Röhrchen/Deep Well	N/A
Proben von Oberflächen in der Umgebung	Vorgewärmtes BPW 8–22 hr bei 41,5 ± 1°C	Easy II	Röhrchen/Deep Well	N/A

* Die Validierung umfasst auch die Verwendung der iQ-Check Free DNA Removal Solution und der Anwendungsprotokolldatei „STEC VirX MLG Fast“ für eine kürzere PCR-Laufzeit. Für die ISO-Interpretation ist ise „STEC VirX ISO Fast“ (Kann außerhalb der AOAC PTM-Validierung verwendet werden). Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihre Bio-Rad-Vertretung.

A. Probenanreicherung

Das Anreicherungsmedium muss vor der Verwendung die geeignete Inkubationstemperatur (37°C oder 41,5°C, falls erforderlich) aufweisen. Bei bestimmten Matrizes kann das selektive STEC Supplement mit BPW verwendet werden. Das selektive STEC Supplement nach den im Anwenderhandbuch angegebenen Anweisungen vorbereiten. 2,5 ml STEC Supplement zu 225 ml BPW geben (für 1.125 ml 15 ml STEC Supplement zugeben).

Kleinere Probenmengen (1–25 g)

1. n g der Probe in $9 \times n$ ml vorgewärmtem BPW oder BPW + STEC Supplement (z. B. 25 g in 225 ml) in einem Stomacherbeutel mit integriertem Filter homogenisieren.
2. Bei 37°C oder 41,5°C 18 ± 2 hr inkubieren.

Abschnitt 7

3. Das DNA-Extraktionsprotokoll Easy II befolgen.

Größere Probenmengen (> 25–375 g)

1. n g der Probe in $3 \times n$ ml vorgewärmtem BPW oder BPW + STEC Supplement (z. B. 375 g in 1.125 ml) in einem Stomacherbeutel mit integriertem Filter homogenisieren.
2. Bei $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ 20 ± 2 hr inkubieren.
3. Das DNA-Extraktionsprotokoll Easy II befolgen.

MicroTally-Abstriche

1. Den Tupfer in 200 ml vorgewärmtem BPW homogenisieren.
2. Bei $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ 20 ± 2 hr inkubieren.
3. Das DNA-Extraktionsprotokoll Easy II befolgen.

Tupfer und Schwämme mit Umgebungsproben

1. Tupfer in 10 ml und Schwämme in 90 ml vorgewärmtem BPW homogenisieren. Es wird empfohlen, eine neutralisierende Nährlösung zu verwenden, die keinen Arylsulfonatkomplex enthält. Neutralisierende Nährlösungen mit Arylsulfonatkomplex können zusätzliche Verdünnungen des DNA-Extrakts erfordern.
2. Bei $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ 20 ± 2 hr inkubieren.
3. Das DNA-Extraktionsprotokoll Easy II befolgen.

Cannabisblume

1. 10 g der Probe in 90 ml vorgewärmtem BPW homogenisieren.
2. Bei 37°C oder $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 21 ± 1 hr inkubieren.
3. Das DNA-Extraktionsprotokoll Easy I befolgen.

B. Behandlung zur Entfernung freier DNA

Die iQ-Check Free DNA Removal Solution eignet sich bestens zur Entfernung freier DNA. Es sind die Empfehlungen von Bio-Rad im Anwenderhandbuch zu beachten.

C. DNA-Extraktion

Allgemeine Empfehlungen:

1. Schalten Sie vor Testbeginn den Testblock oder Thermoshaker ein, um ihn vorzuheizen. Auf $95\text{--}100^\circ\text{C}$ einstellen. Das Lysereagenz während des Pipettierens durch Rühren bei mittlerer Geschwindigkeit auf einer Magnetrührplatte in Suspension halten.
2. Generell sollte vermieden werden, den Anreicherungsbeutel zu schütteln und große Lebensmittelfragmente in der Probe zu entnehmen. Bei Lebensmittelproben mit fettigem Überstand sollte die Probe knapp unterhalb dieser Schicht entnommen werden.
3. Beim Öffnen von Röhrchen und Wells vorsichtig vorgehen, um eine mögliche Kreuzkontamination zu vermeiden.
4. Die Deep Well-Platte kühlen, bevor direkt durch die vorgestanzte Abdichtungsfolie pipettiert wird.
5. Den Magnetrührer verwenden, um das Lysereagenz in Suspension zu halten. Den Pipettiervorgang

durchführen, während es bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt wird.

6. Das Lysereagenz zuerst vorsichtig per Hand schütteln, um das Harz zu resuspendieren. Das Lysereagenz pipettieren, während es bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt wird (Magnetrührstab befindet sich in der Flasche), damit es in Suspension bleibt.
7. Das Lysereagenz wie folgt zur Verwendung rekonstituieren:
 - a. Den Inhalt von Reagenz F (Lyse-beads) vollständig zu Reagenz A (Lysereagenz) geben.
 - b. Zum Pipettieren des homogenisierten Lysereagenzes Pipettenspitzen mit ausreichend großer Öffnung verwenden.
 - c. Das mit Lysis Beads gemischte Lysereagenz (Reagenz A + F) ist bei 4°C für 6 Monate haltbar.

Protokoll Easy I

1. 100 µl homogenisiertes Lysereagenz A (Reagenz A) in Röhrchen oder Wells einer Deep Well-Platte aliquotieren.
2. 100 µl der angereicherten Probe dazugeben. Durch Auf- und Abpipettieren mischen und das Röhrchen mit einem Deckel bzw. die Deep Well Platte mit vorgestanzter Abdichtungsfolie verschließen.
3. Im entsprechenden Wärmeblock 10–15 min bei 95–100°C oder im Thermoshaker 15–20 min bei 1.300 rpm inkubieren.
4. Die Röhrchen bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortex mischen.
5. Wird eine Deep Well-Platte verwendet, muss sie auf Raumtemperatur (20–25°C) gebracht werden.
6. Die Röhrchen 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.

Protokoll Easy II

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

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

2. 100 µl der angereicherten Probe dazugeben.

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

3. Die Lösung durch Auf- und Abpipettieren mischen, bis sie homogen ist.
4. Die Röhrchen verschließen bzw. die Deep Well-Platte mit vorgestanzter Abdichtungsfolie verschließen.
5. Die Röhrchen für 3 ± 1 min in den Cell Disruptor geben.
6. Die Röhrchen 10–15 min in den auf 95–100°C vorgeheizten Heizblock stellen bzw. die Deep Well-Platte 15–20 min unter Agitation bei 1.300 rpm bei 95–100°C in den Inkubator stellen.
7. Die Röhrchen mit 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 muss mindestens eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden. Die entsprechenden Volumen für jedes Reagenz sind in der Pipettiertabelle im Anhang zur Berechnung des PCR Reaktionsgemisches angegeben.

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

2. Aus diesem PCR Reaktionsgemisch dem jeweils verwendeten Platten-Layout entsprechend 20 µl in jedes Well pipettieren.
3. 5 µl DNA-Extrakt, Reagenz D (Negativkontrolle) oder Reagenz E (Positivkontrolle) zugeben. Die Probe vor dem Pipettieren nicht vortexen. Die Wells der Platte bzw. die Teststreifen hermetisch abdichten. Es ist wichtig, Luftblasen am Boden der Wells zu vermeiden, indem behutsam pipettiert wird. Optional kann die verschlossene PCR-Platte bzw. können die verschlossenen PCR-Röhrchenstreifen zur Beseitigung etwaiger Luftblasen kurz zentrifugiert werden.
4. Die PCR-Platte bzw. die PCR-Röhrchenstreifen 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.

E. Datenanalyse

Die Datenanalyse kann direkt am Ende des PCR-Laufs oder später durch Öffnen der gespeicherten Datendatei durchgeführt werden. Es sind die Anweisungen im entsprechenden Benutzerhandbuch für die CFX Manager IDE-Software zum Öffnen von Datendateien und zur Festlegung der Datenanalyseparameter zu beachten.

Auswertung der Ergebnisse

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

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

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>stx1/stx2</i> (FAM-Kanal)	Nachweis von <i>eae</i> (Cy5-Kanal)	Nachweis der internen Kontrolle (HEX-Kanal)
Negativkontrolle	Cq = N/A*	Cq = N/A*	$26 \leq Cq \leq 36$
Positivkontrolle	$26 \leq Cq \leq 36$	$26 \leq Cq \leq 36$	NA

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

Proben

Eine Probe, die positiv für ein STEC-Virulenzgen ist, muss sowohl im FAM- als auch im Cy5-Kanal einen Cq-Wert ≥ 10 aufweisen.

- Liegt der Cq-Wert für beide Kanäle unter 10, muss in den Rohdaten überprüft werden, ob es sich bei der Kurve um eine normale Amplifikationskurve handelt (d. h. um eine Kurve mit flacher Basislinie, gefolgt von einem raschen exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz und anschließender Abflachung). Wenn die Kurve korrekt aussieht, ist die Probe möglicherweise positiv hinsichtlich eines STEC-Virulenzgens.
- Wenn der Cq-Wert für FAM ≥ 10 liegt und der Cq-Wert für Cy5 N/A lautet, ist die Probe positiv für die Virulenzgene *stx1/stx2*.
- Wenn der Cq-Wert für FAM N/A lautet und der Cq-Wert für Cy5 ≥ 10 beträgt, ist die Probe positiv für das Virulenzgen *eae*.

Wenn kein Cq-Wert für FAM oder Cy5 vorliegt (Cq = N/A) oder es sich bei der Kurve nicht um eine typische Amplifikationskurve handelt, muss die interne Kontrolle für die entsprechende Probe analysiert werden:

- Wenn kein Cq-Wert für FAM oder Cy5 vorliegt und der Cq-Wert für die interne Kontrolle ≥ 26 beträgt, gilt die Probe als negativ für STEC-Virulenzgene.
- Falls auch für die interne Kontrolle kein Cq-Wert vorliegt (Cq = N/A), bedeutet dies, dass die PCR-Reaktion vermutlich gehemmt war. In diesem Fall muss die Probe verdünnt (mit 10 μ l DNA-Extrakt eine 1:10 Verdünnung in destilliertem sterilem Wasser durchführen, dann 5 μ l der verdünnten Lösung für die Amplifikation verwenden) und die PCR wiederholt werden.
- Falls der Cq-Wert für die interne Kontrolle < 26 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>stx1/stx2</i> (FAM-Kanal)	Nachweis von <i>eae</i> (Cy5-Kanal)	Nachweis der internen Kontrolle (HEX-Kanal)	Auswertung
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	NA	Positiv – Mit dem iQ-Check STEC SerO oder iQ-Check STEC SerO II testen
Cq ≥ 10	Cq = N/A	NA	Positiv für <i>stx1/stx2</i> , negativ für <i>eae</i> . Probenanalyse beenden
Cq = N/A	Cq ≥ 10	NA	Positiv für <i>eae</i> , negativ für <i>stx1/stx2</i> . Probenanalyse beenden
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 26	Negativ
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Hemmung*

* Wenn sowohl beim Nachweis der *stx1/stx2*- und der *eae*-Virulenzgene 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

Bei positiven Ergebnissen im iQ-Check STEC VirX sollte sich zur Identifizierung der sieben Hauptserogruppen von *E. coli* (O157, O26, O45, O103, O111, O121 und O145) eine Analyse mit dem iQ-Check STEC SerO oder iQ-Check STEC SerO II Kit anschließen.

Folgen Sie für cannabisblume AOAC SMPR 2020.012.

Abschnitt 9

Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit

iQ-Check STEC VirX kann auch zur Bestätigung isolierter STEC-Einzelkolonien auf Agarplatten verwendet werden.

1. Mit einem Zahnstocher, einer sterilen Impföse oder einem anderen geeigneten Verbrauchsartikel (z. B. einer Pipettenspitze) eine isolierte Kolonie von einer selektiven oder nicht-selektiven Agarplatte 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 20 µl PCR-Mix geben (siehe Abschnitt 7 „Real-Time PCR“) und zur Daten- und Ergebnisinterpretation die übrigen Schritte des iQ-Check STEC VirX-Protokolls befolgen. Eine DNA-Extraktion ist nicht erforderlich.

Abschnitt 10

Testleistung und Testvalidierungen



Das iQ-Check STEC VirX Kit wurde vom AOAC Research Institute im Rahmen des Performance Tested Method-Programms zum Nachweis von *stx1/stx2* und *eae* in rohem Rinderhackfleisch, rohem Rindfleisch, rohem Spinat, MicroTally-Abstrichen, und cannabisblume validiert. Ein positives Ergebnis mit iQ-Check ist als vorläufig positiv zu betrachten und sollte mit Standardreferenzmethoden bestätigt werden. Zertifikatnummer: 121203.

Abschnitt 11

Literatur

Centers for Disease Control and Prevention. Bacterial Foodborne and Diarrheal Disease National Case Surveillance. Annual Report, 2005. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2007.

Scientific Report of European Food Safety Authority (2009). Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food). EFSA Journal 7, 1366 [43 pp.].

Food Safety and Inspection Service (2011). Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Certain Raw Beef Products

ISO/TS 13136:2011 (E), Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups – Qualitative Method.

United States Department of Agriculture Federal Register, Vol. 76, No. 182, 9 CFR Parts 416, 417, and 430, [Docket No. FSIS–2010–0023].

United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science (2019). Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. MLG 5C.00, Laboratory Guidebook Notice of Change, new chapter.

Abschnitt 12

Revisionshistorie

Versionsdatum	Dokumentnummer	Änderung
März 2021	10000131516 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Neues Dokumentdesign und Aktualisierung der Quellenangaben und des Inhalts- Erneuerung und Erweiterung der AOAC-Validierung für MicroTally-Abstriche, cannabisblume und „STEC VirX MLG Fast“ APF- Enthaltene „STEC VirX ISO Fast“ für die ISO-Intepretation- Aktualisierung des Protokolls zur Koloniebestätigung- Hinzufügung des Bezugsverweises auf MLG FSIS 5C.00- Änderung der Dokumentnummer - vorhergehende Version 808474 REV C

Anhang — Pipettiertabelle für das PCR Reaktionsgemisch

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

Gesamtzahl an Proben und Kontrollen	Sonden Reagenz B (µl)	Amplifikationsmix Reagenz C (µl)	Gesamtzahl an Proben und Kontrollen	Sonden Reagenz B (µl)	Amplifikationsmix Reagenz C (µl)
1	5	15	49	265	795
2	11	33	50	270	810
3	16	48	51	275	825
4	22	66	52	281	845
5	27	81	53	286	860
6	32	96	54	292	880
7	38	115	55	297	890
8	43	130	56	302	905
9	49	147	57	308	925
10	54	160	58	313	940
11	59	177	59	319	960
12	65	195	60	324	970
13	70	210	61	329	990
14	76	230	62	335	1000
15	81	245	63	340	1020
16	86	260	64	346	1040
17	92	275	65	351	1050
18	97	290	66	356	1070
19	103	310	67	362	1090
20	108	325	68	367	1100
21	113	340	69	373	1120
22	119	357	70	378	1130
23	124	370	71	383	1150
24	130	390	72	389	1170
25	135	405	73	394	1180
26	140	420	74	400	1200
27	146	440	75	405	1210
28	151	450	76	410	1230
29	157	470	77	416	1250
30	162	485	78	421	1260
31	167	500	79	427	1280
32	173	520	80	432	1300
33	178	535	81	437	1310
34	184	550	82	443	1330
35	189	565	83	448	1340
36	194	580	84	454	1360
37	200	600	85	459	1380
38	205	615	86	464	1390
39	211	635	87	470	1410
40	216	650	88	475	1420
41	221	665	89	481	1445
42	227	680	90	486	1460
43	232	696	91	491	1470
44	238	715	92	497	1490
45	243	730	93	502	1510
46	248	745	94	508	1520
47	254	760	95	513	1540
48	259	777	96	518	1550

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



iQ-CheckSTEC VirX Kit

Manuale utente

Test per la rilevazione mediante PCR real-time di geni di virulenza in *Escherichia coli* produttori di Shiga-tossina

Catalogo #3578139

BIO-RAD

Indice

Sezione 1	Introduzione	1
Sezione 2	Tecnologia di iQ-Check STEC VirX	1
Sezione 3	Componenti del kit	2
Sezione 4	Durata e conservazione	2
Sezione 5	Materiali necessari ma non forniti	2
	Apparecchiatura	2
	Materiali	3
Sezione 6	Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali	4
Sezione 7	Protocollo	6
	Arricchimento del campione	6
	Trattamento per la rimozione del DNA libero	7
	Estrazione del DNA	7
	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	11
Sezione 10	Performance del test e validazioni	12
Sezione 11	Riferimenti	12
Sezione 12	Cronologia delle revisioni	13
Appendice	— Guida al calcolo della miscela di PCR	14

Sezione 1

Introduzione

I batteri *Escherichia coli* fanno parte della comune flora dell'intestino umano e animale e sono generalmente innocui. Alcuni ceppi, tuttavia, possono causare malattie agli esseri umani. Tra questi, gli *E. coli* produttori di Shiga-tossina (STEC) sono noti per essere altamente patogeni per l'uomo. Possono causare colite emorragica e sindrome emolitico-uremica (HUS). Gli STEC sono caratterizzati dalla presenza dei geni *stx1* o *stx2* (geni della Shiga-tossina) nel loro genoma. Il gene *eae* (intimina) gene è un marcatore di virulenza aggiuntivo. Tra questi ceppi di STEC, il più noto è *E. coli* O157:H7, sebbene altri ceppi di STEC non O157 siano stati associati a focolai, tra cui O26, O45, O103, O111, O121 e O145.

I focolai di STEC sono comunemente associati al consumo di carne cruda, in particolare manzo, ma anche di prodotti lattiero-caseari e, più recentemente, di prodotti freschi. Un campione positivo sia per i target *stx1/stx2* sia per *eae* richiede generalmente ulteriori test per l'identificazione dei principali sierogruppi di *E. coli*.

Il kit iQ-Check STEC VirX, basato su un sistema PCR real-time multiplex, consente la rilevazione dei geni di virulenza *stx1/stx2* ed *eae* in un pozzetto entro poche ore dall'arricchimento microbiologico. Un campione che risulta positivo per *stx1/stx2* e/o *eae* può essere successivamente analizzato con il kit iQ-Check STEC SerO Real-Time PCR, a seconda dei requisiti locali.

Sezione 2

Tecnologia di iQ-Check STEC VirX

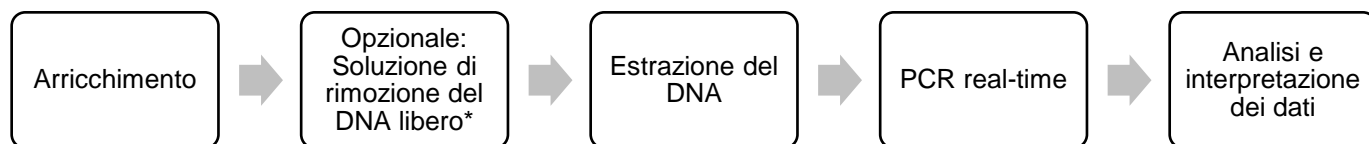
Il kit iQ-Check STEC VirX è un test basato sull'amplificazione e sulla rilevazione genica mediante PCR real-time. I reagenti PCR pronti all'uso inclusi nel kit contengono oligonucleotidi (primer e sonde) specifici per i geni di virulenza *stx1/stx2* ed *eae*, oltre a DNA polimerasi e nucleotidi. La rilevazione e l'analisi dei dati vengono ottimizzate per l'utilizzo tramite uno strumento PCR real-time di Bio-Rad, come il sistema di rilevazione mediante PCR real-time CFX96 Touch Deep Well.

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

Nella PCR real-time, vengono utilizzate specifiche sonde per rilevare il DNA durante la fase di amplificazione tramite ibridazione degli ampliconi. Queste sonde sono collegate a un fluoroforo che emette fluorescenza solo se ibridato alla sequenza target. FAM è il fluoroforo collegato alla sonda ibridata alla sequenza di DNA specifica di *stx1/stx2*, mentre Cy5 è collegato alla sonda ibridata al gene *eae*. In assenza di DNA target, non viene rilevata alcuna fluorescenza. Man mano che la quantità di ampliconi aumenta ad ogni ciclo di amplificazione, l'intensità della fluorescenza aumenta a sua volta. Il modulo ottico misura questa fluorescenza nella fase di appaiamento durante ogni ciclo PCR, mentre il software associato traccia l'intensità della fluorescenza rispetto al numero di cicli.

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

Questo test consente la rilevazione qualitativa dei geni di virulenza STEC in determinati prodotti alimentari e campioni ambientali precedentemente arricchiti mediante coltura. Prevede le cinque fasi principali seguenti:



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

Sezione 3 Componenti del kit

Il kit iQ-Check STEC VirX contiene reagenti sufficienti per eseguire 96 test (94 campioni).

ID reagente	Reagente	Quantità fornita, ml
A	Reagente di lisi	1 flacone, 20
B	Sonde fluorescenti	1 provetta, 0,55
C	Miscela di amplificazione	1 provetta, 4,4
D	Controllo negativo PCR	1 provetta, 0,5
E	Controllo positivo PCR	1 provetta, 0,25
F	Sfere di lisi	1 flacone, 17,6 g

Sezione 4 Durata e conservazione

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

Sezione 5 Materiali necessari ma non forniti

Apparecchiatura

- Omogeneizzatore da laboratorio per i campioni dei test
- Incubatore per l'arricchimento microbiologico dei campioni
- Materiali specifici per l'estrazione in provette da 1,5 ml coniche, sterili e con tappo a vite
 - Centrifuga da banco 10.000-12.000 x g
 - Blocco termico a secco a 37 ± 2°C e/o 95–100°C
- Materiali specifici per l'estrazione in una piastra deep well
 - Termoagitatore* in grado di mantenere 37 ± 2°C e/o 95–100°C con una velocità di miscelazione di almeno 1300 rpm
- Vortex

Sezione 5

- Agitatore magnetico
- Micropipette da 20, 200, e 1.000 µl
- Puntali per pipettatori a ripetizione; sterili e confezionati singolarmente
- Sistema PCR real-time di Bio-Rad*, ad esempio CFX96 Touch Deep Well (catalogo #3600037)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System per l'estrazione automatizzata di DNA e la preparazione della piastra PCR (catalogo #3594911)

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

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

Materiali

- Terreno di arricchimento: acqua peptonata tamponata APT (ad esempio, BPW Plus catalogo #3564684, in forma disidratata, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 flaconi; 3555789, 2,3 L x 5 sacche; 3555790, 5 L x 2 sacche. BPW Standard catalogo #12013259, in forma disidratata, 500 g; 12013258 in forma disidratata, 5 kg; 12013260 5 L x 2 sacche)
- Terreno di arricchimento: STEC Enrichment Broth (SEB catalogo #3564001, in forma disidratata, 500 g)
- Terreno di arricchimento (opzionale arricchimento secondo lo standard USDA): mTSB (ad esempio, catalogo #3564426, in forma disidratata, 500 g) con l'aggiunta di casaminoacidi e novobiocina
- Selective STEC Supplement (catalogo #3564005)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalogo #3594970)
- iQ-Check SerO PCR Detection Kit (catalogo #3578140) o iQ-Check STEC SerO II PCR Detection Kit (catalogo #12013174)
- iQ-Check Purification Reagent (catalogo #12012383)
- Materiali specifici per campioni ambientali
 - Spugne ambientali
 - Tamponi ambientali
 - Brodo neutralizzante per spugne e tamponi come Dey-Engley (D/E), HiCap Neutralizing Broth, o Lethen Broth
- Materiali specifici per l'estrazione in provette
 - Provette coniche sterili con tappo a vite da 1,5 ml (ad esempio, catalogo #2240110XTU)
- Materiali specifici per l'estrazione in una piastra deep well
 - Piastra da 96 deep well (iQ-Check Deep Well Microplate, catalogo #3594900)
 - Pellicola sigillante in plastica (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, catalogo #3590139)

- Pellicola sigillante per piastre PCR (X-Pierce Film, catalogo #3593977, o Pre-Pierced Plate Sealing Film, #3600040, solo Nord America)
- Materiali specifici per il sistema iQ-Check Prep
 - Contenitore per la diluizione da 60 ml (catalogo #3594904)
 - Puntali con filtro (catalogo #3594902, 50 µl x 5.760; 3594903, 1.000 µl x 3.840)
 - Provette per miscela per PCR (catalogo #3594901, 5 ml x 50)
- Piastre PCR, provette, nastro sigillante e tappi
- Puntali sterili con filtro adattabili a micropipette da 20, 200 e 1.000 µl
- Puntali per pipette Combitip o pipettatori a ripetizione equivalenti, sterili e confezionati singolarmente
- Pipette da 1 e 10 ml
- Provette per test sterili da 2 e 5 ml
- Guanti senza polvere
- Acqua distillata sterile
- Candeggina, 5%
- Detergente come DNA AWAY o RNase AWAY

Sezione 6

Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali

- Il presente test deve essere eseguito da personale addestrato
- I campioni e le colture di arricchimento devono essere manipolati come materiali potenzialmente infetti ed eliminati nel rispetto delle direttive e normative locali
- Tutti i materiali potenzialmente infetti devono essere collocati in autoclave prima dello smaltimento
- La qualità dei risultati si basa sulla rigorosa osservanza delle buone pratiche di laboratorio (ad esempio, la norma EN ISO 7218), soprattutto in materia di PCR:
 - Non spostare mai apparecchiature da laboratorio (pipette, provette, ecc.) da una postazione di lavoro all'altra.
 - Utilizzare sempre un controllo positivo e un controllo negativo per ogni serie di reazioni di amplificazione
 - Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza
 - Per garantirne l'omogeneità, miscelare i reagenti nel vortex prima di utilizzarli
 - Verificare periodicamente l'accuratezza e la precisione delle pipette, nonché il corretto funzionamento degli strumenti
 - Cambiare i guanti di frequente, in particolare se si sospetta la presenza di contaminazione

Sezione 6

- Pulire gli spazi di lavoro periodicamente con candeggina al 5% e altri prodotti disinfettanti come DNA AWAY
- Utilizzare guanti senza polvere e non lasciare impronte digitali e scritte sui tappi delle provette. Entrambi interferiscono con l'acquisizione dei dati
- Si consiglia vivamente di osservare i requisiti generali illustrati nella norma EN ISO 22174:2005 (Microbiologia di alimenti e mangimi per animali — Reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca dei microrganismi patogeni degli alimenti — Requisiti generali e definizioni)
- iQ-Check STEC VirX 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. In caso di inalazione del prodotto, spostarsi in una zona ben areata e rivolgersi a un medico in caso di disturbi. Se il prodotto viene a contatto con gli occhi, sciacquarli mantenendoli aperti sotto l'acqua corrente per alcuni minuti. In caso di ingestione del prodotto, indurre il vomito e contattare un medico
- iQ-Check Prep System
 - L'utilizzo improprio del sistema iQ-Check Prep potrebbe causare lesioni personali o danni allo strumento. Se manipolati in modo improprio, alcuni componenti potrebbero presentare un rischio di lesioni personali dovuto al calore eccessivo. Per garantire sicurezza, il sistema iQ-Check Prep deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato e opportunamente addestrato. La manutenzione dello strumento deve essere eseguita esclusivamente da tecnici Bio-Rad
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System
 - L'utilizzo improprio del sistema di rilevazione mediante PCR real-time CFX96 Touch Deep Well potrebbe causare lesioni personali o danni allo strumento. Se manipolati in modo improprio, alcuni componenti potrebbero presentare un rischio di lesioni personali dovuto al calore eccessivo. Per garantire sicurezza, il sistema di rilevazione mediante PCR real-time CFX96 Touch Deep Well deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato e opportunamente addestrato. La manutenzione dello strumento deve essere eseguita esclusivamente da tecnici Bio-Rad
- Arricchimento
 - L'utente è tenuto a leggere, comprendere e osservare tutte le informazioni relative alla sicurezza contenute nelle istruzioni del kit iQ-Check STEC VirX. Conservare le istruzioni di sicurezza per consultazioni future. Al fine di ridurre i rischi biologici e legati all'esposizione a sostanze chimiche, eseguire i test degli agenti patogeni in un laboratorio adeguatamente attrezzato sotto la supervisione di personale addestrato. Seguire sempre le pratiche di laboratorio standard sulla sicurezza, indossando ad esempio indumenti protettivi e una protezione per gli occhi durante la manipolazione di reagenti e campioni contaminati. Evitare il contatto con il contenuto dei terreni di arricchimento e delle provette di reagenti al termine dell'amplificazione. Smaltire i campioni arricchiti in conformità alle norme di settore vigenti
 - A seconda delle normative locali, l'*E. coli* patogeno è un organismo che richiede il livello di biosicurezza 2 o 3. I campioni biologici come gli arricchimenti sono in grado di trasmettere malattie infettive. Osservare ogni normativa locale, statale/provinciale e/o nazionale applicabile in materia di smaltimento di rifiuti biologici. Indossare i dispositivi di protezione individuale, inclusi, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, protezioni per gli occhi, schermi per il viso, camici da laboratorio e guanti. Il lavoro deve essere svolto presso strutture

- adeguatamente attrezzate e utilizzando i dispositivi di sicurezza opportuni (ad esempio, quelli per il contenimento fisico). Prima di operare con materiali potenzialmente infetti, gli addetti devono essere addestrati in conformità ai requisiti normativi aziendali/dell'ente applicabili
- Al termine del test, tutti i materiali e i terreni che potrebbero contenere agenti patogeni devono essere decontaminati in linea con le attuali norme industriali in materia di smaltimento dei rifiuti contaminati (ovvero, collocarli in autoclave per 20 min a 121°C). Per maggiori informazioni relative alle normative locali in materia di smaltimento, consultare la scheda di sicurezza.

Sezione 7

Protocollo

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

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

Oggetto (matrici)	Arricchimento	Estrazione del DNA		Certificazione
		Metodo	Formato	
Manzo macinato crudo e tagli di manzo crudo (375 g)	APT preriscaldata 8-22 hr a 41,5 ± 1°C	Easy II	Provetta/deep well	AOAC PTM*
Spinaci freschi (375 g)	APT preriscaldata 10-22 hr a 41,5 ± 1°C	Easy II	Provetta/deep well	AOAC PTM*
Tampone MicroTally	BPW preriscaldata 8-22 hr a 41,5 ± 1°C	Easy II	Provetta/deep well	AOAC PTM*
Fiore di cannabis	APT 20-22 hr a 37 ± 1°C	Easy I	Provetta/deep well	AOAC PTM*
Prodotti a base di carne (325 g), spugne ambientali e per il campionamento di carcasse	mTSB o mTSB+n 15-24 hr a 42 ± 1°C,	Easy II	Provetta/deep well	USDA-FSIS MLG 5C.00
Prodotti a base di latte crudo (25 g)	APT preriscaldata + Supplemento STEC 16-20 hr a 37 ± 1°C	Easy I	Provetta/deep well	N/A
Campioni prelevati da superfici ambientali	APT preriscaldata 8-22 hr a 41,5 ± 1°C	Easy II	Provetta/deep well	N/A

* La presente validazione comprende anche l'utilizzo di iQ-Check Free DNA Removal Solution e del file di protocollo di applicazione "STEC VirX MLG Fast" per un tempo di ciclo PCR ridotto. Per l'interpretazione ISO, utilizzare "STEC VirX ISO Fast" (può essere utilizzato al di fuori della convalida AOAC PTM). Per maggiori informazioni contattare il rappresentante Bio-Rad locale.

A. Arricchimento del campione

I terreni di arricchimento devono essere mantenuti alla temperatura di incubazione opportuna (37°C o 41,5°C se necessario) prima dell'utilizzo. Per determinate matrici, è possibile utilizzare il supplemento selettivo STEC con APT. Preparare il supplemento selettivo STEC in base alle istruzioni fornite nel manuale utente. Aggiungere 2,5 ml di supplemento STEC a 225 ml di APT (per 1.125 ml aggiungere 15 ml di supplemento STEC).

Campioni di dimensioni minori (1–25 g)

1. Omogeneizzare n g di campione in 9 x n ml di APT preriscaldata o di APT + Supplemento STEC (ad esempio, 25 g in 225 ml) in un sacco stomacher con filtro incorporato.
2. Incubare per 18 ± 2 hr a 37°C o 41,5°C.
3. Seguire il protocollo Easy II per l'estrazione del DNA.

Campioni di dimensioni maggiori (>25–375 g)

1. Omogeneizzare n g di campione in $3 \times n$ di APT preriscaldato o di APT + Supplemento STEC (ad esempio, 375 g in 1.125 ml) in un sacco stomacher con filtro incorporato.
2. Incubare per 20 ± 2 hr a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Seguire il protocollo Easy II per l'estrazione del DNA.

Tamponi MicroTally

1. Omogeneizzare il tampone in 200 ml di APT preriscaldato.
2. Incubare per 20 ± 2 hr a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Seguire il protocollo Easy II per l'estrazione del DNA.

Tamponi e spugne ambientali

1. Omogeneizzare i tamponi in 10 ml e le spugne in 90 ml di APT preriscaldato. Si raccomanda di utilizzare un brodo neutralizzante che non contenga un complesso di aril solfonato. I brodi neutralizzanti che contengono un complesso di aril solfonato possono richiedere ulteriori diluizioni dell'estratto di DNA.
2. Incubare per 20 ± 2 hr a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Seguire il protocollo Easy II per l'estrazione del DNA.

Fiore di cannabis

1. Omogeneizzare 10 g di campione in 90 ml di APT.
2. Incubare per 20 ± 1 hr a 37°C .
3. Seguire il protocollo Easy I per l'estrazione del DNA.

B. Trattamento per la rimozione del DNA libero

Il prodotto iQ-Check Free DNA Removal Solution 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:

1. Prima di iniziare il test, accendere il blocco termico o il termoagitatore con la funzione di preriscaldamento. Impostare a $95-100^\circ\text{C}$. Durante il pipettaggio, mantenere in sospensione il reagente di lisi agitando a media velocità su una piastra di agitazione magnetica.
2. Di norma, evitare l'agitazione del sacco di arricchimento e la raccolta di grossi frammenti di residui alimentari. Per i campioni alimentari aventi un surnatante grasso, raccogliere il campione appena al di sotto di questo strato.
3. Aprire le provette e i pozzetti con attenzione per evitare eventuali contaminazioni crociate.
4. Raffreddare la piastra deep well prima di effettuare il pipettaggio direttamente nella pellicola sigillante preforata.
5. Utilizzare la barra magnetica per mantenere in sospensione il reagente di lisi. Effettuare il pipettaggio mentre è in atto un'agitazione a media velocità.
6. Per risospendere la resina, per prima cosa agitare delicatamente a mano il reagente di lisi. Al fine di

mantenerlo in sospensione, effettuare il pipettaggio mentre è in atto un'agitazione a media velocità mediante la barra magnetica contenuta nel flacone.

7. Ricostituire il reagente di lisi finale come segue:
 - a. Versare con attenzione tutto il contenuto del reagente F (sfere di lisi) nel reagente A (reagente di lisi).
 - b. Utilizzare materiali di consumo con un puntale largo abbastanza da consentire il pipettaggio del reagente di lisi omogeneizzato.
 - c. Se conservato a 4°C, il reagente di lisi miscelato con le sfere di lisi (reagente A + F) ha una validità pari a 6 mesi.

Protocollo Easy I

1. Aliquotare 100 µl di reagente di lisi omogeneizzato (reagente A) nelle provette o nei pozzetti di una piastra deep well.
2. Aggiungere 100 µl di campione arricchito. Miscelare pipettando verso l'alto e verso il basso, quindi chiudere le provette con i tappi o sigillare la piastra deep well con la pellicola sigillante preforata.
3. Incubare nel blocco termico indicato a 95–100°C per 10–15 min o nel termoagitatore per 15–20 min a 1.300 rpm.
4. Miscelare le provette nel vortex ad alta velocità.
5. In caso di utilizzo di una piastra deep well, lasciarla raffreddare a temperatura ambiente (20–25°C).
6. Centrifugare le provette a 10.000–12.000 x g per almeno 2 min. La centrifugazione non è necessaria per la piastra deep well.

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

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

Protocollo Easy II

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

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

2. Aggiungere 100 µl di campione arricchito.

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

3. Miscelare la soluzione pipettando in alto e in basso fino a che non si completa l'omogeneizzazione.
4. Chiudere le provette o sigillare la piastra deep well con la pellicola sigillante preforata.
5. Posizionare le provette nel cell disruptor per 3 ± 1 min.
6. Incubare le provette nel blocco termico a 95-100°C per 10-15 min. Collocare nell'agitatore-incubatore la piastra deep well con agitazione a 1.300 rpm a 95-100°C per 15-20 min.
7. Miscelare le provette nel vortex ad alta velocità e centrifugare a 10.000-12.000 x g per almeno 2 min. La centrifugazione per la piastra deep well non è necessaria.

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

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

D. PCR real-time

Installazione strumento e software

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

Preparazione della miscela di PCR

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

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

2. Pipettare 20 µl della miscela di PCR in ogni pozzetto secondo lo schema analitico scelto.
3. Aggiungere 5 µl di estratto di DNA, reagente D (controllo negativo) o reagente E (controllo positivo). Non miscelare nel vortex il campione prima del pipettaggio. Sigillare ermeticamente i pozzetti della piastra o le strip. È importante pipettare con attenzione al fine di evitare la formazione di bolle sul fondo dei pozzetti. Come fase facoltativa, per eliminare eventuali bolle centrifugare la piastra PCR o le strip delle provette sigillate (centrifuga rapida).
4. Posizionare la piastra PCR o le strip delle provette nel termociclatore. Accertarsi di posizionare la piastra con il pozzetto A1 nell'angolo superiore sinistro. Chiudere il modulo di reazione.

Eeguire la PCR

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

E. Analisi dei dati

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

Interpretazione dei risultati

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

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

Controlli

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

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

	Rilevazione <i>stx1/stx2</i> (canale FAM)	Rilevazione <i>eae</i> (canale Cy5)	Rilevazione controllo interno (canale HEX)
Controllo negativo	Cq = N/A*	Cq = N/A*	$26 \leq Cq \leq 36$
Controllo positivo	$26 \leq Cq \leq 36$	$26 \leq Cq \leq 36$	N/A

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

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

Campioni

Un campione di gene di virulenza STEC positivo deve avere un valore Cq ≥ 10 sia nel canale FAM sia nel canale Cy5.

- Se il valore Cq è inferiore a 10 per entrambi i canali, verificare che la curva dei dati non elaborati sia una curva di amplificazione regolare (con linea di base piatta, seguita da un rapido aumento esponenziale della fluorescenza e infine da un secondo appiattimento). Se la curva appare corretta, potrebbe essere considerata come campione di gene di virulenza STEC positivo
- Se il valore Cq per FAM è ≥ 10 e il valore Cq per Cy5 è N/A, il campione è positivo per i geni di virulenza *stx1/stx2*
- Se il valore Cq per FAM è N/A e il valore Cq per Cy5 è ≥ 10 , il campione è positivo per il gene di virulenza *eae*

In assenza di valore Cq (Cq = N/A) per FAM o Cy5, o se il risultato non è una tipica curva di amplificazione, il controllo interno per il campione in questione deve essere analizzato:

- Se non esiste un valore Cq per FAM o Cy5 e il controllo interno ha un Cq ≥ 26 , il campione viene considerato come campione negativo ai geni di virulenza STEC
- Se il controllo interno non presenta a sua volta un valore Cq (Cq = N/A), ciò indica probabilmente inibizione della reazione PCR. Diluire il campione (eseguire una diluizione 1:10 in acqua distillata sterile tramite 10 μ l di estratto di DNA), utilizzare 5 μ l della diluizione per l'amplificazione, quindi ripetere il test PCR.
- Se il valore Cq per il controllo interno è < 26 , l'interpretazione del risultato non sarà possibile. Verificare il corretto posizionamento della soglia, o che la curva dei dati non elaborati sia una curva di amplificazione regolare. Se la curva non possiede una forma caratteristica, sarà necessario ripetere il test PCR

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

Rilevazione <i>stx1/stx2</i> (canale FAM)	Rilevazione <i>eae</i> (canale Cy5)	Rilevazione controllo interno (canale HEX)	Interpretazione
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	NA	Positivo – Test con il kit iQ-Check STEC SerO o iQ-Check STEC SerO II
Cq ≥ 10	Cq = N/A	NA	Positivo per <i>stx1/stx2</i> , negativo per <i>eae</i> . Interrompere l'analisi del campione
Cq = N/A	Cq ≥ 10	NA	Positivo per <i>eae</i> , negativo per <i>stx1/stx2</i> . Interrompere l'analisi del campione
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 26	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Inibizione*

* Qualora la rilevazione produca un valore Cq = N/A per tutti i geni di virulenza *stx1/stx2* ed *eae* e per il controllo interno, il campione deve essere testato nuovamente ma diluito (1:10).

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

Sezione 8

Conferma dei risultati positivi

I risultati positivi con il kit iQ-Check STEC VirX devono essere testati per l'identificazione dei sette principali sierogruppi di *E. coli* (O157, O26, O45, O103, O111, O121 e O145) con il kit iQ-Check STEC SerO o iQ-Check STEC SerO II.

Per i fiori di cannabis, segui AOAC SMPR 2020.012.

Sezione 9

Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check

Il kit iQ-Check STEC VirX può essere utilizzato anche per la conferma di singole colonie isolate di STEC su piastre agar.

1. Prelevare una colonia isolata da una piastra agar selettiva o non selettiva, servendosi di un'ansa sterile o altri prodotti di consumo adattati (ad esempio, un puntale per pipetta).
2. Risospendere la colonia in 100 µl di sale triptone o acqua distillata sterile in una provetta per microcentrifuga. Omogeneizzare il tutto mediante un miscelatore vortex.
3. Utilizzare 5 µl della sospensione con 20 µl di miscela di PCR (vedere il paragrafo D. PCR real-time nella sezione 7) e seguire il resto del protocollo iQ-Check STEC VirX per l'interpretazione di dati e risultati. L'estrazione di DNA non è necessaria.

Sezione 10

Performance del test e validazioni



Il kit iQ-Check STEC VirX Kit ha ottenuto la validazione di AOAC Research Institute in linea con il Performance Tested Method Program (programma metodo testato per le prestazioni) per la rilevazione di *stx1/stx2* ed *eae* in manzo macinato crudo, tagli di manzo crudo, spinaci freschi, tamponi MicroTally, e fiore di cannabis. Un risultato positivo con iQ-Check deve essere considerato come presunto, si raccomanda pertanto di effettuare la conferma tramite metodi standard di riferimento. Numero di certificato: 121203.

Sezione 11

Riferimenti

Centers for Disease Control and Prevention. Bacterial Foodborne and Diarrheal Disease National Case Surveillance. Annual Report, 2005. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2007.

Scientific Report of European Food Safety Authority (2009). Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food). EFSA Journal 7, 1366 [43 pp.].

Food Safety and Inspection Service (2011). Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Certain Raw Beef Products

ISO/TS 13136:2011 (E), Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups – Qualitative Method.

United States Department of Agriculture Federal Register, Vol. 76, No. 182, 9 CFR Parts 416, 417, and 430, [Docket No. FSIS–2010–0023].

United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science (2019). Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. MLG 5C.00, Laboratory Guidebook Notice of Change, new chapter.

Sezione 12

Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero di documento	Modifica
Marzo 2021	10000131516 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Nuova struttura del documento e aggiornamento di riferimenti e contenuto- Rinnovo ed estensione della validazione di AOAC per tamponi MicroTally, e fiore di cannabis e del file di protocollo di applicazione "STEC VirX MLG Fast"- Incluso "STEC VirX ISO Fast" per l'interpretazione ISO- Aggiornamento del protocollo per la conferma delle colonie- Integrazione del riferimento MLG FSIS 5C.00- Modifica al numero di documento – versione precedente 808474 REV C

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 amplificazione reagente C, (μl)	Numero totale di campioni e controlli	Sonde Reagente B, μl	Miscela amplificazione reagente C, (μl)
1	5	15	49	265	795
2	11	33	50	270	810
3	16	48	51	275	825
4	22	66	52	281	845
5	27	81	53	286	860
6	32	96	54	292	880
7	38	115	55	297	890
8	43	130	56	302	905
9	49	147	57	308	925
10	54	160	58	313	940
11	59	177	59	319	960
12	65	195	60	324	970
13	70	210	61	329	990
14	76	230	62	335	1000
15	81	245	63	340	1020
16	86	260	64	346	1040
17	92	275	65	351	1050
18	97	290	66	356	1070
19	103	310	67	362	1090
20	108	325	68	367	1100
21	113	340	69	373	1120
22	119	357	70	378	1130
23	124	370	71	383	1150
24	130	390	72	389	1170
25	135	405	73	394	1180
26	140	420	74	400	1200
27	146	440	75	405	1210
28	151	450	76	410	1230
29	157	470	77	416	1250
30	162	485	78	421	1260
31	167	500	79	427	1280
32	173	520	80	432	1300
33	178	535	81	437	1310
34	184	550	82	443	1330
35	189	565	83	448	1340
36	194	580	84	454	1360
37	200	600	85	459	1380
38	205	615	86	464	1390
39	211	635	87	470	1410
40	216	650	88	475	1420
41	221	665	89	481	1445
42	227	680	90	486	1460
43	232	696	91	491	1470
44	238	715	92	497	1490
45	243	730	93	502	1510
46	248	745	94	508	1520
47	254	760	95	513	1540
48	259	777	96	518	1550

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 dei rispettivi titolari.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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



iQ-Check STEC VirX Kit

Guia do usuário

Teste para a detecção por PCR em tempo real de genes de virulência de *Escherichia coli* produtores da toxina Shiga

Nº do catálogo 3578139



Índice

Seção 1	Introdução	1
Seção 2	A tecnologia iQ-Check STEC VirX	1
Seção 3	Componentes do Kit	2
Seção 4	Prazo de validade e armazenamento	2
Seção 5	Materiais necessários, mas não fornecidos	2
	Equipamento	2
	Suprimentos.....	3
Seção 6	Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados	4
Seção 7	Protocolo	6
	Enriquecimento da amostra	6
	Tratamento de remoção de DNA livre.....	7
	Extração de DNA.....	7
	PCR em Tempo Real.....	9
	Análise de dados.....	9
Seção 8	Confirmação de Resultados Positivos	11
Seção 9	Confirmação de Colônias Isoladas usando o Kit iQ-Check	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

Bactérias *Escherichia coli* estão normalmente presentes na flora intestinal de humanos e animais, e são geralmente inofensivas. Entretanto, algumas cepas podem causar doenças aos seres humanos. Entre elas, a *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC) são conhecidas como altamente patogênicas para humanos. Elas podem levar a colite hemorrágica e síndrome hemolítica uremica (HUS). STECs são definidos pela presença de *stx1* ou *stx2* (genes da toxina Shiga) no seu genoma. O *eae* (intimina) é um marcador de virulência adicional. A mais conhecida destas cepas STEC é *E. coli* O157:H7, embora outras cepas STEC não-O157 tenham sido ligadas a surtos, incluindo O26, O45, O103, O111, O121, e O145.

Os surtos de STEC são geralmente associados ao consumo de carne crua, particularmente carne bovina, mas também de produtos lácteos, e mais recentemente, de produtos frescos. Uma amostra positiva para ambos os alvos *stx1/stx2* e *eae* normalmente requer testes adicionais para a identificação dos principais sorogrupos de *E. coli*.

O Kit iQ-Check STEC VirX, baseado em um sistema multiplex de PCR em tempo real, permite a detecção dos genes de virulência *stx1/stx2* e *eae* em um poço dentro de poucas horas após o enriquecimento microbiológico. Uma amostra que seria positiva para *stx1/stx2* e/ou *eae* poderia então ser testada com o kit iQ-Check STEC SerO PCR em tempo real, dependendo das exigências locais.

Seção 2

A tecnologia iQ-Check STEC VirX

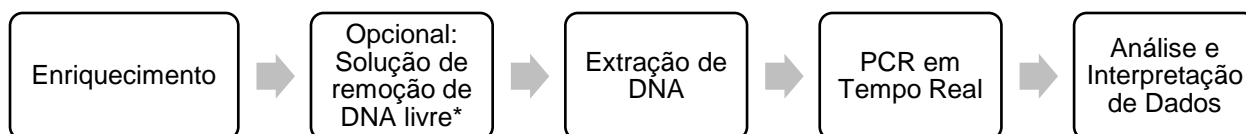
O kit iQ-Check STEC VirX é um teste baseado na amplificação e detecção genética através de PCR em tempo real. Os reagentes de PCR prontos para uso do kit contêm oligonucleotídeos (iniciadores e sondas) específicos para genes virulentos *stx1/stx2* e *eae*, bem como DNA polimerase e nucleotídeos. A detecção 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 de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well.

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

Na PCR em tempo real, são utilizadas sondas específicas para detectar o DNA durante a etapa de amplificação, através da hibridização 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 que hibridiza a sequência de DNA exclusiva do *stx1/stx2*, enquanto que o Cy5 está ligado à sonda hibridizando o gene *eae*. Na ausência de DNA-alvo, não será observada fluorescência. Como a quantidade de amplicons aumenta em cada rodada de amplificação, a intensidade da fluorescência aumenta também. O módulo óptico mede essa fluorescência em cada ciclo de PCR, na fase de hibridação (annealing), e o software associado plota a intensidade da fluorescência em função do número de ciclos.

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

Esse teste permite a detecção qualitativa de genes virulentos STEC em alimentos selecionados e amostras ambientais previamente enriquecidas por cultura. Inclui as cinco etapas principais seguintes:



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

Seção 3

Componentes do Kit

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

ID do Reagente	Reagente	Quantidade fornecida, ml
A	Reagente de lise	1 garrafa, 20
B	Sondas fluorescentes	1 tubo, 0,55
C	Mistura de amplificação	1 tubo, 4,4
D	Controle de PCR negativo	1 tubo, 0,5
E	Controle de PCR positivo	1 tubo, 0,25
F	Beads (microesferas) de lise	1 garrafa, 17,6 g

Seção 4

Prazo de validade e armazenamento

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

Seção 5

Materiais necessários, mas não fornecidos

Equipamento

- Liquidificador de laboratório para homogeneizar amostras de teste
- Incubadora para enriquecimento microbiológico de amostras
- Específico para extração em tubos estéreis de tampa de rosca cônica de 1,5 ml
 - Centrífuga de bancada capaz de 10.000–12.000 x g
 - Bloco para banho seco a 37 ± 2°C e/ou 95–100°C
- Específico para extração em placa Deep Well
 - Termocortador de aquecimento* capaz de manter 37 ± 2°C e/ou 95–100°C, com uma velocidade de mistura de pelo menos 1.300 rpm

Seção 5

- 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, CFX96 Touch Deep Well System (número do catálogo 3600037)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System para extração automatizada de DNA e configuração de placas de PCR (nº do catálogo 3594911)

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

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

Suprimentos

- Meio de enriquecimento: água peptonada tamponada (por exemplo, BPW Plus nº do catálogo 3564684, desidratado, 500 g; 3554179, 6 frascos de 225 ml; 3555789, 5 sacos de 2,3 L; 3555790, 2 sacos de 5 L. BPW Standard, nº do catálogo 12013259, desidratado, 500 g; 12013258 desidratado, 5 kg; 12013260, 2 sacos de 5 L)
- Meio de enriquecimento: STEC Enrichment Broth (SEB nº do catálogo 3564001, desidratado, 500 g)
- Meio de enriquecimento (opcional enriquecimento padrão da USDA): mTSB (por exemplo, nº de catálogo 3564426, desidratado, 500g) mais ácidos casamino e novobiocina
- Selective STEC Supplement (nº do catálogo 3564005)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (nº do catálogo 3594970)
- iQ-Check SerO PCR Detection Kit (nº de catálogo 3578140) ou iQ-Check STEC SerO II PCR Detection Kit (nº de catálogo 12013174)
- iQ-Check Purification Reagent (nº do catálogo 12012383)
- Específico para amostras ambientais
 - Esponjas ambientais
 - Cotonetes ambientais
 - Caldo neutralizante para esponjas e cotonetes, como Dey-Engley (D/E) ou HiCap Neutralizing Broth ou Lethen Broth
- Específico para extração em tubos
 - Tubos com tampa cônica de rosca de 1,5 ml, estéreis (por exemplo, nº do catálogo 2240110XTU)
- Específico para extração em uma placa Deep Well
 - Placa de poços 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 placas PCR (X-Pierce Films, nº do catálogo 3593977, ou Pre-Pierced Plate Sealing Film, nº 3600040, apenas América do Norte)
- Específico para o sistema iQ-Check Prep

- Recipiente de diluição de 60 ml (número do catálogo 3594904)
- Pontas de filtro (nº do catálogo 3594902, 50 µl x 5.760; 3594903, 1.000 µl x 3.840)
- Tubos de mistura de PCR (nº do catálogo 3594901, 5 ml x 50)
- Placas de PCR, tubos, fitas e tampas de vedação
- Pontas de filtro estéreis adaptáveis a micropipetas de 20, 200 e 1.000 µl
- Pontas para Pipetas Combitip ou pipetadores de repetição equivalentes, estéreis, embalados individualmente
- Pipetas de 1 e 10 ml
- Tubos de ensaio estéreis de 2 e 5 ml
- Luvas sem talco
- Água estéril destilada
- Alvejante, 5%
- Agente de limpeza, como o DNA AWAY ou o RNase AWAY

Seção 6

Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados

- Este teste deve ser realizado por pessoal treinado
- Amostras e culturas de enriquecimento devem ser manuseadas como material potencialmente infeccioso e descartadas de acordo com as regras e regulamentos locais
- Todos os materiais potencialmente infecciosos devem passar por autoclavagem antes do descarte
- A qualidade dos resultados depende do estrito cumprimento das Boas Práticas de Laboratório (por exemplo, a norma EN ISO 7218), especialmente em relação à PCR:
 - Nunca circule equipamentos de laboratório (pipetas, tubos etc.) de uma estação de trabalho para outra
 - Sempre use um controle positivo e um controle negativo para cada série de reações de amplificação
 - Não utilizar reagentes após a expiração de suas datas de validade
 - Agite os reagentes do kit antes de utilizá-los, de modo a garantir a homogeneidade
 - Verifique periodicamente a exatidão e precisão das pipetas, bem como o correto funcionamento dos instrumentos
 - Troque frequentemente de luvas, especialmente se suspeitar que estão contaminadas
 - Limpe os espaços de trabalho periodicamente com alvejante a 5% e outros agentes descontaminantes, como o DNA AWAY
 - Utilize luvas sem talco e evite escrever ou deixar impressões digitais nas tampas dos tubos. Ambos interferem com a aquisição de dados
- Recomenda-se fortemente o cumprimento dos requisitos gerais descritos na norma EN ISO 22174:2005 “Microbiologia de alimentos para consumo humano e para alimentação animal – reação

em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de patógenos alimentares – Requisitos e definições gerais” (Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food pathogens – General requirements and definit)

- iQ-Check STEC VirX Kit
 - Todas as substâncias ou misturas no kit de teste são produtos classificados, de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado (GHS). O contato com ácidos pode causar a liberação de gases tóxicos. Nenhuma precaução especial é necessária, se usado corretamente. Se o produto for inalado, forneça ar fresco e consulte um médico em caso de queixas. Após o contato dos olhos com o produto, enxágue os olhos abertos por vários minutos em água corrente. Se os produtos forem ingeridos, provoque vômito e procure ajuda médica
- iQ-Check Prep System
 - O uso inadequado do sistema iQ-Check Prep 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 iQ-Check Prep deve ser operado somente por pessoal qualificado do laboratório que tenha sido treinado adequadamente. A manutenção do instrumento deve ser realizada apenas pelos engenheiros de serviço de campo da Bio-Rad
- Sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well
 - O uso inadequado do Sistema de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well pode causar ferimentos ou danos ao instrumento. Alguns componentes podem representar um risco de ferimentos pessoais devido ao calor excessivo, se manuseados incorretamente. Para uso seguro, o Sistema de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well deve ser operado somente por pessoal qualificado do laboratório que tenha sido treinado adequadamente. A manutenção do instrumento deve ser realizada apenas pelos engenheiros de serviço de campo da Bio-Rad
- Enriquecimento
 - O usuário deve ler, entender e seguir todas as informações de segurança nas instruções do Kit iQ-Check STEC VirX. 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
 - Dependendo das regulamentações locais, o *E. coli* patogênico é um organismo de nível 2 ou nível 3 de biossegurança. Amostras biológicas, como enriquecimentos, têm o potencial de transmitir doenças infecciosas. Siga todos os regulamentos locais, estaduais/provinciais e/ou nacionais aplicáveis sobre o descarte de resíduos biológicos. Use equipamento de proteção adequado, que inclua, entre outros, óculos de proteção, proteção facial, roupas/jaleco e luvas. Todo o trabalho deve ser realizado em instalações adequadamente equipadas, utilizando o equipamento de segurança apropriado (por exemplo, dispositivos de contenção física). Os indivíduos devem ser treinados de acordo com os requisitos regulamentares e da empresa/instituição aplicáveis antes de trabalhar com materiais potencialmente infecciosos
 - Quando o teste estiver concluído, todos os materiais e meios possivelmente contendo patógenos devem ser descontaminados, seguindo as normas atuais da indústria para o descarte de resíduos contaminados (ou seja, autoclave por 20 min a 121°C). Consulte a folha de dados de segurança para obter informações adicionais e regulamentos locais para descarte.

Seção 7 Protocolo

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

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

Escopo (matrizes)	Enriquecimento	Extração de DNA		Certificação
		Método	Formato	
Carne bovina crua moída e aparas de carne bovina crua (375 g)	BPW pré-aquecido 8–22 hr em 41,5 ± 1°C	Easy II	Tubo/poço	AOAC PTM*
Espinafre fresco (375 g)	BPW pré-aquecido 10–22 hr em 41,5 ± 1°C	Easy II	Tubo/Deep Well	AOAC PTM*
Cotonete MicroTally	BPW pré-aquecido 8–22 hr em 41,5 ± 1°C	Easy II	Tubo/Deep Well	AOAC PTM*
Flor de cânabis	BPW 20–22 hr em 37 ± 1°C	Easy I	Tubo/Deep Well	AOAC PTM*
Produtos à base de carne (325 g), esponjas e ambientais para carcaça	mTSB ou mTSB+n 15–24 hr em 42 ± 1°C,	Easy II	Tubo/Deep Well	USDA-FSIS MLG 5C.00
Produtos de leite não pasteurizado (25 g)	BPW pré-aquecido + STEC Supplement 16–20 hr em 37 ± 1°C	Easy I	Tubo/Deep Well	N/A
Amostras de superfície ambiental	BPW pré-aquecido 8–22 hr em 41,5 ± 1°C	Easy II	Tubo/Deep Well	N/A

* A validação também inclui o uso da solução de remoção de DNA iQ-Check Free e do arquivo de protocolo de aplicação "STEC VirX MLG Fast" para um tempo de execução de PCR reduzido. Para a interpretação ISO, use "STEC VirX ISO Fast" (pode ser usado fora da validação AOAC PTM). Entre em contato com seu representante da Bio-Rad para obter mais informações.

A. Enriquecimento da amostra

O meio de enriquecimento deve estar na temperatura de incubação adequada (37°C ou 41,5°C, quando necessário) antes do uso. Para certas matrizes, o suplemento STEC seletivo pode ser usado com BPW. Preparar suplemento STEC seletivo de acordo com instruções fornecidas no guia do usuário. Adicionar 2,5 ml de suplemento STEC a 225 ml de BPW (para 1.125 ml adicionar 15 ml de suplemento STEC).

Tamanhos menores de amostra (1–25 g)

1. Homogeneizar n g da amostra em $9 \times n$ ml de BPW pré-aquecido ou BPW + STEC Supplement (por exemplo, 25 g em 225 ml) em um saco para homogeneizar com filtro incorporado.
2. Incubar por 18 ± 2 hr em 37°C ou 41,5°C.
3. Siga o protocolo de extração de DNA Easy II.

Tamanhos maiores de amostra (>25–375 g)

1. Homogeneizar n g da amostra em $3 \times n$ de BPW pré-aquecido ou BPW + STEC Supplement (por exemplo, 375 g em 1.125 ml) em um saco para homogeneizar com filtro incorporado.
2. Incubar por 20 ± 2 hr em 41,5 ± 1°C.

Seção 7

3. Siga o protocolo de extração de DNA Easy II.

Cotonetes MicroTally

1. Homogeneizar cotonete em 200 ml de BPW pré-aquecido.
2. Incubar por 20 ± 2 hr em $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Siga o protocolo de extração de DNA Easy II.

Cotonetes e esponjas ambientais

1. Homogeneíze cotonetes em 10 ml e esponjas em 90 ml de BPW pré-aquecido. Recomenda-se usar um caldo neutralizante que não contenha complexo de sulfonato de arilo. Os caldos neutralizantes contendo complexo de sulfonato de arilo podem exigir diluições adicionais do extrato de DNA.
2. Incubar por 20 ± 2 hr em $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Siga o protocolo de extração de DNA Easy II.

Flor de cânabis

1. Homogeneizar 10 g da amostra em 90 ml de BPW.
2. Incubar por 21 ± 1 hr em $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Siga o protocolo de extração de DNA Easy I.

B. Tratamento de remoção de DNA livre

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

C. Extração de DNA

Recomendações gerais:

1. Ligue o bloco de calor ou o termocortador para pré-aquecer antes de iniciar o teste. Defina para 95–100°C. Mantenha o reagente de lise em suspensão enquanto pipeta, agitando a velocidade média em uma placa de agitação magnética.
2. Em geral, evite agitar o saco de enriquecimento e coletar fragmentos de grande dimensão de resíduos alimentares. Para amostras alimentares com um sobrenadante gorduroso, colete a amostra a partir da camada logo abaixo desta.
3. Abra os tubos e os poços com cuidado para evitar possíveis contaminações cruzadas.
4. Resfrie a placa Deep Well antes de pipetar diretamente através do filme de vedação pré-perfurado.
5. Use a barra magnética para manter o reagente de lise em suspensão. Pipete enquanto estiver mexendo em velocidade média.
6. Agite suavemente o reagente de lise manualmente primeiro para ressuspender a resina. Pipete enquanto estiver mexendo em velocidade média com a barra magnética contida na garrafa, para mantê-la em suspensão.
7. Reconstitua o reagente final de lise da seguinte maneira:
 - a. Despeje cuidadosamente todo o conteúdo do reagente F (beads de lise) no reagente A

(reagente de lise).

- b. Use consumíveis com uma ponta larga o suficiente para permitir a pipetagem do reagente de lise homogeneizado.
- c. O reagente de lise misturado com as esferas de lise (reagentes A + F) tem um prazo de validade de 6 meses quando armazenado a 4°C.

Protocolo Easy I

1. Alíquota de 100 µl de lise homogeneizado (reagente A) para tubos ou poços de uma placa Deep Well.
2. Adicione 100 µl de amostra enriquecida. Misture pipetando para cima e para baixo e feche o tubo com as tampas, ou vede a placa Deep Well com a película de vedação pré-perfurada.
3. Incube no bloco de calor apropriado a 95–100°C por 10–15 min ou no termocortador por 15–20 min, a 1.300 rpm.
4. Tubos vortex à alta velocidade.
5. Se estiver usando uma placa Deep Well, deixe-a esfriar a temperatura ambiente (20–25°C).
6. Centrifugue tubos a 10.000–12.000 x g por pelo menos 2 min. A centrifugação não é necessária para a placa Deep Well.

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

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

Protocolo Easy II

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

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

2. Adicione 100 µl de amostra enriquecida.

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

3. Misture a solução pipetando para cima e para baixo até homogeneizar.
4. Feche os tubos ou sele a placa Deep Well com filme de vedação pré-perfurado.
5. Coloque os tubos no Cell disruptor por 3 ± 1 min.
6. Incube os tubos no bloco de calor a 95–100°C por 10–15 min. Incube a placa Deep Well na incubadora-agitadora a 1.300 rpm a 95–100°C por 15–20 min.
7. Agite no vórtex os tubos em alta velocidade e depois centrifugue a 10.000–12.000 x g por pelo menos 2 min. A centrifugação não é necessária para a placa Deep Well.

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

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

D. PCR em Tempo Real

Configuração do instrumento e do software

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

Preparação da mistura de PCR

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

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

2. Pipete 20 µl da mistura de PCR para cada poço, de acordo com a configuração da placa.
3. Adicione 5 µl de extrato de DNA, reagente D (controle negativo) ou reagente E (controle positivo). Não agite a amostra em vortex antes da pipetagem. Vede hermeticamente os poços da placa de ou tiras. É importante evitar a formação de bolhas no fundo dos poços, o que é conseguido fazendo a pipetagem cuidadosamente. Como uma etapa opcional, centrifugue a placa de PCR selada ou as tiras de tubo (rotação rápida) para eliminar quaisquer bolhas.
4. Coloque a placa de PCR ou as tiras de tubo no termociclador. Certifique-se de colocar a placa com o poço A1 no canto superior esquerdo. Feche o módulo de reação.

Execute a PCR

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

E. Análise de dados

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

Interpretação de resultados

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

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

Controles

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

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

	Detecção <i>stx1/stx2</i> (Canal FAM)	Detecção <i>eae</i> (Canal Cy5)	Detecção de controle interno (Canal HEX)
Controle negativo	Cq = N/A*	Cq = N/A*	26 ≤ Cq ≤ 36
Controle positivo	26 ≤ Cq ≤ 36	26 ≤ Cq ≤ 36	NA

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

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

Amostras

Uma amostra positiva do gene de virulência STEC deve ter um valor Cq ≥10 em ambos os canais FAM e Cy5.

- Se o valor de Cq para ambos os canais for menor que 10, verifique se a curva de dados brutos é uma curva de amplificação regular (com uma linha de base plana, seguida de um rápido aumento exponencial da fluorescência e depois de um achatamento). Se a curva parecer correta, considere estar diante de uma amostra positiva para o gene de virulência STEC
- Se o valor Cq para FAM for ≥10 e o valor Cq para Cy5 for N/A, a amostra é positiva para os genes de virulência *stx1/stx2*
- Se o valor Cq para FAM for N/A e o valor Cq para Cy5 for ≥10, a amostra é positiva para o gene de virulência *eae*

Caso não haja valor Cq (Cq = N/A) para a FAM ou Cy5, ou caso a curva não seja uma curva de amplificação típica, deve-se analisar o controle interno dessa amostra:

- Se não houver valor de Cq para a FAM ou Cy5 e o controle interno tiver Cq ≥26, essa amostra será considerada uma amostra negativa do gene de virulência STEC
- Se o controle interno também não tiver valor Cq (Cq = N/A), isso provavelmente indica inibição da reação de PCR. Dilua a amostra (faça uma diluição de 1:10 em água esterilizada destilada usando 10 µl de extrato de DNA), use 5 µl da diluição para amplificação e repita o teste de PCR
- Se o valor Cq para o controle interno for <26, não será possível interpretar o resultado. Confirme que o limite foi colocado corretamente ou se a curva de dados brutos é uma curva regular de amplificação. Caso a curva não apresente uma forma característica, será necessário repetir o teste de PCR

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

Detecção <i>stx1/stx2</i> (Canal FAM)	Detecção <i>eae</i> (Canal Cy5)	Detecção de controle interno (Canal HEX)	Interpretação
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	NA	Positivo – Teste com kit iQ-Check STEC SerO ou iQ-Check STEC SerO II
Cq ≥ 10	Cq = N/A	NA	Positivo para <i>stx1/stx2</i> , negativo para <i>eae</i> . Parar análise da amostra
Cq = N/A	Cq ≥ 10	NA	Positivo para <i>eae</i> , negativo para <i>stx1/stx2</i> . Parar análise da amostra
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 26	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Inibição*

* Quando a detecção de todos os genes de virulência *stx1/stx2* e *eae* e do controle interno fornece um valor Cq = N/A, a amostra deve ser testada novamente, porém, diluída (1:10).

Uma interpretação inválida pode ser fornecida quando os critérios de validação não são atendidos. Verifique os dados brutos e proceda como se as amostras estivessem inibidas.

Seção 8

Confirmação de Resultados Positivos

Os resultados positivos do kit iQ-Check STEC VirX devem ser testados para identificação dos sete principais sorogrupos de *E. coli* (O157, O26, O45, O103, O111, O121 e O145) com o kit iQ-Check STEC SerO ou iQ-Check STEC SerO II.

Para flor de cânabis, siga AOAC SMPR 2020.012.

Seção 9

Confirmação de Colônias Isoladas usando o Kit iQ-Check

O kit iQ-Check STEC VirX também pode ser usado para confirmar colônias isoladas em meios de cultura de ágar.

1. Escolha uma colônia isolada, de um meio 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 20 µl de mistura de PCR (consulte a seção 7D. PCR em tempo real) e siga o restante do protocolo iQ-Check STEC VirX para a interpretação de dados e resultados. A extração de DNA não é necessária.

Seção 10

Desempenho e validação do teste



O kit iQ-Check STEC VirX é validado pelo AOAC Research Institute através do Performance Tested Method Program para a detecção de *stx1/stx2* e *eae* em carne bovina moída crua, corte de carne bovina crua, espinafre fresco, cotonetes MicroTally, e flor de cânabis. Um resultado positivo com o iQ-Check deve ser considerado como presumido e recomenda-se que seja confirmado pelos métodos de referência padrão. Número do certificado: 121203.

Seção 11

Referências

Centers for Disease Control and Prevention. Bacterial Foodborne and Diarrheal Disease National Case Surveillance. Annual Report, 2005. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2007.

Scientific Report of European Food Safety Authority (2009). Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food). EFSA Journal 7, 1366 [43 pp.].

Food Safety and Inspection Service (2011). Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Certain Raw Beef Products

ISO/TS 13136:2011 (E), Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups – Qualitative Method.

United States Department of Agriculture Federal Register, Vol. 76, No. 182, 9 CFR Parts 416, 417, and 430, [Docket No. FSIS–2010–0023].

United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science (2019). Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. MLG 5C.00, Laboratory Guidebook Notice of Change, new chapter.

Seção 12

Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Março de 2021	10000131516 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Novo design de documento e atualização de referências e conteúdo- Renovação e extensão da validação AOAC para cotonetes MicroTally, flor de cânabis e "STEC VirX MLG Fast" APF- "STEC VirX ISO Fast" incluído para interpretação de ISO- Atualização do protocolo de confirmação da colônia- Integração da referência MLG FSIS 5C.00- Alteração do número do documento - versão anterior 808474 REV C

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	Sondas Reagente B (µl)	Reagente de amplificação de mistura C (µl)	Número total de amostras e controles	Sondas Reagente B (µl)	Reagente de amplificação de mistura C (µl)
1	5	15	49	265	795
2	11	33	50	270	810
3	16	48	51	275	825
4	22	66	52	281	845
5	27	81	53	286	860
6	32	96	54	292	880
7	38	115	55	297	890
8	43	130	56	302	905
9	49	147	57	308	925
10	54	160	58	313	940
11	59	177	59	319	960
12	65	195	60	324	970
13	70	210	61	329	990
14	76	230	62	335	1000
15	81	245	63	340	1020
16	86	260	64	346	1040
17	92	275	65	351	1050
18	97	290	66	356	1070
19	103	310	67	362	1090
20	108	325	68	367	1100
21	113	340	69	373	1120
22	119	357	70	378	1130
23	124	370	71	383	1150
24	130	390	72	389	1170
25	135	405	73	394	1180
26	140	420	74	400	1200
27	146	440	75	405	1210
28	151	450	76	410	1230
29	157	470	77	416	1250
30	162	485	78	421	1260
31	167	500	79	427	1280
32	173	520	80	432	1300
33	178	535	81	437	1310
34	184	550	82	443	1330
35	189	565	83	448	1340
36	194	580	84	454	1360
37	200	600	85	459	1380
38	205	615	86	464	1390
39	211	635	87	470	1410
40	216	650	88	475	1420
41	221	665	89	481	1445
42	227	680	90	486	1460
43	232	696	91	491	1470
44	238	715	92	497	1490
45	243	730	93	502	1510
46	248	745	94	508	1520
47	254	760	95	513	1540
48	259	777	96	518	1550

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



iQ-Check STEC VirX Kit

Manual del usuario

Análisis de detección por PCR en tiempo real de los genes de virulencia en *Escherichia coli* productora de la toxina Shiga

Referencia #3578139



Tabla de Contenidos

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

Apartado 1

Introducción

Las bacterias *Escherichia coli* forman parte de la flora normal de los intestinos de humanos y animales y por lo general son inofensivas. Sin embargo, algunas cepas pueden causar enfermedades a los humanos. Entre ellas, la *E. coli* productora de la toxina Shiga (STEC) es conocida por ser altamente patógena para los humanos. Puede provocar colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). Las STEC se caracterizan por la presencia de los genes *stx1* o *stx2* (toxina Shiga) en su genoma. El gen *eae* (intimina) es un marcador adicional de virulencia. La cepa más conocida de estas STEC es la *E. coli* O157:H7, aunque se han vinculado otras cepas de STEC distintas de la O157 a los brotes, entre ellas la O26, O45, O103, O111, O121, y la O145.

Los brotes de STEC están comúnmente asociados con el consumo de carne cruda, en particular de vacuno, pero también con productos lácteos y, más recientemente, con productos frescos. Una muestra positiva para las dianas *stx1/stx2* y *eae* habitualmente requiere más pruebas para la identificación de los principales serogrupos de *E. coli*.

El kit iQ-Check STEC VirX, basado en un sistema múltiplex de PCR en tiempo real, permite la detección de los genes de virulencia *stx1/stx2* y *eae* en un pocillo, pocas horas después del enriquecimiento microbiológico. Una muestra positiva para *stx1/stx2* y / o *eae* debe ser analizada con el kit iQ-Check STEC SerO Real-Time PCR, en función de los requisitos locales.

Apartado 2

Tecnología de iQ-Check STEC VirX

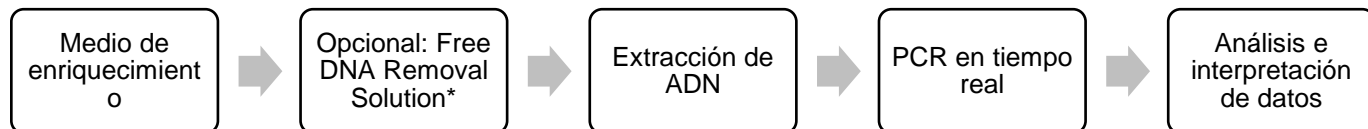
El kit iQ-Check STEC VirX es un ensayo basado en la amplificación y detección de genes por PCR en tiempo real. Los reactivos de PCR listos para su uso incluidos en el kit contienen oligonucleótidos (cebadores y sondas) específicos para los genes de virulencia *stx1/stx2* y *eae*, así como ADN polimerasa y nucleótidos. La detección y el análisis de datos están optimizados para su uso con un instrumento de PCR en tiempo real de Bio-Rad, como el CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection 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 permiten la desnaturalización del ADN por calor, seguida de la unión de los cebadores a la región diana. La ADN polimerasa utiliza estos cebadores y desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) para extender el ADN, creando copias del ADN diana. Estas copias se llaman amplicones.

En la PCR en tiempo real, se utilizan sondas específicas para detectar el ADN durante la fase de amplificación, mediante la hibridación de los amplicones. Estas sondas están unidas a un fluoróforo que sólo se vuelve fluorescente cuando se hibrida con la secuencia diana. El FAM es el fluoróforo unido a la sonda que hibrida con la secuencia de ADN específica del *stx1/stx2*, mientras que el Cy5 está unido a la sonda que hibrida con el gen *eae*. En ausencia de ADN diana o de interés, no se detectará ninguna fluorescencia. A medida que la cantidad de amplicones aumenta con cada ciclo de amplificación, la intensidad de la fluorescencia también aumenta. El módulo óptico mide esta fluorescencia en la fase de lectura durante cada ciclo de PCR mientras que el software correspondiente traza la intensidad de la fluorescencia en función del número de ciclos.

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

Esta prueba permite la detección cualitativa de genes de virulencia de STEC en muestras de determinados alimentos y muestras ambientales previamente enriquecidas por cultivo. Consta de los siguientes cinco pasos principales:



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

Apartado 3 Componentes del kit

El kit iQ-Check STEC VirX contiene suficientes reactivos para 96 análisis (94 muestras).

ID de reactivo	Reactivo	Cantidad proporcionada, ml
A	Reactivo de lisis	1 frasco, 20
B	Sondas fluorescentes	1 tubo, 0,55
C	Mix de amplificación	1 tubo, 4,4
D	Control negativo PCR	1 tubo, 0,5
E	Control positivo PCR	1 tubo, 0,25
F	Perlas de lisis	1 frasco, 17, 6 g

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

Equipamiento

- Homogeneizador de palas para homogeneizar las muestras del ensayo
- Incubador para el enriquecimiento microbiológico de muestras
- Instrumentos específicos para la extracción en tubos cónicos estériles de 1,5 mL y tapa de rosca
 - Centrífuga de sobremesa con capacidad de 10.000-12.000 x g
 - Bloque calefactor seco a 37 ± 2°C y 95–100°C
- Instrumentos específicos para la extracción en placa Deep Well
 - Calefactor térmico con agitación* con capacidad para mantener 37 ± 2°C y 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

Apartado 5

- Puntas para pipetas de repetición; estériles, empaquetadas individualmente
- Sistema PCR en tiempo real Bio-Rad*; por ejemplo, el CFX96 Touch Deep Well System (referencia #3600037)
- iQ-Check Prep System de Bio-Rad para la extracción automática de ADN y configuración de la placa de PCR (referencia #3594911)

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

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

Fungibles

- Caldo de enriquecimiento: agua de peptona tamponada (por ejemplo, BPW Plus referencia #3564684, deshidratado, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 frascos; 3555789, 2,3 L x 5 bolsas; 3555790, 5 L x 2 bolsas. BPW Standard referencia #12013259, deshidratado, 500 g; 12013258 deshidratado, 5 kg; 12013260 5 L x 2 bolsas)
- Caldo de enriquecimiento: STEC Enrichment Broth (SEB referencia #3564001, deshidratado, 500 g)
- Caldo de enriquecimiento (opcional enriquecimiento normalizado USDA): mTSB (por ejemplo, referencia #3564426, deshidratado, 500g) más casamino ácidos y novobiocina
- Selective STEC Supplement (referencia #3564005)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (referencia #3594970)
- iQ-Check SerO PCR Detection Kit referencia #3578140) o iQ-Check STEC SerO II PCR Detection Kit (referencia #12013174)
- iQ-Check Purification Reagent (referencia #12012383)
- 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 o el caldo Lethen
- Materiales específicos para la extracción en tubo
 - Tubos cónicos estériles de 1,5 ml y tapa de rosca (por ejemplo, referencia #2240110XTU)
- Materiales específicos para la extracción en una placa Deep Well
 - Placa Deep Well de 96 pocillos (iQ-Check Deep Well Microplates, referencia #3594900)
 - Película o film plástico de sellado (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, referencia #3590139)
 - Películas pre-perforadas de sellado para placas Deep Well (X-Pierce Films, referencia #3593977, o Pre-Pierced Plate Sealing Film, #3600040, sólo en América del Norte)
- Materiales específicos para el iQ-Check Prep System
 - Recipiente de 60 ml para dilución (referencia #3594904)
 - Puntas con filtro (referencia #3594902, 50 µl x 5.760; 3594903, 1.000 µl x 3.840)
 - Tubos para mix de PCR (referencia #3594901, 5 ml x 50)

- Placas tubos, film de sellado y tapas de PCR
- Puntas estériles con filtro adaptables a micropipetas de 20, 200 y 1.000 µl
- Puntas para pipetas Combitip o pipetas de repetición equivalentes; estériles, empaquetadas individualmente
- Pipetas de 1 y 10 ml
- Tubos de ensayo estériles de 2 y 5 ml
- Guantes sin polvo
- Agua destilada estéril
- Lejía, 5 %
- Descontaminante, como DNA AWAY o RNase AWAY

Apartado 6

Precauciones y recomendaciones de seguridad para la obtención de resultados óptimos

- Este análisis debe ser realizado por personal capacitado
- Las muestras y los cultivos enriquecidos deben manipularse como material potencialmente infeccioso y desecharse de acuerdo con las normas y reglamentos locales
- Todo el material potencialmente infeccioso debe ser esterilizado en autoclave antes de su eliminación
- La calidad de los resultados depende del estricto cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio (por ejemplo, la norma EN ISO 7218), especialmente en lo que respecta a la PCR:
 - El material de laboratorio (pipetas, tubos, etc.) no debe intercambiarse entre un puesto de trabajo y otro.
 - Utilice siempre un control positivo y un control negativo para cada serie de reacciones de amplificación
 - No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad
 - Agite (mediante vórtex) los reactivos del kit antes de usarlos para asegurar su homogeneidad
 - Verifique periódicamente la exactitud y la precisión de las pipetas, así como el correcto funcionamiento de los instrumentos
 - Cámbiese los guantes a menudo, especialmente si sospecha que están contaminados
 - Limpie los espacios de trabajo periódicamente con un 5 % de lejía y otros agentes descontaminantes como DNA AWAY
 - Use guantes sin polvo y evite las huellas dactilares y escribir en las tapas de los tubos. Ello podría interferir en la correcta adquisición de datos
- Se recomienda encarecidamente seguir los requisitos generales descritos en la norma EN ISO

Apartado 6

22174:2005 (Microbiología de los alimentos y piensos - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en alimentos - Requisitos generales y definiciones)

- iQ-Check STEC VirX Kit
 - Todas las sustancias o mixes del kit de análisis son productos clasificados, según el Sistema Global Armonizado de Clasificación y Rotulado de Productos Químicos (GHS en inglés por el acrónimo de Globally Harmonized System). El contacto con los ácidos puede causar la liberación de gases tóxicos. No es necesario tomar precauciones especiales si se utiliza correctamente. Si se inhala el producto, suministre aire fresco y consulte a un médico en caso de presentar molestias. En caso de contacto del producto con los ojos, enjuague el ojo abierto durante varios minutos con agua corriente. En caso de ingestión de los productos, induzca el vómito y solicite ayuda médica.
- iQ-Check Prep System
 - El uso inadecuado del sistema 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 sistema iQ-Check Prep System debe ser manipulado y utilizado sólo por personal de laboratorio cualificado que haya sido instruido para tal fin. El mantenimiento del instrumento debe correr a cargo exclusivamente de los ingenieros del servicio técnico de Bio-Rad.
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System
 - El uso inadecuado del CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System puede causar lesiones personales o daños en el instrumento. Algunos componentes pueden suponer un riesgo de lesiones personales debido al calor excesivo si se manejan de forma inadecuada. Para un uso seguro, el CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System debe ser manipulado y utilizado sólo por personal de laboratorio cualificado y que haya sido instruido para tal fin. El mantenimiento del instrumento debe correr a cargo exclusivamente de los ingenieros del servicio técnico de Bio-Rad.
- Medio de enriquecimiento
 - El usuario debe leer, comprender y seguir toda la información de seguridad en las instrucciones del kit iQ-Check STEC VirX. Conserve las instrucciones de seguridad para futuras consultas. Para reducir los riesgos asociados a la exposición a productos químicos y a riesgos biológicos, los análisis de patógenos deben ser realizados en un laboratorio debidamente equipado y bajo el control de personal capacitado. Siga siempre las prácticas reguladas de seguridad de los laboratorios, incluido el uso de vestimenta protectora adecuada y protección ocular al manipular reactivos y muestras contaminadas. Evite el contacto con el contenido de los medios de enriquecimiento y los tubos de reactivos después de la amplificación. Deseche las muestras enriquecidas de acuerdo con las normas vigentes aplicables a la industria
 - En función de los reglamentos locales, el *E. coli* patógeno es un organismo que puede clasificarse en los Niveles de Bioseguridad de 2 a 3. Las muestras biológicas como los enriquecimientos tienen potencial de transmitir enfermedades infecciosas. Siga todos los reglamentos locales, estatales/provinciales y/o nacionales aplicables para la eliminación de desechos biológicos. Use el equipo de protección apropiado, que incluya, pero no se limite a, gafas protectoras, protector facial, vestimenta/bata de laboratorio y guantes. Todos los trabajos deben realizarse en instalaciones debidamente equipadas, utilizando el equipo de seguridad adecuado (por ejemplo, dispositivos de contención física). Las personas deben ser instruidas y estar capacitadas de acuerdo con los requisitos reglamentarios y de la

empresa/institución aplicables antes de trabajar con materiales potencialmente infecciosos

- Una vez finalizados los análisis, todos los materiales y medios que puedan contener patógenos deberán descontaminarse siguiendo las normas actuales de la industria para la eliminación de desechos contaminados (es decir, en autoclave durante 20 minutos a 121 °C). Consulte la Ficha de Datos de Seguridad para obtener información adicional y los reglamentos locales para la eliminación.

Apartado 7 Protocolo

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

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

Alcance (matrices)	Enriquecimiento	Extracción de ADN		Certificación
		Método	Formato	
Carne de vacuno cruda, carne picada cruda de vacuno (375 g)	APT precalentada 8–22 hr a 41,5 ± 1°C	Easy II	Tubo/Deep Well	AOAC PTM*
Espinaca fresca (375 g)	APT precalentada 10–22 hr a 41,5 ± 1°C	Easy II	Tubo/Deep Well	AOAC PTM*
Hisopo MicroTally	APT precalentada 8–22 hr a 41,5 ± 1°C	Easy II	Tubo/Deep Well	AOAC PTM*
Flor de cannabis	APT 20–22 hr a 37 ± 1°C	Easy I	Tubo/Deep Well	AOAC PTM*
Productos cárnicos (325 g), esponjas ambientales y de canales	mTSB o mTSB+n 15–24 hr a 42 ± 1°C,	Easy II	Tubo/Deep Well	USDA-FSIS MLG 5C.00
Productos de leche cruda (25 g)	APT precalentada + suplemento STEC 16–20 hr a 37 ± 1°C	Easy I	Tubo/Deep Well	N/A
Muestras ambientales de superficie	APT precalentada 8–22 hr a 41,5 ± 1°C	Easy II	Tubo/Deep Well	N/A

* La validación también incluye el uso del iQ-Check Free DNA Removal Solution y el archivo de protocolo de aplicación “STEC VirX MLG Fast” para un tiempo de run de PCR reducido. Para la interpretación de ISO, utilice “STEC VirX ISO Fast” (puede utilizarse fuera de la validación de AOAC PTM). Póngase en contacto con su representante de Bio-Rad para más información.

A. Enriquecimiento de la muestra

El medio de enriquecimiento debe encontrarse a la temperatura de incubación apropiada (37 °C o 41,5°C cuando sea necesario) antes de su uso. Para Imatrices específicas, se puede usar el suplemento selectivo de STEC con APT. Prepare el suplemento selectivo de STEC siguiendo las instrucciones incluidas en el manual de uso. Añada 2,5 ml of de STEC Supplement a 225 ml de APT (para 1.125 ml añada 15 ml de STEC Supplement).

Muestras con peso comprendido entre 1 y 25 g

1. Homogeneice *n* g de muestra en 9 x *n* ml de APT precalentada o APT + STEC Supplement (por ejemplo, 25 g en 225 ml) en una bolsa de stomacher con filtro incorporado.
2. Incube durante 18 ± 2 hr a 37°C o 41,5 °C.
3. Siga el protocolo de extracción de ADN Easy II.

Apartado 7

Muestras con peso comprendido desde 25 a 375 g (>25–375 g)

1. Homogeneice n g de muestra en $3 \times n$ ml de APT precalentada o APT + STEC Supplement (por ejemplo, 375 g en 1.125 ml) en una bolsa de stomacher con filtro incorporado.
2. Incube durante 20 ± 2 hr a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Siga el protocolo de extracción de ADN Easy II.

Hisopos MicroTally

1. Homogeneice el hisopo en 200 ml de APT precalentada.
2. Incube durante 20 ± 2 hr a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Siga el protocolo de extracción de ADN Easy II..

Hisopos y esponjas ambientales

1. Homogeneice los hisopos en 10 ml y las esponjas en 90 ml de APT precalentada. Se recomienda usar un caldo neutralizante que no contenga complejos aril sulfonato. Los caldos neutralizantes que contengan complejos aril sulfonato pueden requerir diluciones adicionales del extracto de ADN.
2. Incube durante 20 ± 2 hr a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Siga el protocolo de extracción de ADN Easy II.

Flor de cannabis

1. Homogeneice 10 g de muestra en 90 ml de APT.
2. Incube durante 20 ± 1 hr a 37°C .
3. Siga el protocolo de extracción de ADN Easy I.

B. Tratamiento de eliminación de ADN libre

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

C. Extracción de ADN

Recomendaciones generales:

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

7. Reconstituya y utilice el reactivo de lisis final de la siguiente manera:
 - a. Vierta cuidadosamente todo el contenido del reactivo F (perlas de lisis) en el reactivo A (reactivo de lisis).
 - b. Utilice puntas con apertura suficientemente ancha para permitir el pipeteo homogeneizado del reactivo de lisis.
 - c. Los reactivos de lisis mezclados con perlas de lisis (reactivos A + F) tienen una vida útil de 6 meses almacenados a una temperatura de 4 °C.

Protocolo Easy I

1. Deposite una alícuota de 100 µl de reactivo de lisis homogeneizado (reactivo A) en los tubos o pocillos de una placa Deep Well.
2. Añada 100 µl de muestra enriquecida. Mezcle pipeteando arriba y abajo y cierre el tubo con tapa o selle la placa Deep Well con la película pre-perforada de sellado.
3. Incube en el bloque calefactor apropiado a 95–100°C durante 10–15 min. o en el calefactor térmico con agitación durante 15–20 min. a 1.300 rpm.
4. Agite con vórtex los tubos a alta velocidad.
5. Si está usando una placa Deep Well, espere a que se enfríe a temperatura ambiente (20–25°C).
6. Centrifugue los tubos a 10.000 - 12.000 x g durante al menos 2 min. La centrifugación no es necesaria en el caso de la placa Deep Well.

Este es el punto de parada recomendado para detener temporalmente el procedimiento. El sobrenadante puede ser almacenado hasta 1 año a –20 °C. Antes de volver a utilizarlo, déjelo descongelar y homogenícelo y, a continuación, centrifúguelo a 10.000 - 12.000 x g durante 5 minutos.

Protocolo Easy II

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

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

2. Añada 100 µl de muestra enriquecida.

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

3. Mezcle la solución pipeteando hacia arriba y hacia abajo hasta que se homogeneice.
4. Cierre los tubos o selle la placa Deep Well mediante la película pre-perforada de sellado.
5. Si trabaja con tubos, agítelos en el vortex cell disruptor durante 3 ± 1 min.
6. Si trabaja con tubos, incúbelos en el bloque calefactor a 95 - 100 °C durante 10 - 15 min. Si trabaja con placa Deep Well, incúbela en el agitador-incubador agitando simultáneamente a 1.300 rpm a 95 - 100 °C durante 15 - 20 min.
7. Si trabaja con tubos, agítelos con vortex 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 y homogenícelo y, a continuación, centrifúguelo a 10.000 - 12.000 x g durante 5 minutos.

D. PCR en tiempo real

Configuración del software e instrumento

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

Preparación de la mix de PCR

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

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

2. Pipetee 20 µl de mix de PCR en cada pocillo según la configuración de su placa.
3. Añada 5 µl de extracto de ADN, reactivo D (control negativo) o reactivo E (control positivo). No agite con vórtex la muestra antes del pipeteo. Selle herméticamente los pocillos de la placa de o las tiras. Es importante evitar la formación de burbujas en el fondo de los pocillos pipeteando con cuidado. Como paso opcional, centrifugue la placa sellada de PCR o las tiras de tubos (quick spin) para eliminar cualquier burbuja.
4. 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.

Run de PCR

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

E. Análisis de los datos

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

Interpretación de los resultados

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

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

Controles

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

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

	Detección de <i>stx1/stx2</i> (canal FAM)	detección de <i>eae</i> (canal Cy5)	Detección de control interno (canal HEX)
Control negativo	Cq = N/A*	Cq = N/A*	26 ≤ Cq ≤ 36
Control positivo	26 ≤ Cq ≤ 36	26 ≤ Cq ≤ 36	NA

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

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

Muestras

Una muestra positiva en gen de virulencia de STEC debe presentar un valor Cq ≥ 10 en los canales FAM y Cy5.

- Si el valor Cq de ambos canales es inferior a 10, verifique que la curva presente una amplificación normal (con una línea de base plana, seguida de un rápido aumento exponencial de la fluorescencia, y luego un aplanamiento o fase meseta). Si la curva parece correcta, puede considerarse una muestra positiva en gen de virulencia de STEC.
- Si el valor Cq para FAM es ≥10 y el valor Cq para Cy5 es N/A, la muestra es positiva para los genes de virulencia *stx1/stx2*
- Si el valor Cq para FAM es N/A y el valor Cq para Cy5 es ≥10, la muestra es positiva para el gen de virulencia *eae*

Si no hay un valor Cq (Cq = N/A) para FAM o Cy5, 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 FAM o Cy5 y el control interno tiene un Cq ≥26, esta muestra se considera negativa para el gen de virulencia de STEC
- 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), utilice 5 µl de la dilución para la amplificación y repita la prueba PCR.
- Si el valor Cq del control interno es <26, no es posible interpretar el resultado. Verifique el posicionamiento correcto del umbral y que la curva presente una amplificación típica. Si la curva no tiene una forma característica, será necesario repetir la prueba de PCR.

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

Apartado 8

Detección de <i>stx1/stx2</i> (FAM)	Detección de <i>eae</i> (Cy5)	Detección de control interno (HEX)	Interpretación
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	NA	Positivo – Analizar con el kit iQ-Check STEC SerO o iQ-Check STEC SerO II
Cq ≥ 10	Cq = N/A	NA	Positivo para <i>stx1/stx2</i> , negativo para <i>eae</i> . Detener el análisis de la muestra
Cq = N/A	Cq ≥ 10	NA	Positivo para <i>eae</i> , negativo para <i>stx1/stx2</i> . Detener el análisis de la muestra
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 26	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibición*

* Si la detección de los genes de virulencia *stx1/stx2* y *eae* y la detección de control interno dan un valor Cq = N/A, es necesario volver a analizar la muestra, pero diluida (1:10).

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

Apartado 8

Confirmación de los resultados positivos

Los resultados positivos del kit iQ-Check STEC VirX deben analizarse para la identificar los siete serogrupos principales de *E. coli* (O157, O26, O45, O103, O111, O121, y O145) con iQ-Check STEC SerO o iQ-Check STEC SerO Kit.

Para la flor de cannabis, utilice AOAC SMPR 2020.012.

Apartado 9

Confirmación de colonias aisladas usando el kit iQ-Check

El kit iQ-Check STEC VirX puede utilizarse también para confirmar colonias STEC aisladas en placas de agar.

1. Recoja una colonia aislada de una placa de agar selectiva o no selectiva r con un palillo, un asa estéril u otro fungible adaptado (por ejemplo, una punta de pipeta).
2. Resuspenda la colonia en 100 µl de sal triptona o agua destilada estéril en un tubo de microcentrífuga. Homogenice con vórtex.
3. Utilice 5 µl de la suspensión con 20 µl de mix de PCR (véase 7 D. PCR en tiempo real) y siga el resto del protocolo iQ-Check STEC VirX para la interpretación de los datos y los resultados. No es necesario realizar extracción de ADN.

Apartado 10

Aplicación del ensayo y validaciones



El kit iQ-Check STEC VirX está validado por el Instituto de Investigación de la AOAC en el marco del Programa "Performance Tested Methods" para la detección de *stx1/stx2* y *eae* en carne de vacuno cruda, carne picada cruda de vacuno, espinacas frescas, hisopos MicroTally, y la flor de cannabis. Un resultado positivo con iQ-Check debe considerarse como presuntivo y se recomienda que se confirme mediante métodos de referencia normalizados. Número de certificado:121203.

Apartado 11

Referencias

Centers for Disease Control and Prevention. Bacterial Foodborne and Diarrheal Disease National Case Surveillance. Annual Report, 2005. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2007.

Scientific Report of European Food Safety Authority (2009). Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food). EFSA Journal 7, 1366 [43 pp.].

Food Safety and Inspection Service (2011). Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Certain Raw Beef Products

ISO/TS 13136:2011 (E), Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups – Qualitative Method.

United States Department of Agriculture Federal Register, Vol. 76, No. 182, 9 CFR Parts 416, 417, and 430, [Docket No. FSIS–2010–0023].

United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science (2019). Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. MLG 5C.00, Laboratory Guidebook Notice of Change, new chapter.

Apartado 12

Historial de revisiones

Fecha de publicación	Número de documento	Cambio
Marzo 2021	10000131516 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Nuevo diseño del documento y actualización de las referencias y el contenido - Renovación y ampliación de la validación AOAC para los hisopos MicroTally, el cannabis y los productos con infusión de cannabis y "STEC VirX MLG Fast" APF - Incluido "STEC VirX ISO Fast" para interpretación de ISO - Actualización del protocolo de confirmación de colonias - Integración de la referencia MLG FSIS 5C.00 - Cambio en el número de documento - versión anterior 808474 REV C

Apéndice — Guía 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
1	5	15	49	265	795
2	11	33	50	270	810
3	16	48	51	275	825
4	22	66	52	281	845
5	27	81	53	286	860
6	32	96	54	292	880
7	38	115	55	297	890
8	43	130	56	302	905
9	49	147	57	308	925
10	54	160	58	313	940
11	59	177	59	319	960
12	65	195	60	324	970
13	70	210	61	329	990
14	76	230	62	335	1000
15	81	245	63	340	1020
16	86	260	64	346	1040
17	92	275	65	351	1050
18	97	290	66	356	1070
19	103	310	67	362	1090
20	108	325	68	367	1100
21	113	340	69	373	1120
22	119	357	70	378	1130
23	124	370	71	383	1150
24	130	390	72	389	1170
25	135	405	73	394	1180
26	140	420	74	400	1200
27	146	440	75	405	1210
28	151	450	76	410	1230
29	157	470	77	416	1250
30	162	485	78	421	1260
31	167	500	79	427	1280
32	173	520	80	432	1300
33	178	535	81	437	1310
34	184	550	82	443	1330
35	189	565	83	448	1340
36	194	580	84	454	1360
37	200	600	85	459	1380
38	205	615	86	464	1390
39	211	635	87	470	1410
40	216	650	88	475	1420
41	221	665	89	481	1445
42	227	680	90	486	1460
43	232	696	91	491	1470
44	238	715	92	497	1490
45	243	730	93	502	1510
46	248	745	94	508	1520
47	254	760	95	513	1540
48	259	777	96	518	1550

Visite [bio-rad.com/iqcheck](https://www.bio-rad.com/iqcheck) para más información.

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

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

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



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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

