
iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit

User Guide

Test for the real-time PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7
in food and environmental samples

Catalog # 3578114

BIO-RAD

Table of Contents

Section 1.	Introduction	1
Section 2.	The iQ-Check <i>E. coli</i> O157:H7 Technology	1
Section 3.	Kit Components	2
Section 4.	Shelf Life and Storage	2
Section 5.	Materials Required but Not Supplied.....	2
	Equipment.....	2
	Supplies	3
Section 6.	Safety Precautions and Recommendations for Best Results	4
Section 7.	Protocol	6
	Sample Enrichment.....	6
	Free DNA Removal Treatment.....	7
	DNA Extraction	7
	Real-Time PCR	9
	Data Analysis	9
Section 8.	Confirmation of Positive Results	11
Section 9.	Confirmation of Single Colonies Using iQ-Check Kit	12
Section 10.	Test Performance and Validations	12
Section 11.	References	13
Section 12.	Revision History.....	13
	Appendix — PCR Mix Calculation Guide	14

Section 1

Introduction

Conventional bacteriological detection methods are often long and tedious. In comparison, iQ-Check *Escherichia coli* O157:H7 is a simple and rapid qualitative test, allowing the detection of specific DNA sequences unique to *E. coli* O157:H7 found in food products and environmental samples. Using real-time polymerase chain reaction (PCR), *E. coli* O157:H7 specific DNA sequences are amplified and detected simultaneously by means of fluorescent probes. Up to 94 samples can be processed, with a minimized risk of contamination and an easy-to-use procedure. The intended users of this kit are trained laboratory personnel who are performing tests to detect *E. coli* O157:H7. The use of this test allows results to be obtained within a few hours following enrichment of a sample.

Section 2

The iQ-Check *E. coli* O157:H7 Technology

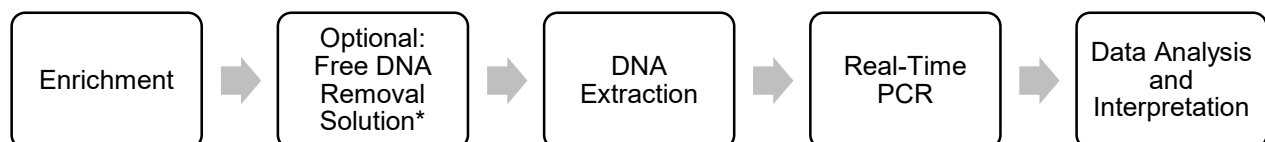
The iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit is a test based on gene amplification and detection by real-time PCR. Ready-to-use PCR reagents contain oligonucleotides (primers and probes) specific for *E. coli* O157:H7, as well as a DNA polymerase and nucleotides. Detection and data analysis are optimized for use with a Bio-Rad real-time PCR instrument, such as the CFX96 Touch Deep Well or CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Detection System.

PCR is a powerful technique used to generate many copies of target DNA. During the PCR reaction, several cycles of heating and cooling allow DNA denaturation followed by primers annealing to the target region at which point DNA polymerase uses these primers and deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) to extend the DNA, creating copies of the target DNA. These copies are called amplicons.

In real-time PCR, specific probes are used to detect DNA during the amplification step by hybridizing to the amplicons. These probes are linked to a fluorophore that fluoresces only when hybridized to the target sequence. FAM is the fluorophore linked to the probe hybridizing to the *E. coli* O157:H7-specific DNA sequence. In the absence of target DNA, no fluorescence will be detected. As the amount of amplicons increases with each round of amplification, fluorescence intensity also increases. The optical module measures this fluorescence at the annealing step during each PCR cycle while the associated software plots the fluorescence intensity versus number of cycles.

A synthetic DNA internal control is included in the reaction mix. This control is amplified with a specific probe at the same time as the *E. coli* O157:H7 target DNA sequence and detected by a second fluorophore.

This test allows the qualitative detection of *E. coli* O157:H7 in select foods and environmental samples previously enriched by culture. It includes the following main steps:



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

Section 3

Kit Components

The iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit contains sufficient reagents for 96 tests (94 samples).

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

Section 4

Shelf Life and Storage

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

Section 5

Materials Required but Not Supplied

Equipment

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

Section 5 Materials Required but Not Supplied

- Magnetic stir plate
- 20, 200, and 1,000 µl micropipets
- Tips for repeat pipettors; sterile, individually packaged
- Bio-Rad real-time PCR system;* for example, the CFX96 Touch Deep Well (catalog #3600037) or CFX Opus Deepwell (catalog #17007991) Real-Time PCR Systems
- Bio-Rad iQ-Check Prep System for automated DNA extraction and PCR plate setup (catalog #3594911)

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

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

Supplies

- Enrichment medium: buffered peptone water (for example, BPW Plus catalog #3564684, dehydrated, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 bottles; 3555789, 2.3 L x 5 bags; 3555790, 5 L x 2 bags. BPW Standard catalog #12013259, dehydrated, 500 g; 12013258 dehydrated, 5 kg; 12013260 5L x 2 bags)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalog #3594970)
- STEC supplement (catalog #3564005)
- iQ-Check Purification Reagent (catalog #12012383)
- Specific for environmental samples
 - Environmental sponges
 - Environmental swabs
 - Neutralizing broth for sponges and swabs, such as Dey-Engley (D/E) or HiCap Neutralizing Broth, or Lethen broth
- Specific for extraction in tubes
 - 1.5 ml conical screwcap tubes, sterile (catalog #17010678)
- Specific for extraction in a deep well plate
 - 96-well deep well plate (iQ-Check Deep Well Microplates, catalog #3594900)
 - Plastic sealing film (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, catalog #3590139)
 - PCR plate sealing film (X-Pierce Films, catalog #3593977, or Pre-Pierced Plate Sealing Film, #3600040, North America only)
- Specific for iQ-Check Prep System:
 - 60 ml dilution container (catalog #12014473)
 - Filter tips (catalog # 12014486, 50 µl x 5,760; 12014483, 1,000 µl x 3,840)
 - PCR mix tubes (catalog #12016673, 5 ml x 25)
- PCR plates, tubes, sealing tape, and caps
- Sterile filter tips adaptable to 20, 200, and 1,000 µl micropipets

Section 6 Safety Precautions and Recommendations for Best Results

- Tips for Combitip pipets or equivalent repeat pipettors; sterile, individually packaged
- 2 and 5 ml sterile test tubes
- RAPID'*E. coli* O157:H7 agar (catalog #3564748, 100 g) supplemented with novobiocin and potassium tellurite (can be used outside the scope of AOAC validation)
- For confirmations: CT-SMAC agar, plus O157 and H7 latex tests
- Powder-free gloves
- Distilled sterile water
- Bleach, 5%
- Cleaning agent such as DNA AWAY or RNase AWAY

Section 6

Safety Precautions and Recommendations for Best Results

- This test must be performed by trained personnel
- Samples and enrichment cultures must be handled as potentially infectious material and discarded according to local rules and regulations
- All potentially infectious material should be autoclaved before disposal
 - The quality of results depends on strict compliance with Good Laboratory Practices (for example, the EN ISO 7218 standard), especially concerning PCR:
 - Never circulate laboratory equipment (pipets, tubes, etc.) from one workstation to another
 - Always use a positive control and a negative control for each series of amplification reactions
 - Do not use reagents after their expiration date
 - Vortex reagents from the kit before using them to ensure homogeneity
 - Periodically verify the accuracy and precision of pipets, as well as correct functioning of the instruments
 - Change gloves often, especially if you suspect they are contaminated
 - Clean work spaces periodically with 5% bleach and other decontaminating agents such as DNA AWAY
 - Use powder-free gloves and avoid fingerprints and writing on tube caps. Both will interfere with data acquisition
- It is strongly advised to follow the general requirements described in the standard EN ISO 22174:2024 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food pathogens — General requirements and definitions)
- iQ-Check *E. coli* O157:H7 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

Section 6 Safety Precautions and Recommendations for Best Results

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 or CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Detection System
 - Improper use of the CFX96 Touch or CFX Opus Deep Well Real-Time PCR Detection System may cause personal injury or damage to the instrument. Some components may pose a risk of personal injury due to excessive heat if improperly handled. For safe use, the CFX96 Touch or CFX Opus Deep Well Real-Time PCR Detection System must be operated only by qualified laboratory personnel who have been appropriately trained. Servicing of instrument must be performed only by Bio-Rad Field Service Engineers
- Enrichment
 - The user should read, understand, and follow all safety information in the instructions for the iQ-Check *E. coli* O157:H7 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 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

A. Sample Enrichment

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

The use of an enrichment bag with incorporated filter is highly recommended

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

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

The iQ-Check *E. coli* O157:H7 kit is part of the USDA MLG 5C.02 standard method and can be used following the enrichment indicated in the method.

NF VALIDATION BRD 7/15-06/08		
Scope (Matrices)	Sample Preparation	Enrichment/DNA Extraction
Raw meat (excluding poultry) ^{1,2} (25 g)	Homogenize <i>n</i> g sample in 9 x <i>n</i> ml BPW (25 g in 225 ml)	Easy II extraction <ul style="list-style-type: none"> Incubate 8-16 hr at 41.5 ± 1°C Tube/deep well format
Raw meat (excluding poultry) ^{1,2} (375 g)	Homogenize <i>n</i> g sample in 3 x <i>n</i> ml BPW (375 g in 1,125 ml)	Easy II extraction <ul style="list-style-type: none"> Incubate 10-18 hr at 41.5 ± 1°C Tube/deep well format
AOAC PTM 020801		
Scope (Matrices)	Sample Preparation	Enrichment/DNA Extraction
Raw ground beef, fresh spinach, apple cider (25 g) ¹	Homogenize <i>n</i> g sample in 9 x <i>n</i> ml prewarmed BPW (25 g in 225 ml)	Easy I extraction <ul style="list-style-type: none"> Incubate 8-24 hr at 41.5 ± 1°C Tube/deep well format
Raw ground beef (25 g) ^{1, 2}	Homogenize <i>n</i> g sample in 9 x <i>n</i> ml prewarmed BPW (25 g in 225 ml)	Standard II extraction <ul style="list-style-type: none"> Incubate 8-12 hr at 36 ± 1°C Tube/deep well format
Raw ground beef and raw beef trim ^{1,3} (375 g)	Homogenize <i>n</i> g sample in 3 x <i>n</i> ml prewarmed BPW (375 g in 1,125 ml)	Easy II extraction <ul style="list-style-type: none"> Incubate 8-22 hr at 41.5 ± 1°C Tube/deep well format
Fresh spinach ^{1,3} (375 g)	Homogenize <i>n</i> g sample in 3 x <i>n</i> ml prewarmed BPW (375 g in 1,125 ml)	Easy II extraction <ul style="list-style-type: none"> Incubate 10-22 hr at 41.5 ± 1°C Tube/deep well format
Raw chicken with and without skin, mechanically separated chicken and raw ground pork (25 g) ¹	Homogenize <i>n</i> g sample in 9 x <i>n</i> ml prewarmed BPW (25 g in 225 ml)	Easy II extraction <ul style="list-style-type: none"> Incubate 8-22 hr at 41.5 ± 1°C Tube/deep well format
MicroTally swab ^{1,4}	Homogenize swab in 200 ml prewarmed BPW by stomaching or hand massaging for 30 sec	Easy II extraction <ul style="list-style-type: none"> Incubate 8-22 hr at 41.5 ± 1°C Tube/deep well format

Section 7 Protocol

Environmental surface samples	Homogenize swabs in 10 ml prewarmed BPW by vortexing or shaking vigorously for 10 sec	Easy II extraction <ul style="list-style-type: none">▪ Incubate 8-24 hr at 41.5 ± 1°C▪ Tube/deep well format
	Homogenize sponges in 60-90 ml prewarmed BPWn by stomaching or hand massaging for 30 sec	

¹ Validation also includes the use of the "O157_H7 Fast" Application Protocol File for a reduced PCR run time. Contact your Bio-Rad representative for more information.

² Protocol for simultaneous detection of *Salmonella*.

³ Harmonized protocol with iQ-Check *Salmonella* II and iQ-Check STEC VirX Kits

⁴ Harmonized protocol with iQ-Check STEC VirX Kit

B. Free DNA Removal Treatment

The iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalog #3594970) provides an ideal way to get rid of free DNA (outside the current scope of AOAC and NF validations). Follow Bio-Rad's recommendations in the user guide.

C. DNA Extraction

General recommendations:

1. Turn on the heat block or thermoshaker to preheat before starting the test. Set it to 95–100°C. Keep the lysis reagent in suspension while pipetting by stirring at medium speed on a magnetic stir plate.
2. In general, avoid shaking the enrichment bag and collecting large fragments of food debris. For food samples with a fatty supernatant, collect the sample just below this layer.
3. Open tubes and wells carefully to avoid any possible cross contamination.
4. Cool the deep well plate before pipetting directly through pre-pierced sealing film.
5. Use the magnetic bar to keep the lysis reagent in suspension. Pipet while it is stirring at medium speed.
6. Gently shake the lysis reagent by hand first to resuspend the resin. Then pipet while it is stirring at medium speed with the magnetic bar contained in the bottle, in order to keep it in suspension.
7. Reconstitute the final lysis reagent as follows:
 - a. Carefully pour all the contents from reagent F (lysis beads) into reagent A (lysis reagent).
 - b. Use consumables with a wide enough tip to allow pipetting of the homogenized lysis reagent.
 - c. The lysis reagent mixed with lysis beads (reagents A + F) has a shelf life of 6 months when stored at 4°C.

Standard II Protocol

1. Collect 1 ml of decanted enriched sample into a tube or in a well of a deep well plate. Seal the deep well plate with a plastic film.

Section 7 Protocol

2. Centrifuge tubes at 10,000–12,000 x g for 5 min. Discard the supernatant. Centrifuge deep well plates at 2,250 x g for 20 min and discard supernatant manually or using the DW40.
3. Add 200 µl of homogenized lysis reagent (reagents A + F) to the pellet and resuspend pellet by pipetting the reagent up and down. Close tubes or seal deep well plate with pre-pierced sealing film.

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

4. Place tube in the cell disruptor for 3 ± 1 min, or shake deep well plate in the plate agitator-incubator at 1,300–1,600 rpm at 95–100°C for 15–20 min.
5. Incubate in the appropriate heat block at 95–100°C for 10–15 min.
6. Vortex tubes at high speed and centrifuge at 10,000–12,000 x g for 5 min. Centrifuge deep well plate at 2,250 x g for 2 min.

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

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

Easy I Protocol

1. Aliquot 100 µl of homogenized lysis (reagent A) to tubes or wells of a deep well plate.
2. Add 100 µl of enriched sample. Mix by pipetting up and down and close the tube with caps or seal the deep well plate with pre-pierced sealing film.
3. Incubate in the appropriate heat block at 95–100°C for 10–15 min or in the plate thermoshaker for 15–20 min at 1,300 rpm.
4. Vortex tubes at high speed.
5. If using a deep well plate, allow it to cool to room temperature (20–25°C).
6. Centrifuge tubes at 10,000–12,000 x g for at least 2 min. Centrifugation is not needed for deep well plate.

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

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

Easy II Protocol

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

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

2. Add 100 µl of enriched sample.
3. Mix the solution by pipetting up and down until homogenized.
4. Close the tubes or seal the deep well plate with pre-pierced sealing film.
5. Place tubes in the cell disruptor for 3 ± 1 min. Incubate tubes in the heat block at 95–100°C for 10–15 min.

6. If using the thermoshaker for the tube or deep well format, incubate the tubes or deep well plate in the thermoshaker under agitation at 1,300 rpm at 95–100°C for 15–20 min.
7. Vortex tubes at high speed, and then centrifuge at 10,000–12,000 x g for at least 2 min. Centrifugation is not needed for deep well plate.

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

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

D. Real-Time PCR

Instrument and Software Setup

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

PCR Mix Preparation

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

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

2. Pipet 45 µl of the PCR mix into each well according to your plate setup.
3. Add 5 µl of sample, reagent D (negative control), or reagent E (positive control). Do not vortex the sample before pipetting. Hermetically seal the wells of the plate or strips. It is important to avoid bubbles at the bottom of the wells by pipetting carefully. As an optional step, centrifuge the sealed PCR plate or tube strips (quick spin) to eliminate any bubbles.
4. Place the 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 or CFX Maestro IDE Software User Manual for opening data files and setting the data analysis parameters.

Interpreting Results

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

CFX Manager IDE Software or CFX Maestro IDE Software allows complete automated analysis for Bio-Rad real-time PCR detection systems. Verification of the typical characteristics of the

Section 7 Protocol

amplification curves should be performed prior to releasing results. Contact your local Bio-Rad technical support team for additional support.

Controls

Verify the positive and negative controls before interpreting sample results.

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

	<i>E. coli</i> O157:H7 Detection (FAM channel)	Internal Control Detection (HEX channel)
Negative control	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Positive control	$26 \leq Cq \leq 36$	NA

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

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

Samples

A **positive** iQ-Check *E. coli* O157:H7 PCR test must show a typical amplification curve and a Cq value ≥ 10 for the FAM fluorophore.

- If the Cq value for both channels is below 10, verify 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 *E. coli* O157:H7 sample

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

- If there is no Cq value for FAM and the internal control has a Cq ≥ 28 , this sample is considered as a **negative** *E. coli* O157:H7 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

Section 8 Confirmation of Positive Results

Interpretation of sample results is summarized in the following table:

<i>E. coli</i> O157:H7 Detection (FAM)	Internal Control Detection (HEX channel)	Interpretation
Cq \geq 10	NA	Positive.
Cq = N/A	Cq > 28	Negative
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition*

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

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

Section 8

Confirmation of Positive Results

In the context of the NF VALIDATION certified method, all positive iQ-Check *E. coli* O157:H7 results must be confirmed in the following ways:

1. Using classic tests described in the standardized methods CEN or ISO by going back to the sample.
2. Using one of the following two methods, starting from the BPW enrichment:
 - a. Isolation on CT-SMAC agar (with or without an immunoseparation step first), followed by isolation of colonies on nonselective agar, then O157 and H7 latex tests on 1–3 characteristic colonies.
 - b. Isolation on RAPID *E. coli* O157:H7 chromogenic medium, with an immunoseparation step first, followed by isolation of colonies on nonselective agar, then O157 and H7 latex tests 1–3 on characteristic colonies. Refer to the confirmation method in the RAPID *E. coli* O157:H7 chromogenic media user guide

In the case of discrepant results between the iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit and one of the confirmation options listed above (particularly by latex tests), follow the necessary steps to ensure valid results, for example, adding an immunoseparation step and then isolating on CT-SMAC or RAPID *E. coli* O157:H7 agar.

In the context of the AOAC PTM validated method, a positive iQ-Check *E. coli* O157:H7 result is presumed to be positive, and confirmation according to an appropriate reference method (for example, USDA MLG or FDA BAM) is recommended.

Section 9

Confirmation of Single Colonies Using iQ-Check Kit

The iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit may also be used for confirming single isolated *E. coli* O157:H7 colonies on agar plates.

1. Pick an isolated colony from a selective or nonselective agar plate with a toothpick, sterile loop, or other adapted consumable (for example, a pipet tip).
2. Resuspend the colony in 100 µl tryptone salt or distilled sterile water in a microcentrifuge tube. Homogenize using a vortexer.
3. Use 5 µl of the suspension with 45 µl of PCR mix (see D. Real-Time PCR in Section 7 Protocol) and follow the rest of the iQ-Check *E. coli* O157:H7 protocol for the data and results interpretation.

Note that colony confirmation can be performed in accordance with the protocol described in the USDA MLG 5C.00 method.

Section 10

Test Performance and Validations



BRD 07/15 – 06/08

ALTERNATIVE
ANALYTICAL METHODS
FOR AGRIBUSINESS

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

iQ-Check *E. coli* O157:H7 (Easy II Protocol) is certified NF VALIDATION as an alternative method to the reference method ISO 16654 (July 2001) and its amendment A1 (June 2017), for the detection of *E. coli* O157:H7 in raw meat (excluding poultry meats) in 25 and 375 g samples. The validation followed the protocol of the NF EN ISO 16140-2:2016 standard, and includes the use of the CFX96, CFX96 Deep Well and CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Systems. The associated software program is CFX Manager Software IDE (V2.2 and later) or CFX Maestro Software IDE (version 4.0 and later) and the O157_H7 Fast APF. Certificate number: BRD 07/15-06/08. Valid until: For more information about the end of validity of the NF VALIDATION certification, please refer to the certificate available on the website

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



iQ-Check *E. coli* O157:H7 has been validated by the AOAC-Research Institute under the Performance Tested Method Program for detection of *E. coli* O157:H7 from raw ground beef (25 and 375 g), raw beef trim (375 g), raw boneless chicken breast without skin (25 g), raw chicken thigh with skin (25 g), mechanically separated chicken (25 g), raw ground pork (25 g), fresh spinach (25 and 375 g), apple cider (25 ml) and MicroTally swabs (4" x 4" surface area). Standard Protocol II has also been validated by AOAC-RI for the simultaneous detection of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in raw ground beef. A positive result with iQ-Check should be considered presumptive and it is recommended that it be confirmed by standard reference methods. Certificate number 020801.

Section 11

References

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

ISO 16654. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *E. coli* O157.

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

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2015). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 5.09: Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2021). Microbiology Laboratory Guidebook –Chapter 5C.02. Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2020). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4a. Diarrheagenic *Escherichia coli*.

Section 12

Revision History

Release date	Document number	Change
May 2020	10000131517 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Renewal and extension of AFNOR validation for: 25 and 375 g meat samples and "O157_H7 Fast" APF - AOAC extension - New document design and updated references, content, USDA reference method, and colony confirmation - Document number change – previous version 808473 REV D
December 2022	10000131517 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Added new catalog numbers for consumables - Replaced protocol section with summary table - AFNOR extension: CFX Opus Deepwell Real-Time PCR System and upgrade to CFX Manager Software IDE version 3.1 - Clarification of result interpretation protocol - General content updates
March 2024	10000131517 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - AOAC extension: MicroTally swabs - Clarification of extraction protocol
April 2025	10000131517 Ver D	<ul style="list-style-type: none"> - Validation extension for CFX Maestro IDE Software version 4.0

Appendix — PCR Mix Calculation Guide

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

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

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

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

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

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



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit

Guide d'utilisation

Test pour la détection par PCR en temps réel d'*Escherichia coli* O157:H7 dans les échantillons alimentaires et environnementaux

Référence — N° 3578114

BIO-RAD

Sommaire

Section 1.	Introduction	1
Section 2.	Technologie iQ-Check <i>E. coli</i> O157:H7	1
Section 3.	Composants du kit	2
Section 4.	Durée de conservation et stockage.....	2
Section 5.	Matériel requis non fourni.....	2
	Matériel.....	2
	Produits	3
Section 6.	Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux	4
Section 7.	Protocole	6
	Enrichissement de l'échantillon	6
	Traitement de l'ADN libre.....	8
	Extraction de l'ADN	8
	PCR en temps réel.....	10
	Analyse des données.....	10
Section 8.	Confirmation des résultats positifs.....	12
Section 9.	Confirmation de colonies isolées à l'aide du kit iQ-Check	13
Section 10.	Performance du test et validations.....	13
Section 11.	Références	14
Section 12.	Historique des révisions	14
	Annexe — Guide de calcul du mélange de PCR	15

Section 1

Introduction

Les méthodes traditionnelles de détection bactériologique sont souvent chronophages et fastidieuses. En comparaison, la méthode iQ-Check *Escherichia coli* O157:H7 constitue un test qualitatif rapide et simple permettant la détection de séquences d'ADN spécifiques d'*E. coli* O157:H7 dans les échantillons alimentaires et environnementaux. Grâce à la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel, la séquence d'ADN spécifique d'*E. coli* O157:H7 est amplifiée et détectée simultanément au moyen d'une sonde fluorescente. Il est possible de traiter jusqu'à 94 échantillons, avec un risque minimum de contamination et une procédure d'utilisation simple. Ce kit est destiné au personnel de laboratoire qualifié, qui réalise des tests de détection d'*E. coli* O157:H7. La mise en œuvre de ce test permet l'obtention de résultats en quelques heures après l'enrichissement d'un échantillon.

Section 2

Technologie iQ-Check *E. coli* O157:H7

Le kit iQ-Check *E. coli* O157:H7 est un test basé sur l'amplification et la détection des gènes par PCR en temps réel. Les réactifs de PCR prêts à l'emploi contiennent des oligonucléotides (amorces et sondes) spécifiques d'*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 CFX96 Touch Deep Well System ou le CFX Opus Deepwell System.

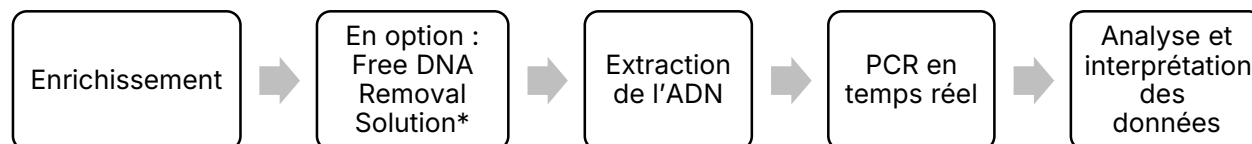
La PCR (amplification en chaîne par polymérase) est une technique puissante utilisée pour générer de nombreuses copies d'ADN cible. Durant la PCR, la succession de cycles de chauffage et de refroidissement permet une dénaturation de l'ADN, suivie par une hybridation des amorces à la région cible puis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

Au cours de la PCR en temps réel, des sondes spécifiques détectent l'ADN en s'hybridant avec les amplicons. Ces sondes sont liées à un fluorophore qui produit une fluorescence uniquement lors d'une hybridation avec la séquence cible. FAM est le fluorophore lié à la sonde qui s'hybride à la séquence d'ADN propre à *E. coli* O157:H7. En l'absence d'ADN cible, aucune fluorescence ne sera détectée. Étant donné que le nombre d'amplicons augmente avec chaque cycle d'amplification, l'intensité de la fluorescence augmente également. Le module optique mesure cette fluorescence à l'étape d'hybridation pour chaque cycle de PCR tandis que le logiciel associé enregistre l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles.

Le mélange réactif du kit comprend un contrôle interne d'ADN synthétique. Ce contrôle est amplifié avec une sonde spécifique en même temps que la séquence d'ADN cible d'*E. coli* O157:H7 et détecté par un second fluorophore.

Section 3 Composants du kit

Ce test permet la détection qualitative d'*E. coli* O157:H7 dans les échantillons alimentaires et environnementaux sélectifs préalablement enrichis par culture. Il comprend les étapes principales suivantes :



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

Section 3

Composants du kit

Le kit iQ-Check *E. coli* O157:H7 contient suffisamment de réactifs pour 96 tests (94 échantillons).

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

Section 4

Durée de conservation et stockage

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

Section 5

Matériel requis non fourni

Matériel

- Stomacher pour homogénéiser les échantillons de test
- Incubateur pour l'enrichissement microbiologique des échantillons

Section 5 Matériel requis non fourni

- Matériel spécifique pour extraction en tubes coniques à bouchon fileté 1,5 ml stériles :
 - Centrifugeuse de paillasse 10 000–12 000 x g
 - Bloc de chauffage à sec à 37 ± 2 °C et/ou 95–100 °C
- Matériel spécifique pour extraction en plaque Deep Well :
 - Agitateur-incubateur* capable de maintenir une température de 37 ± 2 °C et/ou 95–100 °C, avec une vitesse de mélange d'au moins 1 300 rpm
- Agitateur-mélangeur vortex
- Plaque d'agitation magnétique
- Micropipettes de 20, 200 et 1 000 µl
- Embouts pour pipettes à répétition ; stériles, emballés individuellement
- Système de PCR en temps réel de Bio-Rad*, par exemple CFX96 Touch Deep Well System (n° de référence 3600037) ou CFX Opus Deepwell System (n° de référence 17007991)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System pour l'extraction automatisée d'ADN et la préparation des plaques de PCR (n° de référence 3594911)

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

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

Produits

- Milieu d'enrichissement : eau peptonée tamponnée (EPT) (par exemple, BPW Plus n° de référence 3564684, base déshydratée, 500 g ; 3554179, 225 ml x 6 flacons ; n° de référence 3555789, 2,3 L x 5 poches ; 3555790, 5 L x 2 poches. BPW Standard, n° de référence 12013259, base déshydratée, 500 g ; n° de référence 12013258, base déshydratée, 5 kg ; 12013260 5 L x 2 poches)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (n° de référence 3594970)
- STEC Supplement (n° de référence 3564005)
- iQ-Check Purification Reagent (n° de référence 12012383)
- Produits spécifiques pour les échantillons environnementaux
 - Éponges d'échantillonnage environnemental
 - Écouvillons d'échantillonnage environnemental
 - Bouillon neutralisant pour éponges et écouvillons, par exemple, Dey-Engley (D/E), HiCap ou Letheen
- Produits spécifiques pour extraction en tubes
 - Tubes coniques à bouchon fileté 1,5 ml, stériles (n° de référence 17010678)
- Produits spécifiques pour extraction en plaque Deep Well
 - Plaque Deep Well, 96 puits (iQ-Check Deep Well Microplates, n° de référence 3594900)

Section 6 Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux

- Film à sceller en plastique (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, n° de référence 3590139)
- Film à sceller pour plaque PCR (X-Pierce Films, n° de référence 3593977, Pre-Pierced Plate Sealing Film, n° de référence 3600040, Amérique du Nord uniquement)
- Produits spécifiques pour iQ-Check Prep System :
 - Récipient de dilution 60 ml (n° de référence 3594904)
 - Embouts à filtre (n° de référence 3594902 ou 12014486, 50 µl x 5 760 ; n° de référence 3594903 ou 12014483, 1 000 µl x 3 840)
 - Tubes de mélange de PCR (n° de référence 12016673, 5 ml x 25)
- 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 2 et 5 ml
- RAPID'*E.coli* O157:H7 Agar (n° de référence 3564748, 100 g) supplémentée avec novobiocine et tellurite de potassium (utilisable en dehors du champ de validation AOAC)
- Pour les confirmations : Gélose CT-SMAC, plus test latex O157 et H7
- Gants non poudrés
- Eau distillée stérile
- Eau de Javel, 5 %
- Agent nettoyant tel que DNA AWAY ou RNase AWAY

Section 6

Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux

- Ce test doit être réalisé par du personnel formé.
- Les échantillons et cultures d'enrichissement doivent être manipulés en tant que substances potentiellement infectieuses et éliminés conformément aux règles et réglementations locales.
- Tous les matériels potentiellement infectieux doivent être soumis à l'autoclave avant élimination.
 - La qualité des résultats dépend du respect strict des bonnes pratiques de laboratoire (par exemple, la norme EN ISO 7218), particulièrement en ce qui concerne la PCR :
 - Ne jamais transférer du matériel de laboratoire (pipettes, tubes, etc.) d'un poste de travail à un autre.
 - Toujours utiliser un contrôle positif et un contrôle négatif pour chaque série de réactions d'amplification.

Section 6 Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux

- Ne pas utiliser les réactifs après leur date d'expiration.
 - Vortexer les réactifs du kit avant de les utiliser afin d'assurer leur homogénéité.
 - Vérifier périodiquement l'exactitude et la précision des pipettes, ainsi que le fonctionnement correct des instruments.
 - Changer de gants fréquemment, surtout si une contamination est suspectée.
 - Nettoyer les postes de travail périodiquement avec de l'eau de Javel à 5 % et d'autres agents de décontamination tels que DNA AWAY.
 - Utiliser des gants non poudrés et éviter les empreintes digitales et l'écriture sur les bouchons des tubes. En effet, l'acquisition des données peut en être affectée.
- Il est fortement recommandé de respecter les exigences générales décrites dans la norme EN ISO 22174:2024 (Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences générales et définitions).
 - iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit
 - Tous les mélanges ou substances du kit de test sont des produits classés conformément au Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). Tout contact avec des acides peut entraîner la libération de gaz toxiques. Aucune précaution particulière n'est nécessaire si le kit est utilisé correctement. Si les produits sont inhalés, apporter de l'air frais et consulter un médecin en cas de troubles. En cas de contact avec les yeux, rincer l'œil ouvert pendant plusieurs minutes sous l'eau courante. Si les produits sont ingérés, provoquer le vomissement et appeler les secours médicaux.
 - iQ-Check Prep System
 - Une utilisation incorrecte d'iQ-Check Prep System peut causer des blessures corporelles ou endommager l'instrument. En cas de manipulation incorrecte, certains composants peuvent entraîner un risque de blessures corporelles causées par une chaleur excessive. Pour une utilisation en toute sécurité, iQ-Check Prep System doit être uniquement manipulé par du personnel de laboratoire qualifié et ayant reçu une formation adéquate. La maintenance de l'instrument doit être réalisée uniquement par des techniciens de maintenance de Bio-Rad.
 - Système de détection par PCR en temps réel CFX96 Touch Deep Well System or CFX Opus Deepwell
 - Une utilisation incorrecte du système de détection par PCR en temps réel CFX96 Touch Deep Well Real-Time System peut causer des blessures corporelles ou endommager l'instrument. En cas de manipulation incorrecte, certains composants peuvent entraîner un risque de blessures corporelles causées par une chaleur excessive. Pour une utilisation en toute sécurité, le système de détection par PCR en temps réel CFX96 Touch System ou CFX Opus Deep Well System doit être uniquement manipulé par du personnel de laboratoire qualifié et ayant reçu une formation adéquate. La maintenance de l'instrument doit être réalisée uniquement par des techniciens de maintenance de Bio-Rad.

Section 7 Protocole

▪ Enrichissement

- L'utilisateur doit lire, comprendre et suivre toutes les informations relatives à la sécurité dans les instructions du kit iQ-Check *E. coli* O157:H7. Conserver les instructions relatives à la sécurité pour référence ultérieure. Afin de réduire les risques associés à l'exposition aux produits chimiques et biologiques, réaliser les analyses d'agents pathogènes dans un laboratoire convenablement équipé, sous le contrôle d'un personnel qualifié. Toujours suivre les pratiques standard en matière de sécurité en laboratoire, notamment porter des vêtements et lunettes/masque de protection appropriés pour manipuler les réactifs et échantillons contaminés. Éviter tout contact avec le contenu du milieu d'enrichissement et des tubes de réactif après amplification. Éliminer les échantillons enrichis conformément aux normes actuelles de l'industrie.
- 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. Respecter toutes les réglementations locales, étatiques/provinciales et/ou nationales applicables à l'élimination des déchets biologiques. Porter un équipement de protection approprié, ce qui comprend, sans s'y limiter : lunettes ou masque de protection, écran facial, vêtements de protection/blouse de laboratoire et gants. Tout travail doit être effectué dans des installations convenablement équipées, à l'aide des équipements de sécurité appropriés (par exemple, dispositifs de confinement physique). Le personnel doit être formé conformément aux exigences réglementaires et aux exigences de l'entreprise/de l'institution avant de travailler avec des substances potentiellement infectieuses.
- Une fois l'analyse terminée, l'ensemble du matériel et les milieux de culture pouvant contenir des agents pathogènes doivent être décontaminés conformément aux normes actuelles de l'industrie pour l'élimination des déchets contaminés (c'est-à-dire, avec un passage à l'autoclave de 20 min à 120 °C). Consulter la fiche de données de sécurité pour obtenir des informations supplémentaires ainsi que les réglementations locales relatives à l'élimination.

Section 7

Protocole

A. Enrichissement de l'échantillon

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

L'utilisation d'une poche d'enrichissement à filtre incorporé est fortement recommandée

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

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

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit fait partie de la méthode normalisée USDA MLG 5C.00 et peut être utilisé à la suite de l'enrichissement indiqué dans celle-ci.

Section 7 Protocole

NF VALIDATION BRD 7/15-06/08		
Domaine (matrices)	Préparation des échantillons	Enrichissement/Extraction de l'ADN
Viande crue (à l'exclusion de la volaille) ^{1,2} (25 g)	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon dans 9 x <i>n</i> ml d'EPT (25 g dans 225 ml)	Extraction Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 8–16 hr à 41,5 ± 1 °C Format tube/Deep Well
Viande crue (à l'exclusion de la volaille) ^{1,2} (375 g)	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon dans 3 x <i>n</i> ml d'EPT (375 g dans 1 125 ml)	Extraction Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 10–18 hr à 41,5 ± 1 °C Format tube/Deep Well
AOAC PTM 020801		
Domaine (matrices)	Préparation des échantillons	Enrichissement/Extraction de l'ADN
Bœuf cru haché, épinards frais, cidre (25 g)	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml d'EPT préchauffée (25 g dans 225 ml)	Extraction Easy I <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 8–24 hr à 41,5 ± 1 °C Format tube/Deep Well
Bœuf cru haché ² (25 g)	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon dans 9 x <i>n</i> ml d'EPT préchauffée (25 g dans 225 ml)	Extraction Standard II <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 8–12 hr à 36 ± 1 °C Format tube/Deep Well
Bœuf cru haché et bœuf cru en morceaux ^{1,3} (375 g)	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon dans 3 x <i>n</i> ml d'EPT préchauffée (375 g dans 1 125 ml)	Extraction Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 8–22 hr à 41,5 ± 1 °C Format tube/Deep Well
Épinards frais ^{1,3} (375 g)	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon dans 3 x <i>n</i> ml d'EPT préchauffée (375 g dans 1 125 ml)	Extraction Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 10–22 hr à 41,5 ± 1 °C Format tube/Deep Well
Poulet cru avec et sans peau, poulet séparé mécaniquement et porc cru haché (25 g)	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon dans 9 x <i>n</i> ml d'EPT préchauffée (25 g dans 225 ml)	Extraction Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 8–22 hr à 41,5 ± 1 °C Format tube/Deep Well
Tampon d'échantillonnage MicroTally ^{1,4}	Homogénéiser le tampon d'échantillonnage dans 200 ml de BPW préchauffée avec un homogénéisateur Stomacher ou à la main pendant 30 sec	Extraction Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 8–22 hr à 41,5 ± 1 °C Format tube/Deep Well
Échantillons de surface environnementale	Homogénéiser le tampon d'échantillonnage dans 10 ml d'EPT préchauffée.	Extraction Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 8–24 hr à 41,5 ± 1 °C Format tube/Deep Well
	Homogénéiser le tampon d'échantillonnage dans 60–90 ml d'EPT préchauffée.	

¹ La validation inclut également l'utilisation du fichier de protocole d'application « O157_H7 Fast » pour un temps d'exécution PCR réduit. Contacter le représentant Bio-Rad pour obtenir davantage d'informations.

² Protocole pour la détection simultanée de *Salmonella*.

³ Protocole harmonisé avec les kits iQ-Check *Salmonella* II Kit et iQ-Check STEC VirX Kit

B. Traitement de l'ADN libre

iQ-Check Free DNA Removal Solution (n° de référence 3594970) est un moyen idéal d'éliminer l'ADN libre (en dehors du champ actuel des validations AOAC et NF). Suivre les recommandations de Bio-Rad dans le guide d'utilisation.

C. Extraction de l'ADN

Recommandations générales :

1. Allumer le bloc de chauffage ou l'agitateur thermique afin de préchauffer avant de commencer le test. Le régler sur 95–100 °C. Garder le réactif de lyse en suspension pendant le pipettage en mélangeant à vitesse moyenne sur une plaque d'agitation magnétique.
2. De façon générale, éviter d'agiter la poche d'enrichissement et de prélever de gros fragments d'aliments. Pour les échantillons alimentaires présentant une couche grasse surnageante, prélever juste en dessous de cette couche.
3. Ouvrir les tubes et les puits avec précaution pour éviter les risques de contamination croisée.
4. Refroidir la plaque Deep Well avant de pipetter directement à travers le film préperforé.
5. Utiliser le barreau magnétique afin de maintenir le réactif de lyse en suspension. Pipetter en mélangeant à vitesse moyenne.
6. Dans un premier temps, agiter délicatement le réactif de lyse à la main pour remettre la résine en suspension. Garder le réactif de lyse en suspension pendant le pipettage en mélangeant à vitesse moyenne avec le barreau magnétique contenu dans le flacon.
7. Reconstituer le réactif de lyse final de la façon suivante :
 - a. Verser soigneusement tout le contenu du réactif F (billes de lyse) dans le réactif A (réactif de lyse).
 - b. Utiliser des consommables adaptés, avec un embout à large ouverture, pour permettre le pipettage du réactif de lyse homogénéisé.
 - c. Le réactif de lyse mélangé aux billes de lyse (réactifs A + F) présente une durée de conservation de 6 mois pour un stockage à 4 °C.

Protocole Standard II

1. Prélever 1 ml d'échantillon enrichi décanté dans un tube ou dans un puits de plaque Deep Well. Sceller la plaque Deep Well avec un film plastique.

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

2. Centrifuger les tubes à 10 000–12 000 x g pendant 5 min. Éliminer le surnageant. Centrifuger les plaques Deep Well à 2 250 x g pendant 20 min et éliminer le surnageant manuellement ou à l'aide du DW40.
3. Ajouter 200 µl du réactif de lyse homogénéisé (réactifs A + F) au culot obtenu et mélanger par aspiration/refoulement avec la pipette. Fermer les tubes ou sceller la plaque Deep Well avec un film préperforé.

Section 7 Protocole

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

4. Placer les tubes dans le Cell disruptor pendant 3 ± 1 min ou la plaque Deep Well dans l'agitateur-incubateur à 1 300–1 600 rpm et 95–100 °C pendant 15–20 min.
5. Incuber dans le bloc de chauffage à 95–100 °C pendant 10–15 min.
6. Vortexer les tubes à grande vitesse et centrifuger à 10 000–12 000 x g pendant 5 min. Centrifuger la plaque Deep Well à 2 250 x g pendant 2 min.

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

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

Protocole Easy I

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

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

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

Protocole Easy II

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

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

2. Ajouter 100 µl d'échantillon enrichi.

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

3. Mélanger la solution par aspiration/refoulement avec la pipette jusqu'à homogénéisation.
4. Fermer les tubes ou sceller la plaque Deep Well avec un film préperforé.
5. Placer les tubes dans le Cell disruptor pendant 3 ± 1 min. Incuber les tubes dans le bloc de chauffage à 95–100 °C pendant 10–15 min.

Section 7 Protocole

6. Si vous utilisez un agitateur/incubateur pour les tubes ou les plaques Deep Well, incubez les tubes ou les plaques Deep Well en agitant à une vitesse de 1 300 rpm à 95–100 °C pendant 15–20 min.
7. Vortexer les tubes à grande vitesse et centrifuger à 10 000–12 000 x g pendant au moins 2 min. La centrifugation est inutile pour les plaques Deep Well.

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

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

D. PCR en temps réel

Configuration de l'instrument et du logiciel

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

Préparation du mélange de PCR

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

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

2. Pipetter 45 µl de ce mélange de PCR dans chaque puits en fonction de la plaque préparée.
3. Ajouter 5 µl d'échantillon, de réactif D (contrôle négatif) ou de réactif E (contrôle positif). Ne pas vortexer l'échantillon avant le pipettage. Sceller hermétiquement les puits de la plaque ou les bandes de tubes. Pipetter avec précaution afin d'éviter la formation de bulles au fond des puits. Étape facultative : centrifuger la plaque de PCR scellée ou les bandes de tubes (rotation rapide) afin d'éliminer les bulles éventuelles.
4. Placer la plaque 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 du logiciel CFX Manager IDE ou CFX Maestro 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 de chaque échantillon (le cycle auquel la courbe d'amplification dépasse le seuil).

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

Contrôles

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

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

	Détection d' <i>E. coli</i> O157:H7 (canal FAM)	Détection de contrôle interne (canal HEX)
Contrôle négatif	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Contrôle positif	$26 \leq Cq \leq 36$	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 dépasse pas le seuil.

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

Échantillons

Un test PCR iQ-Check *E. coli* O157:H7 **positif** doit présenter une courbe d'amplification typique et une valeur Cq ≥ 10 pour le fluorophore FAM.

- Si la valeur Cq des deux canaux est inférieure à 10, vérifier que la courbe, en tant que données brutes, montre un aspect caractéristique d'amplification exponentielle (une ligne de départ plane, avec une augmentation rapide de la fluorescence, puis une stabilisation). Si la courbe semble correcte, l'échantillon peut être considéré comme positif pour la présence d'*E. coli* O157:H7.

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

- Si aucune valeur Cq n'est obtenue pour FAM et si le contrôle interne présente une valeur Cq ≥ 28 , l'échantillon est considéré **négatif** pour *E. coli* O157:H7.
- Un contrôle interne qui n'a pas non plus de valeur Cq (Cq = N/A) indique probablement un phénomène d'inhibition de la réaction de PCR. Diluer l'échantillon (réaliser une dilution à 1:10 dans de l'eau distillée stérile avec 10 µl d'extrait d'ADN), utiliser 5 µl de la dilution pour l'amplification et répéter le test de PCR.
- Si la valeur Cq pour le contrôle interne est < 28 , il n'est pas possible d'interpréter le résultat. Vérifier que le seuil a été placé correctement ou que la courbe de données brutes est une

Section 8 Confirmation des résultats positifs

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 d' <i>E. coli</i> O157:H7 (FAM)	Détection de contrôle interne (canal HEX)	Interprétation
Cq \geq 10	NA	Positif
Cq = N/A	Cq > 28	Négatif
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition*

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

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

Section 8

Confirmation des résultats positifs

Dans le contexte de la méthode certifiée NF VALIDATION, tous les résultats iQ-Check *E. coli* O157:H7 positifs doivent être confirmés de l'une des façons suivantes :

1. Mise en œuvre des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées CEN ou ISO, à partir de l'échantillon.
2. Mise en œuvre de l'une des deux méthodes suivantes, à partir de l'enrichissement à l'EPT :
 - a. Isolement sur gélose CT-SMAC (avec ou sans étape d'immunoséparation préalable), suivi d'un isolement des colonies sur gélose non sélective, puis tests au latex O157 et H7 sur 1 à 3 colonies caractéristiques.
 - b. Isolement sur milieu chromogène RAPID'*E. coli* O157:H7, avec une étape d'immunoséparation préalable, suivi d'un isolement des colonies sur gélose non sélective, puis tests au latex O157 et H7 sur 1 à 3 colonies caractéristiques. Se reporter à la méthode de confirmation décrites dans le guide d'utilisation du milieu chromogène RAPID'*E. coli* O157:H7

En cas de résultats discordants entre le kit iQ-Check *E. coli* O157:H7 et l'une des options de confirmation énumérées ci-dessus (particulièrement avec les tests au latex), mettre en œuvre les étapes nécessaires pour garantir la validité du résultat, par exemple en ajoutant une étape d'immunoséparation puis en procédant à un isolement sur gélose CT-SMAC ou RAPID'*E. coli* O157:H7.

Dans le contexte de la méthode validée AOAC PTM, un résultat iQ-Check *E. coli* O157:H7 est supposé être positif et une confirmation selon une méthode de référence appropriée (par exemple, USDA MLG ou FDA BAM) est recommandée.

Section 9

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

Le kit iQ-Check *E. coli* O157:H7 peut également être utilisé pour confirmer des colonies isolées d'*E. coli* O157:H7 sur milieux de culture gélosés.

1. Choisir une colonie isolée sur un milieu de culture gélosé sélectif ou non sélectif, avec un cure-dent, une anse stérile ou un autre consommable adapté (par exemple, un embout de pipette).
2. Remettre en suspension la colonie dans 100 µl de tryptone-sel ou d'eau distillée stérile dans un microtube à centrifuger. Vortexer pour homogénéiser.
3. Utiliser 5 µl de la suspension avec 45 µl de mélange de PCR (voir D. PCR en temps réel, Section 7 Protocole) et suivre le reste du protocole iQ-Check *E. coli* O157:H7 pour l'interprétation des données et des résultats.

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

Section 10

Performance du test et validations



BRD 07/15-06/08

MÉTHODES ANALYTIQUES
ALTERNATIVES POUR LE
SECTEUR AGROALIMENTAIRE

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

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit (protocole Easy II) est certifié NF VALIDATION comme méthode alternative à la méthode de référence ISO 16654 (juillet 2001) et son amendement A1 (juin 2017) pour la détection d'*E. coli* O157:H7 dans les échantillons de 25 g et 375 g de viande crue (à l'exception de la volaille). La validation respecte le protocole de la norme ISO 16140-2:2016, et inclut l'utilisation des systèmes PCR en temps réel CFX96 System, CFX96 Deep Well System et CFX Opus Deepwell System. Le programme logiciel associé est CFX Manager Software IDE (version 2.2 et ultérieure) ou CFX Maestro IDE (version 4.0 et ultérieure) et le fichier de protocole d'application « O157_H7 Fast ». Numéro de certificat : BRD 07/15-06/08. Fin de validité : se reporter au certificat disponible sur le site Web <http://nf-validation.afnor.org/en>.



iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit est validé par AOAC Research Institute dans le cadre du programme « Performance Tested Methods » pour la détection d'*E. coli* O157:H7 dans les éléments suivants : bœuf cru haché (25 et 375 g), bœuf cru en morceaux (375 g), poitrine de poulet cru désossée et sans peau (25 g), cuisse de poulet cru avec peau (25 g), poulet séparé mécaniquement (25 g), porc cru haché (25 g), épinards frais (25 et 375 g) et cidre (25 ml). Le protocole Standard II a également été validé par AOAC-RI pour la détection simultanée d'*E. coli* O157:H7 et *Salmonella* spp. dans le bœuf cru haché. Il convient de considérer un résultat positif avec iQ-Check comme étant présumé et il est recommandé de le confirmer grâce aux méthodes de référence normalisées. Numéro de certificat 020801.

Section 11

Références

ISO 7218:2024. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Exigences générales et recommandations pour les analyses microbiologiques.

ISO 16654 Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche des *E. coli* O157.

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

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2015). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 5.09: Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2021). Microbiology Laboratory Guidebook –Chapter 5C.02. Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2020). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4a. Diarrheagenic *Escherichia coli*.

Section 12

Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Mai 2020	10000131517 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Renouvellement et extension de la validation AFNOR pour : <ul style="list-style-type: none"> - échantillons de viande 25 g et 375 g - fichier de protocole d'application « O157_H7 Fast » - Extension AOAC - Nouvelle conception de document et mises à jour (références, contenu, méthode de référence USDA, confirmation de colonie) - Modification du numéro de document (version précédente 808473 REV D)
Décembre 2022	10000131517 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Ajout de nouvelles références pour les consommables - Remplacement de la section protocole avec un tableau récapitulatif - Extension AFNOR : Système de PCR en temps réel CFX Opus Deepwell et mise à niveau vers CFX Manager Software IDE version 3.1 - Clarification du protocole d'interprétation des résultats - Mises à jour générales du contenu
Mars 2024	10000131517 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - Extension AOAC : tampons d'échantillonnage MicroTally - Clarification du protocole d'extraction
Avril 2025	10000131517 Ver D	<ul style="list-style-type: none"> - Extension de la validation pour le logiciel CFX Maestro IDE version 4.0

Annexe — Guide de calcul du mélange de PCR

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

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

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

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

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

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

BIO-RAD

**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit

Anwenderhandbuch

Test zum Nachweis von *Escherichia coli* O157:H7 in Lebensmittel- und Umgebungsproben durch die Real-Time PCR

Katalog-Nr. 3578114



Inhaltsverzeichnis

Abschnitt 1.	Einleitung	1
Abschnitt 2.	Die iQ-Check <i>E. coli</i> O157:H7-Technologie	1
Abschnitt 3.	Zusammensetzung des Kits	2
Abschnitt 4.	Haltbarkeit und Lagerung	2
Abschnitt 5.	Zusätzlich benötigtes Material	2
	Geräte	2
	Zubehör.....	3
Abschnitt 6.	Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse	4
Abschnitt 7.	Protokoll.....	6
	Probenanreicherung	6
	Behandlung zur Entfernung freier DANN.....	7
	DNA-Extraktion	7
	Real-Time PCR.....	10
	Datenanalyse	10
Abschnitt 8.	Bestätigung positiver Ergebnisse.....	12
Abschnitt 9.	Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit	12
Abschnitt 10.	Testleistung und Testvalidierungen.....	13
Abschnitt 11.	Literatur.....	13
Abschnitt 12.	Revisionshistorie.....	14
	Anhang — Pipettiertabelle für das PCR-Reaktionsgemisch.....	15

Abschnitt 1

Einleitung

Herkömmliche bakteriologische Nachweismethoden sind oft langwierig und aufwändig. Bei dem iQ-Check *Escherichia coli* O157:H7 Kit handelt es sich dagegen um einen einfachen und schnellen qualitativen Test zum Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen von *E. coli* O157:H7 in Lebensmittelerzeugnissen und Umgebungsproben. Mithilfe der Real-Time Polymerasekettenreaktion (PCR) werden *E. coli* O157:H7 spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert und gleichzeitig durch fluoreszierende Sonden nachgewiesen. In einem einfach durchzuführenden Verfahren können bei minimalem Kontaminationsrisiko bis zu 94 Proben bearbeitet werden. Die Anwenderzielgruppe ist geschultes Laborpersonal, das Tests zum Nachweis von *E. coli* O157:H7 durchführt. Mit diesem Test können Ergebnisse innerhalb weniger Stunden nach Anreicherung einer Probe erhalten werden.

Abschnitt 2

Die iQ-Check *E. coli* O157:H7-Technologie

Das iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit ist ein Test, der auf der Amplifizierung und dem Nachweis von Genen mittels Real-Time PCR beruht. Die gebrauchsfertigen PCR-Reagenzien enthalten *E. coli* O157:H7 spezifische Oligonukleotide (Primer und Sonden) sowie DNA-Polymerase und Nukleotide. Der Nachweis und die Datenanalyse sind für die Verwendung eines Real-Time PCR Gerätes von Bio-Rad, z. B. des CFX96 Touch Deep Well oder CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Nachweissystems, optimiert.

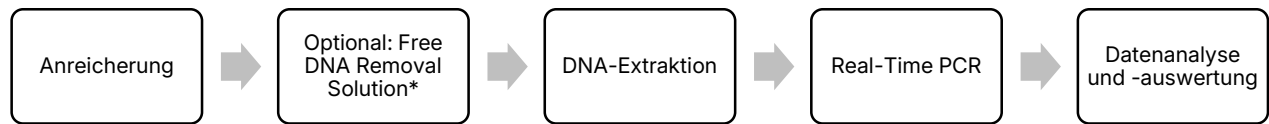
Die PCR ist eine leistungsstarke Technik, mit der viele Kopien der Ziel-DNA erzeugt werden können. Während der PCR-Reaktion wird die DNA während mehrerer Zyklen des Erhitzens und Abkühlens denaturiert. Danach binden Primer an die Zielregion. Die DNA-Polymerase verwendet diese Primer und die Desoxynukleotidtriphosphate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

Bei der Real-Time PCR beruht der DNA-Nachweis auf der Hybridisierung spezifischer Sonden während der Amplifikation an die Amplikons. An diese Sonden ist ein Fluorophor gebunden, der nur fluoresziert, wenn die Sonde an die Zielsequenz hybridisiert. Bei dem Fluorophor, der an die Sonde gebunden ist, die mit der *E. coli* O157:H7 spezifischen DNA-Sequenz hybridisiert, handelt es sich um FAM. Wenn keine Ziel-DNA vorhanden ist, ist keine Fluoreszenz nachweisbar. Da sich die Zahl der Amplikons mit jeder Amplifizierungsrunde erhöht, verstärkt sich auch die Fluoreszenzintensität. Beim 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 interne DNA-Kontrolle aus synthetischer DNA. Diese Kontrolle wird gleichzeitig mit der *E. coli* O157:H7 DNA-Zielsequenz mit einer spezifischen Sonde amplifiziert und durch einen zweiten Fluorophor nachgewiesen.

Abschnitt 3 Zusammensetzung des Kits

Dieser Test gestattet den qualitativen Nachweis von *E. coli* O157:H7 in ausgewählten Lebensmittel- und Umgebungsproben, die zuvor durch Kultur angereichert wurden. Er umfasst die folgenden Hauptschritte:



* Hinsichtlich der Verwendungsbedingungen ist das Anwenderhandbuch für die iQ-Check Free DNA Removal Solution (Katalog-Nr. 10000058391) zu beachten.

Abschnitt 3

Zusammensetzung des Kits

Das iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit enthält ausreichend Reagenzien für 96 Tests (94 Proben).

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

Abschnitt 4

Haltbarkeit und Lagerung

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

Abschnitt 5

Zusätzlich benötigtes Material

Geräte

- Labor-Paddel-Blender zum Homogenisieren von Testproben
- Inkubator zur mikrobiologischen Anreicherung der Proben
- Speziell für die Extraktion in sterilen konischen 1,5 ml Röhrchen mit Schraubdeckel:
 - Tischzentrifuge 10.000–12.000 x g

Abschnitt 5 Zusätzlich benötigtes Material

- Heiztrockenblock mit 37 ± 2 °C und/oder 95–100 °C
- Speziell für die Extraktion in einer Deep Well Platte:
 - Thermoshaker mit Heizfunktion/Agitator-Inkubator*, der eine Temperatur von 37 ± 2 °C und/oder 95–100 °C aufrecht erhalten kann, mit einer Mischgeschwindigkeit von mindestens 1.300 rpm
- Vortex
- Magnetrührer
- Mikropipetten für 20 µl, 200 µl, 1.000 µl
- Spitzen für Mehrfachpipetten, steril, einzeln verpackt
- Bio-Rad Real-Time PCR System;* zum Beispiel das CFX96 Touch Deep Well (Katalog-Nr. 3600037) oder CFX Opus Deep Well (Katalog-Nr. 17007991)
- iQ-Check Prep System von Bio-Rad für die automatisierte DNA-Extraktion und PCR-Plattenvorbereitung (Katalog-Nr. 3594911)

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

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

Zubehör

- Anreicherungsmedium: Gepuffertes Peptonwasser (GPW; Buffered Peptone Water, BPW; z. B. BPW Plus Katalog-Nr. 3564684, dehydriert, 500 g; Katalog-Nr. 3554179, 6 Flaschen x 225 ml; Katalog-Nr. 3555789, 5 Beutel x 2,3 L; Katalog-Nr. 3555790, 2 Beutel x 5 L. BPW Standard Katalog-Nr. 12013259, dehydriert, 500 g; Katalog-Nr. 12013258 dehydriert, 5 kg; Katalog-Nr. 12013260 2 Beutel x 5 L)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (Lösung zur Entfernung von freier DNA, Katalog-Nr. 3594970)
- STEC Supplement (Katalog-Nr. 3564005)
- iQ-Check Reinigungsreagenz (Katalog-Nr. 12012383)
- Speziell für die Untersuchung von Umgebungsproben
 - Schwämme zur Gewinnung von Umgebungsproben
 - Tupfer zur Gewinnung von Umgebungsproben
 - Neutralisierungsmedium für Probennahme-Schwämme und -Tupfer, z. B. Dey-Engley (D/E) oder HiCap Neutralizing Broth oder Lethen Broth
- Speziell für die Extraktion in Röhrchen
 - Konische sterile 1,5 ml Röhrchen mit Schraubdeckel (Katalog-Nr. 17010678)
- Speziell für die Extraktion in einer Deep Well Platte
 - Deep Well Platte mit 96 Wells (iQ-Check Deep Well Microplates, Katalog-Nr. 3594900)
 - Abdichtungsfolie aus Kunststoff (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, Katalog-Nr. 3590139)

Abschnitt 6 Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse

- Abdichtungsfolie für PCR-Platten (X-Pierce Films, Katalog-Nr. 3593977 oder vorgestanzte Plattenabdichtungsfolie, Katalog-Nr. 3600040, nur in Nordamerika)
- Speziell für das iQ-Check Prep System:
 - 60 ml Verdünnungsbehältnis (Katalog-Nr. 3594904)
 - Filterspitzen (Katalog-Nr. 3594902 oder 12014486, 5.760 x 50 µl; Katalog-Nr. 3594903 oder 12014483, 3.840 x 1.000 µl)
 - PCR-Mix Röhrchen (Katalog-Nr. 12016673, 25 x 5 ml)
- PCR-Platten, -Röhrchen, -Abdichtungsfolie und -Deckel
- Sterile Filterspitzen für 20 µl, 200 µl und 1.000 µl Mikropipetten
- Sterile, einzeln verpackte Spitzen für Combitip-Pipetten oder äquivalente Mehrfachpipetten
- Sterile 2 ml und 5 ml Teströhrchen
- RAPID'E.coli O157:H7 Agar (Katalog-Nr. 3564748, 100 g) mit zugesetztem Novobiocin und Kaliumtellurit (kann außerhalb des Geltungsumfangs der AOAC-Validierung verwendet werden)
- Zur Bestätigung: CT-SMAC Agar, plus O157 and H7 Latextests
- Ungepuderte Handschuhe
- Destilliertes steriles Wasser
- 5%ige Bleichlösung
- Reinigungsmittel wie DNA AWAY oder RNase AWAY

Abschnitt 6

Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse

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

Abschnitt 6 Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse

- Handschuhe häufig wechseln, vor allem dann, wenn vermutet wird, dass sie kontaminiert sein könnten.
- Die Arbeitsplätze regelmäßig mit 5%iger Bleichlösung und anderen Dekontaminationsmitteln, z. B. DNA AWAY, reinigen.
- Ungepuderte Handschuhe verwenden, und Fingerabdrücke und Beschriftungen auf Röhrchendeckeln vermeiden, da dies die Datenerfassung beeinträchtigen würde.
- Es wird dringend empfohlen, die in der Norm EN ISO 22174:2024 „Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Allgemeine Anforderungen und Begriffe“ beschriebenen Anforderungen einzuhalten.
- iQ-Check *E. coli* O157:H7 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.
- Real-Time PCR Nachweissystem CFX96 Touch Deep Well oder CFX Opus Deepwell
 - Die unsachgemäße Verwendung des Real-Time PCR Nachweissystems CFX96 Touch oder CFX Opus Deep Well kann zu Personenverletzungen oder Schäden am Gerät führen. Einige Komponenten können bei unsachgemäßer Handhabung aufgrund übermäßiger Hitze zu Personenverletzungen führen. Für eine sichere Nutzung darf das Real-Time PCR Nachweissystem CFX96 Touch oder CFX Opus Deep Well nur von qualifiziertem Laborpersonal bedient werden, das entsprechend geschult wurde. Die Wartung des Geräts darf nur von Außendiensttechnikern von Bio-Rad durchgeführt werden.
- Anreicherung
 - Der Benutzer sollte alle Sicherheitsinformationen in der Anweisung des iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kits lesen, verstanden haben und beachten. Die Sicherheitshinweise zum späteren Nachschlagen aufbewahren. Um die mit der Exposition gegenüber Chemikalien und biologischen Gefahren verbundenen Risiken zu verringern, sind Pathogentests in einem ordnungsgemäß ausgestatteten Labor unter der Kontrolle von geschultem Personal durchzuführen. Beim Umgang mit Reagenzien und kontaminierten Proben sind stets die üblichen Laborsicherheitspraktiken einzuhalten, beispielsweise sind geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille zu tragen. Den Kontakt mit dem Inhalt des

Abschnitt 7 Protokoll

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. Dazu zählen u. a. Schutzbrille, Gesichtsschutz, Kleidung/Laborkittel und Handschuhe. Alle Arbeiten sollten in ordnungsgemäß ausgestatteten Einrichtungen unter Verwendung der entsprechenden Sicherheitsausrüstung (z. B. physikalische Eindämmungsvorrichtungen) durchgeführt werden. Mitarbeiter sollten vor der Arbeit mit potenziell infektiösen Materialien nach den geltenden Bestimmungen und Anforderungen der Firma/Institution geschult werden.
- Nach Abschluss der Tests sind alle Materialien und Medien, die möglicherweise Krankheitserreger enthalten, im Einklang mit den geltenden Industriestandards für die Entsorgung kontaminierter Abfälle zu dekontaminieren (d. h. 20 min bei 120 °C autoklavieren). Weitere Informationen und vor Ort geltende Entsorgungsvorschriften sind im Sicherheitsdatenblatt aufgeführt.

Abschnitt 7

Protokoll

A. Probenanreicherung

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

Die Verwendung eines Anreicherungsbeutels mit eingebautem Filter wird dringend empfohlen.

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

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

Das iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit ist Teil der USDA MLG 5C.02 Standardmethode und kann nach der in der Methode angegebenen Anreicherung verwendet werden.

NF VALIDATION BRD 7/15-06/08		
Umfang (Matrices)	Probenvorbereitung	Anreicherung/DNA-Extraktion
Rohfleisch (ausgenommen Geflügel) ^{1,2} (25 g)	<i>n</i> g Probe in 9 x <i>n</i> ml GPW homogenisieren (25 g in 225 ml)	Easy II Extraktion <ul style="list-style-type: none">▪ Für 8–16 hr bei 41,5 ± 1 °C inkubieren.▪ Röhrchen/Deep Well-Format
Rohfleisch (ausgenommen Geflügel) ^{1,2} (375 g)	<i>n</i> g Probe in 3 x <i>n</i> ml GPW homogenisieren (375 g in 1.125 ml)	Easy II Extraktion <ul style="list-style-type: none">▪ Für 10–18 hr bei 41,5 ± 1 °C inkubieren.▪ Röhrchen/Deep Well-Format

AOAC PTM 020801		
Umfang (Matrices)	Probenvorbereitung	Anreicherung/DNA-Extraktion
Rohes Rinderhackfleisch, roher Spinat, Apfelwein (25 g)	n g Probe in $9 \times n$ ml vorgewärmtem GPW homogenisieren (25 g in 225 ml).	Easy I Extraktion <ul style="list-style-type: none"> Für 8–24 hr bei $41,5 \pm 1$ °C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format
Rohes Rinderhackfleisch ² (25 g)	n g Probe in $9 \times n$ ml vorgewärmtem GPW homogenisieren (25 g in 225 ml).	Standard II Extraktion <ul style="list-style-type: none"> Für 8–12 hr bei 36 ± 1 °C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format
Rohes Rinderhackfleisch und rohes Rindfleisch ^{1,3} (375 g)	n g Probe in $3 \times n$ ml vorgewärmtem GPW homogenisieren (375 g in 1.125 ml).	Easy II Extraktion <ul style="list-style-type: none"> Für 8–22 hr bei $41,5 \pm 1$ °C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format
Roher Spinat ^{1,3} (375 g)	n g Probe in $3 \times n$ ml vorgewärmtem GPW homogenisieren (375 g in 1.125 ml).	Easy II Extraktion <ul style="list-style-type: none"> Für 10–22 hr bei $41,5 \pm 1$ °C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format
Rohes Hühnerfleisch mit und ohne Haut, mechanisch zerteiltes Hühnerfleisch und rohes Schweinehackfleisch (25 g)	n g Probe in $9 \times n$ ml vorgewärmtem GPW homogenisieren (25 g in 225 ml).	Easy II Extraktion <ul style="list-style-type: none"> Für 8–22 hr bei $41,5 \pm 1$ °C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format
MicroTally-Abstrich ^{1,4}	Abstrich in 200 ml vorgewärmtem BPW durch 30 Sekunden langes Stampfen oder Massieren mit der Hand homogenisieren	Easy II Extraktion <ul style="list-style-type: none"> Für 8–22 hr bei $41,5 \pm 1$ °C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format
Proben von Oberflächen in der Umgebung	Tupfer in 10 ml vorgewärmtem GPW homogenisieren. Schwämme in 60–90 ml vorgewärmtem GPW homogenisieren.	Easy II Extraktion <ul style="list-style-type: none"> Für 8–24 hr bei $41,5 \pm 1$ °C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format

¹ Die Validierung umfasst auch die Verwendung der Anwendungsprotokolldatei „O157_H7 Fast“ für eine kürzere PCR-Laufzeit. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihre Bio-Rad-Vertretung.

² Protokoll für den gleichzeitigen Nachweis von *Salmonella*.

³ Mit dem iQ-Check *Salmonella* II und dem iQ-Check STEC VirX Kit abgestimmtes Protokoll.

B. Behandlung zur Entfernung freier DANN

Die iQ-Check Free DNA Removal Solution (Katalog-Nr. 3594970) ist zur Entfernung freier DNA optimal geeignet (außerhalb des aktuellen Geltungsumfangs der AOAC- und der NF-Validierung). Es sind die Empfehlungen von Bio-Rad im Anwenderhandbuch zu beachten.

C. DNA-Extraktion

Allgemeine Empfehlungen:

- Den Heizblock oder den Thermoshaker zum Vorheizen einschalten, bevor mit dem Test begonnen wird. Auf 95–100 °C einstellen. Das Lysereagenz während des Pipettierens durch Rühren bei mittlerer Geschwindigkeit auf einer Magnetrührplatte in Suspension halten.

Abschnitt 7 Protokoll

2. Generell sollte vermieden werden, den Anreicherungsbeutel zu schütteln und große Lebensmittelfragmente in der Probe zu entnehmen. Bei Lebensmittelproben mit fettigem Überstand sollte die Probe knapp unterhalb dieser Schicht entnommen werden.
3. Beim Öffnen von Röhrchen und Wells vorsichtig vorgehen, um eine mögliche Kreuzkontamination zu vermeiden.
4. Die Deep Well Platte kühlen, bevor direkt durch die vorgestanzte Abdichtungsfolie pipettiert wird.
5. Den Magnetrührer verwenden, um das Lysereagenz in Suspension zu halten. Den Pipettiervorgang durchführen, während es bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt wird.
6. Das Lysereagenz zuerst vorsichtig per Hand schütteln, um das Harz zu resuspendieren. Das Lysereagenz pipettieren, während es bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt wird (Magnetrührstab befindet sich in der Flasche), damit es in Suspension bleibt.
7. Das Lysereagenz wie folgt zur Verwendung rekonstituieren:
 - a. Den Inhalt von Reagenz F (Lysis Beads) vollständig zu Reagenz A (Lysereagenz) geben.
 - b. Zum Pipettieren des homogenisierten Lysereagenzes Pipettenspitzen mit ausreichend großer Öffnung verwenden.
 - c. Das mit Lysis Beads gemischte Lysereagenz (Reagenz A + F) ist bei 4 °C für 6 Monate haltbar.

Protokoll Standard II

1. 1 ml dekantierte angereicherte Probe in ein Röhrchen oder in ein Well einer Deep Well Platte überführen. Die Deep Well Platte mit Kunststoffabdichtungsfolie verschließen.

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

2. Die Röhrchen bei 10.000–12.000 x g 5 min zentrifugieren. Den Überstand verwerfen. Die Deep Well Platten 20 min bei 2.250 x g zentrifugieren und den Überstand manuell oder mithilfe des DW40 verwerfen.
3. 200 µl homogenisiertes Lysereagenz (Reagenz A + F) zu dem Pellet geben und das Pellet durch Auf- und Abpipettieren des Reagenzes resuspendieren. Die Röhrchen verschließen bzw. die Deep Well Platte mit vorgestanzter Abdichtungsfolie verschließen.

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

4. Das Röhrchen für 3 ± 1 min in das Zellaufschlussgerät geben bzw. die Deep Well Platte 15–20 min bei 1.300–1.600 rpm und 95–100 °C im Agitator-Inkubator schütteln.
5. Für 10–15 min in den jeweiligen auf 95–100 °C vorgeheizten Heizblock stellen.
6. Die Röhrchen bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortex mischen und 5 min bei 10.000–12.000 x g zentrifugieren. Die Deep Well Platte 2 min bei 2.250 x g zentrifugieren.

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

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

Protokoll Easy I

1. 100 µl homogenisiertes Lysereagenz (Reagenz A) in Röhrrchen oder Wells einer Deep Well Platte aliquotieren.
2. 100 µl der angereicherten Probe dazugeben. Durch Auf- und Abpipettieren mischen und das Röhrrchen mit einem Deckel bzw. die Deep Well Platte mit vorgestanzter Abdichtungsfolie verschließen.
3. Im entsprechenden Wärmeblock 10–15 min bei 95–100 °C oder im Plattenthermoshaker 15–20 min bei 1.300 rpm inkubieren.
4. Die Röhrrchen bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortex mischen.
5. Wird eine Deep Well Platte verwendet, muss sie auf Raumtemperatur (20–25 °C) gebracht werden.
6. Die Röhrrchen mindestens 2 min bei 10.000–12.000 x g zentrifugieren. Deep Well Platten müssen nicht zentrifugiert werden.

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

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

Protokoll Easy II

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

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

2. 100 µl der angereicherten Probe dazugeben.

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

3. Die Lösung durch Auf- und Abpipettieren mischen, bis sie homogen ist.
4. Die Röhrrchen verschließen bzw. die Deep Well Platte mit vorgestanzter Abdichtungsfolie verschließen.
5. Die Röhrrchen für 3 ± 1 min in den Cell Disruptor geben. Die Röhrrchen für 10–15 min bei 95–100 °C im Heizblock inkubieren.
6. Bei Verwendung des Thermoschüttlers für die Röhrrchen oder das Deep Well-Format: die Röhrrchen oder Deep Well-Platte im Thermoschüttler bei einer Bewegung von 1.300 rpm bei 95–100°C für 15–20 min inkubieren.
7. Die Röhrrchen bei hoher Geschwindigkeit vortexen und dann mindestens 2 min bei 10.000–12.000 x g zentrifugieren. Die Deep Well Platte muss nicht zentrifugiert werden.

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

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

D. Real-Time PCR

Konfiguration des Geräts und der Software

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

Vorbereitung des PCR-Reaktionsgemisches

1. Ein PCR-Reaktionsgemisch mit der Amplifikationslösung (Reagenz C) und den fluoreszierenden Sonden (Reagenz B) vorbereiten. Das benötigte Volumen des PCR-Reaktionsgemisches hängt von der Anzahl der zu analysierenden Proben und Kontrollen ab. In jedem PCR-Lauf müssen mindestens eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden. Die korrekten Mengen jedes Reagenzes sind der Pipettiertabelle im Anhang zu entnehmen.

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

2. Aus diesem PCR-Reaktionsgemisch dem jeweils verwendeten Platten-Layout entsprechend 45 µl in jedes Well pipettieren.
3. 5 µl Probe oder Reagenz D (Negativkontrolle) oder Reagenz E (Positivkontrolle) zugeben. Die Probe vor dem Pipettieren nicht vortexen. Die Wells der Platte bzw. die Teststreifen hermetisch abdichten. Es ist wichtig, Luftblasen am Boden der Wells zu vermeiden, indem behutsam pipettiert wird. Optional kann die verschlossene PCR-Platte bzw. können die verschlossenen PCR-Röhrchenstreifen zur Beseitigung etwaiger Luftblasen kurz zentrifugiert werden.
4. Die 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 sind die Anweisungen im Benutzerhandbuch der Software CFX Manager IDE oder der CFX Maestro IDE zu befolgen.

Ergebnisinterpretation

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

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

Kontrollen

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

Abschnitt 7 Protokoll

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

	Nachweis von <i>E. coli</i> O157:H7 (FAM-Kanal)	Nachweis der internen Kontrolle (HEX-Kanal)
Negativkontrolle	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Positivkontrolle	$26 \leq Cq \leq 36$	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 von denen in der Tabelle für die Kontrollen unterscheiden (ungültige Kontrolle), sind der in „D. Real-Time PCR“ und „E. Datenanalyse“ in Abschnitt 7 „Protokoll“ beschriebene Lauf und die Analyse zu wiederholen.

Proben

Ein **positiver** iQ-Check *E. coli* O157:H7 PCR-Test muss eine typische Amplifikationskurve und für den FAM-Fluorophor einen Cq-Wert von ≥ 10 ergeben.

- Liegt der Cq-Wert für beide Kanäle unter 10, muss in den Rohdaten überprüft werden, ob es sich bei der Kurve um eine normale Amplifikationskurve handelt (d. h. um eine Kurve mit flacher Basislinie, gefolgt von einem raschen exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz und anschließender Abflachung). Wenn die Kurve korrekt aussieht, ist die Probe möglicherweise positiv auf *E. coli* O157:H7.

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

- Wenn kein Cq-Wert für FAM vorliegt und der Cq-Wert für die interne Kontrolle ≥ 28 beträgt, gilt die Probe als **negativ** auf *E. coli* O157:H7.
- Falls auch für die interne Kontrolle kein Cq-Wert vorliegt (Cq = N/A), bedeutet dies, dass die PCR-Reaktion vermutlich gehemmt war. In diesem Fall muss die Probe verdünnt (mit 10 μ l DNA-Extrakt eine 1:10 Verdünnung in destilliertem sterilem Wasser durchführen, dann 5 μ l der verdünnten Lösung für die Amplifikation verwenden) und die PCR wiederholt werden.
- Falls der Cq-Wert für die interne Kontrolle < 28 liegt, ist keine Interpretation des Ergebnisses möglich. Es ist zu überprüfen, ob der Schwellenwert korrekt platziert wurde oder ob es sich bei der Kurve in den Rohdaten um eine normale Amplifikationskurve handelt. Wenn die Kurve keine charakteristische Form aufweist, muss der PCR-Test wiederholt werden.

Die Interpretation der Probenergebnisse ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Nachweis von <i>E. coli</i> O157:H7 (FAM)	Nachweis der internen Kontrolle (HEX-Kanal)	Auswertung
$Cq \geq 10$	NA	Positiv.
$Cq = N/A$	$Cq > 28$	Negativ
$Cq = N/A$	$Cq = N/A$	Hemmung*

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

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

Abschnitt 8

Bestätigung positiver Ergebnisse

Im Kontext der NF VALIDATION-zertifizierten Methode müssen alle positiven iQ-Check *E. coli* O157:H7 Ergebnisse bestätigt werden. Dazu gibt es folgende Möglichkeiten:

1. Durchführung klassischer Tests, die in den standardisierten CEN- oder ISO-Methoden beschrieben sind, unter Verwendung der Ausgangsprobe.
2. Verwendung von einer der folgenden beiden Methoden ab dem Schritt der GPW-Anreicherung:
 - a. Isolierung auf CT-SMAC-Agar (mit oder ohne Immunseparationsschritt davor), gefolgt von der Isolierung von Kolonien auf nicht selektivem Agar, und anschließendem O157- und H7-Latex-Tests mit 1 bis 3 charakteristischen Kolonien.
 - b. Isolierung auf chromogenem RAPID'*E.coli* O157:H7 Medium mit einem vorangegangenen Immunseparationsschritt, gefolgt von der Isolierung von Kolonien auf nicht selektivem Agar, und anschließendem O157- und H7-Latex-Tests mit 1 bis 3 charakteristischen Kolonien. Es wird eine Bestätigung mit der im Anwenderhandbuch für das chromogene RAPID'*E.coli* O157:H7 Medium genannten Methode empfohlen.

Bei nicht übereinstimmenden Ergebnissen zwischen dem iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit und einer der oben aufgeführten Bestätigungsoptionen (insbesondere Latex-Tests) sind die erforderlichen Schritte zu befolgen, um gültige Ergebnisse sicherzustellen, z. B. Hinzufügen eines Immunseparationsschritts und dann Isolieren auf CT-SMAC- oder RAPID'*E.coli* O157:H7-Agar.

Im Zusammenhang mit der AOAC PTM-validierten Methode gilt ein positives iQ-Check *E. coli* O157:H7 Ergebnis als vermutlich positiv, und es wird eine Bestätigung mit einer geeigneten Referenzmethode (z. B. USDA MLG oder FDA BAM) empfohlen.

Abschnitt 9

Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit

Das iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit kann auch zum Bestätigen isolierter *E. coli* O157:H7-Kolonien auf Agarplatten verwendet werden.

1. Mit einem Zahnstocher, einer sterilen Impföse oder einem anderen geeigneten Verbrauchsartikel (z. B. einer Pipettenspitze) eine isolierte Kolonie aus einer Platte mit selektivem oder nichtselektivem Agar aufnehmen.
2. Die Kolonie in 100 µl Tryptonsalz-Medium oder destilliertem, sterilem Wasser in einem Mikrozentrifugenröhrchen resuspendieren. Auf dem Vortex homogenisieren.
3. 5 µl der Suspension zu 45 µl PCR-Reaktionsgemisch geben (siehe D. „Real-Time PCR“ in Abschnitt 7 „Protokoll“) und zur Daten- und Ergebnisauswertung die übrigen Schritte des iQ-Check *E. coli* O157:H7 Protokolls befolgen.

Es ist zu beachten, dass die Bestätigung der Kolonien gemäß dem in der USDA MLG 5C.00 Methode beschriebenen Protokoll durchgeführt werden kann.

Abschnitt 10

Testleistung und Testvalidierungen



BRD 07/15 – 06/08

ALTERNATIVE
ANALYSEMETHODEN
FÜR AGRIBUSINESS

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

iQ-Check *E. coli* O157:H7 (Protokoll Easy II) wurde von NF VALIDATION als Alternative zur Referenzmethode ISO 16654 (Juli 2001) und dessen Änderung A1 (Juni 2017) für den Nachweis von *E. coli* O157:H7 in Rohfleischproben (ausgenommen Geflügelfleisch) einer Menge von 25 g und 375 g zertifiziert. Die Validierung erfolgte nach dem Protokoll von NF EN ISO 16140-2:2016 und umfasst die Verwendung der Real-Time PCR Systeme CFX96, CFX96 Deep Well und CFX Opus Deep Well. Das zugehörige Softwareprogramm ist die Software CFX Manager IDE Software (ab V2.2) oder CFX Maestro IDE (ab Version 4.0) und die O157_H7 Fast APF. Zertifikatnummer: BRD 07/15–06/08. Gültig bis: Entsprechend den Angaben auf dem Zertifikat auf der Website <http://nf-validation.afnor.org/en>.



iQ-Check *E. coli* O157:H7 wurde vom AOAC-Research Institute im Rahmen des Performance Tested Method-Programms zum Nachweis von *E. coli* O157:H7 in rohem Rinderhackfleisch (25 g und 375 g), rohem Rindfleisch (375 g), roher entbeinter Hühnerbrust ohne Haut (25 g), rohem Hühnerschenkel mit Haut (25 g), mechanisch zerteiltem Hühnerfleisch (25 g), rohem Schweinehackfleisch (25 g), rohem Spinat (25 g und 375 g) und Apfelwein (25 ml) validiert. Auch das Protokoll Standard II wurde von AOAC-RI bezüglich des gleichzeitigen Nachweises von *E. coli* O157:H7 und *Salmonella* spp. in rohem Rinderhackfleisch validiert worden. Ein positives Ergebnis mit iQ-Check ist als vorläufig positiv zu betrachten und sollte mit Standardreferenzmethoden bestätigt werden. Zertifikatnummer 020801.

Abschnitt 11

Literatur

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

ISO 16654 Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Horizontales Verfahren für den Nachweis von *Escherichia coli* O157.

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

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2015). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 5.09: Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2021). Microbiology Laboratory Guidebook –Chapter 5C.02. Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2020). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4a. Diarrheagenic *Escherichia coli*.

Abschnitt 12

Revisionshistorie

Freigabedatum	Dokumentnummer	Änderung
Mai 2020	10000131517 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Verlängerung und Erweiterung der AFNOR-Validierung für: - Fleischproben in den Mengen 25 g and 375 g - „O157_H7 Fast“ APF - AOAC-Erweiterung - Neues Dokumentdesign und aktualisierte Referenzen, Inhalt, USDA-Referenzmethode und Koloniebestätigung - Änderung der Dokumentnummer - vorhergehende Version 808473 REV D
Dezember 2022	10000131517 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Neue Katalognummern für Verbrauchsmaterialien hinzugefügt - Protokollabschnitt durch Übersichtstabelle ersetzt - AFNOR Erweiterung: CFX Opus Deep Well Real-Time PCR System und Aktualisierung auf CFX Manager Software IDE Version 3.1 - Klarstellung des Ergebnisinterpretationsprotokolls - Generelle Aktualisierungen des Inhalts
März 2024	10000131517 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - AOAC-Erweiterung: MicroTally-Abstriche - Abklärung des Extraktionsprotokolls
April 2025	10000131517 Ver D	<ul style="list-style-type: none"> - Erweiterung der Validierung für die Software CFX Maestro IDE Version 4.0

Anhang — Pipettiertabelle für das PCR-Reaktionsgemisch

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

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

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

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

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

Alle hier genannten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit

Manuale d'uso

Test per la rilevazione mediante PCR real-time di *Escherichia coli* O157:H7 in prodotti alimentari e campioni ambientali

N. catalogo 3578114

BIO-RAD

Indice

Sezione 1.	Introduzione	1
Sezione 2.	Tecnologia iQ-Check <i>E. coli</i> O157:H7	1
Sezione 3.	Componenti del kit	2
Sezione 4.	Validità e conservazione	2
Sezione 5.	Materiali necessari ma non inclusi.....	2
	Apparecchiatura	2
	Materiali	3
Sezione 6.	Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali	4
Sezione 7.	Protocollo	6
	Arricchimento del campione	6
	Trattamento per la rimozione del DNA libero	8
	Estrazione del DNA	8
	PCR real-time	10
	Analisi dei dati	11
Sezione 8.	Conferma dei risultati positivi	12
Sezione 9.	Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check.....	13
Sezione 10.	Esecuzione e convalida del test	13
Sezione 11.	Riferimenti bibliografici	14
Sezione 12.	Cronologia delle revisioni	14
	Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR.....	15

Sezione 1

Introduzione

I metodi convenzionali di rilevazione batteriologica sono spesso lunghi e noiosi. In confronto, iQ-Check *Escherichia coli* O157:H7 è un test qualitativo semplice e rapido che permette la rilevazione di sequenze specifiche di DNA esclusive di *E. coli* O157:H7 ritrovate in prodotti alimentari e campioni ambientali. Mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR) real-time, le sequenze specifiche di DNA di *E. coli* O157:H7 vengono amplificate e rilevate simultaneamente tramite sonde fluorescenti. È possibile processare un numero massimo di 94 campioni, con un rischio di contaminazione minimizzato e una procedura intuitiva. Questo kit è destinato al personale di laboratorio qualificato, incaricato di eseguire test per la rilevazione di *E. coli* O157:H7. I risultati del test si ottengono entro poche ore dall'arricchimento del campione.

Sezione 2

Tecnologia iQ-Check *E. coli* O157:H7

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit è un test basato sull'amplificazione e sulla rilevazione genica mediante PCR real-time. I reagenti PCR pronti all'uso contengono oligonucleotidi (primer e sonde) specifici per *E. coli* O157:H7, oltre a DNA polimerasi e nucleotidi. La rilevazione e l'analisi dei dati sono ottimizzati per l'impiego con uno strumento PCR real-time Bio-Rad, come il sistema di rilevazione tramite PCR real-time CFX96 Touch Deep Well System o CFX Opus Deepwell System.

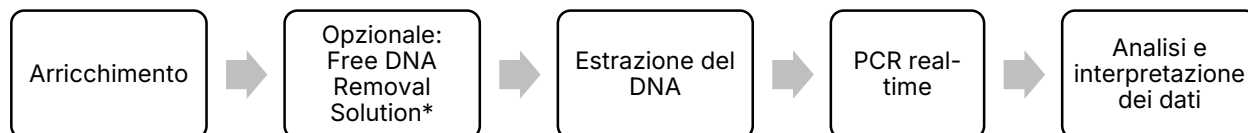
La PCR è una tecnica di grande efficacia impiegata per generare molteplici copie di DNA target. Durante la reazione PCR, diversi cicli di riscaldamento e raffreddamento consentono la denaturazione del DNA, con successivo appaiamento dei primer ad una regione target specifica. A questo punto la DNA polimerasi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

Nella PCR real-time, vengono utilizzate specifiche sonde per rilevare il DNA durante la fase di amplificazione tramite ibridazione degli ampliconi. Queste sonde sono collegate a un fluoroforo che emette fluorescenza solo se ibridato alla sequenza target. FAM è il fluoroforo collegato alla sonda ibridata alla sequenza specifica di DNA di *E. coli* O157:H7. In assenza di DNA target, non verrà rilevata alcuna fluorescenza. Man mano che la quantità di ampliconi aumenta ad ogni ciclo di amplificazione, l'intensità della fluorescenza aumenta a sua volta. Il modulo ottico misura questa fluorescenza nella fase di appaiamento durante ogni ciclo PCR, mentre il software associato traccia l'intensità della fluorescenza rispetto al numero di cicli.

Nella miscela di reazione è incluso un controllo interno del DNA sintetico. Il controllo viene amplificato con una sonda specifica simultaneamente rispetto alla sequenza di DNA target di *E. coli* O157:H7 e rilevato da un secondo fluoroforo.

Sezione 3 Componenti del kit

Questo test consente la rilevazione qualitativa di *E. coli* O157:H7 in determinati prodotti alimentari e campioni ambientali precedentemente arricchiti mediante coltura. Prevede le seguenti fasi principali:



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

Sezione 3

Componenti del kit

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit contiene reagenti a sufficienza per l'esecuzione di 96 test (94 campioni).

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

Sezione 4

Validità e conservazione

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

Sezione 5

Materiali necessari ma non inclusi

Apparecchiatura

- Omogeneizzatore da laboratorio per i campioni dei test

Sezione 5 Materiali necessari ma non inclusi

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

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

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

Materiali

- Terreno di arricchimento: acqua peptonata tamponata (ad esempio, BPW Plus n. catalogo 3564684, in forma disidratata, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 flaconi; 3555789, 2,3 L x 5 sacche; 3555790, 5 L x 2 sacche. BPW Standard (n. catalogo 12013259, in forma disidratata, 500 g; 12013258 in forma disidratata, 5 kg; 12013260 5 L x 2 sacche)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (n. catalogo 3594970)
- STEC Supplement (n. catalogo 3564005)
- iQ-Check Purification Reagent (n. catalogo 12012383)
- Materiali specifici per campioni ambientali
 - Spugne ambientali
 - Tamponi ambientali
 - Brodo neutralizzante per spugne e tamponi come Dey-Engley (D/E), HiCap Neutralizing Broth, o Lethen Broth
- Materiali specifici per l'estrazione in provette
 - Provette coniche sterili con tappo a vite da 1,5 ml (n. catalogo 17010678)
- Materiali specifici per l'estrazione in una piastra Deep Well

Sezione 6 Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali

- Piastra da 96 Deep Well (iQ-Check Deep Well Microplate, n. catalogo 3594900)
- Pellicola sigillante in plastica (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, n. catalogo 3590139)
- Pellicola sigillante per piastre PCR (X-Pierce Film, n. catalogo 3593977, o Pre-Pierced Plate Sealing Film, n. catalogo 3600040, solo Nord America)
- Specifici per iQ-Check Prep System:
 - Contenitore per la diluizione da 60 ml (n. catalogo 3594904)
 - Puntali con filtro (n. catalogo 3594902 o 12014486, 50 µl x 5.760; 3594903 o 12014483, 1.000 µl x 3.840)
 - Provette per miscela di PCR (n. catalogo 12016673, 5 ml x 25)
- Piastre PCR, provette, nastro isolante e tappi
- Puntali sterili con filtro adattabili a micropipette da 20, 200 e 1000 µl
- Puntali per pipette Combitip o pipettatori a ripetizione equivalenti, sterili e confezionati singolarmente
- Provette sterili per test da 2 e 5 ml
- RAPID'*E.coli* O157:H7 agar (n. catalogo 3564748, 100 g) supplementato con novobiocina e tellurite di potassio (può essere utilizzato al di fuori dell'ambito della validazione AOAC)
- Per le conferme: CT-SMAC agar, più test al lattice per O157 e H7
- Guanti senza polvere
- Acqua distillata sterile
- Candeggina, 5%
- Detergenti come DNA AWAY o RNase AWAY

Sezione 6

Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali

- Il presente test deve essere eseguito da personale addestrato
- I campioni e le colture di arricchimento devono essere manipolati come materiali potenzialmente infetti ed eliminati nel rispetto delle regole e normative locali
- Tutti i materiali potenzialmente infetti devono essere collocati in autoclave prima dello smaltimento
- La qualità dei risultati si basa sulla rigorosa osservanza delle buone pratiche di laboratorio (ad esempio, la norma EN ISO 7218), soprattutto in materia di PCR:
 - Non spostare mai apparecchiature da laboratorio (pipette, provette, ecc.) da una postazione di lavoro all'altra

Sezione 6 Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali

- Utilizzare sempre un controllo positivo e un controllo negativo per ciascuna serie di reazioni di amplificazione
- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza
- Per garantire l'omogeneità dei reagenti del kit, miscelarli nel vortex prima di utilizzarli
- Verificare periodicamente l'accuratezza e la precisione delle pipette, nonché il corretto funzionamento degli strumenti
- Cambiare i guanti di frequente, in particolare se si sospetta la presenza di contaminazione
- Pulire gli spazi di lavoro periodicamente con candeggina al 5% e altri prodotti disinfettanti come DNA AWAY
- Utilizzare guanti senza polvere e non lasciare impronte digitali e scritte sui tappi delle provette. Entrambi interferiscono con l'acquisizione dei dati
- Si raccomanda vivamente di seguire i requisiti generali descritti nella norma EN ISO 22174:2024 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food pathogens — General requirements and definitions)
- iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit
 - Tutte le sostanze o miscele contenute nel kit per il test sono classificate come prodotti in conformità al sistema mondiale armonizzato (GHS). Il contatto con acidi potrebbe causare il rilascio di gas tossici. Se utilizzato correttamente, non sono necessarie precauzioni particolari. Se il prodotto viene inalato, portare il soggetto in una zona ben aerata e in caso di disturbi consultare un medico. Se il prodotto viene a contatto con gli occhi, sciacquarli mantenendoli aperti sotto l'acqua corrente per diversi minuti. In caso di ingestione del prodotto, indurre il vomito e contattare un medico
- iQ-Check Prep System
 - L'utilizzo improprio del iQ-Check Prep System potrebbe causare lesioni personali o danni allo strumento. Se manipolati in modo improprio, alcuni componenti potrebbero presentare un rischio di lesioni personali dovuto al calore eccessivo. Per garantire sicurezza, iQ-Check Prep System deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato e opportunamente addestrato. La manutenzione dello strumento deve essere eseguita solo dai tecnici di assistenza Bio-Rad
- Sistema di rilevazione tramite PCR real-time CFX96 Touch System o CFX Opus Deepwell System
 - L'uso improprio del sistema di rilevazione tramite PCR real-time CFX96 Touch System o CFX Opus Deep Well System può causare lesioni personali o danni allo strumento. Se manipolati in modo improprio, alcuni componenti potrebbero presentare un rischio di lesioni personali dovuto al calore eccessivo. Per garantire la sicurezza, il sistema di rilevazione tramite PCR real-time CFX96 Touch Deep Well System o CFX Opus Deep Well System deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio specializzato opportunamente addestrato. La manutenzione dello strumento deve essere eseguita solo dai tecnici di assistenza Bio-Rad

Sezione 7 Protocollo

▪ Arricchimento

- L'utente è tenuto a leggere, comprendere e osservare tutte le informazioni relative alla sicurezza contenute nelle istruzioni dell' iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit. Conservare le istruzioni di sicurezza per consultazioni future. Per ridurre i rischi biologici e i rischi legati all'esposizione ai prodotti chimici, eseguire il test dei patogeni in un laboratorio adeguatamente attrezzato sotto il controllo di personale qualificato. Seguire sempre le pratiche di laboratorio standard sulla sicurezza, tra cui indossare gli indumenti protettivi e la protezione per gli occhi durante la manipolazione di reagenti e campioni contaminati. Evitare il contatto con il contenuto dei terreni di arricchimento e delle provette con i reagenti al termine dell'amplificazione. Smaltire i campioni arricchiti in conformità alle attuali norme industriali
- 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 dispositivi di protezione adeguati, che includono, a titolo esemplificativo, dispositivi di protezione per gli occhi, schermi per il viso, indumenti/camici da laboratorio e guanti. Tutti le operazioni devono essere eseguite in strutture adeguatamente attrezzate utilizzando gli idonei dispositivi di sicurezza (ad esempio, i dispositivi di contenimento fisico). Prima di lavorare con materiali potenzialmente infettivi, gli addetti devono ricevere una formazione che sia conforme alle disposizioni regolamentari in vigore e ai requisiti dell'azienda/ente
- Una volta completati i test, tutti i materiali e i mezzi che potrebbero contenere patogeni devono essere decontaminati seguendo gli attuali standard di settore per lo smaltimento dei rifiuti contaminati (ossia, sterilizzazione in autoclave per 20 min a 120 °C). Per maggiori informazioni relative alle normative locali in materia di smaltimento, consultare la scheda di sicurezza

Sezione 7

Protocollo

A. Arricchimento del campione

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

Si consiglia vivamente di utilizzare un sacco di arricchimento con filtro incorporato

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

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

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit fa parte del metodo standard USDA MLG 5C.02 e può essere utilizzato in seguito all'arricchimento indicato nel metodo.

Sezione 7 Protocollo

VALIDAZIONE NF BRD 7/15-06/08		
Oggetto (matrici)	Preparazione dei campioni	Arricchimento/ Estrazione del DNA
Carne cruda (escluso pollame) ^{1,2} (25 g)	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione in 9 x <i>n</i> ml di APT (25 g in 225 ml)	Estrazione Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 8-16 hr a 41,5 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well
Carne cruda (escluso pollame) ^{1,2} (375 g)	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione in 3 x <i>n</i> ml di APT (375 g in 1.125 ml)	Estrazione Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 10-18 hr a 41,5 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well
AOAC PTM 020801		
Oggetto (matrici)	Preparazione dei campioni	Arricchimento/ Estrazione del DNA
Manzo macinato crudo, spinaci freschi, sidro di mele (25 g)	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione in 9 x <i>n</i> ml di APT preriscaldata (25 g in 225 ml)	Estrazione Easy I <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 8-24 hr a 41,5 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well
Manzo macinato crudo ² (25 g)	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione in 9 x <i>n</i> ml di APT preriscaldata (25 g in 225 ml)	Estrazione Standard II <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 8-12 hr a 36 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well
Manzo macinato crudo e rifilatura di manzo crudo ^{1,3} (375 g)	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione in 3 x <i>n</i> ml di APT preriscaldata (375 g in 1.125 ml)	Estrazione Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 8-22 hr a 41,5 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well
Spinaci freschi ^{1,3} (375 g)	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione in 3 x <i>n</i> ml di APT preriscaldata (375 g in 1.125 ml)	Estrazione Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 10-22 hr a 41,5 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well
Pollo crudo con e senza pelle, pollo separato meccanicamente e maiale macinato crudo (25 g)	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione in 9 x <i>n</i> ml di APT preriscaldata (25 g in 225 ml)	Estrazione Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 8-22 hr a 41,5 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well
Tampone MicroTally ^{1,4}	Omogeneizzare il tampone in 200 ml di BPW preriscaldata con l'apposito strumento stomacher oppure massaggiando manualmente per 30 sec	Estrazione Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 8-22 hr a 41,5 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well
Campioni prelevati da superfici ambientali	Omogeneizzare i tamponi in 10 ml di APT preriscaldata Omogeneizzare le spugne in 60-90 ml di APT preriscaldata	Estrazione Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 8-24 hr a 41,5 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well

¹ La validazione comprende anche l'utilizzo del file di protocollo di applicazione "O157_H7 Fast" per un tempo di ciclo PCR ridotto. Per ulteriori informazioni contattare il rappresentante Bio-Rad locale.

² Protocollo per la rilevazione simultanea di *Salmonella*.

³ Protocollo armonizzato con i kit iQ-Check *Salmonella* II e iQ-Check STEC VirX

B. Trattamento per la rimozione del DNA libero

Il prodotto iQ-Check Free DNA Removal Solution (n. catalogo 3594970) rappresenta un metodo ottimale per la rimozione del DNA libero (al di fuori dell'ambito attuale delle validazioni AOAC e NF). Seguire le raccomandazioni di Bio-Rad contenute nel manuale d'uso.

C. Estrazione del DNA

Raccomandazioni generali:

1. Prima di iniziare il test, accendere il blocco termico o il thermoshaker per la funzione di preriscaldamento. Impostare a 95-100 °C. Durante il pipettaggio, mantenere in sospensione il reagente di lisi agitando a media velocità su una piastra di agitazione magnetica.
2. Di norma, evitare l'agitazione del sacco di arricchimento e la raccolta di grossi frammenti di residui alimentari. Per i campioni alimentari aventi un surnatante grasso, raccogliere il campione appena al di sotto di questo strato.
3. Aprire le provette e i pozzetti con attenzione per evitare eventuali contaminazioni crociate.
4. Raffreddare la piastra Deep Well prima di effettuare il pipettaggio direttamente nella pellicola sigillante preforata.
5. Utilizzare la barra magnetica per mantenere in sospensione il reagente di lisi. Effettuare il pipettaggio mentre è in atto un'agitazione a media velocità.
6. Per risospendere la resina, per prima cosa agitare delicatamente a mano il reagente di lisi. Al fine di mantenerlo in sospensione, effettuare il pipettaggio mentre è in atto un'agitazione a media velocità mediante la barra magnetica contenuta nel flacone.
7. Ricostituire il reagente di lisi finale come segue:
 - a. Versare con attenzione tutto il contenuto del reagente F (sfere di lisi) nel reagente A (reagente di lisi).
 - b. Utilizzare materiali di consumo con un puntale largo abbastanza da consentire il pipettaggio del reagente di lisi omogeneizzato.
 - c. Se conservato a 4 °C, il reagente di lisi miscelato con le sfere di lisi (reagente A + F) ha una validità pari a 6 mesi.

Protocollo Standard II

1. Raccogliere 1 ml di campione decantato arricchito in una provetta o in un pozzetto di una piastra Deep Well. Sigillare la piastra Deep Well con una pellicola in plastica.

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

2. Centrifugare le provette a 10.000-12.000 x g per 5 min. Eliminare il surnatante. Centrifugare le piastre Deep Well a 2.250 x g per 20 min ed eliminare il surnatante manualmente o mediante la DW40.

Sezione 7 Protocollo

3. Aggiungere 200 µl di reagente di lisi omogeneizzato (reagente A + F) al pellet e risospendere quest'ultimo pipettando il reagente in alto e in basso. Chiudere le provette o sigillare la piastra Deep Well con la pellicola sigillante preforata.

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

4. Collocare la provetta nel cell disruptor per 3 ± 1 min, oppure agitare la piastra Deep Well nell'agitatore-incubatore a 1.300-1.600 rpm a 95-100 °C per 15-20 min.
5. Incubare le provette nel blocco termico indicato a 95-100 °C per 10-15 min.
6. Miscelare nel vortex le provette ad alta velocità e centrifugare a 10.000-12.000 x g per 5 min. Centrifugare la piastra Deep Well a 2.250 x g per 2 min.

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

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

Protocollo Easy I

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

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

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

Protocollo Easy II

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

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

2. Aggiungere 100 µl di campione arricchito.

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

3. Miscelare la soluzione pipettando su e giù fino a ottenere l'omogeneizzazione.
4. Chiudere le provette o sigillare la piastra a pozzetti profondi con la pellicola sigillante preforata.
5. Posizionare le provette nel dispositivo per il frazionamento cellulare per 3 ± 1 min. Incubare le provette nel blocco termico a 95-100 °C per 10-15 min.
6. Se si utilizza il termoaggitatore per il formato provetta o Deep Well, incubare le provette o la piastra Deep Well nel termoaggitatore con agitazione a 1.300 rpm a 95-100 °C per 15-20 min.
7. Miscelare le provette nel vortex ad alta velocità e centrifugare a 10.000-12.000 x g per almeno 2 min. La centrifugazione per la piastra Deep Well non è necessaria.

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

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

D. PCR real-time

Installazione strumento e software

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

Preparazione della miscela di PCR

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

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 45 µl della miscela di PCR in ogni pozzetto secondo lo schema analitico scelto.
3. Aggiungere 5 µl di campione, reagente D (controllo negativo) o reagente E (controllo positivo). Non miscelare nel vortex il campione prima del pipettaggio. Sigillare ermeticamente i pozzetti della piastra o le strip. Pipettare con attenzione per evitare la formazione di bolle sul fondo dei pozzetti. 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 un ciclo PCR

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

E. Analisi dei dati

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

Interpretazione dei risultati

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

Il software CFX Manager IDE o CFX Maestro IDE consente di completare un'analisi automatizzata per i sistemi di rilevazione PCR real-time Bio-Rad. È necessario eseguire la verifica delle caratteristiche tipiche della curva di amplificazione prima di rilasciare i risultati. Per ulteriore supporto, contattare il proprio team di supporto tecnico Bio-Rad.

Controlli

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

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

	Rilevazione <i>E. coli</i> O157:H7 (canale FAM)	Rilevazione controllo interno (canale HEX)
Controllo negativo	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Controllo positivo	$26 \leq Cq \leq 36$	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.

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

Campioni

Un test di PCR per iQ-Check *E. coli* O157:H7 **positivo** deve mostrare una curva di amplificazione tipica e un valore Cq ≥ 10 per il fluoroforo FAM.

- Se il valore Cq è inferiore a 10 per entrambi i canali, verificare che la curva dei dati non elaborati sia una curva di amplificazione regolare (con linea di base piatta, seguita da un rapido aumento esponenziale della fluorescenza e infine da un secondo appiattimento). Se la curva appare corretta, potrebbe essere considerata come campione di *E. coli* O157:H7 positivo

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

- Se non esiste un valore Cq per FAM e il controllo interno ha un Cq ≥ 28 , il campione viene considerato come campione **negativo** a *E. coli* O157:H7
- 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.

Sezione 8 Conferma dei risultati positivi

- 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 dei campioni è riassunta nella seguente tabella:

Rilevazione <i>E. coli</i> O157:H7 (FAM)	Rilevazione controllo interno (canale HEX)	Interpretazione
Cq ≥ 10	NA	Positivo.
Cq = N/A	Cq > 28	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Inibizione*

* Qualora il target e la rilevazione del controllo interno diano un valore Cq = N/A, il campione deve essere diluito 1/10 e testato nuovamente.

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

Sezione 8

Conferma dei risultati positivi

Nell'ambito del metodo certificato della VALIDAZIONE NF, tutti i risultati positivi con iQ-Check *E. coli* O157:H7 devono essere confermati come segue:

1. Mediante test classici illustrati nei metodi standardizzati CEN o ISO ritornando al campione.
2. Utilizzando uno dei due metodi seguenti, a partire dall'arricchimento con APT:
 - a. Isolamento su agar CT-SMAC (con o senza precedente fase di immunoseparazione), seguito da isolamento delle colonie su agar non selettivo, quindi test al lattice per O157 e H7 su 1-3 colonie caratteristiche.
 - b. Isolamento su terreno cromogenico RAPID'*E.coli* O157:H7, con precedente fase di immunoseparazione, seguito da isolamento delle colonie su agar non selettivo, quindi test al lattice per O157 e H7 su 1-3 colonie caratteristiche. Fare riferimento al metodo di conferma nel manuale d'uso per terreno cromogenico RAPID'*E.coli* O157:H7

In caso di risultati discrepanti tra iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit e una delle opzioni di conferma sopra elencate (in particolare mediante i test al lattice), seguire i passaggi necessari per garantire risultati validi, ad esempio aggiungendo una fase di immunoseparazione e successivamente procedendo all'isolamento su agar CT-SMAC o RAPID'*E.coli* O157:H7.

Nell'ambito del metodo validato AOAC PTM, un risultato positivo con iQ-Check *E. coli* O157:H7 si presume essere positivo, ed è raccomandata la conferma in conformità a un metodo di riferimento opportuno (ad esempio, USDA MLG o FDA BAM).

Sezione 9

Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit può essere utilizzato anche per la conferma di singole colonie isolate di *E. coli* O157:H7 su piastre agar.

1. Scegliere una colonia isolata da una piastra agar selettiva o non selettiva servendosi di uno stuzzicadenti, un'ansa sterile o altri prodotti di consumo adattati (ad esempio, un puntale per pipetta).
2. Risospendere la colonia in 100 µl di sale triptone o acqua distillata sterile in una provetta per microcentrifuga. Omogeneizzare il tutto mediante un miscelatore vortex.
3. Utilizzare 5 µl della sospensione con 45 µl di miscela di PCR (vedere il paragrafo D. PCR real-time nella sezione 7 Protocollo) e seguire il resto del protocollo iQ-Check *E. coli* O157:H7 per l'interpretazione di dati e risultati.

Si noti che la conferma delle colonie può essere eseguita in base al protocollo descritto nel metodo USDA MLG 5C.00.

Sezione 10

Esecuzione e convalida del test



BRD 07/15 – 06/08

METODI ANALITICI
ALTERNATIVI PER IL SETTORE
AGROALIMENTARE

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

iQ-Check *E. coli* O157:H7 (protocollo Easy II) è certificato ai sensi della VALIDAZIONE NF come metodo alternativo rispetto al metodo di riferimento ISO 16654 (luglio 2001) e al suo emendamento A1 (giugno 2017), per la rilevazione di *E. coli* O157:H7 in campioni di carne cruda (esclusa la carne di pollame) da 25 e 375 g. La validazione osserva il protocollo dello standard NF EN ISO 16140-2:2016 e comprende l'utilizzo dei sistemi di rilevazione mediante PCR real-time CFX96 System, CFX96 Deep Well System e CFX Opus Deepwell System. Il programma software associato è CFX Manager Software IDE (V2.2 e versioni successive) o CFX Maestro IDE (versione 4.0 e successive) e il file di protocollo di applicazione O157_H7 Fast. Numero di certificato: BRD 07/15-06/08. Periodo di validità: Fare riferimento al certificato disponibile sul sito web <http://nf-validation.afnor.org/en>.



iQ-Check *E. coli* O157:H7 è stato validato dall'AOAC Research Institute nell'ambito del programma Performance Tested Method per la rilevazione di *E. coli* O157:H7 in manzo macinato crudo (25 e 375 g), rifilatura di manzo crudo (375 g), petto di pollo crudo disossato senza pelle (25 g), coscia di pollo crudo con pelle (25 g), pollo separato meccanicamente (25 g), maiale macinato crudo (25 g), spinaci freschi (25 e 375 g) e sidro di mele (25 ml). Il protocollo Standard II è stato validato dall'AOAC-RI anche per la rilevazione simultanea di *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* spp. in manzo macinato crudo. 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 020801.

Sezione 11

Riferimenti bibliografici

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

ISO 16654. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *E. coli* O157.

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

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2015). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 5.09: Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2021). Microbiology Laboratory Guidebook –Chapter 5C.02. Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2020). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4a. Diarrheagenic *Escherichia coli*.

Sezione 12

Cronologia delle revisioni

Data di rilascio	Numero di documento	Modifica
Maggio 2020	10000131517 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Rinnovo ed estensione della validazione AFNOR per: <ul style="list-style-type: none"> - campioni di carne da 25 e 375 g - protocollo di file di applicazione "O157_H7 Fast" - Estensione di AOAC - Nuova struttura del documento e aggiornamento di riferimenti, contenuto, metodo di riferimento USDA e conferma delle colonie - Modifica al numero di documento – versione precedente 808473 REV D
Dicembre 2022	10000131517 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Aggiunti nuovi numeri di catalogo per i materiali di consumo - Sostituita sezione del protocollo con tabella di riepilogo - Estensione AFNOR: Sistema di PCR real-time CFX Opus Deepwell System e aggiornamento alla versione 3.1 del software CFX Manager IDE Software - Chiarimento del protocollo di interpretazione dei risultati - Aggiornamenti generali dei contenuti
Marzo 2024	10000131517 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - Estensione AOAC: Tamponi MicroTally - Chiarimento del protocollo di estrazione
Aprile 2025	10000131517 Ver D	<ul style="list-style-type: none"> - Estensione di convalida per il software CFX Maestro IDE versione 4.0

Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR

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

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

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

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

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

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

BIO-RAD

**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit

Guia do usuário

Teste para detecção por PCR em tempo real de *Escherichia coli* O157:H7 em amostras ambientais e de alimentos

Nº do catálogo 3578114

BIO-RAD

Índice

Seção 1.	Introdução	1
Seção 2.	Tecnologia iQ-Check <i>E. coli</i> O157:H7	1
Seção 3.	Componentes do kit	2
Seção 4.	Prazo de validade e armazenamento	2
Seção 5.	Materiais necessários, mas não fornecidos	2
	Equipamento	2
	Suprimentos	3
Seção 6.	Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados	4
Seção 7.	Protocolo	6
	Enriquecimento da amostra	6
	Tratamento de remoção de DNA livre	8
	Extração de DNA	8
	PCR em Tempo Real	10
	Análise de dados	11
Seção 8.	Confirmação de Resultados Positivos	12
Seção 9.	Confirmação de Colônias Isoladas usando o iQ-Check Kit	13
Seção 10.	Desempenho e validação do teste	13
Seção 11.	Referências	14
Seção 12.	Histórico de Revisão	14
	Apêndice – Guia de Cálculo da Mistura de PCR	15

Seção 1

Introdução

Os métodos de detecção bacteriológicos convencionais são, muitas vezes, longos e entediante. Comparado a eles, o *Escherichia coli* O157:H7 é um teste qualitativo simples e rápido, que permite a detecção de sequências de DNA específicas e exclusivas da *E. coli* O157:H7 encontrada nos produtos alimentares. Utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), as sequências de DNA específicas da *E. coli* O157:H7 são amplificadas e detectadas simultaneamente através de sondas fluorescentes. Podem ser processadas até 94 amostras, com risco minimizado de contaminação e um procedimento fácil de usar. Os usuários pretendidos deste kit são funcionários qualificados de laboratório que estão realizando testes para detectar *E. coli* O157:H7. A utilização deste teste permite que os resultados sejam obtidos poucas horas após o enriquecimento de uma amostra.

Seção 2

Tecnologia iQ-Check *E. coli* O157:H7

O iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit é um teste baseado na amplificação e detecção genética através de PCR em tempo real. Os reagentes de PCR prontos para uso contêm oligonucleotídeos (iniciadores e sondas) específicos para *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 System ou CFX Opus Deepwell System.

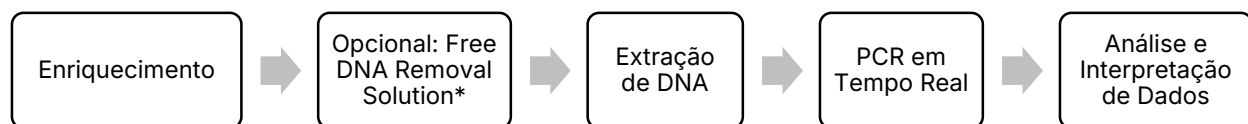
A PCR é uma poderosa técnica utilizada para gerar muitas cópias do DNA alvo. Durante a reação de PCR, os vários ciclos de aquecimento e resfriamento permitem a desnaturação do DNA, seguido pelos primers ligando-se à região-alvo. A DNA polimerase utiliza esses primers e desoxinucleotídeos trifosfatos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

Na PCR em tempo real, são utilizadas sondas específicas para detectar o DNA durante a etapa de amplificação, através da hibridização dos amplicons. Estas sondas estão ligadas a um fluoróforo, que apresenta fluorescência apenas quando hibridizado à sequência-alvo. FAM é o fluoróforo ligado às sondas que estão hibridizando nas sequências de DNA exclusivas da *E. coli* O157:H7. Na ausência de DNA-alvo, não será observada fluorescência. Como a quantidade de amplicons aumenta em cada rodada de amplificação, a intensidade da fluorescência aumenta também. O módulo óptico mede essa fluorescência em cada ciclo de PCR, na fase de hibridização (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. Este controle é amplificado com uma sonda específica ao mesmo tempo que a sequência-alvo de *E. coli* O157:H7, e é detectado por um segundo fluoróforo.

Seção 3 Componentes do kit

Esse teste permite a detecção qualitativa de *E. coli* O157:H7 em alimentos selecionados e amostras ambientais previamente enriquecidas por cultura. Inclui as etapas principais seguintes:



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

Seção 3

Componentes do kit

O iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit contém reagentes suficientes para 96 testes (94 amostras).

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

Seção 4

Prazo de validade e armazenamento

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

Seção 5

Materiais necessários, mas não fornecidos

Equipamento

- Liquidificador de laboratório para homogeneizar amostras de teste
- Incubadora para enriquecimento microbiológico de amostras

Seção 5 Materiais necessários, mas não fornecidos

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

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

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

Suprimentos

- Meio de enriquecimento: água peptonada tamponada (por exemplo, BPW Plus nº do catálogo 3564684, desidratado, 500 g; 3554179, 6 frascos de 225 ml; 3555789, 5 sacos de 2,3 L; 3555790, 2 sacos de 5 L. BPW Standard, nº do catálogo 12013259, desidratado, 500 g; 12013258 desidratado, 5 kg; 12013260, 2 sacos de 5 L)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (nº do catálogo 3594970)
- STEC Supplement (nº do catálogo 3564005)
- iQ-Check Purification Reagent (nº do catálogo 12012383)
- Específico para amostras ambientais
 - Esponjas ambientais
 - Esfregãos ambientais
 - Caldo neutralizante para esponjas e cotonetes, como Dey-Engley (D/E) ou HiCap Neutralizing Broth ou Lethen Broth
- Específico para extração em tubos
 - Tubos com tampa cônica de rosca de 1,5 ml, estéreis (nº do catálogo 17010678)

Seção 6 Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados

- Específico para extração em uma placa Deep Well
 - Placa Deep Well de 96 poços (iQ-Check Deep Well Microplates, nº do catálogo 3594900)
 - Filme plástico de vedação (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, nº do catálogo 3590139)
 - Filme de vedação de placas PCR (X-Pierce Films, nº do catálogo 3593977, ou Pre-Pierced Plate Sealing Film, nº do catálogo 3600040, apenas América do Norte)
- Específico para o sistema iQ-Check Prep System:
 - Recipiente de diluição de 60 ml (nº do catálogo 3594904)
 - Pontas de filtro (nº do catálogo 3594902 ou 12014486, 50 µl x 5.760; 3594903 ou 12014483, 1,000 µl x 3.840)
 - Tubos de mistura de PCR (nº do catálogo 12016673, 5 ml x 25)
- Placas de PCR, tubos, fitas e tampas de vedação
- Pontas de filtro estéreis adaptáveis a micropipetas de 20, 200 e 1.000 µl
- Ponteiras para pipetas Combitip ou pipetadores de repetição equivalentes, estéreis, embalados individualmente
- Tubos de ensaio estéreis de 2 e 5 ml
- RAPID'E.coli O157:H7 Agar (nº do catálogo 3564748, 100 g) suplementado com novobiocina e telurito de potássio (pode ser utilizado fora do escopo da validação AOAC)
- Para confirmações: CT-SMAC ágar, além de testes do látex O157 e H7
- 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 ao PCR:

Seção 6 Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados

- Nunca circule equipamentos de laboratório (pipetas, tubos etc.) de uma estação de trabalho para outra
- Sempre use um controle positivo e um controle negativo para cada série de reações de amplificação
- Não utilize reagentes após a expiração de suas datas de validade
- Agite os reagentes do kit antes de utilizá-los, de modo a garantir a homogeneidade
- Verifique periodicamente a exatidão e precisão das pipetas, bem como o correto funcionamento dos instrumentos
- Troque frequentemente de luvas, especialmente se suspeitar que estão contaminadas
- Limpe os espaços de trabalho periodicamente com alvejante a 5% e outros agentes descontaminantes, como o DNA AWAY
- Utilize luvas sem talco e evite escrever ou deixar impressões digitais nas tampas dos tubos. Ambos interferem na aquisição de dados
- Recomenda-se fortemente o cumprimento dos requisitos gerais descritos na norma EN ISO 22174:2024 (Microbiologia de alimentos para consumo humano e para alimentação animal – reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de patógenos alimentares – Requisitos e definições gerais)
- iQ-Check *E. coli* O157:H7 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 iQ-Check Prep System 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 iQ-Check Prep System deve ser operado somente por pessoal qualificado do laboratório que tenha sido treinado adequadamente. A manutenção do instrumento deve ser realizada apenas pelos engenheiros de serviço de campo da Bio-Rad
- Sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch ou CFX Opus Deepwell
 - O uso inadequado do Sistema de PCR em tempo real CFX96 Touch ou CFX Opus Deep Well pode causar ferimentos ou danos ao instrumento. Alguns componentes podem representar um risco de ferimentos pessoais devido ao calor excessivo, se manuseados incorretamente. Para uso seguro, o Sistema de PCR em tempo real CFX96 Touch ou CFX Opus Deep Well deve ser operado somente por pessoal qualificado do laboratório que tenha sido treinado adequadamente. A manutenção do instrumento deve ser realizada apenas pelos engenheiros de serviço de campo da Bio-Rad

Seção 7 Protocolo

▪ Enriquecimento

- O usuário deve ler, entender e seguir todas as informações de segurança nas instruções do iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit. Guarde as instruções de segurança para referência futura. Para reduzir os riscos associados à exposição a produtos químicos e riscos biológicos, realize testes de patógenos em um laboratório devidamente equipado, sob o controle de pessoal treinado. Sempre siga as práticas padrão de segurança do laboratório, incluindo o uso de vestuário de proteção e proteção ocular adequados ao manusear reagentes e amostras contaminadas. Evite o contato com o conteúdo do meio de enriquecimento e dos tubos de reagentes após a amplificação. Descarte amostras enriquecidas de acordo com as normas atuais do setor
- O *E. coli* patogênico é um organismo de nível 2 ou 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

A. Enriquecimento da amostra

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

O uso de um saco de enriquecimento com filtro incorporado é altamente recomendado

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

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

O iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit é parte do método padrão USDA MLG 5C.02 e pode ser usado após o enriquecimento indicado no método.

Seção 7 Protocolo

NF VALIDATION BRD 7/15-06/08		
Escopo (Matrizes)	Preparação da amostra	Enriquecimento/ Extração de DNA
Carne crua (exceto de aves domésticas) ^{1,2} (25 g)	Homogeneíze <i>n</i> g de amostra em 9 x <i>n</i> ml de APT (25 g em 225 ml)	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 8–16 hr a 41,5 ± 1°C Formato do tubo/Deep Well
Carne crua (exceto de aves domésticas) ^{1,2} (375 g)	Homogeneíze <i>n</i> g de amostra em 3 x <i>n</i> ml de APT (375 g em 1.125 ml)	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 10–18 hr a 41,5 ± 1°C Formato do tubo/Deep Well
AOAC PTM 020801		
Escopo (Matrizes)	Preparação da amostra	Enriquecimento/Extração de DNA
Carne bovina moída e crua, espinafre fresco, cidra de maçã (25 g)	Homogeneíze <i>n</i> g de amostra em 9 x <i>n</i> ml de APT pré-aquecida (25 g em 225 ml)	Extração Easy I <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 8–24 hr a 41,5 ± 1°C Formato do tubo/Deep Well
Carne bovina moída e crua ² (25 g)	Homogeneíze <i>n</i> g de amostra em 9 x <i>n</i> ml de APT pré-aquecida (25 g em 225 ml)	Extração Standard II <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 8–12 hr a 36 ± 1°C Formato do tubo/Deep Well
Carne bovina crua moída e aparas de carne bovina crua ^{1,3} (375 g)	Homogeneíze <i>n</i> g de amostra em 3 x <i>n</i> ml de APT pré-aquecida (375 g em 1.125 ml)	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 8–22 hr a 41,5 ± 1°C Formato do tubo/Deep Well
Espinafre fresco ^{1,3} (375 g)	Homogeneíze <i>n</i> g de amostra em 3 x <i>n</i> ml de APT pré-aquecida (375 g em 1.125 ml)	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 10–22 hr a 41,5 ± 1°C Formato do tubo/Deep Well
Carne de frango crua com e sem pele, carne de frango mecanicamente separada e carne suína moída e crua (25 g)	Homogeneíze <i>n</i> g de amostra em 9 x <i>n</i> ml de APT pré-aquecida (25 g em 225 ml)	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 8–22 hr a 41,5 ± 1°C Formato do tubo/Deep Well
Cotonete MicroTally ^{1, 4}	Homogeneíze o cotonete em 200 ml de APT pré-aquecido por meio de estomia ou massagem manual por 30 sec	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 8–22 hr a 41,5 ± 1°C Formato do tubo/Deep Well
Amostras de superfície ambiental	Homogeneizar swabs em 10 ml de APT pré-aquecida Homogeneizar as esponjas em 60–90 ml de APT pré-aquecida	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 8–24 hr a 41,5 ± 1°C Formato do tubo/Deep Well

¹ A validação também inclui o uso do arquivo de protocolo de aplicação "O157_H7 Fast" para um tempo de execução de PCR reduzido. Entre em contato com seu representante da Bio-Rad para obter mais informações.

² Protocolo para detecção simultânea de *Salmonella*.

³ Protocolo harmonizado com os iQ-Check *Salmonella* II e iQ-Check STEC VirX Kits

B. Tratamento de remoção de DNA livre

A Solução iQ-Check Free DNA Removal Solution (número do catálogo 3594970) fornece uma maneira ideal de se livrar do DNA livre (fora do escopo atual de validações AOAC e NF). Siga as recomendações da Bio-Rad no guia do usuário.

C. Extração de DNA

Recomendações gerais:

1. Ligue o bloco de calor ou o agitador térmico para pré-aquecer antes de iniciar o teste. Defina para 95–100°C. Mantenha o reagente de lise em suspensão enquanto pipeta, agitando em velocidade média em uma placa de agitação magnética.
2. Em geral, evite agitar o saco de enriquecimento e coletar fragmentos de grande dimensão de resíduos alimentares. Para amostras alimentares com um sobrenadante gorduroso, colete a amostra logo abaixo desta camada.
3. Abra os tubos e os poços com cuidado para evitar possíveis contaminações cruzadas.
4. Resfrie a placa Deep Well antes de pipetar diretamente através do filme de vedação pré-perfurado.
5. Use a barra magnética para manter o reagente de lise em suspensão. Pipete enquanto estiver mexendo em velocidade média.
6. Agite suavemente o reagente de lise manualmente primeiro para ressuspender a resina. Pipete enquanto estiver mexendo em velocidade média com a barra magnética contida na ampola, para mantê-lo em suspensão.
7. Reconstitua o reagente final de lise da seguinte maneira:
 - a. Despeje cuidadosamente todo o conteúdo do reagente F (microesferas de lise) no reagente A (reagente de lise).
 - b. Use consumíveis com uma ponta larga o suficiente para permitir a pipetagem do reagente de lise homogeneizado.
 - c. O reagente de lise misturado com as microesferas de lise (reagentes A + F) tem um prazo de validade de 6 meses quando armazenado a 4°C.

Protocolo Standard II

1. Coletar 1 ml de amostra enriquecida decantada em um tubo ou uma placa Deep Well. Sele a placa Deep Well com um filme plástico.

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

2. Centrifugue os tubos a 10.000–12.000 x g por 5 min. Descarte o sobrenadante. Centrifugue as placas de poço a 2.250 x g por 20 min e descarte o sobrenadante manualmente ou usando o DW40.

Seção 7 Protocolo

3. Adicione 200 µl de reagente de lise homogeneizado (reagentes A + F) ao sedimento e ressuspenda o sedimento pipetando o reagente para cima e para baixo. Feche os tubos ou sele a placa Deep Well com filme de vedação pré-perfurado.

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

4. Coloque o tubo no disruptor de célula por 3 ± 1 min ou mexa a placa Deep Well na incubadora-agitadora da placa a 1.300–1.600 rpm a 95–100°C por 15–20 min.
5. Incube no bloco de calor apropriado a 95–100°C por 10–15 min.
6. Agite no vortex os tubos em alta velocidade e centrifugue a 10.000–12.000 x g por 5 min. Centrifugue a placa Deep Well a 2.250 x g por 2 min.

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

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

Protocolo Easy I

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

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

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

Protocolo Easy II

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

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

2. Adicione 100 µl de amostra enriquecida.

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

Seção 7 Protocolo

3. Misture a solução pipetando para cima e para baixo até homogeneizar.
4. Feche os tubos ou sele a placa Deep Well com filme de vedação pré-perfurado.
5. Coloque os tubos no Cell disruptor por 3 ± 1 min. Incube os tubos no bloco de aquecimento a 95–100°C por 10–15 min
6. Caso esteja usando o agitador térmico para o formato de tubo ou de poço profundo, incube os tubos ou a placa de poços profundo no agitador térmico sob agitação a 1.300 rpm a 95–100°C por 15–20 min.
7. Agite no vórtex os tubos em alta velocidade e depois centrifugue a 10.000–12.000 x g por pelo menos 2 min. A centrifugação não é necessária para a placa Deep Well.

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

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

D. PCR em Tempo Real

Configuração do instrumento e do software

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

Preparação da mistura de PCR

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

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

2. Pipete 45 µl da mistura de PCR para cada poço, de acordo com a configuração da placa.
3. Adicione 5 µl de amostra, reagente D (controle negativo) ou reagente E (controle positivo). Não agite a amostra em vortex antes da pipetagem. Vede hermeticamente os poços da placa ou tiras. É importante evitar a formação de bolhas no fundo dos poços, o que é conseguido fazendo a pipetagem cuidadosamente. Como 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 o PCR

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

E. Análise de dados

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

Interpretação de resultados

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

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

Controles

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

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

	Detecção de <i>E. coli</i> O157:H7 (Canal FAM)	Detecção de controle interno (Canal HEX)
Controle negativo	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Controle positivo	$26 \leq Cq \leq 36$	NA

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

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

Amostras

Um teste de PCR **positivo** iQ-Check *E. coli* O157:H7 deve mostrar uma curva de amplificação típica e um valor de Cq ≥ 10 para o fluoróforo FAM.

- Se o valor de Cq para ambos os canais estiver abaixo de 10, verifique se a curva de dados brutos é uma curva de amplificação regular (com uma linha de base plana, seguida de um rápido aumento exponencial da fluorescência e depois de um achatamento). Se a curva parecer correta, considere estar diante de uma amostra positiva para *E. coli* O157:H7

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

- Se não houver valor de Cq para a FAM e o controle interno tiver Cq ≥ 28 , essa amostra será considerada uma amostra **negativa** de *E. coli* O157:H7

Seção 8 Confirmação de Resultados Positivos

- Se o controle interno também não tiver valor Cq (Cq = N/A), isso provavelmente indica inibição da reação de PCR. Dilua a amostra (faça uma diluição de 1:10 em água esterilizada destilada usando 10 µl de extrato de DNA), use 5 µl da diluição para amplificação e repita o teste 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 de <i>E. coli</i> O157:H7 (FAM)	Detecção de controle interno (Canal HEX)	Interpretação
Cq ≥ 10	NA	Positivo.
Cq = N/A	Cq > 28	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Inibição*

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

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

Seção 8

Confirmação de Resultados Positivos

No contexto do método certificado NF VALIDATION, todos os resultados positivos iQ-Check *E. coli* O157:H7 devem ser confirmados das seguintes formas:

1. Utilizando testes clássicos descritos nos métodos padronizados CEN ou ISO, retornando à amostra.
2. Usando um dos dois métodos a seguir, iniciando a partir do enriquecimento APT:
 - a. Isolamento em ágar CT-SMAC (com ou sem uma etapa de imunoseparação primeiramente), seguido de isolamento de colônias em ágar não seletivo, depois testes de látex O157 e H7 em 1 a 3 colônias características.
 - b. Isolamento em meio cromogênico RAPID'*E. coli* O157:H7 com uma etapa de imunoseparação primeiramente, seguido de isolamento de colônias em ágar não seletivo, depois testes de látex O157 e H7 em 1 a 3 colônias características. Consulte o método de confirmação do guia do usuário de meio cromogênico RAPID'*E. coli* O157:H7

No caso de resultados discrepantes entre o iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit e uma das opções de confirmação listadas acima (particularmente por testes de látex), siga as etapas necessárias para garantir resultados válidos, por exemplo, adicionando uma etapa de imunoseparação e depois isolando em ágar CT-SMAC ou RAPID'*E. coli* O157:H7.

No contexto do método validado AOAC PTM, presume-se um resultado positivo iQ-Check *E. coli* O157:H7, e recomenda-se a confirmação de acordo com um método de referência apropriado (por exemplo, USDA MLG ou FDA BAM).

Seção 9

Confirmação de Colônias Isoladas usando o iQ-Check Kit

O iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit também pode ser usado para confirmar colônias isoladas de *E. coli* O157:H7 em placas de ágar.

1. Escolha uma colônia isolada de uma placa de cultura de ágar seletivo ou não seletivo com um palito de dente, alça estéril ou outro consumível adaptado (por exemplo, uma ponta de pipeta).
2. Ressuspenda a colônia em 100 µl de sal de triptona ou água estéril destilada em um tubo de microcentrifuga. Homogeneíze usando um vortexer.
3. Use 5 µl da suspensão com 45 µl de mistura de PCR (consulte D. PCR em Tempo Real, na Seção 7 Protocolo) e siga o restante do protocolo iQ-Check *E. coli* O157:H7 para a interpretação dos dados e resultados.

Observe que a confirmação da colônia pode ser realizada de acordo com o protocolo descrito no método USDA MLG 5C.00.

Seção 10

Desempenho e validação do teste



BRD 07/15 – 06/08

MÉTODOS ANALÍTICOS
ALTERNATIVOS PARA
AGRONEGÓCIO

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

iQ-Check *E. coli* O157:H7 (protocolo Easy II) tem certificação NF VALIDATION como um método alternativo para o método de referência ISO 16654 (julho de 2001) e sua emenda A1 (junho de 2017), para a detecção de *E. coli* O157:H7 em carne crua (excluindo carnes de aves) em amostras de 25 g e 375 g. A validação seguiu o protocolo da norma NF EN ISO 16140-2:2016 e inclui o uso dos sistemas de PCR em tempo real CFX96 ou CFX96 Deep Well e CFX Opus Deepwell. Os programas de software associado são o CFX Manager IDE (V2.2 e posterior) ou CFX Maestro IDE (versão 4.0 e posterior) e o O157_H7 Fast APF. Número do certificado: BRD 07/15–06/08. Válido até: Consulte o certificado disponível no site <http://nf-validation.afnor.org/en>.



iQ-Check *E. coli* O157:H7 foi validado pelo AOAC-Research Institute de acordo com o programa de métodos testados de desempenho para detecção de *E. coli* O157:H7 em carne bovina moída e crua (25 g e 375 g), aparas de carne bovina crua (375 g), peito de frango sem osso e sem pele (25 g), coxa de frango crua com pele (25 g), carne de frango mecanicamente separada (25 g), carne suína moída e crua (25 g), espinafre fresco (25 g e 375 g) e cidra de maçã (25 ml). O protocolo Standard II foi validado por AOAC-RI para detecção simultânea de *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* spp. em carne bovina moída e crua. Um resultado positivo com o iQ-Check deve ser considerado como presumido e recomenda-se que seja confirmado pelos métodos de referência padrão. Certificado número 020801.

Seção 11

Referências

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

ISO 16654 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *E. coli* O157.

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

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2015). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 5.09: Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2021). Microbiology Laboratory Guidebook –Chapter 5C.02. Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2020). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4a. Diarrheagenic *Escherichia coli*.

Seção 12

Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Maio de 2020	10000131517 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Renovação e extensão da validação AFNOR para: <ul style="list-style-type: none"> - amostras de carne de 25 g e 375 g - "O157_H7 Fast" APF - Extensão AOAC - Novo projeto de documento e atualização de referências, conteúdo, método de referência USDA e confirmação de colônia - Alteração do número do documento – versão anterior 808473 REV D
Dezembro de 2022	10000131517 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Adicionado novo nº do catálogo para consumíveis - Seção de protocolo substituída por tabela de resumo - Extensão AFNOR: Sistema de PCR em tempo real CFX Opus Deepwell e atualização para o Software CFX Manager IDE versão 3.1 - Esclarecimento do protocolo de interpretação de resultados - Atualizações do conteúdo geral
Março de 2024	10000131517 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - Extensão AOAC: Cotonetes MicroTally - Esclarecimento do protocolo de extração
Abril de 2025	10000131517 Ver D	<ul style="list-style-type: none"> - Extensão de validação para o software CFX Maestro IDE versão 4.0

Apêndice – Guia de Cálculo da Mistura de PCR

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

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

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

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

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

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



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit

Manual de usuario

Análisis de detección por PCR en tiempo real de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras alimentarias y ambientales

Referencia #3578114

BIO-RAD

Tabla de Contenidos

Apartado 1.	Introducción	1
Apartado 2.	Tecnología de iQ-Check <i>E. coli</i> O157:H7	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.	Seguridad, precauciones y recomendaciones para la obtención de resultados óptimos.....	4
Apartado 7.	Protocolo	6
	Enriquecimiento de la muestra.....	6
	Tratamiento de eliminación de ADN libre.....	8
	Extracción de ADN	8
	PCR en tiempo real	10
	Análisis de los datos.....	10
Apartado 8.	Confirmación de resultados positivos.....	12
Apartado 9.	Confirmación de colonias aisladas usando el kit iQ-Check	13
Apartado 10.	Aplicación del análisis y validaciones	13
Apartado 11.	Referencias	14
Apartado 12.	Historial de revisiones.....	14
	Apéndice — Tabla de cálculo de la mix de PCR.....	15

Apartado 1

Introducción

Los métodos convencionales de detección bacteriológica suelen ser largos y tediosos. En comparación, iQ-Check *Escherichia coli* O157:H7 es un ensayo cualitativo simple y rápido, que permite la detección de secuencias específicas de ADN exclusivas de *E. coli* O157:H7 que se encuentran en productos alimenticios y muestras ambientales. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, las secuencias de ADN específicas de *E. coli* O157:H7 se amplifican y se detectan simultáneamente por medio de sondas fluorescentes. Se pueden procesar hasta 94 muestras, con un riesgo mínimo de contaminación y un procedimiento fácil de usar. Los usuarios previstos de este kit de detección son personal de laboratorio capacitado que está realizando ensayos para detectar la *E. coli* O157:H7. El uso de este ensayo permite obtener resultados pocas horas después del enriquecimiento de una muestra.

Apartado 2

Tecnología de iQ-Check *E. coli* O157:H7

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit es un ensayo basado en la detección y amplificación de genes por PCR en tiempo real. Los reactivos de PCR listos para su uso contienen oligonucleótidos (cebadores y sondas) específicos para *E. coli* O157:H7, así como un ADN polimerasa y nucleótidos. La detección y el análisis de datos están optimizados para su uso con un instrumento de PCR en tiempo real de Bio-Rad, como el sistema de detección en tiempo real CFX96 Touch Deep Well System o CFX Opus Deepwell System.

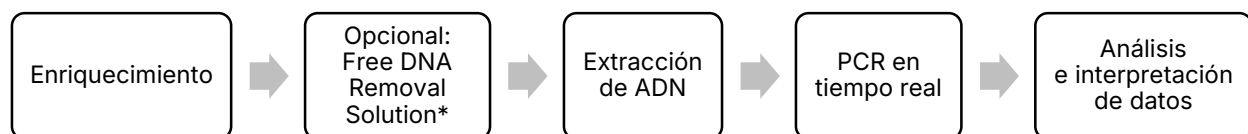
La PCR es una técnica potente que se utiliza para generar múltiples copias del ADN diana. Durante la reacción de PCR, varios ciclos de calentamiento y enfriamiento permiten la desnaturalización del ADN seguida de la unión de los cebadores en la región diana, momento en el que la ADN polimerasa utiliza estos cebadores y desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) para extender el ADN, creando copias del ADN diana. Estas copias se llaman amplicones.

En la PCR en tiempo real, se utilizan sondas específicas para detectar el ADN durante la fase de amplificación, mediante la hibridación de los amplicones. Estas sondas están unidas a un fluoróforo que sólo se vuelve fluorescente cuando se hibrida con la secuencia diana. FAM es el fluoróforo unido a la sonda que hibrida con la secuencia de ADN específica de *E. coli* O157:H7. En ausencia de ADN diana, no se detectará ninguna fluorescencia. A medida que la cantidad de amplicones aumenta con cada ciclo de amplificación, la intensidad de la fluorescencia también aumenta. El módulo óptico mide esta fluorescencia en la fase de lectura durante cada ciclo de PCR mientras que el software correspondiente traza la intensidad de la fluorescencia en función del número de ciclos.

En la mix de la reacción se incluye un control interno de ADN sintético. Este control se amplifica con una sonda específica al mismo tiempo que la secuencia de ADN diana de *E. coli* O157:H7 y se detecta por un segundo fluoróforo.

Este ensayo permite la detección cualitativa de *E. coli* O157:H7 en muestras de alimentos y muestras ambientales previamente enriquecidas por cultivo. Engloba los siguientes pasos:

Apartado 3 Componentes del kit



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

Apartado 3

Componentes del kit

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit contiene suficientes reactivos para 96 ensayos (94 muestras).

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

Apartado 4

Vida útil y conservación

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

Apartado 5

Materiales necesarios, no suministrados

Equipos

- Mezcladora de paletas de laboratorio para homogeneizar las muestras de ensayo
- Incubadora para el enriquecimiento microbiológico de muestras
- Materiales específicos para la extracción en tubos estériles de tapón de rosca cónico de 1,5 ml:
 - Centrifuga de sobremesa capacidad de 10.000-12.000 x g
 - Calentador de bloque seco a 37 ± 2 °C y/o 95-100 °C
- Materiales específicos para la extracción en la placa Deep Well:

Apartado 5 Materiales necesarios, no suministrados

- Calefactor térmico con agitación / agitador-incubadora* con capacidad para mantener 37 ± 2 °C y/o 95-100 °C, con una velocidad de agitación de al menos 1.300 rpm
- Agitador vórtex
- Placa agitadora magnética
- Micropipetas de 20, 200 y 1.000 μ l
- Puntas para pipetas de repetición; estériles, empaquetadas individualmente
- Sistema de PCR en tiempo real de Bio-Rad*, por ejemplo, los sistemas de PCR en tiempo real CFX96 Touch Deep Well System (referencia #3600037) o CFX Opus Deepwell System (referencia #17007991)
- iQ-Check Prep System de Bio-Rad para el procedimiento de extracción automático de ADN y configuración de la placa PCR (referencia #3594911)

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

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

Consumibles

- Caldo de enriquecimiento: agua peptona tamponada (por ejemplo, BPW Plus referencia #3564684, deshidratado, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 frascos; 3555789, 2,3 L x 5 bolsas; 3555790, 5 L x 2 bolsas. BPW Standard (referencia #12013259, deshidratado, 500 g; 12013258 deshidratado, 5 kg; 12013260 5L x 2 bolsas)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (referencia #3594970)
- STEC supplement (referencia #3564005)
- iQ-Check Purification Reagent (referencia #12012383)
- Materiales específicos para muestras ambientales
 - Esponjas ambientales
 - Hisopos ambientales
 - Caldo neutralizante para esponjas e hisopos, como el caldo neutralizante Dey-Engley (D/E) o HiCap Neutralizing Broth o Lethen Broth
- Materiales específicos para la extracción en tubos
 - Tubos cónicos estériles de 1,5 ml y tapa de rosca (referencia #17010678)
- Materiales específicos para la extracción en una placa Deep Well
 - Placa Deep Well de 96 pocillos (iQ-Check Deep Well Microplates, referencia #3594900)
 - Película o film plástico de sellado (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, referencia #3590139)
 - Película de sellado de placas PCR (X-Pierce Films, referencia #3593977, o Pre-Pierced Plate Sealing Film, #3600040, sólo en América del Norte)

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

- Materiales específicos para el iQ-Check Prep System:
 - Recipiente de 60 ml para dilución (referencia #3594904)
 - Puntas con filtro (referencia #3594902 o 12014486, 50 µl x 5760; 3594903 o 12014483, 1000 µl x 3840)
 - Tubos de mix de PCR (referencia #12016673, 5 ml x 25)
- Placas PCR, tubos, film adhesivo y tapas
- Puntas estériles con filtro adaptables a micropipetas de 20, 200 y 1.000 µl
- Puntas de pipeta Combitip o pipetas de repetición equivalente; estériles, empaquetadas individualmente
- Tubos de ensayo estériles de 2 y 5 ml
- RAPID'*E.coli* O157:H7 agar (referencia #3564748, 100 g) suplementado con novobiocina y telurito de potasio (puede utilizarse fuera del ámbito de la validación AOAC)
- Para confirmaciones: Agar CT-SMAC, más pruebas de látex O157 y H7
- Guantes sin talco
- Agua destilada estéril
- Lejía, 5 %
- Agente descontaminante, como DNA AWAY o RNase AWAY

Apartado 6

Seguridad, precauciones y recomendaciones para la obtención de resultados óptimos

- Este análisis debe ser realizado por personal capacitado
- Las muestras y los cultivos enriquecidos deben manipularse como material potencialmente infeccioso y desecharse de acuerdo con las normas y reglamentos locales
- Todo el material potencialmente infeccioso debe ser esterilizado en autoclave antes de su eliminación
- La calidad de los resultados depende del estricto cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio (por ejemplo, la norma EN ISO 7218), especialmente en lo que respecta a la PCR:
 - Nunca haga circular el material de laboratorio (pipetas, tubos, etc.) de una estación de trabajo a otra
 - Utilice siempre un control positivo y un control negativo para cada serie de reacciones de amplificación
 - No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad
 - Agite (mediante vórtex) los reactivos del kit antes de usarlos para asegurar su homogeneidad

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

- Verifique periódicamente la exactitud y la precisión de las pipetas, así como el correcto funcionamiento de los instrumentos
- Cámbiense los guantes a menudo, especialmente si sospecha que están contaminados
- Limpie los espacios de trabajo periódicamente con un 5 % de lejía y otros agentes descontaminantes como DNA AWAY
- Use guantes sin talco y evite las huellas dactilares y escribir en los tapones de los tubos. Ello podría interferir en la correcta adquisición de datos
- Se recomienda encarecidamente seguir los requisitos generales descritos en la norma EN ISO 22174:2024 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions)
- iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit
 - Todas las sustancias o mezclas del equipo de ensayo son productos clasificados, según el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS en inglés por el acrónimo de Globally Harmonized System). El contacto con ácidos puede causar la liberación de gases tóxicos. No es necesario tomar precauciones especiales si se utiliza correctamente. Si se inhala el producto, suministre aire fresco y consulte a un médico en caso de presentar molestias. En caso de contacto del producto con los ojos, enjuague el ojo abierto durante varios minutos con agua corriente. En caso de ingestión de los productos, induzca el vómito y solicite ayuda médica.
- iQ-Check Prep System
 - El uso inadecuado del sistema de preparación iQ-Check Prep System puede causar lesiones personales o daños en el instrumento. Algunos componentes pueden suponer un riesgo de lesiones personales debido al calor excesivo si se manejan de forma inadecuada. Para un uso seguro, el iQ-Check Prep System debe ser manipulado y utilizado sólo por personal de laboratorio calificado que haya sido instruido para tal fin. El mantenimiento del instrumento debe ser realizado sólo por los ingenieros del servicio de campo de Bio-Rad.
- Sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch System o CFX Opus Deepwell System
 - El uso inadecuado del sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch System o CFX Opus Deep Well System puede causar lesiones personales o daños en el instrumento. Algunos componentes pueden suponer un riesgo de lesiones personales debido al calor excesivo si se manejan de forma inadecuada. Para un uso seguro, los sistemas de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch System o CFX Opus Deep Well System deben ser manipulados y utilizados sólo por personal de laboratorio cualificado y que haya sido instruido para tal fin. El mantenimiento del instrumento debe ser realizado sólo por los ingenieros del servicio de técnico de Bio-Rad.
- Enriquecimiento
 - El usuario debe leer, comprender y seguir toda la información de seguridad en las instrucciones de iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit. Conserve las instrucciones de seguridad para futuras consultas. Para reducir los riesgos asociados a la exposición a productos químicos

Apartado 7 Protocolo

y a riesgos biológicos, los análisis de patógenos deben ser realizados en un laboratorio debidamente equipado y bajo el control de personal capacitado. Siga siempre las prácticas normalizadas de seguridad de los laboratorios, incluido el uso de vestimenta protectora adecuada y protección ocular al manipular reactivos y muestras contaminadas. Evite el contacto con el contenido de los medios de enriquecimiento y los tubos de reactivos después de la amplificación. Deseche las muestras enriquecidas de acuerdo con las normas vigentes aplicables a la industria.

- El *E. coli* patógeno es un organismo de bioseguridad de nivel 2 o 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, ropa/bata de laboratorio y guantes. Todos los trabajos deben realizarse en instalaciones debidamente equipadas, utilizando el equipo de seguridad adecuado (por ejemplo, dispositivos de contención física). Las personas deben ser instruidas y estar capacitadas de acuerdo con los requisitos reglamentarios y de la empresa/institución aplicables antes de trabajar con materiales potencialmente infecciosos
- Una vez finalizados los análisis, todos los materiales y medios que puedan contener patógenos deberán descontaminarse siguiendo las normas actuales de la industria para la eliminación de desechos contaminados (es decir, en autoclave durante 20 min a 121 °C). Consulte la Ficha de Datos de Seguridad para obtener información adicional y los reglamentos locales para la eliminación

Apartado 7

Protocolo

A. Enriquecimiento de la muestra

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

Se recomienda encarecidamente el uso de una bolsa de enriquecimiento con filtro incorporado

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

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

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit es parte del método estándar USDA MLG 5C.02 y puede usarse siguiendo el enriquecimiento indicado en el método.

Apartado 7 Protocolo

NF VALIDACIÓN BRD 7/15-06/08		
Alcance (matrices)	Preparación de las muestras	Enriquecimiento/ Extracción de ADN
Carne cruda (excluyendo aves de corral) ^{1,2} (25 g)	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de APT (25 g en 225 ml)	Extracción Easy II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 8-16 hr a 41,5 ± 1 °C ▪ Formato de tubo/Deep Well
Carne cruda (excluyendo aves de corral) ^{1,2} (375 g)	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 3 x <i>n</i> ml de APT (375 g en 1.125 ml)	Extracción Easy II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 10-18 hr a 41,5 ± 1 °C ▪ Formato de tubo/Deep Well
AOAC PTM 020801		
Alcance (matrices)	Preparación de las muestras	Enriquecimiento/ Extracción de ADN
Carne de vacuno triturada cruda, espinaca fresca, sidra de manzana (25 g)	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de APT precalentada (25 g en 225 ml)	Extracción Easy I <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 8-24 hr a 41,5 ± 1 °C ▪ Formato de tubo/Deep Well
Carne de vacuno triturada cruda ² (25 g)	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de APT precalentada (25 g en 225 ml)	Extracción Standard II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 8-12 hr a 36 ± 1 °C ▪ Formato de tubo/Deep Well
Carne de vacuno triturada cruda, corte de carne de vacuno cruda ^{1,3} (375 g)	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 3 x <i>n</i> ml de APT precalentada (375 g en 1.125 ml)	Extracción Easy II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 8-22 hr a 41,5 ± 1 °C ▪ Formato de tubo/Deep Well
Espinaca fresca ^{1,3} (375 g)	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 3 x <i>n</i> ml de APT precalentada (375 g en 1.125 ml)	Extracción Easy II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 10-22 hr a 41,5 ± 1 °C ▪ Formato de tubo/Deep Well
Pollo crudo con y sin piel, pollo mecánicamente seccionado y carne de cerdo triturada cruda (25 g)	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de APT precalentada (25 g en 225 ml)	Extracción Easy II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 8-22 hr a 41,5 ± 1 °C ▪ Formato de tubo/Deep Well
Hisopo MicroTally ^{1,4}	Homogeneizar el hisopo en 200 ml de agua de peptona tamponada precalentada mediante homogeneizador o masaje manual durante 30 sec	Extracción Easy II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 8-22 hr a 41,5 ± 1 °C ▪ Formato de tubo/Deep Well
Muestras ambientales de superficie	Homogeneizar el hisopo en 10 ml de APT precalentada. Homogeneizar el hisopo en 60-90 ml de APT precalentada.	Extracción Easy II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 8-24 hr a 41,5 ± 1 °C ▪ Formato de tubo/Deep Well

¹ La validación también incluye el uso del archivo de protocolo de aplicación "O157_H7 Fast" para un tiempo de run de PCR reducido. Póngase en contacto con su representante de Bio-Rad para más información.

² Protocolo para la detección simultánea de *Salmonella*.

³ Protocolo armonizado con los kits iQ-Check *Salmonella* II y iQ-Check STEC VirX

B. Tratamiento de eliminación de ADN libre

La solución iQ-Check Free DNA Removal Solution (referencia #3594970) es la mejor forma de eliminar el ADN libre (fuera del alcance actual de las validaciones AOAC y NF). Siga las recomendaciones de Bio-Rad en el manual del usuario.

C. Extracción de ADN

Recomendaciones generales:

1. Precaliente el bloque calefactor o mezclador térmico antes de iniciar el ensayo. Póngalo a 95-100 °C. Mantenga el reactivo de lisis en suspensión mientras pipetea agitando a velocidad media en una placa agitadora magnética.
2. En general, evite agitar la bolsa de enriquecimiento y recoger grandes fragmentos de restos de muestra. Para muestras de alimentos con un sobrenadante graso, recoja la muestra justo debajo de esta capa.
3. Abra los tubos y pocillos con cuidado para evitar cualquier posible contaminación cruzada.
4. Enfríe la placa Deep Well antes de pipetear directamente a través de la película para sellado preperforada.
5. Utilice la barra magnética para mantener el reactivo de lisis en suspensión. Pipetee mientras agita a velocidad media.
6. En primer lugar, agite el reactivo de lisis manualmente para resuspender la resina. Seguidamente, pipetee mientras se agita a media velocidad con la barra magnética contenida en la botella, para mantener el reactivo en suspensión.
7. Reconstituya el reactivo de lisis final de las siguientes maneras:
 - a. Vierta cuidadosamente todo el contenido del reactivo F (perlas de lisis) en el reactivo (reactivo de lisis).
 - b. Utilice puntas con apertura suficientemente ancha para permitir el pipeteo homogeneizado del reactivo de lisis.
 - c. El reactivo de lisis mezclados con perlas de lisis (reactivos A + F) tiene una vida útil de 6 meses almacenado a una temperatura de 4 °C.

Protocolo Standard II

1. Recoja 1 ml de muestra enriquecida decantada en un tubo o en un pocillo de una placa Deep Well. Selle la placa Deep Well con una película o film plástico.

Nota: Agite la suspensión para homogeneizar el cultivo y seguidamente deje que los restos decanten antes de recoger la muestra.

2. Centrifugue el tubo a 10.000-12.000 x g durante 5 min. Descarte el sobrenadante. Centrifugue las placas Deep Well a 2.250 x g durante 20 min y descarte el sobrenadante manualmente o con el DW40.
3. Añada 200 µl de reactivo de lisis homogeneizado (reactivos A + F) al comprimido y resuspéndalo pipeteando el reactivo hacia arriba y hacia abajo. Cierre los tubos o selle la placa Deep Well usando la película para sellado pre-perforada.

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

Apartado 7 Protocolo

4. Coloque el tubo en el disruptor celular 3 ± 1 min, o agite la placa Deep Well en el agitador-incubador de placas a 1.300-1.600 rpm a 95-100 °C durante 15-20 min.
5. Incube en el bloque calefactor apropiado a 95-100 °C durante 10-15 min.
6. Agite los tubos con vórtex a alta velocidad y centrifugue a 10.000-12.000 x g durante 5 min. Centrifugue la placa Deep Well a 2.250 x g durante 2 min.

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

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

Protocolo Easy I

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

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

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

Protocolo Easy II

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

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

2. Añada 100 μ l de muestra enriquecida.

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

3. Homogeneice la solución pipeteando hacia arriba y hacia abajo hasta que se homogeneice.
4. Cierre los tubos o selle la placa Deep Well mediante la película pre-perforada de sellado.
5. Si trabaja con tubos, agítelos en el disruptor celular durante 3 ± 1 min. Incubar los tubos en el bloque calefactor a 95 – 100 °C durante 10 - 15 min

Apartado 7 Protocolo

6. Si se utiliza el termoagitador para el formato de tubo o de pocillo profundo, incubar los tubos o la placa de pocillo profundo en el termoagitador, agitando a 1.300 rpm a 95–100 °C durante 15–20 min.
7. Si trabaja con tubos, agítelos con vórtex a alta velocidad y centrifugue a 10.000–12.000 x g durante al menos 2 min. La centrifugación no es necesaria para la placa Deep Well.

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

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

D. PCR en tiempo real

Configuración del software e instrumento

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

Preparación de la mix de PCR

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

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

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

Ejecución de la PCR

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

E. Análisis de los datos

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

Interpretación de los resultados

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

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

Controles

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

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

	Detección de <i>E. coli</i> O157:H7 (Canal FAM)	Detección de control interno (canal HEX)
Control negativo	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Control positivo	$26 \leq Cq \leq 36$	NA

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

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

Muestras

Un resultado **positivo** de PCR iQ-Check *E. coli* O157:H7 debe mostrar una curva de amplificación típica y un valor Cq ≥ 10 para el fluoróforo FAM.

- Si el valor Cq de ambos canales está por debajo de 10, verifique que la curva presente una amplificación normal (con una línea de base plana, seguida de un rápido aumento exponencial de la fluorescencia, y luego un aplanamiento o fase meseta). Si la curva parece correcta, puede considerarse una muestra positiva para el ensayo *E. coli* O157:H7.

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

- Si no hay un valor Cq para FAM y el control interno tiene un Cq ≥ 28 , esta muestra se considera como una muestra **negativa de *E. coli* O157:H7**.
- Si el control interno tampoco tiene un valor Cq (Cq = N/A), esto probablemente indica la inhibición de la reacción de PCR. Diluya la muestra (realice una dilución 1:10 en agua destilada estéril utilizando 10 μ l de extracto de ADN), utilice 5 μ l de la dilución para la amplificación y repita el ensayo 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 el ensayo de PCR.

Apartado 8 Confirmación de resultados positivos

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

Detección de <i>E. coli</i> O157:H7 (FAM)	Detección de control interno (canal HEX)	Interpretación
Cq ≥ 10	NA	Positivo.
Cq = N/A	Cq > 28	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibición*

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

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

Apartado 8

Confirmación de resultados positivos

En el contexto del método certificado de NF VALIDATION, todos los resultados positivos con iQ-Check *E. coli* O157:H7 deben confirmarse como se indica a continuación:

1. Utilizando los ensayos clásicos descritos en los métodos estandarizados CEN o ISO volviendo a la muestra.
2. Aplicando uno de los dos métodos siguientes, partiendo del enriquecimiento de APT:
 - a. Aislamiento en agar CT-SMAC (con o sin inmunoseparación previa), seguido de aislamiento de colonias en agar no selectivo, y a continuación pruebas de látex O157 y H7 en 1-3 colonias características.
 - b. Aislamiento en agar medio cromogénico RAPID'*E.coli* O157:H7, con fase de inmunoseparación previa, seguido de aislamiento de colonias en agar no selectivo, y a continuación pruebas de látex O157 y H7 en 1-3 colonias características. Consulte el método de confirmación en el manual del usuario del medio cromogénico RAPID'*E.coli* O157:H7

En caso de resultados discrepantes entre el iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit y una de las opciones de confirmación enumeradas anteriormente (especialmente las pruebas de látex), siga los pasos necesarios para asegurar resultados válidos, por ejemplo, añadiendo un paso de inmunoseparación y aislando a continuación en agar CT-SMAC o RAPID'*E.coli* O157:H7.

En el contexto del método validado AOAC PTM, se presume que un resultado positivo con iQ-Check *E. coli* O157:H7 es positivo y se recomienda su confirmación con un método de referencia apropiado (por ejemplo, USDA MLG o FDA BAM).

Apartado 9

Confirmación de colonias aisladas usando el kit iQ-Check

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit también puede usarse para confirmar colonias individuales aisladas de *E. coli* O157:H7 en placas de agar.

1. Recoja una colonia aislada en una placa de agar selectivo o no selectivo con un palillo, un lazo estéril u otro consumible adaptado (por ejemplo, una punta de pipeta).
2. Resuspenda la colonia en 100 µl de sal triptona o agua destilada estéril en un tubo de microcentrifuga. Homogenice con vórtex.
3. Utilice 5 µl de la suspensión con 45 µl de mix de PCR (véase D. PCR en tiempo real en el apartado 7 Protocolo) y siga el resto del protocolo iQ-Check *E. coli* O157:H7 para la interpretación de los datos y los resultados.

Tenga en cuenta que la confirmación de colonias puede realizarse siguiendo el protocolo descrito en el método USDA MLG 5C.00.

Apartado 10

Aplicación del análisis y validaciones



BRD 07/15 – 06/08

MÉTODOS ANALÍTICOS
ALTERNATIVOS PARA LA
AGROINDUSTRIA

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

iQ-Check *E. coli* O157:H7 (protocolo Easy II) está certificado por NF VALIDATION como método alternativo al método de referencia ISO 16654 (julio de 2001) y su enmienda A1 (junio de 2017), para la detección de *E. coli* O157:H7 en carne cruda (excluyendo carnes de aves) en muestras de 25 y 375 g. La validación siguió el protocolo de la norma NF EN ISO 16140-2:2016 e incluye el uso del sistema de PCR en tiempo real CFX96 System, CFX96 Deep Well System y CFX Opus Deepwell System. El software asociado es el CFX Manager IDE (V2.2 y posteriores) o el CFX Maestro IDE (version 4.0 versión 4.0 y posteriores) y el O157_H7 Fast APF. Número de certificado: BRD 07/15-06/08. Válido hasta: Consulte el certificado disponible en el sitio web <http://nf-validation.afnor.org/en>.



iQ-Check *E. coli* O157:H7 ha sido validado por el Instituto de investigación AOAC dentro del Programa de Métodos de Rendimiento Comprobados para la detección de *E. coli* O157:H7 en carne de vacuno triturada cruda (25 y 375 g), corte de carne de vacuno cruda (375 g), pechuga de pollo deshuesada cruda sin piel (25 g), muslo de pollo crudo con piel (25 g), pollo mecánicamente seccionado (25 g), carne de cerdo triturada cruda (25 g), espinaca fresca (25 y 375 g) y sidra de manzana (25 ml). El protocolo Standard II también está validado por AOAC-PTM para la detección simultánea de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. en carne de vacuno triturada cruda. Un resultado positivo con iQ-Check debe considerarse como no definitivo y se recomienda que se confirme mediante métodos de referencia normalizados. Número de certificado 020801.

Apartado 11

Referencias

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

ISO 16654. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *E. coli* O157.

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

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2015). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 5.09: Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2021). Microbiology Laboratory Guidebook –Chapter 5C.02. Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2020). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4a. Diarrheagenic *Escherichia coli*.

Apartado 12

Historial de revisiones

Fecha de lanzamiento	Número de documento	Modificación
Mayo de 2020	10000131517 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Renovación y ampliación de la validación AFNOR para: <ul style="list-style-type: none"> - muestras de carne de 25 y 375 g - "O157_H7 Fast" APF - Ampliación AOAC - Nuevo diseño del documento y actualización de referencias, contenido, método de referencia USDA y confirmación de colonias - Cambio en el número de documento–versión anterior 808473 REV D
Diciembre 2022	10000131517 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Se han añadido nuevas referencias para los consumibles - Sustitución de la sección de protocolo por un cuadro resumen - Extensión AFNOR: Sistema de PCR en tiempo real CFX Opus Deepwell System y actualización al software CFX Manager IDE versión 3.1 - Aclaración del protocolo de interpretación de resultados - Actualización de contenidos generales
Marzo de 2024	10000131517 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - Extensión AOAC: Hisopos MicroTally - Aclaración del protocolo de extracción
Abril de 2025	10000131517 Ver D	<ul style="list-style-type: none"> - Extensión de validación para el software CFX Maestro IDE versión 4.0

Apéndice — Tabla de cálculo de la mix de PCR

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

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

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

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

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

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



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit

用户指南

可用于食物和环境样本中大肠杆菌 O157:H7 的实时荧光定量 PCR 检测

目录号 3578114

BIO-RAD

目录

第 1 部分	简介	1
第 2 部分	iQ-Check <i>E. coli</i> O157:H7 技术	1
第 3 部分	成分列表	2
第 4 部分	保质期及储存条件	2
第 5 部分	其他仪器、试剂与耗材	2
	仪器	2
	试剂和耗材	3
第 6 部分	最佳实验结果的安全预防措施及建议	4
第 7 部分	操作方案	6
	样本增菌	6
	去除游离 DNA 处理	7
	DNA 提取	7
	实时荧光定量 PCR	9
	数据分析	9
第 8 部分	阳性结果的确认	11
第 9 部分	使用 iQ-Check Kit 确认单菌落	11
第 10 部分	测试性能和验证	12
第 11 部分	参考资料	12
第 12 部分	修订记录	13
	附录 — PCR 混合物计算指南	14

第 1 部分

简介

传统的细菌学检测方法往往耗时较长且复杂繁琐。相比之下，iQ-Check *Escherichia coli* O157:H7 是一种简单且快速的定性检测方法，可以检测在食物产品和环境样本中发现的大肠杆菌 O157:H7 特有的特异性 DNA 序列。利用实时聚合酶链反应 (PCR)，通过荧光探针可以同时扩增和检测大肠杆菌 O157:H7 的特异性 DNA 序列。可以处理多达 94 个样本，污染风险极低，流程简单方便。该试剂盒的预期用户是经过专门培训的负责检测大肠杆菌 O157:H7 的实验室人员。采用这种检测方法在样本增菌后数小时内即可获得结果。

第 2 部分

iQ-Check *E. coli* O157:H7 技术

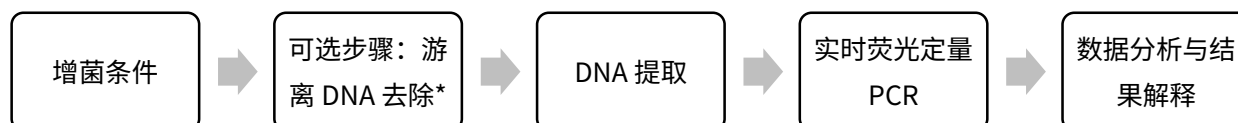
iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit 是一项基于 PCR 基因扩增和实时荧光检测的技术。该试剂盒的即用型 PCR 试剂包含大肠杆菌 O157:H7 特异性寡核苷酸（引物和探针），以及 DNA 聚合酶和核苷酸。我们将检测过程和数据进行了优化，优化了检测和数据分析，以用于 Bio-Rad 实时 PCR 仪，例如 CFX96 Touch Deep Well 或 CFX Opus Deepwell 实时 PCR 检测系统。

PCR 是分子生物学中使用最广泛的技术，它能在短时间内大量扩增目标 DNA。在 PCR 反应过程中，几个加热和冷却循环使 DNA 变性，随后引物退火到目标区域，此时 DNA 聚合酶使用这些引物和三磷酸脱氧核苷酸 (dNTP) 来扩增 DNA，从而生成目标 DNA 的扩增产物，也称“扩增子”。

在实时 PCR 中，特异性探针用于在扩增过程中与扩增子杂交，从而检测目标 DNA。这些探针与荧光基团相连，仅在与目标序列杂交时才会发出荧光。探针可与大肠杆菌 O157:H7 特异性 DNA 序列杂交，与该探针连接的荧光基团为 FAM。当不存在目标 DNA 时，无法检测到荧光。随着每轮扩增后扩增量的增加，荧光强度也随之增强。光模块可以在每个 PCR 周期的退火步骤中测量荧光基团，而相关的软件可以绘制荧光强度与周期数的关系图。

反应混合物中包含合成的 DNA 内部质控。该对照与大肠杆菌 O157:H7 目标 DNA 序列同时用特异性探针扩增，并由第二个荧光团检测。

该检测方法可对培养增菌后的选定食品和环境样本中的大肠杆菌 O157:H7 进行定性检测。其中主要包括以下几个步骤：



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

第 3 部分

成分列表

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit 所含试剂可进行 96 次检测（共 94 个样本）。

试剂编号	试剂	数量, ml
A	裂解液	1 瓶, 20
B	荧光探针	1 管, 0.55
C	扩增混合液	1 管, 4.4
D	PCR 阴性对照	1 管, 0.5
E	PCR 阳性对照	1 管, 0.25
F	裂解珠	1 瓶 (17.6 g)

第 4 部分

保质期及储存条件

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

第 5 部分

其他仪器、试剂与耗材

仪器

- 实验室专用拍打式无菌均质器：用于检测样本的混匀处理
- 恒温箱：用于微生物增菌
- 专用于在无菌 1.5 ml 锥形螺帽管中提取：
 - 台式离心机（可调至 10000 – 12000 x g）
 - 干式恒温器（可调至 37 ± 2°C 和/或 95 – 100°C）
- 提取专用 Deep Well 板：
 - 加热振荡混合仪/搅拌器-培养箱（可维持 37 ± 2°C 和/或 95-100°C 恒温，混合速度至少为 1,300 rpm）
- 涡旋振荡器
- 磁力搅拌板

第 5 部分 其他仪器、试剂与耗材

- 微量移液枪 (20 µl, 200 µl, 1000 µl)
- 移液枪枪头 (灭菌, 独立包装)
- Bio-Rad 实时 PCR 系统, * 例如 CFX96 Touch Deep Well (目录号 3600037) 或 CFX Opus Deepwell (目录号 17007991) 实时 PCR 系统
- Bio-Rad iQ-Check Prep System: 用于全自动 DNA 提取和 PCR 板设置 (目录号 3594911)

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

*请联系 Bio-Rad 技术支持获取推荐仪器的信息。

试剂和耗材

- 增菌培养基, 缓冲蛋白胨水 (例如, BPW Plus 目录号 3564684, 干粉, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 瓶; 3555789, 2.3 L x 5 袋; 3555790, 5 L x 2 袋。BPW Standard 目录号 12013259, 干粉, 500 g; 12013258 干粉, 5 kg; 12013260 5 L x 2 袋)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (目录号 3594970)
- STEC 添加剂 (目录号 3564005)
- iQ-Check Purification Reagent (目录号 12012383)
- 环境样本专用:
 - 采样海绵
 - 采样棉签
 - 用于海绵和拭子的中和肉汤, 例如 Dey-Engley (D/E) 或 HiCap Neutralizing Broth, 或 Lethen broth
- 专用于管内提取
 - 1.5 ml 锥形螺旋盖管, 无菌 (目录号 17010678)
- 专用于在 Deep Well 板内提取
 - 96 孔 Deep Well 板 (iQ-Check Deep Well Microplates, 目录号 3594900)
 - 塑料密封膜 (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, 目录号 3590139)
 - PCR 板密封膜 (X-Pierce Films, 目录号 3593977, 或 Pre-Pierced Plate Sealing Film, 目录号 3600040, 仅限北美)
- 专用于 iQ-Check Prep System:
 - 60 ml 稀释容器 (目录号 3594904)
 - 带滤芯移液器枪头 (目录号 3594902 或 12014486, 50 µl x 5760; 3594903 或 12014483, 1000 µl x 3840)
 - PCR 混合管 (目录号 12016673, 5 ml x 25)

第 6 部分 最佳实验结果的安全预防措施及建议

- PCR 板、管子、密封胶带和盖子
- 适用于 20、200 和 1000 µl 微量移液管的无菌带滤芯移液器枪头
- Combitip 移液器或等效重复移液器的吸头；无菌，独立包装
- 2 ml 和 5 ml 无菌试管
- 添加新生霉素和亚硝酸钾的 RAPID'*E.coli* O157:H7 琼脂（目录号 3564748，100 g）
（可在 AOAC 验证范围外使用）
- 用于确认：CT-SMAC 琼脂，和 O157 与 H7 乳胶试验
- 无粉手套
- 蒸馏无菌水
- 漂白剂，5%
- DNA AWAY 或 RNase AWAY 等清洁剂

第 6 部分

最佳实验结果的安全预防措施及建议

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

第 6 部分 最佳实验结果的安全预防措施及建议

- iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit
 - 根据全球化学品统一分类和标签制度 (GHS)，测试试剂盒中的所有物质或混合物均属于分类产品。与酸接触可能会释放有毒气体。如果使用得当，则不需要特别的预防措施。如果产品被吸入，请马上吸入新鲜空气并在出现投诉时咨询医生。眼睛接触产品后，用流水冲洗睁开的眼睛几分钟。如果吞下产品，请催吐并寻求医疗帮助。
- iQ-Check Prep System
 - iQ-Check Prep System 的不当使用可能会导致身体伤害或仪器损坏。如果处理不当，某些组件可能会有因过热而造成人身伤害的风险。为安全使用，iQ-Check Prep System 只能由经过适当培训的合格实验室人员操作。只能由 Bio-Rad 现场服务工程师执行仪器维修
- CFX96 Touch Deep Well 或 CFX Opus Deepwell 实时 PCR 检测系
 - CFX96 Touch 或 CFX Opus Deep Well 实时 PCR 检测系统使用不当可能会导致人身伤害或仪器损坏。如果处理不当，某些组件可能会有因过热而造成人身伤害的风险。为安全使用，CFX96 Touch 或 CFX Opus Deep Well 实时 PCR 检测系统只能由经过适当培训的合格实验室人员操作。只能由 Bio-Rad 现场服务工程师执行仪器维修
- 增菌条件
 - 用户应阅读、理解和遵循 iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit 说明中的所有安全信息。保留安全说明以备将来参考。为降低与接触化学品和生物危害相关的风险，请在经过培训的人员控制下，在配备适当的实验室进行病原体检测。始终遵循标准的实验室安全规范，包括在处理试剂和受污染的样品时穿戴适当的防护服和护目镜。扩增后避免接触增菌培养液和试剂管。根据当前行业标准处理增菌样品。
 - 致病性大肠杆菌属于生物安全 2 级或 3 级生物。增菌生物样本具有传播传染病的潜力。遵守所有适用的地方、州/省和/或国家有关生物废物处置的法规。穿戴合适的防护设备，包括但不限于：防护眼镜、面罩、衣服/实验服和手套。所有工作都应在配备适当安全设备（例如隔离装置）的设施中进行。在处理潜在传染性材料之前，个人应根据适用的法规和公司/机构要求接受培训
 - 测试完成后，所有可能含有病原体的材料和介质都应按照当前处理污染废弃物的行业标准进行净化（即在 120°C 下高压灭菌 20 min）。有关更多信息和当地处理法规，请参阅安全数据表

第 7 部分

操作方案

A. 样本增菌

强烈建议您在阅读完全部操作流程后才开始进行检测。

强烈建议使用带有过滤功能的增菌袋

使用前请将增菌液根据需求放置于适当的孵育温度下（37°C 或 41.5°C）。

下表概述了可供使用的不同方案，具体取决于应用和验证范围。

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit 是 USDA MLG 5C.02 标准方法的一部分，可在本方法所示的增菌后使用。

NF 验证 BRD 7/15-06/08		
范围（食品基质）	样本制备	增菌/DNA 提取
生肉（不包括禽肉） ^{1,2} (25 g)	在 9 x <i>n</i> ml BPW 中均匀混合 <i>n</i> g 样本 (225 ml 中混合 25 g)	Easy II 提取 <ul style="list-style-type: none"> 在 41.5±1°C 下培养 8–16 hr 管/Deep Well
生肉（不包括禽肉） ^{1,2} (375 g)	在 3 x <i>n</i> ml BPW 中均匀混合 <i>n</i> g 样本 (1125 ml 中混合 375 g)	Easy II 提取 <ul style="list-style-type: none"> 在 41.5±1°C 下培养 10–18 hr 管/Deep Well
AOAC PTM 020801		
范围（食品基质）	样本制备	增菌/DNA 提取
生碎牛肉、新鲜菠菜、 苹果醋 (25 g)	在 9 x <i>n</i> ml 预热 BPW 中均匀混合 <i>n</i> g 样本 (225 ml 中混合 25 g)	Easy I 提取 <ul style="list-style-type: none"> 在 41.5±1°C 下培养 8–24 hr 管/Deep Well
生碎牛肉 ² (25 g)	在 9 x <i>n</i> ml 预热 BPW 中均匀混合 <i>n</i> g 样本 (225 ml 中混合 25 g)	Standard II 提取 <ul style="list-style-type: none"> 在 36±1°C 下培养 8–12 hr 管/Deep Well
生碎牛肉和生牛肉边 角料 ^{1,3} (375 g)	在 3 x <i>n</i> ml 预热 BPW 中均匀混合 <i>n</i> g 样本 (1125 ml 中混合 375 g)	Easy II 提取 <ul style="list-style-type: none"> 在 41.5±1°C 下培养 8–22 hr 管/Deep Well
新鲜菠菜 ^{1,3} (375 g)	在 3 x <i>n</i> ml 预热 BPW 中均匀混合 <i>n</i> g 样本 (1125 ml 中混合 375 g)	Easy II 提取 <ul style="list-style-type: none"> 在 41.5±1°C 下培养 10–22 hr 管/Deep Well
带皮和不带皮的生鸡 肉、机械分离的鸡肉和 生碎猪肉 (25 g)	在 9 x <i>n</i> ml 预热 BPW 中均匀混合 <i>n</i> g 样本 (225 ml 中混合 25 g)	Easy II 提取 <ul style="list-style-type: none"> 在 41.5±1°C 下培养 8–22 hr 管/Deep Well

第 7 部分 操作方案

MicroTally 拭子 ^{1,4}	将拭子放入 200 mL 预热的 BPW 中，使用均质器或用手按摩 30 秒，将拭子均匀混匀	Easy II 提取 <ul style="list-style-type: none">在 41.5±1°C 下培养 8–22 hr管/Deep Well
环境表面样品	在 10 ml 预热 BPW 中均匀混合拭子 在 60-90 ml 预热 BPW 中均匀混合海绵	Easy II 提取 <ul style="list-style-type: none">在 41.5±1°C 下培养 8–24 hr管/Deep Well

¹ 验证中需还使用了“O157_H7 Fast” Application Protocol File，以缩短 PCR 扩增时间。可联系您的 Bio-Rad 销售代表获取更多信息。

² 沙门氏菌同时检测方案。

³ 采用 iQ-Check *Salmonella* II 和 iQ-Check STEC VirX Kits 的协调方案

B. 去除游离 DNA 处理

iQ-Check Free DNA Removal Solution（目录号 3594970）提供了去除游离 DNA 的理想方法（在当前 AOAC 和 NF 范围以外）。使用过程中请遵守 Bio-Rad 用户指南中的建议。

C. DNA 提取

以下是我们的建议：

1. 检测开始前，预热恒温器或加热振荡混合仪。将其设置为 95 – 100°C。移液时将裂解液置于磁力搅拌板上以中等速度搅拌，使其保持悬浮状态。
2. 避免晃动增菌袋和采集大块食品碎屑。若食品样本中含有脂肪上清液，只需收集脂肪层以下的样本。
3. 小心打开离心管和孔板，避免交叉污染。
4. 在直接移液到预穿孔密封膜前，冷却 Deep Well 板。
5. 使用磁力搅拌棒使裂解剂保持悬浮状态。以中等速度搅拌时进行移液。
6. 使用裂解液时，首先用手轻轻晃动裂解液。然后，瓶中磁力搅拌棒以中速搅拌液体时移液，使液体保持呈悬浮状态。
7. 按照以下步骤重组最终裂解液：
 - a. 小心将 F 试剂（裂解珠）中的所有内含物倒入 A 试剂（裂解液）中。
 - b. 使用带有足够宽吸头的耗材，以便对均质后的裂解液进行移液。
 - c. 裂解液与裂解珠混合后（试剂 A + F）在 4°C 条件下保存可有 6 个月保质期。

Standard II 操作方案

1. 将 1 ml 倒出的增菌样本收集到试管或 Deep Well 板的孔中。用塑料薄膜密封 Deep Well 板。

注意：晃动悬浮液使培养物混匀，然后等碎片沉淀后再采集样本。

第 7 部分 操作方案

2. 以 10000 – 12000 x g 离心试管 5 min。废弃上清液。以 2250 x g 离心 Deep Well 板 20 min，手动或使用 DW40 废弃上清液。
3. 向颗粒中加入 200 μ l 均质后的裂解液（试剂 A + F），对试剂进行上下移液，使颗粒重新悬浮。关闭试管，或用预穿孔密封膜将 Deep Well 板密封。

注意：首先用手轻轻晃动裂解液，使珠子悬浮。

4. 将试管放入细胞破碎器中 3 ± 1 min，或在 95–100°C 下以 1300 – 1600 rpm 的速度摇动板搅拌器恒温箱中的 Deep Well 板 15 – 20 min。
5. 在 95-100°C 的适当恒温器中培养 10 – 15 min。
6. 高速涡旋试管，并以 10000 – 12000 x g 离心 5 min。以 2250 x g 离心 Deep Well 板 2 min。

如需暂时停止检测，推荐在此步骤暂停。

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

Easy I 流程

1. 向离心管或 Deep Well 板中加入 100 μ l 混匀的裂解液（A 试剂）。
2. 加入 100 μ l 增菌后的样品。通过上下移液混合，并用盖子封闭离心管或用预先刺穿的密封膜密封 Deep Well 板。
3. 在 95 – 100°C 的适当恒温器中孵育 10 – 15 min，或在 1300 rpm 的加热振荡混合仪中孵育 15 – 20 min。
4. 高速涡流管。
5. 如果使用 Deep Well 板，让其冷却至室温 (20 – 25°C)。
6. 将离心管在 10000 – 12000 x g 条件下至少离心 2 min。Deep Well 板不需要进行离心。

如需暂时停止检测，推荐在此步骤暂停。

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

Easy II 流程

1. 向 Deep Well 板的孔中加入 100 μ l 均质后的裂解液（试剂 A + F）。

注意：首先用手轻轻晃动裂解剂，使珠子悬浮。

2. 加入 100 μ l 增菌后的样品。

注意：晃动悬浮液使培养物混匀，然后等碎片沉淀后再采集样本。

3. 用移液枪上下吹打溶液，直至安全混合均匀。
4. 盖上离心管盖，或用预穿孔密封膜将 Deep Well 板密封。
5. 将试管置于细胞破碎器中 3 ± 1 min。在 95-100°C 的恒温器中孵育试管 10-15 分钟。

第 7 部分 操作方案

6. 如果将振荡混合仪用于管或深孔形式，则将管或深孔板在振荡混合仪中孵育，在 1300 rpm、95 – 100°C 条件下搅拌 15 – 20 min。
7. 将离心管高速涡旋振荡，然后在 10000 – 12000 x g 条件下至少离心 2 min。Deep Well 板不需要进行离心。如需暂时停止检测，推荐在此步骤暂停。

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

D. 实时荧光定量 PCR

仪器和软件设置

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

PCR 混合物的准备

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

注：PCR 混合物（B 试剂 + C 试剂）制备完后，应立即使用。在 2-8°C 条件下最多可稳定保存 1 hr。

2. 根据您的实验设计方案，向每孔中加入 45 µl PCR 混合物。
3. 加入 5 µl 样本，或试剂 D（阴性对照）或试剂 E（阳性对照）。移液前不要涡旋振荡样品。将上样孔密封。请小心移液，避免孔底部产生气泡。可选步骤：对密封后的 PCR 板或联管进行离心操作（快速旋转），以消除气泡。
4. 将 PCR 板或 PCR 联管放入热循环仪中。确保将 A1 孔放置在左上角的位置。最后关上 PCR 仪器盖。

运行 PCR

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

E. 数据分析

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

结果解释

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

借助 CFX Manager IDE 软件或 CFX Maestro IDE 软件，可以对 Bio-Rad 实时 PCR 检测系统进行完整的自动化分析。如果需要额外支持，请联系您的 Bio-Rad 技术支持团队。

第 7 部分 操作方案

对照

在解释样本结果之前，需核实阳性和阴性对照。

当对照出现下表所示结果时，表示实验有效。否则必须重新进行 PCR 反应。

	大肠杆菌 O157:H7 检测 (FAM 通道)	内部对照检测 (HEX 通道)
阴性对照	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
阳性对照	$26 \leq Cq \leq 36$	NA

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

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

样本

阳性 iQ-Check *E. coli* O157:H7 PCR 检测必须显示典型的扩增曲线，并且 FAM 荧光团的 Cq 值 ≥ 10 。

- 如果两个通道的 Cq 值均小于 10，请核实原始数据曲线是否是正常的扩增曲线（具有平坦的基线，随后荧光发射呈指数快速增加，最后趋于平坦）。如果曲线正常，则可视为 **大肠杆菌 O157:H7 阳性样本**。如果没有 FAM Cq 值（Cq = N/A），或曲线不是典型扩增曲线，则必须分析该样本的内部质控：
 - 如果无 FAM Cq 值但内部对照 Cq ≥ 28 ，则该样本视为 **大肠杆菌 O157:H7 阴性样本**
 - 如果内部对照也无 Cq 值（Cq = N/A），说明 PCR 反应未正常进行。稀释样本（用 10 μ l DNA 提取物在蒸馏水中 1:10 稀释），使用 5 μ l 稀释液进行扩增，并重复 PCR 检测
 - 如果内部对照 Cq 值 < 28 ，则无法解释结果。需核实阈值是否设置正确，或原始数据曲线是否为正常扩增曲线。如果曲线不具有典型形状，则需重新进行 PCR 检测

样本结果解释如下表所示：

大肠杆菌 O157:H7 检测 (FAM)	内部对照检测 (HEX 通道)	结果解释
Cq ≥ 10	NA	阳性
Cq = N/A	Cq > 28	阴性
Cq = N/A	Cq = N/A	反应抑制*

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

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

第 8 部分

阳性结果的确认

在 NF 验证认证方法的情况下，所有 iQ-Check *E. coli* O157:H7 阳性检测结果必须通过下列方法证实：

1. 使用 CEN 或 ISO 标准化方法中描述的经典检测方法从样本开始进行证实。
2. 使用以下两种方法之一，从 BPW 增菌开始：
 - a. 在 CT-SMAC 琼脂上分离（无论是否先进行免疫分离），然后在非选择性琼脂菌上进行菌落分离，之后在 1-3 特有菌落进行 O157 和 H7 乳胶试验。
 - b. 在 RAPID' *E. coli* O157:H7 显色培养基上分离（先进行免疫分离），然后在非选择性琼脂菌上进行菌落分离，之后在 1-3 特有菌落进行 O157 和 H7 乳胶试验。请参见 RAPID' *E. coli* O157:H7 显色培养基用户指南中的确认方法

如果 iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit 和上面列出的任一确认选项之间的结果不一致（特别是乳胶试验），则遵循必要的步骤以确保有效的结果。例如，增加免疫分离步骤，然后在 CT-SMAC 或 RAPID' *E. coli* O157:H7 琼脂上分离。

如果采用 AOAC PTM 验证方法，iQ-Check *E. coli* O157:H7 阳性结果为假定阳性，并建议按照适当的参考方法（例如 USDA MLG 或 FDA BAM）进行确认。

第 9 部分

使用 iQ-Check Kit 确认单菌落

iQ-Check *E. coli* O157:H7 Kit 也可用于确认平板培养基上的大肠杆菌 O157:H7 菌落。

1. 用牙签、无菌环或其他合适耗材（如移液枪枪头）从选择性或非选择性琼脂培养基上挑取一个单菌落。
2. 用 100 µl 胰蛋白胍盐或无菌蒸馏水在微量离心管中重悬菌落，并使用涡旋振荡器混匀。
3. 取 5 µl 悬浮液，加入 45 µl PCR 混合物（参见第 7 部分“操作流程”中的“D. 实时 PCR”），并按照 iQ-Check *E. coli* O157:H7 操作流程进行后续操作，获取数据并进行结果解释。

请注意，可按照 USDA MLG 5C.00 方法中描述的操作流程来进行菌落确认。

第 10 部分

测试性能和验证



BRD 07/15 - 06/08

农业企业的替代分析方法

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

iQ-Check *E. coli* O157:H7 (Easy II 方案) 经 NF 认证为参考方法 ISO 16654 (2001 年 7 月) 及其修正案 A1 (2017 年 6 月) 的替代方法, 用于检测 25 和 375 g 样品中生肉 (不包括禽肉) 中的大肠杆菌 O157:H7。验证遵循 NF EN ISO 16140-2:2016 标准中的操作流程, 并且使用了 CFX96、CFX96 Deep Well 和 CFX Opus Deepwell 实时 PCR 系统。相关软件程序为 CFX Manager 软件 IDE (版本 2.2 和更高版本) 或 CFX Maestro 软件 IDE (版本 4.0 及更高版本) 和 O157_H7 Fast APF。证书编号: BRD 07/15-06/08。有效期至: 有关 NF VALIDATION 认证有效期终止的更多信息, 请参见网站上提供的证书 <http://nf-validation.afnor.org/en>。



iQ-Check *E. coli* O157:H7 已由 AOAC 研究所根据性能测试法程序进行了验证, 用于生碎牛肉 (25 和 375 g)、生牛肉边角料 (375 g)、生无骨无皮鸡胸肉 (25 g)、带皮生鸡腿 (25 g)、生碎猪肉 (25 g)、新鲜菠菜 (25 g 和 375 g) 以及苹果醋 (25 ml) 中大肠杆菌 O157:H7 的检测。Standard 方案 II 也由 AOAC-RI 进行了验证, 用于生碎牛肉中大肠杆菌 O157:H7 的同时检测。iQ-Check 的阳性结果应被视为推定结果, 建议通过标准参考方法进行确认。证书编号 020801。

第 11 部分

参考资料

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

ISO 16654 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *E. coli* O157.

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

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2015). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 5.09: Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2021). Microbiology Laboratory Guidebook –Chapter 5C.02. Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2020). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4a. Diarrheagenic *Escherichia coli*.

第 12 部分

修订记录

发布日期	文件编号	变更
2020 年 5 月	10000131517 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - AFNOR 验证的更新和延期： <ul style="list-style-type: none"> - 25 g 和 375 g 肉样本 - “O157_H7 Fast” APF - AOAC 扩展 - 新文档设计和更新了参考文献、内容、USDA 参考方法和菌落确认 - 文件编号更改 – 先前版本 808473 REV D
2022 年 12 月	10000131517 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - 增加了耗材的新目录号 - 将方案部分替换为汇总表 - AFNOR 扩展：CFX Opus Deepwell 实时 PCR 系统的，并升级到 CFX Manager 软件 IDE 版本 3.1 - 结果解释方案的澄清 - 一般内容更新
2024 年 3 月	10000131517 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - AOAC 扩展: MicroTally 拭子 - 澄清提取方案
2025 年 4 月	10000131517 Ver D	<ul style="list-style-type: none"> - CFX Maestro IDE 软件版本 4.0 的验证扩展

附录 — PCR 混合物计算指南

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

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

请访问 bio-rad.com/iqcheck 了解更多信息。

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

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

此处使用的所有商标均为其各自所有者的财产。

BIO-RAD

**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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