
iQ-Check STEC VirX Kit

User Guide

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

Catalog # 3578139

BIO-RAD

Table of Contents

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

Section 1

Introduction

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

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

The iQ-Check STEC VirX Kit, based on a multiplex real-time PCR system, allows the detection of the *stx1/stx2* and *eae* virulence genes in one well within a few hours after microbiological enrichment. A sample that would be positive for *stx1/stx2* with or without *eae* could then be tested with the iQ-Check STEC SerOII Real-Time PCR Kit, depending on local requirements.

Section 2

The iQ-Check STEC VirX Technology

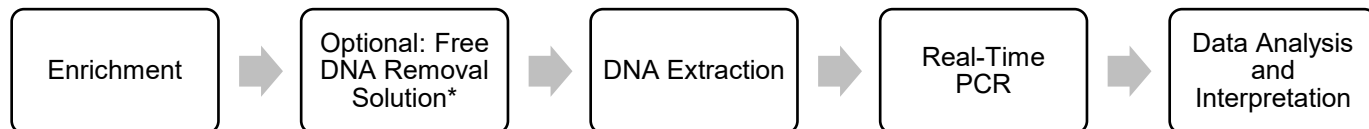
The iQ-Check STEC VirX Kit is a test based on gene amplification and detection by real-time PCR. The kit's ready-to-use PCR reagents contain oligonucleotides (primers and probes) specific for *stx1/stx2* and *eae* virulence genes, as well as DNA polymerase and nucleotides. Detection and data analysis are optimized for use with a Bio-Rad real-time PCR instrument, such as the CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System.

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

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

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

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



* 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 STEC VirX Kit contains sufficient reagents for 96 tests (94 samples).

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

Section 4 Shelf Life and Storage

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

Section 5 Materials Required but Not Supplied

Equipment

- Lab paddle blender for homogenizing test samples
- Incubator for sample microbiological enrichment
- Specific for extraction in sterile 1.5 ml conical screwcap tubes
 - Benchtop centrifuge capable of 10,000–12,000 x g
 - Dry heat block at 37 ± 2°C and/or 95–100°C
- Specific for extraction in deep well plate
 - Heating thermoshaker/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

- 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)
- Enrichment medium (optional USDA standard enrichment): mTSB (for example, catalog #3564426, dehydrated, 500g) plus casamino acids and novobiocin
- Selective STEC Supplement (catalog #3564005)
- PIF Supplement (catalog #12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalog #3594970)
- iQ-Check STEC SerO II PCR Detection Kit (catalog #12013174)
- iQ-Check Purification Reagent (catalog #12012383)
- Specific for environmental samples
 - Environmental sponges
 - Environmental swabs
 - Neutralizing broth for sponges and swabs, such as Dey-Engley (D/E) or HiCap Neutralizing Broth, or Lethen broth
- Specific for extraction in tubes
 - 1.5 ml conical screwcap tubes, sterile (for example, catalog #2240110XTU)
- Specific for extraction in a deep well plate
 - 96-well deep well plate (iQ-Check Deep Well Microplates, catalog #3594900)
 - Plastic sealing film (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, catalog #3590139)

- PCR plate sealing film (X-Pierce Films, catalog #3593977, or Pre-Pierced Plate Sealing Film, #3600040, North America only)
- Specific for iQ-Check Prep System
 - 60 ml dilution container (catalog #3594904)
 - Filter tips (catalog #3594902 or 12014486, 50 µl x 5,760; 3594903 or 12014483, 1,000 µl x 3,840)
 - PCR mix tubes (catalog #12016673, 5 ml x25)
- PCR plates, tubes, sealing tape, and caps
- Sterile filter tips adaptable to 20, 200, and 1,000 µl micropipets
- Tips for Combitip pipets or equivalent repeat pipettors; sterile, individually packaged
- 1 and 10 ml pipets
- 2 and 5 ml sterile test tubes
- Powder-free gloves
- Distilled sterile water
- Bleach, 5%
- Cleaning agent such as DNA AWAY or RNase AWAY

Section 6

Safety Precautions and Recommendations for Best Results

- This test must be performed by trained personnel
- Samples and enrichment cultures must be handled as potentially infectious material and discarded according to local rules and regulations
- All potentially infectious material should be autoclaved before disposal
- The quality of results depends on strict compliance with Good Laboratory Practices (for example, the EN ISO 7218 standard), especially concerning PCR:
 - Never circulate laboratory equipment (pipets, tubes, etc.) from one workstation to another
 - Always use a positive control and a negative control for each series of amplification reactions
 - Do not use reagents after their expiration date
 - Vortex reagents from the kit before using them to ensure homogeneity
 - Periodically verify the accuracy and precision of pipets, as well as correct functioning of the instruments

Section 6

- Change gloves often, especially if you suspect they are contaminated
- Clean work spaces periodically with 5% bleach and other decontaminating agents such as DNA AWAY
- Use powder-free gloves and avoid fingerprints and writing on tube caps. Both will interfere with data acquisition
- It is strongly advised to follow the general requirements described in the standard EN ISO 22174:2005 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food pathogens — General requirements and definitions)
- iQ-Check STEC VirX Kit
 - All substances or mixtures in the test kit are classified products, according to the Globally Harmonized System (GHS). Contact with acids may cause release of toxic gases. No special precautions are necessary if used correctly. If the product is inhaled, supply fresh air and consult a doctor in case of complaints. After eye contact with the product, rinse opened eye for several minutes under running water. If the products are swallowed, induce vomiting and call for medical help
- iQ-Check Prep System
 - Improper use of the iQ-Check Prep System may cause personal injury or damage to the instrument. Some components may pose a risk of personal injury due to excessive heat if improperly handled. For safe use, the iQ-Check Prep System must be operated only by qualified laboratory personnel who have been appropriately trained. Servicing of instrument must be performed only by Bio-Rad field service engineers
- CFX96 Touch Deep Well 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 Deep Well Real-Time PCR Detection System must be operated only by qualified laboratory personnel who have been appropriately trained. Servicing of instrument must be performed only by Bio-Rad Field Service Engineers
- Enrichment
 - The user should read, understand, and follow all safety information in the instructions for the iQ-Check STEC VirX Kit. Retain the safety instructions for future reference. To reduce the risks associated with exposure to chemicals and biohazards, perform pathogen testing in a properly equipped laboratory under the control of trained personnel. Always follow standard laboratory safety practices, including wearing appropriate protective apparel and eye protection while handling reagents and contaminated samples. Avoid contact with the contents of the enrichment media and reagent tubes after amplification. Dispose of enriched samples according to current industry standards
 - Depending on local regulations, pathogenic *E. coli* is a Biosafety Level 2 or Level 3 organism. Biological samples such as enrichments have the potential to transmit infectious diseases. Follow all applicable local, state/provincial, and/or national regulations on disposal of biological waste. Wear appropriate protective equipment, which includes but is not limited to: protective eyewear, face shield, clothing/lab coat, and gloves. All work should be conducted in properly equipped facilities utilizing the appropriate safety equipment (for example, physical containment devices). Individuals should be trained in accordance with applicable

regulatory and company/institution requirements before working with potentially infectious materials

- When testing is complete, all materials and media possibly containing pathogens should be decontaminated following current industry standards for the disposal of contaminated waste (that is, autoclave for 20 min at 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:

Section 7

AOAC PTM 121203		
Scope (Matrices)	Sample Preparation	Enrichment/DNA Extraction
Raw ground beef and raw beef trim (375 g) ^{1,2}	Homogenize <i>n</i> g food 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
MicroTally swab ¹	Homogenize swab in 200 ml prewarmed BPW	Easy II extraction <ul style="list-style-type: none"> Incubate 8–22 hr at 41.5 ± 1°C Tube/deep well format
Fresh spinach (375 g) ^{1,2}	Homogenize <i>n</i> g food 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
Cannabis flower (10 g), cannabis infused chocolate and gummies (25 g), cannabis-derived concentrates (5 g), hemp (25 g) ^{1,3}	Homogenize <i>n</i> g food in 9 x <i>n</i> ml BPW (25 g in 225 ml or 5 g in 45 ml)	Easy I extraction <ul style="list-style-type: none"> Incubate 18–22 hr at 37 ± 1°C Tube/deep well format
All-purpose flour (375 g) ^{1,3}	1:4 dilution <ul style="list-style-type: none"> Homogenize <i>n</i> g food in 3 x <i>n</i> ml prewarmed BPW + PIF Supplement (375 g in 1,125 ml + 150 µl prepared PIF Supplement) After enrichment, transfer a 1–5 ml aliquot to a tube or deep well plate and allow to sit for at least 30 min before proceeding to DNA extraction 1:10 dilution <ul style="list-style-type: none"> Homogenize <i>n</i> g food in 9 x <i>n</i> ml prewarmed BPW + PIF Supplement (375 g in 3,375 ml + 375 µl prepared PIF Supplement) 	Easy II extraction <ul style="list-style-type: none"> Incubate 22 ± 2 hr at 37 ± 1°C Tube/deep well format
MicroVal		
Scope (Matrices)	Sample Preparation	Enrichment/DNA Extraction
Raw meat (up to 375 g) excluding poultry ^{1,5}	Homogenize <i>n</i> g food 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 10–18 hr at 41.5 ± 1°C Tube/deep well format
Raw milk products (25 g) ^{1,5}	Homogenize <i>n</i> g food in 9 x <i>n</i> ml prewarmed BPW + STEC Supplement (25 g in 225 ml + 2.5 ml prepared STEC Supplement)	Easy II extraction <ul style="list-style-type: none"> Incubate 16–24 hr at 41.5 ± 1°C Tube/deep well format
Flour and raw dough products (375 g) ^{1,5}	1:4 dilution <ul style="list-style-type: none"> Homogenize <i>n</i> g food in 3 x <i>n</i> ml BPW + STEC Supplement (375 g in 1,125 ml + 15 ml prepared STEC Supplement) 	Easy II extraction <ul style="list-style-type: none"> Incubate 18–26 hr at 41.5 ± 1°C Tube/deep well format
Multicomponent foods, meal components, raw produce and fruit (25 g)	Homogenize <i>n</i> g food in 9 x <i>n</i> ml prewarmed BPW (25 g in 225 ml)	Easy II extraction <ul style="list-style-type: none"> Incubate 18–26 hr at 41.5 ± 1°C Tube/deep well format
USDA FSIS MLG 5C.02		
Scope (Matrices)	Sample Preparation	Enrichment/DNA Extraction
Meat products (325 g), environmental and carcass sponges	Homogenize sample in mTSB or mTSB+n as described in the MLG 5C.02 method	Easy II extraction <ul style="list-style-type: none"> Incubate 15–24 hr at 42 ± 1°C Tube/deep well format
Scope (Matrices)	Sample Preparation	Enrichment/DNA Extraction
Environmental surface samples	Homogenize swabs in 10 ml and sponges in 90 ml of prewarmed BPW (it is recommended to use neutralizing broth that does not contain aryl sulfonate complex)	Easy II extraction <ul style="list-style-type: none"> Incubate 8–22 hr at 41.5 ± 1°C Tube/deep well format

¹Validation includes the use of the iQ-Check Free DNA Removal Solution and of the “STEC VirX MLG Fast” or “STEC VirX ISO Fast” Assay Protocol Files for a reduced PCR run time

²Harmonized protocol with iQ-Check *E. coli* O157:H7 and iQ-Check *Salmonella* II Kits

³Harmonized protocol with iQ-Check *Salmonella* II Kit

⁵In the scope of MicroVal validation, the enriched broth can be stored up to 72 hr at 2–8°C

B. Free DNA Removal Treatment

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

C. DNA Extraction

General recommendations:

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 from just below this layer.
3. Open tubes and wells carefully to avoid any possible cross contamination.
4. Cool the deep well plate before pipetting directly through pre-pierced sealing film.
5. Use the magnetic bar to keep the lysis reagent in suspension. Pipet while it is stirring at medium speed.
6. Gently shake the lysis reagent by hand first to resuspend the resin. Then pipet while it is stirring at medium speed with the magnetic bar contained in the bottle, in order to keep it in suspension.
7. Reconstitute the final lysis reagent as follows:
 - a. Carefully pour all the contents from reagent F (lysis beads) into reagent A (lysis reagent).
 - b. Use consumables with a wide enough tip to allow pipetting of the homogenized lysis reagent.
 - c. Lysis reagent mixed with lysis beads (reagents A + F) has a shelf life of 6 months when stored at 4°C.

Easy I Protocol

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

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

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

Easy II Protocol

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

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

2. Add 100 µl of enriched sample.

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

Section 7

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 the tubes in the heat block at 95–100°C for 15–20 min.
6. If using the agitator-incubator for the tube or deep well format, incubate the tubes or deep well plate in the agitator- incubator under agitation at 1,300 to 1,600 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 instructions in the real-time PCR system user guide for iQ-Check Kits.

PCR mix preparation

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

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

2. Pipet 20 µl of the PCR mix into each well according to your plate setup.
3. Add 5 µl of DNA extract, reagent D (negative control), or reagent E (positive control). Do not vortex the sample before pipetting. Hermetically seal the wells of the plate or strips. It is important to avoid bubbles at the bottom of the wells by pipetting carefully. As an optional step, centrifuge the sealed PCR plate or tube strips (quick spin) to eliminate any bubbles.
4. Place the PCR plate or tube strips in the thermal cycler. Be sure to place the plate with the A1 well at the upper left corner. Close the reaction module.

Run PCR

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

E. Data Analysis

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

Interpreting results

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

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

Controls

Verify the positive and negative controls before interpreting sample results.

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

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

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

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

Samples

A positive STEC virulence gene test must show a typical amplification curve and must have a Cq value ≥ 10 in FAM (at minimum) and Cy5 channels.

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

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

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

Section 8

the curve does not have a characteristic shape, it will be necessary to repeat the PCR test

Interpretation of test results is summarized in the following table:

<i>stx1/stx2</i> Detection (FAM channel)	<i>eae</i> Detection (Cy5 channel)	Internal Control Detection (HEX channel)	Interpretation
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	NA	Positive – Test with iQ-Check SerO II kit
Cq ≥ 10	Cq = N/A	NA	Positive for <i>stx1/stx2</i> , negative for <i>eae</i> ¹
Cq = N/A	Cq ≥ 10	NA	Positive for <i>eae</i> , negative for <i>stx1/stx2</i> . Stop sample analysis
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 26	Negative
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition ²

¹Proceed to confirmation when required, for example, in the scope of MicroVal validation

²When all *stx1/stx2* and *eae* virulence genes and internal control detection give a Cq value = N/A, the sample must be tested again but diluted (1:10).

An invalid interpretation can be given when validation criteria are not met. Check the raw data and proceed as if the sample were inhibited. Interpretation of the test result and the confirmation process may vary depending on local regulations.

Section 8 Confirmation of Positive Results

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

In the scope of MicroVal validation, *stx* positive tests must be confirmed.

1. Streak 10 µl of enrichment to selective agar plates (TBX or CHROMAgar STEC). Incubate plates 18–24 hr at 37 ± 1°C.
2. Resuspend a single colony in 100 µl tryptone salt or BPW in a microcentrifuge tube and perform detection of virulence genes using iQ-Check STEC VirX kit. It is possible to pool 10 colonies together to test for virulence genes. If a positive result is obtained, colonies must be tested individually.
3. Use 5 µl of the suspension with 20 µl of PCR mix (see Section 7 D. Real-Time PCR) and follow the rest of the iQ-Check STEC VirX protocol for the data and results interpretation. DNA extraction is not necessary.
4. In the case of discrepant results between the iQ-Check STEC VirX Kit and direct confirmation, additional procedures are recommended.
5. Dilute the enrichment 1:100 in fresh broth (for example, 0.1 ml enrichment in 9 ml fresh BPW+STEC supplement). Incubate diluted enrichment 16–24 hr at 41.5 ± 1°C. Streak 10 µl of diluted enrichment to selective agar plates and incubate for 18–24 hr at 37 ± 1°C.

6. Screen up to 50 colonies as recommended in the ISO/TS 13136 method.

In the case of discrepant results between the iQ-Check STEC VirX Kit and any of the confirmation options listed above, follow the necessary steps to ensure valid results.

Section 9

Confirmation of Single Colonies Using iQ-Check Kit

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

1. Pick an isolated colony, selective or nonselective, from an agar plate with a toothpick, sterile loop, or other adapted consumable (for example, a pipet tip).
2. Resuspend the colony in 100 µl tryptone salt or distilled sterile water in a microcentrifuge tube. Homogenize using a vortexer.
3. Use 5 µl of the suspension with 20 µl of PCR mix (see Section 7 D. Real-Time PCR) and follow the rest of the iQ-Check STEC VirX protocol for the data and results interpretation. DNA extraction is not necessary.

Section 10

Test Performance and Validations



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



The iQ-Check STEC VirX method has been certified by MICROVAL NEN as an alternative to the reference method ISO13136:2012 for the detection of *stx* genes of STEC in raw milk products (25 g), raw meat products (375 g), flour and raw dough products (375 g), multicomponent foods, meal components, raw produce and fruit (25g). The validation protocol followed the ISO16140-2: 2016 standard and included the use of CFX96 Touch Deep Well and CFX Opus Deepwell Real-Time PCR systems, the CFX Manager Software IDE (v3.1 and later), the "STEC VirX ISO Fast" APF and, the use of the iQ-Check Free DNA Removal Solution as an option. Certificate number: 2021LR96

Section 11

References

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

Scientific Report of European Food Safety Authority (2009). Technical specifications for the monitoring

Section 12

and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food). EFSA Journal 7, 1366 [43 pp.].

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

ISO/TS 13136:2012 (E), Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups – Qualitative Method.

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

United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science (2019). Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. MLG 5C.02, Laboratory Guidebook Notice of Change, new chapter.

Section 12 Revision History

Release date	Document number	Change
August 2020	10000131516 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- New document design and update of references and content- Renewal and extension of AOAC validation for MicroTally Swabs, cannabis and cannabis infused products and “VirX Fast” APF- Update of the colony confirmation protocol- Integration of the MLG FSIS 5C.00 reference- Document number change – previous version 808474 REV C
June 2022	10000131516 Ver B	<ul style="list-style-type: none">- Update of enrichment and confirmation protocols associated with MicroVal validation- AOAC matrix extension for hemp and all-purpose flour- Replaced sample enrichment protocol section with summary table- Update of references
June 2023	10000131516 Ver C	<ul style="list-style-type: none">- MicroVal validation extension on different matrices (broad range of food scope) and on CFX Opus Deepwell and CFX Manager Software IDE v3.1- AOAC matrix extension for cannabis infused products and cannabis concentrates

Appendix — PCR Mix Calculation Guide

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

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

Visit [bio-rad.com/iqcheck](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 STEC VirX Kit

Guide d'utilisation

Test pour la détection par PCR en temps réel de gènes de virulence des *Escherichia coli* productrices de shigatoxines dans les échantillons alimentaires et environnementaux

N° de référence 3578139

The logo for BIO-RAD, featuring the text "BIO-RAD" in white, bold, uppercase letters inside a green rounded rectangular border.

Sommaire

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

Section 1

Introduction

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

Une flambée épidémique STEC est communément associée à la consommation de viande crue (le bœuf en particulier), mais également de produits laitiers et plus récemment de produits frais. Un échantillon positif à la fois pour les cibles *stx1/stx2* et *eae* nécessite généralement un test supplémentaire pour l'identification des principaux sérogroupes d'*E. coli*.

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

Section 2

Technologie iQ-Check STEC VirX

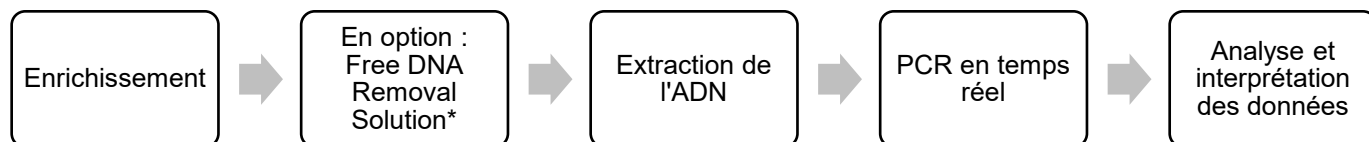
iQ-Check STEC VirX Kit est fondé sur l'amplification et la détection des gènes par PCR en temps réel. Les réactifs PCR prêts à l'emploi de ce kit contiennent des oligonucléotides (amorces et sondes) propres aux gènes de virulence *stx1/stx2* et *eae*, ainsi que de l'ADN polymérase et des nucléotides.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

La PCR (amplification en chaîne par polymérase) est une technique puissante utilisée pour générer de nombreuses copies d'ADN cible. Durant la réaction de PCR, la succession de cycles de chauffage et de refroidissement permet une dénaturation de l'ADN, suivie d'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 grâce à une hybridation avec les amplicons. Ces sondes sont liées à un fluorophore qui produit une fluorescence uniquement lors d'une hybridation avec la séquence cible. FAM est le fluorophore lié à la sonde qui s'hybride à la séquence d'ADN propre à *stx1/stx2*, tandis que Cy5 est lié à la sonde qui s'hybride au gène *eae*. En l'absence d'ADN cible, aucune fluorescence ne sera détectée. Étant donné que le nombre d'amplicons augmente avec chaque cycle d'amplification, l'intensité de la fluorescence augmente également. Le module optique mesure cette fluorescence à l'étape d'hybridation pour chaque cycle de PCR tandis que le logiciel associé enregistre l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles.

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

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



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

Section 3

Composants du kit

iQ-Check STEC VirX Kit 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 conservé à 2 – 8 °C. Les réactifs stockés à cette température peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur les tubes.

Section 5

Matériel requis non fourni

Matériel

- Stomacher pour homogénéiser les échantillons de test
- Incubateur pour l'enrichissement microbiologique des échantillons
- Matériel spécifique pour extraction en tubes coniques stériles à bouchon fileté 1,5 ml
 - Centrifugeuse de paillasse 10 000 – 12 000 x g
 - Bloc de chauffage à sec à 37 ± 2 °C et/ou 95 – 100 °C

Section 5

- 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 (n° de référence 3600037) ou CFX Opus Deepwell (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 iQ-Check Prep.

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

Produits

- Milieu d'enrichissement : eau peptonée tamponnée (par exemple, BPW Plus, n° de référence 3564684, base déshydratée, 500 g ; 3554179, 225 ml x 6 flacons ; 3555789, 2,3 L x 5 poches ; 3555790, 5 L x 2 poches. BPW Standard n° de référence 12013259, base déshydratée, 500 g ; 12013258 base déshydratée, 5 kg ; 12013260 5 L x 2 poches)
- Milieu d'enrichissement (enrichissement standard USDA facultatif) : mTSB (par exemple, n° de référence 3564426, base déshydratée, 500 g) plus casaminoacides et novobiocine
- Selective STEC Supplement (n° de référence 3564005)
- PIF Supplement (n° de référence 12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (n° de référence 3594970)
- iQ-Check STEC SerO II PCR Detection Kit (n° de référence 12013174)
- iQ-Check Purification Reagent (n° de référence 12012383)
- Produits spécifiques pour les échantillons environnementaux
 - Éponges d'échantillonnage environnemental
 - Tampons d'échantillonnage environnemental
 - Bouillon neutralisant pour éponges et tampons, par exemple, Dey-Engley (D/E), HiCap ou Lethen

- Produits spécifiques pour extraction en tubes
 - Tubes coniques à bouchon fileté 1,5 ml, stériles (par exemple, n° de référence 2240110XTU)
- Produits spécifiques pour extraction en plaque Deep Well
 - Plaque Deep Well de 96 puits (iQ-Check Deep Well Microplates, n° de référence 3594900)
 - Film à sceller en plastique (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, n° de référence 3590139)
 - Film à sceller préperforé (X-Pierce Films, n° de référence 3593977 ou Pre-Pierced Plate Sealing Film, 3600040, Amérique du Nord uniquement)
- 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 ; 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
- Pipettes 1 et 10 ml
- Tubes à essai stériles 2 et 5 ml
- Gants non poudrés
- Eau distillée stérile
- Eau de Javel, 5 %
- Agent nettoyant tel que DNA AWAY ou RNase AWAY

Section 6

Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux

- Ce test doit être réalisé par du personnel formé.
- Les échantillons et cultures d'enrichissement doivent être manipulés comme des substances potentiellement infectieuses et éliminés conformément aux règles et réglementations locales.
- Tous les matériels potentiellement infectieux doivent être soumis à l'autoclave avant élimination.

Section 6

- La qualité des résultats dépend du respect strict des bonnes pratiques de laboratoire (par exemple, la norme EN ISO 7218), particulièrement en ce qui concerne la PCR :
 - Ne jamais transférer du matériel de laboratoire (pipettes, tubes, etc.) d'un poste de travail à un autre.
 - Toujours utiliser un contrôle positif et un contrôle négatif pour chaque série de réactions d'amplification.
 - Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
 - Mélanger (vortex) les réactifs du kit avant de les utiliser afin d'assurer leur homogénéité.
 - Vérifier périodiquement l'exactitude et la précision des pipettes, ainsi que le fonctionnement correct des instruments.
 - Changer de gants fréquemment, surtout si une contamination est suspectée.
 - Nettoyer les postes de travail périodiquement avec de l'eau de Javel à 5 % et d'autres agents de décontamination tels que DNA AWAY.
 - Utiliser des gants non poudrés et éviter les empreintes digitales et l'écriture sur les bouchons des tubes. En effet, l'acquisition des données peut en être affectée.
- Il est fortement recommandé de respecter les exigences générales décrites dans la norme EN ISO 22174:2005 (Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences générales et définitions).
- iQ-Check STEC VirX 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 du iQ-Check Prep System peut causer des blessures corporelles ou endommager l'instrument. En cas de manipulation incorrecte, certains composants peuvent entraîner un risque de blessures corporelles causées par une chaleur excessive. Pour une utilisation en toute sécurité, le système iQ-Check Prep System doit être utilisé uniquement par du personnel de laboratoire qualifié et convenablement formé. La maintenance de l'instrument doit être réalisée uniquement par des techniciens de maintenance de Bio-Rad.
- CFX96 Touch Deep Well ou CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Detection System
 - Une utilisation incorrecte du CFX96 Touch ou CFX Opus Deep Well Real-Time PCR Detection System peut causer des blessures corporelles ou endommager l'instrument. En cas de manipulation incorrecte, certains composants peuvent entraîner un risque de blessures corporelles causées par une chaleur excessive. Pour une utilisation en toute sécurité, le système CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System doit être utilisé uniquement par du personnel de laboratoire qualifié et convenablement formé. La

maintenance de l'instrument doit être réalisée uniquement par des techniciens de maintenance de Bio-Rad.

- **Enrichissement**

- L'utilisateur doit lire, comprendre et respecter toutes les informations de sécurité présentes dans les instructions de iQ-Check STEC VirX Kit. Conserver les instructions relatives à la sécurité pour référence ultérieure. Afin de réduire les risques associés à l'exposition aux produits chimiques et biologiques, réaliser les analyses d'agents pathogènes dans un laboratoire convenablement équipé, sous le contrôle d'un personnel qualifié. Toujours suivre les bonnes pratiques en matière de sécurité en laboratoire, notamment porter des vêtements et des lunettes/un masque de protection appropriés pour manipuler les réactifs et échantillons contaminés. Éviter tout contact avec le contenu du milieu d'enrichissement et des tubes de réactif après amplification. Éliminer les échantillons enrichis conformément aux normes actuelles de l'industrie.
- En fonction des réglementations locales, les *E. coli* pathogènes sont des organismes de niveau de biosécurité 2 ou 3. Les échantillons biologiques tels que les enrichissements peuvent transmettre des maladies infectieuses. 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 des milieux de culture pouvant contenir des agents pathogènes doit être décontaminé 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 :

Section 7

AOAC PTM 121203		
Domaine (matrices)	Préparation des échantillons	Enrichissement/Extraction de l'ADN
Bœuf cru haché et bœuf cru en morceaux (375 g) ^{1,2}	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 3 x <i>n</i> ml de BPW 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
Tampon d'échantillonnage MicroTally ¹	Homogénéiser le tampon d'échantillonnage dans 200 ml de BPW préchauffée.	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 crus (375 g) ^{1,2}	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 3 x <i>n</i> ml de BPW 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
Fleur de cannabis (10 g), chocolat et gommes infusés au cannabis (25 g), concentrés dérivés du cannabis (5 g), chanvre (25 g) ^{1,3}	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml de BPW (25 g dans 225 ml ou 5 g dans 45 ml)	Extraction Easy I <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 18 – 22 hr à 37 ± 1 °C Format tube/Deep Well
Farine universelle (375 g) ^{1,3}	Dilution au 1:4 <ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 3 x <i>n</i> ml de BPW préchauffée avec supplément PIF (375 g dans 1 125 ml + 150 µl de supplément PIF préparé) Après enrichissement, transférer une aliquote de 1 à 5 ml dans un tube ou une plaque Deep Well et laisser reposer pendant 30 min au moins avant de procéder à l'extraction de l'ADN. Dilution au 1:10 <ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml de BPW préchauffée avec supplément PIF (375 g dans 3 375 ml + 375 µl de supplément PIF préparé) 	Extraction Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 22 ± 2 hr à 37 ± 1 °C. Format tube/Deep Well
MicroVal		
Domaine (matrices)	Préparation des échantillons	Enrichissement/Extraction de l'ADN
Viande crue (jusqu'à 375 g), à l'exclusion de la volaille ^{1,5}	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 3 x <i>n</i> ml de BPW préchauffée (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
Produits à base de lait cru (25 g) ^{1,5}	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml de BPW préchauffée avec supplément STEC (25 g dans 225 ml + 2,5 ml de supplément STEC préparé)	Extraction Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 16 – 24 hr à 41,5 ± 1 °C Format tube/Deep Well
Farine et produits à base de pâte crue (375 g) ^{1,5}	Dilution au 1:4 <ul style="list-style-type: none"> Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 3 x <i>n</i> ml de BPW préchauffée avec supplément STEC (375 g dans 1 125 ml + 15 ml de supplément STEC préparé) 	Extraction Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 18 – 26 hr à 41,5 ± 1 °C Format tube/Deep Well
Aliments à composants multiples, composants de repas, produits bruts et fruits (25 g)	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml de BPW préchauffée (25 g dans 225 ml)	Extraction Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 18 – 26 hr à 41,5 ± 1 °C Format tube/Deep Well
USDA FSIS MLG 5C.02		
Domaine (matrices)	Préparation des échantillons	Enrichissement/Extraction de l'ADN
Produits carnés (325 g), éponges pour échantillonnage de carcasses et de surfaces	Homogénéiser l'échantillon dans un bouillon mTSB ou mTSB+n comme décrit dans la méthode MLG 5C.02	Extraction Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 15 – 24 hr à 42 ± 1 °C Format tube/Deep Well
Domaine (matrices)	Préparation des échantillons	Enrichissement/Extraction de l'ADN
Échantillons de surface environnementale	Homogénéiser les tampons d'échantillonnage dans 10 ml et les éponges d'échantillonnage dans 90 ml de BPW préchauffée (il est recommandé d'utiliser un bouillon neutralisant qui ne contient pas de complexe aryle-sulfonate)	Extraction Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 8 – 22 hr à 41,5 ± 1 °C Format tube/Deep Well

¹La validation inclut l'utilisation d'iQ-Check Free DNA Removal Solution et du fichier de protocole d'application « STEC VirX MLG Fast » ou « STEC VirX ISO Fast » pour une durée d'exécution réduite de la PCR

²Protocole harmonisé avec les kits iQ-Check *E. coli* O157:H7 et iQ-Check *Salmonella* II

³Protocole harmonisé avec le kit iQ-Check *Salmonella* II

⁵Dans le cadre de la validation MicroVal, le bouillon d'enrichissement peut être conservé jusqu'à 72 hr à 2 – 8 °C

B. Traitement de l'ADN libre

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

C. Extraction de l'ADN

Recommandations générales :

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 d'aliment présentant une couche grasse surnageante, prélever juste en dessous de cette couche.
3. Ouvrir les tubes et les puits avec précaution pour éviter les risques de contamination croisée.
4. Refroidir la plaque Deep Well avant de pipetter directement à travers le film préperforé.
5. Utiliser le barreau magnétique afin de maintenir le réactif de lyse en suspension. Pipetter en mélangeant à vitesse moyenne.
6. Dans un premier temps, agiter délicatement le réactif de lyse à la main pour remettre la résine en suspension. Garder le réactif de lyse en suspension pendant le pipettage en mélangeant à vitesse moyenne avec le barreau magnétique contenu dans le flacon.
7. Reconstituer le réactif de lyse final de la façon suivante :
 - a. Verser soigneusement tout le contenu du réactif F (billes de lyse) dans le réactif A (réactif de lyse).
 - b. Utiliser des consommables adaptés, avec un embout à large ouverture, pour permettre le pipettage du réactif de lyse homogénéisé.
 - c. Le réactif de lyse mélangé aux billes de lyse (réactifs A + F) présente une durée de conservation de 6 mois pour un stockage à 4 °C.

Protocole 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 par aspiration/refoulement avec la pipette puis fermer les tubes avec leur bouchon ou sceller la plaque Deep Well avec du film préperforé.
3. Incuber dans le bloc de chauffage approprié à 95 – 100 °C pendant 10 – 15 min ou dans l'agitateur thermique pendant 15 – 20 min à une vitesse de 1 300 rpm.
4. Agiter (vortex) les tubes à grande vitesse.
5. Dans le cas d'une plaque Deep Well, laisser refroidir à température ambiante (20 – 25 °C).

Section 7

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 15-20 min.
6. En cas d'utilisation d'un incubateur-agitateur pour tube ou plaque deep well incuber les tubes ou plaques deep well dans l'incubateur -agitateur entre 1300 et 1600rpm à 95-100°C pendant 15-20 min.
7. Agiter (vortex) 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 pipetage de l'annexe (Guide de calcul du mélange de PCR) pour trouver les volumes corrects pour chaque réactif.

Remarque : le mélange de PCR (réactifs B + C) doit être utilisé immédiatement après la préparation.

Il est stable pendant 1 hr maximum à une température de 2 – 8 °C.

2. Pipetter 20 µl de ce mélange de PCR dans chaque puits en fonction de la plaque préparée.
3. Ajouter 5 µl d'extrait d'ADN, de réactif D (contrôle négatif) ou de réactif E (contrôle positif). Ne pas agiter (vortex) l'échantillon avant le pipetage. Sceller hermétiquement les puits de la plaque ou les bandes de tubes. Pipetter avec précaution afin d'éviter la formation de bulles au fond des puits. Étape facultative : centrifuger la plaque de PCR scellée ou les bandes de tubes (rotation rapide) afin d'éliminer les bulles éventuelles.
4. Placer la plaque de PCR ou les bandes de tubes dans le thermocycleur. Veiller à placer la plaque correctement, le puits A1 dans le coin supérieur gauche. Fermer le module réactionnel.

Lancement de la PCR

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

E. Analyse des données

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

Interprétation des résultats

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

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

Contrôles

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

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

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

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

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

Échantillons

Un test du gène de virulence STEC produisant un résultat positif doit présenter une courbe d'amplification type et une valeur Cq ≥ 10 dans les canaux FAM (au minimum) et Cy5.

- Si la valeur Cq des deux canaux est inférieure à 10, vérifier que la courbe, en tant que données brutes, montre un aspect caractéristique d'amplification exponentielle (une ligne de départ plane, avec une augmentation rapide de la fluorescence, puis une stabilisation). Si la courbe semble correcte, l'échantillon peut être considéré comme positif pour la présence du gène de virulence STEC.
- Si la valeur Cq pour FAM est ≥ 10 et si la valeur Cq pour Cy5 est N/A, l'échantillon est positif pour les gènes de virulence *stx1/stx2*.
- Si la valeur Cq pour FAM est N/A et si la valeur Cq pour Cy5 est ≥ 10 , l'échantillon est positif pour le gène de virulence *eae*.

S'il n'y a pas de valeur Cq (Cq = N/A) pour FAM ni pour Cy5, ou si la courbe n'est pas une courbe d'amplification typique, le contrôle interne de cet échantillon doit être analysé :

- Si aucune valeur Cq n'est obtenue pour FAM ni pour Cy5 et si le contrôle interne présente une valeur Cq ≥ 26 , l'échantillon est considéré négatif pour les gènes de virulence STEC.
- Un contrôle interne qui n'a pas non plus de valeur Cq (Cq = N/A) indique probablement un phénomène d'inhibition de la réaction de PCR. Diluer l'échantillon (réaliser une dilution au 1:10 dans de l'eau distillée stérile avec 10 μ l d'extrait d'ADN), utiliser 5 μ l de la dilution pour l'amplification et répéter le test de PCR.
- Si la valeur Cq pour le contrôle interne est < 26 , il n'est pas possible d'interpréter le résultat. Vérifier que le seuil a été placé correctement ou que la courbe de données brutes est une courbe d'amplification normale. Si la courbe n'a pas de forme caractéristique, répéter le test de PCR.

L'interprétation des résultats du test est résumée dans le tableau suivant :

Détection <i>stx1/stx2</i> (canal FAM)	Détection <i>eae</i> (canal Cy5)	Détection de contrôle interne (canal HEX)	Interprétation
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	N/A	Positif – Tester avec le kit iQ-Check STEC SerO II
Cq ≥ 10	Cq = N/A	N/A	Positif pour <i>stx1/stx2</i> , négatif pour <i>eae</i> ¹
Cq = N/A	Cq ≥ 10	N/A	Positif pour <i>eae</i> , négatif pour <i>stx1/stx2</i> . Arrêter l'analyse de l'échantillon
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 26	Négatif
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition ²

¹Procéder à une confirmation, le cas échéant, par exemple dans le cadre de la validation MicroVal.

²Lorsque la détection des gènes de virulence *stx1/stx2* et *eae* et du contrôle interne présente une valeur Cq = N/A, il est nécessaire de tester de nouveau l'échantillon, avec une dilution (1:10).

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

L'interprétation du résultat du test et le processus de confirmation peuvent varier en fonction des réglementations locales.

Section 8

Confirmation des résultats positifs

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

Dans le cadre de la validation MicroVal, les tests positifs au *stx* doivent être confirmés.

1. Étaler en stries 10 µl d'enrichissement sur des boîtes de gélose sélective (TBX ou CHROMAgar STEC). Incuber les boîtes pendant 18 – 24 hr à 37 ± 1 °C.
2. Remettre en suspension une colonie isolée dans 100 µl de tryptone sel ou du BPW dans un microtube de centrifugation et procéder à la détection des gènes de virulence avec iQ-Check STEC VirX Kit. Il est possible de regrouper 10 colonies pour procéder au test des gènes de virulence. Si un résultat est positif, les colonies doivent être testées individuellement.
3. Utiliser 5 µl de la suspension avec 20 µl de mélange de PCR (voir la section 7 D. PCR en temps réel) et suivre le reste du protocole iQ-Check STEC VirX pour l'interprétation des données et des résultats. L'extraction d'ADN n'est pas nécessaire.
4. En cas de résultats divergents entre iQ-Check STEC VirX Kit et la confirmation directe, des procédures complémentaires sont recommandées.
5. Diluer l'enrichissement au 1:100 dans un bouillon frais (par exemple, 0,1 ml d'enrichissement dans 9 ml de BPW + supplément STEC). Étaler en stries 10 µl d'enrichissement dilué sur les boîtes de gélose sélective et incuber pendant 18 – 24 hr à 37 ± 1 °C.
6. De plus, incuber l'enrichissement dilué pendant 16 – 24 hr à 41,5 ± 1 °C, puis étaler en stries sur les boîtes de gélose sélective.
7. Tester jusqu'à 50 colonies, tel que recommandé par la méthode ISO/TS 13136.

En cas de résultats discordants entre le kit iQ-Check STEC VirX et l'une des options de confirmation énumérées ci-dessus, suivre les étapes nécessaires pour garantir la validité des résultats.

Section 9

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

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

1. Choisir une colonie isolée, sur milieu de culture de gélose 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. Agiter (vortex) pour homogénéiser.
3. Utiliser 5 µl de la suspension avec 20 µl de mélange de PCR (voir la section 7 D. PCR en temps réel) et suivre le reste du protocole iQ-Check STEC VirX pour l'interprétation des données et des résultats. L'extraction d'ADN n'est pas nécessaire.

Section 10

Performance du test et validations



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



La méthode iQ-Check STEC VirX a été certifiée par MICROVAL NEN comme alternative à la méthode de référence ISO13136:2012 pour la détection des gènes *stx* de STEC dans les produits à base de lait cru (25 g), les produits à base de viande crue (375 g) et les produits à base de farine et de pâte crue (375 g), aliments à composants multiples, composants de repas, produits bruts et fruits (25 g). Le protocole de validation repose sur la norme ISO16140-2:2016 et utilise le système CFX96 Touch Deep Well et CFX Opus Deepwell Real-Time PCR, CFX Manager Software IDE (v3.1 et ultérieure), le fichier de protocole d'application « STEC VirX ISO Fast » et (en option) iQ-Check Free DNA Removal Solution. Numéro de certificat : 2021LR96

Section 11

Références

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

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

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

ISO/TS 13136:2012 (E), Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups – Qualitative Method.

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

United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science (2019). Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. MLG 5C.02, Laboratory Guidebook Notice of Change, new chapter.

Section 12

Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Août 2020	10000131516 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Nouvelle conception de document et mise à jour des références et du contenu - Renouvellement et extension de la validation AOAC pour les tampons d'échantillonnage MicroTally, le cannabis et les produits imprégnés de cannabis, ainsi que le fichier de protocole d'application « VirX Fast » - Mise à jour du protocole de confirmation de colonie - Intégration de la référence MLG FSIS 5C.00 - Modification du numéro de document (version précédente 808474 REV C)
Juin 2022	10000131516 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Mise à jour des protocoles d'enrichissement et de confirmation, associée à la validation MicroVal - Extension de la matrice AOAC pour le chanvre et la farine universelle - Remplacement de la section Protocole d'enrichissement de l'échantillon avec un tableau récapitulatif - Mise à jour des références
Juin 2023	10000131516 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - Extension de la validation MicroVal sur différentes matrices (large gamme d'aliments) et sur CFX Opus Deepwell et CFX Manager Software IDE v3.1 - Extension AOAC pour les produits infusés et les concentrés de cannabis

Annexe — Guide de calcul du mélange de PCR

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

Nombre total d'échantillons et de contrôles	Sondes Réactif B (µl)	Mélange d'amplification Réactif C (µl)	Nombre total d'échantillons et de contrôles	Sondes Réactif B (µl)	Mélange d'amplification Réactif C (µl)
1	5	15	49	265	795
2	11	33	50	270	810
3	16	48	51	275	825
4	22	66	52	281	845
5	27	81	53	286	860
6	32	96	54	292	880
7	38	115	55	297	890
8	43	130	56	302	905
9	49	147	57	308	925
10	54	160	58	313	940
11	59	177	59	319	960
12	65	195	60	324	970
13	70	210	61	329	990
14	76	230	62	335	1 000
15	81	245	63	340	1 020
16	86	260	64	346	1 040
17	92	275	65	351	1 050
18	97	290	66	356	1 070
19	103	310	67	362	1 090
20	108	325	68	367	1 100
21	113	340	69	373	1 120
22	119	357	70	378	1 130
23	124	370	71	383	1 150
24	130	390	72	389	1 170
25	135	405	73	394	1 180
26	140	420	74	400	1 200
27	146	440	75	405	1 210
28	151	450	76	410	1 230
29	157	470	77	416	1 250
30	162	485	78	421	1 260
31	167	500	79	427	1 280
32	173	520	80	432	1 300
33	178	535	81	437	1 310
34	184	550	82	443	1 330
35	189	565	83	448	1 340
36	194	580	84	454	1 360
37	200	600	85	459	1 380
38	205	615	86	464	1 390
39	211	635	87	470	1 410
40	216	650	88	475	1 420
41	221	665	89	481	1 445
42	227	680	90	486	1 460
43	232	696	91	491	1 470
44	238	715	92	497	1 490
45	243	730	93	502	1 510
46	248	745	94	508	1 520
47	254	760	95	513	1 540
48	259	777	96	518	1 550

Visitez [bio-rad.com/iqcheck](https://www.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
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 STEC VirX Kit

Anwenderhandbuch

**Test für den Nachweis von Virulenzgenen in Shiga-Toxin bildenden
Escherichia coli in Lebensmittel- und Umweltproben mittels Real-Time PCR**

Katalog-Nr. 3578139



Inhaltsverzeichnis

Abschnitt 1	Einleitung	1
Abschnitt 2	Die iQ-Check STEC VirX Technologie	1
Abschnitt 3	Zusammensetzung des Kits	2
Abschnitt 4	Haltbarkeit und Lagerung	2
Abschnitt 5	Zusätzlich benötigte Materialien	2
	Geräte	2
	Zubehör.....	3
Abschnitt 6	Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse	4
Abschnitt 7	Protokoll.....	6
	Probenanreicherung	6
	Behandlung zur Entfernung freier DNA	8
	DNA-Extraktion	8
	Real-Time PCR.....	9
	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

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

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

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

Abschnitt 2

Die iQ-Check STEC VirX Technologie

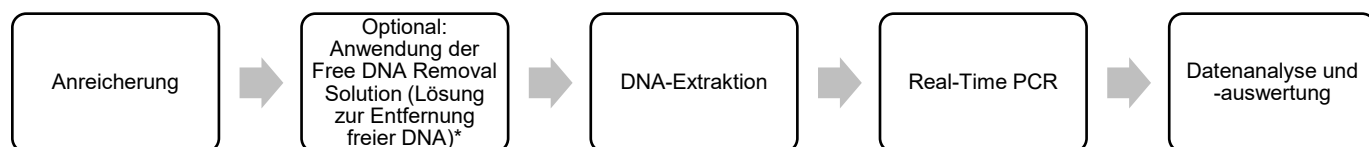
Das iQ-Check STEC VirX Kit beruht auf der Amplifizierung und dem Nachweis von Genen mittels Real-Time PCR. Die gebrauchsfertigen PCR-Reagenzien im Kit enthalten Oligonukleotide (Primer und Sonden), die für die Virulenzgene *stx1/stx2* und *eae* spezifisch sind, sowie DNA-Polymerase und Nukleotide. Der Nachweis und die Datenanalyse sind für die Verwendung eines Real-Time PCR-Gerätes von Bio-Rad, z. B. des CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System, optimiert.

Die PCR ist eine leistungsstarke Technik, mit der viele Kopien der Ziel-DNA erzeugt werden können. Während der PCR-Reaktion wird die DNA in mehreren Erwärmungs- und Abkühlzyklen durch Hitze denaturiert, um es den Primern zu ermöglichen, sich an die Zielregion anzulagern. Die DNA-Polymerase verwendet diese Primer und die Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) zur Verlängerung der DNA, wodurch Kopien der Ziel-DNA erzeugt werden. Diese Kopien werden als Amplikons bezeichnet.

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

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

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



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

Abschnitt 3 Zusammensetzung des Kits

Das iQ-Check STEC VirX Kit enthält 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 benötigte Materialien

Geräte

- Labor-Paddel-Blender zum Homogenisieren von Testproben
- Inkubator zur mikrobiologischen Anreicherung der Proben
- Speziell für die Extraktion in sterilen konischen 1,5 ml Röhrchen mit Schraubdeckel
 - Tischzentrifuge 10.000 – 12.000 x g
 - Heitzrockenblock mit 37 ± 2 °C und/oder 95 – 100 °C

Abschnitt 5

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

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

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

Zubehör

- Anreicherungsmedium: gepuffertes Peptonwasser (z. B. BPW Plus Katalog-Nr. 3564684, dehydratisiert, 500 g; 3554179, 6 Flaschen x 225 ml; 3555789, 5 Beutel x 2,3 L; 3555790, 2 Beutel x 5 L. BPW Standard Katalog-Nr. 12013259, dehydratisiert, 500 g; 12013258 dehydratisiert, 5 kg; 12013260 2 Beutel x 5 L)
- Anreicherungsmedium (optionale USDA-Standardanreicherung): mTSB (zum Beispiel Katalog-Nr. 3564426, dehydratisiert, 500 g) plus Casaminsäuren und Novobiocin
- Selective STEC Supplement (Katalog-Nr. 3564005)
- PIF Supplement (Katalog-Nr. 12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (Katalog-Nr. 3594970)
- iQ-Check STEC SerO II PCR Detection Kit (Katalog-Nr. 12013174)
- iQ-Check Purification Reagent (Katalog-Nr. 12012383)
- Speziell für Umweltproben
 - Schwämme zur Gewinnung von Umweltproben
 - Tupfer zur Gewinnung von Umweltproben
 - Neutralisierungsmedium für Probennahme-Schwämme und -Tupfer, z. B. Dey-Engley (D/E) oder HiCap Neutralizing Broth oder Lethen Broth
- Speziell für die Extraktion in Röhrcchen
 - Konische, sterile 1,5 ml Röhrcchen mit Schraubdeckel (z. B. Katalog-Nr. 2240110XTU)

- Speziell für die Extraktion in einer Deep Well-Platte
 - Deep Well Platte mit 96 Wells (iQ-Check Deep Well Microplates, Katalog-Nr. 3594900)
 - Abdichtungsfolie aus Kunststoff (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, Katalog-Nr. 3590139)
 - Abdichtungsfolie für die PCR-Platte (X-Pierce Films, Katalog-Nr. 3593977 oder Pre-Pierced Plate Sealing Film, Katalog-Nr. 3600040, nur Nordamerika)
- Speziell für iQ-Check Prep System
 - 60 ml Verdünnungsbehältnis (Katalog-Nr. 3594904)
 - Filterspitzen (Katalog-Nr. 3594902 oder 12014486, 5.760 x 50 µl; Katalog-Nr. 3594903 oder 12014483, 3.840 x 1000 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 Multipipetten
- 1 ml- und 10 ml-Pipetten
- Sterile 2 ml- und 5 ml-Teströhrchen
- Ungepuderte Handschuhe
- Destilliertes steriles Wasser
- Bleichlösung, 5 %
- 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.

Abschnitt 6

- Bei jeder Serie von Amplifikationsreaktionen eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle verwenden.
 - Die Reagenzien nach Ablauf ihres Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
 - Die Reagenzien aus dem Kit vor dem Gebrauch auf dem Vortex mischen, um ihre Homogenität sicherzustellen.
 - Regelmäßig die Genauigkeit und Präzision der Pipetten sowie die ordnungsgemäße Funktion der Geräte überprüfen.
 - Handschuhe häufig wechseln, vor allem dann, wenn vermutet wird, dass sie kontaminiert sein könnten.
 - Die Arbeitsplätze regelmäßig mit 5%iger Bleichlösung und anderen Dekontaminationsmitteln, z. B. DNA AWAY, reinigen.
 - Ungepuderte Handschuhe verwenden, und Fingerabdrücke und Beschriftungen auf Röhrchendeckeln vermeiden, da dies die Datenerfassung beeinträchtigen würde.
- Es wird dringend empfohlen, die in der Norm EN ISO 22174:2005 „Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln - Allgemeine Anforderungen und Begriffe“ beschriebenen Anforderungen einzuhalten.
 - iQ-Check STEC VirX Kit
 - Alle Substanzen oder Mischungen in dem Testkit sind klassifizierte Produkte gemäß dem globalen vereinheitlichten System (Global Harmonized System, GHS). Der Kontakt mit Säuren kann zur Freisetzung giftiger Gase führen. Bei korrekter Anwendung sind keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen erforderlich. Bei Einatmen des Produkts Frischluft zuführen und bei Beschwerden einen Arzt hinzuziehen. Nach Augenkontakt mit dem Produkt das geöffnete Auge mehrere Minuten unter fließendem Wasser ausspülen. Wenn die Produkte verschluckt werden, Erbrechen herbeiführen und ärztliche Hilfe anfordern.
 - iQ-Check Prep System
 - Die unsachgemäße Verwendung des iQ-Check Prep System kann zu Personenverletzungen oder Schäden am Gerät führen. Einige Komponenten können bei unsachgemäßer Handhabung aufgrund übermäßiger Hitze zu Personenverletzungen führen. Zur sicheren Verwendung darf das iQ-Check Prep System nur von qualifiziertem Laborpersonal verwendet werden, das entsprechend geschult wurde. Die Gerätewartung darf nur von Außendiensttechnikern von Bio-Rad durchgeführt werden.
 - CFX96 Touch Deep Well oder CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Detection System
 - Die unsachgemäße Verwendung des CFX96 Touch oder CFX Opus Deep Well Real-Time PCR Detection System kann zu Personenverletzungen oder Schäden am Gerät führen. Einige Komponenten können bei unsachgemäßer Handhabung aufgrund übermäßiger Hitze zu Personenverletzungen führen. Zur sicheren Verwendung darf das CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System nur von qualifiziertem Laborpersonal verwendet werden, das entsprechend geschult wurde. Die Gerätewartung darf nur von Außendiensttechnikern von Bio-Rad durchgeführt werden.

- Anreicherung
 - Benutzer sollte alle Sicherheitsinformationen in der Anweisung des iQ-Check STEC VirX Kit lesen, verstehen und beachten. Die Sicherheitshinweise zum späteren Nachschlagen aufbewahren. Um die mit der Exposition gegenüber Chemikalien und biologischen Gefahren verbundenen Risiken zu verringern, sind Pathogentests in einem ordnungsgemäß ausgestatteten Labor unter der Kontrolle von geschultem Personal durchzuführen. Beim Umgang mit Reagenzien und kontaminierten Proben sind stets die üblichen Laborsicherheitspraktiken einzuhalten, beispielsweise sind geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille zu tragen. Den Kontakt mit dem Inhalt des Anreicherungsmediums und der Reagenzröhrchen nach der Anreicherung vermeiden. Angereicherte Proben im Einklang mit den aktuellen Branchenstandards entsorgen.
 - Pathogene *E. coli* sind Organismen der biologischen Sicherheitsstufe 2 oder 3 (abhängig von den vor Ort geltenden Regelungen). Biologische Proben, z. B. Anreicherungen, können Infektionskrankheiten übertragen. Es sind alle geltenden lokalen, staatlichen/regionalen und/oder nationalen Vorschriften zur Entsorgung von biologischen Abfällen einzuhalten. Geeignete Schutzausrüstung tragen. Dazu zählen u. a. Schutzbrille, Gesichtsschutz, Kleidung/Laborkittel und Handschuhe. Alle Arbeiten sollten in ordnungsgemäß ausgestatteten Einrichtungen unter Verwendung der entsprechenden Sicherheitsausrüstung (z. B. physikalische Eindämmungsvorrichtungen) durchgeführt werden. Mitarbeiter sollten vor der Arbeit mit potenziell infektiösen Materialien nach den geltenden Bestimmungen und Anforderungen der Firma/Institution geschult werden.
 - Nach Abschluss der Tests sind alle Materialien und Medien, die möglicherweise Krankheitserreger enthalten, im Einklang mit den geltenden Branchenstandards für die Entsorgung kontaminierter Abfälle zu dekontaminieren (d. h. 20 min bei 120 °C autoklavieren). Weitere Informationen und lokale Bestimmungen zur Entsorgung entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt.

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 können:

Abschnitt 7

AOAC PTM 121203		
Umfang (Matrices)	Probenvorbereitung	Anreicherung/DNA-Extraktion
Rohes Rinderhackfleisch und Abschnitte von rohem Rindfleisch (375 g) ^{1,2}	<i>n</i> g Lebensmittelzeugnis in 3 x <i>n</i> 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 ± 1 °C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format
MicroTally-Abstrich ¹	Den Tupfer in 200 ml vorgewärmtem GPW homogenisieren	Easy II-Extraktion <ul style="list-style-type: none"> Für 8 – 22 hr bei 41,5 ± 1 °C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format
Frischer Spinat (375 g) ^{1,2}	<i>n</i> g Lebensmittelzeugnis in 3 x <i>n</i> 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 ± 1 °C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format
Cannabisblüten (10 g), Schokolade und Gummibonbons angereichert mit Cannabis (25 g), Konzentrate aus Cannabis-Derivaten (5 g), Hanf (25 g) ^{1,3}	<i>n</i> g Lebensmittelzeugnis in 9 x <i>n</i> ml GPW homogenisieren (25 g in 225 ml oder 5 g in 45 ml).	Easy I-Extraktion <ul style="list-style-type: none"> Für 18 – 22 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format
Weizenmehl Type 405 (375 g) ^{1,3}	1:4 Verdünnung <ul style="list-style-type: none"> <i>n</i> g Lebensmittelzeugnis in 3 x <i>n</i> ml vorgewärmtem GPW + PIF Supplement homogenisieren (375 g in 1125 ml + 150 µl zubereitetes PIF Supplement) Nach der Anreicherung ein 1- bis 5-ml-Aliquot in ein Röhrchen oder eine Deep-Well-Platte überführen und mindestens 30 min ruhen lassen, bevor Sie mit der DNA-Extraktion fortfahren 1:10 Verdünnung <ul style="list-style-type: none"> <i>n</i> g Lebensmittelzeugnis in 9 x <i>n</i> ml vorgewärmtem GPW + PIF Supplement homogenisieren (375 g in 3375 ml + 375 µl zubereitetes PIF Supplement) 	Easy II-Extraktion <ul style="list-style-type: none"> Für 22 ± 2 hr bei 37 ± 1 C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format
MicroVal		
Umfang (Matrices)	Probenvorbereitung	Anreicherung/DNA-Extraktion
Rohes Fleisch (bis zu 375 g), ausschließlich Geflügel ^{1,5}	<i>n</i> g Lebensmittelzeugnis in 3 x <i>n</i> ml vorgewärmtem 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
Rohmilcherzeugnisse (25 g) ^{1,5}	<i>n</i> g Lebensmittelzeugnis in 9 x <i>n</i> ml vorgewärmtem GPW + STEC Supplement homogenisieren (25 g in 225 ml + 2,5 ml zubereitetes STEC Supplement)	Easy II-Extraktion <ul style="list-style-type: none"> Für 16 – 24 hr bei 41,5 ± 1 °C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format
Mehl und Produkte aus rohem Teig (375 g) ^{1,5}	1:4 Verdünnung <ul style="list-style-type: none"> <i>n</i> g Lebensmittelzeugnis in 3 x <i>n</i> ml vorgewärmtem GPW + STEC Supplement homogenisieren (375 g in 1.125 ml + 15 ml zubereitetes STEC Supplement) 	Easy II-Extraktion <ul style="list-style-type: none"> Für 18 – 26 hr bei 41,5 ± 1 °C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format
Lebensmittel bestehend aus mehreren Komponenten, Bestandteile eines verarbeiteten Gerichts, rohes Gemüse und Obst (25 g)	<i>n</i> g Lebensmittelzeugnis in 9 x <i>n</i> ml vorgewärmtem GPW homogenisieren (25 g in 225 ml)	Easy II-Extraktion <ul style="list-style-type: none"> Für 18 – 26 hr bei 41,5 ± 1 °C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format
USDA FSIS MLG 5C.02		
Umfang (Matrices)	Probenvorbereitung	Anreicherung/DNA-Extraktion
Fleischerzeugnisse (325 g), Schwämme mit Umgebungs- und Schlachtkörperproben	Die Probe in mTSB oder mTSB+n homogenisieren, wie in der MLG 5C.02-Methode beschrieben	Easy II-Extraktion <ul style="list-style-type: none"> Für 15 – 24 hr bei 42 ± 1 °C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format
Umfang (Matrices)	Probenvorbereitung	Anreicherung/DNA-Extraktion
Proben von Oberflächen in der Umgebung	Die Tupfer in 10 ml und die Schwämme in 90 ml vorgewärmtem GPW homogenisieren (es wird empfohlen, neutralisierende Bouillon zu verwenden, die keinen Arylsulfonatkomplex enthält)	Easy II-Extraktion <ul style="list-style-type: none"> Für 8 – 22 hr bei 41,5 ± 1 °C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format

¹Validierung beinhaltet die Verwendung der iQ-Check Free DNA Removal Solution und der „STEC VirX MLG Fast“ oder „STEC VirX ISO Fast“ Assayprotokolldateien für eine verringerte PCR-Laufzeit

²Mit dem iQ-Check *E. coli* O157:H7 und dem iQ-Check *Salmonella* II Kit abgestimmtes Protokoll

³Mit dem iQ-Check *Salmonella* II Kit abgestimmtes Protokoll

⁵Im Rahmen der MicroVal-Validierung kann die angereicherte Bouillon bis zu 72 hr bei 2 – 8 °C aufbewahrt werden

B. Behandlung zur Entfernung freier DNA

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

C. DNA-Extraktion

Allgemeine Empfehlungen:

1. Vor Testbeginn den Testblock oder Thermoshaker einschalten, um ihn vorzuheizen. Auf 95 – 100 °C einstellen. Das Lysereagenz während des Pipettierens durch Rühren bei mittlerer Geschwindigkeit auf einer Magnetrührplatte in Suspension halten.
2. Generell sollte vermieden werden, den Anreicherungsbeutel zu schütteln und große Lebensmittelfragmente in der Probe zu entnehmen. Bei Lebensmittelproben mit fettigem Überstand sollte die Probe knapp unterhalb dieser Schicht entnommen werden.
3. Beim Öffnen von Röhrchen und Wells vorsichtig vorgehen, um eine mögliche Kreuzkontamination zu vermeiden.
4. Die Deep Well-Platte kühlen, bevor direkt durch die vorgestanzte Abdichtungsfolie pipettiert wird.
5. Den Magnetrührer verwenden, um das Lysereagenz in Suspension zu halten. Den Pipettiervorgang durchführen, während es bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt wird.
6. Das Lysereagenz zuerst vorsichtig per Hand schütteln, um das Harz zu resuspendieren. Das Lysereagenz pipettieren, während es bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt wird (Magnetrührstab befindet sich in der Flasche), damit es in Suspension bleibt.
7. Das Lysereagenz wie folgt zur Verwendung rekonstituieren:
 - a. Den Inhalt von Reagenz F (Lyse-beads) vollständig zu Reagenz A (Lysereagenz) geben.
 - b. Zum Pipettieren des homogenisierten Lysereagenzes Pipettenspitzen mit ausreichend großer Öffnung verwenden.
 - c. Das mit Lysis Beads gemischte Lysereagenz (Reagenz A + F) ist bei 4 °C für 6 Monate haltbar.

Protokoll Easy I

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

Abschnitt 7

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

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

Protokoll Easy II

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

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

2. 100 µl der angereicherten Probe dazugeben.

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

3. Die Lösung durch Auf- und Abpipettieren mischen, bis sie homogen ist.
4. Die Röhrrchen verschließen bzw. die Deep Well-Platte mit vorgestanzter Abdichtungsfolie verschließen.
5. Die Röhrrchen für 3 ± 1 min in den Cell Disruptor geben. Inkubieren Sie die Röhrrchen im Heizblock bei 95-100°C für 15-20 min.
6. Bei Verwendung eines Thermoschüttlers im Röhrrchen oder Deep Well Plattenformat werden die Röhrrchen oder Deep Well Platten bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 1300 bis 1600 rpm und einer Temperatur von 95–100°C für 15-20 min inkubiert.
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. Das PCR Reaktionsgemisch mit der Amplifikationslösung (Reagenz C) und den fluoreszierenden Sonden (Reagenz B) vorbereiten. Das benötigte Volumen des PCR Reaktionsgemisches hängt von der Anzahl der zu analysierenden Proben und Kontrollen ab. In jedem PCR-Lauf muss mindestens eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden. Die entsprechenden Volumen für jedes Reagenz sind in der Pipettiertabelle im Anhang zur Berechnung des PCR Reaktionsgemisches angegeben.

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

2. Aus diesem PCR Reaktionsgemisch dem jeweils verwendeten Platten-Layout entsprechend 20 µl in jedes Well pipettieren.
3. 5 µl DNA-Extrakt, Reagenz D (Negativkontrolle) oder Reagenz E (Positivkontrolle) zugeben. Die Probe vor dem Pipettieren nicht vortexen. Die Wells der Platte bzw. die Teststreifen hermetisch abdichten. Es ist wichtig, Luftblasen am Boden der Wells zu vermeiden, indem behutsam pipettiert wird. Optional kann die verschlossene PCR-Platte bzw. können die verschlossenen PCR-Röhrchenstreifen zur Beseitigung etwaiger Luftblasen kurz zentrifugiert werden.
4. Die PCR-Platte bzw. die PCR-Röhrchenstreifen in den Thermocycler stellen. Die Platte so positionieren, dass sich das Well A1 oben links befindet. Das Reaktionsmodul schließen.

Die PCR durchführen

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

E. Datenanalyse

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

Auswertung der Ergebnisse

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

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

Kontrollen

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

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

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

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

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

Proben

Ein positiver Test auf STEC-Virulenzgene muss eine typische Amplifikationskurve und einen Cq-Wert ≥ 10 im FAM-Kanal (mindestens) und im Cy5-Kanal aufweisen.

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

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

- Wenn kein Cq-Wert für FAM oder Cy5 vorliegt und der Cq-Wert für die interne Kontrolle ≥ 26 beträgt, gilt die Probe als negativ für STEC-Virulenzgene.
- Falls auch für die interne Kontrolle kein Cq-Wert vorliegt (Cq = N/A), bedeutet dies, dass die PCR-Reaktion vermutlich gehemmt war. In diesem Fall muss die Probe verdünnt (mit 10 μ l DNA-Extrakt eine 1:10 Verdünnung in destilliertem sterilem Wasser durchführen, dann 5 μ l der verdünnten Lösung für die Amplifikation verwenden) und die PCR wiederholt werden.
- Falls der Cq-Wert für die interne Kontrolle < 26 liegt, ist keine Interpretation des Ergebnisses möglich. Es ist zu überprüfen, ob der Schwellenwert korrekt platziert wurde oder ob es sich bei der Kurve in den Rohdaten um eine normale Amplifikationskurve handelt. Wenn die Kurve keine charakteristische Form aufweist, muss der PCR-Test wiederholt werden.

Die Interpretation der Testergebnisse ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Nachweis von <i>stx1/stx2</i> (FAM-Kanal)	Nachweis von <i>eae</i> (Cy5-Kanal)	Nachweis der internen Kontrolle (HEX-Kanal)	Auswertung
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	NA	Positiv – Mit dem iQ-Check SerO II Kit testen
Cq ≥ 10	Cq = N/A	NA	Positiv für <i>stx1/stx2</i> , negativ für <i>eae</i> ¹
Cq = N/A	Cq ≥ 10	NA	Positiv für <i>eae</i> , negativ für <i>stx1/stx2</i> . Probenanalyse beenden
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 26	Negativ
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Hemmung ²

¹Gegebenenfalls mit der Bestätigung fortfahren, z. B. im Rahmen der MicroVal-Validierung

²Wenn sowohl beim Nachweis der *stx1/stx2*- und der *eae*-Virulenzgene als auch beim Nachweis der internen Kontrolle ein Cq-Wert = N/A erhalten wird, muss die Probe erneut getestet werden, jedoch im verdünnten Zustand (1:10).

Wenn Validierungskriterien nicht erfüllt sind, wird das Ergebnis unter Umständen als ungültig bezeichnet. Die Rohdaten überprüfen und wie bei einer inhibierten Probe weiter verfahren. Die Interpretation des Testergebnisses und der Bestätigungsprozess können je nach örtlichen Vorschriften variieren.

Abschnitt 8

Bestätigung positiver Ergebnisse

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

stx-positive-positive Tests im Rahmen der MicroVal-Validierung müssen bestätigt werden.

1. 10 µl Anreicherungsmedium auf selektive Agarplatten ausstreichen (TBX oder CHROMAgar STEC). Die Platten für 18 – 24 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren.
2. Eine einzelne Kolonie in 100 µl Tryptonsalz oder GPW in einem Mikrozentrifugenröhrchen resuspendieren und den Nachweis von Virulenzgenen mit iQ-Check STEC VirX Kit durchführen. Es ist möglich, 10 Kolonien zu kombinieren, um sie auf Virulenzgene zu testen. Bei positivem Ergebnis müssen die Kolonien einzeln getestet werden.
3. 5 µl der Suspension zu 20 µl PCR-Mix geben (siehe Abschnitt 7 D. „Real-Time PCR“), und zur Daten- und Ergebnisinterpretation die übrigen Schritte des iQ-Check STEC VirX-Protokolls befolgen. Eine DNA-Extraktion ist nicht erforderlich.
4. Bei abweichenden Ergebnissen zwischen dem iQ-Check STEC VirX Kit und der direkten Bestätigung werden zusätzliche Verfahren empfohlen.
5. Das Anreicherungsmedium 1:100 in frischer Bouillon verdünnen (z. B. 0,1 ml Anreicherung in 9 ml frischem GPW + STEC-Supplement). 10 µl des verdünnten Anreicherungsmediums auf selektive Agarplatten ausstreichen und 18 – 24 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren.
6. Zusätzlich verdünntes Anreicherungsmedium für 16 – 24 hr bei $41,5 \pm 1$ °C inkubieren und dann auf selektiven Agarplatten ausstreichen.
7. Bis zu 50 Kolonien screenen, wie in der ISO/TS 13136-Methode empfohlen.

Im Falle von diskrepanten Ergebnissen des iQ-Check STEC VirX Kits und einer der unten aufgeführten Optionen zur Bestätigung, sind notwendige Schritte zu befolgen um valide Ergebnisse zu gewährleisten.

Abschnitt 9

Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit

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

1. Mit einem Zahnstocher, einer sterilen Impföse oder einem anderen geeigneten Verbrauchsartikel (z. B. einer Pipettenspitze) eine isolierte Kolonie aus einer selektiven oder nicht-selektiven Agarplatte aufnehmen.
2. Die Kolonie in 100 µl Tryptonsalz-Medium oder destilliertem, sterilem Wasser in einem Mikrozentrifugenröhrchen resuspendieren. Auf dem Vortex homogenisieren.
3. 5 µl der Suspension zu 20 µl PCR-Mix geben (siehe Abschnitt 7 D. „Real-Time PCR“), und zur Daten- und Ergebnisinterpretation die übrigen Schritte des iQ-Check STEC VirX-Protokolls befolgen. Eine DNA-Extraktion ist nicht erforderlich.

Abschnitt 10

Testleistung und Testvalidierungen



Das iQ-Check STEC VirX Kit wurde vom AOAC Research Institute im Rahmen des Performance Tested Method-Programms zum Nachweis von *stx1/stx2* und *eae* in rohem Rinderhackfleisch, rohem Rindfleisch, rohem Spinat, MicroTally-Abstrichen, Cannabisblüten, Schokolade und Gummibonbons angereichert mit Cannabis, Konzentrate aus Cannabis-Derivaten, Hanf und Weizenmehl Type 405 validiert. Ein positives Ergebnis mit iQ-Check ist als vorläufig positiv zu betrachten und sollte mit Standardreferenzmethoden bestätigt werden
Zertifikatnummer: 121203.



Die iQ-Check STEC VirX Methode wurde von MICROVAL NEN als Alternative zu der Referenzmethode ISO13136:2012 für den Nachweis von *stx*-Genen von STEC in Rohmilcherzeugnissen (25 g), Rohfleischerzeugnissen (375 g) und Erzeugnissen, die Mehl und Rohteig enthalten (375 g), Lebensmittel bestehend aus mehreren Komponenten, Bestandteile eines verarbeiteten Gerichts, rohes Gemüse und Obst, zertifiziert. Das Validierungsprotokoll orientierte sich an der Norm ISO16140-2: 2016 und beinhaltete die Verwendung des CFX96 Touch Deep Well und CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Systems, der CFX Manager Software IDE (v3.1 und neuer), der „STEC VirX ISO Fast“ APF und optional die Verwendung der iQ-Check Free DNA Removal Solution. Zertifikatnummer: 2021LR96

Abschnitt 11

Literatur

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

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

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

ISO/TS 13136:2012 (E), Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups – Qualitative Method.

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

United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science (2019). Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. MLG 5C.02, Laboratory Guidebook Notice of Change, new chapter.

Abschnitt 12

Revisionshistorie

Versionsdatum	Dokumentnummer	Änderung
August 2020	10000131516 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Neues Dokumentdesign und Aktualisierung der Quellenangaben und des Inhalts - Erneuerung und Erweiterung der AOAC-Validierung für MicroTally-Abstriche, Cannabis und cannabishaltige Erzeugnisse und „VirX Fast“ APF - Aktualisierung des Protokolls zur Koloniebestätigung - Hinzufügung des Bezugsverweises auf MLG FSIS 5C.00 - Änderung der Dokumentnummer - vorhergehende Version 808474 REV C
Juni 2022	10000131516 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Aktualisierung der Anreicherungs- und Bestätigungsprotokolle im Zusammenhang mit der MicroVal-Validierung - AOAC-Matrixerweiterung für Hanf und Weizenmehl Type 405 - Protokollabschnitt zur Probenanreicherung durch Übersichtstabelle ersetzt - Aktualisierung der Literatur
Juni 2023	10000131516 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - Erweiterung der MicroVal Validierung für unterschiedliche Matrices (umfassender Geltungsbereich für Lebensmittel), auf das CFX Opus Deepwell Gerät und die CFX Manager Software IDE V 3.1 - Erweiterung der AOAC Matrices für Cannabis-anereicherte Produkte und Cannabis-Konzentrate

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

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

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

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

Alle hier genannten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 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 STEC VirX Kit

Manuale utente

Test per la rilevazione mediante PCR real-time di geni di virulenza in
Escherichia coli produttori di Shiga-tossina in campioni alimentari e ambientali

Catalogo #3578139

BIO-RAD

Indice

Sezione 1	Introduzione	1
Sezione 2	La tecnologia iQ-Check STEC VirX	1
Sezione 3	Componenti del kit	2
Sezione 4	Durata e conservazione	2
Sezione 5	Materiali necessari ma non forniti	2
	Apparecchiatura	2
	Materiali	3
Sezione 6	Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali	4
Sezione 7	Protocollo	6
	Arricchimento del campione	6
	Trattamento per la rimozione del DNA libero	7
	Estrazione del DNA	7
	PCR real-time	9
	Analisi dei dati	9
Sezione 8	Conferma dei risultati positivi	11
Sezione 9	Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check	12
Sezione 10	Performance del test e validazioni	12
Sezione 11	Riferimenti	13
Sezione 12	Cronologia delle revisioni	14
Appendice	— Guida al calcolo della miscela di PCR	15

Sezione 1

Introduzione

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

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

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

Sezione 2

La tecnologia iQ-Check STEC VirX

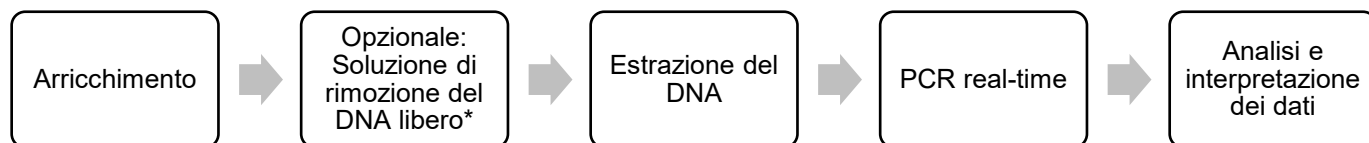
Il iQ-Check STEC VirX Kit è un test basato sull'amplificazione e sulla rilevazione genica mediante PCR real-time. I reagenti PCR pronti all'uso inclusi nel kit contengono oligonucleotidi (primer e sonde) specifici per i geni di virulenza *stx1/stx2* ed *eae*, oltre a DNA polimerasi e nucleotidi. La rilevazione e l'analisi dei dati vengono ottimizzate per l'utilizzo tramite uno strumento PCR real-time di Bio-Rad, come CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection 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 per mezzo del calore, con successivo appaiamento dei primer ad una regione target specifica. La DNA polimerasi si serve di tali primer e deossinucleosidi trifosfati (dNTP) per estendere il DNA, creando copie del DNA target. Queste copie vengono denominate ampliconi.

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

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

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



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

Sezione 3 Componenti del kit

Il iQ-Check STEC VirX Kit contiene reagenti a sufficienza per l'esecuzione di 96 test (94 campioni).

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

Sezione 4 Durata e conservazione

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

Sezione 5 Materiali necessari ma non forniti

Apparecchiatura

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

Sezione 5

- Agitatore magnetico
- Micropipette da 20, 200, e 1.000 µl
- Puntali per pipettatori a ripetizione; sterili e confezionati singolarmente
- Sistema PCR real-time di Bio-Rad*, ad esempio i sistemi PCR real-time CFX96 Touch Deep Well (catalogo #3600037) o CFX Opus Deepwell (catalogo #17007991)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System per l'estrazione automatizzata di DNA e la preparazione della piastra PCR (catalogo #3594911)

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

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

Materiali

- Terreno di arricchimento: acqua peptonata tamponata (ad esempio, BPW Plus catalogo #3564684, in forma disidratata, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 flaconi; 3555789, 2,3 L x 5 sacche; 3555790, 5 L x 2 sacche. BPW Standard catalogo #12013259, in forma disidratata, 500 g; 12013258 in forma disidratata, 5 kg; 12013260 5 L x 2 sacche)
- Terreno di arricchimento (arricchimento opzionale secondo lo standard USDA): mTSB (ad esempio, catalogo #3564426, in forma disidratata, 500 g) con l'aggiunta di casaminoacidi e novobiocina
- Selective STEC Supplement (catalogo #3564005)
- PIF Supplement (catalogo #12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalogo #3594970)
- iQ-Check STEC SerO II PCR Detection Kit (catalogo #12013174)
- iQ-Check Purification Reagent (catalogo #12012383)
- Materiali specifici per campioni ambientali
 - Spugne ambientali
 - Tamponi ambientali
 - Brodo neutralizzante per spugne e tamponi come Dey-Engley (D/E), HiCap Neutralizing Broth, o Lethen Broth
- Materiali specifici per l'estrazione in provette
 - Provette coniche sterili con tappo a vite da 1,5 ml (ad esempio, catalogo #2240110XTU)
- Materiali specifici per l'estrazione in una piastra deep well
 - Piastra a 96 pozzetti profondi (iQ-Check Deep Well Microplates, numero catalogo 3594900)
 - Pellicola sigillante in plastica (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, catalogo #3590139)

- Pellicola sigillante per piastre PCR (X-Pierce Films, catalogo #3593977 o Pre-Pierced Plate Sealing Film, #3600040, solo Nord America)
- Specifico per iQ-Check Prep System
 - Contenitore per la diluizione da 60 ml (catalogo #3594904)
 - Puntali con filtro (catalogo #3594902 o 12014486, 50 µl x 5.760; 3594903 o 12014483, 1.000 µl x 3.840)
 - Provette per miscela di PCR (catalogo #12016673, 5 ml x 25)
- Piastre PCR, provette, nastro sigillante e tappi
- Puntali sterili con filtro adattabili a micropipette da 20, 200 e 1.000 µl
- Puntali per pipette Combitip o pipettatori a ripetizione equivalenti, sterili e confezionati singolarmente
- Pipette da 1 e 10 ml
- Provette per test sterili da 2 e 5 ml
- Guanti senza polvere
- Acqua distillata sterile
- Candeggina, 5%
- Detergente come DNA AWAY o RNase AWAY

Sezione 6

Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali

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

Sezione 6

- Cambiare i guanti di frequente, in particolare se si sospetta la presenza di contaminazione
- Pulire gli spazi di lavoro periodicamente con candeggina al 5% e altri prodotti disinfettanti come DNA AWAY
- Utilizzare guanti senza polvere e non lasciare impronte digitali e scritte sui tappi delle provette. Entrambi interferiscono con l'acquisizione dei dati
- Si consiglia vivamente di osservare i requisiti generali illustrati nella norma EN ISO 22174:2005 (Microbiologia di alimenti e mangimi per animali — Reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca dei microrganismi patogeni degli alimenti — Requisiti generali e definizioni)
- iQ-Check STEC VirX Kit
 - Tutte le sostanze o miscele contenute nel kit per il test sono classificate come prodotti in conformità al sistema mondiale armonizzato (GHS). Il contatto con acidi potrebbe causare il rilascio di gas tossici. Se utilizzato correttamente, non sono necessarie precauzioni particolari. In caso di inalazione del prodotto, spostarsi in una zona ben areata e rivolgersi a un medico in caso di disturbi. Se il prodotto viene a contatto con gli occhi, sciacquarli mantenendoli aperti sotto l'acqua corrente per alcuni minuti. In caso di ingestione del prodotto, indurre il vomito e contattare un medico
- iQ-Check Prep System
 - L'utilizzo improprio del 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, il iQ-Check Prep System deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato e opportunamente addestrato. La manutenzione dello strumento deve essere eseguita esclusivamente da tecnici Bio-Rad
- CFX96 Touch Deep Well o CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Detection System
 - L'utilizzo improprio del CFX96 Touch o CFX Opus Deep Well Real-Time PCR Detection 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, il CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato e opportunamente addestrato. La manutenzione dello strumento deve essere eseguita esclusivamente da tecnici Bio-Rad
- Arricchimento
 - L'utente è tenuto a leggere, comprendere e osservare le informazioni relative alla sicurezza contenute nelle istruzioni del iQ-Check STEC VirX Kit. Conservare le istruzioni di sicurezza per consultazioni future. Al fine di ridurre i rischi biologici e legati all'esposizione a sostanze chimiche, eseguire i test degli agenti patogeni in un laboratorio adeguatamente attrezzato sotto la supervisione di personale addestrato. Seguire sempre le pratiche di laboratorio standard sulla sicurezza, indossando ad esempio indumenti protettivi e una protezione per gli occhi durante la manipolazione di reagenti e campioni contaminati. Evitare il contatto con il contenuto dei terreni di arricchimento e delle provette di reagenti al termine dell'amplificazione. Smaltire i campioni arricchiti in conformità alle norme di settore vigenti
 - A seconda delle normative locali, l'*E. coli* patogeno è un organismo che richiede il livello di biosicurezza 2 o 3. I campioni biologici come gli arricchimenti sono in grado di trasmettere malattie infettive. Osservare ogni normativa locale, statale/provinciale e/o nazionale

applicabile in materia di smaltimento di rifiuti biologici. Indossare i dispositivi di protezione individuale, inclusi, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, protezioni per gli occhi, schermi per il viso, camici da laboratorio e guanti. Il lavoro deve essere svolto presso strutture adeguatamente attrezzate e utilizzando i dispositivi di sicurezza opportuni (ad esempio, quelli per il contenimento fisico). Prima di operare con materiali potenzialmente infetti, gli addetti devono essere addestrati in conformità ai requisiti normativi aziendali/dell'ente applicabili

- Al termine del test, tutti i materiali e i terreni che potrebbero contenere agenti patogeni devono essere decontaminati in linea con le attuali norme industriali in materia di smaltimento dei rifiuti contaminati (ovvero, collocarli in autoclave per 20 min a 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:

AOAC PTM 121203		
Oggetto (matrici)	Preparazione dei campioni	Arricchimento/Estrazione del DNA
Manzo macinato crudo e rifilatura di manzo crudo (375 g) ^{1,2}	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 3 x <i>n</i> ml di acqua peptonata tamponata (BPW) 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
Tampone MicroTally ¹	Omogeneizzare il tampone in 200 ml di BPW preriscaldata	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 (375 g) ^{1,2}	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 3 x <i>n</i> ml di acqua peptonata tamponata (BPW) 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
Fiore di cannabis (10g), cioccolato e caramelle gommosi arricchiti di cannabis (25g), concentrato derivato della cannabis (5g), canapa (25g) ^{1,3}	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 9 x <i>n</i> ml (ad esempio, 25 g in 225 ml o 5 g in 45 ml) di acqua peptonata tamponata	Estrazione Easy I <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 18 – 22 hr a 37 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well
Farina multiuso (375 g) ^{1,3}	Diluizione 1:4 <ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 3 x <i>n</i> ml di acqua peptonata tamponata (BPW) preriscaldata + supplemento PIF (375 g in 1.125 ml + 150 µl di supplemento PIF preparato) Dopo l'arricchimento, trasferire un'aliquota di 1 – 5 ml in una provetta o in una piastra a pozzetto profondo e lasciare depositare per almeno 30 min prima di procedere all'estrazione del DNA diluizione 1:10. <ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 9 x <i>n</i> ml di acqua peptonata tamponata (BPW) preriscaldata + supplemento PIF (375 g in 3.375 ml + 375 µl di supplemento PIF preparato) 	Estrazione Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 22 ± 2 hr a 37 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well
MicroVal		
Oggetto (matrici)	Preparazione dei campioni	Arricchimento/Estrazione del DNA
Carne cruda (fino a 375 g) eccetto pollame ^{1,5}	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 3 x <i>n</i> ml di acqua peptonata tamponata (BPW) preriscaldata (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
Prodotti a base di latte crudo (25 g) ^{1,5}	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 9 x <i>n</i> ml di acqua peptonata tamponata (BPW) + supplemento STEC (25 g in 225 ml + 2,5 ml di supplemento STEC preparato)	Estrazione Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 16 – 24 hr a 41,5 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well
Farina e pasta cruda (375 g) ^{1,5}	Diluizione 1:4 <ul style="list-style-type: none"> Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 3 x <i>n</i> ml di acqua peptonata tamponata (BPW) preriscaldata + supplemento STEC (375 in 1.125 ml + 15 ml di supplemento STEC preparato) 	Estrazione Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 18-26 hr a 41,5 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well
Cibo a più ingredienti, piatti elaborati, prodotti crudi e frutta (25 g)	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 9 x <i>n</i> ml di acqua peptonata tamponata (BPW) preriscaldata (25 g in 225 ml)	Estrazione Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 18-26 hr a 41,5 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well
USDA FSIS MLG 5C.02		
Oggetto (matrici)	Preparazione dei campioni	Arricchimento/Estrazione del DNA
Prodotti a base di carne (325 g), spugne ambientali e per il campionamento di carcasse	Omogeneizzare il campione in mTSB o mTSB+n come descritto nel metodo MLG 5C.02	Estrazione Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 15 – 24 hr a 42 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well
Oggetto (matrici)	Preparazione dei campioni	Arricchimento/Estrazione del DNA
Campioni prelevati da superfici ambientali	Omogeneizzare i tamponi in 10 ml e le spugne in 90 ml di acqua peptonata tamponata (BPW) (si consiglia di utilizzare brodo neutralizzante che non contenga il complesso arilsolfonato)	Estrazione Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 8 – 22 hr a 41,5 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well

¹La validazione include l'utilizzo di iQ-Check Free DNA Removal Solution e dei file di protocollo del dosaggio "STEC VirX MLG Fast" o

"STEC VirX ISO Fast" per un tempo di esecuzione della PCR ridotto

²Protocollo armonizzato con i kit iQ-Check *E. coli* O157:H7 e iQ-Check *Salmonella* II

³Protocollo armonizzato con il kit iQ-Check *Salmonella* II

⁵Nell'ambito della validazione MicroVal, il brodo arricchito può essere conservato fino a 72 hr a 2 – 8 °C

B. Trattamento per la rimozione del DNA libero

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

C. Estrazione del DNA

Raccomandazioni generali:

- Prima di iniziare il test, accendere il blocco termico o il termoaggitatore con 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 Easy I

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

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

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

Protocollo Easy II

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

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

2. Aggiungere 100 µl di campione arricchito.

Nota: Agitare la sospensione per omogeneizzare la coltura e permettere l'assestamento dei residui prima

Sezione 7

di raccogliere il campione.

3. Miscelare la soluzione pipettando in alto e in basso fino a che non si completa l'omogeneizzazione.
4. Chiudere le provette o sigillare la piastra Deep Well con la pellicola sigillante preforata.
5. Posizionare le provette nel dispositivo per il frazionamento cellulare per 3 ± 1 min. Incubare le provette nel termoblocco a 95-100°C per 15-20 min.
6. In caso di utilizzo dell'incubatore-agitatore per le provette o le piastre deepwell, incubare le provette o le deepwell a 1300 o 1600 rpm, 95-100°C per 15-20 min.
7. Miscelare le provette nel vortex ad alta velocità e centrifugare a 10.000-12.000 x g per almeno 2 min. La centrifugazione per la piastra Deep Well non è necessaria.

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

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

D. PCR real-time

Installazione strumento e software

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

Preparazione della miscela di PCR

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

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

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

Eeguire la PCR

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

E. Analisi dei dati

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

Interpretazione dei risultati

Dopo aver impostato i parametri dell'analisi dati, i risultati vengono interpretati analizzando i valori Cq di ogni campione (il ciclo nel quale la curva di amplificazione supera la soglia). Il software CFX Manager IDE consente l'analisi interamente automatizzata dei sistemi di rilevazione Bio-Rad mediante PCR real-time.

Controlli

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

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

	Rilevazione <i>stx1/stx2</i> (canale FAM)	Rilevazione <i>eae</i> (canale Cy5)	Rilevazione controllo interno (canale HEX)
Controllo negativo	Cq = N/A*	Cq = N/A*	$26 \leq Cq \leq 36$
Controllo positivo	$26 \leq Cq \leq 36$	$26 \leq Cq \leq 36$	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 del gene di virulenza STEC positivo deve mostrare una curva di amplificazione tipica e deve avere un valore Cq ≥ 10 nei canali FAM (come valore minimo) e Cy5.

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

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

- Se non esiste un valore Cq per FAM o Cy5 e il controllo interno ha un Cq ≥ 26 , il campione viene considerato come campione negativo ai geni di virulenza STEC
- Se il controllo interno non presenta a sua volta un valore Cq (Cq = N/A), ciò indica probabilmente inibizione della reazione PCR. Diluire il campione (eseguire una diluizione 1:10 in acqua distillata

Sezione 8

sterile tramite 10 µl di estratto di DNA), utilizzare 5 µl della diluizione per l'amplificazione, quindi ripetere il test PCR.

- Se il valore Cq per il controllo interno è <26, l'interpretazione del risultato non sarà possibile. Verificare il corretto posizionamento della soglia, o che la curva dei dati non elaborati sia una curva di amplificazione regolare. Se la curva non possiede una forma caratteristica, sarà necessario ripetere il test PCR

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

Rilevazione <i>stx1/stx2</i> (canale FAM)	Rilevazione <i>eae</i> (canale Cy5)	Rilevazione controllo interno (canale HEX)	Interpretazione
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	NA	Positivo – Test con il kit iQ-Check SerO II
Cq ≥ 10	Cq = N/A	NA	Positivo per <i>stx1/stx2</i> , negativo per <i>eae</i> ¹
Cq = N/A	Cq ≥ 10	NA	Positivo per <i>eae</i> , negativo per <i>stx1/stx2</i> . Interrompere l'analisi del campione
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 26	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Inibizione ²

¹Procedere alla conferma quando richiesto, ad esempio, nell'ambito della validazione MicroVal

²Qualora la rilevazione produca un valore Cq = N/A per tutti i geni di virulenza *stx1/stx2* ed *eae* e per il controllo interno, il campione deve essere testato nuovamente ma diluito (1:10).

È possibile fornire un'interpretazione non valida quando i criteri di validazione non vengono soddisfatti. Controllare i dati non elaborati e procedere come se il campione fosse inibito. L'interpretazione del risultato del test e il processo di conferma potrebbero variare in base ai regolamenti locali.

Sezione 8

Conferma dei risultati positivi

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

Nell'ambito della validazione MicroVal, i test positivi *stx* devono essere confermati.

1. Strisciare 10 µl di arricchimento in piastre di agar selettivo (TBX o CHROMAgar STEC). Incubare le piastre per 18 – 24 hr a 37 ± 1 °C.
2. Risospendere una singola colonia in 100 µl di sale triptone o acqua peptonata tamponata (BPW) in una provetta per microcentrifuga ed eseguire il rilevamento dei geni di virulenza utilizzando iQ-Check STEC VirX Kit. È possibile riunire le 10 colonie insieme per testare i geni di virulenza. Se si ottiene un risultato positivo, occorre testare le colonie individualmente.
3. Utilizzare 5 µl della sospensione con 20 µl di miscela di PCR (vedere il paragrafo D. PCR real-time nella sezione 7) e seguire il resto del protocollo iQ-Check STEC VirX per l'interpretazione di dati e risultati. L'estrazione di DNA non è necessaria.
4. In caso di risultati contrastanti fra iQ-Check STEC VirX Kit e la conferma diretta, si consiglia di

svolgere procedure aggiuntive.

5. Diluire l'arricchimento 1:100 in brodo fresco (ad esempio, 0,1 ml di arricchimento in 9 ml di supplemento BPW+STEC fresco). Strisciare 10 µl di arricchimento diluito in piastre di agar selettivo e incubare per 18 – 24 hr a 37 ± 1 °C.
6. In aggiunta, incubare l'arricchimento diluito per 16 – 24 hr a $41,5 \pm 1$ °C, quindi strisciare sulle piastre di agar selettivo.
7. Esaminare fino a 50 colonie come raccomandato nel metodo ISO/TS 13136.

In caso di risultato discordante tra il kit iQ-Check STEC VirX e uno dei metodi di conferma indicati in precedenza, eseguire ulteriori test per garantire dei risultati validi.

Sezione 9

Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check

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

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

Sezione 10

Performance del test e validazioni



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



Il metodo iQ-Check STEC VirX è stato certificato da MICROVAL NEN come alternativa al metodo di riferimento ISO13136:2012 per il rilevamento dei geni *stx* di STEC nei prodotti a base di latte crudo (25 g), nei prodotti a base di carne cruda (375 g) e nei prodotti a base di impasto crudo e farina (375 g), cibo a più ingredienti, piatti elaborati, prodotti crudi e frutta (25 g). Il protocollo di validazione ha seguito lo standard ISO16140-2: 2016 e ha incluso l'utilizzo del sistema CFX96 Touch Deep Well e CFX Opus Deepwell Real-Time PCR, il CFX Manager Software IDE (v3.1 e successive), l'APF "STEC VirX ISO Fast" e l'uso di iQ-Check Free DNA Removal Solution come opzione. Numero di certificato: 2021LR96

Sezione 11

Riferimenti

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

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

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

ISO/TS 13136:2012 (E), Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups – Qualitative Method.

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

United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science (2019). Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. MLG 5C.02, Laboratory Guidebook Notice of Change, new chapter.

Sezione 12

Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero di documento	Modifica
Agosto 2020	10000131516 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Nuova struttura del documento e aggiornamento di riferimenti e contenuto - Rinnovo ed estensione della validazione di AOAC per tamponi MicroTally, cannabis e prodotti infusi di cannabis e del file di protocollo di applicazione "VirX Fast" - Aggiornamento del protocollo per la conferma delle colonie - Integrazione del riferimento MLG FSIS 5C.00 - Modifica al numero di documento – versione precedente 808474 REV C
Giugno 2022	10000131516 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Aggiornamento dei protocolli di arricchimento e conferma associati alla validazione MicroVal - Estensione della matrice AOAC per canapa e farina multiuso - Sostituita sezione del protocollo di arricchimento dei campioni con tabella di riepilogo - Aggiornamento dei riferimenti
Giugno 2023	10000131516 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - Estensione della validazione Microval su differenti matrici (ampia gamma di prodotti alimentari), sul CFX Opus Deepwell e CFX Manager Software IDE 3.1 - Estensione AOAC ai prodotti infusi di cannabis e ai concentrati di cannabis

Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR

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

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

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

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

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

Tutti i marchi registrati qui utilizzati sono di proprietà dei rispettivi titolari.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 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 STEC VirX Kit

Guia do usuário

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

Nº do catálogo 3578139

BIO-RAD

Índice

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

Seção 1

Introdução

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

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

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

Seção 2

A Tecnologia iQ-Check STEC VirX

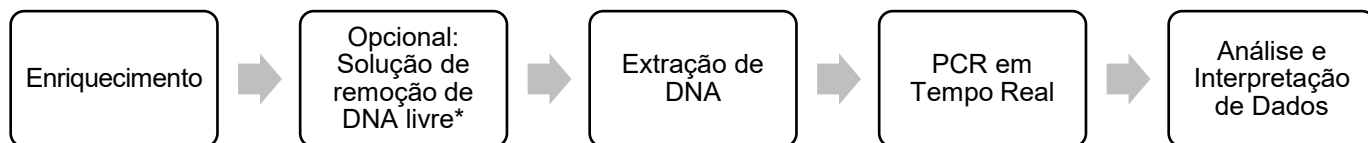
O iQ-Check STEC VirX Kit é um teste baseado na amplificação de genes e detecção por PCR em tempo real. Os reagentes de PCR prontos para uso do kit contêm oligonucleotídeos (iniciadores e sondas) específicos para genes virulentos *stx1/stx2* e *eae*, bem como DNA polimerase e nucleotídeos. A detecção e a análise de dados são otimizadas para uso com um instrumento de PCR em tempo real da Bio-Rad, como o CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System.

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

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

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



* Consulte o guia do usuário da iQ-Check Free DNA Removal Solution (nº 10000058391) para as condições de uso.

Seção 3

Componentes do Kit

O iQ-Check STEC VirX 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	Beads (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
- Específico para extração em tubos estéreis de tampa de rosca cônica de 1,5 ml
 - Centrífuga de bancada capaz de 10.000 – 12.000 x g
 - Bloco para banho seco a 37 ± 2°C e/ou 95 – 100°C
- Específico para extração em placa de poços
 - Agitador térmico de aquecimento* capaz de manter 37 ± 2°C e/ou 95 – 100°C, com uma velocidade de mistura de pelo menos 1.300 rpm
- Agitador

Seção 5

- 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, o CFX96 Touch Deep Well (nº do catálogo 3600037) ou CFX Opus Deepwell (nº do catálogo 17007991) Sistemas de PCR em tempo real
- Bio-Rad iQ-Check Prep System para extração automatizada de DNA e configuração de placa de PCR (nº do catálogo 3594911)

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

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

Suprimentos

- Meio de enriquecimento: água peptonada tamponada (por exemplo, BPW Plus nº do catálogo 3564684, desidratado, 500 g; 3554179, 6 frascos de 225 ml; 3555789, 5 sacos de 2,3 L; 3555790, 2 sacos de 5 L. BPW Standard, nº do catálogo 12013259, desidratado, 500 g; 12013258 desidratado, 5 kg; 12013260, 2 sacos de 5 L)
- Meio de enriquecimento (enriquecimento padrão opcional da USDA): mTSB (por exemplo, nº do catálogo 3564426, desidratado, 500g) mais ácidos casamino e novobiocina
- Selective STEC Supplement (nº do catálogo 3564005)
- PIF Supplement (nº do catálogo 12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (nº do catálogo 3594970)
- iQ-Check STEC SerO II PCR Detection Kit (nº do catálogo 12013174)
- iQ-Check Purification Reagent (nº do catálogo 12012383)
- Específico para amostras ambientais
 - Esponjas ambientais
 - Esfregaços ambientais
 - Caldo neutralizante para esponjas e esfregaços, como Dey-Engley (D/E) ou HiCap Neutralizing Broth ou Lethen Broth
- Específico para extração em tubos
 - Tubos com tampa cônica de rosca de 1,5 ml, estéreis (por exemplo, nº no catálogo 2240110XTU)
- Específico para extração em uma placa de poços
 - Placa de poços de 96 poços (iQ-Check Deep Well Microplates, nº do catálogo 3594900)
 - Filme plástico de vedação (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, nº do catálogo 3590139)

- Filme de vedação de placa PCR (X-Pierce Films, nº do catálogo 3593977, ou Pre-Pierced Plate Sealing Film, nº 3600040, somente América do Norte)
- Específico para iQ-Check Prep System
 - Recipiente de diluição de 60 ml (nº do catálogo 3594904)
 - Pontas de filtro (nº do catálogo 3594902 ou 12014486, 50 µl x 5.760; 3594903 ou 12014483, 1,000 µl x 3.840)
 - Tubos de mistura de PCR (nº do catálogo 12016673, 5 ml x 25)
- Placas de PCR, tubos, fitas e tampas de vedação
- Pontas de filtro estéreis adaptáveis a micropipetas de 20, 200 e 1.000 µl
- Pontas para Pipetas Combitip ou pipetadores de repetição equivalentes, estéreis, embalados individualmente
- Pipetas de 1 e 10 ml
- Tubos de ensaio estéreis de 2 e 5 ml
- Luvas sem talco
- Água estéril destilada
- Alvejante, 5%
- Agente de limpeza, como o DNA AWAY ou o RNase AWAY

Seção 6

Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados

- Este teste deve ser realizado por pessoal treinado
- Amostras e culturas de enriquecimento devem ser manuseadas como material potencialmente infeccioso e descartadas de acordo com as regras e regulamentos locais
- Todos os materiais potencialmente infecciosos devem passar por autoclavagem antes do descarte
- A qualidade dos resultados depende do estrito cumprimento das Boas Práticas de Laboratório (por exemplo, a norma EN ISO 7218), especialmente em relação ao PCR:
 - Nunca circule equipamentos de laboratório (pipetas, tubos etc.) de uma estação de trabalho para outra
 - Sempre use um controle positivo e um controle negativo para cada série de reações de amplificação
 - Não utilize reagentes após a expiração de suas datas de validade
 - Agite os reagentes do kit antes de utilizá-los, de modo a garantir a homogeneidade
 - Verifique periodicamente a exatidão e precisão das pipetas, bem como o correto funcionamento dos instrumentos

Seção 6

- 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 22174:2005 “Microbiologia de alimentos para consumo humano e para alimentação animal – reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de patógenos alimentares – Requisitos e definições gerais” (Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food pathogens – General requirements and definit)
- iQ-Check STEC VirX Kit
 - Todas as substâncias ou misturas no kit de teste são produtos classificados, de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado (GHS). O contato com ácidos pode causar a liberação de gases tóxicos. Nenhuma precaução especial é necessária, se usado corretamente. Se o produto for inalado, forneça ar fresco e consulte um médico em caso de queixas. Após o contato dos olhos com o produto, enxágue os olhos abertos por vários minutos em água corrente. Se os produtos forem ingeridos, provoque vômito e procure ajuda médica
- iQ-Check Prep System
 - O uso inadequado do iQ-Check Prep System pode causar ferimentos pessoais ou danos ao instrumento. Alguns componentes podem representar um risco de ferimentos pessoais devido ao calor excessivo, se manuseados incorretamente. Para uso seguro, o iQ-Check Prep System deve ser operado somente por pessoal qualificado do laboratório que tenha sido treinado adequadamente. A manutenção do instrumento deve ser realizada apenas pelos engenheiros de serviço de campo da Bio-Rad
- CFX96 Touch Deep Well ou CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Detection System
 - O uso inadequado do CFX96 Touch ou CFX Opus Deep Well Real-Time PCR Detection System pode causar ferimentos pessoais ou danos ao instrumento. Alguns componentes podem representar um risco de ferimentos pessoais devido ao calor excessivo, se manuseados incorretamente. Para uso seguro, o CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection 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
- Enriquecimento
 - O usuário deve ler, compreender e seguir todas as informações de segurança contidas nas instruções do iQ-Check STEC VirX 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
 - Dependendo das regulamentações locais, o *E. coli* patogênico é um organismo de nível 2 ou nível 3 de biossegurança. Amostras biológicas, como enriquecimentos, têm o potencial de

transmitir doenças infecciosas. Siga todos os regulamentos locais, estaduais/provinciais e/ou nacionais aplicáveis sobre o descarte de resíduos biológicos. Use equipamento de proteção adequado, que inclua, entre outros, óculos de proteção, proteção facial, roupas/jaleco e luvas. Todo o trabalho deve ser realizado em instalações adequadamente equipadas, utilizando o equipamento de segurança apropriado (por exemplo, dispositivos de contenção física). Os indivíduos devem ser treinados de acordo com os requisitos regulamentares e da empresa/instituição aplicáveis antes de trabalhar com materiais potencialmente infecciosos

- Quando o teste estiver concluído, todos os materiais e meios possivelmente contendo patógenos devem ser descontaminados, seguindo as normas atuais da indústria para o descarte de resíduos contaminados (ou seja, autoclave por 20 min a 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 do aplicativo e do escopo da validação:

Seção 7

AOAC PTM 121203		
Escopo (Matrizes)	Preparação da amostra	Enriquecimento/Extração de DNA
Carne bovina crua moída e aparas de carne bovina crua (375 g) ^{1,2}	Homogeneíze <i>n</i> g de alimento em 3 x <i>n</i> ml BPW pré-aquecido (375 g em 1.125 ml)	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar por 8 – 22 hr em 41,5 ± 1 °C ▪ Formato do tubo/poço
MicroTally swab ¹	Homogeneizar cotonete em 200 ml de BPW pré-aquecido	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar por 8 – 22 hr em 41,5 ± 1 °C ▪ Formato do tubo/poço
Espinafre fresco (375 g) ^{1,2}	Homogeneíze <i>n</i> g de alimento em 3 x <i>n</i> ml BPW pré-aquecido (375 g em 1.125 ml)	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar por 10 – 22 hr em 41,5 ± 1 °C ▪ Formato do tubo/poço
Flor de cannabis (10 g), chocolate e gomas com infusão de cannabis (25 g), concentrados derivados de cannabis (5 g), cânhamo (25 g) ^{1,3}	Homogeneíze <i>n</i> g de alimento em 9 x <i>n</i> ml BPW (25 g em 225 ml ou 5 g em 45 ml)	Extração Easy I <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar por 18 – 22 hr em 37 ± 1 °C ▪ Formato do tubo/poço
Farinha de uso geral (375 g) ^{1,3}	Diluição 1:4 <ul style="list-style-type: none"> ▪ Homogeneíze <i>n</i> g de alimento em 3 x <i>n</i> ml BPW pré-aquecido + Suplemento PIF (375 g em 1.125 ml + 150 µl de Suplemento PIF preparado) ▪ Após o enriquecimento, transfira uma alíquota de 1 a 5 ml para um tubo ou placa de poços profundos e deixe descansar por pelo menos 30 min. antes de prosseguir para a extração de DNA Diluição 1:10 <ul style="list-style-type: none"> ▪ Homogeneíze <i>n</i> g de alimento em 9 x <i>n</i> ml BPW pré-aquecido + Suplemento PIF (375 g em 3.375 ml + 375 µl de Suplemento PIF preparado) 	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar por 22 ± 2 hr em 37 ± 1 °C ▪ Formato do tubo/poço
MicroVal		
Escopo (Matrizes)	Preparação da amostra	Enriquecimento/Extração de DNA
Carne crua (até 375 g) exceto frango ^{1,5}	Homogeneíze <i>n</i> g de alimento em 3 x <i>n</i> ml BPW pré-aquecido (375 g em 1.125 ml)	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar por 10 – 18 hr em 41,5 ± 1 °C ▪ Formato do tubo/poço
Produtos de leite não pasteurizado (25 g) ^{1,5}	Homogeneíze <i>n</i> g de alimento em 9 x <i>n</i> ml BPW pré-aquecido + Suplemento STEC (25 g em 255 ml + 2,5 ml de Suplemento STEC preparado)	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar por 16 – 24hr em 41,5 ± 1 °C ▪ Formato do tubo/poço
Produtos de farinha e massa crua (375 g) ^{1,5}	Diluição 1:4 <ul style="list-style-type: none"> ▪ Homogeneíze <i>n</i> g de alimento em 3 x <i>n</i> ml BPW pré-aquecido + Suplemento STEC (375 g em 1.125 ml + 15 ml se Suplemento STEC preparado) 	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubate por 18 – 26 hr em 41,5 ± 1 °C ▪ Formato do tubo/poço
Barras multicomponentes, componentes de refeições, produtos crus e frutas (25 g)	Homogeneíze <i>n</i> g de alimento em 9 x <i>n</i> ml BPW pré-aquecido (25 g em 225 ml)	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubate por 18 – 26 hr em 41,5 ± 1 °C ▪ Formato do tubo/poço
USDA FSIS MLG 5C.02		
Escopo (Matrizes)	Preparação da amostra	Enriquecimento/Extração de DNA
Produtos à base de carne (325 g), esponjas e ambientais para carcaça	Homogeneíze a amostra em mTSB ou mTSB+n como descrito no método MLG 5C.02	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar por 15 – 24 hr em 42 ± 1 °C ▪ Formato do tubo/poço
Escopo (Matrizes)	Preparação da amostra	Enriquecimento/Extração de DNA
Amostras de superfície ambiental	Homogeneíze cotonetes em 10 ml e esponjas em 90 ml de BPW pré-aquecido (recomenda-se usar um caldo neutralizante que não contenha complexo de sulfonato de arilo)	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar por 8 – 22 hr em 41,5 ± 1 °C ▪ Formato do tubo/poço

¹A validação inclui o uso da Solução de remoção de DNA livre iQ-Check e dos Arquivos de Protocolo de Ensaio “STEC VirX MLG Fast” ou “STEC VirX ISO Fast” para um tempo de execução de PCR reduzido

²Protocolo harmonizado com os kits iQ-Check *E. coli* O157:H7 e iQ-Check *Salmonella* II

³Protocolo harmonizado com o kit iQ-Check *Salmonella* II

⁵No escopo da validação MicroVal, o caldo enriquecido pode ser armazenado por até 72 hr em 2 – 8 °C

B. Tratamento de remoção de DNA livre

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

C. Extração de DNA

Recomendações gerais:

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 a velocidade

média em uma placa de agitação magnética.

2. Em geral, evite agitar o saco de enriquecimento e coletar fragmentos de grande dimensão de resíduos alimentares. Para amostras alimentares com um sobrenadante gorduroso, colete a amostra a partir da camada logo abaixo desta.
3. Abra os tubos e os poços com cuidado para evitar possíveis contaminações cruzadas.
4. Resfrie a placa de poços 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-la 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 esferas de lise (reagentes A + F) tem um prazo de validade de 6 meses quando armazenado a 4 °C.

Protocolo Easy I

1. Alíquota de 100 µl de lise homogeneizado (reagente A) para tubos ou poços de uma placa Deep Well.
2. Adicione 100 µl de amostra enriquecida. Misture pipetando para cima e para baixo e feche o tubo com as tampas, ou vede a placa Deep Well com a película de vedação pré-perfurada.
3. Incube no bloco de calor apropriado a 95 – 100 °C por 10 – 15 min. ou no termoshaker 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 de poços.

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

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

Protocolo Easy II

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

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

2. Adicione 100 µl de amostra enriquecida.

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

Seção 7

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. Encubar os tubos em bloco térmico a 95-100°C por 15-20 min.
6. Se estiver usando um agitador térmico para tubos ou placas de poço profundo, encubar os tubos ou placas de poço profundo no agitador térmico a 1.300 a 1.600 rpm a 95-100°C por 15-20 min.
7. Agite no vórtex os tubos em alta velocidade e depois centrifugue a 10.000 – 12.000 x g por pelo menos 2 min. A centrifugação não é necessária para a placa Deep Well.

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

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

D. PCR em Tempo Real

Configuração do instrumento e do software

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

Preparação da mistura de PCR

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

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

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

Execute o PCR

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

E. Análise de dados

Os dados podem ser analisados diretamente no final da execução do PCR ou posteriormente, abrindo

o arquivo de dados armazenados. Siga as instruções no manual do usuário do software CFX Manager IDE correspondente para abrir arquivos de dados e definir os parâmetros de análise de dados.

Interpretação de resultados

Depois que os parâmetros de análise de dados forem definidos, os resultados serão interpretados através da análise dos valores Cq de cada amostra (o ciclo no qual a curva de amplificação cruza o limite). O software CFX Manager IDE permite análises automatizadas completas para sistemas de detecção de PCR em tempo real da Bio-Rad.

Controles

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

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

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

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

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

Amostras

Um teste de gene de virulência STEC positivo deve mostrar uma curva de amplificação típica e deve ter um valor de Cq ≥ 10 nos canais FAM (no mínimo) e Cy5.

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

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

- Se não houver valor de Cq para a FAM ou Cy5 e o controle interno tiver Cq ≥ 26 , essa amostra será considerada uma amostra negativa do gene de virulência STEC
- Se o controle interno também não tiver valor Cq (Cq = N/A), isso provavelmente indica inibição da reação de PCR. Dilua a amostra (faça uma diluição de 1:10 em água esterilizada destilada usando 10 μ l de extrato de DNA), use 5 μ l da diluição para amplificação e repita o teste PCR

Seção 8

- Se o valor Cq para o controle interno for <26, não será possível interpretar o resultado. Confirme que o limite foi colocado corretamente ou se a curva de dados brutos é uma curva regular de amplificação. Caso a curva não apresente uma forma característica, será necessário repetir o teste PCR

A interpretação dos resultados do teste é resumida na tabela a seguir:

Detecção <i>stx1/stx2</i> (Canal FAM)	Detecção <i>eae</i> (Canal Cy5)	Detecção de controle interno (Canal HEX)	Interpretação
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	NA	Positivo – Teste com kit iQ-Check SerOII
Cq ≥ 10	Cq = N/A	NA	Positivo para <i>stx1/stx2</i> , negativo para <i>eae</i> ¹
Cq = N/A	Cq ≥ 10	NA	Positivo para <i>eae</i> , negativo para <i>stx1/stx2</i> . Parar análise da amostra
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 26	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	Inibição ²

¹Proceda à confirmação quando necessário, por exemplo, no âmbito da validação MicroVal

²Quando a detecção de todos os genes de virulência *stx1/stx2* e *eae* e do controle interno fornece um valor Cq = N/A, a amostra deve ser testada novamente, porém, diluída (1:10).

Uma interpretação inválida pode ser fornecida quando os critérios de validação não são atendidos. Verifique os dados brutos e proceda como se as amostras estivessem inibidas. A interpretação do resultado do teste e o processo de confirmação podem variar dependendo dos regulamentos locais.

Seção 8

Confirmação de Resultados Positivos

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

No escopo da validação MicroVal, testes positivos para *stx* precisam ser confirmados.

1. Estrie 10 µl de enriquecimento em placas de ágar seletivo (TBX ou CHROMAgar STEC). Deixe incubar as placas por 18 – 24 hr em 37 ± 1°C.
2. Ressuspenda uma única colônia em 100 µl de sal de triptona ou BPW em um tubo de microcentrifuga e realize a detecção de genes de virulência usando iQ-Check STEC VirX Kit. É possível reunir 10 colônias para testar genes de virulência. Se for obtido um resultado positivo, as colônias devem ser testadas individualmente.
3. Use 5 µl de suspensão com 20 µl de mistura de PCR (consulte a seção 7 D. PCR em tempo real) e siga o restante do protocolo iQ-Check STEC VirX para a interpretação dos dados e resultados. A extração de DNA não é necessária.
4. No caso de resultados discrepantes entre o iQ-Check STEC VirX Kit e a confirmação direta, procedimentos adicionais são recomendados.
5. Dilua o enriquecimento 1:100 em caldo fresco (por exemplo, 0,1 ml de enriquecimento em 9 ml de

suplemento BPW+STEC fresco). Estrie 10 µl de enriquecimento diluído em placas de ágar seletivo e deixe incubar por 18 – 24 hr em 37 ± 1°C.

6. Além disso, deixe incubar o enriquecimento diluído por 16 – 24 hr em 41.5 ± 1°C em seguida, estrie em placas de ágar seletivo.
7. Faça a triagem de até 50 colônias conforme recomendado no método ISO/TS 13136.

Em caso de resultados discrepantes entre o kit iQ-Check STEC VirX e qualquer uma das opções de confirmação listadas acima, siga as etapas necessárias para garantir resultados válidos.

Seção 9

Confirmação de Colônias Únicas usando o Kit iQ-Check

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

1. Escolha uma colônia isolada, de um meio de cultura de ágar seletivo ou não seletivo, com um palito de dente, alça estéril ou outro consumível adaptado (por exemplo, uma ponta de pipeta).
2. Ressuspenda a colônia em 100 µl de sal de triptona ou água estéril destilada em um tubo de microcentrifuga. Homogeneíze usando um agitador.
3. Use 5 µl de suspensão com 20 µl de mistura de PCR (consulte a seção 7 D. PCR em tempo real) e siga o restante do protocolo iQ-Check STEC VirX para a interpretação dos dados e resultados. A extração de DNA não é necessária.

Seção 10

Desempenho e validação do teste



O iQ-Check STEC VirX Kit é validado pelo AOAC Research Institute através do Performance Tested Method Program para a detecção de *stx1/stx2* e *eae* em carne moída crua, cortes de carne crua, espinafre fresco, cotonetes MicroTally, flor de cannabis, chocolate e gomas com infusão de cannabis, concentrados derivados de cannabis, cânhamo e farinha de uso geral. Um resultado positivo com o iQ-Check deve ser considerado como presumido e recomenda-se que seja confirmado pelos métodos de referência padrão. Número do certificado: 121203.



O método iQ-Check STEC VirX foi certificado pela MICROVAL NEN como uma alternativa ao método de referência ISO13136:2012 para a detecção de genes *stx* de STEC em produtos lácteos crus (25 g), produtos de carne crua (375 g) e produtos de farinha e massa crua (375 g), barras multicomponentes, componentes de refeições, produtos crus e frutas (25 g). O protocolo de validação seguiu o padrão ISO16140-2: 2016 padrão e inclui o uso do CFX96 Touch Deep Well e CFX Opus Deepwell Real-Time PCR sistema, o CFX Manager Software IDE (v3.1 e posterior), o APF "STEC VirX ISO Fast" e o uso do iQ-Check Free DNA Removal Solution como opção. Número do certificado: 2021LR96

Seção 11

Referências

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

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

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

ISO/TS 13136:2012 (E), Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups – Qualitative Method.

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

United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science (2019). Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. MLG 5C.02, Laboratory Guidebook Notice of Change, new chapter.

Seção 12

Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Agosto de 2020	10000131516 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Novo design de documento e atualização de referências e conteúdo - Renovação e extensão da validação AOAC para esfregaços MicroTally, canabis e produtos infundidos de canabis e "VirX Fast" APF - Atualização do protocolo de confirmação da colônia - Integração da referência MLG FSIS 5C.00 - Alteração do número do documento – versão anterior 808474 REV C
Junho de 2022	10000131516 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Atualização dos protocolos de enriquecimento e confirmação associados à validação MicroVal - Extensão de matriz AOAC para cânhamo e farinha de uso geral - Substituição da seção do protocolo de enriquecimento de amostra por tabela de resumo - Atualização das referências
Junho de 2023	10000131516 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - Extensão de validação MicroVal em diferentes matrizes (ampla gama de escopo alimentar) e no CFX Opus Deepwell e CFX Manager Software IDE v3.1 - Extensão AOAC para produtos com infusão de cannabis e concentrados de cannabis

Apêndice – Guia de Cálculo da Mistura de PCR

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

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

Visite bio-rad.com/iqcheck 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 STEC VirX Kit

User Guide

Prueba de PCR en tiempo real para la detección de los genes de virulencia de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga en muestras de alimentos y ambientales

Referencia #3578139

BIO-RAD

Tabla de Contenidos

Apartado 1	Introducción	1
Apartado 2	La tecnología iQ-Check STEC VirX.....	1
Apartado 3	Componentes del kit	2
Apartado 4	Vida útil y conservación	2
Apartado 5	Instrumentos necesarios, no suministrados	2
	Equipos	2
	Proveedor	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	7
	Extracción de ADN	8
	PCR en tiempo real	9
	Análisis de los datos	10
Apartado 8	Confirmación de los resultados positivos	12
Apartado 9	Confirmación de colonias aisladas usando el kit iQ-Check.....	12
Apartado 10	Aplicación del ensayo y validaciones	13
Apartado 11	Referencias.....	13
Apartado 12	Historial de revisiones.....	14
Apéndice —	Guía de cálculo de la mezcla de PCR	15

Apartado 1

Introducción

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

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

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

Apartado 2

La tecnología iQ-Check STEC VirX

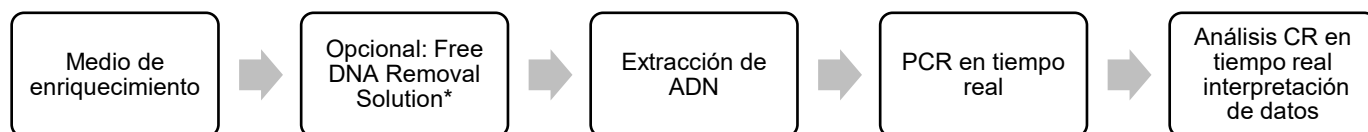
El iQ-Check STEC VirX Kit es un test que se basa en la amplificación del gen y la detección por PCR en tiempo real. Los reactivos de PCR listos para su uso del kit contienen oligonucleótidos (cebadores y sondas) específicos para los genes de virulencia *stx1/stx2* y *eae*, así como ADN polimerasa y nucleótidos. La detección y el análisis de datos están optimizados para su uso con un instrumento de PCR en tiempo real de Bio-Rad, como el sistema CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System.

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

En la PCR en tiempo real, se utilizan sondas específicas para detectar el ADN durante la fase de amplificación, mediante la hibridación de los amplicones. Estas sondas están unidas a un fluoróforo que sólo se vuelve fluorescente cuando se hibrida con la secuencia diana. El FAM es el fluoróforo unido a la sonda que hibrida con la secuencia de ADN específica del *stx1/stx2*, mientras que el Cy5 está unido a la sonda que hibrida con el gen *eae*. En ausencia de ADN diana, 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 recocido durante cada ciclo de PCR mientras que el software correspondiente traza la intensidad de la fluorescencia en función del número de ciclos.

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

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



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

Apartado 3 Componentes del kit

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

ID de reactivo	Reactivo	Cantidad proporcionada, ml
A	Reactivo de lisis	1 frasco, 20
B	Sondas fluorescentes	1 tubo, 0,55
C	Mezcla 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 Instrumentos necesarios, no suministrados

Equipos

- Homogeneizador de palas para homogeneizar las muestras de ensayo
- Incubador para el enriquecimiento microbiológico de muestras
- Instrumentos específicos para la extracción en tubos cónicos estériles con tapón de rosca de 1,5 ml
 - Centrífuga de sobremesa con capacidad de 10.000 – 12.000 x g
 - Bloque calefactor seco a 37 ± 2 °C y/o 95 – 100 °C

Apartado 5

- Instrumentos específicos para la extracción en placa Deep Well
 - Calefactor térmico con agitación* con capacidad para mantener 37 ± 2 °C y/o 95 – 100 °C, con una velocidad de agitación de al menos 1.300 rpm
- Agitador vórtex
- Placa agitadora magnética
- Micropipetas de 20, 200 y 1.000 µl
- Puntas para pipeteadores 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 (referencia #3600037) o CFX Opus Deepwell (referencia # 17007991).
- Bio-Rad iQ-Check Prep System para el procedimiento de extracción automático de ADN y configuración de la placa de PCR (referencia #3594911)

Nota: Recomendamos usar un suministro de alimentación eléctrica ininterrumpida (SAI) con el termociclador y los sistemas iQ-Check Prep.

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

Proveedor

- Medio de enriquecimiento: agua de peptona tamponada (por ejemplo, BPW Plus referencia #3564684, deshidratado, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 frascos; 3555789, 2,3 L x 5 bolsas; 3555790, 5 L x 2 bolsas. BPW Standard referencia #12013259, deshidratado, 500 g; 12013258 deshidratado, 5 kg; 12013260 5 L x 2 bolsas)
- Medio de enriquecimiento (enriquecimiento estándar USDA opcional): mTSB (por ejemplo, referencia #3564426, deshidratado, 500g) más casamino ácidos y novobiocina
- Selective STEC Supplement (referencia #3564005)
- PIF Supplement (referencia #12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (referencia #3594970)
- iQ-Check STEC SerO II PCR Detection Kit (referencia #12013174)
- iQ-Check Purification Reagent (referencia #12012383)
- Instrumentos específicos para muestras ambientales
 - Esponjas ambientales
 - Hisopos ambientales
 - Caldo neutralizante para esponjas e hisopos, como el caldo neutralizante Dey-Engley (D/E) o HiCap o el caldo Lethen

- Instrumentos específicos para la extracción en tubos
 - Tubos cónicos estériles con tapón de rosca de 1,5 ml (por ejemplo, referencia #2240110XTU)
- Materiales específicos para la extracción en una placa de pocillo profundo
 - Placa de pocillo profundo de 96 pocillos (iQ-Check Deep Well Microplates, referencia #3594900)
 - Película plástica de sellado (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, referencia #3590139)
 - Película de sellado de placas de PCR (X-Pierce Films, referencia #3593977, o Pre-Pierced Plate Sealing Film, #3600040, sólo en Norteamérica)
- Específico para iQ-Check Prep System
 - Recipiente de 60 ml para dilución (referencia #3594904)
 - Puntas con filtro (referencia #3594902 o 12014486, 50 µl x 5760; 3594903 o 12014483, 1000 µl x 3840)
 - Tubos para mix de PCR (referencia #12016673, 5 ml x25)
- Placas de PCR, tubos, film adhesivo y tapones
- Puntas estériles con filtro adaptables a micropipetas de 20, 200 y 1.000 µl
- Puntas para pipetas Combitip o pipeteadores de repetición equivalentes; estériles, empaquetadas individualmente
- Pipetas de 1 y 10 ml
- Tubos de ensayo estériles de 2 y 5 ml
- Guantes sin polvo
- Agua destilada estéril
- Lejía, 5 %
- Descontaminante, como DNA AWAY o RNase AWAY

Apartado 6

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

Apartado 6

- Todo el material potencialmente infeccioso debe ser esterilizado en autoclave antes de su eliminación
- La calidad de los resultados depende del estricto cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio (por ejemplo, la norma EN ISO 7218), especialmente en lo que respecta a la PCR:
 - El material de laboratorio (pipetas, tubos, etc.) no debe intercambiarse entre un puesto de trabajo y otro
 - Utilice siempre un control positivo y un control negativo para cada serie de reacciones de amplificación
 - No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad
 - Agite (agitador vórtex) los reactivos del kit antes de utilizarlos para asegurar su homogeneidad
 - Verifique periódicamente la exactitud y la precisión de las pipetas, así como el correcto funcionamiento de los instrumentos
 - Cámbiese los guantes a menudo, especialmente si sospecha que están contaminados
 - Limpie los espacios de trabajo periódicamente con un 5 % de lejía y otros agentes descontaminantes como DNA AWAY
 - Use guantes sin polvo y evite las huellas dactilares y escribir en las tapas de los tubos. Ambos interferirán con la adquisición de datos
- Se recomienda encarecidamente seguir los requisitos generales descritos en la norma EN ISO 22174:2005 (Microbiología de los alimentos y piensos - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en alimentos - Requisitos generales y definiciones)
- iQ-Check STEC VirX Kit
 - Todas las sustancias o mezclas del kit de análisis 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, suministrar aire fresco y consultar a un médico en caso de presentar molestias. En caso de contacto del producto con los ojos, enjuague el ojo abierto durante varios minutos con agua corriente. En caso de ingestión de los productos, induzca el vómito y solicite ayuda médica
- iQ-Check Prep System
 - El uso inadecuado del iQ-Check Prep System puede causar lesiones personales o daños en el instrumento. Algunos componentes pueden suponer un riesgo de lesiones personales debido al calor excesivo si se manejan de forma inadecuada. Para un uso seguro, el iQ-Check Prep System debe ser manipulado y utilizado sólo por personal de laboratorio cualificado que haya sido instruido para tal fin. El mantenimiento del instrumento debe ser realizado sólo por los ingenieros del servicio de campo de Bio-Rad

- CFX96 Touch Deep Well o CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Detection System
 - El uso inadecuado del CFX96 Touch o CFX Opus Deep Well Real-Time PCR Detection System puede causar lesiones personales o daños en el instrumento. Algunos componentes pueden suponer un riesgo de lesiones personales debido al calor excesivo si se manejan de forma inadecuada. Para un uso seguro, el CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System debe ser manipulado y utilizado sólo por personal de laboratorio cualificado que haya sido instruido para tal fin. El mantenimiento del instrumento debe correr a cargo exclusivamente de los ingenieros del servicio técnico de Bio-Rad

- Medio de enriquecimiento
 - El usuario debe leer, comprender y seguir toda la información de seguridad en las instrucciones del iQ-Check STEC VirX Kit. Conserve las instrucciones de seguridad para futuras consultas. Para reducir los riesgos asociados a la exposición a productos químicos y a riesgos biológicos, los análisis de patógenos deben ser realizados en un laboratorio debidamente equipado y bajo el control de personal capacitado. Siga siempre las prácticas reguladas de seguridad de los laboratorios, incluido el uso de vestimenta protectora adecuada y protección ocular al manipular reactivos y muestras contaminadas. Evite el contacto con el contenido de los medios de enriquecimiento y los tubos de reactivos después de la amplificación. Deseche las muestras enriquecidas de acuerdo con las normas vigentes aplicables a la industria

 - En función de los reglamentos locales, el *E. coli* patógeno es un organismo de bioseguridad de nivel 2 o nivel 3. Las muestras biológicas como los enriquecimientos tienen potencial de transmitir enfermedades infecciosas. Siga todos los reglamentos locales, estatales/provinciales y/o nacionales aplicables para la eliminación de desechos biológicos. Use el equipo de protección apropiado, que incluya, pero no se limite a, gafas protectoras, protector facial, vestimenta/bata de laboratorio y guantes. Todos los trabajos deben realizarse en instalaciones debidamente equipadas, utilizando el equipo de seguridad adecuado (por ejemplo, dispositivos de contención física). Las personas deben ser instruidas y estar capacitadas de acuerdo con los requisitos reglamentarios y de la empresa/institución aplicables antes de trabajar con materiales potencialmente infecciosos

 - Una vez finalizados los análisis, todos los materiales y medios que puedan contener patógenos deberán descontaminarse siguiendo las normas actuales de la industria para la eliminación de desechos contaminados (es decir, en autoclave durante 20 min a 120 °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 la prueba.

Altamente recomendable 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:

Apartado 7

AOAC PTM 121203		
Alcance (matrices)	Preparación de las muestras	Enriquecimiento/Extracción de ADN
Carne picada cruda y recortes de carne cruda (375 g) ^{1,2}	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
Hisopo MicroTally ¹	Homogeneizar el hisopo en 200 ml de APT precalentada.	Extracción Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubar durante 8 – 22 hr a 41,5 ± 1 °C Formato de tubo/Deep Well
Espinacas frescas (375 g) ^{1,2}	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
Flor de Cannabis (10 g), gominolas y chocolate con infusión de cannabis (25 g), concentrados derivados de cannabis (5 g), hemp (25 g) ^{1,3}	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de BPW (25 g en 225 ml o 5 g en 45 ml)	Extracción Easy I <ul style="list-style-type: none"> Incubar durante 18 – 22 hr a 37 ± 1 °C Formato de tubo/Deep Well
Harina para todo uso (375 g) ^{1,3}	Dilución de 1:4 <ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 3 x <i>n</i> ml de APT precalentada + PIF Supplement (375 g en 1.125 ml + 150 µl de PIF Supplement preparado) Después del enriquecimiento, transferir una alícuota de 1 – 5 ml a un tubo o placa de pocillos profundos y dejar reposar durante al menos 30 min. antes de proceder a la extracción de ADN Dilución 1:10 <ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de APT precalentada + PIF Supplement (375 g en 3.375 ml + 375 µl de PIF Supplement preparado) 	Extracción Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubar durante 22 ± 2 hr a 37 ± 1 °C. Formato de tubo/Deep Well
MicroVal		
Alcance (matrices)	Preparación de las muestras	Enriquecimiento/Extracción de ADN
Carne cruda (hasta 375 g) excluyendo aves ^{1,5}	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 – 18 hr a 41,5 ± 1 °C Formato de tubo/Deep Well
Productos de leche cruda (25 g) ^{1,5}	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de APT precalentada + STEC Supplement (25 g en 225 ml + 2,5 ml de STEC Supplement preparado)	Extracción Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubar durante 16 – 24 hr a 41,5 ± 1 °C Formato de tubo/Deep Well
Harina y productos con masa cruda (375g) ^{1,5}	Dilución de 1:4 <ul style="list-style-type: none"> Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 3 x <i>n</i> ml de APT precalentada + STEC Supplement (375 g en 1.125 ml + 15 ml de STEC Supplement preparado) 	Extracción Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubar durante 18 – 26 hr a 41,5 ± 1 °C Formato de tubo/Deep Well
Alimentos multicomponente, componentes de platos elaborados, vegetales crudos y fruta (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 18 – 26 hr a 41,5 ± 1 °C Formato de tubo/Deep Well
USDA FSIS MLG 5C.02		
Alcance (matrices)	Preparación de las muestras	Enriquecimiento/Extracción de ADN
Productos cárnicos (325 g), esponjas ambientales y de canales	Homogeneizar la muestra en mTSB o mTSB+n como se describe en el método MLG 5C.02	Extracción Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubar durante 15 – 24 hr a 42 ± 1 °C Formato de tubo/Deep Well
Alcance (matrices)	Preparación de las muestras	Enriquecimiento/Extracción de ADN
Muestras ambientales de superficie	Homogeneizar los hisopos en 10 ml y las esponjas en 90 ml de APT precalentada (se recomienda utilizar caldo neutralizador que no contenga complejo de aril sulfonato)	Extracción Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubar durante 8 – 22 hr a 41,5 ± 1 °C Formato de tubo/Deep Well

¹La validación incluye el uso de iQ-Check Free DNA Removal Solution y de los archivos de protocolo de ensayo "STEC VirX MLG Fast" o "STEC VirX ISO Fast" para reducir el tiempo de ejecución de la PCR

²Protocolo armonizado con los kits iQ-Check *E. coli* O157:H7 e iQ-Check *Salmonella* II

³Protocolo armonizado con el kit iQ-Check *Salmonella* II

⁵En el marco de la validación de MicroVal, el caldo enriquecido puede almacenarse hasta 72 hr a 2 – 8°C

B. Tratamiento de eliminación de ADN libre

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

C. Extracción de ADN

Recomendaciones generales:

1. Encienda el bloque calefactor o calefactor térmico con agitación para precalentar antes de iniciar la prueba. Póngalo a 95 – 100 °C. Mantenga el reactivo de lisis en agitación a velocidad media en una placa agitadora magnética mientras pipetea.
2. En general, evite agitar la bolsa de enriquecimiento y recoger grandes fragmentos de restos de muestra. Para muestras de alimentos con un sobrenadante graso, recoja la muestra de justo debajo de esta capa.
3. Abra los tubos y pocillos con cuidado para evitar cualquier posible contaminación cruzada.
4. Enfríe la placa de pocillos profundos antes de pipetear directamente a través de la película de sellado pre-perforada .
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 A (reactivo de lisis).
 - b. Utilice puntas con apertura suficientemente ancha para permitir el pipeteo homogeneizado del reactivo de lisis.
 - c. El reactivo de lisis mezclado con perlas de lisis (reactivos A + F) tiene una vida útil de 6 meses almacenado a una temperatura de 4 °C.

Protocolo Easy I

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

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

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

Apartado 7

Protocolo Easy II

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

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

2. Añada 100 µl de muestra enriquecida.

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

3. Mezcle la solución pipeteando hacia arriba y hacia abajo hasta que se homogeneice.
4. Cerrar los tubos o sellar la placa de pocillo profundo mediante la película de sellado pre-perforada.
5. Coloque el tubo en el disruptor celular durante 3 ± 1 min. Incubar los tubos en el bloque térmico a 95–100°C durante 15–20 min.
6. Si se emplea un termoagitador para tubos o placa de pocillo profundo (placa deep well), incubar los tubos o la placa a 95-100°C programando una agitación de 1,300 a 1,600 rpm 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 de pocillos profundos.

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

El sobrenadante puede ser almacenado hasta 1 año a -20 °C. Antes de volver a utilizarlo, déjelo descongelar y homogeneícelo, 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 de la guía del usuario del sistema de PCR en tiempo real para los kits iQ-Check.

Preparación de la mix de PCR

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

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

2. Pipetee 20 µl de mix PCR en cada pocillo según la configuración de su placa.

- Añada 5 µl de extracto de ADN, reactivo D (control negativo) o reactivo E (control positivo). No agite (agitador vortex) la muestra antes del pipeteo. Selle herméticamente los pocillos de la placa de o las tiras. 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 (spin rápido) para eliminar cualquier burbuja.
- 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 de usuario del sistema de PCR en tiempo real del kit iQ-Check.

E. Análisis de los datos

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

Interpretación de los resultados

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

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

Controles

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

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

	Detección <i>destx1/stx2</i> (FAM)	detección de <i>eae</i> (Cy5)	Detección de control interno (canal HEX)
Control negativo	Cq = N/A*	Cq = N/A*	26 ≤ Cq ≤ 36
Control positivo	26 ≤ Cq ≤ 36	26 ≤ Cq ≤ 36	NA

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

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

Apartado 7

Muestras

Una prueba positiva del gen de virulencia STEC debe mostrar una curva de amplificación típica y debe tener un valor $Cq \geq 10$ en los canales FAM (como mínimo) y Cy5.

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

Si no hay un valor Cq ($Cq = N/A$) para FAM o Cy5, o si la curva no es una curva de amplificación típica, debe analizarse el control interno de esa muestra:

- Si no hay un valor Cq para FAM o Cy5 y el control interno tiene un $Cq \geq 26$, esta muestra se considera una negativa para el gen de virulencia de STEC
- Si el control interno tampoco tiene un valor Cq ($Cq = N/A$), esto probablemente indica la inhibición de la reacción de PCR. Diluya la muestra (realice una dilución 1:10 en agua destilada estéril utilizando 10 μ l de extracto de ADN), utilice 5 μ l de la dilución para la amplificación y repita la prueba PCR.
- Si el valor Cq del control interno es < 26 , no es posible interpretar el resultado. Verifique que el umbral se haya colocado correctamente, o que la curva de datos en bruto sea una curva de amplificación típica. Si la curva no tiene una forma característica, será necesario repetir la prueba de PCR

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

Detección <i>destx1/stx2</i> (FAM)	detección de <i>eae</i> (Cy5)	Detección de control interno (canal HEX)	Interpretación
$Cq \geq 10$	$Cq \geq 10$	NA	Resultado positivo - Prueba con el kit iQ-Check SerO II
$Cq \geq 10$	$Cq = N/A$	NA	Positivo para <i>stx1/stx2</i> , negativo para <i>eae</i> ¹
$Cq = N/A$	$Cq \geq 10$	NA	Positivo para <i>eae</i> , negativo para <i>stx1/stx2</i> . Detener el análisis de la muestra
$Cq = N/A$	$Cq = N/A$	$Cq > 26$	Negativo
$Cq = N/A$	$Cq = N/A$	$Cq = N/A$	Inhibición ²

¹Proceda a la confirmación cuando se requiera, por ejemplo, en el ámbito de la validación de MicroVal.

²Si la detección de los genes de virulencia *stx1/stx2* y *eae* y la detección de control interno dan un valor $Cq = N/A$, es necesario volver a analizar la muestra, pero diluida (1:10).

Si no se cumplen los criterios de validación, se puede dar una interpretación errónea. Compruebe los datos en bruto y proceda como si la muestra se hubiera inhibido. La interpretación del resultado de la prueba y el proceso de confirmación pueden variar en función de la normativa local.

Apartado 8

Confirmación de los resultados positivos

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

En el ámbito de la validación de MicroVal, deben confirmarse las pruebas positivas en *stx*.

1. Rayar 10 µl de enriquecimiento en placas de agar selectivo (TBX o CHROMAgar STEC). Incubar las placas 18 – 24 hr a 37 ± 1 °C.
2. Resuspender una colonia aislada en 100 µl de sal de triptona o APT en un tubo de microcentrífuga y realizar la detección de los genes de virulencia utilizando iQ-Check STEC VirX Kit. Es posible agrupar 10 colonias para analizar los genes de virulencia. Si se obtiene un resultado positivo, las colonias deben ser analizadas individualmente.
3. Utilizar 5 µl de la suspensión con 20 µl de la mezcla PCR (véase 7 D. PCR en tiempo real) y seguir el resto del protocolo iQ-Check STEC VirX para la interpretación de los datos y los resultados. No es necesario realizar extracción de ADN.
4. En caso de resultados discrepantes entre el iQ-Check STEC VirX Kit y la confirmación directa, se recomiendan procedimientos adicionales.
5. Diluir el enriquecimiento 1:100 en caldo fresco (por ejemplo, 0,1 ml de enriquecimiento en 9 ml de APT fresca+STEC Supplement). Sembrar 10 µl del enriquecimiento diluido en placas de agar selectivo e incubar durante 18 – 24 hr a 37 ± 1 °C.
6. Además, incubar el enriquecimiento diluido entre 16 y 24 hr a 41,5 ± 1 °C y, a continuación, sembrar en placas de agar selectivo.
7. Examinar hasta 50 colonias como se recomienda en el método ISO/TS 13136.

En caso de resultados discrepantes entre iQ-Check STEC VirX Kit y alguna de las opciones para confirmación listadas arriba, siga los pasos necesarios para asegurar que los resultados son válidos.

Apartado 9

Confirmación de colonias aisladas usando el kit iQ-Check

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

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

Apartado 10

Aplicación del ensayo y validaciones



El iQ-Check STEC VirX Kit está validado por el Instituto de Investigación de la AOAC en el marco del Programa de Métodos de Rendimiento Comprobados para la detección de *stx1/stx2* y *eae* en carne de vacuno cruda, carne de vacuno triturada cruda, espinacas frescas, hisopos MicroTally, flor de cannabis, gominolas y chocolate con infusión de cannabis, concentrados derivados de cannabis, cáñamo y harina para todo uso. Un resultado positivo con iQ-Check debe considerarse como presuntivo y se recomienda que se confirme mediante métodos de referencia normalizados. Número de certificado: 121203.



El método iQ-Check STEC VirX ha sido certificado por MICROVAL NEN como alternativa al método de referencia ISO13136:2012 para la detección de genes *stx* de STEC en productos de leche cruda (25 g), productos cárnicos crudos (375 g) y harinas y productos de masa crudos (375 g), alimentos multicomponente, componentes de platos elaborados, vegetales crudos y fruta (25 g). El protocolo de validación siguió la norma ISO16140-2: 2016 e incluyó el uso del sistema CFX96 Touch Deep Well y CFX Opus Deepwell Real-Time PCR, el CFX Manager Software IDE (v3.1 y posterior), el APF "STEC VirX ISO Fast" y el uso de iQ-Check Free DNA Removal Solution de forma opcional. Número de certificado: 2021LR96

Apartado 11

Referencias

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

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

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

ISO/TS 13136:2012 (E), Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups – Qualitative Method.

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

United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science (2019). Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. MLG 5C.02, Laboratory Guidebook Notice of Change, new chapter.

Apartado 12

Historial de revisiones

Fecha de publicación	Número de documento	Cambio
Agosto 2020	10000131516 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Nuevo diseño del documento y actualización de las referencias y el contenido - Renovación y ampliación de la validación AOAC para los hisopos MicroTally, el cannabis y los productos con infusión de cannabis y “VirX Fast” APF - Actualización del protocolo de confirmación de colonias - Integración de la referencia MLG FSIS 5C.00 - Cambio en el número de documento - versión anterior 808474 REV C
Junio de 2022	10000131516 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Actualización de los protocolos de enriquecimiento y confirmación asociados a la validación de MicroVal - Ampliación de la matriz AOAC para el cáñamo y la harina para todo uso - Sustitución de la sección del protocolo de enriquecimiento de muestras por un cuadro resumen - Actualización de las referencias
Junio de 2023	10000131516 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - Extensión de la validación Microval en diferentes matrices (alcance de amplio rango de alimentos) y en el CFX Opus Deepwell y Software CFX Manager IDE v3.1 - Extensión de matriz en AOAC para productos con infusión de cannabis y concentrados de cannabis

Apéndice — Guía de cálculo de la mezcla de PCR

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

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

Visite bio-rad.com/iqcheck para obtener 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 STEC VirX Kit

用户指南

食品和环境样品中产志贺毒素大肠杆菌毒力基因实时 PCR 检测方法的研究

目录号 3578139

BIO-RAD

目录

第 1 部分	简介	1
第 2 部分	iQ-Check STEC VirX 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	8
	DNA 提取	8
	实时荧光定量 PCR	9
	数据分析	10
第 8 部分	阳性结果的确认	11
第 9 部分	使用 iQ-Check 试剂盒确认单菌落	12
第 10 部分	测试性能和验证	13
第 11 部分	参考资料	13
第 12 部分	修订记录	14
附录 —	PCR 混合物计算指南	15

第 1 部分

简介

*大肠杆菌*是人类和动物肠道中的正常菌群，通常是无害的。然而，某些菌株会导致人类疾病。其中，产志贺毒素的*大肠杆菌* (STEC) 是已知对人类具有高致病性的细菌。该细菌可导致出血性结肠炎和溶血性尿毒症综合征 (HUS)。STEC 是通过其基因组中存在 *stx1* 或 *stx2* (志贺毒素基因) 来定义的。*eae* (紧密素) 基因是一种额外的毒力标记。尽管包括 O26、O45、O103、O111、O121 和 O145 在内的其他非 O157 STEC 菌株也与爆发有关，但这些 STEC 菌株中最著名的是*大肠杆菌* O157:H7。

STEC 的爆发通常与生肉（尤其是牛肉）的消费息息相关，也与乳制品有密切关系，最近还在新鲜农产品中发现相关菌株爆发情况。*stx1/stx2* 和 *eae* 靶标均呈阳性的样本通常需要进一步检测以确定主要*大肠杆菌* 菌血清群。

基于多重实时 PCR 系统，iQ-Check STEC VirX Kit 允许在微生物增菌后几小时内在一个孔中检测 *stx1/stx2* 和 *eae* 毒力基因。然后，根据当地要求，对带有或不带有 *eae* 的 *stx1/stx2* 阳性样本使用 iQ-Check STEC SerO11 Real-Time PCR 试剂盒进行检测。

第 2 部分

iQ-Check STEC VirX 技术

iQ-Check STEC VirX Kit 是一种基于实时 PCR 的基因扩增和检测的测试。该试剂盒的即用型 PCR 试剂包含 *stx1/stx2* 和 *eae* 毒力基因特异性寡核苷酸（引物和探针），以及 DNA 聚合酶和核苷酸。我们将检测过程 and 数据分析进行了优化，可与 Bio-Rad 的实时荧光定量 PCR 仪器（例如 CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System）配合使用。

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，经过多次加热和冷却，可使 DNA 受热变性，然后退火，引物与目标 DNA 互补区结合，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。FAM 是连接到与 *stx1/stx2* 特异性 DNA 序列杂交的探针的荧光团，而 Cy5 连接到与 *eae* 基因杂交的探针。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，可验证任何可能的阴性结果。该对照与 STEC 靶标 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 STEC 毒力基因进行定性检测。其中主要包括以下五个步骤：



*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 STEC VirX Kit 包含足够进行 96 项检测（94 份样本）的试剂。

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 10,000 – 12,000 x g）
 - 干式恒温器（可调至 37 ± 2° C 和/或 95 – 100° C）
- 提取专用深孔板
 - 加热振荡混合仪（可维持 37 ± 2° C 和/或 95 – 100° C 恒温，混合速度至少为 1,300 rpm）

第 5 部分

- 涡旋振荡器
- 磁力搅拌板
- 微量移液枪 (20 µl, 200 µl, 1,000 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 5L x 2 袋)
- 增菌培养基 (可选 USDA 标准增菌) : mTSB (例如, 目录号 3564426, 干粉, 500g) 加上酪蛋白氨基酸和新生霉素
- Selective STEC Supplement (目录号 3564005)
- PIF Supplement (目录号 12013322, 2 g)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (目录号 3594970)
- iQ-Check STEC SerO II PCR Detection Kit (目录号 12013174)
- 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 中和肉汤, 或 Letheen 肉汤
- 专用于管内提取
 - 1.5 ml 锥形螺旋盖管, 无菌 (例如产品目录号 2240110XTU 的产品)
- 专用于在深孔板内提取
 - 96 孔深孔板 (iQ-Check Deep Well Microplates, 目录号 3594900)

- 塑料密封膜 (TeSeE NSP Plastic Sealing Film, 目录号 3590139)
- PCR 板密封膜 (X-Pierce Films, 目录号 3593977 或 Pre-Pierced Plate Sealing Film, 目录号 3600040, 仅限北美)
- 专门针对 iQ-Check Prep System
 - 60 ml 稀释容器 (目录 #3594904)
 - 带滤芯移液器枪头 (目录号 3594902 或 12014486, 50 μ l x 5,760 ; 3594903 或 12014483, 1,000 μ l x 3,840)
 - PCR 混合管 (目录号 12016673, 5 ml x 25)
- PCR 板、管子、密封胶带和盖子
- 适用于 20、200 和 1,000 μ l 微量移液管的无菌带滤芯移液器枪头
- Combitip 移液器等等效重复移液器的枪头 ; 无菌, 独立包装
- 1 ml 和 10 ml 移液器
- 2 ml 和 5 ml 无菌试管
- 无粉手套
- 蒸馏无菌水
- 漂白剂, 5%
- DNA AWAY 或 RNase AWAY 等清洁剂

第 6 部分

最佳实验结果的安全预防措施及建议

- 此测试必须由经过专门培训的人员操作
- 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

第 6 部分

- 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 22174:2005（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
- iQ-Check STEC VirX Kit
 - 根据全球化学品统一分类和标签制度 (GHS)，测试套件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 或者 CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Detection System
 - CFX96 Touch 或者 CFX Opus Deep Well Real-Time PCR Detection 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，CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection 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
- 增菌条件
 - 用户应阅读、理解并遵守 iQ-Check STEC VirX 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。
 - 根据当地法规，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置法规，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。

第 7 部分

AOAC PTM 121203		
范围 (食品基质)	样本制备	增菌/DNA 提取
生碎牛肉和生牛肉边角料 (375 g) ^{1,2}	在 3 x n ml 预热 BPW 中均匀混合 ng 食品 (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/深孔
MicroTally 拭子 ¹	在 200 ml 预热 BPW 中均匀混合拭子	Easy II 提取 <ul style="list-style-type: none"> 在 41.5±1° C 下培养 8 – 22 hr 管/深孔
新鲜菠菜 (375 g) ^{1,2}	在 3 x n ml 预热 BPW 中均匀混合 ng 食品 (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/深孔
大麻花(10 克), 大麻巧克力和软糖(25 克), 大麻浓缩物(5 克),大麻(25 克) ^{1,3}	在 9 x n ml BPW 中均匀混合 ng 食品 (225 ml 中混合 25 g 或者 45 ml 中混合 5 g)	容易提取 <ul style="list-style-type: none"> 在 37±1° C 下培养 18 – 22 hr 管/深孔
通用面粉 (375 g) ^{1,3}	1:4 稀释 <ul style="list-style-type: none"> 在 3 x n ml 预热 BPW + PIF 添加剂中均匀混合 ng 食品 (1125 ml + 150 µl 制备 PIF 添加剂中混合 375 g) 增菌后, 将 1 – 5 ml 等量转移到试管或深孔板中, 静置至少 30 min, 然后进行 DNA 提取 1:10 稀释 <ul style="list-style-type: none"> 在 9 x n ml 预热 BPW + PIF 添加剂中均匀混合 ng 食品 (3,375 ml + 375 µl 制备 PIF 添加剂中混合 375 g) 	Easy II 提取 <ul style="list-style-type: none"> 在 37±1° C 下培养 22±2 hr 管/深孔
MicroVal		
范围 (食品基质)	样本制备	增菌/DNA 提取
生肉 (最多 375 g), 不包括家禽 ^{1,5}	在 3 x n ml 预热 BPW 中均匀混合 ng 食品 (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/深孔
生牛乳制品 (25 g) ^{1,5}	在 9 x n ml 预热 BPW + STEC 补添加剂中均匀混合 ng 食品 (225 ml + 2.5 ml 制备 STEC 添加剂中混合 25 g)	Easy II 提取 <ul style="list-style-type: none"> 在 41.5±1° C 下培养 16 – 24 hr 管/深孔
面粉和生面团产品(375 克) ^{1,5}	1:4 稀释 <ul style="list-style-type: none"> 在 3 x n ml 预热 BPW + STEC 添加剂中均匀混合 ng 食品 (1125 ml + 15 ml 制备 STEC 添加剂中混合 375 g) 	Easy II 提取 <ul style="list-style-type: none"> 在 41.5±1° C 下培养 18 – 26 hr 管/深孔
多成分食品,膳食成分,农产品和水果(25 克)	在 9 x n ml 预热 BPW 中均匀混合 ng 食品 (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 18 – 26 hr 管/深孔
USDA FSIS MLG 5C.02		
范围 (食品基质)	样本制备	增菌/DNA 提取
肉制品 (325 g), 环境海绵和胴体海绵	按照 MLG 5C.02 方法中的描述, 在 mTSB 或 mTSB+n 中均匀混合样品	Easy II 提取 <ul style="list-style-type: none"> 在 42±1° C 下培养 15 – 24 hr 管/深孔
范围 (食品基质)	样本制备	增菌/DNA 提取
环境表面样品	在 10 ml 预热 BPW 中均匀混合拭子, 在 90 ml 中均匀混合海绵 (建议使用不含芳基磺酸络合物的中和肉汤)	Easy II 提取 <ul style="list-style-type: none"> 在 41.5±1° C 下培养 8 – 22 hr 管/深孔

¹ 验证包括使用“iQ-Check Free DNA Removal Solution”和“STEC VirX MLG Fast”或“STEC VirX ISO Fast”检测方案文件, 以缩短 PCR 运行时间

² 采用 iQ-Check 大肠杆菌 O157:H7 和 iQ-Check 沙门氏菌 II 试剂盒的兼容方案

³ 采用 iQ-Check 沙门氏菌 II 试剂盒的兼容方案

⁵ 在 MicroVal 验证范围内, 增菌肉汤可以在 2 – 8° C 下储存长达 72 hr

B. 去除游离 DNA 处理

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

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。如果食品样本中含有脂肪上清液，从此层以下收集样本。
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，冷却深孔板。
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。

简易法 I 流程

1. 向离心管或深孔板中加入 100 µl 混匀的裂解液（A 试剂）。
2. 加入 100 µl 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深孔板。
3. 在 95 – 100° C 的适当恒温器中孵育 10 – 15 min，或在 1,300 rpm 的加热振荡混合仪中孵育 15 – 20 min。
4. 高速涡流管。
5. 如果使用深孔板，让其冷却至室温 (20–25°C)。
6. 将离心管在 10,000 – 12,000 x g 条件下至少离心 2 min。深孔板不需要进行离心。

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 10,000 – 12,000 x g 5 min。

Easy II 流程

1. 向深孔板的孔中加入 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深孔板密封。
5. 将试管置于细胞破碎器中 3 ± 1 min。将试管放在加热块中于 $95-100^{\circ}\text{C}$ 下孵育 15–20 分钟。
6. 如果使用试管或深孔板形式的搅拌培养箱，请先将试管或深孔板放在搅拌培养箱中以 1,300 至 1,600 rpm, $95-100^{\circ}\text{C}$ 孵育 15–20 分钟。
7. 将离心管高速涡旋振荡，然后在 $10,000 - 12,000 \times g$ 条件下至少离心 2 min。深孔板不需要进行离心。

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 $10,000 - 12,000 \times g$ 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 混合物的制备

1. 制备 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。利用“附录一 PCR 混合物计算指南”中的移液概览表，即可确定每种试剂的所需体积。

注意：PCR 混合物（B 试剂 + C 试剂）制备完后，应立即使用。在 $2 - 8^{\circ}\text{C}$ 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 20 μ l PCR 混合物。

- 加入 5 μ l DNA 提取物，或试剂 D（阴性对照）或试剂 E（阳性对照）。移液前不要涡旋振荡样品。将上样孔密封。请小心移液，避免孔底部产生气泡。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。
- 将 PCR 板或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 试剂盒的实时荧光定量 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 Software 用户手册中的说明，来打开数据文件并设置数据分析参数。

结果解释

设置数据分析参数后，可通过分析每个样本的 Cq 值（扩增曲线与阈值相交的循环）来解读检测结果。CFX Manager IDE 软件可对 Bio-Rad 实时荧光定量 PCR 检测系统进行完整的自动化分析。

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。

	<i>stx1/stx2</i> 检测 (FAM 通道)	<i>eae</i> 检测 (Cy5 通道)	内部对照检测 (HEX 通道)
阴性对照	Cq = N/A*	Cq = N/A*	26 ≤ Cq ≤ 36
阳性对照	26 ≤ Cq ≤ 36	26 ≤ Cq ≤ 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 STEC 毒力基因检测必须显示典型的扩增曲线，并且在 FAM（最低）和 Cy5 通道中的 Cq 值必须 ≥ 10。

第 8 部分

- 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，则视为 STEC 毒力基因阳性样本
- 如果 FAM 的 Cq 值 ≥ 10 ，而 Cy5 的 Cq 值为 N/A，则样本为 *stx1/stx2* 毒力基因阳性
- 如果 FAM 的 Cq 值为 N/A，而 Cy5 的 Cq 值 ≥ 10 ，则样本为 *eae* 毒力基因阳性

如果没有 FAM 或 Cy5 的 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对照：

- 如果没有 FAM 或 Cy5 的 Cq 值，而且内部对照 Cq ≥ 26 ，则该样本视为 STEC 毒力基因阴性样本
- 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 < 26 ，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。

检测结果解释如下表所示：

<i>stx1/stx2</i> 检测 (FAM 通道)	<i>eae</i> 检测 (Cy5 通道)	内部对照检测 (HEX 通道)	结果解释
Cq ≥ 10	Cq ≥ 10	NA	阳性 – 使用 iQ-Check SerO II 试剂盒测试
Cq ≥ 10	Cq = N/A	NA	<i>stx1/stx2</i> 阳性， <i>eae</i> 阴性 ¹
Cq = N/A	Cq ≥ 10	NA	<i>eae</i> 阳性， <i>stx1/stx2</i> 阴性。 停止样本分析
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq > 26	阴性
Cq = N/A	Cq = N/A	Cq = N/A	抑制 ²

¹必要时进行确认，例如，在 MicroVal 验证范围内

²当所有 *stx1/stx2* 和 *eae* 毒力基因以及内部对照检测均给出 Cq 值 = N/A 时，必须再次测试样品，但要稀释 (1:10)。

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。根据当地法规的不同，测试结果的解释和确认过程可能会有所不同。

第 8 部分

阳性结果的确认

应使用 iQ-Check SerO II 试剂盒对 iQ-Check STEC VirX Kit 阳性结果进行测试，以确定七个主要的大肠杆菌血清群（O157、O26、O45、O103、O111、O121 和 O145）。

在 MicroVal 验证范围内，*stx* 阳性测试必须得到确认。

1. 将 10 μ l 增菌液用划线法涂在选择性琼脂平板（TBX 或 CHROMAgar STEC）上。将平板在 $37 \pm 1^\circ \text{C}$ 下培养 18 – 24 hr。
2. 将单个菌落重新悬浮在微离心管中的 100 μ l 胰蛋白盐或 BPW 中，并使用 iQ-Check STEC VirX Kit 进行毒力基因检测。可以将 10 个菌落汇集在一起以测试毒力基因。如果得到阳性结果，必须对菌落进行单独测试。
3. 取 5 μ l 悬浮液，加入 20 μ l PCR 混合物（请参见第 7 部分 D.“实时 PCR”），参照 iQ-Check STEC VirX 操作方案进行后续操作，获取数据并进行结果分析。不需要进行 DNA 提取。
4. 如果 iQ-Check STEC VirX Kit 与直接确认之间的结果不一致，建议采用额外的程序。
5. 在新鲜肉汤中以 1:100 稀释增菌液（例如，在 9 ml 新鲜 BPW+STEC 添加剂中加入 0.1 ml 增菌液）。将 10 μ l 稀释的增菌液用划线法涂在选择性琼脂平板上，在 $37 \pm 1^\circ \text{C}$ 下培养 18 – 24 hr。
6. 此外，将稀释的增菌液在 $41.5 \pm 1^\circ \text{C}$ 下培养 16 – 24 hr，然后用划线法涂在选择性琼脂平板上。
7. 按照 ISO/TS 13136 方法的建议，最多筛选 50 个菌落。

如果 iQ-Check STEC VirX 试剂盒方法结果与上面罗列的任何确认方法结果不一致，请遵循必要的步骤操作以确保结果有效。

第 9 部分

使用 iQ-Check 试剂盒确认单菌落

也可以使用 iQ-Check STEC VirX Kit 确认琼脂平板上单个分离的 STEC 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平板上挑取一个单菌落。
2. 用 100 μ l 胰蛋白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 μ l 悬浮液，加入 20 μ l PCR 混合物（请参见第 7 部分 D.“实时 PCR”），参照 iQ-Check STEC VirX 操作方案进行后续操作，获取数据并进行结果分析。不需要进行 DNA 提取。

第 10 部分

测试性能和验证



iQ-Check STEC VirX 试剂盒已通过 AOAC 研究所的性能测试方法的验证，可用于生碎牛肉、生牛肉边角料、新鲜菠菜、MicroTally 拭子、大麻、大麻巧克力、软糖、大麻浓缩物、大麻和通用面粉的 stx1/stx2 和 eae 的检测。iQ-Check 的阳性检测结果应视为推定结果，建议通过标准参考方法进行进一步确认。证书编号：121203.



iQ-Check STEC VirX 方法已通过 MICROVAL NEN 验证认证，可作为参考方法 ISO13136:2012 的替代方法，用于生奶制品 (25 克)、生肉制品 (375 克)、面粉、生面团产品 (375 克)、多成分食品、膳食成分、农产品和水果 (25 克) 中 STEC 的 stx 基因的检测。验证方案遵循 ISO16140-2: 2016 中的操作流程，并使用 CFX96 Touch 深孔板系统和 CFX Opus 深孔实时荧光 PCR 系统、CFX Manager 软件行业诊断版 IDE (v3.1 及更高版本)、“STEC VirX ISO Fast” APF 以及使用 iQ-Check 游离 DNA 去除试剂盒作为选项。证书编号：2021LR96.

第 11 部分

参考资料

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

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

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

ISO/TS 13136:2012 (E), Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups – Qualitative Method.

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

United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science (2019). Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. MLG 5C.02, Laboratory Guidebook Notice of Change, new chapter.

第 12 部分

修订记录

发布日期	文件编号	变更
2020 年 8 月	10000131516 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - 新的文档设计和参考资料和内容的更新 - 更新和扩展用于 MicroTally 拭子、大麻和大麻浸泡产品以及“VirX Fast”APF 的 AOAC 验证 - 更新菌落确认操作方案 - 整合 MLG FSIS 5C.00 参考资料 - 文件编号更改 – 先前版本 808474 REV C
2022 年 6 月	10000131516 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - 更新与 MicroVal 验证相关的增菌和确认操作方案 - 大麻和通用面粉的 AOAC 基质扩展 - 将样本增菌操作方案部分替换为汇总表 - 更新参考资料
2023 年 6 月	10000131516 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> - MicroVal 验证扩展适用于不同食品基质(广泛的食物范围)和 CFX Opus 深孔机器以及 CFX Manager 软件 IDE v3.1 - 大麻注入产品及大麻浓缩物的 AOAC 食品基质的扩展

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。

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

请访问 bio-rad.com/iqcheck 了解更多信息。

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

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

此处使用的所有商标均为其各自所有者的财产。



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

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