
iQ-Check STEC SerO II Kit

User Guide

Test for the real-time PCR detection of 7 major serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food and environmental samples

Catalog #12013174



Table of Contents

Section 1	Introduction	1
Section 2	The iQ-Check STEC SerO II 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	3
Section 7	Protocol.....	5
	A. Sample Enrichment	5
	B. Free DNA Removal Treatment.....	5
	C. DNA Extraction	5
	D. Real-Time PCR	5
	E. Data Analysis.....	6
Section 8	Confirmation of Positive Results.....	8
Section 9	Confirmation of Single Colonies Using iQ-Check Kit.....	8
Section 10	Test Performance and Validations	9
Section 11	References.....	9
Section 12	Revision History.....	9
Appendix —	PCR Mix Calculation Guide.....	10

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 *Escherichia 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.

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 *stx1/2* and *eae* targets typically requires further testing for the identification of the major *E. coli* serogroups.

The iQ-Check STEC SerO II Kit, based on a multiplex real-time PCR system, allows the detection of these six major serogroups, plus *E. coli* O157:H7, in three wells, within few hours after the iQ-Check STEC VirX result.

Section 2 The iQ-Check STEC SerO II Technology

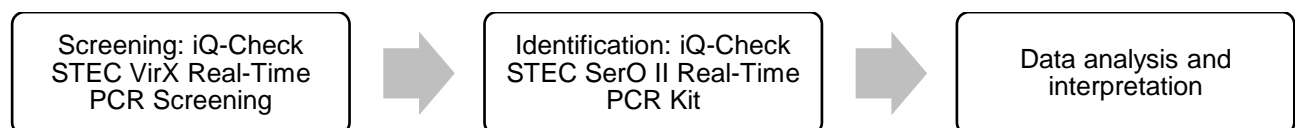
The iQ-Check STEC SerO II Kit is a test based on gene amplification and detection by real-time PCR. The kit's ready-to-use PCR reagents contain oligonucleotides (primers and probes) specific for the six STEC major serogroups and *E. coli* O157:H7, as well as DNA polymerase and nucleotides. Detection 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, by hybridizing to the amplicons. These probes are linked to a fluorophore which fluoresces only when hybridized to the target sequence. In the absence of target DNA, no fluorescence will be detected. The iQ-Check STEC SerO II kit is a multiplex PCR test. To detect and identify the seven STEC serogroups, three different multiplex systems, each detecting three or four targets, are included in the kit. In each system, two to three fluorophores are linked to probes hybridizing to the target DNA sequences. 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 serogroup target DNA sequence and is detected by a third fluorophore.

This test allows the identification of the major STEC serogroups in select food and environmental samples previously tested with the iQ-Check STEC VirX Kit. It includes the following steps:



Section 3

Kit Components

The iQ-Check STEC SerO II kit contains sufficient reagents for 32 tests.

Reagent ID	Reagent	Quantity Provided, ml
B1	Fluorescent probes O157:H7 and O111	1 tube, 0.18
B2	Fluorescent probes O26, O103, and O145	1 tube, 0.18
B3	Fluorescent probes O45 and O121	1 tube, 0.18
C	Amplification mix	1 tube, 1.65
D	PCR negative control	1 tube, 0.5
E	PCR positive control	1 tube, 0.25

Section 4

Shelf Life and Storage

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

Section 5

Materials Required but Not Supplied

Equipment

- Vortexer
- 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 Real-Time PCR 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

- 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
- 1.5 ml and 2 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
 - Briefly vortex reagents from the kit before using them to ensure homogeneity
 - Periodically verify the accuracy and precision of pipets, as well as correct functioning of the instruments
 - Change gloves often, especially if you suspect they are contaminated
 - Clean work spaces periodically with 5% bleach and other decontaminating agents such as DNA AWAY
 - Use powder-free gloves and avoid fingerprints and writing on tube caps. Both will interfere with data acquisition

It is strongly advised to follow the general requirements described in the standard EN ISO 22174:2005 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions)

- iQ-Check STEC SerO 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 SerO II 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
 - 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 120°C). Consult the Safety Data Sheet for additional information and local regulations for disposal.

Section 7 Protocol

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

The test is performed on the same DNA extracted with the iQ-Check STEC VirX Kit. The DNA will be tested in three wells.

A. Sample Enrichment

Refer to the iQ-Check VirX Kit user guide for information on sample enrichment.

B. Free DNA Removal Treatment

Refer to the iQ-Check VirX Kit user guide for information on free DNA removal treatment.

C. DNA Extraction

Refer to the iQ-Check VirX Kit user guide for information on free DNA removal treatment.

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 three PCR mixes 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.
 - a. PCR test group STEC SerO1 Fast: mix amplification solution (reagent C) and fluorescent probes B1.
 - b. PCR test group STEC SerO2 Fast: mix amplification solution (reagent C) and fluorescent probes B2
 - c. PCR test group STEC SerO3 Fast: mix amplification solution (reagent C) and fluorescent probes B3.

Note: Pay attention to correctly use probes B1 for Test Group STEC SerO1 Fast, probes B2 for test Group STEC SerO2 Fast, and probes B3 for Test Group STEC SerO3 Fast.

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

2. Pipet 20 µl of each PCR mix in wells according to your plate setup (one mix for each PCR test

group).

3. Add 5 µl of sample or reagent D (negative control) or reagent E (positive control) in the wells of each PCR Test Group. 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 plate or strips in the thermal cycler. Be sure to place the plate with the A1 well at the upper left corner. Close the reaction module.

Run PCR

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

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 quantification cycle (Cq) values of each sample (the cycle at which the amplification curve crosses the threshold) in each PCR test group.

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.

	Target 1 (FAM channel)	Target 2 (Texas Red channel)	Target 3 (Cy5 channel)	Internal Control Detection (HEX channel)
Test Group STEC SerO1	O111		O157:H7	
Negative control	Cq = N/A*		Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Positive control	26 ≤ Cq ≤ 36		26 ≤ Cq ≤ 36	NA
Test Group STEC SerO2	O26	O103	O145	
Negative control	Cq = N/A*	Cq = N/A*	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Positive control	26 ≤ Cq ≤ 36	26 ≤ Cq ≤ 36	26 ≤ Cq ≤ 36	NA
Test Group STEC SerO3	O45		O121	
Negative control	Cq = N/A*		Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40

Section 7 Protocol

Positive control	$26 \leq Cq \leq 36$		$26 \leq Cq \leq 36$	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.

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

Samples

A sample **positive** for a targeted serogroup must have a Cq value ≥ 10 in FAM, Texas Red or Cy5 channels.

- If the Cq value for FAM, Texas Red, or Cy5 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 target serogroup sample.

If there is no Cq value (Cq = N/A) for FAM, Texas Red, 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, Texas Red, or Cy5, and the internal control has a Cq ≥ 28 , this sample is considered as a negative target serogroup 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 μ l of DNA extract), use 5 μ l of the dilution for amplification, and repeat the PCR test
- If the Cq value for the internal control is < 28 , it is not possible to interpret the result. Verify that the threshold was correctly placed, 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:

Target 1 detection (FAM)	Target 2 detection (Texas Red)	Target 3 detection (Cy5 channel)	Internal control detection (HEX channel)	Interpretation
STEC SerO1 (O111)		STEC SerO1 (O157:H7)		
Cq ≥ 10		Cq ≥ 10	NA	Positive for O111 and O157:H7
Cq ≥ 10		Cq = N/A	NA	Positive for O111
Cq = N/A		Cq ≥ 10	NA	Positive for O157:H7
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq > 28	Negative
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition
STEC SerO2 (O26)	STEC SerO2 (O103)	STEC SerO2 (O145)		
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	NA	Positive for O103, O145, and O26

Cq ≥ 10	Cq = N/A	Cq = N/A	NA	Positive for O26
Cq = N/A	Cq ≥ 10	Cq = N/A	NA	Positive for O103
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq ≥ 10	NA	Positive for O145
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 28	Negative
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition
STEC SerO3 (O45)		STEC SerO3 (O121)		
Cq ≥ 10		Cq ≥ 10	NA	Positive for O45 and O121
Cq ≥ 10		Cq = N/A	NA	Positive for O45
Cq = N/A		Cq ≥ 10	NA	Positive for O121
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq > 28	Negative
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition

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

Section 8 Confirmation of Positive Results

Samples positive for one of the major 7 *E. coli* serogroups (O157, O26, O45, O103, O111, O121 and O145) should be confirmed following a standard reference method such as USDA-FSIS MLG, FDA BAM, ISO, etc.

Section 9 Confirmation of Single Colonies Using iQ-Check Kit

iQ-Check STEC SerO II 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 SerO II protocol for the data and result interpretation. DNA extraction is not necessary.

Note: Colony confirmation can be performed in accordance to the protocol described in the USDA-FSIS MLG 5C.00.

Section 10 Test Performance and Validations



The iQ-Check STEC SerO II Kit is validated by AOAC Research Institute under the Performance Tested Method Program for detection of *Escherichia coli* O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121, and O145 in raw beef trim, raw ground beef, fresh spinach, and MicroTally Swabs. 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).

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, 1,366.

ISO/TS 13136:2012. Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2014). Federal Register Vol. 79, No. 223. Docket No. FSIS–2010–0023. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in certain raw beef products.

United States Department of Agriculture Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science, MLG 5C.00, Detection and Isolation of non-O157 Shiga-toxin Producing *Escherichia coli* (STEC) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. February 2019.

Section 12 Revision History

Release date	Document number	Change
August 2020	10000125262 Ver A	- New document
December 2020	10000125262 Ver B	- Document translated (French, German, Italian, Portuguese, Spanish)

Appendix — PCR Mix Calculation Guide

To find the correct volumes to use when preparing the PCR mixes, add the total number of samples and controls to be analyzed on the PCR test group, and find the corresponding volumes of reagents B1, B2, or B3 and reagent C in the table.

Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B1 or B2 or B3, μ l	Amplification Mix Reagent C, μ l
1	5	15
2	11	33
3	16	48
4	22	66
5	27	81
6	32	96
7	38	115
8	43	130
9	49	147
10	54	160
11	59	177
12	65	195
13	70	210
14	76	230
15	81	245
16	86	260
17	92	275
18	97	290
19	103	310
20	108	325
21	113	340
22	119	357
23	124	370
24	130	390
25	135	405
26	140	420
27	146	440
28	151	450
29	157	470
30	162	485
31	167	500
32	173	520

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 SerO II Kit

Guide d'utilisation

Test pour la détection par PCR en temps réel de 7 principaux sérogroupes d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines dans les échantillons alimentaires et environnementaux

N° de référence 12013174



Sommaire

Section 1	Introduction	1
Section 2	Technologie iQ-Check STEC SerO II	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	3
Section 7	Protocole	5
	A. Enrichissement de l'échantillon	5
	B. Traitement de l'ADN libre.....	5
	C. Extraction de l'ADN.....	5
	D. PCR en temps réel	5
	E. Analyse des données	6
Section 8	Confirmation des résultats positifs	8
Section 9	Confirmation de colonies isolées à l'aide du kit iQ-Check	8
Section 10	Performance du test et validations	9
Section 11	Références	9
Section 12	Historique des révisions	9
Annexe —	Guide de calcul du mélange de PCR	10

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 *Escherichia 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.

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 *stx1/2* et *eae* nécessite généralement un test supplémentaire pour l'identification des principaux sérogroupes d'*E. coli*.

Le kit iQ-Check STEC SerO II, est basé sur un système multiplex par PCR en temps réel, permet la détection de six sérogroupes principaux, plus *E. coli* O157:H7, dans trois puits et en quelques heures après le résultat iQ-Check STEC VirX.

Section 2 Technologie iQ-Check STEC SerO II

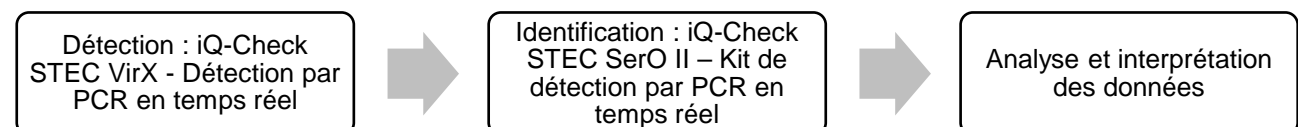
Le kit iQ-Check STEC SerO II est un test basé sur l'amplification et la détection des gènes par PCR en temps réel. Les réactifs PCR prêts à l'emploi de ce kit contiennent des oligonucléotides (amorces et sondes) propres aux six principaux sérogroupes STEC et à *E. coli* O157:H7, ainsi que de l'ADN polymérase 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. En l'absence d'ADN cible, aucune fluorescence ne sera détectée. Le kit iQ-Check STEC SerO II est un test PCR multiplex. En vue de la détection et de l'identification des sept sérogroupes STEC, le kit comprend trois systèmes multiplex différents, chacun détectant trois ou quatre cibles. Dans chaque système, deux à trois fluorophores sont liés aux sondes qui s'hybrident aux séquences d'ADN cibles. 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 du séro groupe STEC et est détecté par un troisième fluorophore.

Ce test permet d'identifier les principaux sérogroupes STEC dans les échantillons alimentaires et environnementaux préalablement testés avec le kit iQ-Check STEC VirX. Il comprend les étapes suivantes :



Section 3

Composants du kit

Le kit iQ-Check STEC SerO II contient la quantité de réactifs suffisante pour 32 tests.

ID réactif	Réactif	Quantité fournie, ml
B1	Sondes fluorescentes O157:H7 et O111	1 tube, 0,18
B2	Sondes fluorescentes O26, O103 et O145	1 tube, 0,18
B3	Sondes fluorescentes O45 et O121	1 tube, 0,18
C	Mélange d'amplification	1 tube, 1,65
D	Contrôle négatif PCR	1 tube, 0,5
E	Contrôle positif PCR	1 tube, 0,25

Section 4

Durée de conservation et stockage

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

Section 5

Matériel requis non fourni

Matériel

- Agitateur-mélangeur vortex
- 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 Real-Time PCR 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

- Plaques, tubes, ruban à sceller et bouchons pour PCR
- Embouts filtrants stériles adaptables pour micropipettes de 20, 200 et 1 000 µl
- Embouts pour pipettes Combitip ou pipettes à répétition équivalentes ; stériles, emballés individuellement
- Tubes à essai stériles de 1,5 ml et 2ml
- 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.
 - Utiliser des gants non poudrés et éviter les empreintes digitales et l'écriture sur les bouchons des tubes. En effet, l'acquisition des données peut en être affectée.

Il est fortement recommandé de respecter les exigences générales décrites dans la norme EN ISO 22174:2005 (Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences générales et définitions).

- iQ-Check STEC SerO Kit
 - Tous les mélanges ou substances du kit de test sont des produits classés conformément au Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (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 de l'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 SerO II. 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.
 - 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 120 °C). Consulter la fiche de données de sécurité pour obtenir des informations supplémentaires ainsi que les réglementations locales relatives à l'élimination.

Section 7 Protocole

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

Le test est effectué sur l'ADN qui a été extrait avec le kit iQ-Check STEC VirX. L'ADN est testé dans trois puits.

A. Enrichissement de l'échantillon

Se référer au guide d'utilisation du kit iQ-Check VirX pour obtenir des informations sur l'enrichissement de l'échantillon.

B. Traitement de l'ADN libre

Se référer au guide d'utilisation du kit iQ-Check VirX pour obtenir des informations sur le traitement de l'ADN libre.

C. Extraction de l'ADN

Se référer au guide d'utilisation du kit iQ-Check VirX pour obtenir des informations sur le traitement de l'ADN libre.

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 trois mélanges de PCR contenant la solution d'amplification (réactif C) et les sondes fluorescentes (réactif B). Le volume de mélange de PCR nécessaire dépend du nombre d'échantillons et de contrôles à analyser. Au moins un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque PCR. Utiliser le tableau de pipetage de l'annexe (Guide de calcul du mélange de PCR) pour trouver les volumes corrects pour chaque réactif.
 - a. Groupe de test PCR STEC SerO1 Fast : solution d'amplification du mélange (réactif C) et sondes fluorescentes B1.
 - b. Groupe de test PCR STEC SerO2 Fast : solution d'amplification du mélange (réactif C) et sondes fluorescentes B2.
 - c. Groupe de test PCR STEC SerO3 Fast : solution d'amplification du mélange (réactif C) et sondes fluorescentes B3.

Remarque : veiller à utiliser correctement les sondes B1 pour le groupe de test STEC SerO1 Fast, les sondes B2 pour le groupe de test STEC SerO2 Fast et les sondes B3 pour le groupe de test STEC SerO3 Fast.

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 chaque mélange de PCR dans les puits en fonction de la plaque préparée (un mélange pour chaque groupe de test PCR).
3. Ajouter 5 µl d'échantillon ou de réactif D (contrôle négatif) ou de réactif E (contrôle positif) dans les puits de chaque groupe de test PCR. Ne pas vortexer l'échantillon avant le pipetage. 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.

- Placer la plaque ou les bandes de tubes dans le thermocycleur. Veiller à placer la plaque correctement, le puits A1 dans le coin supérieur gauche. Fermer le module réactionnel.

Lancement de la PCR

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

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 Cq (cycle de quantification) de chaque échantillon (le cycle auquel la courbe d'amplification dépasse le seuil), dans chaque groupe de test PCR.

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.

	Cible 1 (canal FAM)	Cible 2 (canal Texas Red)	Cible 3 (canal Cy5)	Détection contrôle interne (canal HEX)
Groupe de test STEC SerO1	O111		O157:H7	
Contrôle négatif	Cq = N/A*		Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Contrôle positif	26 ≤ Cq ≤ 36		26 ≤ Cq ≤ 36	NA
Groupe de test STEC SerO2	O26	O103	O145	
Contrôle négatif	Cq = N/A*	Cq = N/A*	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Contrôle positif	26 ≤ Cq ≤ 36	26 ≤ Cq ≤ 36	26 ≤ Cq ≤ 36	NA
Groupe de test STEC SerO3	O45		O121	
Contrôle négatif	Cq = N/A*		Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
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.

Section 7 Protocole

Pour chaque groupe de test PCR, 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 du groupe de test concerné, décrites dans D. PCR en temps réel et E. Analyse des données de la Section 7 Protocole.

Échantillons

Un échantillon **positif** pour un sérotype ciblé doit présenter une valeur Cq ≥ 10 pour les canaux FAM, Texas Red ou Cy5.

- Si la valeur Cq des canaux FAM, Texas Red ou Cy5 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 sérotype cible.

S'il n'y a pas de valeur Cq (Cq = N/A) pour FAM, Texas Red ou 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, Texas Red ou Cy5, et si le contrôle interne présente une valeur Cq ≥ 28 , l'échantillon est considéré négatif pour le sérotype cible.
- Un contrôle interne qui n'a pas non plus de valeur Cq (Cq = N/A) indique probablement un phénomène d'inhibition de la réaction de PCR. Diluer l'échantillon (réaliser une dilution à 1:10 dans de l'eau distillée stérile avec 10 μ l d'extrait d'ADN), utiliser 5 μ l de la dilution pour l'amplification, et répéter le test de PCR.
- Si la valeur Cq pour le contrôle interne est < 28 , il n'est pas possible d'interpréter le résultat. Vérifier que le seuil a été placé correctement 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.

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

Détection cible 1 (FAM)	Détection cible 2 (Texas Red)	Détection cible 3 (canal Cy5)	Détection contrôle interne (canal HEX)	Interprétation
STEC SerO1 (O111)		STEC SerO1 (O157:H7)		
Cq ≥ 10		Cq ≥ 10	NA	Positif pour O111 et O157:H7
Cq ≥ 10		Cq = N/A	NA	Positif pour O111
Cq = N/A		Cq ≥ 10	NA	Positif pour O157:H7
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq > 28	Négatif
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition
STEC SerO2 (O26)	STEC SerO2 (O103)	STEC SerO2 (O145)		
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	NA	Positif pour O103, O145 et O26
Cq ≥ 10	Cq = N/A	Cq = N/A	NA	Positif pour O26

Cq = N/A	Cq ≥ 10	Cq = N/A	NA	Positif pour O103
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq ≥ 10	NA	Positif pour O145
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 28	Négatif
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition
STEC SerO3 (O45)		STEC SerO3 (O121)		
Cq ≥ 10		Cq ≥ 10	NA	Positif pour O45 et O121
Cq ≥ 10		Cq = N/A	NA	Positif pour O45
Cq = N/A		Cq ≥ 10	NA	Positif pour O121
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq > 28	Négatif
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition

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

Les échantillons positifs pour l'un des 7 principaux sérogroupes d'*E. coli* (O157, O26, O45, O103, O111, O121 et O145) doivent être confirmés à l'aide d'une méthode de référence standard telle que USDA-FSIS MLG, FDA BAM, ISO, etc.

Section 9

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

Le kit iQ-Check STEC SerO II 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 SerO II pour l'interprétation des données et des résultats. L'extraction d'ADN n'est pas nécessaire.

Remarque : il est possible d'effectuer la confirmation de colonie conformément au protocole décrit dans le guide USDA-FSIS MLG 5C.00.

Section 10

Performance du test et validations



Le kit iQ-Check STEC SerO II est validé par AOAC Research Institute dans le cadre du programme « Performance Tested Methods » pour la détection d'*Escherichia coli* O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121 et O145 dans le bœuf cru en morceaux, le bœuf cru haché, les épinards frais et les tampons d'échantillonnage MicroTally. 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).

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, 1,366.

ISO/TS 13136:2012. Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2014). Federal Register Vol. 79, No. 223. Docket No. FSIS–2010–0023. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in certain raw beef products.

United States Department of Agriculture Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science, MLG 5C.00, Detection and Isolation of non-O157 Shiga-toxin Producing *Escherichia coli* (STEC) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. February 2019.

Section 12

Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Août 2020	10000125262 Ver A	- Nouveau document
Décembre 2020	10000125262 Ver B	- Document traduit (Français, Allemand, Italien, Portugais, Espagnol)

Annexe — Guide de calcul du mélange de PCR

Pour trouver les volumes corrects à utiliser lors de la préparation des mélanges de PCR, additionner le nombre total d'échantillons et de contrôles à analyser pour le groupe de test PCR et trouver les volumes correspondants de réactif B1, B2 ou B3, et de réactif C dans le tableau.

Nombre total d'échantillons et de contrôles	Sondes Réactif B1 ou B2 ou B3, µl	Mélange d'amplification Réactif C, µl
1	5	15
2	11	33
3	16	48
4	22	66
5	27	81
6	32	96
7	38	115
8	43	130
9	49	147
10	54	160
11	59	177
12	65	195
13	70	210
14	76	230
15	81	245
16	86	260
17	92	275
18	97	290
19	103	310
20	108	325
21	113	340
22	119	357
23	124	370
24	130	390
25	135	405
26	140	420
27	146	440
28	151	450
29	157	470
30	162	485
31	167	500
32	173	520

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 SerO II Kit

Anwenderhandbuch

Test für den Nachweis von 7 Hauptserogruppen von Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* in Lebensmittel- und Umgebungsproben durch Real-Time PCR

Katalog-Nr. 12013174



Inhaltsverzeichnis

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

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 *Escherichia coli* (STEC), von denen bekannt ist, dass sie beim 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.

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 *stx1/2* als auch für *eae* positiv ist, sind üblicherweise weitere Tests zur Identifizierung der wichtigsten *E. coli*-Serogruppen erforderlich.

Das iQ-Check STEC SerO II Kit basiert auf einem Multiplex Real-Time PCR-System und ermöglicht den Nachweis dieser sechs Hauptserogruppen plus *E. coli* O157:H7 in drei Wells innerhalb weniger Stunden nach dem iQ-Check STEC VirX-Ergebnis.

Abschnitt 2 Die iQ-Check STEC SerO II Technologie

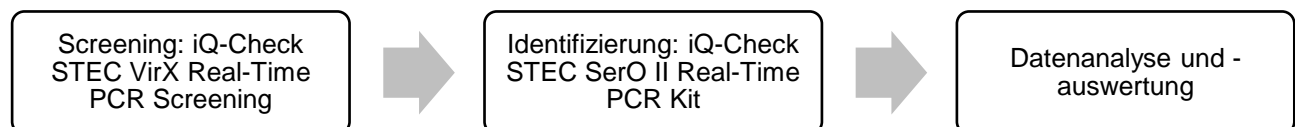
iQ-Check STEC SerO II Kit ist ein Test, der auf der Amplifizierung und dem Nachweis von Genen mittels Real-Time PCR beruht. Die gebrauchsfertigen PCR-Reagenzien im Kit enthalten Oligonukleotide (Primer und Sonden), die für die sechs STEC-Hauptserogruppen und für *E. coli* O157:H7 spezifisch sind, sowie DNA-Polymerase und Nukleotide. Der Nachweis und die Datenanalyse sind für die Verwendung eines Real-Time PCR Gerätes 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 während der Amplifikation an die Amplikons. An diese Sonden ist ein Fluorophor gebunden, der nur fluoresziert, wenn die Sonde an die Zielsequenz hybridisiert. Wenn keine Ziel-DNA vorhanden ist, ist keine Fluoreszenz nachweisbar. iQ-Check STEC SerO II Kit ist ein Multiplex-PCR-Assay. Das Kit enthält drei verschiedene Multiplex-Systeme, die jeweils drei oder vier Targets erkennen, zum Nachweis und zur Identifizierung der sieben STEC-Serogruppen. In jedem System sind an die Sonden, die an die DNA-Zielsequenzen hybridisieren, zwei oder drei Fluorophore gebunden. Da sich die Zahl der Amplikons mit jeder Amplifizierungsrunde erhöht, verstärkt sich auch die Fluoreszenzintensität. Beim Annealing-Schritt jedes PCR-Zyklus misst das optische Modul diese Fluoreszenz, während die zugehörige Software die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zyklen aufträgt.

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

Dieser Assay ermöglicht die Identifizierung der wichtigsten STEC-Serogruppen in ausgewählten Lebensmittel- und Umgebungsproben, die zuvor mit dem iQ-Check STEC VirX Kit getestet wurden. Er umfasst die folgenden Schritte:



Abschnitt 3

Zusammensetzung des Kits

Das iQ-Check STEC SerO II Kit enthält ausreichende Reagenzien für 32 Tests.

Reagenz ID	Reagenz	Menge
B1	Fluoreszenzsonden O157:H7 und O111	1 Röhrchen, 0,18 ml
B2	Fluoreszenzsonden O26, O103 und O145	1 Röhrchen, 0,18 ml
B3	Fluoreszenzsonden O45 und O121	1 Röhrchen, 0,18 ml
C	Amplifikationsmix	1 Röhrchen, 1,65 ml
D	PCR-Negativkontrolle	1 Röhrchen, 0,5 ml
E	PCR-Positivkontrolle	1 Röhrchen, 0,25 ml

Abschnitt 4

Haltbarkeit und Lagerung

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

Abschnitt 5

Zusätzlich benötigtes Material

Geräte

- Vortex
- 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 PCR 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

- 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
- Sterile 1,5 ml und 2 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.
 - Reagenzien aus dem Kit vor dem Gebrauch kurz auf dem Vortex mischen, um ihre Homogenität sicherzustellen.
 - Regelmäßig die Genauigkeit und Präzision der Pipetten sowie die ordnungsgemäße Funktion der Geräte überprüfen.
 - Handschuhe häufig wechseln, vor allem dann, wenn vermutet wird, dass sie kontaminiert sein könnten.
 - Die Arbeitsplätze regelmäßig mit 5%iger Bleichlösung und anderen Dekontaminationsmitteln, z. B. DNA AWAY, reinigen.
 - Ungepuderte Handschuhe verwenden, und Fingerabdrücke und Beschriftungen auf Röhrchendeckeln vermeiden, da dies die Datenerfassung beeinträchtigen würde.

Es wird dringend empfohlen, die in der Norm EN ISO 22174:2005 „Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln - Allgemeine Anforderungen und Begriffe“ beschriebenen Anforderungen einzuhalten.

- iQ-Check STEC SerO 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 SerO II 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. Biologische Proben, z. B. Anreicherungen, können Infektionskrankheiten übertragen. Es sind alle geltenden lokalen, staatlichen/regionalen und/oder nationalen Vorschriften zur Entsorgung von biologischen Abfällen einzuhalten. Geeignete Schutzausrüstung tragen, einschließlich unter anderem Schutzbrille, Gesichtsschutz, Kleidung/Laborkittel und Handschuhe. Alle Arbeiten sollten in ordnungsgemäß ausgestatteten Einrichtungen unter Verwendung der entsprechenden Sicherheitsausrüstung (z. B. physikalische Eindämmungsvorrichtungen) durchgeführt werden. 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 120°C autoklavieren). Weitere Informationen und lokale Bestimmungen zur Entsorgung sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen.

Abschnitt 7 Protokoll

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

Der Test wird mit der DNA durchgeführt, die mit dem iQ-Check STEC VirX Kit extrahiert wurde. Die DNA wird in drei Wells analysiert.

A. Probenanreicherung

Hinweise zur Probenanreicherung befinden sich im Anwenderhandbuch für das iQ-Check VirX Kit.

B. Behandlung zur Entfernung freier DNA

Hinweise zur Behandlung zur Entfernung freier DNA befinden sich im Anwenderhandbuch für das iQ-Check VirX Kit.

C. DNA-Extraktion

Hinweise zur Behandlung zur Entfernung freier DNA befinden sich im Anwenderhandbuch für das iQ-Check VirX Kit.

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. Drei PCR Reaktionsgemische 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.
 - a. PCR-Testgruppe STEC SerO1 Fast: Amplifikationslösung (Reagenz C) und Fluoreszenzsonden B1 mischen.
 - b. PCR-Testgruppe STEC SerO2 Fast: Amplifikationslösung (Reagenz C) und Fluoreszenzsonden B2 mischen.
 - c. PCR-Testgruppe STEC SerO3 Fast: Amplifikationslösung (Reagenz C) und Fluoreszenzsonden B3 mischen.

Hinweis: Auf korrekte Sondenverwendung achten: die Sonden B1 sind für die Testgruppe STEC SerO1 Fast bestimmt, die Sonden B2 für die Testgruppe STEC SerO2 Fast und die Sonden B3 für die Testgruppe STEC SerO3 Fast.

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

2. Aus jedem PCR Reaktionsgemisch dem jeweils verwendeten Platten-Layout entsprechend 20 µl in die Wells pipettieren (ein Gemisch für jede PCR-Testgruppe).
3. 5 µl Probe oder Reagenz D (Negativkontrolle) oder Reagenz E (Positivkontrolle) in die Wells jeder PCR-Testgruppe geben. 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 Platte bzw. die Streifen in den Thermocycler stellen. Die Platte so positionieren, dass sich das Well A1 oben links befindet. Das Reaktionsmodul schließen.

Die PCR durchführen

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

E. Datenanalyse

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

Auswertung der Ergebnisse

Nach Festlegung der Datenanalyseparameter werden die Ergebnisse durch Analyse der Quantifizierungszykluswerte (Cq) jeder Probe (Zyklus, in dem die Amplifikationskurve den Schwellenwert übersteigt) in jeder PCR-Testgruppe ausgewertet.

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.

	Target 1 (FAM-Kanal)	Target 2 (Texasrot-Kanal)	Target 3 (Cy5-Kanal)	Nachweis der internen Kontrolle (HEX-Kanal)
Testgruppe STEC SerO1	O111		O157:H7	
Negativkontrolle	Cq = N/A*		Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Positivkontrolle	26 ≤ Cq ≤ 36		26 ≤ Cq ≤ 36	NA
Testgruppe STEC SerO2	O26	O103	O145	
Negativkontrolle	Cq = N/A*	Cq = N/A*	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Positivkontrolle	26 ≤ Cq ≤ 36	26 ≤ Cq ≤ 36	26 ≤ Cq ≤ 36	NA

Abschnitt 7 Protokoll

Testgruppe STEC SerO3	O45		O121	
Negativkontrolle	Cq = N/A*		Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Positivkontrolle	26 ≤ Cq ≤ 36		26 ≤ Cq ≤ 36	NA

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

Wenn sich die Ergebnisse der Negativ- und der Positivkontrolle in einer PCR-Testgruppe 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 der jeweiligen Testgruppe zu wiederholen.

Proben

Eine hinsichtlich einer Ziel-Serogruppe **positive** Probe muss im FAM-, Texasrot- oder Cy5-Kanal einen Cq-Wert ≥ 10 aufweisen.

- Wenn der Cq-Wert für FAM, Texasrot oder Cy5 unter 10 liegt, ist zu überprüfen, ob es sich bei der Rohdatenkurve 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 der Ziel-Serogruppen.

Wenn kein Cq-Wert für FAM, Texasrot 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, Texasrot oder Cy5 vorliegt und der Cq-Wert für die interne Kontrolle ≥ 28 beträgt, gilt die Probe als negativ hinsichtlich der Ziel-Serogruppe.
- Falls auch für die interne Kontrolle kein Cq-Wert vorliegt (Cq = N/A), bedeutet dies, dass die PCR Reaktion vermutlich gehemmt war. In diesem Fall muss die Probe verdünnt (mit 10 µl DNA-Extrakt eine 1:10 Verdünnung in destilliertem sterilem Wasser durchführen, dann 5 µl der verdünnten Lösung für die Amplifikation verwenden) und die PCR wiederholt werden.
- Falls der Cq-Wert für die interne Kontrolle < 28 liegt, ist keine Interpretation des Ergebnisses möglich. Es ist zu überprüfen, ob der Schwellenwert korrekt platziert wurde oder ob es sich bei der Kurve in den Rohdaten um eine normale Amplifikationskurve handelt. Wenn die Kurve keine charakteristische Form aufweist, muss der PCR-Test wiederholt werden.

Die Interpretation der Probenergebnisse ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Target 1-Nachweis (FAM)	Target 2-Nachweis (Texasrot)	Target 3-Nachweis (Cy5-Kanal)	Nachweis der internen Kontrolle (HEX-Kanal)	Auswertung
STEC SerO1 (O111)		STEC SerO1 (O157:H7)		
Cq ≥ 10		Cq ≥ 10	NA	Positiv für O111 und O157:H7
Cq ≥ 10		Cq = N/A	NA	Positiv für O111
Cq = N/A		Cq ≥ 10	NA	Positiv für O157:H7

Cq = N/A		Cq = N/A	Cq > 28	Negativ
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq = N/A	Hemmung
STEC SerO2 (O26)	STEC SerO2 (O103)	STEC SerO2 (O145)		
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	NA	Positiv für O103, O145 und O26
Cq ≥ 10	Cq = N/A	Cq = N/A	NA	Positiv für O26
Cq = N/A	Cq ≥ 10	Cq = N/A	NA	Positiv für O103
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq ≥ 10	NA	Positiv für O145
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 28	Negativ
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Hemmung
STEC SerO3 (O45)		STEC SerO3 (O121)		
Cq ≥ 10		Cq ≥ 10	NA	Positiv für O45 und O121
Cq ≥ 10		Cq = N/A	NA	Positiv für O45
Cq = N/A		Cq ≥ 10	NA	Positiv für O121
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq > 28	Negativ
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq = N/A	Hemmung

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 Proben, die hinsichtlich einer der 7 Hauptserogruppen von *E. coli* (O157, O26, O45, O103, O111, O121 und O145) positiv sind, sollte das Ergebnis mit einer Standardreferenzmethode wie USDA-FSIS MLG, FDA BAM, ISO usw. bestätigt werden.

Abschnitt 9

Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit

iQ-Check STEC SerO II Kit 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.

Testleistung und Testvalidierungen

3. 5 µl der Suspension zu 20 µl PCR Reaktionsgemisch geben (siehe Abschnitt 7 Real-Time PCR) und zur Daten- und Ergebnisinterpretation die übrigen Schritte des iQ-Check STEC SerO II Protokolls befolgen. Eine DNA-Extraktion ist nicht erforderlich.

Hinweis: Die Bestätigung von Kolonien kann gemäß dem in USDA-FSIS MLG 5C.00 beschriebenen Protokoll durchgeführt werden.

Abschnitt 10 Testleistung und Testvalidierungen



Das iQ-Check STEC SerO II Kit wurde vom AOAC Research Institute im Rahmen des Performance Tested Method-Programms zum Nachweis von *Escherichia coli* O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121 und O145 in rohem Rindfleisch, rohem Rinderhackfleisch, rohem Spinat und MicroTally-Abstrichen validiert. Ein positives Ergebnis in 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).

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, 1,366.

ISO/TS 13136:2012. Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2014). Federal Register Vol. 79, No. 223. Docket No. FSIS–2010–0023. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in certain raw beef products.

United States Department of Agriculture Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science, MLG 5C.00, Detection and Isolation of non-O157 Shiga-toxin Producing *Escherichia coli* (STEC) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. February 2019.

Abschnitt 12 Revisionshistorie

Versionsdatum	Dokumentnummer	Änderung
August 2020	10000125262 Ver A	- Neues Dokument
Dezember 2020	10000125262 Ver B	- Dokument übersetzt (Französisch, Deutsch, Italienisch, Portugiesisch, Spanisch)

Anhang — Pipettiertabelle für das PCR Reaktionsgemisch

Die Tabelle gibt Aufschluss über die entsprechenden korrekten Mengen der Reagenzien B1, B2 oder B3 sowie Reagenz C zur Herstellung der PCR Reaktionsgemische je nach der Gesamtzahl der zu analysierenden Proben und Kontrollen in der PCR-Testgruppe.

Gesamtzahl der Proben und Kontrollen	Sonden Reagenz B1 oder B2 oder B3, µl	Amplifikationsmix Reagenz C, µl
1	5	15
2	11	33
3	16	48
4	22	66
5	27	81
6	32	96
7	38	115
8	43	130
9	49	147
10	54	160
11	59	177
12	65	195
13	70	210
14	76	230
15	81	245
16	86	260
17	92	275
18	97	290
19	103	310
20	108	325
21	113	340
22	119	357
23	124	370
24	130	390
25	135	405
26	140	420
27	146	440
28	151	450
29	157	470
30	162	485
31	167	500
32	173	520

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

10000125262 Ver B US/EG

Sig 0220



iQ-CheckSTEC SerO II Kit

Manuale utente

Test per la rilevazione mediante PCR real-time dei 7 principali sierogruppi di *Escherichia coli* produttori di Shiga-tossina in prodotti alimentari e campioni ambientali

Catalogo #12013174

BIO-RAD

Indice

Sezione 1	Introduzione	1
Sezione 2	Tecnologia di iQ-Check STEC SerO II	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	3
Sezione 7	Protocollo	5
	A. Arricchimento del campione	5
	B. Trattamento per la rimozione del DNA libero	5
	C. Estrazione del DNA	5
	D. PCR real-time	5
	E. Analisi dei dati	6
Sezione 8	Conferma dei risultati positivi	8
Sezione 9	Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check	8
Sezione 10	Performance del test e validazioni	9
Sezione 11	Riferimenti	9
Sezione 12	Cronologia delle revisioni	9
Appendice	— Guida al calcolo della miscela di PCR	10

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 *Escherichia 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) è un marcatore di virulenza aggiuntivo.

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 *stx1/2* sia per *eae* richiede generalmente ulteriori test per l'identificazione dei principali sierogruppi di *E. coli*.

Il kit iQ-Check STEC SerO II, basato su un sistema PCR real-time multiplex, consente la rilevazione di questi sei principali sierogruppi, in aggiunta a *E. coli* O157:H7, in tre pozzetti, entro poche ore dal risultato fornito da iQ-Check STEC VirX.

Sezione 2 Tecnologia di iQ-Check STEC SerO II

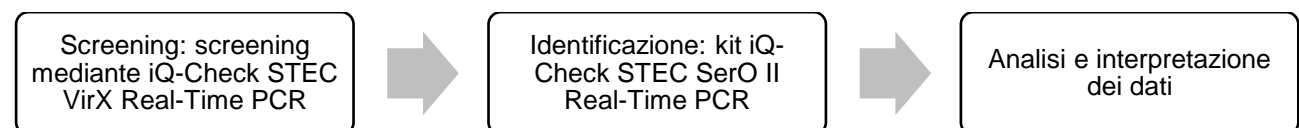
Il kit iQ-Check STEC SerO II è un test basato sull'amplificazione e sulla rilevazione genica mediante PCR real-time. I reagenti PCR pronti all'uso inclusi nel kit contengono oligonucleotidi (primer e sonde) specifici per i sei principali sierogruppi di STEC e per *E. coli* O157:H7, oltre a DNA polimerasi 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 l'amplificazione tramite ibridazione degli ampliconi. Queste sonde sono collegate a un fluoroforo che emette fluorescenza solo se ibridato alla sequenza target. In assenza di DNA target, non viene rilevata alcuna fluorescenza. Il kit iQ-Check STEC SerO II è un test PCR multiplex. Per rilevare e identificare i sette sierogruppi di STEC, nel kit sono inclusi tre diversi sistemi multiplex, ognuno dei quali rileva tre o quattro target. In ogni sistema, due-tre fluorofori sono collegati a sonde ibridate alle sequenze di DNA target. 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 del sierogruppo di STEC e viene rilevato da un terzo fluoroforo.

Questo test consente l'identificazione dei principali sierogruppi di STEC in determinati prodotti alimentari e campioni ambientali precedentemente testati con il kit iQ-Check STEC VirX. Prevede le fasi seguenti:



Sezione 3

Componenti del kit

Il kit iQ-Check STEC SerO II contiene reagenti sufficienti per eseguire 32 test.

ID reagente	Reagente	Quantità fornita, ml
B1	Sonde fluorescenti O157:H7 e O111	1 provetta, 0,18
B2	Sonde fluorescenti O26, O103, e O145	1 provetta, 0,18
B3	Sonde fluorescenti O45 e O121	1 provetta, 0,18
C	Miscela di amplificazione	1 provetta, 1,65
D	Controllo negativo PCR	1 provetta, 0,5
E	Controllo positivo PCR	1 provetta, 0,25

Sezione 4

Durata e conservazione

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

Sezione 5

Materiali necessari ma non forniti

Apparecchiatura

- Vortex
- 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 Real-Time PCR System (catalogo #3600037)
- Sistema Bio-Rad iQ-Check Prep per l'estrazione automatizzata di DNA e la preparazione della piastra PCR (catalogo #3594911)

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

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

Materiali

- Piastre PCR, provette, nastro sigillante e tappi
- Puntali sterili con filtro adattabili a micropipette da 20, 200 e 1.000 µl
- Puntali per pipette Combitip o pipettatori a ripetizione equivalenti, sterili e confezionati singolarmente
- Provette per test sterili da 1,5 e 2 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 brevemente i reagenti nel vortex prima di utilizzarli
 - Verificare periodicamente l'accuratezza e la precisione delle pipette, nonché il corretto funzionamento degli strumenti
 - Cambiare i guanti di frequente, in particolare se si sospetta la presenza di contaminazione
 - Pulire gli spazi di lavoro periodicamente con candeggina al 5% e altri prodotti disinfettanti come DNA AWAY
 - Utilizzare guanti senza polvere e non lasciare impronte digitali e scritte sui tappi delle provette. Entrambi interferiscono con l'acquisizione dei dati

Si consiglia vivamente di osservare i requisiti generali illustrati nella norma EN ISO 22174:2005 (Microbiologia di alimenti e mangimi per animali — Reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca dei microrganismi patogeni degli alimenti — Requisiti generali e definizioni)

- iQ-Check STEC SerO 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 SerO II. 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
 - 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 120°C). Per maggiori informazioni relative alle normative locali in materia di smaltimento, consultare la scheda di sicurezza.

Sezione 7 Protocollo

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

Il test viene eseguito con lo stesso DNA estratto con il kit iQ-Check STEC VirX. Il DNA viene testato in tre pozzetti.

A. Arricchimento del campione

Per informazioni sull'arricchimento del campione, fare riferimento al manuale utente del kit iQ-Check VirX.

B. Trattamento per la rimozione del DNA libero

Per informazioni sul trattamento per la rimozione del DNA libero, fare riferimento al manuale utente del kit iQ-Check VirX.

C. Estrazione del DNA

Per informazioni sul trattamento per la rimozione del DNA libero, fare riferimento al manuale utente del kit iQ-Check VirX.

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 tre miscele di PCR contenenti la soluzione di amplificazione (reagente C) e le sonde fluorescenti (reagente B). Il volume della miscela di PCR necessario dipende dal numero di campioni e controlli da analizzare. In ogni ciclo PCR devono essere inclusi almeno un controllo positivo e un controllo negativo. Utilizzare la tabella relativa al pipettaggio riportata nell'Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR per verificare i corretti volumi da impiegare per ogni reagente.
 - a. Gruppo di test PCR STEC SerO1 Fast: miscelare la soluzione di amplificazione (reagente C) e le sonde fluorescenti B1.
 - b. Gruppo di test PCR STEC SerO2 Fast: miscelare la soluzione di amplificazione (reagente C) e le sonde fluorescenti B2
 - c. Gruppo di test PCR STEC SerO3 Fast: miscelare la soluzione di amplificazione (reagente C) e le sonde fluorescenti B3.

Nota: Prestare attenzione ad utilizzare correttamente le sonde B1 per il gruppo di test STEC SerO1 Fast, le sonde B2 per il gruppo di test STEC SerO2 Fast e le sonde B3 per il gruppo di test STEC SerO3 Fast.

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 di ciascuna miscela di PCR nei pozzetti secondo lo schema analitico scelto (una miscela per ogni gruppo di test PCR).
3. Aggiungere 5 µl di campione o reagente D (controllo negativo) o reagente E (controllo positivo) nei pozzetti di ciascun gruppo di test PCR. 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 o le strip 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 del ciclo di quantificazione (Cq) di ogni campione (il ciclo nel quale la curva di amplificazione supera la soglia) in ciascun gruppo di test PCR.

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.

	Target 1 (canale FAM)	Target 2 (canale Texas Red)	Target 3 (canale Cy5)	Rilevazione controllo interno (canale HEX)
Gruppo di test STEC SerO1	O111		O157:H7	
Controllo negativo	Cq = N/A*		Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Controllo positivo	26 ≤ Cq ≤ 36		26 ≤ Cq ≤ 36	NA
Gruppo di test STEC SerO2	O26	O103	O145	
Controllo negativo	Cq = N/A*	Cq = N/A*	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40

Sezione 7 Protocollo

Controllo positivo	$26 \leq Cq \leq 36$	$26 \leq Cq \leq 36$	$26 \leq Cq \leq 36$	NA
Gruppo di test STEC SerO3	O45		O121	
Controllo negativo	$Cq = N/A^*$		$Cq = N/A^*$	$28 \leq Cq \leq 40$
Controllo positivo	$26 \leq Cq \leq 36$		$26 \leq Cq \leq 36$	NA

* 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.

Per ogni gruppo di test PCR, se i risultati dei controlli positivo e negativo differiscono da quelli riportati nella tabella Controlli (controllo non valido), ripetere il ciclo e l'analisi di quel gruppo di test come descritto nei paragrafi D. PCR real-time ed E: Analisi dei dati nel protocollo della Sezione 7.

Campioni

Un campione **positivo** per un sierogruppo target deve avere un valore $Cq \geq 10$ nei canali FAM, Texas Red o Cy5.

- Se il valore Cq per FAM, Texas Red o Cy5 è inferiore a 10, 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 sierogruppo target positivo.

In assenza di valore Cq ($Cq = N/A$) per FAM, Texas Red 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, Texas Red o Cy5, e il controllo interno ha un $Cq \geq 28$, il campione viene considerato come campione di sierogruppo target negativo
- Se il controllo interno non presenta a sua volta un valore Cq ($Cq = N/A$), ciò indica probabilmente inibizione della reazione PCR. Diluire il campione (eseguire una diluizione 1:10 in acqua distillata sterile tramite 10 μ l di estratto di DNA), utilizzare 5 μ l della diluizione per l'amplificazione, quindi ripetere il test PCR.
- Se il valore Cq per il controllo interno è < 28 , l'interpretazione del risultato non sarà possibile. Verificare 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 target 1 (FAM)	Rilevazione target 2 (Texas Red)	Rilevazione target 3 (canale Cy5)	Rilevazione controllo interno (canale HEX)	Interpretazione
STEC SerO1 (O111)		STEC SerO1 (O157:H7)		
$Cq \geq 10$		$Cq \geq 10$	NA	Positivo per O111 e O157:H7
$Cq \geq 10$		$Cq = N/A$	NA	Positivo per O111
$Cq = N/A$		$Cq \geq 10$	NA	Positivo per O157:H7

Cq = N/A		Cq = N/A	Cq > 28	Negativo
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq = N/A	Inibizione
STEC SerO2 (O26)	STEC SerO2 (O103)	STEC SerO2 (O145)		
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	NA	Positivo per O103, O145 e O26
Cq ≥ 10	Cq = N/A	Cq = N/A	NA	Positivo per O26
Cq = N/A	Cq ≥ 10	Cq = N/A	NA	Positivo per O103
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq ≥ 10	NA	Positivo per O145
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 28	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Inibizione
STEC SerO3 (O45)		STEC SerO3 (O121)		
Cq ≥ 10		Cq ≥ 10	NA	Positivo per O45 e O121
Cq ≥ 10		Cq = N/A	NA	Positivo per O45
Cq = N/A		Cq ≥ 10	NA	Positivo per O121
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq > 28	Negativo
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq = N/A	Inibizione

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 campioni positivi per uno dei 7 principali sierogruppi di *E. coli* (O157, O26, O45, O103, O111, O121 e O145) devono essere confermati mediante un metodo standard di riferimento quale USDA-FSIS MLG, FDA BAM, ISO, ecc.

Sezione 9

Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check

Il kit iQ-Check STEC SerO II 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.

Performance del test e validazioni

- 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 SerO II per l'interpretazione di dati e risultati. L'estrazione di DNA non è necessaria.

Nota: La conferma delle colonie può essere eseguita in base al protocollo descritto in USDA-FSIS MLG 5C.00.

Sezione 10 Performance del test e validazioni



Il kit iQ-Check STEC SerO II 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 *Escherichia coli* O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121 e O145 in tagli di manzo crudo, manzo macinato crudo, spinaci freschi e tamponi MicroTally. 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).

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, 1,366.

ISO/TS 13136:2012. Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2014). Federal Register Vol. 79, No. 223. Docket No. FSIS–2010–0023. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in certain raw beef products.

United States Department of Agriculture Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science, MLG 5C.00, Detection and Isolation of non-O157 Shiga-toxin Producing *Escherichia coli* (STEC) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. February 2019.

Sezione 12 Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero di documento	Modifica
Agosto 2020	10000125262 Ver A	- Nuovo documento
Dicembre 2020	10000125262 Ver B	- Documento tradotto (Francese, Tedesco, Italiano, Portoghese, Spagnolo)

Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR

Al fine di trovare i volumi corretti da utilizzare per la preparazione delle miscele di PCR, aggiungere il numero totale di campioni e controlli da analizzare nel gruppo di test PCR e trovare i volumi corrispondenti dei reagenti B1, B2 o B3 e del reagente C nella tabella.

Numero totale di campioni e controlli	Sonde Reagente B1 o B2 o B3, µl	Miscela di amplificazione Reagente C, µl
1	5	15
2	11	33
3	16	48
4	22	66
5	27	81
6	32	96
7	38	115
8	43	130
9	49	147
10	54	160
11	59	177
12	65	195
13	70	210
14	76	230
15	81	245
16	86	260
17	92	275
18	97	290
19	103	310
20	108	325
21	113	340
22	119	357
23	124	370
24	130	390
25	135	405
26	140	420
27	146	440
28	151	450
29	157	470
30	162	485
31	167	500
32	173	520

Per maggiori informazioni, visitare il sito [bio-rad.com/iqcheck](https://www.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](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

10000125262 Ver B US/EG

Sig 0220



iQ-Check STEC SerO II Kit

Guia do usuário

Teste para a detecção por PCR em tempo real dos 7 sorogrupos principais de *Escherichia coli* produtores da toxina Shiga em amostras de alimentos e ambientais

Nº do catálogo 12013174



Índice

Seção 1	Introdução	1
Seção 2	A tecnologia iQ-Check STEC SerO II	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	3
Seção 7	Protocolo	5
	A. Enriquecimento da amostra.....	5
	B. Tratamento de remoção de DNA livre	5
	C. Extração de DNA.....	5
	D. PCR em Tempo Real	5
	E. Análise de dados.....	6
Seção 8	Confirmação de Resultados Positivos	8
Seção 9	Confirmação de Colônias Isoladas usando o Kit iQ-Check	8
Seção 10	Desempenho e validação do teste	9
Seção 11	Referências	9
Seção 12	Histórico de Revisão	9
	Apêndice - Guia de Cálculo da Mistura de PCR.....	10

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 *Escherichia 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.

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 *stx1/2* e *eae* normalmente requer testes adicionais para a identificação dos principais sorogrupos de *E. coli*.

O kit iQ-Check STEC SerO II, baseado em um sistema multiplex de PCR em tempo real, permite a detecção destes seis grandes sorogrupos, além da *E. coli* O157:H7, em três poços, dentro de poucas horas após o resultado do iQ-Check STEC VirX.

Seção 2 A tecnologia iQ-Check STEC SerO II

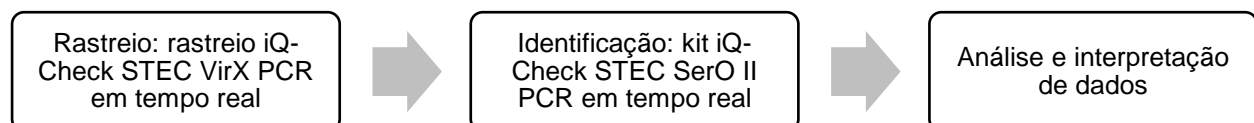
O kit iQ-Check STEC SerO II é um teste baseado na amplificação e detecção genética através de PCR em tempo real. Os reagentes de PCR prontos para uso do kit contêm oligonucleotídeos (iniciadores e sondas) específicos para os seis principais sorogrupos STEC e *E. coli* O157:H7, bem como DNA polimerase 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 alinhando-se 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 amplificação, através da hibridização dos amplicons. Estas sondas estão ligadas a um fluoróforo, que apresenta fluorescência apenas quando hibridizado à sequência-alvo. Na ausência de DNA-alvo, não será observada fluorescência. O kit iQ-Check STEC SerO II é um teste PCR multiplex. Para detectar e identificar os sete sorogrupos STEC, três sistemas multiplex diferentes, cada um detectando três ou quatro alvos, estão incluídos no kit. Em cada sistema, dois a três fluoróforos estão ligados a sondas que hibridizam as sequências de DNA alvo. 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 sorogrupo STEC, e é detectado por um terceiro fluoróforo.

Este teste permite a identificação dos principais sorogrupos STEC em amostras selecionadas de alimentos e ambientais, previamente testadas com o kit iQ-Check STEC VirX. Inclui as etapas seguintes:



Seção 3

Componentes do Kit

O kit iQ-Check STEC SerO II contém reagentes suficientes para 32 testes.

ID do Reagente	Reagente	Quantidade fornecida, ml
B1	Sondas fluorescentes O157:H7 e O111	1 tubo, 0,18
B2	Sondas fluorescentes O26, O103, e O145	1 tubo, 0,18
B3	Sondas fluorescentes O45 e O121	1 tubo, 0,18
C	Mistura de amplificação	1 tubo, 1,65
D	Controle de PCR negativo	1 tubo, 0,5
E	Controle de PCR positivo	1 tubo, 0,25

Seção 4

Prazo de validade e armazenamento

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

Seção 5

Materiais necessários, mas não fornecidos

Equipamento

- Vortexer
- 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, sistema de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well (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

- Placas de PCR, tubos, fitas e tampas de vedação
- Pontas de filtro estéreis adaptáveis a micropipetas de 20, 200 e 1.000 µl
- Pontas para Pipetas Combitip ou pipetadores de repetição equivalentes, estéreis, embalados individualmente
- Tubos de teste estéreis de 1,5 ml e 2 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 brevemente 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 seguir os requisitos gerais descritos na norma EN ISO 22174:2005 (Microbiologia de alimentos para animais e para animais - reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de patógenos de origem alimentar - Requisitos e definições gerais)

- iQ-Check STEC SerO 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 SerO II. Guarde as instruções de segurança para referência futura. Para reduzir os riscos associados à exposição a produtos químicos e riscos biológicos, realize testes de patógenos em um laboratório devidamente equipado, sob o controle de pessoal treinado. Sempre siga as práticas padrão de segurança do laboratório, incluindo o uso de vestuário de proteção e proteção ocular adequados ao manusear reagentes e amostras contaminadas. Evite o contato com o conteúdo do meio de enriquecimento e dos tubos de reagentes após a amplificação. Descarte amostras enriquecidas de acordo com as normas atuais do setor
 - O *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 120°C). Consulte a folha de dados de segurança para obter informações adicionais e regulamentos locais

para descarte.

Seção 7 Protocolo

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

O teste é realizado no mesmo DNA extraído com o kit iQ-Check STEC VirX. O DNA será testado em três poços.

A. Enriquecimento da amostra

Consulte o guia do usuário do kit iQ-Check VirX para informações sobre enriquecimento da amostra.

B. Tratamento de remoção de DNA livre

Consulte o guia do usuário do kit iQ-Check VirX para informações sobre o tratamento de remoção de DNA livre.

C. Extração de DNA

Consulte o guia do usuário do kit iQ-Check VirX para informações sobre o tratamento de remoção de DNA livre.

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 três misturas 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.
 - a. Grupo de teste STEC SerO1 Fast: solução de amplificação mistura (reagente C) e sondas fluorescentes B1.
 - b. Grupo de teste STEC SerO2 Fast: solução de amplificação mistura (reagente C) e sondas fluorescentes B2
 - c. Grupo de teste STEC SerO3 Fast: solução de amplificação mistura (reagente C) e sondas fluorescentes B3.

Nota: Observe o uso correto das sondas B1 para Grupo de teste STEC SerO1 Fast, das sondas B2 para Grupo de teste STEC SerO2 Fast, e das sondas B3 para Grupo de teste STEC SerO3 Fast.

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. Pipetar 20 µl de cada mistura de PCR em poços de acordo com sua configuração de placa (uma mistura para cada grupo de teste PCR).
3. Adicione 5 µl de amostra, reagente D (controle negativo) ou reagente E (controle positivo) nos poços de cada grupo de teste PCR. 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 ou as tiras no termociclador. Certifique-se de colocar a placa com o poço A1 no canto superior esquerdo. Feche o módulo de reação.

Execute 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 do ciclo de quantificação (Cq) de cada amostra (o ciclo no qual a curva de amplificação cruza o limite) em cada grupo de teste PCR.

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.

	Objetivo 1 (Canal FAM)	Objetivo 2 (Canal Texas Red)	Objetivo 3 (Canal Cy5)	Deteção de controle interno (Canal HEX)
Grupo de teste STEC SerO1	O111		O157:H7	
Controle negativo	Cq = N/A*		Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Controle positivo	26 ≤ Cq ≤ 36		26 ≤ Cq ≤ 36	NA
Grupo de teste STEC SerO2	O26	O103	O145	
Controle negativo	Cq = N/A*	Cq = N/A*	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40

Seção 7 Protocolo

Controle positivo	$26 \leq Cq \leq 36$	$26 \leq Cq \leq 36$	$26 \leq Cq \leq 36$	NA
Grupo de teste STEC SerO3	O45		O121	
Controle negativo	$Cq = N/A^*$		$Cq = N/A^*$	$28 \leq Cq \leq 40$
Controle positivo	$26 \leq Cq \leq 36$		$26 \leq Cq \leq 36$	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.

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

Amostras

Uma amostra **positiva** para o sorogrupo alvo deve ter um valor $Cq \geq 10$ nos canais FAM, Texas Red ou Cy5.

- Se o valor de Cq para FAM, Texas Red, ou Cy5 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 sorogrupo alvo.

Caso não haja valor Cq ($Cq = N/A$) para a FAM, Texas Red 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, Texas Red, ou Cy5 e o controle interno tiver $Cq \geq 28$, essa amostra será considerada uma amostra negativa do sorogrupo alvo
- 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 μ l de extrato de DNA), use 5 μ l da diluição para amplificação e repita o teste de PCR
- Se o valor Cq para o controle interno for < 28 , não será possível interpretar o resultado. Confirme que o limite foi colocado corretamente 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 objetivo 1 (FAM)	Detecção objetivo 2 (Texas Red)	Detecção objetivo 3 (Canal Cy5)	Detecção de controle interno (Canal HEX)	Interpretação
STEC SerO1 (O111)		STEC SerO1 (O157:H7)		
$Cq \geq 10$		$Cq \geq 10$	NA	Positivo para O111 e O157:H7
$Cq \geq 10$		$Cq = N/A$	NA	Positivo para O111
$Cq = N/A$		$Cq \geq 10$	NA	Positivo para O157:H7
$Cq = N/A$		$Cq = N/A$	$Cq > 28$	Negativo

Cq = N/A		Cq = N/A	Cq = N/A	Inibição
STEC SerO2 (O26)	STEC SerO2 (O103)	STEC SerO2 (O145)		
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	NA	Positivo para O103, O145, e O26
Cq ≥ 10	Cq = N/A	Cq = N/A	NA	Positivo para O26
Cq = N/A	Cq ≥ 10	Cq = N/A	NA	Positivo para O103
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq ≥ 10	NA	Positivo para O145
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 28	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Inibição
STEC SerO3 (O45)		STEC SerO3 (O121)		
Cq ≥ 10		Cq ≥ 10	NA	Positivo para O45 e O121
Cq ≥ 10		Cq = N/A	NA	Positivo para O45
Cq = N/A		Cq ≥ 10	NA	Positivo para O121
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq > 28	Negativo
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq = N/A	Inibição

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

Seção 8

Confirmação de Resultados Positivos

As amostras positivas para um dos 7 sorogrupos de *E. coli* principais (O157, O26, O45, O103, O111, O121 e O145) devem ser confirmadas seguindo um método de referência padrão como USDA-FSIS MLG, FDA BAM, ISO, etc.

Seção 9

Confirmação de Colônias Isoladas usando o Kit iQ-Check

O kit iQ-Check STEC SerO II também pode ser usado para confirmar colônias STEC 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 tripton ou água estéril destilada em um tubo de microcentrífuga. 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

Desempenho e validação do teste

siga o restante do protocolo iQ-Check STEC SerO II para a interpretação de dados e resultado. A extração de DNA não é necessária.

Nota: A confirmação da colônia pode ser realizada de acordo com o protocolo descrito no USDA-FSIS MLG 5C.00.

Seção 10 Desempenho e validação do teste



O Kit iQ-Check STEC SerO II é validado pelo AOAC Research Institute, através do Performance Tested Method Program para a detecção de *Escherichia coli* O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121, e O145 em cortes de carne bovina crua, carne bovina moída crua, espinafre fresco, e cotonetes MicroTally. 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).

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, 1,366.

ISO/TS 13136:2012. Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2014). Federal Register Vol. 79, No. 223. Docket No. FSIS–2010–0023. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in certain raw beef products.

United States Department of Agriculture Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science, MLG 5C.00, Detection and Isolation of non-O157 Shiga-toxin Producing *Escherichia coli* (STEC) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. February 2019.

Seção 12 Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Agosto 2020	10000125262 Ver A	- Novo documento
Dezembro 2020	10000125262 Ver B	- Tradução do documento (Francês, Alemão, Italiano, Português, Espanhol)

Apêndice - Guia de Cálculo da Mistura de PCR

Para encontrar os volumes corretos para a preparação da misturas de PCR, adicione o número total de amostras e de controles a serem analisados no grupo de teste PCR e encontre os volumes correspondentes dos reagentes B1, B2 ou B3 e de reagente C na tabela.

Número total de Amostras e Controles	Sondas Reagente B1 ou B2 ou B3, µl	Mistura de amplificação Reagente C, µl
1	5	15
2	11	33
3	16	48
4	22	66
5	27	81
6	32	96
7	38	115
8	43	130
9	49	147
10	54	160
11	59	177
12	65	195
13	70	210
14	76	230
15	81	245
16	86	260
17	92	275
18	97	290
19	103	310
20	108	325
21	113	340
22	119	357
23	124	370
24	130	390
25	135	405
26	140	420
27	146	440
28	151	450
29	157	470
30	162	485
31	167	500
32	173	520

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

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

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

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



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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

10000125262 Ver B US/EG

Sig 0220



iQ-Check STEC SerO II Kit

Manual del usuario

Análisis de detección por PCR en tiempo real de los 7 serogrupos principales de *Escherichia coli* productores de toxina Shiga, en muestras alimentarias y ambientales

Referencia #12013174



Tabla de Contenidos

Apartado 1	Introducción	1
Apartado 2	Tecnología de iQ-Check STEC SerO II	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	3
Apartado 7	Protocolo	5
	A. Enriquecimiento de la muestra	5
	B. Tratamiento de eliminación de ADN libre	5
	C. Extracción de ADN	5
	D. PCR en tiempo real	5
	E. Análisis de los datos	6
Apartado 8	Confirmación de los resultados positivos	8
Apartado 9	Confirmación de colonias aisladas usando el kit iQ-Check	8
Apartado 10	Aplicación del ensayo y validaciones	9
Apartado 11	Referencias	9
Apartado 12	Historial de revisiones	9
Apéndice —	Guía de cálculo de la mix de PCR	10

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 *Escherichia 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.

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 *stx1/2* y *eae* habitualmente requiere más pruebas para la identificación de los principales serogrupos de *E. coli*.

El kit iQ-Check STEC SerO II, basado en un sistema múltiplex de PCR en tiempo real, permite la detección de estos seis principales serogrupos, además de *E. coli* O157:H7, en tres pocillos, a las pocas horas del resultado de iQ-Check STEC VirX.

Apartado 2 Tecnología de iQ-Check STEC SerO II

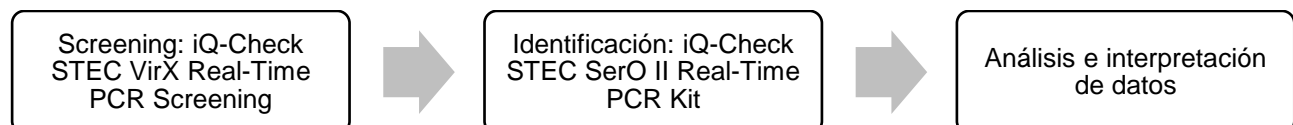
El kit iQ-Check STEC SerO II es ensayo basado en la amplificación y detección de genes por PCR en tiempo real. Los reactivos de PCR listos para su uso incluidos en el kit contienen oligonucleótidos (cebadores y sondas) específicos para los seis principales serogrupos STEC y *E. coli* O157:H7, así como 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 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. En ausencia de ADN diana o de interés, no se detectará ninguna fluorescencia. El kit iQ-Check STEC SerO II es una prueba PCR múltiplex. Para detectar e identificar los siete serogrupos de STEC, el kit incluye tres sistemas múltiplex diferentes, cada uno de los cuales detecta tres o cuatro dianas. En cada sistema, dos o tres fluoróforos están conectados a sondas que se hibridan con las secuencias de ADN diana. 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 del serogrupo de STEC y se detecta por un tercer fluoróforo.

Esta prueba permite la identificación de los principales serogrupos de STEC en muestras de alimentos y muestras ambientales seleccionadas previamente con el kit iQ-Check STEC VirX. Consta de los siguientes pasos :



Apartado 3

Componentes del kit

El kit iQ-Check STEC SerO II contiene suficientes reactivos para 32 análisis.

ID de reactivo	Reactivo	Cantidad proporcionada, ml
B1	Sondas fluorescentes O157:H7 y O111	1 tubo, 0,18
B2	Sondas fluorescentes O26, O103, y O145	1 tubo, 0,18
B3	Sondas fluorescentes O45 y O121	1 tubo, 0,18
C	Mix de amplificación	1 tubo, 1,65
D	Control negativo PCR	1 tubo, 0,5
E	Control positivo PCR	1 tubo, 0,25

Apartado 4

Vida útil y conservación

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

Apartado 5

Materiales necesarios, no suministrados

Equipamiento

- Agitador vórtex
- Micropipetas de 20, 200 y 1.000 µl
- Puntas para pipetas de repetición; estériles, empaquetadas individualmente
- Sistema PCR en tiempo real Bio-Rad*; por ejemplo, el CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR 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

- 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
- Tubos de ensayo estériles de 1,5 y 2 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 22174:2005 (Microbiología de los alimentos y piensos - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos transmitidos por los alimentos - Requisitos generales y definiciones)

- iQ-Check STEC SerO 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 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 SerO II. 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
- 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 120 °C). Consulte la Ficha de Datos de Seguridad para obtener información adicional y los reglamentos locales para la eliminación.

Apartado 7 Protocolo

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

El análisis se realiza en el mismo ADN extraído con el kit iQ-Check STEC VirX. El ADN se analizará en tres pocillos.

A. Enriquecimiento de la muestra

Consulte el manual del usuario del kit iQ-Check VirX para más información sobre el enriquecimiento de la muestra.

B. Tratamiento de eliminación de ADN libre

Consulte el manual del usuario del kit iQ-Check VirX para más información sobre el tratamiento de eliminación del ADN libre.

C. Extracción de ADN

D. PCR en tiempo real

Configuración del software e instrumento

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

Preparación de la mix de PCR

1. Prepare tres mix de PCR que contengan 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.
 - a. Grupo de análisis PCR STEC SerO1 Fast: mezclar solución de amplificación (reactivo C) y sondas fluorescentes B1.
 - b. Grupo de análisis PCR STEC SerO2 Fast: mezclar solución de amplificación (reactivo C) y sondas fluorescentes B2
 - c. Grupo de análisis PCR STEC SerO3 Fast: mezclar solución de amplificación (reactivo C) y sondas fluorescentes B3.

Nota: Preste atención al uso correcto de las sondas B1 para el grupo de análisis STEC SerO1 Fast, las sondas B2 para el grupo de análisis STEC SerO2 Fast, y las sondas B3 para el grupo de análisis STEC SerO3 Fast.

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.

- Pipetee 20 µl de cada mix de PCR en los pocillos según la configuración de su placa (un mix por cada grupo de análisis de PCR).
- Añada 5 µl de muestra o reactivo D (control negativo) o reactivo E (control positivo) en los pocillos de cada grupo de análisis de PCR. No agite con vórtex la muestra antes del pipeteo. Selle herméticamente los pocillos de la placa de o las tiras de PCR. 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.
- Coloque la placa o las tiras de PCR 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 de la guía del usuario del sistema de PCR en tiempo real del kit iQ-Check.

E. Análisis de los datos

Los datos pueden ser analizados directamente al final del run de PCR o en un momento posterior abriendo el archivo de datos almacenados. Siga las instrucciones del correspondiente manual 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 del ciclo de cuantificación (Cq) de cada muestra (el ciclo en el que la curva de amplificación cruza el umbral) en cada grupo de análisis de PCR.

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

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

	Diana 1 (Canal FAM)	Diana 2 (Canal Texas Red)	Diana 3 (Canal Cy5)	Detección de control interno (Canal HEX)
Grupo de análisis STEC SerO1	O111		O157:H7	
Control negativo	Cq = N/A*		Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Control positivo	26 ≤ Cq ≤ 36		26 ≤ Cq ≤ 36	NA
Grupo de análisis STEC SerO2	O26	O103	O145	
Control negativo	Cq = N/A*	Cq = N/A*	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Control positivo	26 ≤ Cq ≤ 36	26 ≤ Cq ≤ 36	26 ≤ Cq ≤ 36	NA
Grupo de análisis	O45		O121	

Apartado 7 Protocolo

STEC SerO3

Control negativo	Cq = N/A*		Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
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.

Para cada grupo de análisis de PCR, si los resultados de los controles negativos y positivos difieren de los de la tabla de controles (control inválido), repita el run y el análisis de ese grupo de ensayo que se describen en el protocolo D. PCR en tiempo real y E. Análisis de datos en el apartado 7.

Muestras

Una muestra **positiva** para un serogrupo diana tiene que presentar un valor Cq ≥ 10 en los canales FAM, Texas Red o Cy5.

- Si el valor Cq para FAM, Texas Red, o Cy5 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 el serogrupo diana.

Si no hay un valor Cq (Cq = N/A) para FAM, Texas Red, 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, Texas Red, o Cy5 y el control interno tiene un Cq ≥ 28, esta muestra se considera una muestra negativa en el serogrupo diana.
- 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 de PCR.
- Si el valor Cq del control interno es <28, no es posible interpretar el resultado. Verifique el posicionamiento correcto del umbral y que la curva presente una amplificación típica. Si la curva no tiene una forma característica, será necesario repetir la prueba de PCR.

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

Detección diana 1 (FAM)	Detección diana 2 (Texas Red)	Detección diana 3 (Cy5)	Detección de control interno (HEX)	Interpretación
STEC SerO1 (O111)		STEC SerO1 (O157:H7)		
Cq ≥ 10		Cq ≥ 10	NA	Positivo para O111 y O157:H7
Cq ≥ 10		Cq = N/A	NA	Positivo para O111
Cq = N/A		Cq ≥ 10	NA	Positivo para O157:H7
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq > 28	Negativo
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibición

STEC SerO2 (O26)	STEC SerO2 (O103)	STEC SerO2 (O145)		
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	NA	Positivo para O103, O145, y O26
Cq ≥ 10	Cq = N/A	Cq = N/A	NA	Positivo para O26
Cq = N/A	Cq ≥ 10	Cq = N/A	NA	Positivo para O103
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq ≥ 10	NA	Positivo para O145
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 28	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibición
STEC SerO3 (O45)		STEC SerO3 (O121)		
Cq ≥ 10		Cq ≥ 10	NA	Positivo para O45 y O121
Cq ≥ 10		Cq = N/A	NA	Positivo para O45
Cq = N/A		Cq ≥ 10	NA	Positivo para O121
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq > 28	Negativo
Cq = N/A		Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibición

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

Las muestras positivas en uno de los principales 7 serogrupos de *E. coli* (O157, O26, O45, O103, O111, O121 y O145) deben confirmarse mediante métodos de referencia normalizados como USDA-FSIS MLG, FDA BAM, ISO, etc.

Apartado 9

Confirmación de colonias aisladas usando el kit iQ-Check

El kit iQ-Check STEC SerO II 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, 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. Analice 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 SerO II para la interpretación de los datos y los resultados. No es necesario realizar extracción de ADN.

Nota: La confirmación de colonias puede realizarse siguiendo el protocolo descrito en USDA-FSIS MLG 5C.00.

Apartado 10

Aplicación del ensayo y validaciones



El kit iQ-Check STEC SerO II está validado por el Instituto de Investigación de la AOAC en el marco del Programa "Performance Tested Methods" para la detección de *Escherichia coli* O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121, y O145 en carne de vacuno cruda, carne picada cruda, espinacas frescas e hisopos MicroTally. 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).

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, 1,366.

ISO/TS 13136:2012. Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2014). Federal Register Vol. 79, No. 223. Docket No. FSIS–2010–0023. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in certain raw beef products.

United States Department of Agriculture Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science, MLG 5C.00, Detection and Isolation of non-O157 Shiga-toxin Producing *Escherichia coli* (STEC) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. February 2019.

Apartado 12

Historial de revisiones

Fecha de publicación	Número de documento	Cambio
Agosto 2020	10000125262 Ver A	- Documento nuevo
Diciembre 2020	10000125262 Ver B	- Documento traducido (Francés, Alemán, Italiano, Portugués, Español)

Apéndice — Guía de cálculo de la mix de PCR

Para obtener los volúmenes correctos a usar en la preparación de cada mix de PCR, sume el número total de muestras y controles a analizar en el grupo de análisis PCR y localice los volúmenes correspondientes de los reactivos B1, B2, o B3 y del reactivo C en la tabla.

Número total de muestras y controles	Sondas Reactivo B1 o B2 o B3, μ l	Mix de amplificación Reactivo C, μ l
1	5	15
2	11	33
3	16	48
4	22	66
5	27	81
6	32	96
7	38	115
8	43	130
9	49	147
10	54	160
11	59	177
12	65	195
13	70	210
14	76	230
15	81	245
16	86	260
17	92	275
18	97	290
19	103	310
20	108	325
21	113	340
22	119	357
23	124	370
24	130	390
25	135	405
26	140	420
27	146	440
28	151	450
29	157	470
30	162	485
31	167	500
32	173	520

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

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

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

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



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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

