SNAPSHOOT
ENGINEERED FOR A SAFER TOMORROW

현장을 이해하고, 필요한 솔루션을 연결합니다.

산업안전 · 추락방지 시스템
산업용 소재 · 건축자재
제품 제안부터 공급·시공·설치·교육까지



COMPANY INFORMATION

스냅슛 (SNAPSHOOT)

ADDRESS (15431) 경기도 안산시 단원구 풍전로 37-9 트리플렉스 301동 118호
TEL 0507-1374-9229
FAX 0504-481-6749
E-MAIL bkkim@snapshoot.co.kr

TECHNICAL DOCUMENTS

인증서 · 데이터시트 · 기술자료

제품의 규격과 성능, 인증 및 적용 조건을 확인하기 위한 자료입니다.

ABOUT SNAPSHOOT

제품 공급을 넘어, 현장에 맞는 해결책으로

스냅슛은 산업현장의 작업 환경과 요구 조건을 바탕으로
적합한 제품과 시스템을 제안합니다. 현장 실사를 통해 설치 조건을 확인하고,
공급부터 시공·설치 및 사용 교육까지 필요한 과정을 함께합니다.

추락방지 시스템

안전대부착설비 · 수평·수직 라이프라인
레일 시스템 · 리지드 포스트

밀폐공간 진입·구조 솔루션

데빗암 · 삼각대 · 구조용 윈치
윈치 안전블록 · 구조장비

산업안전 보호구

전신형 안전대 · 랜야드 · 안전블록
작업 환경에 맞춘 개인보호구

산업용 소재·건축자재

산업용 테이프 · 접착제 · 기능성 소재
구조용 스크류 · 목조건축 자재

SNAPSHOOT
ENGINEERED FOR A SAFER TOMORROW

홈페이지 바로가기 →
문서 라이브러리 바로가기 →
시공사례 바로가기 →
문의하기 →

본 페이지는 스냅슛의 자료 제공 안내용 표지입니다. 첨부된 인증서 및 기술자료의 발행 주체, 인증 대상과 적용 범위는 해당 원문을 기준으로 확인해 주세요.

NEOGEN

Product Instructions
MDA2ECO96

- (EN) **Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7)**
- (FR) **Kit de détection moléculaire 2 – *E. coli* O157 (incluant H7)**
- (DE) **Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2**
- (IT) **Analisi molecolare Neogen di seconda generazione per il rilevamento di *E. coli* O157 (compreso H7)**
- (ES) **Análisis de Detección Molecular 2 para *E. coli* O157 (incluido H7)**
- (NL) **Moleculaire Detectieanalyse 2 *E. coli* O157 (inclusief H7)**
- (SV) **Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7)**
- (DA) **Molekylær Detektions Analyse 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7)**
- (NO) **Molekylær deteksjonstest 2 for *E. coli* O157 (inkludert H7)**
- (FI) **Molekyläärinen testisetti 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7)**
- (PT) **Ensaio para Detecção Molecular 2 de *E. coli* O157 (incluindo H7)**
- (EL) **Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7)**
- (PL) **Molekularny test do wykrywania 2 — *E. coli* O157 (w tym H7)**
- (RU) **Молекулярная диагностика 2 - *E. coli* O157 (Включая H7)**
- (TR) **Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 Dahil)**
- (JA) **分子検出アッセイ2　*大腸菌* O157（H7含む）**
- (ZH) ***大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2**
- (TH) **ชุดทดสอบเชื้อ*อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ระดับโมเลกุล2**
- (KO) ***병원성대장균용*(o157:h7 포함) 분자 검출 키트 2**
- (ID) **Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 *E. coli* O157 (Termasuk H7)**

2

E. coli O157 (including H7)

NEOGEN

Product Instructions

Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7)

Product Description and Intended Use

The Neogen® Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) is used with the Neogen® Molecular Detection System for the rapid and specific detection of *E. coli* O157 (including H7) in enriched food and feed samples.

The Neogen Molecular Detection Assays use loop-mediated isothermal amplification to rapidly amplify nucleic acid sequences with high specificity and sensitivity, combined with bioluminescence to detect the amplification. Presumptive positive results are reported in real-time while negative results are displayed after the assay is completed. Presumptive positive results should be confirmed using your preferred method or as specified by local regulations [1, 2, 3].

The Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) is intended for use in a laboratory environment by professionals trained in laboratory techniques. Neogen has not documented the use of this product in industries other than food or beverage. For example, Neogen has not documented this product for testing environmental, pharmaceutical, cosmetics, clinical or veterinary samples. The Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) has not been evaluated with all possible food products, food processes, testing protocols or with all possible strains of bacteria.

As with all test methods, the source, formulation and quality of enrichment medium can influence the results. Factors such as sampling methods, testing protocols, sample preparation, handling, and laboratory technique may also influence results. Neogen recommends evaluation of the method including enrichment medium, in the user's environment using a sufficient number of samples with particular foods and microbial challenges to ensure that the method meets the user's criteria.

Neogen has evaluated the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) with Buffered Peptone Water ISO.

The Neogen® Molecular Detection Instrument is intended for use with samples that have undergone heat treatment during the assay lysis step, which is designed to destroy organisms present in the sample. Samples that have not been properly heat treated during the assay lysis step may be considered a potential biohazard and should NOT be inserted into the Neogen Molecular Detection Instrument.

Neogen Food Safety is certified to ISO (International Organization for Standardization) 9001 for design and manufacturing.

The Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) test kit contains 96 tests, described in Table 1.

Table 1. Neogen Molecular Detection Assay Kit Components

Item	Identification	Quantity	Contents	Comments
Neogen® Lysis Solution (LS)	Pink solution in clear tubes	96 (12 strips of 8 tubes)	580 µL of Neogen Lysis Solution per tube	Racked and ready to use
Neogen® Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) Reagent Tubes	Pink tubes	96 (12 strips of 8 tubes)	Lyophilized specific amplification and detection mix	Ready to use
Extra caps	Pink caps	96 (12 strips of 8 caps)		Ready to use
Neogen® Reagent Control (RC)	Clear flip-top tubes	16 (2 pouches of 8 individual tubes)	Lyophilized control DNA, amplification and detection mix	Ready to use

The Negative Control, not provided in the kit, is a sterile enrichment medium, e.g., BPW ISO. Do not use water as a Negative Control.

Safety

The user should read, understand and follow all safety information in the instructions for the Neogen Molecular Detection System and the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7). Retain the safety instructions for future reference.

⚠ **WARNING:** Indicates a hazardous situation, which, if not avoided, could result in death or serious injury and/or property damage.

NOTICE: Indicates a potentially hazardous situation which, if not avoided, could result in property damage.

⚠ WARNING

Do not use the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) in the diagnosis of conditions in humans or animals.

The user must train its personnel in current proper testing techniques: for example, Good Laboratory Practices, ISO/IEC 17025[4], or ISO 7218[5].

To reduce the risks associated with a false-negative result leading to the release of contaminated product:

- Follow the protocol and perform the tests exactly as stated in the product instructions.
- Use medium pre-warmed to 41.5 ± 1°C. Do not allow the medium to drop below the incubation temperature range during sample preparation.
- Store the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) as indicated on the package and in the product instructions.
- Always use the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) by the expiration date.
- Use the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) with food, feed and food process environmental samples that have been validated internally or by a third party.
- Use the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) only with surfaces, sanitizers, protocols and bacterial strains that have been validated internally or by a third party.
- For an environmental sample containing Neutralizing Buffer (NB) with aryl sulfonate complex, perform a 1:2 dilution before testing (1 part sample into 1 part sterile enrichment broth). Another option is to transfer 10 µL of the neutralizing buffer enrichment into the Neogen Lysis Solution tubes. Neogen® Sample Handling products which include Neogen® Neutralizing Buffer with aryl sulfonate complex: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XSLSSL10NB, HS10NB and HS119510NB.

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. Incubated enrichment media and equipment or surfaces that have come into contact with incubated enrichment media may contain pathogens at levels sufficient to cause risk to human health.
- 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 and associated contaminated waste according to current local/regional/national/industry standards.
- Do not exceed the recommended temperature setting on heater.
- Do not exceed the recommended heating time.
- Use an appropriate, calibrated thermometer to verify the Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert temperature (e.g., a partial immersion thermometer or digital thermocouple thermometer, not a total immersion thermometer). The thermometer must be placed in the designated location in the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert.

To reduce the risks associated with cross-contamination while preparing the assay:

- Always wear gloves (to protect the user and prevent introduction of nucleases).

To reduce the risks associated with exposure to hot liquids:

- Do not exceed the recommended temperature setting on heater.
- Do not exceed the recommended heating time.
- Use an appropriate, calibrated thermometer to verify the Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert temperature (e.g., a partial immersion thermometer or digital thermocouple thermometer, not a total immersion thermometer). The thermometer must be placed in the designated location in the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert.

NOTICE

To reduce the risks associated with cross-contamination while preparing the assay:

- Use of sterile, aerosol barrier (filtered), molecular biology grade pipette tips is recommended.
- Use a new pipette tip for each sample transfer.
- Use Good Laboratory Practices to transfer the sample from the enrichment to the lysis tube. To avoid pipettor contamination, the user may choose to add an intermediate transfer step. For example, the user can transfer each enriched sample into a sterile tube.
- Use a molecular biology workstation containing germicidal lamp where available.

To reduce the risks associated with a false-positive result:

- Never open tubes post amplification.
- Always dispose of the contaminated tubes by soaking in a 1-5% (v:v in water) household bleach solution for 1 hour and away from the assay preparation area.

Consult the Safety Data Sheet for additional information and local regulations for disposal.

If you have questions about specific applications or procedures, please visit our website at www.neogen.com or contact your local Neogen representative or distributor.

User Responsibility

Users are responsible for familiarizing themselves with product instructions and information. Visit our website at **www.neogen.com,** or contact your local Neogen representative or distributor for more information.

When selecting a test method, it is important to recognize that external factors such as sampling methods, testing protocols, sample preparation, handling, and laboratory technique may influence results.

It is the user's responsibility in selecting any test method or product to evaluate a sufficient number of samples with the appropriate matrices and microbial challenges to satisfy the user that the chosen test method meets the user's criteria.

It is also the user's responsibility to determine that any test methods and results meet its customers' and suppliers' requirements.

As with any test method, results obtained from use of any Neogen Food Safety product do not constitute a guarantee of the quality of the matrices or processes tested.

To help customers evaluate the method for various food matrices, Neogen has developed the Neogen® Molecular Detection Matrix Control kit. When needed, use the Matrix Control (MC) to determine if the matrix has the ability to impact the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) results. Test several samples, representative of the matrix, i.e. samples obtained from different origin, during any validation period when adopting the Neogen method or when testing new or unknown matrices or matrices that have undergone raw material or process changes.

A matrix can be defined as a type of product with intrinsic properties such as composition and process. Differences between matrices may be as simple as the effects caused by differences in their processing or presentation for example, raw versus pasteurized; fresh versus dried, etc.

Limitation of Warranties / Limited Remedy

EXCEPT AS EXPRESSLY STATED IN A LIMITED WARRANTY SECTION OF INDIVIDUAL PRODUCT PACKAGING, NEOGEN DISCLAIMS ALL EXPRESS AND IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, ANY WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR USE. If any Neogen Food Safety Product is defective, Neogen or its authorized distributor will, at its option, replace or refund the purchase price of the product. These are your exclusive remedies. You must promptly notify Neogen within sixty days of discovery of any suspected defects in a product and return it to Neogen. Please contact your Neogen representative or authorized Neogen distributor for any further questions.

Limitation of Neogen Liability

NEOGEN WILL NOT BE LIABLE FOR ANY LOSS OR DAMAGES, WHETHER DIRECT, INDIRECT, SPECIAL, INCIDENTAL OR CONSEQUENTIAL DAMAGES, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO LOST PROFITS. In no event shall Neogen's liability under any legal theory exceed the purchase price of the product alleged to be defective.

Storage and Disposal

Store the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) at 2-8°C. Do not freeze. Keep kit away from light during storage. After opening the kit, check that the foil pouch is undamaged. If the pouch is damaged, do not use. After opening, unused reagent tubes should always be stored in the re-sealable pouch with the desiccant inside to maintain stability of the lyophilized reagents. Store resealed pouches at 2-8°C for no longer than 60 days.

Do not use Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) past the expiration date. Expiration date and lot number are noted on the outside label of the box. After use, the enrichment medium and the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) tubes can potentially contain pathogenic materials. When testing is complete, follow current industry standards for the disposal of contaminated waste. Consult the Safety Data Sheet for additional information and local regulations for disposal.

Instructions for Use

Follow all instructions carefully. Failure to do so may lead to inaccurate results.

The user should complete the Neogen Molecular Detection System operator qualification training, as described in the "Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System" document[7].

Periodically decontaminate laboratory benches and equipment (pipettes, cap/decap tools, etc.) with a 1- 5% (v:v in water) household bleach solution or DNA removal solution.

See Section "Specific Instructions for validated methods" for specific requirements:

Table 3 for enrichment protocols according to AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2017.01

Table 4 for enrichment protocols according to NF Validation certificate 3M 01/18-05/17

Sample Enrichment

Tables 2, 3 or 4 present guidance for enrichment protocols for food. It is the user's responsibility to validate alternate sampling protocols or dilution ratios to ensure this test method meets the user's criteria.

Foods

1. Pre-warm BPW ISO enrichment medium to 41.5 ± 1°C.
2. Aseptically combine the enrichment medium and sample according to Tables 2, 3 or 4. For all meat and highly particulate samples, the use of filter bags is recommended.
3. Homogenize all matrices except leafy produce and fruit, thoroughly by blending, stomaching, or hand mixing for 2 ±0.2 minutes. Incubate at 41.5 ± 1°C for the appropriate time according to Tables 2, 3 or 4.

Table 2. General enrichment protocols

Sample Matrix[a]	Sample Size	Enrichment Broth Volume (mL)	Enrichment Temperature (±1°C)	Enrichment Time (hours)
Raw beef including ground/mince and trim	325 g	975 BPW ISO (pre-warmed)	41.5	10-18
Raw meats including raw beef, pork, poultry, lamb, and bison	25 g	225 BPW ISO (pre-warmed)	41.5	8-18
Leafy produce[b]	200 g	450 BPW ISO (pre-warmed)	41.5	18-24
Other foods including fruit[b], vegetables, fruit/vegetable juices, fresh herbs, raw seafood, raw eggs, raw milk, cookie dough, and processed meats	25 g	225 BPW ISO (pre-warmed)	41.5	18-24
Walnuts or nut mixes containing walnuts (this protocol is appropriate for other nuts including pecans, almonds, pistachios, cashews, and chestnuts,	25 g	225 reconstituted non-fat dry milk	41.5	18-24

(a) Frozen samples should be equilibrated to 4-8°C before addition to enrichment broth.

(b) Leafy produce and fruit samples should be gently agitated by hand for 5 minutes. Do not blend or stomach.

Specific Instructions for Validated Methods

AOAC® *Official Methods of Analysis*℠ 2017.01

In AOAC *Official Method of Analysis*℠ program, the Neogen Molecular Detection Assay 2 – *E. coli* O157 (including H7) was found to be an effective method for the detection of *E. coli* O157:H7. The matrices tested in the study are shown in Table 3.

Table 3. Enrichment protocols using pre-warmed BPW ISO at 41.5 ± 1°C according to AOAC® *Official Methods*℠ 2017.01

Sample Matrix	Sample Size	Enrichment Broth Volume (mL)	Enrichment Time (hours)	Homogenized
Raw ground beef (73% lean)	325 g	975	10-18	Manually by hand or by Stomach
Raw bagged spinach[a]	200 g	450	18-24	Gently agitated by hand for 5 minutes, do not homogenize
Fresh sprouts	25 g	225	18-24	Gently agitated by hand for 5 minutes, do not homogenize
Frozen blueberries[a][b]	25 g	225	18-24	Gently agitated by hand for 5 minutes, do not homogenize

(a) Leafy produce and fruit samples should be gently agitated by hand for 5 minutes. Do not blend or stomach.

(b) Frozen samples should be equilibrated to 4-8°C before addition to enrichment broth.

NF Validation by AFNOR Certification

3M 01/18-05/17

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

For more information about end of validity, please refer to NF VALIDATION certificate available on the website mentioned above.

NF VALIDATION Certified method in compliance with ISO 16140-2[8] in comparison to ISO 16654[3]

Scope of the validation: Raw beef meat, raw dairy products, raw fruits and vegetables

Sample preparation: Samples should be prepared according to EN ISO 16654 and EN ISO 6887[6]

Software Version: See certificate

Table 4. Enrichment protocols using pre-warmed BPW ISO at 41.5 ± 1°C according to NF VALIDATION certified method 3M 01/18-05/17

Protocol	Sample Size	Enrichment Broth Volume (mL)	Enrichment Temperature (±1°C)	Enrichment Time (hours)
Raw dairy products, raw fruits and raw vegetables	25 g	225	41.5	18-24
Raw beef meat	25 g	225	41.5	8-24

NOTES:

- Samples larger than 25 g have not been tested in the NF VALIDATION study.
- The recommended protocol interruption points are after enrichment or after sample lysis. Enrichment broth or sample lysate can be stored at 2-8°C for up to 72 hours. After removing the enrichment broth from storage, resume testing from Step 1 in the **Lysis** section. After removing the sample lysate from storage, resume testing from Step 7 in the **Lysis** section. The lysate can also be stored at -20°C.
- Short enrichment protocols are sensitive to incubation conditions and the temperatures specified in the protocol must be followed. The temperature of the waterbath or the incubator where the broths are prewarmed should be verified to ensure the enrichment broth is reaching the required temperature. The total time for sample preparation, including the delay between the end of the medium pre-warming step and the beginning of incubation of the food sample, must not exceed 45 minutes. Using a ventilated incubator during incubation is recommended.

Preparation of the Neogen® Molecular Detection Speed Loader Tray

1. Wet a cloth or disposable towel with a 1-5% (v:v in water) household bleach solution and wipe the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray.
2. Rinse the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray with water.
3. Use a disposable towel to wipe the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray dry.
4. Ensure the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray is dry before use.

Preparation of the Neogen® Molecular Detection Chill Block Insert

Place the Neogen Molecular Detection Chill Block Insert directly on the laboratory bench: The Neogen Molecular Detection Chill Block Tray is not used. Use the block at ambient laboratory temperature (20-25°C).

Preparation of the Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert

Place the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert in a dry double block heater unit. Turn on the dry block heater unit and set the temperature to allow the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert to reach and maintain a temperature of 100 ± 1°C.

NOTE: Depending on the heater unit, allow approximately 30 minutes for the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert to reach temperature. Using an appropriate, calibrated thermometer (e.g., a partial immersion thermometer, digital thermocouple thermometer, not a total immersion thermometer) placed in the designated location, verify that the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert is at 100 ± 1°C.

Preparation of the Neogen® Molecular Detection Instrument

1. Launch the Neogen® Molecular Detection Software and log in. Contact your Neogen Food Safety representative to ensure you have the most updated version of the software.
2. Turn on the Neogen Molecular Detection Instrument.
3. Create or edit a run with data for each sample. Refer to the Neogen® Molecular Detection System User Manual for details.

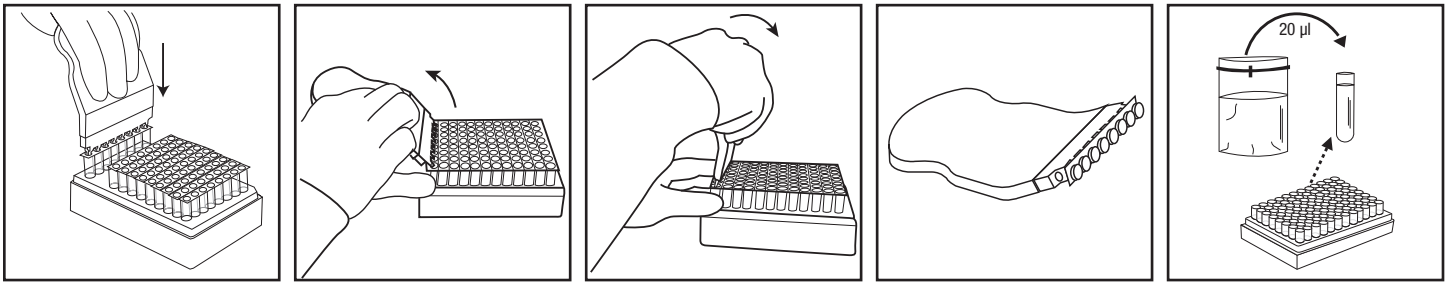
NOTE: The Neogen Molecular Detection Instrument must reach and maintain temperature of 60°C before inserting the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray with reaction tubes. This heating step takes approximately 20 minutes and is indicated by an ORANGE light on the instrument's status bar. When the instrument is ready to start a run, the status bar will turn GREEN.

Lysis

1. Allow the Neogen Lysis Solution tubes to warm up by setting the rack at room temperature (20-25°C) overnight (16-18 hours). Alternatives to equilibrate the Neogen Lysis Solution tubes to room temperature are to set the Neogen Lysis Solution tubes on the laboratory bench for at least 2 hours, incubate the Neogen Lysis Solution tubes in a 37 ± 1°C incubator for 1 hour or place them in a dry double block heater for 30 seconds at 100°C.
2. Invert the capped tubes to mix. Proceed to next step within 4 hours.
3. Remove the enrichment broth from the incubator.
4. One Neogen Lysis Solution tube is required for each sample and the Negative Control (NC) sample (sterile enrichment medium).
   - 4.1 Neogen Lysis Solution tube strips can be cut to desired Neogen Lysis Solution tube number. Select the number of individual Neogen Lysis Solution tubes or 8-tube strips needed. Place the Neogen Lysis Solution tubes in an empty rack.
   - 4.2 To avoid cross-contamination, decap one Neogen Lysis Solution tubes strip at a time and use a new pipette tip for each transfer step.
   - 4.3 Transfer enriched sample to Neogen Lysis Solution tubes as described below:

     Transfer each enriched sample into an individual Neogen Lysis Solution tube **first.** Transfer the NC **last.**

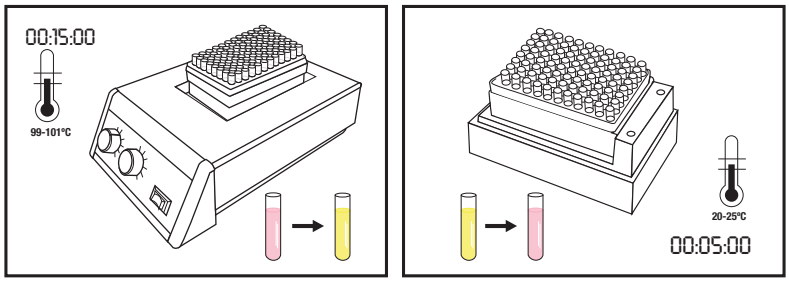
   - 4.4 Use the Neogen® Molecular Detection Cap/Decap Tool-Lysis to decap one Neogen Lysis Solution tube strip - one strip at a time.
   - 4.5 Discard the Neogen Lysis Solution tube cap – If lysate will be retained for retest, place the caps into a clean container for re-application after lysis.
     - 4.5.1 For processing of retained lysate, see Appendix A.
   - 4.6 Transfer 20 µL of sample into a Neogen Lysis Solution tube unless otherwise indicated in the Protocol Tables 2, 3, and 4.



5. Repeat step 4.3 until each individual sample has been added to a corresponding Neogen Lysis Solution tube in the strip.
6. Repeat steps 4.1 to 4.6 as needed, for the number of samples to be tested.
7. When all samples have been transferred, transfer 20 µL of NC (sterile enrichment medium e.g. BPW ISO) into a Neogen Lysis Solution tube. Do not use water as a NC.
8. Verify that the temperature of the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert is at 100 ± 1°C.
9. Place the uncovered rack of Neogen Lysis Solution tubes in the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert and heat for 15 ± 1 minutes. During heating, the Neogen Lysis solution will change from pink (cool) to yellow (hot).

   Samples that have not been properly heat treated during the assay lysis step may be considered a potential biohazard and should NOT be inserted into the Neogen Molecular Detection Instrument.

10. Remove the uncovered rack of Neogen Lysis Solution tubes from the heating block and allow to cool in the Neogen Molecular Detection Chill Block Insert at least 5 minutes and a maximum of 10 minutes. The Neogen Molecular Chill Block Insert, used at ambient temperature without the Neogen Molecular Detection Chill Block Tray, should sit directly on the laboratory bench. When cool, the lysis solution will revert to a pink color.
11. Remove the rack of Neogen Lysis Solution tubes from the Neogen Molecular Detection Chill Block Insert.

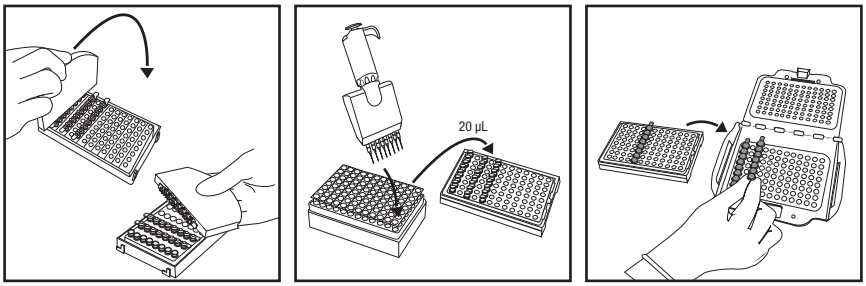


Amplification

1. One Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) Reagent Tube is required for each sample and the NC.
   - 1.1 Tube strips can be cut to desired tube number. Select the number of individual Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) Reagent Tubes or 8-tube strips needed.
   - 1.2 Place Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) Reagent Tubes in an empty rack.
   - 1.3 Avoid disturbing the reagent pellets from the bottom of the tubes.
2. Select one Neogen Reagent Control tube and place in rack.
3. To avoid cross-contamination, decap one Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) Reagent Tube strip at a time and use a new pipette tip for each transfer step.
4. Transfer lysate to a Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) Reagent Tube and Neogen Reagent Control tube as described below:

Transfer each sample lysate into individual Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) Reagent Tubes **first** followed by the NC. Hydrate the Neogen Reagent Control tube **last.**

5. Use the Neogen® Molecular Detection Cap/Decap Tool-Reagent to decap the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) Reagent Tube – one tube strip at a time. Discard cap.
   - **5.1 Transfer 20 µL of Sample lysate from the upper ½ of the liquid (avoid precipitate) in the Neogen Lysis Solution tube into corresponding** Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) **Reagent Tube. Dispense at an angle to avoid disturbing the pellets. Mix by gently pipetting up and down 5 times.**
   - 5.2 Repeat step 5.1 until individual sample lysate has been added to a corresponding Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) Reagent Tube in the strip.
   - 5.3 Cover the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) Reagent Tubes with the provided extra caps and use the rounded side of the Neogen Molecular Detection Cap/Decap Tool-Reagent to apply pressure in a back and forth motion ensuring that the cap is tightly applied.
   - 5.4 Repeat steps 5.1 to 5.3 as needed, for the number of samples to be tested.
   - 5.5 When all sample lysates have been transferred, repeat 5.1 to 5.3 to transfer 20 µL of NC lysate into a Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) Reagent Tube.
   - 5.6 Transfer **20 µL of NC lysate into a Neogen Reagent Control tube.** Dispense at an angle to avoid disturbing the pellets. Mix by gently pipetting up and down 5 times.
6. Load capped tubes into a clean and decontaminated Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray. Then close and latch the lid.



7. Review and confirm the configured run in the Neogen Molecular Detection Software.
8. Click the Start button in the software and select instrument for use. The selected instrument's lid automatically opens.
9. Place the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray into the Neogen Molecular Detection Instrument and close the lid to start the assay. Results are provided within 60 minutes, although positives may be detected sooner.
10. After the assay is complete, remove the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray from the Neogen Molecular Detection Instrument and dispose of the tubes by soaking in a 1-5% (v:v in water) household bleach solution for 1 hour and away from the assay preparation area.

NOTICE: To minimize the risk of false positives due to cross-contamination, never open reagent tubes containing amplified DNA. This includes Neogen Reagent Control, Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) Reagent Tube, and Neogen Matrix Control Tubes. Always dispose of sealed reagent tubes by soaking in a 1-5% (v:v in water) household bleach solution for 1 hour and away from the assay preparation area.

Results and Interpretation

An algorithm interprets the light output curve resulting from the detection of the nucleic acid amplification. Results are analysed automatically by the software and are color-coded based on the result. A Positive or Negative result is determined by analysis of a number of unique curve parameters. Presumptive positive results are reported in real-time while Negative and Inspect results will be displayed after the run is completed.

Presumptive positive samples should be confirmed as per the laboratory standard operating procedures or by following the appropriate reference method confirmation[1,2,3], beginning with transfer from the primary BPW ISO enrichment to secondary enrichment broth(s), followed by subsequent plating and confirmation of isolates using appropriate biochemical and serological methods.

NOTE: Even a negative sample will not give a zero reading as the system and Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) amplification reagents have a "background" relative light unit (RLU) reading.

In the rare event of any unusual light output, the algorithm labels this as "Inspect." Neogen recommends the user to repeat the assay for any Inspect samples. If the result continues to be Inspect, proceed to confirmation test using your preferred method or as specified by local regulations.

In the event of discordant results (presumptive positive with the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7), non-confirmed by one of the means described above, and in particular for the latex agglutination test), the laboratory must follow the necessary steps to ensure the validity of the results obtained.

Confirmation of Results According to the NF VALIDATION Certified Method

In the context of the NF VALIDATION, all samples identified as positive by the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) must be confirmed by one of the following tests:

Option 1: Using the ISO 16654[3] standard starting from the buffered peptone water[3] enrichment.

Option 2: Implementing a confirmation method consisting of the following: Streak 50 µL of the buffered peptone water[3] enrichment onto a Cefixime Potassium Tellurite Sorbitol MacConkey (CT-SMAC)[3] agar plate. Incubate for 24 ±3 hours at 37°C. Streak characteristic colonies onto nutrient agar and perform latex agglutination test directly onto isolated colonies. If the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7) results are not confirmed, perform an immunomagnetic separation step and then streak 50 µL onto CT-SMAC.

Option 3: Using nucleic acid probes as described in the EN ISO 7218[5] standard, performed on isolated colonies (purified or not) from CT-SMAC (see Options 1 or 2). The nucleic acid probes must be different from those used in the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (including H7).

Option 4: Using any other method certified NF VALIDATION, the principle of which must be different from Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157(including H7). The complete protocol described for this second validated method must be used. All steps prior to the start of confirmation must be common to both methods.

In the event of discordant results (presumptive positive with the alternative method, non-confirmed by one of the means described above) the laboratory must follow the necessary steps to ensure the validity of the result obtained.

If you have questions about specific applications or procedures, please visit our website at www.neogen.com or contact your local Neogen representative or distributor.

Appendix A. Protocol Interruption: Storage and re-testing of samples

1. To store a heat-treated lysate, re-cap the lysis tube with a clean cap (see **Lysis** section, 4.5)
2. To store an enriched sample, incubate for a minimum of 18 hours prior to storage.
3. Store at 4 to 8°C for up to 72 hours.
4. Prepare a stored sample for amplification by inverting 2-3 times to mix.
5. Decap the tubes.

6. Place the mixed lysate tubes on Neogen Molecular Detection Heat Block Insert and heat at 100 ± 1°C for 5 ± 1 minutes.
7. Remove the rack of Neogen Lysis Solution tubes from the heating block and allow to cool in the Neogen Molecular Detection Chill Block Insert at least 5 minutes and a maximum of 10 minutes.
8. Continue the protocol at the **Amplification** section detailed above.

References:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli.* November 2015.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 5.09. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. Effective Date: 15 January 2015.
3. ISO 16654:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.
7. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Neogen Food Safety.

Explanation of Symbols

info.neogen.com/symbols

AOAC is a registered trademark of AOAC INTERNATIONAL

Official Methods is a registered service mark of AOAC INTERNATIONAL

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

NEOGEN®

Instructions sur les produits

Kit de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7)

Description du produit et utilisation prévue

Le kit Neogen® de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) est utilisé avec le système de détection Neogen® pour la détection rapide et spécifique d'*E. coli* O157 (incluant H7) dans des échantillons de nourriture et d'aliments pour animaux enrichis.

Les kits Neogen de détection moléculaire utilisent l'amplification isotherme médiée par les boucles pour amplifier rapidement des séquences d'acides nucléiques avec une spécificité et une sensibilité élevées, en association avec la bioluminescence pour détecter l'amplification. Les résultats présumés positifs sont signalés en temps réel, tandis que les résultats négatifs sont affichés une fois l'analyse terminée. Les résultats présumés positifs doivent être confirmés à l'aide de votre méthode préférée ou selon les réglementations locales [1, 2, 3].

Le kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) est destiné à une utilisation en laboratoire par des professionnels formés aux techniques de laboratoire. Neogen n'a pas documenté l'utilisation de ce produit dans des secteurs autres que l'alimentation ou les boissons. Par exemple, Neogen n'a pas documenté ce produit pour des tests d'échantillons environnementaux, pharmaceutiques, cosmétiques, cliniques ou vétérinaires. Le kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) n'a pas été évalué avec tous les produits et processus alimentaires, protocoles de test ou souches de bactéries possibles.

Comme pour toutes les méthodes de test, la source, la formulation et la qualité du milieu d'enrichissement peuvent influencer les résultats. Des facteurs tels que les méthodes d'échantillonnage, les protocoles de test, la préparation des échantillons, la manipulation et la technique de laboratoire, peuvent également influencer les résultats. Neogen recommande d'évaluer la méthode, y compris le milieu d'enrichissement, dans l'environnement de l'utilisateur en employant un nombre suffisant d'échantillons avec des aliments particuliers et des défis microbiens pour s'assurer que la méthode répond aux critères de l'utilisateur.

Neogen a évalué le kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) avec de l'eau peptonée tamponnée (BPW) ISO.

L'instrument de détection moléculaire Neogen® est destiné à une utilisation avec des échantillons ayant été soumis à un traitement thermique lors de la phase de lyse de l'analyse, qui vise à détruire les organismes présents dans l'échantillon. Les échantillons qui n'ont pas été traités thermiquement lors de la phase de lyse de l'analyse peuvent être considérés comme présentant un risque biologique potentiel et ne doivent PAS être insérés dans l'instrument de détection moléculaire Neogen.

Neogen Food Safety est certifiée ISO (International Organization for Standardization) 9001 en termes de conception et de fabrication.

Le kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) contient 96 tests, décrits dans le tableau 1.

Tableau 1. Composants du kit Neogen de détection moléculaire

Élément	Identification	Quantité	Contenu	Commentaires
Solution de lyse (LS) Neogen®	Solution rose dans des tubes transparents	96 (12 barrettes de 8 tubes)	580 µL de solution de lyse Neogen par tube	Sur portoir et prêts à l'emploi
Tubes de réactif du kit Neogen® de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7)	Tubes roses	96 (12 barrettes de 8 tubes)	Mélange d'amplification et de détection spécifiques lyophilisé	Prêt à l'emploi
Bouchons supplémentaires	Bouchons roses	96 (12 barrettes de 8 bouchons)		Prêt à l'emploi
Contrôle de réactif (RC) Neogen®	Tubes transparents à rabat	16 (2 sachets de 8 tubes individuels)	ADN témoin lyophilisé, mélange d'amplification et de détection	Prêt à l'emploi

Le témoin négatif, non fourni dans le kit, est un milieu d'enrichissement stérile, p. ex. de l'eau peptonée tamponnée ISO. Ne pas utiliser de l'eau comme témoin négatif.

Sécurité

L'utilisateur doit lire, comprendre et respecter toutes les consignes de sécurité figurant dans les instructions relatives au système de détection moléculaire Neogen et au kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7). Conservez les consignes de sécurité pour référence ultérieure.

⚠ **AVERTISSEMENT :** Indique une situation dangereuse qui, si elle n'est pas évitée, pourrait entraîner la mort ou des blessures graves et/ou des dommages matériels.

MISE EN GARDE : Indique une situation potentiellement dangereuse qui, si elle n'est pas évitée, pourrait entraîner des dommages matériels.

⚠ AVERTISSEMENT

Ne pas utiliser le kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) pour le diagnostic de maladies chez des êtres humains ou des animaux.

L'utilisateur doit former son personnel aux techniques de test actuelles appropriées : par exemple, les bonnes pratiques de laboratoire (BPL), ISO/IEC 17025[4] ou ISO 7218[5].

Pour réduire les risques associés à un résultat faussement négatif entraînant la commercialisation d'un produit contaminé :

- Suivre le protocole et effectuer les tests exactement comme indiqué dans les instructions du produit.
- Utiliser un milieu préchauffé à 41,5 ± 1 °C. Ne pas laisser le milieu descendre à une température inférieure à la plage d'incubation pendant la préparation de l'échantillon.
- Conserver le kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) conformément aux indications figurant sur l'emballage et dans les instructions du produit.
- Toujours utiliser le kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) avant la date d'expiration.
- Utiliser le kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) avec des échantillons environnementaux de denrées alimentaires, d'aliments pour animaux et de procédés alimentaires qui ont été validés en interne ou par une tierce partie.
- Utiliser le kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) uniquement avec des surfaces, des désinfectants, des protocoles et des souches bactériennes qui ont été validés en interne ou par une tierce partie.
- Dans le cas d'un échantillon environnemental contenant un tampon neutralisant (NB) avec un complexe de sulfonate d'aryle, effectuer une dilution 1:2 avant le test (1 portion d'échantillon dans 1 portion de bouillon d'enrichissement stérile). Une autre option consiste à transférer 10 µL de l'enrichissement du tampon neutralisant dans les tubes de solution de lyse Neogen. Produits de manipulation d'échantillons Neogen® contenant du tampon neutralisant Neogen® avec un complexe de sulfonate d'aryle : RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XSLSSL10NB, HS10NB et HS119510NB.

Pour réduire les risques liés à l'exposition aux produits chimiques et aux risques biologiques :

- Effectuer les tests d'agents pathogènes dans un laboratoire correctement équipé sous le contrôle d'un personnel qualifié. Les milieux d'enrichissement incubés et l'équipement ou les surfaces qui ont été en contact avec des milieux d'enrichissement incubés peuvent contenir des agents pathogènes à des niveaux suffisants pour présenter un risque pour la santé humaine.
- Toujours suivre les pratiques de sécurité standard en laboratoire, y compris le port de vêtements de protection appropriés et d'une protection oculaire lors de la manipulation d'échantillons contaminés et de réactifs.
- Éviter tout contact avec le contenu des milieux d'enrichissement et des tubes de réactifs après l'amplification.
- Éliminer les échantillons enrichis et les déchets contaminés associés conformément aux normes locales/régionales/nationales/industrielles en vigueur.
- Ne pas dépasser la température recommandée sur l'appareil de chauffage.
- Ne pas dépasser le temps de chauffe recommandé.
- Utiliser un thermomètre étalonné approprié pour vérifier la température du support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen® (p. ex., un thermomètre à immersion partielle ou un thermomètre à thermocouple numérique, pas un thermomètre à immersion totale). Le thermomètre doit être placé à l'endroit prévu dans le support du bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen.

Pour réduire les risques associés à une contamination croisée lors de la préparation de l'analyse :

- Toujours porter des gants (pour protéger l'utilisateur et empêcher l'introduction de nucléases).

Pour réduire les risques liés à l'exposition à des liquides chauds :

- Ne pas dépasser la température recommandée sur l'appareil de chauffage.
- Ne pas dépasser le temps de chauffe recommandé.
- Utiliser un thermomètre étalonné approprié pour vérifier la température du support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen® (p. ex., un thermomètre à immersion partielle ou un thermomètre à thermocouple numérique, pas un thermomètre à immersion totale). Le thermomètre doit être placé à l'endroit prévu dans le support du bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen.

MISE EN GARDE

Pour réduire les risques associés à une contamination croisée lors de la préparation de l'analyse :

- Il est recommandé d'utiliser des embouts de pipette stériles, avec barrière contre les aérosols (à filtre), de qualité biologie moléculaire.
- Utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque transfert d'échantillon.
- Utiliser les bonnes pratiques de laboratoire pour transférer l'échantillon de l'enrichissement au tube de lyse. Pour éviter la contamination par la pipette, l'utilisateur peut choisir d'ajouter une étape de transfert intermédiaire. Par exemple, l'utilisateur peut transférer chaque échantillon enrichi dans un tube stérile.
- Utiliser un poste de travail de biologie moléculaire équipé d'une lampe germicide, le cas échéant.

Pour réduire les risques liés à un résultat faussement positif :

- Ne jamais ouvrir les tubes après l'amplification.
- Toujours éliminer les tubes contaminés en les faisant tremper dans une solution d'eau de Javel ménagère à 1-5 % (v:v dans l'eau) pendant une heure et à un emplacement éloigné de la zone de préparation de l'analyse.

Consulter la fiche de données de sécurité pour plus d'informations et les réglementations locales en matière de mise au rebut.

Si vous avez des questions au sujet d'applications ou de procédures spécifiques, veuillez visiter notre site Web à l'adresse www.neogen.com ou contacter votre représentant ou votre distributeur Neogen local.

Responsabilité de l'utilisateur

Les utilisateurs sont tenus de se familiariser avec les instructions et les informations sur les produits. Visitez notre site Web à l'adresse **www.neogen.com** ou contactez votre représentant ou votre distributeur Neogen local pour plus d'informations.

Lors du choix d'une méthode de test, il est important de comprendre que des facteurs externes tels que les méthodes d'échantillonnage, les protocoles de test, la préparation des échantillons, la manipulation et la technique de laboratoire peuvent influencer les résultats.

Lors du choix de tout produit ou méthode de test, il est de la responsabilité de l'utilisateur d'évaluer un nombre suffisant d'échantillons avec les matrices et les défis microbiens appropriés pour vérifier que la méthode de test choisie répond à ses critères.

Il est également de la responsabilité de l'utilisateur de déterminer si les méthodes de test et les résultats répondent aux exigences de ses clients et fournisseurs.

Comme pour toute méthode de test, les résultats obtenus par l'utilisation d'un produit Neogen Food Safety ne constituent pas une garantie de la qualité des matrices ou procédés testés.

Afin d'aider les clients à évaluer la méthode pour diverses matrices alimentaires, Neogen a mis au point le kit de contrôle de matrice pour système de détection moléculaire Neogen®. Si nécessaire, utilisez le contrôle de matrice (MC) pour déterminer si la matrice peut avoir un impact sur les résultats du kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7). Testez plusieurs échantillons représentatifs de la matrice, c'est-à-dire des échantillons d'origine différente, pendant toute période de validation lors de l'adoption de la méthode Neogen ou lors du test de matrices nouvelles ou inconnues ou de matrices ayant subi des changements en termes de matières premières ou de procédé.

Une matrice peut être définie comme un type de produit présentant des propriétés intrinsèques telles que la composition et le procédé. Les différences entre les matrices peuvent être aussi simples que les effets causés par les différences de traitement ou de présentation, par exemple, cru ou pasteurisé, frais ou séché, etc.

Limitation des garanties / Recours limité

SAUF MENTION EXPRESSE DANS UNE SECTION DE GARANTIE LIMITÉE DE L'EMBALLAGE D'UN PRODUIT INDIVIDUEL, NEOGEN DÉCLINE TOUTE GARANTIE EXPRESSE OU IMPLICITE, Y COMPRIS, MAIS SANS S'Y LIMITER, TOUTE GARANTIE DE QUALITÉ MARCHANDE OU D'ADÉQUATION À UN USAGE PARTICULIER. Si un produit Neogen Food Safety est défectueux, Neogen ou son distributeur agréé remplacera ou remboursera le prix d'achat du produit, à sa discrétion. Ce sont vos recours exclusifs. Vous devez informer rapidement Neogen dans les soixante jours suivant la découverte de tout défaut suspecté dans un produit et retourner ce dernier à Neogen. Merci de contacter votre représentant ou distributeur Neogen agréé pour toute autre question.

Limitation de la responsabilité de Neogen

NEOGEN NE SERA PAS RESPONSABLE DES PERTES OU DOMMAGES ÉVENTUELS, QU'ILS SOIENT DIRECTS, INDIRECTS, SPÉCIAUX, ACCESSOIRES OU CONSÉCUTIFS, Y COMPRIS, MAIS SANS S'Y LIMITER, LES PERTES DE BÉNÉFICES. En aucun cas, la responsabilité de Neogen en vertu d'une théorie juridique ne pourra excéder le prix d'achat du produit prétendument défectueux.

Stockage et mise au rebut

Conservez le kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) entre 2 et 8 °C. Ne le congelez pas. Conservez le kit à l'abri de la lumière. Après avoir ouvert le kit, vérifiez que le sachet en aluminium n'est pas endommagé. Si le sachet est endommagé, ne l'utilisez pas. Après ouverture, les tubes de réactifs non utilisés doivent toujours être conservés dans le sachet refermable avec le déshydratant à l'intérieur pour maintenir la stabilité des réactifs lyophilisés. Conservez les sachets refermés entre 2 et 8 °C pendant un maximum de 60 jours.

N'utilisez pas le kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) après la date d'expiration. La date d'expiration et le numéro de lot sont indiqués sur l'étiquette extérieure de la boîte. Après utilisation, le milieu d'enrichissement et les tubes du kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) peuvent potentiellement contenir des substances pathogènes. Une fois le test terminé, respectez les normes actuelles du secteur pour l'élimination des déchets contaminés. Consultez la fiche de données de sécurité pour plus d'informations et les réglementations locales en matière de mise au rebut.

Mode d'emploi

Suivez attentivement toutes les instructions. Leur non-respect peut fausser les résultats.

L'utilisateur doit suivre la formation de qualification destinée à l'opérateur du système de détection moléculaire Neogen, comme décrit dans le document « Protocoles et instructions de qualification de l'installation (IQ)/qualification opérationnelle (OQ) du système de détection moléculaire Neogen »[7].

Décontaminez régulièrement les paillasses et le matériel de laboratoire (pipettes, outils de pose/retrait de bouchons, etc.) avec une solution d'eau de Javel ménagère à 1-5 % (v:v dans de l'eau) ou une solution d'élimination de l'ADN.

Voir la section « Instructions spécifiques pour les méthodes validées » pour connaître les exigences spécifiques :

Tableau 3 pour les protocoles d'enrichissement conformément à la méthode d'analyse officielle de l'AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2017.01

Tableau 4 pour les protocoles d'enrichissement conformément au certificat NF Validation 3M 01/18-05/17

Enrichissement d'échantillon

Les tableaux 2, 3 et 4 fournissent des indications pour les protocoles d'enrichissement concernant les aliments. Il incombe à l'utilisateur de valider d'autres protocoles d'échantillonnage ou taux de dilution afin de s'assurer que cette méthode de test répond à ses critères.

Aliments

1. Préchauffez le milieu d'enrichissement BPW ISO à 41,5 ± 1 °C.
2. Combinez de manière aseptique le milieu d'enrichissement et l'échantillon conformément au tableau 2, 3 ou 4. Pour tous les échantillons de viande et contenant une quantité élevée de particules, l'utilisation de sacs filtrants est recommandée.
3. Homogénéisez parfaitement toutes les matrices, à l'exception des produits à feuilles et des fruits, en les mélangeant à la main, les mixant ou les passant à l'homogénéiseur pendant 2 ± 0,2 minutes. Faites-les incuber à 41,5 ± 1 °C pendant la durée appropriée conformément au tableau 2, 3 ou 4.

Tableau 2. Protocoles d'enrichissement généraux

Matrice d'échantillon[a]	Taille d'échantillon	Volume du bouillon d'enrichissement (mL)	Température d'enrichissement (± 1 °C)	Durée d'enrichissement (heures)
Viande bovine crue, y compris hachée et chutes de découpes	325 g	975 BPW ISO (préchauffée)	41,5	10-18
Viandes crues, y compris le bœuf, le porc, la volaille, l'agneau et le bison crus	25 g	225 BPW ISO (préchauffée)	41,5	8-18
Produits à feuilles[b]	200 g	450 BPW ISO (préchauffée)	41,5	18-24
Autres aliments tels que fruits[b], légumes, jus de fruits et de légumes, herbes fraîches, fruits de mer crus, œufs crus, lait cru, pâte à biscuits et viandes transformées	25 g	225 BPW ISO (préchauffée)	41,5	18-24
Noix ou mélanges de noix contenant des noix (ce protocole est approprié pour d'autres noix, telles que les noix de pécan, les amandes, les pistaches, les noix de cajou et les châtaignes)	25 g	225 lait écrémé en poudre reconstitué	41,5	18-24

(a) Les échantillons congelés doivent être équilibrés à 4-8 °C avant d'être ajoutés au bouillon d'enrichissement.

(b) Les échantillons de produits à feuilles et de fruits doivent être mélangés délicatement à la main pendant 5 minutes. Ne pas mixer ni passer à l'homogénéiseur.

Instructions spécifiques pour les méthodes validées

AOAC® *Official Methods of Analysis℠* 2017.01

Dans le programme AOAC *Official Method of Analysis℠*, le kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) s'est révélé être une méthode efficace pour la détection d'*E. coli* O157:H7. Les matrices testées dans le cadre de l'étude sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3. Protocoles d'enrichissement utilisant de l'eau peptonée tamponnée (BPW) ISO préchauffée à 41,5 ± 1 °C conformément à la méthode d'analyse officielle de l'AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2017.01

Matrice d'échantillon	Taille d'échantillon	Volume du bouillon d'enrichissement (mL)	Durée d'enrichissement (heures)	Homogénéisation
Bœuf haché cru (73 % de maigre)	325 g	975	10-18	Manuellement ou avec un homogénéiseur
Épinards crus en sachets[a]	200 g	450	18-24	Mélanger délicatement à la main pendant 5 minutes, ne pas homogénéiser
Choux de Bruxelles frais	25 g	225	18-24	Mélanger délicatement à la main pendant 5 minutes, ne pas homogénéiser
Myrtilles surgelées[a][b]	25 g	225	18-24	Mélanger délicatement à la main pendant 5 minutes, ne pas homogénéiser

(a) Les échantillons de produits à feuilles et de fruits doivent être mélangés délicatement à la main pendant 5 minutes. Ne pas mixer ni passer à l'homogénéiseur.

(b) Les échantillons congelés doivent être équilibrés à 4-8 °C avant d'être ajoutés au bouillon d'enrichissement.

NF Validation par la certification AFNOR

3M 01/18-05/17

MÉTHODES ANALYTIQUES ALTERNATIVES POUR L'AGRO-INDUSTRIE

http://nf-validation.afnor.org

Pour plus d'informations sur la fin de validité, veuillez vous référer au certificat NF VALIDATION disponible sur le site mentionné ci-dessus.

Méthode certifiée NF VALIDATION conformément à la norme ISO 16140-2[8] par rapport à la norme ISO 16654[3]

Champ d'application de la validation : Viande bovine crue, produits laitiers crus, fruits et légumes crus

Préparation des échantillons : Les échantillons doivent être préparés conformément aux normes EN ISO 16654 et EN ISO 6887[6]

Version du logiciel : Voir le certificat

Tableau 4. Protocoles d'enrichissement utilisant de l'eau peptonée tamponnée (BPW) ISO préchauffée à 41,5 ± 1 °C conformément à la méthode certifiée NF VALIDATION 3M 01/18-05/17

Protocole	Taille d'échantillon	Volume du bouillon d'enrichissement (mL)	Température d'enrichissement (± 1 °C)	Durée d'enrichissement (heures)
Produits laitiers crus, fruits et légumes crus	25 g	225	41,5	18-24
Viande bovine crue	25 g	225	41,5	8-24

REMARQUES :

- Les échantillons supérieurs à 25 g n'ont pas été testés dans le cadre de l'étude NF VALIDATION.
- Les points d'interruption de protocole recommandés sont après l'enrichissement ou après la lyse de l'échantillon. Le bouillon d'enrichissement ou le lysat d'échantillon peut être conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 72 heures. Après avoir retiré le bouillon d'enrichissement du stockage, reprenez le test à partir de l'étape 1 de la section **Lyse**. Après avoir retiré le lysat d'échantillon du stockage, reprenez le test à partir de l'étape 7 de la section **Lyse**. Le lysat peut également être conservé à -20 °C.
- Les protocoles d'enrichissement courts sont sensibles aux conditions d'incubation et les températures spécifiées dans le protocole doivent être respectées. La température du bain-marie ou de l'incubateur dans lequel les bouillons sont préchauffés doit être vérifiée pour s'assurer que le bouillon d'enrichissement atteint la température requise. Le temps total de préparation de l'échantillon, y compris le délai entre la fin de l'étape de préchauffage du milieu et le début de l'incubation de l'échantillon alimentaire, ne doit pas dépasser 45 minutes. Il est recommandé d'utiliser un incubateur ventilé pendant l'incubation.

Préparation du plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen®

1. Mouillez un chiffon ou une serviette jetable avec une solution d'eau de Javel ménagère à 1-5 % (v:v dans de l'eau) et frottez le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen.
2. Rincez le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen avec de l'eau.
3. Essuyez le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen à l'aide d'une serviette jetable.
4. Veillez à ce que le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen soit sec avant de l'utiliser.

Préparation du support du bloc réfrigérant pour système de détection moléculaire Neogen®

Placez le support du bloc réfrigérant pour système de détection moléculaire Neogen directement sur la paillasse du laboratoire : le plateau du bloc réfrigérant pour système de détection moléculaire Neogen n'est pas utilisé. Utilisez le bloc à température ambiante de laboratoire (20-25 °C).

Préparation du support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen®

Placez le support du bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen dans une unité de traitement thermique à sec à double bloc. Allumez l'unité de traitement thermique à sec à double bloc et réglez la température de sorte que le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen atteigne une température de 100 ± 1 °C et la maintienne.

REMARQUE : Selon l'unité de traitement thermique, attendez environ 30 minutes pour que le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen atteigne la température. Utilisez un thermomètre étalonné approprié (p. ex., un thermomètre à immersion partielle ou un thermomètre à thermocouple numérique, pas un thermomètre à immersion totale) placé à l'emplacement désigné pour vérifier que le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen est à une température de 100 ± 1 °C.

Préparation de l'instrument de détection moléculaire Neogen®

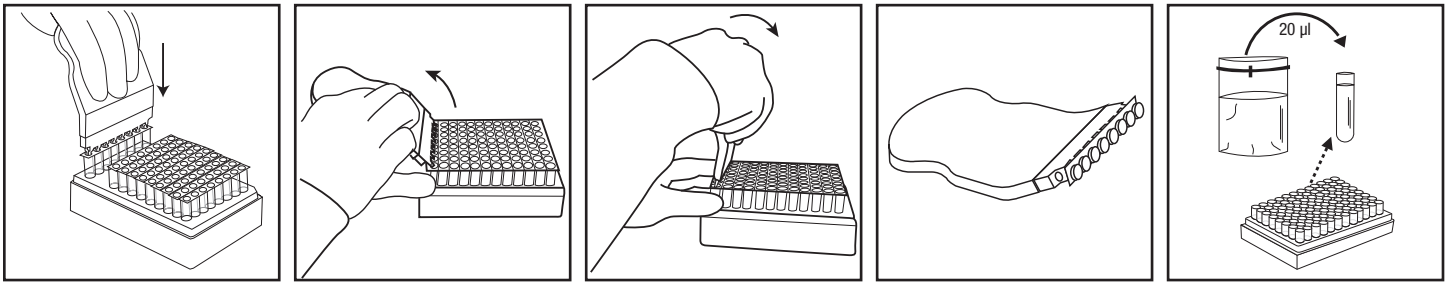
1. Lancez le logiciel de détection moléculaire Neogen® et connectez-vous. Contactez votre représentant Neogen Food Safety pour vérifier que vous disposez de la version la plus récente du logiciel.
2. Allumez l'instrument de détection moléculaire Neogen.
3. Créez ou modifiez une analyse avec des données pour chaque échantillon. Pour plus de détails, consultez le manuel d'utilisation du système de détection moléculaire Neogen®.

REMARQUE : L'instrument de détection moléculaire Neogen doit atteindre et maintenir une température de 60 °C avant d'insérer le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen avec des tubes de réaction. Cette étape de chauffage prend environ 20 minutes et est indiquée par un voyant ORANGE sur la barre d'état de l'instrument. Lorsque l'instrument est prêt à démarrer une analyse, la barre d'état devient VERTE.

Lyse

1. Laissez les tubes de la solution de lyse Neogen se réchauffer en laissant le portoir à température ambiante (20-25 °C) pendant la nuit (16-18 heures). Pour équilibrer les tubes de solution de lyse Neogen à la température ambiante, vous pouvez les placer sur la paillasse du laboratoire pendant au moins 2 heures, les incuber dans un incubateur à 37 ± 1 °C pendant 1 heure ou les placer dans une unité de traitement thermique à sec à double bloc pendant 30 secondes à 100 °C.
2. Retournez les tubes fermés pour mélanger. Passez à l'étape suivante dans les 4 heures.
3. Retirez le bouillon d'enrichissement de l'incubateur.
4. Un tube de solution de lyse Neogen est nécessaire pour chaque échantillon et pour l'échantillon de témoin négatif (NC) (milieu d'enrichissement stérile).
   - 4.1 Les barrettes de tubes de solution de lyse Neogen peuvent être coupées selon le nombre de tubes de solution de lyse Neogen souhaité. Sélectionnez le nombre de tubes individuels de solution de lyse Neogen ou de barrettes à 8 tubes nécessaires. Placez les tubes de solution de lyse Neogen dans un portoir vide.
   - 4.2 Pour éviter toute contamination croisée, débouchez une seule barrette de tubes de solution de lyse Neogen à la fois et utilisez un nouvel embout de pipette pour chaque étape de transfert.
   - 4.3 Transférez l'échantillon enrichi dans des tubes de solution de lyse Neogen comme décrit ci-dessous :

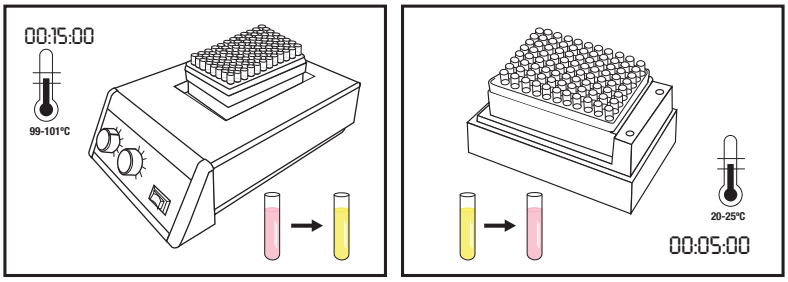
     Commencez par transférer chaque échantillon enrichi dans un tube individuel de solution de lyse Neogen. Transférez le témoin négatif (NC) **en dernier.**
   - 4.4 Utilisez l'outil de pose/retrait de bouchons de lyse pour système de détection moléculaire Neogen® pour ouvrir une barrette de tubes de solution de lyse Neogen (une barrette à la fois).
   - 4.5 Jetez le bouchon du tube de solution de lyse Neogen. Si le lysat doit être conservé pour un nouveau test, placez le bouchon dans un récipient propre pour le remettre après la lyse.
     - 4.5.1 Pour le traitement du lysat conservé, reportez-vous à l'annexe A.
   - 4.6 Transférez 20 µl d'échantillon dans un tube de solution de lyse Neogen, sauf indication contraire dans les tableaux 2, 3 et 4 relatifs aux protocoles.



5. Répétez l'étape 4.3 jusqu'à ce que chaque échantillon individuel ait été ajouté à un tube de solution de lyse Neogen correspondant dans la barrette.
6. Répétez les étapes 4.1 à 4.6 si nécessaire, pour le nombre d'échantillons à tester.
7. Une fois tous les échantillons transférés, transvasez 20 µL de NC (milieu d'enrichissement stérile, p. ex. eau peptonée tamponnée ISO) dans un tube de solution de lyse Neogen. Ne pas utiliser de l'eau comme témoin négatif.
8. Vérifiez que la température du support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen est à 100 ± 1 °C.
9. Placez le portoir non couvert de tubes de solution de lyse Neogen dans le support du bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen et chauffez-le pendant 15 ± 1 minutes. Pendant le chauffage, la solution de lyse Neogen passe du rose (froid) au jaune (chaud).

   Les échantillons qui n'ont pas été traités thermiquement lors de la phase de lyse de l'analyse peuvent être considérés comme présentant un risque biologique potentiel et ne doivent PAS être insérés dans l'instrument de détection moléculaire Neogen.

10. Retirez le portoir non couvert des tubes de solution de lyse Neogen du bloc chauffant et laissez-le refroidir dans le support de bloc réfrigérant pour système de détection moléculaire Neogen pendant au moins 5 minutes et un maximum de 10 minutes. Utilisé à température ambiante sans le plateau de bloc réfrigérant pour système de détection moléculaire Neogen, le support du bloc réfrigérant pour système de détection moléculaire Neogen doit reposer directement sur la paillasse de laboratoire. Lorsqu'elle est refroidie, la solution de lyse reprend une couleur rose.
11. Retirez le portoir de tubes de solution de lyse Neogen du support de bloc réfrigérant pour système de détection moléculaire Neogen.

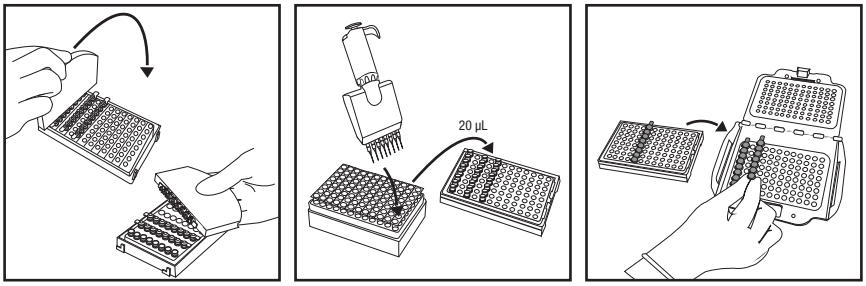


Amplification

1. Un tube de réactif du kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) est requis pour chaque échantillon et témoin négatif (NC).
   - 1.1 Les barrettes de tubes peuvent être coupées au nombre de tubes souhaité. Sélectionnez le nombre requis de tubes ou de barrettes à 8 tubes de réactif du kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7).
   - 1.2 Placez les tubes de réactif du kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) dans un portoir vide.
   - 1.3 Évitez d'agiter les granulés de réactif au fond des tubes.
2. Sélectionnez un tube de contrôle de réactif Neogen et placez-le dans le portoir.
3. Pour éviter toute contamination croisée, débouchez une seule barrette de tubes de réactifs du kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 à la fois et utilisez un nouvel embout de pipette pour chaque étape de transfert.
4. Transférez le lysat dans un tube de réactif du kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) et un tube de contrôle de réactif Neogen comme décrit ci-dessous :

Transférez chaque lysat d'échantillon dans un tube individuel de réactif du kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) **d'abord**, et poursuivez avec le témoin négatif. Hydratez le tube de contrôle de réactif Neogen **en dernier.**

5. Utilisez l'outil de pose/retrait de bouchons de réactif pour système de détection moléculaire Neogen® pour ouvrir le tube de réactif du kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) (une barrette de tubes à la fois). Éliminez le bouchon.
   - **5.1 Transférez 20 µL de lysat d'échantillon prélevé dans la moitié supérieure du liquide (évitez le précipité) contenu dans le tube de solution de lyse Neogen dans le tube correspondant de réactif du** kit Neogen de détection moléculaire 2- *E. coli* O157 (incluant H7)**. Versez de biais pour éviter d'agiter les granulés. Mélangez en pipetant doucement de haut en bas 5 fois.**
   - 5.2 Répétez l'étape 5.1 jusqu'à ce que chaque lysat d'échantillon ait été ajouté à un tube correspondant de réactif du kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) de la barrette.
   - 5.3 Couvrez les tubes de réactifs du kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) avec les bouchons supplémentaires fournis et utilisez le côté arrondi de l'outil de pose/retrait de bouchons de réactif pour système de détection moléculaire Neogen pour appliquer une pression avec un mouvement de va-et-vient afin de vous assurer que le bouchon est parfaitement en place.
   - 5.4 Répétez les étapes 5.1 à 5.3 si nécessaire, pour le nombre d'échantillons à tester.
   - 5.5 Une fois tous les lysats d'échantillon transférés, répétez les étapes 5.1 à 5.3 pour transférer 20 µL de lysat de témoin négatif dans un tube de réactif du kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7).
   - 5.6 Transférez **20 µL de lysat de témoin négatif dans un tube de contrôle de réactif Neogen.** Versez de biais pour éviter d'agiter les granulés. Mélangez en pipetant doucement de haut en bas 5 fois.
6. Chargez les tubes fermés dans un plateau propre et décontaminé de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen. Fermez ensuite le couvercle et verrouillez-le.



7. Révisez l'analyse et confirmez-la dans le logiciel de détection moléculaire Neogen.
8. Cliquez sur le bouton Démarrer dans le logiciel et sélectionnez l'instrument à utiliser. Le couvercle de l'instrument sélectionné s'ouvre automatiquement.
9. Placez le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen dans l'instrument de détection moléculaire Neogen et fermez le couvercle pour commencer l'analyse. Les résultats sont fournis dans les 60 minutes, bien que les résultats positifs puissent être détectés plus tôt.
10. Une fois l'analyse terminée, retirez le plateau de chargement rapide de l'instrument de détection moléculaire Neogen et faites tremper les tubes contaminés dans une solution d'eau de Javel ménagère à 1-5 % (v:v dans l'eau) pendant une heure et à un emplacement éloigné de la zone de préparation de l'analyse.

MISE EN GARDE : Pour réduire le risque de faux positifs dus à une contamination croisée, n'ouvrez jamais les tubes de réactif contenant de l'ADN amplifié. Il s'agit notamment des tubes de contrôle de réactif Neogen, ainsi que des tubes de contrôle de matrice Neogen et des tubes de réactif du kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7). Éliminez toujours les tubes de réactif scellés en les faisant tremper dans une solution d'eau de Javel ménagère à 1-5 % (v:v dans l'eau) pendant une heure et à un emplacement éloigné de la zone de préparation du test.

Résultats et interprétation

Un algorithme interprète la courbe du signal lumineux résultant de la détection de l'amplification des acides nucléiques. Les résultats sont automatiquement analysés par le logiciel et sont codés par couleur en fonction du résultat. Un résultat positif ou négatif est déterminé par l'analyse d'un certain nombre de paramètres de courbe uniques. Les résultats présumés positifs sont signalés en temps réel, tandis que les résultats négatifs et à vérifier sont affichés une fois l'analyse terminée.

Les échantillons présumés positifs doivent être confirmés conformément aux procédures opérationnelles standard du laboratoire ou en suivant la confirmation de la méthode de référence appropriée[1, 2, 3], en commençant par le transfert de l'enrichissement primaire d'eau peptonée tamponnée ISO vers le(s) bouillon(s) d'enrichissement secondaire, suivi de la mise en culture et de la confirmation des isolats à l'aide de méthodes biochimiques et sérologiques appropriées.

REMARQUE : Même un échantillon négatif ne donnera pas une valeur zéro, car le système et les réactifs d'amplification du kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) présentent une valeur d'unités relatives de lumière (RLU) « d'arrière-plan ».

Dans les rares cas où l'émission de lumière est inhabituelle, l'algorithme la renseigne comme à vérifier (« Inspect »). Neogen recommande à l'utilisateur de répéter l'analyse pour tous les échantillons à vérifier. Si le résultat reste à vérifier, procédez au test de confirmation en recourant à votre méthode préférée ou selon les réglementations locales.

En cas de résultats discordants (positif présumé avec le kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7), non confirmé par l'un des moyens décrits ci-dessus, et en particulier pour le test d'agglutination au latex), le laboratoire doit suivre les étapes nécessaires pour garantir la validité des résultats obtenus.

Confirmation des résultats selon la méthode certifiée NF VALIDATION

Dans le cadre de la méthode NF VALIDATION, tous les échantillons identifiés comme positifs par le kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) doivent être confirmés par l'un des tests suivants :

Option 1 : Utilisation de la norme ISO 16654[3] en commençant par l'enrichissement en eau peptonée tamponnée[3].

Option 2 : Mise en œuvre d'une méthode de confirmation composée des points suivants : étalez en stries 50 µL de l'enrichissement à l'eau peptonée tamponnée[3] dans une boîte de gélose MacConkey au sorbitol contenant de la céfixime et du tellurite de potassium (CT-SMAC)[3]. Laissez incuber pendant 24 ±3 heures à 37 °C. Étalez en stries des colonies caractéristiques sur la gélose nutritive et réalisez le test d'agglutination au latex directement sur les colonies isolées. Si les résultats du kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7) ne sont pas confirmés, effectuez une séparation immunomagnétique, puis étalez en stries 50 µL sur de la gélose CT-SMAC.

Option 3 : Utilisation de sondes d'acides nucléiques telles que décrites dans la norme EN ISO 7218[5], appliquées sur des colonies isolées (purifiées ou non) issues de la gélose CT-SMAC (voir option 1 ou 2). Les sondes d'acides nucléiques doivent être différentes de celles utilisées dans le kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7).

Option 4 : Utilisation de toute autre méthode certifiée NF VALIDATION, pour autant que son principe soit différent de celui du kit Neogen de détection moléculaire 2 - *E. coli* O157 (incluant H7). Vous devez appliquer le protocole complet décrit pour cette deuxième méthode validée. Toutes les étapes préalables au début de la confirmation doivent être communes aux deux méthodes.

En cas de résultats discordants (positif présumé avec la méthode alternative, non confirmé par l'un des moyens décrits ci-dessus), le laboratoire doit suivre les étapes nécessaires pour garantir la validité du résultat obtenu.

Si vous avez des questions au sujet d'applications ou de procédures spécifiques, veuillez visiter notre site Web à l'adresse www.neogen.com ou contacter votre représentant ou votre distributeur Neogen local.

Annexe A. Interruption de protocole : conservation et test répété des échantillons

1. Pour conserver un lysat traité thermiquement, refermez le tube de lyse avec un bouchon propre (voir section 4.5 **Lyse**)
2. Pour conserver un échantillon enrichi, incubez-le pendant au moins 18 heures avant de le stocker.
3. Conservez-le à une température comprise entre 4 et 8 °C pendant un maximum de 72 heures.
4. Préparez un échantillon stocké pour l'amplification en retournant le tube 2 ou 3 fois pour le mélanger.
5. Ouvrez les tubes.

6. Placez les tubes de lysat mélangés sur le support du bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen et chauffez-les à 100 ± 1 °C pendant 5 ± 1 minutes.
7. Retirez le portoir des tubes de solution de lyse Neogen du bloc chauffant et laissez-le refroidir dans le support de bloc réfrigérant pour système de détection moléculaire Neogen pendant au moins 5 minutes et un maximum de 10 minutes.
8. Poursuivrez le protocole à la section **Amplification** détaillée ci-dessus.

Références :

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapitre 4A : Diarrheagenic *Escherichia coli.* Novembre 2015.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 5.09. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. Date d'entrée en vigueur : 15 janvier 2015.
3. ISO 16654:2001 Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche des *Escherichia coli* O157.
4. ISO/IEC 17025. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.
5. ISO 7218. Microbiologie des aliments – Exigences générales et recommandations.
6. ISO 6887. Microbiologie des aliments – Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.
7. Qualification d'installation (IQ)/Qualification opérationnelles (OQ) du système de détection moléculaire Neogen®. Neogen Food Safety.

Explication des symboles

info.neogen.com/symbols

AOAC est une marque déposée d'AOAC INTERNATIONAL

Official Methods est une marque de service déposée d'AOAC INTERNATIONAL

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

NEOGEN®

Produktanweisungen

Molekulare Detektion *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2

Produktbeschreibung und Verwendungszweck

Der Neogen® Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 wird mit dem molekularen Detektionssystem von Neogen® zum schnellen und spezifischen Nachweis von *E. coli* O157 (einschl. H7) in angereicherten Lebens- und Futtermittelproben verwendet.

Die molekularen Detektionsnachweise von Neogen verwenden die Loop-vermittelte isothermale Amplifikation zur schnellen Vervielfältigung von Nukleinsäuresequenzen mit hoher Spezifität und Sensitivität, kombiniert mit Biolumineszenz zur Detektion der Amplifikation. Vermutlich positive Ergebnisse werden in Echtzeit gemeldet, während negative Ergebnisse nach Abschluss des Nachweises angezeigt werden. Vermutlich positive Ergebnisse müssen mit Ihrer bevorzugten Methode bestätigt werden, wie in den örtlichen Bestimmungen angegeben [1, 2, 3].

Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 ist vorgesehen für die Verwendung in einer Laborumgebung durch Fachkräfte, die in Labortechniken geschult sind. Neogen hat die Verwendung dieses Produkts in anderen Branchen als der Lebensmittel- oder Getränkeindustrie nicht dokumentiert. Zum Beispiel hat Neogen dieses Produkt nicht für die Prüfung von Umwelt-, Pharma-, Kosmetik-, klinischen oder veterinärmedizinischen Proben dokumentiert. Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 wurde nicht mit allen möglichen Lebensmitteln, Verarbeitungsmethoden für Lebensmittel, Testprotokollen oder Bakterienstämmen geprüft.

Wie bei allen Testmethoden können Quelle, Formel und Qualität des Anreicherungsmediums die Ergebnisse beeinflussen. Faktoren wie Probenahmemethoden, Testprotokolle, Probenvorbereitung, Handhabung und Labortechnik können die Ergebnisse ebenfalls beeinflussen. Neogen empfiehlt die Prüfung der Methode einschließlich Anreicherungsmedium in der Umgebung des Benutzers unter Verwendung einer ausreichenden Anzahl von Proben mit bestimmten Lebensmitteln und mikrobiellen Belastungstests, um sicherzustellen, dass die Methode die Kriterien des Benutzers erfüllt.

Neogen hat Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 mit gepuffertem Peptonwasser (ISO) geprüft.

Das molekulare Detektionsgerät von Neogen® ist für die Verwendung mit Proben vorgesehen, die im Rahmen des Nachweises während des Lyseschritts wärmbehandelt wurden, um die in der Probe vorhandenen Organismen zu zerstören. Proben, die im Rahmen des Nachweises während des Lyseschritts nicht ordnungsgemäß wärmebehandelt wurden, sind als potenziell biogefährlich einzustufen und dürfen NICHT in das molekulare Detektionsgerät von Neogen eingesetzt werden.

Neogen Food Safety ist gemäß der Norm ISO 9001 der International Organization for Standardization für Design und Fertigung zertifiziert.

Das Nachweiskit Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 enthält 96 Tests, beschrieben in Tabelle 1.

Tabelle 1. Komponenten des Neogen-Nachweiskits für molekulare Detektion

Artikel	Merkmale	Menge	Inhalt	Kommentare
Neogen® Lyselösung (LL)	Rosa Lösung in transparenten Röhrchen	96 (12 Streifen mit 8 Röhrchen)	580 µl Neogen-Lyselösung pro Röhrchen	In Gestell und gebrauchsfertig
Neogen® Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2-Reagenzröhrchen	Rosa Röhrchen	96 (12 Streifen mit 8 Röhrchen)	Lyophilisierte spezifische Amplifikations- und Detektionsmischung	Gebrauchs-fertig
Zusätzliche Kappen	Rosa Kappen	96 (12 Streifen je 8 Kappen)		Gebrauchs-fertig
Neogen® Reagenzkontrolle (RC)	Transparente Röhrchen mit Flip-Top	16 (2 Beutel je 8 einzelne Röhrchen)	Lyophilisierte Kontroll-DNA, Amplifikations- und Detektionsmischung	Gebrauchs-fertig

Die Negativkontrolle (nicht im Kit enthalten) ist ein steriles Anreicherungsmedium, z. B. BPW ISO. Verwenden Sie kein Wasser als Negativkontrolle.

Sicherheit

Der Benutzer muss alle Sicherheitsinformationen in den Anweisungen für das molekulares Detektionssystem von Neogen und Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 lesen, verstehen und befolgen. Bewahren Sie die Sicherheitsanweisungen zur späteren Referenz auf.

⚠ **WARNUNG:** Weist auf eine Gefahrensituation hin, die zu Tod oder schwerwiegenden Verletzungen und/oder Sachschäden führen kann, wenn sie nicht vermieden wird.

HINWEIS: Weist auf eine mögliche Gefahrensituation hin, die zu Sachschäden führen kann, wenn sie nicht vermieden wird.

⚠ WARNUNG

Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 nicht zur Diagnose von Erkrankungen bei Menschen und Tieren anwenden.

Der Benutzer muss sein Personal in aktuellen ordnungsgemäßen Testtechniken schulen: beispielsweise Gute Laborpraxis, ISO/IEC 17025[4] oder ISO 7218[5].

Um die mit falsch-negativen Ergebnissen verbundenen Risiken, die zu einer Freisetzung kontaminierter Produkte führen können, zu reduzieren, beachten Sie Folgendes:

- Befolgen Sie das Protokoll und führen Sie die Tests genau gemäß den Angaben in den Produktanweisungen durch.
- Verwenden Sie auf 41,5 ± 1 °C vorgewärmtes Medium. Lassen Sie das Medium während der Probenvorbereitung nicht unter den Inkubationstemperaturbereich fallen.
- Lagern Sie Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 wie auf der Verpackung und in den Produktanweisungen angegeben.
- Verwenden Sie Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 immer vor dem Verfalldatum.
- Verwenden Sie Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 mit Lebensmitteln, Futtermitteln und Umweltproben aus der Lebensmittelverarbeitung, die intern oder durch Dritte validiert wurden.
- Verwenden Sie Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 nur mit Oberflächen, Reinigungsmitteln, Protokollen und Bakterienstämmen, die intern oder durch Dritte validiert wurden.
- Bei einer Umweltprobe, die Neutralisationspuffer (NP) mit Arylsulfonatkomplex enthält, ist vor dem Test eine Verdünnung von 1:2 durchzuführen (1 Teil Probe in 1 Teil steriler Anreicherungsbouillon). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, 10 µl der Anreicherung mit Neutralisationspuffer in die Röhrchen der Neogen-Lyselösung zu überführen. Neogen® Probenhandhabungsprodukte einschließlich Neogen® Neutralisationspuffer mit Arylsulfonatkomplex: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XSLSSL10NB, HS10NB und HS119510NB.

Um die mit einer Exposition gegenüber Chemikalien und Biogefährdung verbundenen Risiken zu reduzieren, beachten Sie Folgendes:

- Führen Sie Erregertests in einem ordnungsgemäß ausgestatteten Labor unter der Aufsicht von geschultem Personal durch. Inkubierte Anreicherungsmedien und Geräte oder Oberflächen, die mit inkubierten Anreicherungsmedien in Berührung gekommen sind, können Krankheitserreger in ausreichenden Mengen enthalten, um ein Risiko für die menschliche Gesundheit darzustellen.
- Befolgen Sie immer die Standardsicherheitspraktiken des Labors, einschließlich des Tragens geeigneter Schutzkleidung und eines geeigneten Augenschutzes bei der Handhabung von Reagenzien und kontaminierten Proben.
- Vermeiden Sie den Kontakt mit dem Inhalt des Anreicherungsmediums und der Reagenzröhrchen nach der Amplifikation.
- Entsorgen Sie angereicherte Proben und entsprechende kontaminierte Abfälle gemäß aktueller örtlicher/regionaler/nationaler/branchenweiter Standards.
- Überschreiten Sie nicht die empfohlene Temperatureinstellung am Heizelement.
- Die empfohlene Heizzeit darf nicht überschritten werden.
- Verwenden Sie ein geeignetes, kalibriertes Thermometer zur Prüfung der Temperatur des Neogen® Heizblockeinsatzes für molekulare Detektion (z. B. ein Einstechthermometer oder Digitalthermometer mit Thermoelement, kein Tauchthermometer). Das Thermometer muss in die vorgesehene Position im Neogen-Heizblockeinsatz für molekulare Detektion eingesetzt werden.

Um die mit einer Kreuzkontamination bei der Vorbereitung des Nachweises verbundenen Risiken zu reduzieren, beachten Sie Folgendes:

- Tragen Sie stets Handschuhe (um den Benutzer zu schützen und die Einführung von Nukleasen zu vermeiden).

Um die mit einer Exposition gegenüber heißen Flüssigkeiten verbundenen Risiken zu reduzieren, beachten Sie Folgendes:

- Überschreiten Sie nicht die empfohlene Temperatureinstellung am Heizelement.
- Die empfohlene Heizzeit darf nicht überschritten werden.
- Verwenden Sie ein geeignetes, kalibriertes Thermometer zur Prüfung der Temperatur des Neogen® Heizblockeinsatzes für molekulare Detektion (z. B. ein Einstechthermometer oder Digitalthermometer mit Thermoelement, kein Tauchthermometer). Das Thermometer muss in die vorgesehene Position im Neogen-Heizblockeinsatz für molekulare Detektion eingesetzt werden.

HINWEIS

Um die mit einer Kreuzkontamination bei der Vorbereitung des Nachweises verbundenen Risiken zu reduzieren, beachten Sie Folgendes:

- Es wird empfohlen, sterile Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere (gefiltert) in Molekularbiologiequalität zu verwenden.
- Verwenden Sie für jeden Probentransfer eine neue Pipettenspitze.
- Wenden Sie gute Laborpraxis an, um die Probe von der Anreicherung in das Lyseröhrchen zu überführen. Um eine Kontamination der Pipette zu vermeiden, kann der Benutzer einen Zwischentransferschritt hinzufügen. Beispielsweise kann der Benutzer jede angereicherte Probe in ein steriles Röhrchen überführen.
- Verwenden Sie eine Werkbank für Molekularbiologie mit einer Entkeimungslampe.

Um die mit falsch-positiven Ergebnissen verbundenen Risiken zu reduzieren, beachten Sie Folgendes:

- Öffnen Sie niemals Röhrchen nach der Amplifikation.
- Entsorgen Sie Röhrchen stets durch einstündiges Einweichen in einer 1–5%igen (v:v in Wasser) Bleichmittellösung abseits des Nachweis-Vorbereitungsbereichs.

Beachten Sie das Sicherheitsdatenblatt für weitere Informationen sowie örtliche Vorgaben für die Entsorgung.

Wenn Sie Fragen zu bestimmten Anwendungen oder Verfahren haben, besuchen Sie bitte unsere Website unter www.neogen.com oder wenden Sie sich an Ihren örtlichen Neogen-Verkaufsvertreter oder Händler.

Verantwortung des Benutzers

Es liegt in der Verantwortung des Benutzers, sich mit den Produktanweisungen und -informationen vertraut zu machen. Besuchen Sie unsere Website unter **www.neogen.com** oder wenden Sie sich für weitere Informationen an Ihren örtlichen Neogen-Verkaufsvertreter oder Händler.

Bei der Auswahl einer Testmethode ist es wichtig, zu berücksichtigen, dass externe Faktoren wie Probenahmemethoden, Prüfprotokolle, Probenvorbereitung, Handhabung und Labortechnik die Ergebnisse beeinflussen können.

Es liegt in der Verantwortung des Benutzers, bei der Auswahl einer Testmethode oder eines Testprodukts eine ausreichende Anzahl von Proben mit den entsprechenden Matrices und mikrobiellen Belastungstests zu bewerten, um sicherzustellen, dass die gewählte Testmethode die Kriterien des Benutzers erfüllt.

Es liegt auch in der Verantwortung des Benutzers, festzustellen, ob alle Testmethoden und -ergebnisse den Anforderungen seiner Kunden und Lieferanten entsprechen.

Wie bei jeder anderen Testmethode stellen die mit einem Produkt von Neogen Food Safety gewonnen Ergebnisse keine Garantie für die Qualität der getesteten Matrices oder Prozesse dar.

Um Kunden bei der Evaluierung der Methode für unterschiedliche Lebensmittelmatrices zu unterstützen, hat Neogen das Kit Neogen® Matrixkontrolle für molekulare Detektion entwickelt. Verwenden Sie bei Bedarf die Matrixkontrolle (MC), um zu ermitteln, ob die Matrix die Ergebnisse des Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 beeinflussen kann. Testen Sie mehrere Proben, die für die Matrix repräsentativ sind, d. h. Proben unterschiedlichen Ursprungs, während eines beliebigen Validierungszeitraums bei Einführung der Neogen-Methode oder beim Testen unbekannter Matrices oder Matrices, deren Rohmaterial oder Verfahren sich geändert hat.

Eine Matrix kann definiert werden als Produkttyp mit intrinsischen Eigenschaften wie Zusammensetzung und Verfahren. Unterschiede zwischen Matrices können einfache Auswirkungen von Unterschieden in Verarbeitung oder Präsentation sein, wie roh oder pasteurisiert, frisch oder getrocknet usw.

Beschränkte Gewährleistung/Beschränkter Rechtsbehelf

SOFERN NICHT AUSDRÜCKLICH IN EINEM ABSCHNITT ZUR BESCHRÄNKTEN GEWÄHRLEISTUNG AUF DER VERPACKUNG INDIVIDUELLER PRODUKTE ANDERWEITIG ANGEGEBEN, SCHLIESST NEOGEN JEGLICHE AUSDRÜCKLICHE UND STILLSCHWEIGENDE GEWÄHRLEISTUNG AUS, EINSCHLIESSLICH UNTER ANDEREM DIE GEWÄHRLEISTUNG DER MARKTGÄNGIGKEIT ODER EIGNUNG FÜR EINEN BESTIMMTEN ZWECK. Wenn ein Produkt von Neogen Food Safety defekt ist, wird Neogen oder sein autorisierter Vertriebspartner nach eigenem Ermessen das Produkt ersetzen oder seinen Kaufpreis erstatten. Dies sind Ihre ausschließlichen Rechtsbehelfe. Sie müssen Neogen unverzüglich innerhalb von sechzig Tagen nach Entdeckung vermuteter Mängel an einem Produkt benachrichtigen und das Produkt an Neogen zurücksenden. Bei weiteren Fragen wenden Sie sich bitte an Ihren Neogen-Verkaufsvertreter oder autorisierten Vertreter für Neogen.

Haftungsbeschränkung für Neogen

NEOGEN SCHLIESST DIE HAFTUNG FÜR ETWAIGE VERLUSTE ODER DIREKTE, INDIREKTE, BESONDERE, ZUFÄLLIGE ODER FOLGESCHÄDEN AUS, EINSCHLIESSLICH UNTER ANDEREM ENTGANGENE PROFITE. In keinem Fall übersteigt die Haftung von Neogen nach einer beliebigen Rechtstheorie den Kaufpreis des Produkts, das mutmaßlich fehlerhaft ist.

Lagerung und Entsorgung

Lagern Sie Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 bei 2–8 °C. Nicht einfrieren. Lagern Sie das Kit dunkel. Überprüfen Sie nach dem Öffnen des Kits, ob der Folienbeutel unbeschädigt ist. Bei beschädigtem Beutel nicht verwenden. Nach dem Öffnen müssen unbenutzte Reagenzröhrchen immer im wiederverschließbaren Beutel mit dem Trockenmittel aufbewahrt werden, um die Stabilität der lyophilisierten Reagenzien zu erhalten. Wiederverschlossene Beutel maximal 60 Tage lang bei 2–8 °C lagern.

Verwenden Sie Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 nicht nach dem Verfalldatum. Das Verfalldatum und die Losnummer sind auf dem äußeren Etikett des Kartons vermerkt. Nach Gebrauch können das Anreicherungsmedium und die Röhrchen mit Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 potenziell krankheitserregende Materialien enthalten. Wenn die Tests abgeschlossen sind, befolgen Sie die aktuellen Branchenstandards für die Entsorgung kontaminierter Abfälle. Beachten Sie das Sicherheitsdatenblatt für weitere Informationen sowie örtliche Vorgaben für die Entsorgung.

Gebrauchsanweisung

Befolgen Sie alle Anweisungen sorgfältig. Andernfalls kann es zu ungenauen Ergebnissen kommen.

Der Benutzer muss die Bedienerqualifikationsschulung für das molekulare Detektionssystem von Neogen absolvieren, wie im Dokument „Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System"[7] beschrieben.

Dekontaminieren Sie Laborwerkbänke und Geräte (Pipetten, Capper/Decapper usw.) mit einer 1–5%igen (v:v in Wasser) Bleichmittellösung oder Lösung zur DNA-Entfernung.

Spezifische Anforderungen sind dem Abschnitt „Spezifische Anweisungen für validierte Methoden" zu entnehmen:

Tabelle 3 für Anreicherungsprotokolle gemäß AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2017.01

Tabelle 4 für Anreicherungsprotokolle gemäß NF Validation Zertifikat 3M 01/18-05/17

Probenanreicherung

Tabelle 2, 3 oder 4 bieten Anleitungen für Anreicherungsprotokolle für Lebensmittel. Es liegt in der Verantwortung des Benutzers, alternative Beprobungsprotokolle oder Verdünnungsverhältnisse zu validieren, um sicherzustellen, dass diese Testmethode den Kriterien des Benutzers entspricht.

Lebensmittel

1. BPW ISO-Anreicherungsmedium auf 41,5 ± 1 °C vorwärmen.
2. Anreicherungsmedium und die Probe gemäß Tabelle 2, 3 oder 4 aseptisch mischen. Für alle Fleischproben und stark partikelförmigen Proben wird die Verwendung von Filterbeuteln empfohlen.
3. Alle Matrices mit Ausnahme von Blattgemüse und Obst gründlich 2 ± 0,2 Minuten lang mit einem Mixer, Stomacher oder Handmixer homogenisieren. Über die in Tabelle 2, 3 oder 4 angegebene angemessene Zeitspanne bei 41,5 ± 1 °C inkubieren.

Tabelle 2. Allgemeine Anreicherungsprotokolle

Probenmatrix[a]	Probengröße	Volumen Anreicherungs-bouillon (ml)	Anreiche-rungstempe-ratur (±1 °C)	Anreiche-rungsdauer (Stunden)
Rindfleisch roh, einschl. Hack und Muskelfleisch	325 g	975 BPW ISO (vorgewärmt)	41,5	10–18
Rohes Fleisch einschließlich rohes Rindfleisch, Schweinefleisch, Geflügel, Lamm und Bison	25 g	225 BPW ISO (vorgewärmt)	41,5	8–18
Blattgemüse[b]	200 g	450 BPW ISO (vorgewärmt)	41,5	18–24
Andere Lebensmittel einschließlich Obst[b], Gemüse, Obst-/Gemüsesäfte, frische Kräuter, rohe Meeresfrüchte, rohe Eier, rohe Milch, Keksteig und verarbeitetes Fleisch	25 g	225 BPW ISO (vorgewärmt)	41,5	18–24
Walnüsse oder Nussmischungen mit Walnüssen (dieses Protokoll eignet sich für andere Nüsse wie Pekannüsse, Mandeln, Pistazien, Cashews und Kastanien)	25 g	225 rekonstituiertes Magermilchpulver	41,5	18–24

(a) Gefrorene Proben müssen vor der Hinzugabe in die Anreicherungsbouillon auf 4–8 °C gebracht werden.

(b) Blattgemüse- und Obstproben müssen 5 Minuten lang sanft per Hand gerührt werden. Keinen Mixer oder Stomacher verwenden.

Spezifische Anweisungen für validierte Methoden

AOAC® *Official Methods of Analysis*℠ 2017.01

Im Programm AOAC *Official Method of Analysis*℠ hat sich Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 als effektive Methode für die Detektion von *E. coli* O157:H7 erwiesen. Die in der Studie geprüften Matrices sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3. Anreicherungsprotokolle mit vorgewärmtem BPW ISO bei 41,5 ± 1 °C gemäß AOAC® *Official Methods*℠ 2017.01

Probenmatrix	Probengröße	Volumen Anrei-cherungsbouillon (ml)	Anreicherungs-dauer (Stunden)	Homogenisiert
Rohes Rinderhack (73 % mager)	325 g	975	10-18	Manuell oder via Stomacher
Roher verpackter Spinat[a]	200 g	450	18-24	5-minütiges sanftes manuelles Rühren, nicht homogenisieren
Frischer Rosenkohl	25 g	225	18-24	5-minütiges sanftes manuelles Rühren, nicht homogenisieren
Gefrorene Blaubeeren[a][b]	25 g	225	18-24	5-minütiges sanftes manuelles Rühren, nicht homogenisieren

(a) Blattgemüse- und Obstproben müssen 5 Minuten lang sanft per Hand gerührt werden. Keinen Mixer oder Stomacher verwenden.

(b) Gefrorene Proben müssen vor der Hinzugabe in die Anreicherungsbouillon auf 4–8 °C gebracht werden.

NF Validation by AFNOR Certification

3M 01/18-05/17

ALTERNATIVE ANALYSEMETHODEN FÜR DIE AGRARWIRTSCHAFT

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

Weitere Informationen zum Gültigkeitsende finden Sie im Zertifikat für NF VALIDATION, das auf der oben genannten Website verfügbar ist.

NF VALIDATION zertifizierte Methode in Übereinstimmung mit ISO 16140-2[8] im Vergleich zu ISO 16654[3]

Umfang der Validierung: Rohes Rindfleisch, rohe Milchprodukte, rohes Obst und Gemüse

Probenvorbereitung: Proben müssen gemäß EN ISO 16654 und EN ISO 6887 vorbereitet werden[6]

Softwareversion: Siehe Zertifikat

Tabelle 4. Anreicherungsprotokolle mit vorgewärmtem BPW ISO bei 41,5 ± 1 °C gemäß NF VALIDATION zertifizierter Methode 3M 01/18-05/17

Protokoll	Proben-größe	Volumen Anreiche-rungsbouillon (ml)	Anreicherungstempera-tur (± 1 °C)	Anreicherungs-dauer (Stunden)
Rohe Milchprodukte, rohes Obst und rohes Gemüse	25 g	225	41,5	18–24
Rohes Rindfleisch	25 g	225	41,5	8–24

HINWEISE:

- Proben über 25 g wurden in der Studie mit NF VALIDATION nicht getestet.
- Die empfohlenen Protokollunterbrechungspunkte liegen nach der Anreicherung oder nach der Probenlyse. Anreicherungsbouillon oder Probenlysat können bei 2–8 °C bis zu 72 Stunden lang gelagert werden. Nach Entnahme des Anreicherungsbouillons aus der Lagerung wird die Testung ab Schritt 1 im Abschnitt **Lyse** fortgesetzt. Nach Entnahme des Probenlysats aus der Lagerung wird die Testung ab Schritt 7 im Abschnitt **Lyse** fortgesetzt. Das Lysat kann auch bei -20 °C gelagert werden.
- Kurze Anreicherungsprotokolle reagieren empfindlich auf Inkubationsbedingungen, und die im Protokoll angegebenen Temperaturen müssen eingehalten werden. Die Temperatur des Wasserbads oder des Inkubators, in dem die Bouillons vorgewärmt werden, muss überprüft werden, um sicherzustellen, dass die Anreicherungsbouillon die erforderliche Temperatur erreicht. Die Gesamtzeit für die Probenvorbereitung, einschließlich der Verzögerung zwischen dem Ende des Vorwärmschritts des Mediums und dem Beginn der Inkubation der Lebensmittelprobe, darf 45 Minuten nicht überschreiten. Die Verwendung eines belüfteten Inkubators bei der Inkubation wird empfohlen.

Vorbereitung des Neogen® Schnellladefachs für molekulare Detektion

1. Ein Tuch oder Einwegtuch mit 1–5%iger (v:v in Wasser) Bleichmittellösung befeuchten und das Neogen-Schnellladefach für molekulare Detektion abwischen.
2. Neogen-Schnellladefach für molekulare Detektion mit Wasser abspülen.
3. Neogen-Schnellladefach für molekulare Detektion mit einem Einwegtuch trocken wischen.
4. Vor Gebrauch sicherstellen, dass das Neogen-Schnellladefach für molekulare Detektion trocken ist.

Vorbereitung des Neogen® Kühlblockeinsatzes für molekulare Detektion

Neogen-Kühlblockeinsatz für molekulare Detektion direkt auf der Laborwerkbank platzieren: Das Neogen-Kühlblockfach für molekulare Detektion wird nicht verwendet. Block bei Umgebungstemperatur im Labor (20–25 °C) verwenden.

Vorbereitung des Neogen® Heizblockeinsatzes für molekulare Detektion

Neogen-Heizblockeinsatz für molekulare Detektion in einem Doppel-Heizblock platzieren. Den Heizblock einschalten und die Temperatur so einstellen, dass der Neogen-Heizblockeinsatz für molekulare Detektion eine Temperatur von 100 ± 1 °C erreichen und halten kann.

HINWEIS: Je nach Heizgerät ca. 30 Minuten warten, bis der Neogen-Heizblockeinsatz für molekulare Detektion die vorgesehene Temperatur erreicht hat. Mit einem geeigneten, kalibrierten Thermometer (z. B. ein Einstechthermometer oder Digitalthermometer mit Thermoelement, kein Tauchthermometer) an der vorgesehenen Position sicherstellen, dass der Neogen-Heizblockeinsatz für molekulare Detektion eine Temperatur von 100 ± 1 °C erreicht hat.

Vorbereitung des molekularen Detektionsgeräts von Neogen®

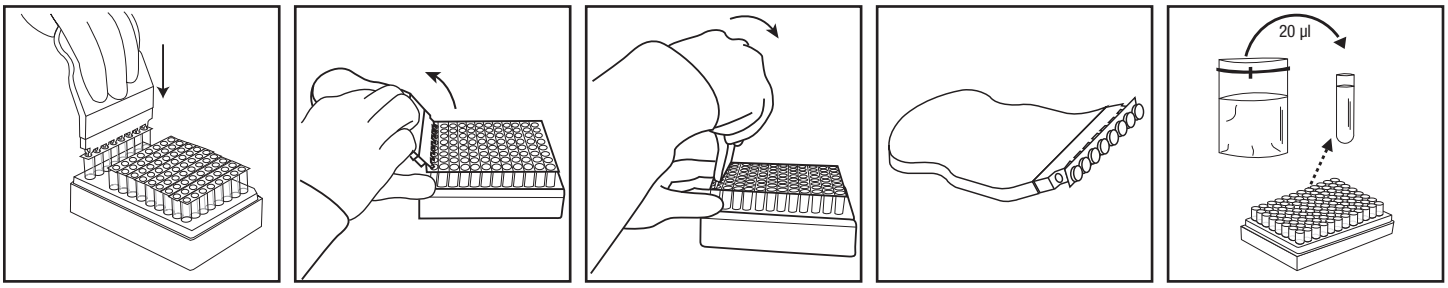
1. Neogen® Software für molekulare Detektion starten und anmelden. Wenden Sie sich an einen Verkaufsvertreter von Neogen Food Safety, um sicherzustellen, dass Sie über die aktuell Version der Software verfügen.
2. Das molekulare Detektionsgerät von Neogen einschalten.
3. Einen Durchgang mit Daten für jede Probe erstellen oder bearbeiten. Einzelheiten siehe Benutzerhandbuch für das molekulare Detektionssystem von Neogen®.

HINWEIS: Das molekulare Detektionsgerät von Neogen muss eine Temperatur von 60 °C erreichen und halten, bevor das Neogen-Schnelladefach für molekulare Detektion mit Reaktionsröhrchen eingesetzt wird. Dieser Heizschritt dauert ca. 20 Minuten und wird durch eine ORANGEFARBENE Anzeige in der Statusleiste des Geräts angezeigt. Wenn das Gerät bereit ist, einen Durchgang zu starten, wird die Statusleiste GRÜN.

Lyse

1. Fach mit Röhrchen mit Neogen-Lyselösung über Nacht (16–18 Stunden) auf Raumtemperatur (20–25 °C) aufwärmen lassen. Alternative Möglichkeiten zur Temperaturangleichung der Neogen-Lyselösung: Neogen-Lyselösung auf die Laborwerkbank stellen und mindestens 2 Stunden belassen, Röhrchen mit Neogen-Lyselösung in einem Inkubator bei 37 ± 1 °C 1 Stunde lang inkubieren oder Röhrchen für 30 Sekunden in ein Doppel-Heizblock bei 100 °C geben.
2. Die verschlossenen Röhrchen zum Mischen umdrehen. Innerhalb von 4 Stunden mit dem nächsten Schritt fortfahren.
3. Die Anreicherungsbouillon aus dem Inkubator nehmen.
4. Für jede Probe und die Negativkontrollprobe (NC) (steriles Anreicherungsmedium) ist ein Fläschchen Neogen-Lyselösung erforderlich.
   - 4.1 Röhrchenstreifen mit Neogen-Lyselösung können auf die gewünschte Anzahl von Röhrchen mit Neogen-Lyselösung zugeschnitten werden. Erforderliche Anzahl einzelner Röhrchen Neogen-Lyselösung oder Streifen zu 8 Röhrchen auswählen. Röhrchen mit Neogen-Lyselösung in einem leeren Gestell platzieren.
   - 4.2 Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, immer nur einen Röhrchenstreifen Neogen-Lyselösung öffnen und für jeden Transferschritt eine neue Pipettenspitze verwenden.
   - 4.3 Angereicherte Probe wie nachstehend beschrieben in die Röhrchen mit Neogen-Lyselösung überführen:

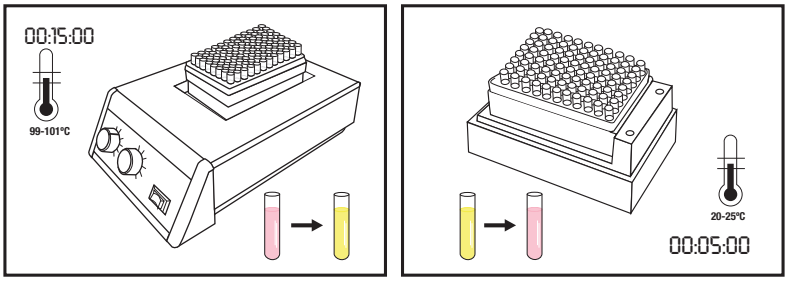
     Zuerst jede angereicherte Probe in ein einzelnes Röhrchen mit Neogen-Lyselösung überführen. Die NC **zuletzt** überführen.
   - 4.4 Den Neogen® Capper/Decapper für molekulare Detektion – Lyse zum Öffnen eines Röhrchenstreifens mit Neogen-Lyselösung verwenden. Immer nur einen Streifen öffnen.
   - 4.5 Kappe des Röhrchens mit Neogen-Lyselösung entsorgen. Wenn Lysat für einen erneuten Test aufbewahrt werden soll, Kappen in einen sauberen Behälter legen und nach der Lyse erneut aufsetzen.
     - 4.5.1 Verarbeitung des aufbewahrten Lysats siehe Anhang A.
   - 4.6 20-µl-Probe in ein Röhrchen mit Neogen-Lyselösung überführen, sofern sich in Protokolltabellen 2, 3 und 4 keine anderweitigen Angaben finden.



5. Schritt 4.3 wiederholen, bis jede einzelne Probe in ein entsprechendes Röhrchen Neogen-Lyselösung im Streifen gegeben wurde.
6. Schritte 4.1 bis 4.6 nach Bedarf für die Anzahl der zu testenden Proben wiederholen.
7. Wenn alle Proben umgefüllt wurden, 20 µl NC (steriles Anreicherungsmedium, z. B. BPW ISO) in ein Röhrchen mit Neogen-Lyselösung überführen. Kein Wasser als NC verwenden.
8. Sicherstellen, dass die Temperatur des Neogen-Heizblockeinsatzes für molekulare Detektion bei 100 ± 1 °C liegt.
9. Das nicht abgedeckte Gestell mit Röhrchen mit Neogen-Lyselösung im Neogen-Heizblockeinsatz für molekulare Detektion platzieren und 15 ± 1 Minuten lang aufheizen. Beim Aufheizen wechselt die Farbe der Neogen-Lyselösung von rosa (kühl) zu gelb (warm).

   Proben, die im Rahmen des Nachweises während des Lyseschritts nicht ordnungsgemäß wärmebehandelt wurden, sind als potenziell biogefährlich einzustufen und dürfen NICHT in das molekulare Detektionsgerät von Neogen eingesetzt werden.

10. Das nicht abgedeckte Gestell mit Röhrchen mit Neogen-Lyselösung aus dem Heizblock nehmen und mindestens 5 Minuten und maximal 10 Minuten lang im Neogen-Kühlblockeinsatz für molekulare Detektion abkühlen. Der Neogen-Kühlblockeinsatz für molekulare Detektion muss bei Verwendung bei Raumtemperatur ohne das Neogen-Kühlblockfach für molekulare Detektion direkt auf der Laborwerkbank stehen. Nach dem Abkühlen nimmt die Lyselösung wieder eine rosa Farbe an.
11. Das Gestell mit Röhrchen mit Neogen-Lyselösung aus dem Neogen-Kühlblockeinsatz für molekulare Detektion entnehmen.

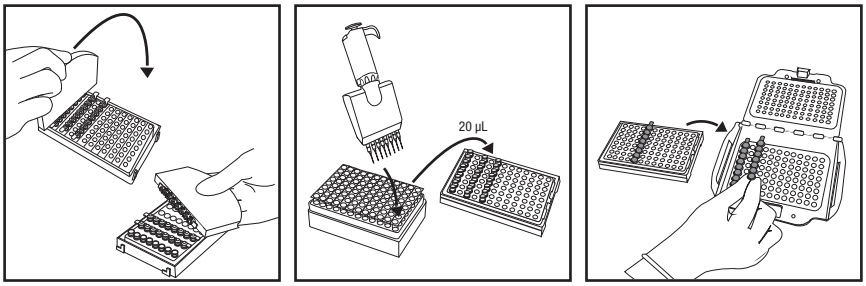


Amplifikation

1. Ein Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2-Reagenzröhrchen ist für jede Probe und die NC erforderlich.
   - 1.1 Röhrchenstreifen können auf die gewünschte Anzahl an Röhrchen zugeschnitten werden. Die erforderliche Anzahl einzelner Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2-Reagenzröhrchen oder Streifen zu 8 Röhrchen auswählen.
   - 1.2 Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2-Reagenzröhrchen in einem leeren Gestell platzieren.
   - 1.3 Die Reagenz-Pellets unten in den Röhrchen nicht in Bewegung bringen.
2. Ein Röhrchen mit Neogen-Reagenzkontrolle auswählen und im Gestell platzieren.
3. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, immer nur einen Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2-Reagenzröhrchenstreifen öffnen und für jeden Transferschritt eine neue Pipettenspitze verwenden.
4. Das Lysat wie nachstehend beschrieben in ein Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2-Reagenzröhrchen und ein Röhrchen mit Neogen-Reagenzkontrolle überführen:

> Jedes Probenlysat in ein eigenes Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2-Reagenzröhrchen überführen. **Dies erfolgt als erstes,** bevor die Überführung in die NC folgt. Das Röhrchen mit Neogen-Reagenzkontrolle **zuletzt** hydrieren.

5. Mit dem Neogen® Capper/Decapper für molekulare Detektion – Reagenz immer ein Röhrchenstreifen Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2-Reagenzröhrchenstreifen öffnen. Kappe entsorgen.
   - **5.1 20 µl Probenlysat aus der oberen Hälfte der Flüssigkeit (Ausfällungen vermeiden) im Röhrchen mit Neogen-Lyselösung in das entsprechende** Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) **Nachweis 2-Reagenzröhrchen überführen. Abgewinkelt einfüllen, um die Pellets nicht in Bewegung zu versetzen. Fünf Mal sanft Auf- und Abpipettieren, um zu mischen.**
   - 5.2 Schritt 5.1 wiederholen, bis jedes individuelle Probenlysat in ein entsprechendes Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2-Reagenzröhrchen im Streifen überführt wurde.
   - 5.3 Die Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2-Reagenzröhrchenstreifen mit den bereitgestellten zusätzlichen Kappen verschließen und durch Hin- und Herbewegen der runden Seite des Neogen-Capper/Decapper für molekulare Detektion – Reagenz Druck auf die Kappe ausüben, damit sie dicht verschließt.
   - 5.4 Schritte 5.1 bis 5.3 nach Bedarf für die Anzahl der zu testenden Proben wiederholen.
   - 5.5 Wenn alle Probenlysate überführt wurden, Schritte 5.1 bis 5.3 wiederholen, um 20 µl NC-Lysat in ein Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2- Reagenzröhrchen zu überführen.
   - 5.6 **20 µl <u>NC-Lysat</u> in ein Röhrchen mit Neogen-Reagenzkontrolle überführen.** Abgewinkelt einfüllen, um die Pellets nicht in Bewegung zu versetzen. Fünf Mal sanft Auf- und Abpipettieren, um zu mischen.
6. Verschlossene Röhrchen in ein sauberes und dekontaminiertes Neogen-Schnellladefach für molekulare Detektion einsetzen. Danach die Klappe schließen und verriegeln.



7. Den konfigurierten Durchgang in der Neogen-Software für molekulare Detektion prüfen und bestätigen.
8. In der Software auf die Schaltfläche „Start” klicken und das zu verwendende Gerät auswählen. Die Klappe des ausgewählten Geräts öffnet sich automatisch.
9. Das Neogen-Schnellladefach für molekulare Detektion in das molekulare Detektionsgerät von Neogen einsetzen und Klappe schließen, um den Nachweis zu starten. Die Ergebnisse liegen innerhalb von 60 Minuten vor, wobei positive Ergebnisse auch früher erkannt werden können.
10. Nach Abschluss des Nachweises das Neogen-Schnellladefach für molekulare Detektion aus dem molekularen Detektionsgerät von Neogen entnehmen und die Röhrchen durch einstündiges Einweichen in einer 1–5%igen (v:v in Wasser) Bleichmittellösung abseits des Nachweis-Vorbereitungsbereichs entsorgen.

HINWEIS: Um das Risiko falsch-positiver Ergebnisse aufgrund von Kreuzkontamination zu minimieren, niemals Reagenzröhrchen öffnen, die amplifizierte DNA enthalten. Das umfasst Neogen-Reagenzkontrolle, Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2-Reagenzröhrchen und Röhrchen mit Neogen-Matrixkontrolle. Versiegelte Reagenzröhrchen stets durch einstündiges Einweichen in einer 1–5%igen (v:v in Wasser) Bleichmittellösung abseits des Nachweis-Vorbereitungsbereichs entsorgen.

Ergebnisse und Interpretation

Ein Algorithmus interpretiert die Lichtausgabekurve der Detektion der Nukleinsäureamplifikation. Die Ergebnisse werden von der Software automatisch analysiert und basierend auf dem Ergebnis farblich gekennzeichnet. Ein positives oder negatives Ergebnis wird durch die Analyse einer Reihe eindeutiger Kurvenparameter bestimmt. Vermutlich positive Ergebnisse werden in Echtzeit gemeldet, während negative und zu prüfende Ergebnisse nach Abschluss des Durchgangs angezeigt werden.

Vermutlich positive Proben müssen gemäß Standardbetriebsverfahren des Labors oder durch Befolgung der geeigneten Referenzmethode[1,2,3] bestätigt werden, beginnend mit der Überführung von der primären BPW-ISO-Anreicherung in sekundäre(s) Anreicherungsbouillon(s), gefolgt von Stempeln und Bestätigung von Isolaten anhand geeigneter biochemischer und serologischer Methoden.

HINWEIS: Selbst negative Proben geben keinen Wert von Null aus, da das System und die Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2-Amplifikationsreagenzien einen RLU-„Hintergrundwert” (relative Lichteinheiten) aufweisen.

Im seltenen Fall einer ungewöhnlichen Lichtausgabe kennzeichnet der Algorithmus diese als „zu prüfen”. Neogen empfiehlt Benutzern, den Nachweis für auf diese Weise gekennzeichnete Proben zu wiederholen. Wenn das Ergebnis weiterhin „zu prüfen” lautet, erfolgt ein Bestätigungstest mit der bevorzugten Methode oder wie in den örtlichen Bestimmungen angegeben.

Im Fall abweichender Ergebnisse (vermutlich positiv mit Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2, nicht bestätigt durch eine der oben angegebenen Methoden und insbesondere für den Latex-Agglutinationstest) muss das Labor die erforderlichen Schritte unternehmen, um die Gültigkeit der erhaltenen Ergebnisse sicherzustellen.

Bestätigung der Ergebnisse gemäß NF VALIDATION zertifizierter Methode

Im Kontext der NF VALIDATION müssen alle von Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 als positiv identifizierten Proben mit einem der folgenden Tests bestätigt werden:

Option 1: Anwendung der Norm ISO 16654[3] ab Anreicherung mit gepuffertem Peptonwasser[3].

Option 2: Implementierung einer Bestätigungsmethode, die aus Folgendem besteht: 50 µl der Anreicherung in gepuffertem Peptonwasser[3] auf eine CT-SMAC-Agarplatte[3] ausstreichen. 24 ± 3 Stunden bei 37 °C inkubieren. Charakteristische Kolonien auf Nähragar ausstreichen und Latex-Agglutinationstest direkt auf isolierten Kolonien durchführen. Wenn die Ergebnisse von Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 nicht bestätigt werden, erfolgt ein Schritt zur immunomagnetischen Separation, woraufhin 50 µl auf CT-SMAC ausgestrichen werden.

Option 3: Verwendung von Nukleinsäuresonden wie in der Norm EN ISO 7218[5] beschrieben, durchgeführt auf aus CT-SMAC isolierten Kolonien (gereinigt oder nicht) (siehe Option 1 oder 2). Die Nukleinsäuresonden müssen sich von denjenigen in Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2 unterscheiden.

Option 4: Verwendung einer beliebigen anderen NF VALIDATION zertifizierten Methode mit anderem Prinzip als Neogen Molekulare Detektion – *E. coli* O157 (einschl. H7) Nachweis 2. Es muss das vollständige Protokoll verwendet werden, das für diese zweite validierte Methode beschrieben wurde. Alle Schritte vor dem Beginn der Bestätigung müssen für beide Methoden gleich sein.

Im Fall abweichender Ergebnisse (vermutlich positiv mit der alternativen Methode, nicht bestätigt durch eine der oben angegebenen Methoden) muss das Labor die erforderlichen Schritte unternehmen, um die Gültigkeit des erhaltenen Ergebnisses sicherzustellen.

Wenn Sie Fragen zu bestimmten Anwendungen oder Verfahren haben, besuchen Sie bitte unsere Website unter www.neogen.com oder wenden Sie sich an Ihren lokalen Neogen-Verkaufsvertreter oder Händler.

Anhang A. Protokollunterbrechung: Lagerung und erneuter Test von Proben

1. Um wärmebehandeltes Lysat zu lagern, das Lyseröhrchen mit einem sauberen Kappe verschließen (siehe Abschnitt 4.5 **Lyse**)
2. Um eine angereicherte Probe zu lagern, vor Lagerung mindestens 18 Stunden inkubieren.
3. Bis zu 72 Stunden lang bei 4 bis 8 °C lagern.
4. Durch Mischen mittels 2–3-maligem Invertieren eine gelagerte Probe für die Amplifikation vorbereiten.
5. Röhrchen öffnen.

6. Die gemischten Röhrchen mit Lysat im Neogen-Heizblockeinsatz für molekulare Detektion platzieren und 5 ± 1 Minuten lang bei 100 ± 1 °C aufheizen.
7. Das Gestell mit Röhrchen mit Neogen-Lyselösung aus dem Heizblock nehmen und mindestens 5 Minuten und maximal 10 Minuten lang im Neogen-Kühlblockeinsatz für molekulare Detektion abkühlen.
8. Das Protokoll im obigen Abschnitt **Amplifikation** fortsetzen.

Literatur:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Kapitel 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli.* November 2015.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 5.09. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. Datum des Inkrafttretens: 15. Januar 2015.
3. ISO 16654:2001 Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren für den Nachweis von *Escherichia coli* O157.
4. ISO/IEC 17025 Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien.
5. ISO 7218 Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen.
6. ISO 6887 Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen.
7. Installationsqualifikation(IQ)/Betriebsqualifikation (BQ) Neogen® Molekulares Detektionssystem. Neogen Food Safety.

Erklärung der Symbole

info.neogen.com/symbols

AOAC ist eine eingetragene Marke von AOAC INTERNATIONAL

Official Methods ist eine eingetragene Dienstleistungsmarke von AOAC INTERNATIONAL

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

NEOGEN

Istruzioni del prodotto

Test di rilevamento molecolare di seconda generazione - *E. coli* O157 (compreso H7)

Descrizione del prodotto e destinazione d'uso

Il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen® - *E. coli* O157 (compreso H7) è utilizzato con il Sistema di rilevazione molecolare Neogen® per il rilevamento rapido e specifico di *E. coli* O157 (compreso H7) in campioni alimentari e di alimenti arricchiti.

I Test di rilevamento molecolare Neogen utilizzano l'amplificazione isotermica mediata sul ciclo per amplificare rapidamente le sequenze di acido nucleico con elevata specificità e sensibilità, combinata con la bioluminescenza per rilevare l'amplificazione. I risultati presunti positivi vengono riportati in tempo reale, mentre i risultati negativi vengono visualizzati al termine del test. I risultati presunti positivi devono essere confermati utilizzando il proprio metodo preferito o come specificato dalle normative locali [1, 2, 3].

Il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) è destinato all'uso in un ambiente di laboratorio da parte di tecnici adeguatamente formati nelle tecniche di laboratorio. Neogen non ha documentato l'uso di questo prodotto in settori diversi da quelli alimentare e delle bevande. Ad esempio, Neogen non ha documentato questo prodotto per testare campioni ambientali, farmaceutici, cosmetici, clinici o veterinari. Il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) non è stato valutato con tutti i possibili prodotti alimentari, processi alimentari, protocolli di analisi o con tutti i possibili ceppi di batteri.

Come con tutti i metodi di analisi, la fonte, la formulazione e la qualità del mezzo di arricchimento possono influenzare i risultati. Anche fattori come i metodi di campionamento, i protocolli di analisi, la preparazione del campione, la manipolazione e la tecnica di laboratorio possono influenzare i risultati. Neogen raccomanda la valutazione del metodo, ivi incluso il mezzo di arricchimento, nell'ambiente dell'utente, utilizzando un numero sufficiente di campioni con alimenti particolari e test microbici per garantire che il metodo di analisi scelto soddisfi i criteri richiesti dall'utente.

Neogen ha valutato il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) con acqua peptonata tamponata ISO.

Lo strumento di rilevamento molecolare Neogen® è destinato all'utilizzo con campioni che sono stati sottoposti a trattamento termico durante la fase di lisi del test, progettata per distruggere gli organismi presenti nel campione. I campioni che non sono stati adeguatamente trattati termicamente durante la fase di lisi del test possono essere considerati un potenziale rischio biologico e NON devono essere inseriti nello strumento di rilevamento molecolare Neogen.

La sicurezza alimentare Neogen è certificata dall'ISO (International Organization for Standardization) 9001 per la progettazione e la produzione.

Il kit di prova del Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) contiene 96 test, descritti in Tabella 1.

Tabella 1. Componenti del kit Test di rilevamento molecolare Neogen

Elemento	Identificazione	Quantità	Indice	Commenti
Soluzione di lisi (LS) Neogen®	Soluzione rosa in provette trasparenti	96 (12 strisce di 8 provette)	580 µl di soluzione di lisi Neogen per provetta	Travasata e pronta all'uso
Provette di reagente per il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen® - *E. coli* O157 (compreso H7)	Provette rosa	96 (12 strisce di 8 provette)	Miscela specifica di amplificazione e rilevamento liofilizzata	Pronta all'uso
Cappucci extra	Cappucci rosa	96 (12 strisce di 8 cappucci)		Pronta all'uso
Controllo reagente (RC) Neogen®	Provette con tappo a ribalta trasparenti	16 (2 buste di 8 provette singole)	Miscela di amplificazione e rilevamento di controllo DNA liofilizzata	Pronta all'uso

Il Controllo negativo, non fornito nel kit, è un mezzo di arricchimento sterile, ad es. BPW ISO. Non utilizzare l'acqua come controllo negativo.

Sicurezza

L'utente deve leggere, comprendere e rispettare tutte le informazioni sulla sicurezza contenute nelle istruzioni per l'uso del Sistema di rilevamento molecolare Neogen e nel Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7). Conservare queste istruzioni sulla sicurezza per riferimento futuro.

⚠ **AVVERTENZA:** indica una situazione pericolosa che, se non evitata, potrebbe causare morte o lesioni gravi e/o danni materiali.

AVVISO: indica una situazione potenzialmente pericolosa che, se non evitata, potrebbe causare danni materiali.

⚠ AVVERTENZA

Non utilizzare il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) per la diagnosi delle condizioni su persone o animali.

L'utente deve istruire il suo personale in tecniche di analisi corrette e aggiornate: ad esempio, Buone pratiche di laboratorio, ISO/IEC 17025[4], o ISO 7218[5].

Per ridurre i rischi associati a un risultato falso negativo che porta al rilascio di prodotto contaminato:

- Seguire il protocollo ed eseguire i test esattamente come stabilito dalle istruzioni del prodotto.
- Utilizzare un terreno preriscaldato a 41,5 ± 1 °C. Non lasciare che il terreno scenda al di sotto dell'intervallo di temperatura di incubazione durante la preparazione del campione.
- Conservare il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) come indicato sulla confezione e nelle istruzioni del prodotto.
- Utilizzare sempre il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) entro la data di scadenza.
- Utilizzare il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) con campioni di cibo, alimenti e processi alimentari che siano stati convalidati internamente o da terze parti.
- Utilizzare il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) solo con superfici, disinfettanti, protocolli e ceppi batterici che siano stati convalidati internamente o da terze parti.
- Per un campione ambientale contenente tampone neutralizzante (NB) con complesso arilsolfonato, eseguire una diluizione 1:2 prima del test (1 parte di campione in 1 parte di brodo di arricchimento sterile). Un'altra opzione è quella di trasferire 10 µl dell'arricchimento del tampone neutralizzante nelle provette della soluzione di lisi Neogen. Prodotti di trattamento dei campioni Neogen® che includono il tampone neutralizzante Neogen® con complesso arilsolfonato: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XSLSSL10NB, HS10NB e HS119510NB.

Per ridurre i rischi associati all'esposizione a sostanze chimiche e rischi biologici:

- Eseguire test sugli agenti patogeni in un laboratorio adeguatamente attrezzato sotto il controllo di personale qualificato. I mezzi di arricchimento incubati e le attrezzature o le superfici che sono venute a contatto con i mezzi di arricchimento incubati possono contenere agenti patogeni a livelli sufficienti a causare rischi per la salute umana.
- Seguire sempre le pratiche di sicurezza standard di laboratorio, incluso indossare indumenti protettivi e protezioni per gli occhi adeguati durante l'utilizzo di reagenti e campioni contaminati.
- Evitare il contatto con il contenuto dei mezzi di arricchimento e delle provette dei reagenti dopo l'amplificazione.
- Smaltire i campioni arricchiti e i relativi rifiuti contaminati nel rispetto delle norme locali/regionali/nazionali/di settore in vigore.
- Non superare la temperatura raccomandata sul riscaldatore.
- Non superare il tempo di riscaldamento consigliato.
- Utilizzare un termometro calibrato appropriato per verificare la temperatura dell'Inserto per blocco di raffreddamento di rilevamento molecolare Neogen® (ad es., un termometro a immersione parziale o un termometro a termocoppia digitale, non un termometro a immersione totale). Il termometro deve essere inserito nel punto indicato sull'inserto per blocco di raffreddamento per rilevamento molecolare Neogen.

Per ridurre i rischi associati alla contaminazione incrociata durante la preparazione del test:

- Indossare sempre guanti (per proteggere l'utente e prevenire l'introduzione di nucleasi).

Per ridurre i rischi associati all'esposizione a liquidi molto caldi:

- Non superare la temperatura raccomandata sul riscaldatore.
- Non superare il tempo di riscaldamento consigliato.
- Utilizzare un termometro calibrato appropriato per verificare la temperatura dell'Inserto per blocco di raffreddamento di rilevamento molecolare Neogen® (ad es., un termometro a immersione parziale o un termometro a termocoppia digitale, non un termometro a immersione totale). Il termometro deve essere inserito nel punto indicato sull'inserto per blocco di raffreddamento per rilevamento molecolare Neogen.

AVVISO

Per ridurre i rischi associati alla contaminazione incrociata durante la preparazione del test:

- Si consiglia l'uso di una barriera aerosol sterile (filtrata) e di puntali per pipette per uso biologico molecolare.
- Utilizzare un puntale per pipetta nuovo per ogni trasferimento di campione.
- Utilizzare le Buone pratiche di laboratorio per trasferire il campione dal mezzo di arricchimento alla provetta di lisi. Per evitare la contaminazione del pipettatore, l'utente può scegliere di aggiungere una fase di trasferimento intermedia. Ad esempio, l'utente può trasferire ogni campione arricchito in una provetta sterile.
- Utilizzare una stazione di lavoro per biologia molecolare contenente una lampada germicida, se disponibile.

Per ridurre i rischi associati a risultati falsi positivi:

- Non aprire mai le provette dopo l'amplificazione.
- Smaltire sempre le provette contaminate immergendole in una soluzione di candeggina per uso domestico all'1-5% (v:v in acqua) per 1 ora e lontano dall'area di preparazione del test.

Consultare la Scheda dati di sicurezza per ulteriori informazioni e le norme in materia di smaltimento in vigore localmente.

In caso di domande su applicazioni o procedure specifiche, visitare il nostro sito Web all'indirizzo www.neogen.com oppure contattare il rappresentante o il distributore locale Neogen.

Responsabilità dell'utente

Gli utenti sono tenuti a familiarizzare con le istruzioni e le informazioni sul prodotto. Per maggiori informazioni, visitare il nostro sito Web all'indirizzo **www.neogen.com** o contattare il rappresentante o il distributore Neogen locale.

Quando si seleziona un metodo di prova, è importante riconoscere che fattori esterni come metodi di campionamento, protocolli di prova, preparazione dei campioni, manipolazione e tecniche di laboratorio possono influenzare i risultati.

È responsabilità dell'utente, nel selezionare qualsiasi metodo di test o prodotto, valutare un numero sufficiente di campioni con le matrici e i test microbici appropriati per convincere lo stesso che il metodo di test scelto soddisfi i criteri richiesti.

È inoltre responsabilità dell'utente determinare che tutti i metodi di prova e i risultati soddisfino i requisiti dei propri clienti e fornitori.

Come con qualsiasi metodo di test, i risultati ottenuti dall'uso di qualsiasi prodotto per la sicurezza alimentare Neogen non costituiscono una garanzia della qualità delle matrici o dei processi testati.

Per aiutare i consumatori a valutare il metodo per diverse matrici alimentari, Neogen ha sviluppato il kit Controllo matrice di rilevamento molecolare Neogen®. Quando necessario, utilizzare il Controllo matrice (MC) per stabilire se la matrice ha la capacità di influire sui risultati del Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7). Testare diversi campioni, rappresentativi della matrice, vale a dire campioni ottenuti da origine differente, durante ogni periodo di validazione quando si adotta il metodo Neogen o quando si testano matrici nuove o sconosciute o matrici che abbiano subito modifiche di materie prime o di processo.

Una matrice può essere definita come un tipo di prodotto con proprietà intrinseche come composizione e processo. Le differenze tra le matrici possono essere semplici come gli effetti causati da differenze nel trattamento o nella presentazione come, ad esempio, grezzo rispetto a pastorizzato, fresco rispetto a essiccato, ecc.

Limitazione delle garanzie / Rimedio limitato

ECCETTO QUANTO ESPRESSAMENTE STABILITO NELLA SEZIONE GARANZIA LIMITATA DELLA CONFEZIONE DI UN SINGOLO PRODOTTO, NEOGEN DECLINA TUTTE LE GARANZIE ESPRESSE E IMPLICITE, INCLUSE MA NON LIMITATE A, OGNI GARANZIA DI COMMERCIABILITÀ O IDONEITÀ PER UN USO PARTICOLARE. Se un prodotto per la sicurezza alimentare Neogen è difettoso, Neogen o il suo distributore autorizzato, a sua discrezione, sostituirà o rimborserà il prezzo di acquisto del prodotto. Questi sono i rimedi esclusivi per l'utente. L'utente è tenuto a notificare tempestivamente a Neogen entro sessanta giorni dalla scoperta di eventuali difetti sospetti di un prodotto e a restituirlo a Neogen. Per ulteriori domande, contattare il rappresentante Neogen o il distributore autorizzato Neogen.

Limitazione di responsabilità Neogen

NEOGEN NON È RESPONSABILE PER PERDITE O DANNI, DIRETTI, INDIRETTI, PARTICOLARI, INCIDENTALI O CONSEQUENZIALI, INCLUSA MA NON LIMITATA A, LA PERDITA DI PROFITTI. In nessun caso la responsabilità di Neogen ai sensi di qualsiasi teoria legale supererà il prezzo di acquisto del prodotto presunto difettoso.

Stoccaggio e smaltimento

Conservare il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) a 2-8 °C. Non congelare. Tenere il kit al riparo dalla luce durante lo stoccaggio. Dopo aver aperto il kit, verificare che la busta di alluminio non sia danneggiata. Se la busta è danneggiata, non utilizzare il prodotto. Dopo l'apertura, le provette dei reagenti non utilizzate devono essere sempre conservate nella busta richiudibile con l'essiccante all'interno per mantenere la stabilità dei reagenti liofilizzati. Conservare le buste risigillate a 2-8 °C per non più di 60 giorni.

Non utilizzare il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) dopo la data di scadenza. La data di scadenza e il numero di lotto sono riportati sull'etichetta esterna della scatola. Dopo l'uso, le provette del mezzo di arricchimento e del Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) possono potenzialmente contenere materiali patogeni. Al termine del test, seguire gli attuali standard del settore per lo smaltimento dei rifiuti contaminati. Consultare la Scheda dati di sicurezza per ulteriori informazioni e le norme in materia di smaltimento in vigore localmente.

Istruzioni per l'uso

Seguire attentamente tutte le istruzioni. In caso contrario, potrebbero ottenersi risultati imprecisi.

L'utente deve completare il corso di qualifica come operatore del Sistema di rilevamento molecolare Neogen, come descritto nel documento “Protocolli di Qualifica dell'installazione (IQ)/Qualifica operativa (OQ) e Istruzioni per il Sistema di rilevamento molecolare Neogen”[7].

Decontaminare periodicamente i banchi di laboratorio e le attrezzature (pipette, tappi/strumenti per stappare, ecc.) con una soluzione di candeggina per uso domestico all'1-5% (v:v in acqua) o una soluzione per la rimozione del DNA.

Per i requisiti specifici, consultare la sezione “Istruzioni specifiche per i metodi di validazione”:

Tabella 3 per i protocolli di arricchimento secondo AOAC® *Metodo ufficiale di analisi*℠ 2017.01

Tabella 4 per i protocolli di arricchimento secondo certificato di validazione NF 3M 01/18-05/17

Arricchimento del campione

Le Tabelle 2, 3 e 4 contengono indicazioni per i protocolli di arricchimento per alimenti. L'utente ha la responsabilità di validare protocolli di arricchimento o rapporti di diluizione alternativi al fine di garantire che questo metodo di test soddisfi i criteri dell'utente.

Alimenti

1. Preriscaldare il mezzo di arricchimento BPW ISO a 41,5 ± 1 °C.
2. Combinare asetticamente il mezzo di arricchimento e il campione secondo le Tabelle 2, 3 o 4. Per tutti i campioni di carne e di particolato elevato, si consiglia l'uso di sacchetti filtranti.
3. Omogeneizzare accuratamente tutte le matrici, ad eccezione dei prodotti a foglia e della frutta, frullando, sciogliendo o mescolando a mano per 2 ± 0,2 minuti. Incubare a 41,5 ± 1 °C per il tempo appropriato secondo le Tabelle 2, 3 o 4.

Tabella 2. Protocolli di arricchimento generali

Matrice campione[a]	Dimensioni del campione	Volume brodo di arricchimento (ml)	Temperatura di arricchimento (±1 °C)	Tempo di arricchimento (ore)
Carne cruda macinata/tritata e a pezzi	325 g	975 BPW ISO (pre-riscaldato)	41,5	10-18
Carni crude di manzo, maiale, pollame, agnello e bisonte	25 g	225 BPW ISO (pre-riscaldato)	41,5	8-18
Prodotti a foglia[b]	200 g	450 BPW ISO (pre-riscaldato)	41,5	18-24
Altri alimenti tra cui frutta[b], verdure, succhi di frutta/vegetali, erbe fresche, frutti di mare crudi, uova crude, latte crudo, impasto per biscotti e carni lavorate	25 g	225 BPW ISO (pre-riscaldato)	41,5	18-24
Noci o mix di frutta secca contenente noci (questo protocollo è appropriato per altra frutta secca tra cui noci pecan, mandorle, pistacchi, anacardi e castagne)	25 g	225 ricostituito con latte liofilizzato scremato	41,5	18-24

(a) I campioni congelati devono essere equilibrati a 4-8 °C prima dell'aggiunta al brodo di arricchimento.

(b) I campioni di prodotti a foglia e di frutta devono essere delicatamente agitati a mano per 5 minuti. Non mescolare o sciogliere.

Istruzioni specifiche per i metodi convalidati

AOAC® *Metodi di analisi ufficiali*℠ 2017.01

Nel programma AOAC *Metodo di analisi ufficiale*℠, il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) si è rilevato un metodo efficace per il rilevamento di *E. coli* O157:H7. Le matrici testate nello studio sono mostrate in Tabella 3.

Tabella 3. Protocolli di arricchimento con l'uso di BPW ISO pre-riscaldato a 41,5 ± 1 °C secondo AOAC® *Metodi ufficiali*℠ 2017.01

Matrice campione	Dimensioni del campione	Volume brodo di arricchimento (ml)	Tempo di arricchimento (ore)	Omogeneizzato
Carne cruda di manzo (73% magra)	325 g	975	10-18	Manualmente a mano o scioglimento
Spinaci crudi imbustati[a]	200 g	450	18-24	Agitare delicatamente per 5 minuti, non omogeneizzare
Germogli freschi	25 g	225	18-24	Agitare delicatamente per 5 minuti, non omogeneizzare
Mirtilli congelati[a][b]	25 g	225	18-24	Agitare delicatamente per 5 minuti, non omogeneizzare

(a) I campioni di prodotti a foglia e di frutta devono essere delicatamente agitati a mano per 5 minuti. Non mescolare o sciogliere.

(b) I campioni congelati devono essere equilibrati a 4-8 °C prima dell'aggiunta al brodo di arricchimento.

Validazione NF secondo certificazione AFNOR

3M 01/18-05/17

METODI DI ANALISI ALTERNATIVI PER AGROALIMENTARE

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

Per ulteriori informazioni sulla fine della validità, fare riferimento al certificato NF VALIDATION disponibile sul sito Web sopra menzionato.

Metodo certificato NF VALIDATION in conformità con ISO 16140-2[8] in confronto a ISO 16654[3]

Ambito della convalida: carne di manzo cruda, prodotti caseari crudi, frutta e verdura crude

Preparazione del campione: i campioni devono essere preparati secondo EN ISO 16654 ed EN ISO 6887[6]

Versione software: vedere il certificato

Tabella 4. Protocolli di arricchimento con l'uso di BPW ISO pre-riscaldato a 41,5 ± 1 °C secondo metodo certificato NF VALIDATION 3M 01/18-05/17

Protocollo	Dimensioni del campione	Volume brodo di arricchimento (ml)	Temperatura di arricchimento (±1 °C)	Tempo di arricchimento (ore)
Carne di manzo cruda, prodotti caseari crudi, frutta e verdure crude	25 g	225	41,5	18-24
Carne di manzo cruda	25 g	225	41,5	8-24

NOTE:

- Campioni di dimensioni superiori a 25 g non devono essere testati nel corso dello studio NF VALIDATION.
- I punti di interruzione del protocollo raccomandati sono dopo l'arricchimento o dopo la lisi del campione. Il brodo di arricchimento o il lisato campione possono essere conservati a 2-8 °C per un massimo di 72 ore. Dopo la rimozione del brodo di arricchimento dallo stoccaggio, riprendere il test dalla Fase 1 della sezione **Lisi**. Dopo la rimozione del lisato campione dallo stoccaggio, riprendere il test dalla Fase 7 della sezione **Lisi**. Il lisato può essere conservato anche a -20 °C.
- I protocolli di arricchimento brevi sono sensibili alle condizioni di incubazione e devono essere rispettate le temperature specificate nel protocollo. La temperatura del bagnomaria o dell'incubatrice in cui vengono preriscaldati i brodi deve essere verificata per garantire che il brodo di arricchimento raggiunga la temperatura richiesta. Il tempo totale per la preparazione del campione, compreso il ritardo tra la fine della fase di preriscaldamento del mezzo e l'inizio dell'incubazione del campione alimentare, non deve superare i 45 minuti. Per l'incubazione, si consiglia l'uso di un'incubatrice ventilata.

Preparazione del vassoio per caricamento rapido per rilevamento molecolare Neogen®

1. Inumidire un panno o una salvietta monouso con una soluzione di candeggina domestica all'1-5% (v:v in acqua) e passarlo sul vassoio per caricamento rapido per rilevamento molecolare Neogen.
2. Sciacquare il vassoio per caricamento rapido per rilevamento molecolare Neogen con acqua.
3. Utilizzare una salvietta monouso per asciugare il vassoio per caricamento rapido per rilevamento molecolare Neogen.
4. Verificare che il vassoio per caricamento rapido per rilevamento molecolare Neogen sia asciutto, prima dell'uso.

Preparazione dell'inserto per blocco di raffreddamento per rilevamento molecolare Neogen®

Sistemare l'inserto per blocco di raffreddamento per rilevamento molecolare Neogen direttamente sul banco da laboratorio: il vassoio per blocco di raffreddamento per rilevamento molecolare Neogen non viene utilizzato. Utilizzare il blocco a temperatura ambiente di laboratorio (20-25 °C).

Preparazione dell'inserto per blocco di riscaldamento per rilevamento molecolare Neogen®

Sistemare l'inserto per blocco di riscaldamento per rilevamento molecolare Neogen in un'unità riscaldatore a doppio blocco a secco. Accendere l'unità di riscaldamento a secco e impostare la temperatura per consentire all'inserto a blocco di riscaldamento per rilevamento molecolare Neogen di raggiungere e mantenere una temperatura di 100 ± 1 °C.

NOTA: a seconda dell'unità di riscaldamento, attendere circa 30 minuti affinché l'inserto del blocco di riscaldamento per rilevamento molecolare Neogen raggiunga la temperatura. Utilizzando un termometro calibrato appropriato (ad es., un termometro a immersione parziale o un termometro a termocoppia digitale, non un termometro a immersione totale) sistemato nel punto prestabilito, verificare che l'inserto per blocco di riscaldamento per rilevamento molecolare Neogen sia a 100 ± 1 °C.

Preparazione dello strumento di rilevamento molecolare Neogen®

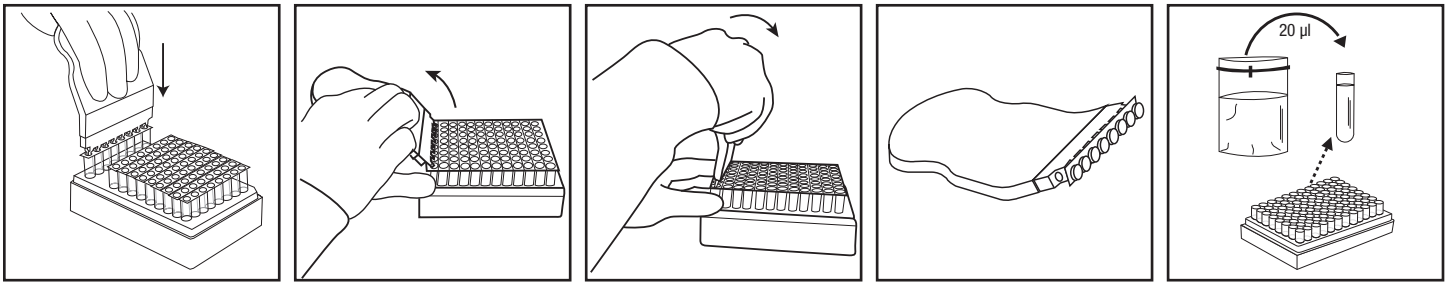
1. Lanciare il software di rilevamento molecolare Neogen® ed eseguire l'accesso. Contattare il rappresentante locale Sicurezza alimentare Neogen per assicurarsi di disporre della versione software più aggiornata.
2. Accendere lo strumento di rilevamento molecolare Neogen.
3. Creare o modificare una sessione con i dati per ogni campione. Per i particolari, fare riferimento al Manuale dell'utente del sistema di rilevamento molecolare Neogen®.

NOTA: lo strumento di rilevamento molecolare Neogen deve raggiungere e mantenere una temperatura di 60 °C prima di inserire il vassoio di caricamento rapido per rilevamento molecolare Neogen con le provette di reazione. Questa fase di riscaldamento richiede circa 20 minuti ed è indicata da una luce ARANCIONE sulla barra di stato dello strumento. Quando lo strumento è pronto per iniziare una sessione, la barra di stato diventa VERDE.

Lisi

1. Lasciare riscaldare le provette di soluzione per lisi Neogen impostando il rack a temperatura ambiente (20-25 °C) durante la notte (16-18 ore). Alternative per equilibrare le provette di soluzione per lisi Neogen a temperatura ambiente consistono nel lasciare le provette con la soluzione per lisi Neogen sul banco del laboratorio per almeno 2 ore, incubare le provette con la soluzione per lisi Neogen in un'incubatrice a 37 ± 1 °C per 1 ora o sistemarle in un riscaldatore a doppio blocco a secco per 30 secondi a 100 °C.
2. Capovolgere le provette tappate per mescolare. Procedere alla fase successiva entro 4 ore.
3. Rimuovere il brodo di arricchimento dall'incubatrice.
4. Per ogni campione è richiesta una provetta di soluzione per lisi Neogen il campione per controllo negativo (NC) (mezzo di arricchimento sterile).
   - 4.1 Le strisce di provette della soluzione di lisi Neogen possono essere tagliate in base al numero di provette della soluzione di lisi Neogen desiderato. Selezionare il numero di singole provette di soluzione per lisi Neogen o di strisce da 8 provette necessarie. Sistemare le provette di soluzione di lisi Neogen in un rack vuoto.
   - 4.2 Per evitare la contaminazione incrociata, stappare una striscia di provette di soluzione di lisi Neogen alla volta e utilizzare un nuovo puntale per pipetta per ogni fase di trasferimento.
   - 4.3 Trasferire il campione arricchito nelle provette di soluzione di lisi Neogen come descritto sotto:

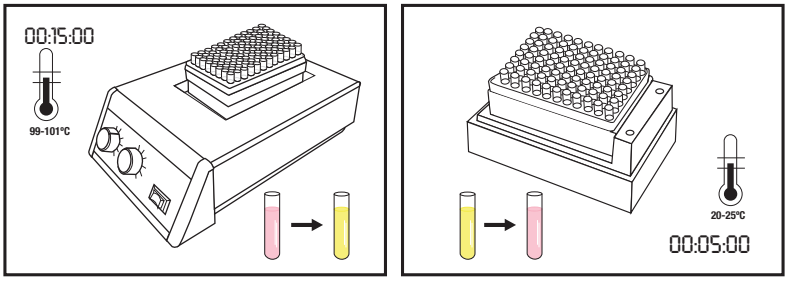
     Trasferire **prima** ogni campione arricchito in una singola provetta di soluzione di lisi Neogen. Trasferire l'NC **per ultimo.**
   - 4.4 Utilizzare lo strumento per tappare/stappare le provette per rilevamento molecolare Neogen® - Lisi per stappare una striscia di provette di soluzione di lisi Neogen, una striscia alla volta.
   - 4.5 Scartare il tappo della provetta di soluzione di lisi Neogen. Se il lisato verrà trattenuto per ripetere il test, posizionare i tappi in un contenitore pulito per la riapplicazione dopo la lisi.
     - 4.5.1 Per il trattamento del lisato trattenuto, vedere l'Appendice A.
   - 4.6 Trasferire 20 µl di campione in una provetta con soluzione di lisi Neogen, se non diversamente indicato nel Protocollo, Tabelle 2, 3 e 4.



5. Ripetere la fase 4.3 fino a quando ogni singolo campione non è stato aggiunto a una provetta corrispondente della soluzione di lisi Neogen nella striscia.
6. Ripetere le fasi da 4.1 a 4.6 secondo necessità, per il numero di campioni da testare.
7. Quando tutti i campioni sono stati trasferiti, trasferire 20 µl di NC (mezzo di arricchimento sterile, ad es. BPW ISO) in una provetta per soluzione di lisi Neogen. Non utilizzare acqua come NC.
8. Verificare che la temperatura dell'inserto per blocco di riscaldamento per rilevamento molecolare Neogen sia di 100 ± 1 °C.
9. Sistemare il rack scoperto delle provette di soluzione di lisi Neogen nell'inserto Neogen per blocco di riscaldamento per rilevamento molecolare Neogen e riscaldare per 15 ± 1 minuti. Durante il riscaldamento, la soluzione di lisi Neogen virerà dal rosa (fredda) al giallo (calda).

   I campioni che non sono stati adeguatamente trattati termicamente durante la fase di lisi del test possono essere considerati un potenziale rischio biologico e NON devono essere inseriti nello strumento di rilevamento molecolare Neogen.

10. Rimuovere il rack scoperto di provette di soluzione di lisi Neogen dal blocco riscaldante e lasciarlo raffreddare nell'inserto per blocco di raffreddamento per rilevamento molecolare Neogen per almeno 5 minuti e un massimo di 10 minuti. L'inserto per blocco di raffreddamento molecolare Neogen, utilizzato a temperatura ambiente senza il vassoio per blocco di raffreddamento per rilevamento molecolare Neogen, deve essere posizionato direttamente sul banco del laboratorio. Una volta raffreddata, la soluzione di lisi tornerà a un colore rosa.
11. Rimuovere il rack delle provette della soluzione di lisi Neogen dall'inserto del blocco di raffreddamento per rilevamento molecolare Neogen.

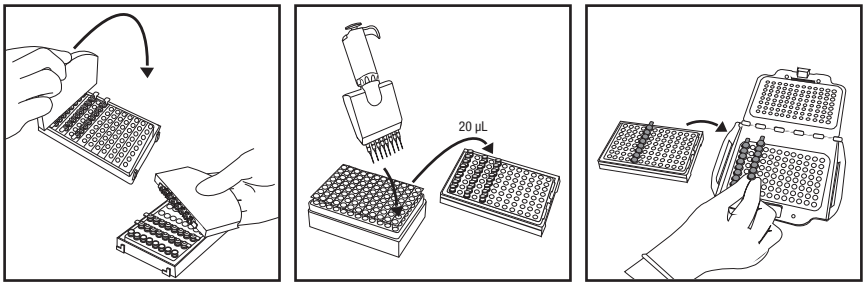


Amplificazione

1. Per ogni campione e per NC è richiesta una provetta di reagente per il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7).
   - 1.1 Le strisce di provette possono essere tagliate in base al numero di provette desiderato. Selezionare il numero di singole provette di reagente per il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) o le strisce da 8 provette necessarie.
   - 1.2 Sistemare le provette di reagente per il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) in un rack vuoto.
   - 1.3 Evitare di smuovere le pastiglie di reagente dal fondo delle provette.
2. Selezionare una provetta di controllo reagente Neogen e sistemarla nel rack.
3. Per evitare la contaminazione incrociata, stappare una striscia di provette di reagente per il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) alla volta e utilizzare un nuovo puntale per pipetta per ogni fase di trasferimento.
4. Trasferire il lisato in un provetta di reagente per il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) e in una provetta di controllo reagente Neogen come descritto sotto:

Trasferire ogni campione di lisato **prima** in ogni singola provetta di reagente per il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) e poi nell'NC. Idratare **infine** la provetta di controllo reagente Neogen**.**

5. Utilizzare lo strumento per tappare/stappare le provette per rilevamento molecolare Neogen® - Reagente per stappare la provetta di reagente per il test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7), una striscia di provette alla volta. Gettare via il tappo.
   - **5.1 Trasferire 20 µl di lisato campione dalla ½ superiore del liquido (evitare il precipitato) nella provetta con la soluzione di lisi Neogen nella corrispondente provetta di reagente del** test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7)**. Erogare ad angolo per evitare di disturbare le pastiglie. Mescolare delicatamente pipettando in su e in giù per 5 volte.**
   - 5.2 Ripetere la fase 5.1 fino a quando ogni singolo campione di lisato è stato aggiunto a una corrispondente provetta di reagente del Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) della striscia.
   - 5.3 Chiudere le provette di reagente del Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen 2 - *E. coli* O157 (compreso H7) con i tappi supplementari in dotazione e utilizzare il lato arrotondato dello strumento per tappare/stappare le provette per rilevamento molecolare Neogen - Reagente per applicare pressione in un movimento avanti e indietro per assicurarsi che il tappo sia saldamente inserito.
   - 5.4 Ripetere le fasi da 5.1 a 5.3 secondo necessità, per il numero di campioni da testare.
   - 5.5 Dopo che tutti i campioni di lisato sono stati trasferiti, ripetere le fasi da 5.1 a 5.3 per trasferire 20 µl di lisato NC in una provetta di reagente per il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7).
   - 5.6 Trasferire **20 µl di lisato NC in una provetta di controllo reagente Neogen.** Erogare ad angolo per evitare di disturbare le pastiglie. Mescolare delicatamente pipettando in su e in giù per 5 volte.
6. Caricare le provette tappate in un vassoio di caricamento rapido per rilevamento molecolare Neogen pulito e decontaminato. Quindi, chiudere e bloccare lo sportello.



7. Riesaminare e confermare il test configurato nel software del sistema di rilevamento molecolare Neogen.
8. Cliccare sul pulsante Start nel software e selezionare lo strumento da utilizzare. Il coperchio dello strumento selezionato si apre automaticamente.
9. Posizionare il vassoio di caricamento rapido per rilevamento molecolare Neogen nello strumento di rilevamento molecolare Neogen e chiudere il coperchio per avviare il test. I risultati vengono forniti entro 60 minuti, sebbene i positivi possano essere rilevati prima.
10. Al termine del test, rimuovere il vassoio di caricamento rapido per rilevamento molecolare Neogen dallo strumento di rilevamento molecolare Neogen e smaltire le provette immergendole in una soluzione di candeggina per uso domestico all'1-5% (v:v in acqua) per 1 ora e lontano dall'area di preparazione del test.

AVVISO: per ridurre al minimo il rischio di falsi positivi dovuti alla contaminazione incrociata, non aprire mai provette di reagenti contenenti DNA amplificato. Questo comprende la provetta di controllo reagente Neogen, la provetta di reagente del Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) e le provette di controllo matrice Neogen. Smaltire sempre le provette di reagente sigillate immergendole in una soluzione di candeggina per uso domestico all'1-5% (v:v in acqua) per 1 ora e lontano dall'area di preparazione del test.

Risultati e interpretazione

Un algoritmo interpreta la curva di luce risultante dal rilevamento dell'amplificazione dell'acido nucleico. I risultati vengono analizzati automaticamente dal software e sono codificati a colori in base al risultato. Il risultato positivo o negativo viene determinato dall'analisi di una serie di parametri univoci della curva. I risultati presunti positivi vengono riportati in tempo reale, mentre i risultati negativi e da verificare vengono visualizzati al termine del test.

I campioni presunti positivi devono essere confermati secondo le procedure operative standard di laboratorio o in base all'appropriato metodo di conferma di riferimento[1,2,3], iniziando con il trasferimento dal brodo di arricchimento BPW ISO primario a quello secondario, seguito dalla strisciatura e successiva conferma degli isolati con l'ausilio degli appropriati metodi biochimici e sierologici.

NOTA: anche un campione negativo non darà un rilevamento nullo poiché il sistema e i reagenti di amplificazione del Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) hanno un una unità di luce relativa (RLU) di “fondo”.

Nei rari casi di luce insolita, l'algoritmo provvederà a etichettarla come “Da verificare.” Neogen consiglia all'utente di ripetere il test su ogni campione etichettato come “Da verificare”. Se il risultato continua a essere “Da verificare”, passare al test di conferma utilizzando il proprio metodo preferito o come specificato dalle normative locali.

In caso di risultati discordanti presunti positivi con il Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7), non confermati da uno dei metodi sopra descritti e, in particolare, per il test di agglutinazione del lattice, il laboratorio deve compiere i passi necessari per garantire la validità dei risultati ottenuti.

Conferma dei risultati secondo il metodo certificato NF VALIDATION

Nell'ambito della NF VALIDATION, tutti i campioni identificati come positivi dal Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) devono essere confermati da uno dei test seguenti:

Opzione 1: utilizzando lo standard ISO 16654[3] iniziando dall'arricchimento con acqua peptonata tamponata[3].

Opzione 2: implementazione di un metodo di conferma costituito da quanto segue: strisciare 50 µl di arricchimento con acqua peptonata tamponata[3] su una piastra agar Cefixime Potassium Tellurite Sorbitol MacConkey (CT-SMAC)[3]. Incubare per 24 ± 3 ore a 37 °C. Strisciare le colonie caratteristiche sull'agar nutriente ed eseguire il test di agglutinazione del lattice direttamente sulle colonie isolate. Se i risultati del Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7) non vengono confermati, eseguire una fase di separazione immunomagnetica e quindi strisciare 50 µl su CT-SMAC.

Opzione 3: utilizzando sonde di acido nucleico come descritto nello standard EN ISO 7218[5], eseguito su colonie isolate (purificate o no) da CT-SMAC (vedere le opzioni 1 o 2). Le sonde di acido nucleico devono essere diverse da quelle utilizzate nel Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7).

Opzione 4: utilizzando qualsiasi altro metodo certificato NF VALIDATION, il cui principio deve essere diverso da quello del Test di rilevamento molecolare di seconda generazione Neogen - *E. coli* O157 (compreso H7). Deve essere utilizzato il protocollo completo descritto per questo secondo metodo convalidato. Tutti i passaggi che precedono l'inizio della conferma devono essere comuni a entrambi i metodi.

In caso di risultati discordanti presunti positivi con il metodo alternativo, non confermati da uno dei metodi sopra descritti, il laboratorio deve compiere i passi necessari per garantire la validità dei risultati ottenuti.

In caso di domande su applicazioni o procedure specifiche, visitare il nostro sito Web all'indirizzo www.neogen.com oppure contattare il rappresentante o il distributore locale Neogen.

Appendice A. Interruzione del protocollo: stoccaggio e ripetizione del test dei campioni

1. Per conservare un lisato trattato termicamente, ritappare la provetta di lisato con un tappo pulito (vedere la sezione **Lisi**, 4.5)
2. Per conservare un campione arricchito, incubare per almeno 18 ore prima della conservazione.
3. Conservare tra 4 e 8 °C per un massimo di 72 ore.
4. Preparare un campione conservato per l'amplificazione capovolgendolo 2-3 volte per miscelarlo.
5. Stappare le provette.

6. Sistemare le provette di lisato mescolate sull'inserto per blocco di riscaldamento per rilevamento molecolare Neogen e riscaldare a 100 ± 1 °C per 5 ± 1 minuti.
7. Rimuovere il rack di provette di soluzione per lisi Neogen dal blocco riscaldante e lasciarlo raffreddare nell'inserto per blocco di raffreddamento per rilevamento molecolare Neogen per almeno 5 minuti e un massimo di 10 minuti.
8. Procedere con il protocollo alla sezione **Amplificazione** sopra descritta.

Riferimenti:

1. Manuale di analisi batteriologica dell'Agenzia statunitense per gli alimenti e i medicinali. Capitolo 4A: *Escherichia coli* diarreagenici. Novembre 2015.
2. Guida al laboratorio di microbiologia FSIS del Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti (USDA) 5.09. Rilevamento, isolamento e identificazione di *Escherichia coli* O157:H7 da prodotti a base di carne e carcasse e spugne ambientali. Data di entrata in vigore: 15 gennaio 2015.
3. ISO 16654:2001 Microbiologia degli alimenti e dei mangimi per animali - Metodo orizzontale per la ricerca di *Escherichia coli* O157.
4. ISO/IEC 17025. Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura.
5. ISO 7218. Microbiologia degli alimenti e dei mangimi per animali - Regole generali per l'esame microbiologico.
6. ISO 6887. Microbiologia degli alimenti e dei mangimi per animali - Preparazione di campioni di prova, sospensioni iniziali e diluizioni decimali per l'esame microbiologico.
7. Qualifica dell'installazione (IQ)/Qualifica operativa (OQ) e Istruzioni per il Sistema di rilevamento molecolare Neogen®. Sicurezza alimentare Neogen.

Spiegazione dei simboli

info.neogen.com/symbols

AOAC è un marchio registrato di AOAC INTERNATIONAL

Official Methods è un marchio di servizio registrato di AOAC INTERNATIONAL

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

NEOGEN®

Instrucciones del producto

Ensayo de detección molecular 2 - *E. coli* O157 (incluido H7)

Descripción del producto y uso previsto

El ensayo de detección molecular 2 de Neogen® - *E. coli* O157 (incluido H7) se usa con el sistema de detección molecular de Neogen® para la detección rápida y específica de *E. coli* O157 (incluido H7) en muestras enriquecidas de alimentos y piensos.

Los ensayos de detección molecular de Neogen usan amplificación isotérmica mediada por bucle para amplificar rápidamente secuencias de ácido nucleico con especificidad y sensibilidad altas, combinados con bioluminiscencia para detectar la amplificación. Los resultados positivos presuntos se informan en tiempo real, mientras que los resultados negativos se muestran una vez finalizado el ensayo. Los resultados positivos presuntos se deberían confirmar mediante su método de preferencia o según lo especifiquen las regulaciones locales[1, 2, 3].

El ensayo de detección molecular 2 de Neogen - *E. coli* O157 (incluido H7) está diseñado para que lo utilicen profesionales capacitados en técnicas de laboratorio en un entorno de laboratorio. Neogen no ha documentado el uso de este producto en otras industrias que no sean de alimentos o bebidas. Por ejemplo, Neogen no ha documentado este producto para analizar muestras medioambientales, farmacéuticas, cosméticas, clínicas o veterinarias. El ensayo de detección molecular 2 de Neogen - *E. coli* O157 (incluido H7) no se ha evaluado con todos los posibles productos alimenticios, procesos alimentarios o protocolos de prueba, ni con todas las cepas posibles de bacteria.

Al igual que con todos los métodos de prueba, la fuente, la formulación y la calidad del medio de enriquecimiento pueden influir en los resultados. Factores como los métodos de muestreo, los protocolos de prueba, la preparación de la muestra, la manipulación y la técnica de laboratorio también pueden influir en los resultados. Neogen recomienda la evaluación del método incluido el medio de enriquecimiento en el entorno del usuario usando un número suficiente de muestras con alimentos particulares y desafíos microbianos a fin de garantizar que el método cumple con los criterios del usuario.

Neogen ha evaluado el ensayo de detección molecular 2 de Neogen - *E. coli* O157 (incluido H7) con agua con peptona tamponada ISO.

El instrumento de detección molecular de Neogen® está previsto para su uso con muestras que se han sometido a tratamiento de calor durante el paso de lisis del ensayo, que está diseñado para destruir organismos presentes en la muestra. Las muestras que no se hayan tratado con calor de forma adecuada durante el paso de lisis del ensayo podrían considerarse un riesgo biológico potencial y NO deberían introducirse en el instrumento de detección molecular de Neogen.

Neogen Food Safety cuenta con certificación ISO 9001 de la Organización Internacional de Normalización (International Organization for Standardization, ISO) para diseño y fabricación.

El kit de prueba para el ensayo de detección molecular 2 Neogen - *E. coli* O157 (incluido H7) contiene 96 pruebas, descritas en la tabla 1.

Tabla 1. Componentes del kit de ensayo de detección molecular de Neogen

Artículo	Identificación	Cantidad	Contenido	Comentarios
Solución de lisis (LS) Neogen®	Solución rosa en tubos transparentes	96 (12 tiras de 8 tubos)	580 µL de solución de lisis de Neogen por tubo	Separado y listo para usar
Tubos de reactivo para ensayo de detección molecular 2 - Neogen® *E. coli* O157 (incluido H7)	Tubos rosas	96 (12 tiras de 8 tubos)	Mezcla para amplificación y detección específica liofilizada	Listo para usar
Tapas adicionales	Tapas rosas	96 (12 tiras de 8 tapas)		Listo para usar
Control de reactivos (RC) de Neogen®	Tubos transparentes con tapa abatible	16 (2 sobres de 8 tubos individuales)	ADN de control liofilizado, mezcla para amplificación y detección	Listo para usar

El control negativo, que no se provee en el kit, es un medio de enriquecimiento estéril, p. ej. BPW ISO. No use agua como control negativo.

Seguridad

El usuario debe leer, comprender y seguir toda la información de seguridad en las instrucciones para el sistema de detección molecular de Neogen y el ensayo de detección molecular 2 de Neogen *E. coli* O157 (incluido H7). Conserve las instrucciones de seguridad para referencias futuras.

⚠ **ADVERTENCIA:** Indica una situación peligrosa que, si no se evita, podría provocar la muerte o lesiones graves y/o daños a la propiedad.

AVISO: Indica una situación potencialmente peligrosa que, si no se evita, podría provocar daños a la propiedad.

⚠ ADVERTENCIA

No use el ensayo de detección molecular de Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluido H7) en el diagnóstico de condiciones en seres humanos o animales.

El usuario debe capacitar a su personal en técnicas de prueba adecuadas actuales: por ejemplo, buenas prácticas de laboratorio, ISO/IEC 17025[4] o ISO 7218[5].

Para reducir los riesgos asociados con un resultado falso negativo que produce la liberación de producto contaminado:

- Siga el protocolo y realice las pruebas exactamente como se indique en las instrucciones del producto.
- Utilice medio precalentado a 41,5 ± 1 °C. No permita que el medio caiga por debajo del rango de temperatura de incubación durante la preparación de la muestra.
- Almacene el ensayo de detección molecular 2 de Neogen - *E. coli* O157 (incluido H7) según se indica en el paquete y en las instrucciones del producto.
- Siempre use el ensayo de detección molecular 2 de Neogen - *E. coli* O157 (incluido H7) por fecha de vencimiento.
- Use el ensayo de detección molecular 2 de Neogen - *E. coli* O157 (incluido H7) con muestras de alimentos, piensos y ambientales de proceso de alimentos que se hayan validado internamente o mediante un tercero.
- Use el ensayo de detección molecular 2 de Neogen - *E. coli* O157 (incluido H7) solo con superficies, sanitizantes, protocolos y cepas bacterianas que se hayan validado internamente o mediante un tercero.
- Para una muestra ambiental que contenga tampón neutralizante (NB) con complejo de sulfonato de arilo, realice una dilución 1:2 antes de la prueba (1 parte de muestra en 1 parte de caldo de enriquecimiento estéril). Otra opción es transferir 10 µL del enriquecimiento del tampón neutralizante a los tubos de la solución de lisis Neogen. Los productos para manipulación de muestras Neogen® que incluyen tampón neutralizante Neogen® con complejo de sulfonato de arilo: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XSLSSL10NB, HS10NB y HS119510NB.

Para reducir los riesgos asociados con la exposición a químicos y riesgos biológicos:

- Realice pruebas de patógenos en un laboratorio debidamente equipado bajo el control de personal capacitado. Los medios de enriquecimiento incubados y los equipos o superficies que han entrado en contacto con dichos medios pueden contener patógenos en niveles suficientes para causar riesgos para la salud humana.
- Siempre siga las prácticas de laboratorio estándar, incluido el uso de ropa de protección y protección ocular adecuadas mientras manipula 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 y desechos contaminados asociados de acuerdo con los estándares locales, regionales, nacionales e industriales vigentes.
- No supere el ajuste de temperatura recomendado en el calentador.
- No exceda el tiempo de calentamiento recomendado.
- Use un termómetro calibrado adecuado para verificar la temperatura del inserto del bloque de calentamiento para detección molecular de Neogen® (p. ej., un termómetro de inmersión parcial o termómetro termocupla digital, no un termómetro de inmersión total). El termómetro se debe colocar en la ubicación designada en el inserto del bloque de calentamiento para la detección molecular de Neogen.

Para reducir los riesgos asociados con la contaminación cruzada mientras prepara el ensayo:

- Siempre use guantes (para proteger al usuario y evitar la introducción de nucleasas).

Para reducir los riesgos asociados con la exposición a líquidos calientes:

- No supere el ajuste de temperatura recomendado en el calentador.
- No exceda el tiempo de calentamiento recomendado.
- Use un termómetro calibrado adecuado para verificar la temperatura del inserto del bloque de calentamiento para detección molecular de Neogen® (p. ej., un termómetro de inmersión parcial o termómetro termocupla digital, no un termómetro de inmersión total). El termómetro se debe colocar en la ubicación designada en el inserto del bloque de calentamiento para la detección molecular de Neogen.

AVISO

Para reducir los riesgos asociados con la contaminación cruzada mientras prepara el ensayo:

- Se recomienda el uso de puntas de pipeta de grado biológico molecular con barrera de aerosol (filtrada) estéril.
- Use una punta de pipeta nueva para cada transferencia de muestra.
- Utilice las buenas prácticas de laboratorio para transferir la muestra de enriquecimiento al tubo de lisis. Para evitar la contaminación del pipeteador, el usuario puede optar por añadir un paso de transferencia intermedio. Por ejemplo, el usuario puede transferir cada muestra enriquecida en un tubo estéril.
- Use una estación de trabajo de biología molecular con lámpara germicida cuando esté disponible.

Para reducir los riesgos asociados con un resultado falso positivo:

- Nunca abra tubos después de la amplificación.
- Siempre deseche los tubos contaminados remojándolos en una solución de cloro de uso doméstico al 1-5 % (v:v en agua) durante 1 hora y alejado del área de preparación del ensayo.

Consulte la ficha de datos de seguridad para obtener información adicional y conocer las regulaciones locales para el desecho.

Si tiene preguntas sobre aplicaciones o procedimientos específicos, visite nuestro sitio web en www.neogen.com o comuníquese con su representante o distribuidor local de Neogen.

Responsabilidad del usuario

Los usuarios son responsables de familiarizarse con las instrucciones y la información del producto. Visite nuestro sitio web en **www.neogen.com,** o comuníquese con su representante o distribuidor local de Neogen para obtener más información.

Al seleccionar un método de prueba, es importante reconocer que hay factores externos como los métodos de muestreo, los protocolos de prueba, la preparación de muestras, el manejo y la técnica de laboratorio que pueden influir en los resultados.

Al seleccionar cualquier método de prueba o producto, es responsabilidad del usuario evaluar una cantidad suficiente de muestras con retos microbianos y matrices adecuadas para satisfacerlo en cuanto a que el método de prueba elegido cumple con sus criterios.

También es responsabilidad del usuario determinar que los métodos y resultados de las pruebas cumplen con los requisitos de sus clientes y proveedores.

Como sucede con cualquier método de prueba, los resultados obtenidos del uso de cualquier producto de Neogen Food Safety no constituyen una garantía de la calidad de las matrices o procesos probados.

Para ayudar a los clientes a evaluar el método de diversas matrices alimentarias, Neogen ha desarrollado el kit de control de matriz para la detección molecular de Neogen®. Cuando sea necesario, use el control de matriz (MC) para determinar si la matriz tiene la capacidad de afectar los resultados del ensayo de detección molecular 2 de Neogen - *E. coli* O157 (incluido H7). Pruebe varias muestras, representativas de la matriz, es decir, muestras obtenidas de distinto origen, durante cualquier periodo de validación cuando adopte el método de Neogen o cuando pruebe matrices nuevas o desconocidas que se hayan sometido a cambios de materia prima o proceso.

Se puede definir a una matriz como un tipo de producto con propiedades intrínsecas, tales como composición y proceso. Las diferencias entre matrices pueden ser tan simples como los efectos ocasionados por diferencias en su procesamiento o presentación. Por ejemplo: crudo frente a pasteurizado, fresco frente a seco, etc.

Limitación de garantías / Recurso limitado

A EXCEPCIÓN DE LO ESTABLECIDO EXPRESAMENTE EN UNA SECCIÓN DE GARANTÍA LIMITADA DE EMPAQUE DE PRODUCTO INDIVIDUAL, NEOGEN RENUNCIA A TODAS LAS GARANTÍAS EXPRESAS E IMPLÍCITAS, QUE INCLUYE, ENTRE OTRAS, CUALQUIER GARANTÍA DE COMERCIALIZACIÓN O APTITUD PARA UN USO EN PARTICULAR. Si algún producto de Neogen Food Safety es defectuoso, Neogen o su distribuidor autorizado, a su elección, reemplazará o reembolsará el precio de compra del producto. Estos son sus remedios exclusivos. Debe notificar de inmediato a Neogen dentro de los sesenta días posteriores al descubrimiento de cualquier defecto sospechoso en un producto y devolverlo a Neogen. Comuníquese con su representante de Neogen o distribuidor autorizado de Neogen si tuviera cualquier otra pregunta.

Limitación de responsabilidad de Neogen

NEOGEN NO SERÁ RESPONSABLE POR LOS DAÑOS DE NINGÚN TIPO, INCLUIDOS DAÑOS ESPECIALES O MEDIATOS, O GASTOS QUE SURJAN DIRECTA O INDIRECTAMENTE DEL USO DE ESTE PRODUCTO. En ningún caso la responsabilidad de Neogen bajo cualquier teoría legal excederá el precio de compra del producto presuntamente defectuoso.

Almacenamiento y desecho

Almacene el ensayo de detección molecular 2 de Neogen - *E. coli* O157 (incluido H7) a 2-8 °C. No se debe congelar. Mantenga el kit alejado de la luz durante el almacenamiento. Después de abrir el kit, compruebe que la bolsa de aluminio no esté dañada. Si la bolsa está dañada, no la use. Después de abrirlos, los tubos de reactivos no utilizados siempre deben almacenarse en la bolsa resellable con el desecante en su interior para mantener la estabilidad de los reactivos liofilizados. Almacene las bolsas reselladas a 2-8 °C durante no más de 60 días.

No use el ensayo de detección molecular 2 de Neogen - *E. coli* O157 (incluido H7) luego de que haya pasado su fecha de vencimiento. La fecha de vencimiento y el número de lote se indican en la etiqueta exterior de la caja. Luego de usar, el medio de enriquecimiento y los tubos del ensayo de detección molecular de Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluido H7) pueden contener potencialmente materiales patogénicos. Una vez finalizadas las pruebas, siga los estándares actuales de la industria para la eliminación de desechos contaminados. Consulte la ficha de datos de seguridad para obtener información adicional y conocer las regulaciones locales para el desecho.

Instrucciones de uso

Siga todas las instrucciones con atención. De lo contrario, puede dar lugar a resultados inexactos.

El usuario debería completar la capacitación de calificación de operador del sistema de detección molecular de Neogen, según se describe en el documento "Protocolos e instrucciones de calificación de instalación (Installation Qualification, IQ)/calificación operativa (Operational Qualification, OQ) para el sistema de detección molecular de Neogen"[7].

Descontamine periódicamente mesas y equipo de laboratorio (pipetas, herramientas de encapuchado/desencapuchado, etc.) con una solución de cloro de uso doméstico al 1-5 % (v:v en agua) o solución de extracción de ADN.

Consulte la sección “Instrucciones específicas para métodos validados” para conocer los requisitos específicos:

Tabla 3 para protocolos de enriquecimiento de acuerdo con AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2017.01

Tabla 4 para protocolos de enriquecimiento de acuerdo con el certificado de validación NF de 3M 01/18-05/17

Enriquecimiento de muestras

Las tablas 2, 3 o 4 presentan orientación para protocolos de enriquecimiento para alimentos. Es responsabilidad del usuario validar protocolos alternativos de muestreo o índices de dilución a fin de garantizar que este método de prueba cumple con sus criterios.

Alimentos

1. Precaliente el medio de enriquecimiento BPW ISO a 41,5 ± 1 °C.
2. Combine asépticamente el medio de enriquecimiento y la muestra de acuerdo con las tablas 2, 3 o 4. Para todas las muestras de carne y partículas altas, se recomienda el uso de bolsas filtrantes.
3. Homogenice todas las matrices, excepto las frutas y los productos de hoja, mezclando bien, homogeneizando o mezclando a mano durante 2 ± 0,2 minutos. Incube a 41,5 ± 1 °C durante el tiempo adecuado según las tablas 2, 3 o 4.

Tabla 2. Protocolos de enriquecimiento general

Matriz de muestra[a]	Tamaño de muestra	Volumen de caldo de enriquecimiento (ml)	Temperatura de enriquecimiento (±1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)
Bife crudo incluido molido/picado y cortado	325 g	975 BPW ISO (precalentado)	41,5	10-18
La carne cruda incluida bife, puerco, ave, cordero y bisonte crudo	25 g	225 BPW ISO (precalentado)	41,5	8-18
Productos de hoja[b]	200 g	450 BPW ISO (precalentado)	41,5	18-24
Otros alimentos incluidos frutas[b], verduras, jugos de fruta/verdura, hierbas frescas, mariscos crudos, huevos crudos, leche cruda, masa para galletas y carnes procesadas	25 g	225 BPW ISO (precalentado)	41,5	18-24
Nueces o mezclas de frutos secos que contengan nueces (este protocolo es adecuado para otras nueces incluidas pecanas, almendras, pistachos, castañas de cajú y castañas	25 g	225 de leche en polvo descremada reconstituida	41,5	18-24

(a) Las muestras congeladas se deben equilibrar a 4-8 °C antes de añadirlas al caldo de enriquecimiento.

(b) Los productos de hoja y las muestras de fruta se deben agitar suavemente a mano durante 5 minutos. No mezcle ni homogenice.

Instrucciones específicas para métodos validados

AOAC® *Official Methods of Analysis*℠ 2017.01

En el programa AOAC *Official Method of Analysis*℠, se descubrió que el ensayo para la detección molecular 2 de Neogen – *E. coli* O157 (incluido H7) es un método eficaz para la detección de *E. coli* O157: H7. En la tabla 3, se muestran las matrices que se probaron en el estudio.

Tabla 3. Protocolos de enriquecimiento mediante BPW ISO precalentado a 41,5 ± 1 °C de acuerdo con AOAC® *Official Methods*℠ 2017.01

Matriz de muestra	Tamaño de muestra	Volumen de caldo de enriquecimiento (ml)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Homogenizado
Carne molida cruda (73 % magra)	325 g	975	10-18	Manualmente o mediante homogenizador
Espinaca cruda en bolsa[a]	200 g	450	18-24	Agite suavemente a mano durante 5 minutos, no homogenice
Coles frescos	25 g	225	18-24	Agite suavemente a mano durante 5 minutos, no homogenice
Arándanos congelados[a][b]	25 g	225	18-24	Agite suavemente a mano durante 5 minutos, no homogenice

(a) Los productos de hoja y las muestras de fruta se deben agitar suavemente a mano durante 5 minutos. No mezcle ni homogenice.

(b) Las muestras congeladas se deben equilibrar a 4-8 °C antes de añadirlas al caldo de enriquecimiento.

Validación NF de la Certificación AFNOR

3M 01/18-05/17

MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA COMERCIOS AGRÍCOLAS

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

Para obtener más información sobre el fin de validez, consulte el certificado de VALIDACIÓN NF disponible en el sitio web mencionado anteriormente.

El método de certificación de VALIDACIÓN NF en cumplimiento con ISO 16140-2[8] en comparación con ISO 16654[3]

Alcance de la validación: carne cruda, productos lácteos crudos, frutas y verduras crudas

Preparación de la muestra: las muestras se deben preparar de acuerdo con las normas EN ISO 16654 y EN ISO 6887[6]

Versión del software: consultar el certificado

Tabla 4. Protocolos de enriquecimiento mediante BPW ISO precalentado a 41.5 ± 1 °C de acuerdo con método certificado de VALIDACIÓN NF de 3M 01/18-05/17

Protocolo	Tamaño de muestra	Volumen de caldo de enriquecimiento (ml)	Temperatura de enriquecimiento (±1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)
Productos lácteos crudos, frutas y verduras crudas	25 g	225	41,5	18-24
Carne cruda	25 g	225	41,5	8-24

NOTAS:

- Las muestras de más de 25 g no se probaron en el estudio de VALIDACIÓN NF.
- Los puntos de interrupción del protocolo recomendados son después del enriquecimiento o después de la lisis de la muestra. El caldo de enriquecimiento o el lisado de muestras se puede almacenar a 2-8 °C durante un máximo de 72 horas. Una vez que extraiga el caldo de enriquecimiento de almacenamiento, reanude la prueba desde el Paso 1 en la sección **Lisis**. Una vez que extraiga el lisado de la muestra de almacenamiento, reanude la prueba desde el Paso 7 en la sección **Lisis**. El lisado también se puede almacenar a -20 °C.
- Los protocolos de enriquecimiento cortos son sensibles a las condiciones de incubación, por lo que se deben seguir las temperaturas especificadas en el protocolo. Se debe verificar la temperatura del baño de agua o de la incubadora donde se precalientan los caldos para garantizar que el caldo de enriquecimiento alcance la temperatura requerida. El tiempo total de preparación de la muestra, incluido el tiempo transcurrido entre el final de la etapa de precalentamiento del medio y el comienzo de la incubación de la muestra de alimentos, no deberá exceder los 45 minutos. Se recomienda usar una incubadora ventilada durante la incubación.

Preparación de la bandeja de carga rápida para la detección molecular de Neogen®

1. Humedezca un paño o una toalla descartable con una solución de cloro de uso doméstico al 1-5 % (v:v en agua) y enjuague la bandeja de carga rápida para la detección molecular de Neogen.
2. Enjuague con agua la bandeja de carga rápida para la detección molecular de Neogen.
3. Use una toalla descartable para secar la bandeja de carga rápida para la detección molecular de Neogen.
4. Asegúrese de que la bandeja de carga rápida para la detección molecular de Neogen esté seca antes de usarla.

Preparación del inserto del bloque de enfriamiento para la detección molecular de Neogen®

Coloque el inserto del bloque de enfriamiento para la detección molecular de Neogen directamente sobre una mesa de laboratorio: No se utiliza la bandeja de bloques de enfriamiento para detección molecular de Neogen. Utilice el bloque a temperatura ambiente del laboratorio (20-25 °C).

Preparación del inserto del bloque de calentamiento para la detección molecular de Neogen®

Coloque el inserto del bloque de calentamiento para la detección molecular de Neogen en una unidad doble de bloque de calentamiento seco. Encienda la unidad del bloque de calentamiento seco y ajuste la temperatura para permitir que el inserto del bloque de calentamiento para la detección molecular de Neogen alcance y mantenga una temperatura de 100 ± 1 °C.

NOTA: Según la unidad de calentamiento, espere aproximadamente 30 minutos para que el inserto del bloque de calentamiento para detección molecular de Neogen alcance la temperatura. Con un termómetro calibrado adecuado (p. ej., un termómetro de inmersión parcial o termómetro termocupla digital, no un termómetro de inmersión total) colocado en la ubicación designada, verifique que el inserto del bloque de calentamiento para detección molecular de Neogen esté a 100 ± 1 °C.

Preparación del instrumento de detección molecular de Neogen®

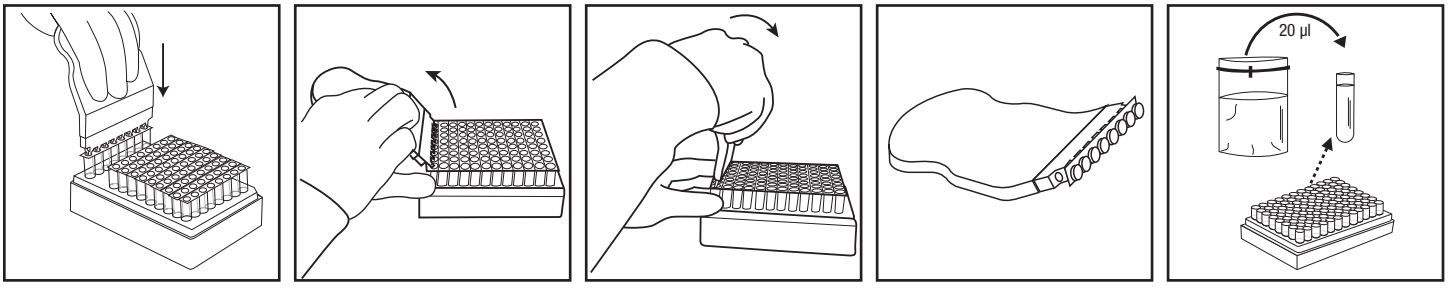
1. Inicie el software de detección molecular de Neogen® e inicie sesión. Comuníquese con su representante de Neogen Food Safety a fin de garantizar que tenga la versión más actualizada del software.
2. Encienda el instrumento de detección molecular de Neogen.
3. Cree o edite una ejecución con datos para cada muestra. Consulte el manual del usuario del sistema de detección molecular de Neogen® para obtener más detalles.

NOTA: El instrumento de detección molecular de Neogen debe alcanzar y mantener una temperatura de 60 °C antes de insertar la bandeja de carga rápida para detección molecular de Neogen con tubos de reacción. Este paso de calentamiento dura aproximadamente 20 minutos y se indica con una luz NARANJA en la barra de estado del instrumento. Cuando el instrumento esté listo para iniciar una ejecución, la barra de estado será VERDE.

Lisis

1. Deje que los tubos de la solución de lisis Neogen se calienten colocando la rejilla a temperatura ambiente (20-25 °C) durante la noche (entre 16 y 18 horas). Las alternativas para equilibrar los tubos de solución de lisis Neogen a temperatura ambiente son poner los tubos sobre un banco de laboratorio durante al menos 2 horas, incubar los tubos de solución de lisis Neogen en una incubadora a 37 ± 1 °C durante 1 hora o colocarlos en un bloque de calentamiento seco doble durante 30 segundos a 100 °C.
2. Invierta los tubos tapados para mezclar. Continúe con el siguiente paso dentro de las 4 horas.
3. Retire el caldo de enriquecimiento de la incubadora.
4. Se requiere un tubo de solución de lisis Neogen para cada muestra y la muestra de control negativo (Negative Control, NC) (medio de enriquecimiento estéril).
   - 4.1 Las tiras de tubos de la solución de lisis Neogen se pueden cortar de acuerdo con el número de tubo deseado de la solución de lisis Neogen. Seleccione la cantidad de tubos individuales de solución de lisis Neogen o tiras de 8 tubos necesarios. Coloque los tubos de solución de lisis Neogen en un soporte vacío.
   - 4.2 Para evitar la contaminación cruzada, destape una tira de tubos de solución de lisis Neogen a la vez y use una nueva punta de pipeta para cada paso de transferencia.
   - 4.3 Transfiera la muestra enriquecida a tubos de solución de lisis Neogen según se describe a continuación:

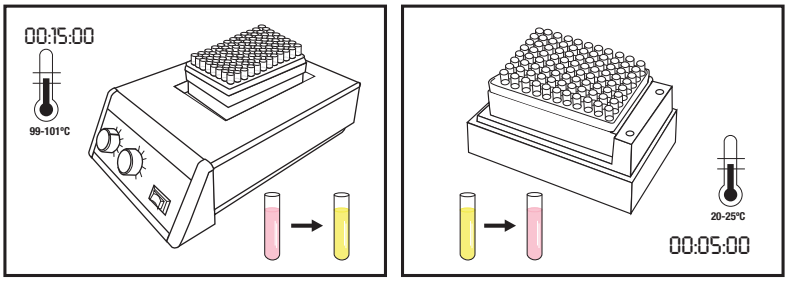
     Transfiera **primero** cada muestra enriquecida en un tubo individual de solución de lisis Neogen**.** Transfiera el NC **al final.**
   - 4.4 Use la herramienta de encapuchado/desencapuchado de detección molecular de Neogen® para destapar una tira de tubo de solución de lisis Neogen, una tira a la vez.
   - 4.5 Deseche la tapa del tubo de la solución de lisis Neogen. Si se retendrá el lisado para volver a realizar la prueba, coloque las tapas en un recipiente limpio para volver a aplicarlas después de la lisis.
     - 4.5.1 Consulte el anexo A para procesamiento de lisado retenido.
   - 4.6 Transfiera 20 µL de muestra en un tubo de solución de lisis Neogen a menos que se indique lo contrario en las tablas 2, 3 y 4 del protocolo.



5. Repita el paso 4.3 hasta que cada muestra individual se haya agregado a un tubo de solución de lisis Neogen correspondiente en la tira.
6. Repita los pasos 4.1 a 4.6 según sea necesario, para la cantidad de muestras que se probarán.
7. Cuando se hayan transferido todas las muestras, transfiera 20 µL de NC (medio de enriquecimiento estéril, por ejemplo, BPW ISO) a un tubo de solución de lisis Neogen. No use agua como NC.
8. Verifique que la temperatura del inserto de bloque de calentamiento para detección molecular de Neogen sea de 100 ± 1 °C.
9. Coloque la gradilla destapada de tubos de solución de lisis en el inserto del bloque de calentamiento para detección molecular y caliente durante 15 ± 1 minutos. Durante el calentamiento, la solución de lisis Neogen cambiará de rosa (frío) a amarillo (caliente).

   Las muestras que no se hayan tratado con calor de forma adecuada durante el paso de lisis del ensayo podrían considerarse un riesgo biológico potencial y NO deberían introducirse en el instrumento de detección molecular de Neogen.

10. Retire la gradilla destapada de los tubos de la solución de lisis Neogen del bloque de calentamiento y deje que se enfríe en el inserto del bloque de enfriamiento para detección molecular de Neogen durante al menos 5 minutos y un máximo de 10 minutos. El inserto del bloque de enfriamiento molecular Neogen, utilizado a temperatura ambiente sin la bandeja de bloque de enfriamiento para detección molecular de Neogen, debe colocarse directamente sobre la mesa del laboratorio. Cuando se enfríe, la solución de lisis volverá a tener un color rosado.
11. Retire la gradilla de los tubos de la solución de lisis Neogen del inserto de bloque de enfriamiento para detección molecular de Neogen.

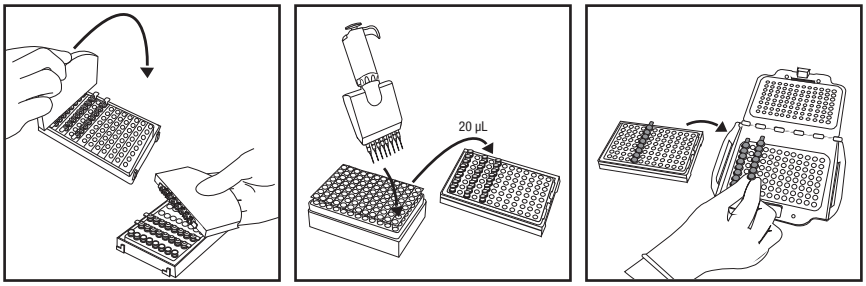


Amplificación

1. Se requiere un tubo de reactivo del ensayo para detección molecular 2 - *E. coli* O157 (incluido H7) para cada muestra y el NC.
   1.1 Las tiras de tubo se pueden cortar según la cantidad de tubos deseada. Seleccione la cantidad necesaria de tubos de reactivos individuales o tiras de 8 tubos del ensayo para detección molecular 2 - *E. coli* O157 (incluido H7).
   1.2 Coloque los tubos de reactivo para el ensayo de detección molecular 2 - *E. coli* O157 (incluido H7) en una gradilla vacía.
   1.3 Evite tocar los pellets del reactivo de la parte inferior de los tubos.
2. Seleccione un tubo de control de reactivo Neogen y colóquelo en la gradilla.
3. Para evitar la contaminación cruzada, destape una tira de tubo de reactivos del ensayo de detección molecular 2 Neogen - *E. coli* O157 (incluido H7) a la vez y use una nueva punta de pipeta para cada paso de transferencia.
4. Transfiera el lisado a un tubo de reactivo y tubo de control de reactivos Neogen del ensayo de detección molecular 2 - *E. coli* O157 (incluido H7) según se describe a continuación:

Transfiera cada lisado de muestra a tubos de reactivos individuales del ensayo para detección molecular 2 Neogen - *E. coli* O157 (incluido H7) **primero** seguido de NC. Hidrate el tubo de control de reactivos Neogen **al final.**

5. Use la herramienta de encapuchado/desencapuchado para reactivos de detección molecular de Neogen® para destapar el tubo de reactivos del ensayo de detección molecular 2 Neogen - *E. coli* O157 (incluido H7), una tira de tubo a la vez. Deseche la tapa.
   5.1 Transfiera 20 µL de lisado de muestra desde la ½ superior del líquido (evitar precipitado) en el tubo de solución de lisis Neogen en el tubo de reactivos del ensayo de detección molecular de Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluido H7) **correspondiente. Distribuya en ángulo para evitar tocar los pellets. Mezcle suavemente aspirando y expulsando el líquido con la pipeta 5 veces.**
   5.2 Repita el paso 5.1 hasta que el lisado de muestra individual se haya agregado a un tubo de reactivos correspondiente del ensayo de detección molecular 2 Neogen - *E. coli* O157 (incluido H7) en la tira.
   5.3 Cubra los tubos de reactivos del ensayo de detección molecular 2 Neogen - *E. coli* O157 (incluido H7) con las tapas extras provistas y use el lado redondeado de la herramienta de encapuchado/desencapuchado para reactivos de detección molecular para aplicar presión en un movimiento hacia adelante y hacia atrás asegurándose de que la tapa se coloque bien.
   5.4 Repita los pasos 5.1 a 5.3 según sea necesario, para la cantidad de muestras que se probarán.
   5.5 Cuando todas las muestras de lisados se hayan transferido, repita los pasos 5.1 a 5.3 para transferir 20 µL de lisado de NC en el tubo de reactivos del ensayo de detección molecular 2 Neogen - *E. coli* O157 (incluido H7).
   5.6 Transfiera **20 µL de <u>lisado de NC</u> en un tubo de control de reactivos Neogen.** Distribuya en ángulo para evitar tocar los pellets. Mezcle suavemente aspirando y expulsando el líquido con la pipeta 5 veces.
6. Cargue los tubos tapados en una bandeja de carga rápida de detección molecular de Neogen limpia y descontaminada. Luego cierre bien la tapa.



7. Revise y confirme la ejecución configurada en el software de detección molecular de Neogen.
8. Haga clic en el botón Inicio del software y seleccione el instrumento que desea utilizar. La tapa del instrumento seleccionado se abrirá automáticamente.
9. Coloque la bandeja de carga rápida de detección molecular de Neogen en el instrumento de detección molecular de Neogen y cierre la tapa para iniciar el ensayo. Los resultados se proporcionan en 60 minutos, aunque los positivos pueden detectarse antes.
10. Una vez que el ensayo esté completo, quite la bandeja de carga rápida de detección molecular de Neogen del instrumento de detección molecular y deseche los tubos al remojar en una solución de cloro de uso doméstico al 1-5 % (v:v en agua) durante 1 hora y alejado del área de preparación del ensayo.

AVISO: Para minimizar el riesgo de falsos positivos debido a la contaminación cruzada, nunca abra los tubos de reactivos que contienen ADN amplificado. Esto incluye el tubo de reactivos y los tubos de control de matrices Neogen para control de reactivos del ensayo de detección molecular 2 - *E. coli* O157 (incluido H7). Siempre deseche los tubos de reactivos sellados al remojar en una solución de cloro de uso doméstico al 1-5 % (v:v en agua) durante 1 hora y alejado del área de preparación del ensayo.

Resultados e interpretación

Un algoritmo interpreta la curva de salida de luz que surja de la detección de la amplificación de ácido nucleico. El software analiza automáticamente los resultados y los codifica por colores en función del resultado. Un resultado positivo o negativo se determina mediante el análisis de una serie de parámetros de curva únicos. Los resultados positivos presuntos se informan en tiempo real, mientras que los resultados negativos y de inspección se muestran una vez que la ejecución está completa.

Las muestras positivas presuntas se deben confirmar según procedimientos operativos estándar de laboratorio o con la confirmación de método de referencia adecuada[1,2,3], que comienza con la transferencia del caldo de enriquecimiento primario BPW ISO al caldo de enriquecimiento secundario, seguido del posterior enchapado y confirmación de aislados mediante métodos bioquímicos y serológicos.

NOTA: Incluso una muestra negativa no dará una lectura de cero dado que los reactivos de amplificación del sistema y el ensayo de detección molecular de Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluido H7) tienen una lectura de unidad de luz relativa (RLU) “de fondo”.

En el raro caso de que ocurra cualquier salida de luz inusual, el algoritmo etiqueta esto como "Inspeccionar". Neogen recomienda al usuario repetir el ensayo para cualquier muestra para inspección. Si el resultado sigue siendo Inspeccionar, continúe con la prueba de confirmación usando su método de preferencia o según lo especifiquen las regulaciones locales.

En caso de resultados discordantes (presunto positivo con el ensayo de detección molecular 2 - *E. coli* O157 (incluido H7), no confirmado mediante uno de los medios descritos anteriormente y en particular para la prueba de aglutinación de látex), el laboratorio debe seguir los pasos necesarios para garantizar la validez de los resultados obtenidos.

Confirmación de resultados según el método certificado de VALIDACIÓN NF

En el contexto de VALIDACIÓN NF, se deben confirmar todas las muestras identificadas como positivas por el ensayo de detección molecular de Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluido H7) mediante una de las siguientes pruebas:

Opción 1: Usar la norma ISO 16654[3] que comienza con agua con peptona tamponada[3].

Opción 2: Implementación de un método de confirmación que consiste en lo siguiente: Manche 50 µL del enriquecimiento de agua con peptona tamponada[3] en una placa de agar de cefixima y telurito de potasio MacConkey sorbitol (CT-SMAC)[3]. Incube durante 24 ±3 horas a 37 °C. Manche las colonias características en agar nutriente y realice la prueba de aglutinación de látex directamente en colonias aisladas. Si los resultados del ensayo de detección molecular de Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluido H7) no están confirmados, realice un paso de separación inmunomagnético y luego manche 50 µL en CT-SMAC.

Opción 3: Usar sondas de ácido nucleico tal como se describe en la norma EN ISO 7218[5], realizado en colonias aisladas (purificadas o no) a partir de CT-SMAC (vea las Opciones 1 o 2). Las sondas de ácido nucleico debe ser diferentes de aquellas usadas en el ensayo de detección molecular 2 - *E. coli* O157 (incluido H7).

Opción 4: Usar cualquier otro método certificado de VALIDACIÓN NF, el principio del que debe ser diferente al del ensayo de detección molecular 2 Neogen - *E. coli* O157 (incluido H7). Se debe utilizar el protocolo completo descrito para este segundo método validado. Todos los pasos previos al inicio de la confirmación deben ser comunes a ambos métodos.

En caso de resultados discordantes (presunto positivo con el método alternativo, no confirmado mediante uno de los medios descritos anteriormente), el laboratorio debe seguir los pasos necesarios para garantizar la validez del resultado obtenido.

Si tiene preguntas sobre aplicaciones o procedimientos específicos, visite nuestro sitio web en www.neogen.com o comuníquese con su representante o distribuidor local de Neogen.

Anexo A. Interrupción de protocolo: Almacenamiento y repetición de la prueba de muestras

1. Para almacenar un lisado tratado con calor, tape el tubo de lisis con una tapa limpia (consulte la sección **Lisis**, 4.5)
2. Para almacenar una muestra enriquecida, incube durante un mínimo de 18 horas antes del almacenamiento.
3. Almacene ente 4 y 8 °C hasta por 72 horas.
4. Prepare una muestra almacenada para amplificación invirtiendo de 2 a 3 veces para mezclar.
5. Destape los tubos.

6. Coloque los tubos de lisado mezclados en el inserto del bloque de calentamiento para detección molecular y caliente a 100 ± 1 °C durante 5 ± 1 minutos.
7. Retire la gradilla de los tubos de la solución de lisis Neogen del bloque de calentamiento y deje que se enfríe en el inserto del bloque de enfriamiento para detección molecular de Neogen durante al menos 5 minutos y un máximo de 10 minutos.
8. Continúe el protocolo en la sección **Amplificación** que se detalla anteriormente.

Referencias:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Capítulo 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli.* Noviembre de 2015.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 5.09. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. Fecha de vigencia: 15 de enero de 2015.
3. ISO 16654:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.
7. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Neogen Food Safety.

Explicación de los símbolos

info.neogen.com/symbols

AOAC es una marca registrada de AOAC INTERNATIONAL

Official Methods es una marca de servicio registrada de AOAC INTERNATIONAL

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

NEOGEN®

Productinstructies

Moleculaire detectie-assay 2 - *E. coli* O157 (waaronder H7)

Productbeschrijving en beoogd gebruik

De moleculaire detectie-assay 2 van Neogen® - *E. coli* O157 (waaronder H7) wordt gebruikt bij het moleculaire detectiesysteem van Neogen® voor de snelle en specifieke detectie van *E. coli* O157 (waaronder H7) monsters van verrijkte voedingsmiddelen en diervoeders.

De moleculaire detectie-assays van Neogen maken gebruik van lusgemedieerde isothermische amplificatie om snel nucleïnezuursequenties te amplificeren met een hoge specificiteit en gevoeligheid, in combinatie met bioluminescentie voor het detecteren van de amplificatie. Vermoedelijke positieve resultaten worden in realtime gerapporteerd, terwijl negatieve resultaten worden weergegeven nadat de assay is voltooid. Vermoedelijke positieve resultaten moeten worden bevestigd met behulp van uw voorkeursmethode of zoals voorgeschreven door de lokale regelgeving [1, 2, 3].

De moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) is bedoeld voor gebruik in een laboratoriumomgeving door professionals die zijn opgeleid in laboratoriumtechnieken. Neogen heeft het gebruik van dit product in andere industrieën dan voedingsmiddelen- of drankenindustrie niet gedocumenteerd. Neogen heeft dit product bijvoorbeeld niet gedocumenteerd voor het testen van milieu-, farmaceutische, cosmetische, klinische of veterinaire monsters. De moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) is niet beoordeeld met alle mogelijke voedselproducten, voedselprocessen, testprotocollen of met alle mogelijke bacteriestammen.

Zoals bij alle testmethoden kan de bron, formulering en kwaliteit van het verrijkingsmedium de resultaten beïnvloeden. Factoren zoals bemonsteringsmethoden, testprotocollen, monstervoorbereiding, behandeling en laboratoriumtechniek kunnen ook van invloed zijn op de resultaten. Neogen raadt aan om de methode, waaronder het verrijkingsmedium, in de omgeving van de gebruiker met behulp van een voldoende aantal monsters met specifieke voedingsmiddelen en microbiële uitdagingen te evalueren om ervoor te zorgen dat de methode aan de criteria van de gebruiker voldoet.

Neogen heeft de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) beoordeeld met gebufferd peptonwater ISO.

Het moleculaire detectie-instrument van Neogen® is bedoeld voor gebruik met monsters die een warmtebehandeling hebben ondergaan tijdens de assay-lysisstap die is bedoeld voor het vernietigen van organismen in het monster. Monsters die tijdens de assay-lysisstap niet op de juiste manier met hitte zijn behandeld, kunnen als een potentieel biologisch gevaar worden beschouwd en mogen NIET in het Neogen Molecular Detection-instrument worden geplaatst.

Neogen Food Safety is gecertificeerd volgens ISO (International Organization for Standardization) 9001 voor ontwerp en productie.

De testkit moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) bevat 96 tests, zoals beschreven in tabel 1.

Tabel 1. Componenten van de moleculaire detectie-assaykit van Neogen

Item	Identificatie	Aantal	Inhoudsopgave	Opmerkingen
Neogen®-lysisoplossing (LS)	Roze oplossing in doorzichtige buisjes	96 (12 strips van 8 buisjes)	580 µL lysisoplossing van Neogen per buisje	In rekken en klaar voor gebruik
De moleculaire detectie-assay 2 van Neogen® - *E. coli* O157 (waaronder H7) reagensbuisjes	Roze buisjes	96 (12 strips van 8 buisjes)	Gelyofiliseerde specifieke amplificatie- en detectiemix	Klaar voor gebruik
Extra doppen	Roze doppen	96 (12 strips van 8 doppen)		Klaar voor gebruik
Neogen® Reagent Control (RC)	Doorzichtige buisjes met flip-top	16 (2 zakken met 8 buisjes)	Gelyofiliseerde controle-DNA, amplificatie- en detectiemix	Klaar voor gebruik

De negatieve controle, niet meegeleverd in de kit, is een steriel verrijkingsmedium, bijvoorbeeld BPW ISO. Gebruik geen water als negatieve controle.

Veiligheid

De gebruiker moet alle veiligheidsinformatie in de instructies voor het moleculaire detectiesysteem en de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) lezen, begrijpen en opvolgen. Bewaar de veiligheidsinstructies als naslag.

⚠ **WAARSCHUWING:** Geeft een gevaarlijke situatie aan die, indien die niet wordt vermeden, kan leiden tot de dood of ernstig letsel en/of materiële schade.

OPMERKING: Geeft een mogelijk gevaarlijke situatie aan die, indien die niet wordt vermeden, kan leiden tot materiële schade.

⚠ WAARSCHUWING

Gebruik de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) niet voor het stellen van een diagnose van aandoeningen bij mensen of dieren.

De gebruiker moet zijn of haar personeel trainen in de huidige juiste testtechnieken: bijvoorbeeld Good Laboratory Practices, ISO/IEC 17025[4] of ISO 7218[5].

De risico's door een vals-negatief resultaat verminderen dat kan leiden tot het vrijkomen van een besmet product:

- Volg het protocol en voer de tests precies uit zoals aangegeven in de productinstructies.
- Gebruik een medium dat is voorverwarmd tot 41,5 ± 1 °C. Laat het medium tijdens de monstervoorbereiding niet onder de incubatietemperatuur zakken.
- Bewaar de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) zoals staat aangegeven op de verpakkingen en in de productinstructies.
- Gebruik de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) niet na de vervaldatum.
- Gebruik de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) alleen bij voedsel-, diervoeder- en voedselverwerkende milieumonsters die intern of door een derde partij zijn gevalideerd.
- Gebruik de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) alleen bij oppervlakken, ontsmettingsmiddelen, protocollen en bacteriestammen die intern of door een derde partij zijn gevalideerd.
- Voer voor een milieumonster dat neutraliserende buffer (NB) met arylsulfonaatcomplex bevat, een 1:2 verdunning uit vóór het testen (1 deel monster in 1 deel steriele verrijkingsbouillon). Een andere optie is om 10 µL van de neutraliserende bufferverrijking over te brengen in de buisjes met de lysisoplossing van Neogen. Neogen®-producten voor monsterverwerking, waaronder Neogen®-neutralisatiebuffer met arylsulfonaatcomplex: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XSLSSL10NB, HS10NB en HS119510NB.

De risico's van blootstelling aan chemicaliën en biologisch gevaar verminderen:

- Voer onder toezicht van opgeleid personeel pathogenentests uit in een goed uitgerust laboratorium. Geïncubeerde verrijkingsmedia en apparatuur of oppervlakken die in contact zijn gekomen met geïncubeerde verrijkingsmedia, kunnen ziekteverwekkers bevatten in hoeveelheden die voldoende zijn om risico's voor de menselijke gezondheid te veroorzaken.
- Volg altijd de standaard veiligheidspraktijken van het laboratorium, inclusief het dragen van de juiste beschermende kleding en oogbescherming tijdens het hanteren van reagentia en besmette monsters.
- Vermijd contact met de inhoud van de verrijkingsmedia en reagensbuisjes na amplificatie.
- Voer verrijkte monsters en het bijbehorende verontreinigde afval af volgens de huidige lokale/regionale/nationale/industriële normen.
- Stel de aanbevolen temperatuurinstelling op het verwarmingselement niet hoger in dan aangegeven.
- Overschrijd de aanbevolen opwarmtijd niet.
- Gebruik een geschikte, geijkte thermometer om de temperatuur van het Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert te controleren (bijv. een gedeeltelijke dompelthermometer of digitale thermokoppelthermometer en niet een volledige totale dompelthermometer). De thermometer moet op de aangewezen plaats in het Neogen Molecular Detection Heat Block Insert worden geplaatst.

De risico's door kruisbesmetting tijdens het prepareren van de assay verminderen:

- Draag altijd handschoenen (ter bescherming en om contact met nucleasen te voorkomen).

De risico's van blootstelling aan hete vloeistoffen verminderen:

- Stel de aanbevolen temperatuurinstelling op het verwarmingselement niet hoger in dan aangegeven.
- Overschrijd de aanbevolen opwarmtijd niet.
- Gebruik een geschikte, geijkte thermometer om de temperatuur van het Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert te controleren (bijv. een gedeeltelijke dompelthermometer of digitale thermokoppelthermometer en niet een volledige totale dompelthermometer). De thermometer moet op de aangewezen plaats in het Neogen Molecular Detection Heat Block Insert worden geplaatst.

OPMERKING

De risico's door kruisbesmetting tijdens het prepareren van de assay verminderen:

- Het gebruik van steriele pipetpunten van moleculair biologische kwaliteit met een aerosolbarrière (gefilterd) wordt aanbevolen.
- Gebruik bij het overbrengen van een nieuw monster altijd een nieuwe pipetpunt.
- Gebruik goede laboratoriumpraktijken om het monster van het verrijkingsbuisje naar het lysisbuisje over te brengen. Om besmetting van de pipet te voorkomen, kan er naar keuze een tussenliggende overdrachtsstap worden toegevoegd. De gebruiker kan bijvoorbeeld elk verrijkt monster overbrengen in een steriel buisje.
- Gebruik indien beschikbaar een werkstation voor moleculaire biologie met een kiemdodende lamp.

De risico's door een vals-positief resultaat verminderen:

- Open nooit buisjes na een amplificatie.
- Gooi de besmette buisjes altijd weg door ze eerst een uur lang in water met 1-5% bleekmiddel ergens uit de buurt van de ruimte waar de assays worden geprepareerd, te laten weken.

Raadpleeg het veiligheidsinformatieblad voor aanvullende informatie en plaatselijke voorschriften voor afvoer.

Als u vragen hebt over specifieke toepassingen of procedures, bezoek dan onze website op www.neogen.com of neem contact op met uw plaatselijke vertegenwoordiger of distributeur van Neogen.

Verantwoordelijkheid van de gebruiker

Gebruikers zijn zelf verantwoordelijk om vertrouwd te raken met de instructies en informatie van het product. Bezoek voor meer informatie onze website op **www.neogen.com** of neem voor meer informatie contact op met uw plaatselijke vertegenwoordiger of distributeur van Neogen.

Bij het selecteren van een testmethode is het belangrijk om te onderkennen dat externe factoren zoals bemonsteringsmethoden, testprotocollen, monstervoorbereiding, verwerking en laboratoriumtechniek de resultaten kunnen beïnvloeden.

Het is bij het selecteren van een testmethode of product de verantwoordelijkheid van de gebruiker om een voldoende aantal monsters met de juiste matrices en microbiële uitdagingen te evalueren om de gebruiker ervan te overtuigen dat de gekozen testmethode voldoet aan de criteria van de gebruiker.

Tevens is het de verantwoordelijkheid van de gebruiker om te bepalen of alle testmethoden en -resultaten voldoen aan de eisen van zijn/haar klanten en leveranciers.

Zoals bij elke testmethode vormen de resultaten die zijn verkregen door het gebruik van een Neogen Food Safety-product, geen garantie voor de kwaliteit van de geteste matrices of processen.

Om klanten te helpen bij het evalueren van de methode voor verschillende voedselmatrices, heeft Neogen® de Molecular Detection Matrix Control-kit ontwikkeld. Gebruik indien nodig Matrix Control (MC) om te bepalen of de matrix de mogelijkheid heeft om de impact van de resultaten van de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) te laten zien. Test meerdere monsters die representatief zijn voor de matrix, d.w.z. monsters van verschillende herkomst, tijdens elke validatieperiode bij het toepassen van de Neogen-methode of bij het testen van nieuwe of onbekende matrices of matrices die veranderingen in de grondstof of het proces hebben ondergaan.

Een matrix kan worden gedefinieerd als een type product met intrinsieke eigenschappen zoals samenstelling en proces. Verschillen tussen matrices kunnen zo eenvoudig zijn als de effecten die worden veroorzaakt door verschillen in hun verwerking of presentatie, bijvoorbeeld rauw versus gepasteuriseerd; vers versus gedroogd, enzovoort.

Beperking van garanties / beperkt rechtsmiddel

BEHALVE ZOALS UITDRUKKELIJK VERMELD IN EEN SECTIE BEPERKTE GARANTIE OP DE INDIVIDUELE PRODUCTVERPAKKING, WIJST NEOGEN ALLE EXPLICIETE EN IMPLICIETE GARANTIES AF, INCLUSIEF MAAR NIET BEPERKT TOT GARANTIES VAN VERKOOPBAARHEID OF GESCHIKTHEID VOOR EEN BEPAALD DOEL. Als een Neogen Food Safety-product defect is, zal Neogen of haar geautoriseerde distributeur naar eigen goeddunken het product vervangen of de aankoopprijs van het product terugbetalen. Dit zijn uw exclusieve rechtsmiddelen. U moet Neogen onmiddellijk binnen zestig dagen na ontdekking van vermoedelijke defecten in een product daarvan op de hoogte brengen en het product aan Neogen retourneren. Neem voor verdere vragen contact op met uw Neogen-vertegenwoordiger of erkende Neogen-distributeur.

Beperking van de aansprakelijkheid van Neogen

NEOGEN IS NIET AANSPRAKELIJK VOOR VERLIES OF SCHADE, DIRECT, INDIRECT, SPECIAAL, INCIDENTEEL OF GEVOLGSCHADE, INCLUSIEF MAAR NIET BEPERKT TOT WINSTDERVING. In geen geval zal de aansprakelijkheid van Neogen op grond van enige juridische theorie hoger zijn dan de aankoopprijs van het product waarvan wordt beweerd dat het defect is.

Opslag en afvoer

Bewaar de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) tussen 2 °C en 8 °C. Niet invriezen. Bewaar de kit in het donker. Controleer na het openen van de kit of het foliezakje onbeschadigd is. Als het zakje beschadigd is, mag u de kit niet gebruiken. Na opening moeten ongebruikte reagensbuisjes altijd worden bewaard in het hersluitbare zakje met het droogmiddel erin om de stabiliteit van de gevriesdroogde reagentia te behouden. Bewaar opnieuw gesloten zakjes niet langer dan 60 dagen tussen 2 °C en 8 °C.

Gebruik de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) niet na de vervaldatum. De vervaldatum en het partijnummer staan op het etiket aan de buitenkant van de doos. Na gebruik kunnen de buisjes met het verrijkingsmedium en de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) mogelijk ziekteverwekkende kiemen bevatten. Wanneer het testen is voltooid, volgt u de geldende industrienormen voor het verwijderen van verontreinigd afval. Raadpleeg het veiligheidsinformatieblad voor aanvullende informatie en plaatselijke voorschriften voor afvoer.

Gebruiksaanwijzing

Volg alle instructies zorgvuldig op. Als u dit niet doet, kan dit leiden tot onnauwkeurige resultaten.

De gebruiker moet de kwalificatietraining voor het gebruiken van het moleculaire detectiesysteem van Neogen voltooien, zoals beschreven in het document "Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System".[7].

Ontsmet periodiek de tafels en apparatuur (pipetten, instrument voor het plaatsen/verwijderen van doppen, enzovoort) in het laboratorium met een oplossing van water met 1-5% huishoudbleekmiddel of een oplossing voor het verwijderen van DNA.

Zie de sectie 'Specifieke instructies voor gevalideerde methoden' voor specifieke vereisten.

Tabel 3 voor verrijkingsprotocollen conform AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2017.01

Tabel 4 voor verrijkingsprotocollen conform NF-keuringscertificaat 3M 01/18-05/17

Monsterverrijking

In tabel 2, 3 of 4 staan richtlijnen voor verrijkingsprotocollen voor voedsel. Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om alternatieve bemonsteringsprotocollen of verdunningsverhoudingen te valideren om er zeker van te zijn dat deze testmethode voldoet aan de criteria van de gebruiker.

Voedingsmiddelen

1. BPW ISO-verrijkingsmedium voorverwarmen tot 41,5 ± 1 °C.
2. Combineer op aseptische wijze het verrijkingsmedium en het monster volgens tabel 2, 3 of 4. Voor alle vlees- en deeltjesmonsters wordt het gebruik van filterzakken aanbevolen.
3. Homogeniseer behalve bladgroenten en fruit alle matrices grondig door ze gedurende 2 ±0,2 minuten te mengen, te verteren of met de hand te mengen. Incubeer gedurende de juiste tijd op 41,5 ± 1 °C conform tabel 2, 3 of 4.

Tabel 2. Algemene verrijkingsprotocollen

Monstermatrix[a]	Monster-grootte	Hoeveelheid verrijkingsbouillon (mL)	Verrijkings-temperatuur (±1 °C)	Verrijkings-tijd (uur)
Rauw rundvlees inclusief gehakt en snijresten	325 g	975 BPW ISO (voorverwarmd)	41,5	10-18
Rauw vlees, inclusief rauw rundvlees, varkensvlees, gevogelte, lam en bizon	25 g	225 BPW ISO (voorverwarmd)	41,5	8-18
Bladgroenten[b]	200 g	450 BPW ISO (voorverwarmd)	41,5	18-24
Andere voedingsmiddelen zoals fruit[b], groenten, fruit-/groentesappen, verse kruiden, rauwe zeevruchten, rauwe eieren, rauwe melk, koekjesdeeg en verwerkt vlees	25 g	225 BPW ISO (voorverwarmd)	41,5	18-24
Walnoten of notenmixen die walnoten bevatten (dit protocol is geschikt voor andere noten, waaronder pecannoten, amandelen, pistachenoten, cashewnoten en kastanjes)	25 g	225 gereconstitueerde magere melk	41,5	18-24

(a) Bevroren monsters moeten worden geëquilibreerd tussen 4 °C en 8 °C voordat ze worden toegevoegd aan verrijkingsbouillon.

(b) Bladgroeten en fruitmonsters moeten gedurende 5 minuten voorzichtig met de hand worden geschud. Niet mengen of verteren.

Specifieke instructies voor gevalideerde methoden

AOAC® *Official Methods of Analysis*℠ 2017.01

In AOAC *Official Method of Analysis*℠ bleek de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen – *E. coli* O157 (waaronder H7) een effectieve methode voor de detectie van *E. coli* O157:H7. De matrices die in het onderzoek zijn getest, staan in tabel 3.

Tabel 3. Verrijkingsprotocollen met voorverwarmde BPW ISO op 41,5 ± 1 °C conform AOAC® *Official Methods*℠ 2017.01

Monstermatrix	Monster-grootte	Hoeveelheid verrijkings-bouillon (mL)	Verrijkingstijd (uur)	Gehomogeniseerd
Rauw rundergehakt (73% mager)	325 g	975	10-18	Handmatig met de hand of verteren
Rauwe spinazie in zakken[a]	200 g	450	18-24	Voorzichtig gedurende 5 minuten roeren met de hand, niet homogeniseren
Verse spruiten	25 g	225	18-24	Voorzichtig gedurende 5 minuten roeren met de hand, niet homogeniseren
Bevroren bosbessen[a][b]	25 g	225	18-24	Voorzichtig gedurende 5 minuten roeren met de hand, niet homogeniseren

(a) Bladgroeten en fruitmonsters moeten gedurende 5 minuten voorzichtig met de hand worden geschud. Niet mengen of verteren.

(b) Bevroren monsters moeten worden geëquilibreerd tussen 4 °C en 8 °C voordat ze worden toegevoegd aan verrijkingsbouillon.

NF-validatie door AFNOR-certificering:

3M 01/18-05/17

ALTERNATIEVE ANALYSEMETHODEN VOOR DE LANDBOUW

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

Voor meer informatie over het einde van de geldigheid, verwijzen wij u naar het NF VALIDATIE-certificaat op de hierboven genoemde website.

Gecertificeerde NF-VALIDATIE-methode conform ISO 16140-2[8] in vergelijking met ISO 16654[3]

Omvang van de validatie: rauw rundvlees, rauwe zuivelproducten, rauw fruit en rauwe groenten

Monstervoorbereiding: monsters moeten worden geprepareerd conform EN ISO 16654 en EN ISO 6887[6]

Softwareversie: zie het certificaat

Tabel 4. Verrijkingsprotocollen met voorverwarmde BPW ISO op 41,5 ± 1 °C conform de gecertificeerde NL-VALIDATIE-methode 3M 01/18-05/17

Protocol	Monster-grootte	Hoeveelheid verrijkingsbouillon (mL)	Verrijkingstemperatuur (±1 °C)	Verrijkingstijd (uur)
Rauwe zuivelproducten, rauw fruit en rauwe groenten	25 g	225	41,5	18-24
Rauw rundvlees	25 g	225	41,5	8-24

OPMERKINGEN:

- Monsters groter dan 25 g zijn niet getest in het NF VALIDATIE-onderzoek.
- De aanbevolen onderbrekingspunten van het protocol zijn na de verrijking of na de monsterlysis. Verrijkingsbouillon of monsterlysaat kan maximaal 72 uur tussen 2 °C en 8 °C worden bewaard. Nadat de verrijkingsbouillon uit de opslag is gehaald, hervat u de tests vanaf stap 1 in de sectie **Lysis**. Nadat het monsterlysaat uit de opslag is gehaald, hervat u de tests vanaf stap 7 in de sectie **Lysis**. Het lysaat kan ook worden bewaard bij -20 °C.
- Korte verrijkingsprotocollen zijn gevoelig voor incubatieomstandigheden. De in het protocol aangegeven temperaturen moeten daarbij worden aangehouden. De temperatuur van het waterbad of de incubator waar de bouillon wordt voorverwarmd, moet worden gecontroleerd om er zeker van te zijn dat de verrijkingsbouillon de vereiste temperatuur bereikt. De totale tijd voor de preparatie van het monster, met inbegrip van de vertraging tussen het einde van de middelzware voorverwarmingsstap en het begin van de incubatie van het voedselmonster, mag niet meer dan 45 minuten bedragen. Het gebruik van een geventileerde incubator tijdens de incubatie wordt aanbevolen.

Prepareren van de Neogen® Molecular Detection Speed Loader Tray

1. Maak een doek of wegwerphanddoek nat met een huishoudbleekoplossing van 1-5% (v:v in water) en veeg de Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray schoon.
2. Spoel de Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray schoon met water.
3. Veeg de Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray droog met een wegwerphanddoek.
4. Zorg ervoor dat de Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray droog is voordat u die gaat gebruiken.

Prepareren van de Neogen® Molecular Detection Chill Block Insert

Plaats de Neogen Molecular Detection Chill Block Insert op de laboratoriumtafel: De Neogen Molecular Detection Chill Block Tray wordt niet gebruikt. Gebruik het blok op laboratoriumtemperatuur (20 °C tot 25 °C).

Prepareren van de Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert

Plaats de Neogen Molecular Detection Heat Block Insert in een droge dubbele blokverwarmingseenheid. Schakel de droge blokverwarmingseenheid in en stel de temperatuur zo in dat de Neogen Molecular Detection Heat Block Insert een temperatuur van 100 °C ± 1 °C kan bereiken en vasthouden.

OPMERKING: Afhankelijk van de verwarmingseenheid moet u ongeveer 30 minuten wachten totdat de Neogen Molecular Detection Heat Block Insert op temperatuur is. Controleer met een geschikte, geijkte thermometer (bijv. een gedeeltelijke dompelthermometer of digitale thermokoppelthermometer en niet een volledige totale dompelthermometer) op de aangewezen plaats of de temperatuur van het Neogen Molecular Detection Heat Block Insert op 100 °C ± 1 °C staat.

Prepareren van het Neogen® Molecular Detection-instrument

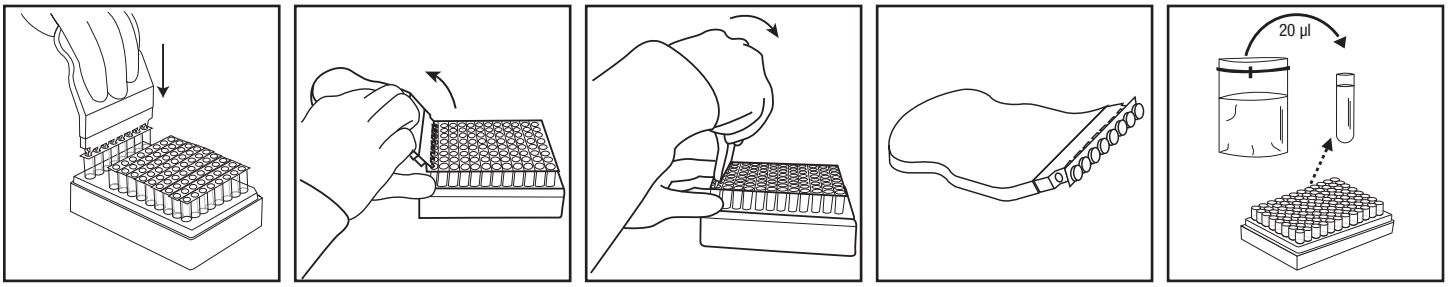
1. Start de moleculaire detectiesoftware van Neogen® en log in. Neem contact op met uw vertegenwoordiger van Neogen Food Safety om er zeker van te zijn dat u de laatst bijgewerkte versie van de software hebt.
2. Schakel het Neogen Molecular Detection-instrument in.
3. Maak of bewerk een run met gegevens voor elk monster. Zie de gebruikershandleiding van het moleculaire detectiesysteem van Neogen® voor meer informatie.

OPMERKING: Het moleculaire detectie-instrument van Neogen moet een temperatuur van 60 °C bereiken en vasthouden voordat de Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray met de reactiebuisjes wordt geplaatst. Deze verwarmingsstap duurt ongeveer 20 minuten en wordt aangegeven door een ORANJE lampje op de statusbalk van het instrument. De statusbalk wordt GROEN wanneer het instrument gereed is om een run te starten.

Lysis

1. Laat de Neogen-buisjes met de lysisoplossing opwarmen door het rek een nacht (16-18 uur) op kamertemperatuur (20 °C tot 25 °C) te laten staan. Een andere manier om de buisjes met de Neogen-lysisoplossing op kamertemperatuur te laten komen, is door zijn die buisjes ten minste 2 uur op een laboratoriumtafel te laten liggen, die buisjes gedurende 1 uur in een incubator van 37 ± 1 °C te incuberen of om ze gedurende 30 seconden bij 100 °C in een droge dubbele blokverwarming te plaatsen.
2. Keer voor het mengen van de oplossing de afgesloten buisjes om. Voer binnen 4 uur de volgende stap uit.
3. Haal de verrijkingsbouillon uit de incubator.
4. Voor elk monster en het monster van de negatieve controle (NC) (steriel verrijkingsmedium) is één buisje met de Neogen-lysisoplossing nodig.
   - 4.1 De strips met de buisjes met de Neogen-lysisoplossing kunnen toe aan het gewenste nummer van het buisje met de Neogen-lysisoplossing worden afgeknipt. Kies het aantal benodigde Neogen-buisjes of strips met 8 buisjes. Plaats de buisjes met de Neogen-lysisoplossing in een leeg rek.
   - 4.2 Om kruisbesmetting te voorkomen, verwijdert u per keer één strip met de buisjes met de Neogen-lysisoplossing en gebruikt u voor elke overdrachtsstap een nieuwe pipetpunt.
   - 4.3 Breng het verrijkte monster over naar het buisje met de Neogen-lysisoplossing zoals hieronder beschreven:

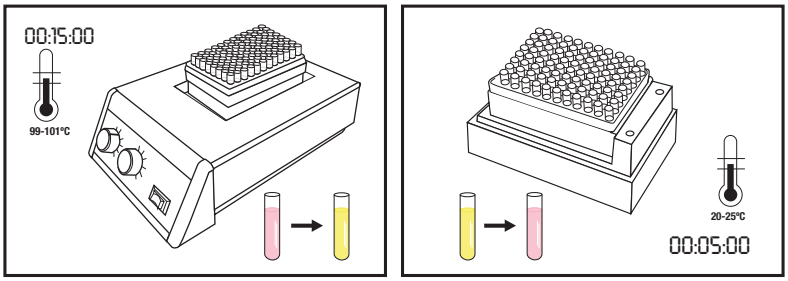
     Breng **eerst** elk verrijkt monster over naar een buisje met de Neogen-lysisoplossing. Breng de NC als **laatste** over.
   - 4.4 Gebruik de tool van het Neogen Molecular Detection-instrument® voor het plaatsen/verwijderen van doppen om de dop van een strip met de buisjes met de Neogen-lysisoplossing te verwijderen. Doe dat voor elke strip afzonderlijk.
   - 4.5 Gooi de dop van het buisje met de Neogen-lysisoplossing weg. Als er nog lysaat over is voor een nieuwe test, plaats de doppen dan in een schone container om ze na de lysis opnieuw aan te brengen.
     - 4.5.1 Zie bijlage A voor de verwerking van het resterende lysaat.
   - 4.6 Breng 20 µL monster over in een buisje met de Neogen-lysisoplossing, tenzij anders aangegeven in de protocoltabellen 2, 3 en 4.



5. Herhaal stap 4.3 totdat elk afzonderlijk monster is toegevoegd aan een corresponderend buisje met de Neogen-lysisoplossing in de strip.
6. Herhaal stap 4.1 tot en met 4.6 voor het aantal monsters dat moet worden getest.
7. Wanneer alle monsters zijn overgebracht, brengt u 20 µL NC (steriel verrijkingsmedium bijv. BPW ISO) over in een buisje met de Neogen-lysisoplossing. Gebruik geen water als NC.
8. Controleer of de temperatuur van de Neogen Molecular Detection Heat Block Insert 100 °C ± 1 °C is.
9. Plaats het niet afgedekte rek met de buisjes met de Neogen-lysisoplossing in de Neogen Molecular Detection Heat Block Insert en verwarm gedurende 15 ±1 minuten. Tijdens het verwarmen verandert de Neogen-lysisoplossing van roze (koel) in geel (heet).

   Monsters die tijdens de assay-lysisstap niet op de juiste manier met hitte zijn behandeld, kunnen als een potentieel biologisch gevaar worden beschouwd en mogen NIET in het Neogen Molecular Detection-instrument worden geplaatst.

10. Verwijder het onbedekte rek met de buisjes met de Neogen-lysisoplossing uit het verwarmingsblok en laat minimaal 5 minuten en maximaal 10 minuten afkoelen in de Neogen Molecular Detection Chill Block Insert. De Neogen Molecular Chill Block Insert, die bij kamertemperatuur wordt gebruikt zonder de Neogen Molecular Detection Chill Block Tray, moet direct op een laboratoriumtafel worden geplaatst. Als die is afgekoeld, is de lysisoplossing weer roze van kleur.
11. Verwijder het rek met buisjes met de Neogen-lysisoplossing uit de Neogen Molecular Detection Chill Block Insert.

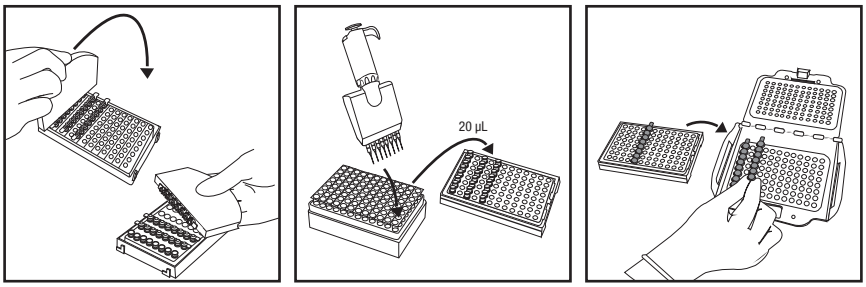


Amplificatie

1. Er is één moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) reagensbuisje voor elk monster en de NC nodig.
   1.1 Strips met buisjes kunnen tot elk gewenst buisjesnummer worden afgeknipt. Selecteer het aantal benodigde moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) reagensbuisjes of strips met 8 buisjes.
   1.2 Plaats de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) reagensbuisjes in een leeg rek.
   1.3 Verstoor de reagenspellets onder in de buisjes niet.
2. Selecteer één Neogen-reagenscontrolebuisje en plaats dat in het rek.
3. Om kruisbesmetting te voorkomen, verwijdert u per keer één strip met de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) reagensbuisjes en gebruikt u voor elke overdrachtsstap een nieuwe pipetpunt.
4. Breng zoals hieronder beschreven, lysaat over naar een moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) reagensbuisje en een Neogen-reagenscontrolebuisje:

Breng **eerst** elk monsterlysaat over naar een moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - E. coli O157 (waaronder H7) reagensbuisje gevolgd door de NC. Hydrateer het Neogen-reagenscontrolebuisje als **laatste.**

5. Gebruik de tool van het Neogen Molecular Detection-instrument® voor het plaatsen/verwijderen van doppen van de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) reagensbuisje, één strip met buisjes per keer. Gooi de doppen weg.
   5.1 **Breng 20 µL monsterlysaat uit de bovenste helft van de vloeistof (voorkom neerslag) in het buisje met Neogen-lysisoplossing over naar het overeenkomstige** moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) **reagensbuisje. Doseer onder een hoek om verstoring van de pellets te voorkomen. Meng de vloeistof door voorzichtig 5 keer op en neer te pipetteren.**
   5.2 Herhaal stap 5.1 totdat elk monsterlysaat is toegevoegd aan een overeenkomstig moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) reagensbuisje in de strip.
   5.3 Sluit de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) reagensbuisjes af met de bijgeleverde extra doppen en gebruik de afgeronde kant van de tool van het Neogen Molecular Detection-instrument voor het plaatsen/verwijderen van doppen om druk uit te oefenen in een heen-en-weergaande beweging om ervoor te zorgen dat de dop stevig vastzit.
   5.4 Herhaal stap 5.1 tot en met 5.3 voor het aantal monsters dat moet worden getest.
   5.5 Herhaal wanneer alle monsterlysaten zijn overgebracht, stap 5.1 tot en met 5.3 om 20 µL NC-lysaat over te brengen in een moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) reagensbuisje.
   5.6 Breng **20 µL <u>NC-lysaat</u> over naar een Neogen-reagenscontrolebuisje.** Doseer onder een hoek om verstoring van de pellets te voorkomen. Meng de vloeistof door voorzichtig 5 keer op en neer te pipetteren.
6. Plaats afgedekte buisjes in een schone en ontsmette Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray. Sluit en vergrendel vervolgens de klep.



7. Controleer en bevestig de geconfigureerde run in de moleculaire detectiesoftware van Neogen.
8. Klik op de Start-knop in de software en selecteer het instrument dat u wilt gaan gebruiken. De klep van het geselecteerde instrument wordt automatisch geopend.
9. Plaats de Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray in het Neogen Molecular Detection-instrument en sluit de klep om de test te starten. De resultaten zijn binnen 60 minuten beschikbaar, hoewel positieve resultaten eerder kunnen worden aangegeven.
10. Verwijder nadat de assay is voltooid, de Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray uit het Neogen Molecular Detection-instrument en gooi de besmette buisjes altijd weg door ze eerst een uur lang in water met 1-5% bleekmiddel ergens uit de buurt van de ruimte waar de assays worden geprepareerd, te laten weken.

OPMERKING: Om het risico op valse positieven als gevolg van kruisbesmetting tot een minimum te beperken, mag u nooit reagensbuisjes openen die geamplificeerd DNA bevatten. Dit betreft de Neogen-reagenscontrole, moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) reagensbuisjes en de Neogen-matrixcontrolebuisjes. Gooi de verzegelde reagensbuisjes altijd weg door ze eerst een uur lang in water met 1-5% bleekmiddel ergens uit de buurt van de ruimte waar de assays worden geprepareerd, te laten weken.

Resultaten en interpretatie

Een algoritme interpreteert de lichtuitgangscurve die het resultaat is van de detectie van de nucleïnezuuramplificatie. De resultaten worden automatisch geanalyseerd door de software en krijgen een kleurcode op basis van het resultaat. Een positief of negatief resultaat wordt bepaald door de analyse van een aantal unieke curveparameters. Vermoedelijke positieve resultaten worden in realtime gerapporteerd, terwijl negatieve resultaten worden weergegeven nadat de run is uitgevoerd.

Vermoedelijk positieve monsters moeten worden bevestigd volgens de standaardwerkwijzen van het laboratorium of door de juiste referentiemethode te bevestigen[1,2,3], te beginnen met het overbrengen van de primaire BPW ISO-verrijkingsbouillon naar een secundaire verrijkingsbouillon, gevolgd door de platering en bevestiging van isolaten met behulp van geschikte biochemische en serologische methoden.

OPMERKING: Zelfs een negatief monster geeft geen nulwaarde, omdat het systeem en de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) amplificatiereagentia een "achtergrond" RLU-aflezing (relatieve lichteenheid) hebben.

In het zeldzame geval van een ongebruikelijke lichtopbrengst wordt dit door het algoritme als "Inspect" gelabeld. Neogen raadt de gebruiker aan om de test voor alle Inspect-monsters te herhalen. Als het resultaat Inspect blijft, ga dan met behulp van uw voorkeursmethode of zoals aangegeven in de lokale regelgeving verder met de bevestigingstest.

In het geval van discordante resultaten (vermoedelijk positief met de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7), niet-bevestigd door een van de hierboven beschreven middelen, en in het bijzonder voor de latexagglutinatietest), moet het laboratorium de nodige stappen ondernemen om de geldigheid van de verkregen resultaten te garanderen.

Bevestiging van resultaten volgens de door NF VALIDATIE gecertificeerde methode

In de context van de NF VALIDATIE moeten alle monsters die als positief zijn geïdentificeerd door de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7), door een van de volgende tests worden bevestigd:

Optie 1: Gebruiken van de ISO 16654[3]-standaard op basis van verrijking met gebufferd peptonwater[3].

Optie 2: Implementeren van een bevestigingsmethode die bestaat uit het volgende: Smeer 50 µL gebufferd peptonwater[3] als verrijking op een Cefixime Potassium Tellurite Sorbitol MacConkey (CT-SMAC)[3] agarplaat. Incubeer gedurende 24 ±3 uur bij 37 °C. Smeer karakteristieke kolonies op voedingsagar en voer de latexagglutinatietest direct op de geïsoleerde kolonies uit. Als de resultaten van de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7) niet zijn bevestigd, voer dan een immunomagnetische scheidingsstap uit en smeer vervolgens 50 µL op CT-SMAC.

Optie 3: Het gebruiken van nucleïnezuurprobes zoals beschreven in de norm EN ISO 7218[5], uitgevoerd op geïsoleerde kolonies (al dan niet gezuiverd) van CT-SMAC (zie optie 1 of 2). De nucleïnezuurprobes moeten anders zijn dan die worden gebruikt in de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7).

Optie 4: Bij gebruik van elke andere door NF VALIDATIE gecertificeerd methode, moet het principe verschillend zijn van de moleculaire detectie-assay 2 van Neogen - *E. coli* O157 (waaronder H7). Het volledige protocol dat wordt beschreven voor deze tweede gevalideerde methode, moet worden gebruikt. Alle stappen voorafgaand aan het begin van de bevestiging moeten voor beide methoden dezelfde stappen zijn.

In het geval van discordante resultaten (vermoedelijk positief met de andere methode, niet-bevestigd door een van de hierboven beschreven middelen) moet het laboratorium de nodige stappen ondernemen om de geldigheid van de verkregen resultaten te garanderen.

Als u vragen hebt over specifieke toepassingen of procedures, bezoek dan onze website op www.neogen.com of neem contact op met uw plaatselijke vertegenwoordiger of distributeur van Neogen.

Bijlage A. Protocolonderbreking: bewaren en opnieuw testen van monsters

1. Om een warmtebehandeld lysaat te bewaren, sluit u het lysisbuisje opnieuw af met een schone dop. (Zie **Lysis** sectie 4.5)
2. Om een verrijkt monster te bewaren, moet er minimaal 18 uur voorafgaan aan het bewaren worden geïncubeerd.
3. Bewaar maximaal 72 uur tussen 4 °C en 8 °C.
4. Prepareer een bewaard monster voor amplificatie door dat 2-3 keer om te keren om te mengen.
5. Haal de doppen van de buisjes.
6. Plaats de gemengde lysaatbuisjes in de Neogen Molecular Detection Heat Block Insert en verwarm gedurende 5 minuten ±1 minuut tot 100 °C ± 1 °C.
7. Verwijder het rek met buisjes met de Neogen-lysisoplossing uit het verwarmingsblok en laat minimaal 5 minuten en maximaal 10 minuten afkoelen in de Neogen Molecular Detection Chill Block Insert.
8. Ga verder met het protocol zoals hierboven in de sectie **Amplificatie** staat beschreven.

Referenties:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Hoofdstuk 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli.* November 2015.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 5.09. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. Ingangsdatum: 15 januari 2015.
3. ISO 16654:2001 Microbiologie van voedingsmiddelen en diervoeders - Horizontale methode voor de detectie van *Escherichia coli* O157.
4. ISO/IEC 17025. Algemene eisen voor de competentie van test- en kalibratielaboratoria.
5. ISO 7218. Microbiologie van voedingsmiddelen en diervoeders - Algemene eisen en richtlijn voor microbiologische onderzoek.
6. ISO 6887. Microbiologie van voedingsmiddelen en diervoeders - Voorbereiding van monsters en bereiding van verdunningen voor microbiologisch onderzoek.
7. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Neogen Food Safety.

Uitleg van de symbolen

info.neogen.com/symbols

AOAC is een geregistreerd handelsmerk van AOAC INTERNATIONAL

Official Methods is een geregistreerd dienstmerk van AOAC INTERNATIONAL

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

NEOGEN®

Produktinstruktioner

Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7)

Produktbeskrivning och avsedd användning

Neogen® Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) används med Neogen® Molecular Detection System för snabb och specifik detektion av *E. coli* O157 (inklusive H7) i berikade livsmedel och foderprover.

Neogens molekylära detektionsanalyser använder loopmedierad isotermisk amplifiering för snabb amplifiering av nukleinsyrasekvenser med hög specificitet och sensitivitet, kombinerat med bioluminescens för att detektera amplifieringen. Presumtivt positiva resultat rapporteras i realtid, och negativa resultat visas efter att analysen är slutförd. Presumtivt positiva resultat ska bekräftas med den metod du föredrar eller så som specificeras i lokala bestämmelser[1, 2, 3].

Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) är avsedd för användning i laboratoriemiljö av yrkespersoner med utbildning i laboratorieteknik. Neogen har inte dokumenterat användningen av denna produkt i andra branscher än livsmedel eller drycker. Neogen har exempelvis inte dokumenterat denna produkt för testning av miljö-, läkemedels- eller kosmetikaprover, eller kliniska eller veterinärmedicinska prover. Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) har inte utvärderats med alla tänkbara livsmedelsprodukter, livsmedelsbearbetningar, testningsprotokoll eller med alla tänkbara bakteriestammar.

Som med alla testmetoder kan anrikningssubstratets ursprung, sammansättning och kvalitet påverka resultaten. Faktorer som provtagningsmetoder, testningsprotokoll, provberedning, hantering och laboratorieteknik kan också påverka resultaten. Neogen rekommenderar utvärdering av metoden som innefattar anrikningssubstrat i användarens miljö med ett tillräckligt antal prover med särskilda livsmedel och mikrobiella utmaningar för att säkerställa att metoden uppfyller användarens kriterier.

Neogen har utvärderat Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) med buffrat peptonvatten ISO.

Neogen® Molecular Detection Instrument är avsett för användning med prover som genomgått värmebehandling under analysens lyseringssteg, som är utformat för att förstöra organismer som förekommer i provet. Prover som inte har värmebehandlats ordentligt under analysens lyseringssteg kan betraktas som en potentiell biologisk risk och ska INTE infogas i Neogen Molecular Detection Instrument.

Neogen Food Safety är certifierat mot ISO (Internationella standardiseringsorganisationen) 9001 för design och tillverkning.

Testkitet Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) innehåller 96 test som beskrivs i Tabell 1.

Tabell 1. Neogen Molekylär Detektionsanalys – kitets komponenter

Artikel	Identifiering	Kvantitet	Innehåll	Kommentarer
Neogen® Lysis Solution (LS)	Rosa lösning i transparenta rör	96 (12 remsor med 8 rör vardera)	580 µl Neogen Lysis Solution per rör	I ställ, redo för användning
Reagensrör för Neogen® Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7)	Rosa rör	96 (12 remsor med 8 rör vardera)	Lyofiliserad specifik amplifierings- och detektionsblandning	Redo för användning
Extra lock	Rosa lock	96 (12 remsor med 8 lock vardera)		Redo för användning
Neogen® Reagent Control (RC)	Transparenta rör med fällbara lock	16 (2 påsar med 8 separata rör)	Lyofiliserad kontroll-DNA, amplifierings- och detektionsblandning	Redo för användning

Den negativa kontrollen (ingår inte i kitet) är ett sterilt anrikningssubstrat, t.ex. BPW ISO. Använd inte vatten som negativ kontroll.

Säkerhet

Användaren ska läsa, förstå och följa all säkerhetsinformation i instruktionerna för Neogen Molecular Detection System och Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7). Spara säkerhetsinstruktionerna för framtida referens.

⚠ **VARNING!** Indikerar en riskabel situation som, om den inte undviks, kan leda till dödsfall eller allvarlig personskada och/eller materiell skada.

OBS! Indikerar en potentiellt riskabel situation som, om den inte undviks, kan leda till materiell skada.

⚠ VARNING!

Använd inte Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) i diagnostisering av tillstånd hos människor eller djur.

Användaren måste utbilda sin personal i aktuella tekniker för korrekt testning: exempelvis god laboratoriepraxis, ISO/IEC 17025[4] eller ISO 7218[5].

För att minska riskerna som är förenade med att ett falskt negativt resultat medför utgivning av kontaminerad produkt:

- Följ protokollet och utför testerna exakt så som anges i produktinstruktionerna.
- Använd substrat som förvärmts till 41,5 ±1 °C. Låt inte substratet sjunka till under inkuberingstemperaturområdet under provberedningen.
- Förvara Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) så som anges på förpackningen och i produktinstruktionerna.
- Använd alltid Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) före utgångsdatumet.
- Använd Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) med prover från livsmedel, foder och miljöer för livsmedelsbearbetning som har validerats internt eller av tredje part.
- Använd Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) endast med ytor, desinficeringsmedel, protokoll och bakteriestammar som har validerats internt eller av tredje part.
- För ett miljöprov som innehåller neutraliserande buffert (NB) med arylsulfonatkomplex ska en 1:2-spädning göras före testning (1 del prov i 1 del steril anrikningsbuljong). Ett annat alternativ är att överföra 10 µl av det neutraliserande buffertsubstratet till Neogen Lysis Solution-rören. Neogen® provhanteringsprodukter som innefattar Neogen® Neutralizing Buffer med arylsulfonatkomplex: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XSLSSL10NB, HS10NB och HS119510NB.

För att minska riskerna som är förenade med exponering för kemikalier och biologiska risker:

- Utför patogentestning i ett rätt utrustat laboratorium under tillsyn av utbildad personal. Inkuberade anrikningssubstrat, och utrustning eller ytor som har kommit i kontakt med inkuberade anrikningssubstrat, kan innehålla tillräckliga halter av patogener för att utgöra en hälsorisk för människor.
- Följ alltid standardpraxis för laboratoriesäkerhet, däribland användning av tillämpliga skyddskläder och ögonskydd, vid hantering av reagens och kontaminerade prover.
- Undvik kontakt med innehållet i anrikningssubstratet och reagensrören efter amplifiering.
- Kassera anrikade prover och tillhörande kontaminerat avfall i enlighet med aktuella lokala, regionala eller nationella standarder eller branschstandarder.
- Överskrid inte den rekommenderade temperaturinställningen för värmeaggregatet.
- Överskrid inte den rekommenderade uppvärmningstiden.
- Bekräfta temperaturen på Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert med en lämplig kalibrerad termometer (t.ex. en dopptermometer eller ett digitalt termoelement, inte en termometer för total nedsänkning). Termometern måste placeras på det angivna stället i Neogen Molecular Detection Heat Block Insert.

För att minska riskerna som är förenade med korskontaminering under analysförberedelsen:

- Använd alltid handskar (för att skydda användaren och förebygga uppkomst av nukleaser).

För att minska riskerna som är förenade med exponering för heta vätskor:

- Överskrid inte den rekommenderade temperaturinställningen för värmeaggregatet.
- Överskrid inte den rekommenderade uppvärmningstiden.
- Bekräfta temperaturen på Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert med en lämplig kalibrerad termometer (t.ex. en dopptermometer eller ett digitalt termoelement, inte en termometer för total nedsänkning). Termometern måste placeras på det angivna stället i Neogen Molecular Detection Heat Block Insert.

OBS!

För att minska riskerna som är förenade med korskontaminering under analysförberedelsen:

- Användning av sterila, aerosolresistenta (filtrerade) pipettspetsar av molekylärbiologiklass rekommenderas.
- Använd en ny pipettspets för varje provöverföring.
- Tillämpa god laboratoriepraxis för överföring av provet från substratet till lyseringsröret. För att undvika pipettorkontaminering kan användaren välja att lägga till ett mellanliggande överföringssteg. Användaren kan exempelvis överföra vardera anrikat prov till ett sterilt rör.
- Använd en arbetsstation för molekylärbiologi med bakteriedödande lampa, om sådan är tillgänglig.

För att minska riskerna som är förenade med ett falskt positivt resultat:

- Öppna aldrig rör efter amplifieringen.
- Hantera alltid de kontaminerade rören genom blötläggning i en 1–5 % lösning (volym:volymprocent i vatten) med blekmedel för hushållsbruk i 1 timme, på avstånd från området för analysförberedelse.

Se säkerhetsdatabladet för ytterligare information och lokala bestämmelser om kassering.

Om du har frågor om specifika tillämpningar eller procedurer, besök vår webbplats på www.neogen.com eller kontakta din lokala Neogen-representant eller -distributör.

Användarens ansvar

Användare ansvarar för att bekanta sig med produktinstruktioner och information. Besök vår webbplats på **www.neogen.com**, eller kontakta din lokala Neogen-representant eller -distributör för mer information.

Vid val av testmetod är det viktigt att inse att externa faktorer som provtagningsmetoder, testprotokoll, provberedning, hantering och laboratorieteknik kan påverka resultaten.

Användaren ansvarar vid val av testmetod eller produkt för att utvärdera ett tillräckligt antal prover med tillämpliga matriser och mikrobiella utmaningar för att försäkra sig om att den valda testmetoden uppfyller de egna kriterierna.

Användaren ansvarar även för att fastställa att testmetoder och resultat uppfyller kraven från dennas kunder och leverantörer.

Som med alla testmetoder utgör erhållna resultat efter användning av någon Neogen Food Safety-produkt ingen garanti för testade matrisers eller processers kvalitet.

Till hjälp för kunders utvärdering av metoden för olika livsmedelsmatriser har Neogen utvecklat Neogen® Molecular Detection Matrix Control-kitet. Använd vid behov Matrix Control (MC) för att fastställa om matrisen skulle kunna påverka resultaten för Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7). Testa flera prover som är representativa för matrisen, dvs. prover från olika källor, under en valideringsperiod när Neogen-metoden tillämpas, eller vid testning av nya eller obekanta matriser eller matriser som genomgått förändringar vad gäller råmaterial eller process.

En matris kan definieras som en typ av produkt som har inbyggda egenskaper, såsom sammansättning och process. Skillnaderna mellan matriser kan vara så enkla som effekter orsakade av skillnader i deras behandling eller utformning, exempelvis rå kontra pastöriserad, färsk kontra torkad osv.

Begränsning av garantier/begränsad gottgörelse

MED UNDANTAG FÖR VAD SOM ANGES I AVSNITT OM BEGRÄNSAD GARANTI FÖR EN ENSKILD PRODUKTFÖRPACKNING, FRISKRIVER SIG NEOGEN FRÅN SAMTLIGA UTTRYCKLIGA OCH UNDERFÖRSTÅDDA GARANTIER INKLUSIVE, MEN INTE BEGRÄNSAT TILL, GARANTIER OM KOMMERSIELL GÅNGBARHET ELLER LÄMPLIGHET FÖR NÅGOT VISST SYFTE. Om någon Neogen Food Safety-produkt är defekt kommer Neogen eller dess godkända distributör att efter eget val ersätta produkten eller återbetala inköpspriset för denna. Detta är dina exklusiva gottgörelser. Du måste meddela Neogen inom sextio dagar efter upptäckten av misstänkta defekter i en produkt och returnera den till Neogen. Kontakta din Neogen-representant eller en godkänd Neogen-distributör om du har fler frågor.

Begränsning av Neogens ansvar

NEOGEN ANSVARAR INTE FÖR EVENTUELL FÖRLUST ELLER SKADA, VARE SIG DIREKT, INDIREKT ELLER OFÖRUTSEDD SKADA ELLER FÖLJDSKADA, INKLUSIVE MEN INTE BEGRÄNSAT TILL, UTEBLIVEN VINST. Neogens ansvar ska under inga omständigheter enligt någon rättsteori överstiga inköpspriset för den produkt som påstås vara defekt.

Förvaring och kassering

Förvara Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) vid 2–8 °C. Får ej frysas. Kitet ska skyddas från ljus under förvaring. Kontrollera efter att ha öppnat kitet att foliepåsen är oskadad. Om påsen är skadad ska produkten inte användas. Efter öppnandet ska oanvända reagensrör alltid förvaras i den återförslutningsbara påsen med torkmedlet inuti för att bibehålla stabiliteten hos den lyofiserade reagensen. Återförslutna påsar ska förvaras vid 2–8 °C i högst 60 dagar.

Använd inte Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) efter utgångsdatumet. Utgångsdatum och partinummer anges på lådans utsida. Efter användning kan anrikningssubstratet och rören för Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) potentiellt innehålla patogena material. När testningen är slutförd ska gällande branschstandarder för kassering av kontaminerat avfall följas. Se säkerhetsdatabladet för ytterligare information och lokala bestämmelser om kassering.

Instruktioner för användning

Följ alla instruktioner noga. Om dessa åsidosätts kan det leda till felaktiga resultat.

Användaren ska genomgå kvalificeringsutbildningen för Neogen Molecular Detection System-operatörer enligt beskrivningen i dokumentet ”Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System”[7].

Dekontaminera regelbundet laboratoriebänkar och utrustning (pipetter, verktyg för påsättning/avtagning av lock osv.) med en 1–5 % lösning (volym:volymprocent i vatten) med blekmedel för hushållsbruk eller DNA-borttagningslösning.

Se avsnittet ”Särskilda instruktioner för validerade metoder” för specifika krav:

Tabell 3 för anrikningsprotokoll enligt AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2017.01

Tabell 4 för anrikningsprotokoll enligt NF Validation-certifikat 3M 01/18-05/17

Anrikning av prover

Tabell 2, 3 eller 4 ger vägledning om anrikningsprotokoll för livsmedel. Användaren ansvarar för att validera alternativa provtagningsprotokoll eller spädningskvoter för att säkerställa att denna testmetod uppfyller användarens kriterier.

Livsmedel

1. Förvärm BPW ISO-anrikningssubstratet till 41,5 ±1 °C.
2. Förena anrikningssubstratet och provet aseptiskt enligt Tabell 2, 3 eller 4. För allt kött och partikelrika prover rekommenderas användning av filterpåsar.
3. Homogenisera noga alla matriser utom bladprodukter och frukt genom att blanda kraftigt i mixer eller för hand i 2 ±0,2 minuter. Inkubera i 41,5 ±1 °C under tillämplig tid enligt Tabell 2, 3 eller 4.

Tabell 2. Allmänna anrikningsprotokoll

Provmatris[a]	Provstorlek	Anrikningsbuljong, volym (mL)	Anrikningstemperatur (±1 °C)	Anrikningstid (timmar)
Rått nötkött inklusive köttfärs och puts	325 g	975 BPW ISO (förvärmd)	41,5	10-18
Rått kött inklusive rått nötkött, fläsk, fågel, lamm och bison	25 g	225 BPW ISO (förvärmd)	41,5	8-18
Bladprodukter[b]	200 g	450 BPW ISO (förvärmd)	41,5	18-24
Andra livsmedel inklusive frukt[b], grönsaker, frukt-/grönsaksjuicer, färska örter, rå fisk/skaldjur, råa ägg, råmjölk, kakdeg och bearbetat kött	25 g	225 BPW ISO (förvärmd)	41,5	18-24
Valnötter eller nötblandningar innehållande valnötter (detta protokoll är tillämpligt på andra nötter inklusive pekannötter, mandlar, pistagenötter, cashewnötter och kastanjer,	25 g	225 rekonstituerat skummjölkspulver	41,5	18-24

(a) Frysta prover ska harmoniseras till 4–8 °C före tillsättning till anrikningsbuljong.

(b) Bladprodukt- och fruktprover ska skakas om lätt för hand i 5 minuter. Blanda inte i mixer.

Särskilda instruktioner för validerade metoder

AOAC® *Official Methods of Analysis*℠ 2017.01

I programmet AOAC *Official Method of Analysis*℠ befanns Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) vara en effektiv metod för detektion av *E. coli* O157:H7. Matriserna som testades i studien visas i Tabell 3.

Tabell 3. Anrikningsprotokoll med förvärmd BPW ISO vid 41,5 ±1 °C enligt AOAC® *Official Methods*℠ 2017.01

Provmatris	Provstorlek	Anrikningsbuljong, volym (mL)	Anrikningstid (timmar)	Homogeniserad
Rå köttfärs (73 % mager)	325 g	975	10-18	Manuellt för hand eller i mixer
Rå spenat i påse[a]	200 g	450	18-24	Lätt omskakad för hand i 5 minuter, homogenisera inte
Färska groddar	25 g	225	18-24	Lätt omskakad för hand i 5 minuter, homogenisera inte
Frysta blåbär[a][b]	25 g	225	18-24	Lätt omskakad för hand i 5 minuter, homogenisera inte

(a) Bladprodukt- och fruktprover ska skakas om lätt för hand i 5 minuter. Blanda inte i mixer.

(b) Frysta prover ska harmoniseras till 4–8 °C före tillsättning till anrikningsbuljong.

NF Validation genom AFNOR-certifiering

3M 01/18-05/17

ALTERNATIVA ANALYSMETODER FÖR AGRI-VERKSAMHETER

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

För mer information om validitetens upphörande, se NF VALIDATION-certifikat på webbplatsen som nämns ovan.

NF VALIDATION-certifierad metod som uppfyller ISO 16140-2[8] i jämförelse med ISO 16654[3]

Valideringens omfattning: Rått nötkött, råa mejeriprodukter, råa frukter och grönsaker

Provberedning: Prover ska beredas i enlighet med EN ISO 16654 och EN ISO 6887[6]

Programvaruversion: Se certifikat

Tabell 4. Anrikningsprotokoll med förvärmd BPW ISO vid 41,5 ±1 °C enligt NF VALIDATION-certifierad metod 3M 01/18-05/17

Protokoll	Provstorlek	Anrikningsbuljong, volym (mL)	Anrikningstemperatur (±1 °C)	Anrikningstid (timmar)
Råa mejeriprodukter, rå frukt och råa grönsaker	25 g	225	41,5	18-24
Rått nötkött	25 g	225	41,5	8-24

OBS!

- Prover överstigande 25 g har inte testats i NF VALIDATION-studien.
- De rekommenderade protokollavbrottspunkterna är efter anrikning eller efter provlysering. Anrikningsbuljong eller provlysat kan förvaras vid 2–8 °C i upp till 72 timmar. Efter att ha tagit fram anrikningsbuljongen från förvaret, återuppta testning från steg 1 i avsnittet **Lysering**. Efter att ha tagit fram provlysatet från förvaret, återuppta testning från steg 7 i avsnittet **Lysering**. Lysatet kan även förvaras vid -20 °C.
- Korta anrikningsprotokoll är känsliga för inkuberingsförhållanden, och de temperaturer som anges i protokollet måste följas. Temperaturen i vattenbadet eller inkubatorn där buljongerna förvärms bör bekräftas för att säkerställa att anrikningsbuljongen uppnår den temperatur som krävs. Den totala tiden för provberedning, inklusive fördröjningen mellan slutet av substratuppvärmningssteget och början av inkuberingen av livsmedelsprovet, får inte överstiga 45 minuter. Under inkuberingen rekommenderas användning av en ventilerad inkubator.

Förbereda Neogen® Molecular Detection Speed Loader Tray

1. Blöt en duk eller pappershandduk i en 1–5 % lösning (volym:volymprocent i vatten) med blekmedel för hushållsbruk och torka av Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray.
2. Skölj Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray med vatten.
3. Torka Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray torr med en pappershandduk.
4. Se till att Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray är torr innan den används.

Förbereda Neogen® Molecular Detection Chill Block Insert

Placera Neogen Molecular Detection Chill Block Insert direkt på laboratoriebänken: Neogen Molecular Detection Chill Block Tray används inte. Använd blocket i omgivande laboratorietemperatur (20–25 °C).

Förbereda Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert

Placera Neogen Molecular Detection Heat Block Insert i en torr värmeenhet för dubbla block: Slå på torrblocksvärmeenheten och ställ in temperaturen så att Neogen Molecular Detection Heat Block Insert uppnår och bibehåller en temperatur på 100 ±1 °C.

OBS! Beroende på värmeenhet, räkna med cirka 30 minuter för att Neogen Molecular Detection Heat Block Insert ska uppnå temperaturen. Använd en lämplig kalibrerad termometer (t.ex. en dopptermometer eller ett digitalt termoelement, inte en termometer för total nedsänkning) placerad på det angivna stället, och bekräfta att temperaturen på Neogen Molecular Detection Heat Block Insert är 100 ±1 °C.

Förbereda Neogen® Molecular Detection Instrument

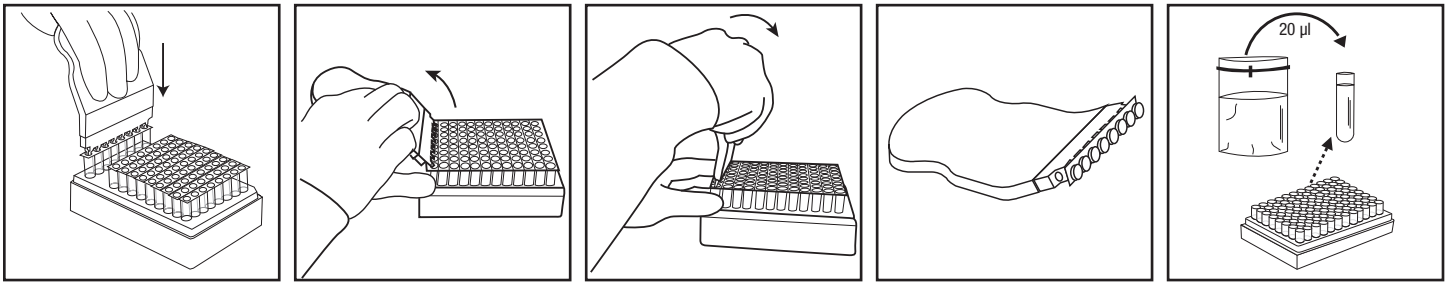
1. Starta Neogen® Molecular Detection-programmet och logga in. Kontakta din Neogen Food Safety-representant för att försäkra dig om att du har den senast uppdaterade versionen av programvaran.
2. Slå på Neogen Molecular Detection Instrument.
3. Skapa eller redigera en körning med data för varje prov. Se användarhandboken till Neogen® Molecular Detection System för utförligare information.

OBS! Neogen Molecular Detection Instrument måste uppnå och bibehålla en temperatur på 60 °C innan Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray med reaktionsrör sätts in. Detta uppvärmningssteg tar cirka 20 minuter och indikeras av en ORANGE lampa i instrumentets statusfält. När instrumentet är redo att starta en körning blir statusfältet GRÖNT.

Lysering

1. Låt Neogen Lysis Solution-rören värmas upp genom att låta stället stå i rumstemperatur (20-25 °C) under natten (16–18 timmar). Alternativ för harmonisering av Neogen Lysis Solution-rören till rumstemperatur är att ställa Neogen Lysis Solution-rören på laboratoriebänken i minst 2 timmar, inkubera Neogen Lysis Solution-rören i en inkubator med en temperatur på 37 ±1 °C i 1 timme, eller placera dem i ett torrt värmeaggregat för dubbla block i 30 sekunder vid 100 °C.
2. Vänd upp och ned på rören med lock för att blanda. Gå vidare till nästa steg inom 4 timmar.
3. Ta ut anrikningsbuljongen ur inkubatorn.
4. Ett Neogen Lysis Solution-rör behövs för varje prov och provet för negativ kontroll (NC) (sterilt anrikningssubstrat).
   - 4.1 Remsorna med Neogen Lysis Solution-rör kan klippas av med önskat antal Neogen Lysis Solution-rör. Välj det antal enskilda Neogen Lysis Solution-rör eller remsor med 8 rör som behövs. Placera Neogen Lysis Solution-rören i ett tomt ställ.
   - 4.2 Undvik korskontaminering genom att ta av locket på en Neogen Lysis Solution-rörremsa i taget och använd en ny pipettspets för varje överföringssteg.
   - 4.3 Överför anrikat prov till Neogen Lysis Solution-rör enligt beskrivningen nedan:

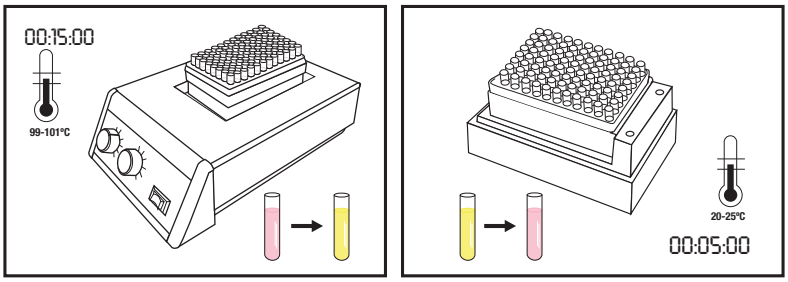
     Överför varje anrikat prov till ett enskilt Neogen Lysis Solution-rör **först.** Överför NC:n **sist.**
   - 4.4 Ta av locket på en remsa med Neogen Lysis Solution-rör i taget med Neogen® Molecular Detection Cap/Decap Tool-Lysis.
   - 4.5 Kassera Neogen Lysis Solution-rörets lock – Om lysat ska sparas för omtestning, placera locken i en ren behållare för återanvändning efter lysering.
     - 4.5.1 För behandling av sparat lysat, se Bilaga A.
   - 4.6 Överför 20 µl av provet till ett Neogen Lysis Solution-rör såvida inget annat anges i protokolltabellerna 2, 3 och 4.



5. Upprepa steg 4.3 tills varje enskilt prov har tillsatts till ett motsvarande Neogen Lysis Solution-rör på remsan.
6. Upprepa steg 4.1 till 4.6 vid behov för det antal prover som ska testas.
7. När alla prover har överförts ska 20 µl NC (sterilt anrikningssubstrat, t.ex. BPW ISO) överföras till ett Neogen Lysis Solution-rör. Använd inte vatten som NC.
8. Kontrollera att Neogen Molecular Detection Heat Block Insert har en temperatur på 100 ±1 °C.
9. Placera det avtäckta stället med Neogen Lysis Solution-rör i Neogen Molecular Detection Heat Block Insert och värm i 15 ±1 minuter. Under uppvärmningen ändrar Neogen Lysis Solution-lösningen färg från rosa (sval) till gul (varm).

   Prover som inte har värmebehandlats ordentligt under analysens lyseringssteg kan betraktas som en potentiell biologisk risk och ska INTE infogas i Neogen Molecular Detection Instrument.

10. Ta bort det avtäckta stället med Neogen Lysis Solution-rör från värmeblocket och låt svalna i Neogen Molecular Detection Chill Block Insert i minst 5 minuter och högst 10 minuter. Neogen Molecular Chill Block Insert, som används i omgivningstemperatur utan Neogen Molecular Detection Chill Block Tray, ska stå direkt på laboratoriebänken. När den har svalnat återfår lyseringslösningen sin rosa färg.
11. Ta bort stället med Neogen Lysis Solution-rör från Neogen Molecular Detection Chill Block Insert.

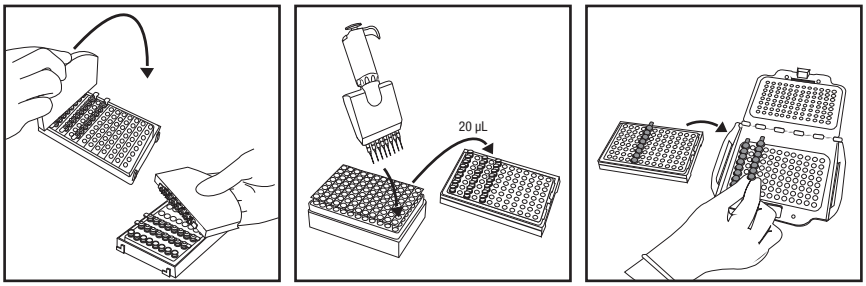


Amplifiering

1. Ett reagensrör för Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) behövs för varje prov och NC:en.
   - 1.1 Rörremsor kan klippas av med önskat antal rör. Välj det antal enskilda reagensrör eller remsor med 8 rör för Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) som behövs.
   - 1.2 Placera reagensrör för Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) i ett tomt ställ.
   - 1.3 Undvik att rubba reagenspelletsen från rörens botten.
2. Välj ett Neogen Reagent Control-rör och placera det i stället.
3. Undvik korskontaminering genom att ta av locket på en Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7)-remsa med reagensrör i taget, och använd en ny pipettspets för varje överföringssteg.
4. Överför lysat till ett reagensrör för Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) och Neogen Reagent Control-rör enligt beskrivningen nedan:

   Överför alla provlysat till enskilda reagensrör för Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) **först,** följt av NC:en Hydratisera Neogen Reagent Control-röret **sist.**

5. Använd Neogen® Molecular Detection Cap/Decap Tool-Reagent för att ta av locket på reagensröret för Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) – en rörremsa i taget. Kassera locket.
   - **5.1 Överför 20 µL provlysat från den övre halvan av vätskan (undvik utfällning) i Neogen Lysis Solution-röret till motsvarande reagensrör för** Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) **. Häll i en vinkel för att undvika att rubba pelletsen. Blanda genom att varsamt pipettera upp och ned 5 gånger.**
   - 5.2 Upprepa steg 5.1 tills enskilda provlysat har tillförts motsvarande reagensrör för Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) på remsan.
   - 5.3 Förslut reagensrören för Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) med de medföljande extralocken, och använd den rundade sidan på Neogen Molecular Detection Cap/Decap Tool-Reagent för att trycka med en fram och tillbaka-rörelse så att locket sitter på ordentligt.
   - 5.4 Upprepa steg 5.1 till 5.3 vid behov för det antal prover som ska testas.
   - 5.5 När alla provlysat har överförts, upprepa steg 5.1 till 5.3 för att överföra 20 µL NC-lysat till ett reagensrör för Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7).
   - 5.6 Överför **20 µL <u>NC-lysat</u> till ett Neogen Reagent Control-rör.** Häll i en vinkel för att undvika att rubba pelletsen. Blanda genom att varsamt pipettera upp och ned 5 gånger.
6. Ställ täckta rör i en ren och dekontaminerad Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray. Stäng och lås sedan locket.



7. Granska och bekräfta den konfigurerade körningen i Neogen Molecular Detection-programmet.
8. Klicka på Start-knappen i programmet och välj det instrument som ska användas. Det valda instrumentets lock öppnas automatiskt.
9. Placera Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray i Neogen Molecular Detection Instrument och stäng locket för att starta analysen. Resultaten ges inom 60 minuter, men positiva resultat kan detekteras tidigare.
10. Ta ut Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray ur Neogen Molecular Detection Instrument när analysen är slutförd och ta bort rören genom blötläggning i en 1–5 % lösning (volym:volymprocent i vatten) med blekmedel för hushållsbruk i 1 timme, på avstånd från området för analysförberedelse.

OBS! För att minimera risken för falskt positiva resultat på grund av korskontaminering, öppna aldrig reagensrör som innehåller amplifierat DNA. Detta gäller även Neogen Reagent Control, reagensrör för Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) och Neogen Matrix Control-rör. Hantera förslutna reagensrör genom blötläggning i en 1–5 % lösning (volym:volymprocent i vatten) med blekmedel för hushållsbruk i 1 timme, på avstånd från området för analysförberedelse.

Resultat och tolkning

En algoritm tolkar lampsignalkurvan som kommer från detektionen av nukleinsyraamplifieringen. Resultaten analyseras automatiskt av programmet och färgkodas baserat på resultatet. Ett positivt eller negativt resultat fastställs genom analys av ett antal unika kurvparametrar. Presumtivt positiva resultat rapporteras i realtid, och negativa resultat och inspektionsresultat visas efter att körningen är slutförd.

Presumtivt positiva prover ska bekräftas enligt laboratoriets standardförfaranden eller tillämplig referensmetod[1,2,3], som börjar med överföring från den primära BPW ISO-anrikningen till sekundär anrikningsbuljong, följt av utstrykning och bekräftelse av isolat med tillämpliga biokemiska och serologiska metoder.

OBS! Inte ens ett negativt prov ger ett nollvärde eftersom systemet och amplifieringsreagens för Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) har en ”bakgrundsavläsning” av relativa ljusenheter.

I det sällsynta fallet av ovanliga lampsignaler markerar algoritmen detta med ”Inspektera”. Neogen rekommenderar att användaren upprepar analysen för sådana eventuella prover. Om resultatet fortsätter att vara Inspektera går du vidare till bekräftelsetestet med den metod du föredrar eller så som specificeras i lokala bestämmelser.

I händelse av motsatta resultat (presumtivt positiva med Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7), ej bekräftade med någon av ovan nämnda metoder, och i synnerhet för latexagglutinationstestet), måste laboratoriet följa de nödvändiga stegen för att säkerställa de erhållna resultatens giltighet.

Bekräftelse av resultat enligt metoden NF VALIDATION-certifierad

Vad gäller NF VALIDATION måste alla prover som identifieras som positiva av Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) bekräftas med ett av följande test:

Alternativ 1: Användning av ISO 16654-standarden[3] med början från anrikningen av det buffrade peptonvattnet[3].

Alternativ 2: Implementering av en bekräftelsemetod som består av följande: Stryk 50 µl anrikat buffrat peptonvatten[3] på en Cefixime Potassium Tellurite Sorbitol MacConkey-agarplatta (CT-SMAC)[3]. Inkubera i 24 ±3 timmar vid 37 °C. Stryk karakteristiska kolonier på näringsagar och utför latexagglutinationstest direkt på isolerade kolonier. Om resultaten för Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) inte bekräftas, utför en immunomagnetisk separation och stryk sedan 50 µl på CT-SMAC.

Alternativ 3: Användning av nukleinsyrasonder enligt beskrivningen i EN ISO 7218-standarden[5] på isolerade kolonier (renade eller ej) från CT-SMAC (se Alternativ 1 eller 2). Nukleinsyrasonderna får inte vara samma som användes för Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7).

Alternativ 4: Användning av någon annan NF VALIDATION-certifierad metod som inte får vara samma som användes för Neogen Molekylär Detektionsanalys 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7). Det fullständiga protokollet som beskrivs för denna andra validerade metod måste användas. Alla steg före bekräftelsens början måste vara gemensamma för båda metoderna.

I händelse av motsatta resultat (presumtivt positiva med den alternativa metoden, ej bekräftade med någon av ovan nämnda metoder) måste laboratoriet följa de nödvändiga stegen för att säkerställa det erhållna resultatets giltighet.

Om du har frågor om specifika tillämpningar eller procedurer, besök vår webbplats på www.neogen.com eller kontakta din lokala Neogen-representant eller -distributör.

Bilaga A. Protokollavbrott: Förvaring och omtestning av prover

1. Vid förvaring av ett värmebehandlat lysat, sätt ett rent lock på lyseringsröret (se avsnittet **Lysering**, 4.5)
2. Vid förvaring av ett anrikat prov, inkubera i minst 18 timmar före förvaring.
3. Förvara vid 4 till 8 °C i upp till 72 timmar.
4. Bered ett förvarat prov för amplifiering genom att vända det upp och ned 2–3 gånger för att blanda.
5. Ta av locken från rören.

6. Placera rören med blandat lysat på Neogen Molecular Detection Heat Block Insert och värm vid 100 ±1 °C i 5 ±1 minuter.
7. Ta bort stället med Neogen Lysis Solution-rör från värmeblocket och låt svalna i Neogen Molecular Detection Chill Block Insert i minst 5 minuter och högst 10 minuter.
8. Fortsätt med protokollet från avsnittet **Amplifiering** som beskrivs ovan.

Referenser:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli.* November 2015.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 5.09. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. Effective Date: 15 January 2015.
3. ISO 16654:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.
7. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Neogen Food Safety.

Teckenförklaring

info.neogen.com/symbols

AOAC är ett registrerat varumärke som tillhör AOAC INTERNATIONAL

Official Methods är ett registrerat servicemärke som tillhör AOAC INTERNATIONAL

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

NEOGEN®

Produktvejledning

Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7)

Produktbeskrivelse og tilsigtet anvendelse

Neogen® Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7) anvendes sammen med Neogen® Molecular Detection System til hurtig og specifik detektion af *E. coli* O157 (inklusive H7) i berigede fødevare- og foderprøver.

Neogen Molecular Detection Assays bruger loop-medieret isotermisk amplifikation til hurtigt at amplificere nukleinsyresekvenser med høj specificitet og sensitivitet, kombineret med bioluminescens for at detektere amplifikationen. Formodet positive resultater rapporteres i realtid, mens negative resultater vises, når analysen er fuldført. Formodet positive resultater skal bekræftes ved hjælp af din foretrukne metode eller som defineret i de lokale regler[1, 2, 3].

Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7) er beregnet til brug i et laboratoriemiljø af fagfolk, der er uddannet i laboratorieteknikker. Neogen har ikke dokumenteret brugen af dette produkt i andre industrier end føde- og drikkevareindustrierne. For eksempel har Neogen ikke dokumenteret dette produkt til test af miljømæssige, farmaceutiske, kosmetiske, kliniske eller veterinære prøver. Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7) er ikke blevet evalueret med alle eksisterende fødevareprodukter, fødevareprocesser, testprotokoller eller med alle eksisterende bakteriestammer.

Som med alle testmetoder kan berigelsesmediets kilde, formulering og kvalitet påvirke resultaterne. Faktorer som prøveudtagningsmetoder, testprotokoller, prøveforberedelse, håndtering og laboratorieteknik kan også påvirke resultaterne. Neogen anbefaler evaluering af metoden inklusive berigelsesmedie i brugerens miljø ved brug af et tilstrækkeligt antal prøver med særlige fødevarer og mikrobielle udfordringer for at sikre, at metoden opfylder brugerens kriterier.

Neogen har evalueret Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7) med bufferet peptonvand ISO.

Neogen® Molecular Detection Instrument er beregnet til brug med prøver, der har gennemgået varmebehandling under analysens lysetrin, og er designet til at ødelægge organismer, der er til stede i prøven. Prøver, der ikke er blevet ordentligt varmebehandlet under analysens lysetrin, kan betragtes som potentielt biologisk risikomateriale og må IKKE indsættes i Neogen Molecular Detection Instrument.

Neogen Food Safety er certificeret i henhold til ISO (International Organization for Standardization) 9001 med hensyn til design og fremstilling.

Testsættet med Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7) indeholder 96 tests, der er beskrevet i tabel 1.

Tabel 1. Komponenter i sættet med Neogen Molecular Detection Assay

Komponent	Identifikation	Kvantitet	Indhold	Bemærkninger
Neogen® Lysis Solution (LS)	Lyserød opløsning i klare rør	96 (12 strimler a 8 rør)	580 µl Neogen Lysis Solution pr. rør	Sat i rack og klar til brug
Neogen® Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7)-reagensrør	Lyserøde rør	96 (12 strimler a 8 rør)	Frysetørret specifik amplifikations- og detektionsblanding	Klar til brug
Ekstra låg	Lyserøde låg	96 (12 strimler a 8 låg)		Klar til brug
Neogen® Reagent Control (RC)	Klare rør med fliplåg	16 (2 poser a 8 enkeltrør)	Frysetørret kontrol-DNA, amplifikations- og detektionsblanding	Klar til brug

Den negative kontrol, som ikke er inkluderet i sættet, er et sterilt berigelsesmedie, f.eks. BPW ISO. Brug ikke vand som negativ kontrol.

Sikkerhed

Brugeren skal læse, sætte sig ind i og følge alle sikkerhedsoplysninger i instruktionerne til Neogen Molecular Detection System og Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7). Opbevar sikkerhedsinstruktionerne som fremtidig reference.

⚠ **ADVARSEL:** Angiver en farlig situation, som, hvis den ikke undgås, kan resultere i død eller alvorlig personskade og/eller materiel skade.

BEMÆRK: Angiver en potentielt farlig situation, som, hvis den ikke undgås, kan resultere i materiel skade.

⚠ ADVARSEL

Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7) må ikke bruges til diagnosticering af sygdomme hos mennesker eller dyr.

Brugeren skal undervise sit personale i aktuelle korrekte testteknikker: for eksempel God laboratoriepraksis, ISO/IEC 17025[4] eller ISO 7218[5].

Sådan reduceres risici forbundet med et falsk-negativt resultat, der fører til frigivelse af forurenet produkt:

- Følg protokollen, og udfør testene nøjagtigt som angivet i produktvejledningen.
- Brug medium, der er forvarmet til 41,5 ± 1 °C. Lad ikke mediet falde til under inkubationstemperaturområdet under prøveforberedelsen.
- Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7) skal opbevares som angivet på pakken og i produktvejledningen.
- Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7) skal altid anvendes inden udløbsdatoen.
- Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7) skal bruges sammen med fødevare-, foder- og fødevareprocesmiljøprøver, der er blevet valideret internt eller af en tredjepart.
- Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7) må kun bruges sammen med overflader, desinfektionsmidler, protokoller og bakteriestammer, der er blevet valideret internt eller af en tredjepart., der er blevet valideret internt eller af en tredjepart.
- For en miljøprøve, der indeholder neutraliserende buffer (NB) med arylsulfonatkompleks, udføres en 1:2 fortynding før testning (1 del prøve i 1 del steril berigelsesbouillon). En anden mulighed er at overføre 10 µl af den neutraliserende bufferberigelse til Neogen Lysis Solution-rørene. Neogen® Sample Handling-produkter, som omfatter Neogen® Neutralizing Buffer med arylsulfonatkompleks: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XSLSSL10NB, HS10NB og HS119510NB.

Sådan reduceres risiciene forbundet med eksponering for kemikalier og biologiske risici:

- Udfør patogentest i et veludstyret laboratorium under ledelse af uddannet personale. Inkuberede berigelsesmedier og udstyr eller overflader, der er kommet i kontakt med inkuberede berigelsesmedier, kan indeholde patogener i tilstrækkelige mængder til at forårsage risiko for menneskers sundhed.
- Følg altid standard laboratoriesikkerhedspraksis, herunder iføring af passende beskyttelsesbeklædning og øjenbeskyttelse, mens du håndterer reagenser og kontaminerede prøver.
- Undgå kontakt med indholdet af berigelsesmediet og reagensrørene efter amplifikation.
- Bortskaf berigede prøver og tilhørende kontamineret affald i overensstemmelse med gældende lokale/regionale/nationale/branchemæssige standarder.
- Overskrid ikke den anbefalede temperaturindstilling på varmeren.
- Overskrid ikke den anbefalede opvarmningstid.
- Ved hjælp af et passende kalibreret termometer skal du kontrollere temperaturen på Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert er på 100 ± 1°C. (f.eks. et termometer til delvis nedsænkning, et digitalt termoelementtermometer eller et termometer, der ikke er til fuldstændig nedsænkning). Termometeret skal placeres på det anviste sted i Neogen Molecular Detection Heat Block Insert.

Sådan reduceres risiciene forbundet med krydskontaminering under forberedelse af assayet:

- Bær altid handsker (for at beskytte brugeren og forhindre indførelse af nukleaser).

Sådan reduceres risiciene forbundet med eksponering for varme væsker:

- Overskrid ikke den anbefalede temperaturindstilling på varmeren.
- Overskrid ikke den anbefalede opvarmningstid.
- Ved hjælp af et passende kalibreret termometer skal du kontrollere temperaturen på Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert er på 100 ± 1°C. (f.eks. et termometer til delvis nedsænkning, et digitalt termoelementtermometer eller et termometer, der ikke er til fuldstændig nedsænkning). Termometeret skal placeres på det anviste sted i Neogen Molecular Detection Heat Block Insert.

BEMÆRK

Sådan reduceres risiciene forbundet med krydskontaminering under forberedelse af assayet:

- Brug af sterile pipettespidser af molekylærbiologisk kvalitet og med aerosolbarriere (med filter) anbefales.
- Brug en ny pipettespids til hver prøveoverførsel.
- Brug god laboratoriepraksis til at overføre prøven fra berigelsen til lysisrøret. For at undgå pipettekontaminering kan brugeren vælge at tilføje et mellemliggende overførselstrin. For eksempel kan brugeren overføre hver beriget prøve til et sterilt rør.
- Brug en molekylærbiologisk arbejdsstation med bakteriedræbende lampe, hvor det er tilgængeligt.

Sådan reduceres risiciene forbundet med et falsk positivt resultat:

- Åbn aldrig rør efter udført amplifikation.
- Bortskaf altid de kontaminerede rør ved at lægge dem i blød i en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsblegemiddelopløsning i 1 time et andet sted end i assayklargøringsområdet.

Se sikkerhedsdatabladet for yderligere information og lokale regler for bortskaffelse.

Hvis du har spørgsmål om specifikke anvendelsesformål eller procedurer, kan du besøge vores websted på www.neogen.com eller kontakte din lokale Neogen-repræsentant eller autoriserede Neogen-distributør.

Brugerens ansvar

Brugere, der er ansvarlige for at sætte sig ind i produktinstruktioner og -oplysninger. Besøg vores websted på **www.neogen.com,** eller kontakt din lokale Neogen-repræsentant eller Neogen-distributør for at få flere oplysninger.

Når der vælges en testmetode, er det vigtigt at erkende, at eksterne faktorer såsom prøveudtagningsmetoder, testprotokoller, prøveforberedelse, håndtering og laboratorieteknik kan påvirke resultaterne.

Det er brugerens ansvar ved valg af testmetode eller produkt at evaluere et tilstrækkeligt antal prøver med passende matricer og mikrobielle udfordringer for at overbevise brugeren om, at den valgte testmetode opfylder brugerens kriterier.

Det er også brugerens ansvar at fastslå, at eventuelle testmetoder og resultater opfylder kundernes og leverandørernes krav.

Som med enhver testmetode udgør resultater opnået ved brug af ethvert Neogen Food Safety-produkt ikke en garanti for kvaliteten af de testede matricer eller processer.

For at hjælpe kunderne med at evaluere metoden for forskellige fødevarematricer, har Neogen udviklet Neogen® Molecular Detection Matrix Control-sættet. Når det er nødvendigt, skal du bruge Matrix Control (MC) til at bestemme, om matrixen har evnen til at påvirke resultaterne af Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7). Test flere prøver, der er repræsentative for matrixen, dvs. prøver, der er opnået fra forskellig oprindelseskilde, i en hvilken som helst valideringsperiode, når Neogen-metoden anvendes, eller når der testes nye eller ukendte matricer eller matricer, der har gennemgået ændringer af råmateriale eller processer.

En matrix kan defineres som en type produkt med iboende egenskaber såsom sammensætning og proces. Forskellene mellem matricer kan være så enkle som virkningerne forårsaget af forskelle i deres behandling eller præsentation, f.eks. rå versus pasteuriseret eller frisk versus tørret osv.

Begrænsning af garantier/begrænset afhjælpning

MEDMINDRE DET ER UDTRYKKELIGT ANGIVET I ET AFSNIT OM BEGRÆNSET GARANTI PÅ DEN ENKELTE PRODUKTEMBALLAGE, FRASKRIVER NEOGEN SIG ALLE UDTRYKKELIGE OG UNDERFORSTÅEDE GARANTIER, HERUNDER MEN IKKE BEGRÆNSET TIL ENHVER GARANTI FOR SALGBARHED ELLER EGNETHED TIL EN BESTEMT BRUG. Hvis et Neogen Food Safety Product er defekt, vil Neogen eller dets autoriserede distributør efter eget valg erstatte eller refundere købsprisen for produktet. Dette er dine eneste retsmidler. Du skal straks underrette Neogen inden tres dage efter opdagelsen af eventuelle formodede fejl i et produkt og returnere det til Neogen. Kontakt din Neogen-repræsentant eller autoriserede Neogen-distributør, hvis du har flere spørgsmål.

Begrænsning af Neogens ansvar

NEOGEN KAN IKKE DRAGES TIL ANSVAR FOR NOGET TAB ELLER NOGEN SKADER, DET VÆRE SIG DIREKTE, INDIREKTE, SÆRLIGE, TILFÆLDE ELLER FØLGESKADER, HERUNDER, MEN IKKE BEGRÆNSET TIL TABT FORTJENESTE. Neogens ansvar i henhold til nogen juridisk teori kan under ingen omstændigheder overstige købsprisen for det produkt, der påstås at være defekt.

Opbevaring og bortskaffelse

Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7) skal opbevares ved 2-8 °C. Må ikke fryses. Hold sættet væk fra lys under opbevaring. Når du har åbnet sættet, skal du kontrollere, at folieposen er intakt. Hvis posen er beskadiget, må den ikke bruges. Efter åbning skal ubrugte reagensrør altid opbevares i den genlukkelige pose med tørremidlet indeni for at opretholde stabiliteten af de frysetørrede reagenser. Genlukkede poser skal opbevares ved 2-8 °C i højst 60 dage.

Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7) må ikke anvendes efter udløbsdatoen. Udløbsdato og lotnummer er anført på æskens udvendige etiket. Efter brug kan rørene med berigelsesmediet og Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7) potentielt indeholde patogene materialer. Når testen er afsluttet, skal du følge gældende industristandarder for bortskaffelse af kontamineret affald. Se sikkerhedsdatabladet for yderligere information og lokale regler for bortskaffelse.

Brugsanvisning

Følg alle anvisningerne nøje. I modsat fald det kan føre til unøjagtige resultater.

Brugeren skal gennemføre Neogen Molecular Detection System-operatørens færdighedsundervisning, som beskrevet i dokumentet "Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System"</1[7].

Dekontaminer periodisk laboratorieborde og -udstyr (pipetter, låg/lågåbningsværktøj osv.) med en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsblegemiddelopløsning eller DNA-fjernelsesopløsning.

Se afsnittet "Specifikke vejledninger for validerede metoder" for at se de specifikke krav:

Tabel 3 for berigelsesprotokoller i henhold til AOAC® *officielle analysemetoder*℠ 2017.01

Tabel 4 for berigelsesprotokoller i henhold til NF-valideringdcertifikat 3M 01/18-05/17

Prøveberigelse

I tabel 2, 3 og 4 vises vejledning om berigelsesprotokoller for fødevarer. Det er brugerens ansvar at validere alternative prøvetagningsprotokoller eller fortyndingsforhold for at sikre, at denne testmetode opfylder brugerens kriterier.

Fødevarer

1. Forvarm BPW ISO-berigelsesmedie til 41,5 ± 1 °C.
2. Kombiner berigelsesmediet og prøven på aseptisk vis i overensstemmelse med tabel 2, 3 eller 4. Til alle kødprøver og prøver med mange partikler anbefales det at anvende filterposer.
3. Homogeniser alle matricer undtagen for prøver fra afgrøder med blade eller frugtprøver blending, Stomach-blending eller håndblanding i 2 (± 0,2) minutter. Inkuber ved 41,5 ± 1 °C i det passende tidsrum ifølge tabel 2, 3 eller 4.

Tabel 2. Generelle berigelsesprotokoller

Prøvematrix[a]	Prøvestørrelse	Volumen af berigelsesbouillon (ml)	Berigelsestemperatur (±1 °C)	Berigelsestid (timer)
Råt oksekød inklusive hakket/fars og afpuds	325 g	975 BPW ISO (forvarmet)	41,5	10-18
Råt kød inklusive råt oksekød, svinekød, fjerkræ, lam og bison	25 g	225 BPW ISO (forvarmet)	41,5	8-18
Afgrøde med blade[b]	200 g	450 BPW ISO (forvarmet)	41,5	18-24
Andre fødevarer, herunder frugt[b], grøntsager, frugt-/grøntsagsjuice, friske krydderurter, rå fisk og skaldyr, rå æg, rå mælk, småkagedej og forarbejdet kød	25 g	225 BPW ISO (forvarmet)	41,5	18-24
Valnødder eller nøddeblandinger indeholdende valnødder (denne protokol er passende for andre nødder, herunder pekannødder, mandler, pistacienødder, cashewnødder og kastanjer)	25 g	225 rekonstitueret fedtfri tørmælk	41,5	18-24

(a) Frosne prøver skal ækvilibreres til 4-8 °C før tilsætning i berigelsesbouillon.

(b) Prøver fra afgrøder med blade eller frugtprøver skal omrøres forsigtigt i hånden i 5 minutter. Må ikke blendes eller Stomacher-blendes.

Specifikke instruktioner for validerede metoder

AOAC® *officielle analysemetoder*℠ 2017.01

I AOAC *officielle analysemetoders*℠-program blev Neogen Molecular Detection Assay 2 – *E. coli* O157 (inklusive H7) fundet at være en effektiv metode til detektion af *E. coli* O157:H7. De testede matricer i undersøgelsen er vist i tabel 3.

Tabel 3. Berigelsesprotokoller med brug af forvarmet BPW ISO ved 41,5 ± 1 °C iht. AOAC® *officielle analysemetoder*℠ 2017.01

Prøvematrix	Prøvestørrelse	Volumen af berigelsesbouillon (ml)	Berigelsestid (timer)	Homogeniseret
Råt hakket oksekød (73 % magert)	325 g	975	10-18	Manuelt med hånden eller med Stomach-blender
Rå spinat i pose[a]	200 g	450	18-24	Let omrørt med hånden i 5 minutter, undlad at homogenise
Friske spirer	25 g	225	18-24	Let omrørt med hånden i 5 minutter, undlad at homogenise
Frosne blåbær[a][b]	25 g	225	18-24	Let omrørt med hånden i 5 minutter, undlad at homogenise

(a) Prøver fra afgrøder med blade eller frugtprøver skal omrøres forsigtigt i hånden i 5 minutter. Må ikke blendes eller Stomacher-blendes.

(b) Frosne prøver skal ækvilibreres til 4-8 °C før tilsætning i berigelsesbouillon.

NF Validation efter AFNOR-certificering

3M 01/18-05/17

ALTERNATIVE ANALYSEMETODER TIL LANDBRUGSVIRKSOMHEDER

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

For mere information om ophør af gyldighed henvises til NF VALIDATION-certifikatet, der foreligger på ovennævnte websted.

NF VALIDATION-certificeret metode i overensstemmelse med ISO 16140-2[8] sammenlignet med ISO 16654[3]

Valideringens omfang: Råt oksekød, rå mejeriprodukter, rå frugter og grøntsager

Prøveklargøring: Prøverne skal klargøres i henhold til EN ISO 16654 og EN ISO 6887[6]

Softwareversion: Se certifikat

Tabel 4. Berigelsesprotokoller med brug af forvarmet BPW ISO ved 41,5 ± 1 °C i henhold til NF VALIDATION-certificeret metode 3M 01/18-05/17

Protokol	Prøvestørrelse	Volumen af berigelsesbouillon (ml)	Berigelsestemperatur (±1 °C)	Berigelsestid (timer)
Rå mejeriprodukter, rå frugter og rå grøntsager	25 g	225	41,5	18-24
Råt oksekød	25 g	225	41,5	8-24

BEMÆRKNINGER:

- Prøver på mere end 25 g er ikke blevet testet i NF VALIDATION-studiet.
- De anbefalede protokolafbrydelsestidspunkter er efter berigelse eller efter prøvelysis. Berigelsesbouillon eller prøvelysat kan opbevares ved 2-8 °C i op til 72 timer. Efter at have taget berigelsesbouillonen ud fra lager, genoptages testningen fra trin 1 i afsnittet **Lysis**. Efter at have taget prøvelysatet ud fra lager, genoptages testningen fra trin 7 i afsnittet **Lysis**. Lysatet kan også opbevares ved -20 °C.
- Korte berigelsesprotokoller er følsomme over for inkubationsbetingelser, og de temperaturer, der er specificeret i protokollen, skal følges. Temperaturen i vandbadet eller inkubatoren, hvor bouillonene forvarmes, skal verificeres for at sikre, at berigelsesbouillonen når den krævede temperatur. Den samlede tid til forberedelse af prøver, herunder forsinkelsen mellem slutningen af det medium foropvarmningstrin og begyndelsen af inkubationen af fødevareprøven, må ikke overstige 45 minutter. Det anbefales at bruge en ventileret inkubator under inkubationen.

Klargøring af Neogen® Molecular Detection Speed Loader Tray

1. Fugt en klud eller engangsserviet med en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsblegemiddelopløsning, og aftør Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray.
2. Skyl Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray med vand.
3. Brug en engangsserviet til at tørre vandet af Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray.
4. Sørg for, at Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray er tør, før den bruges.

Klargøring af Neogen® Molecular Detection Chill Block Insert

Anbring Neogen Molecular Detection Chill Block Insert direkte på laboratoriebordet: Neogen Molecular Detection Chill Block Tray anvendes ikke. Brug blokken ved omgivende laboratorietemperatur (20-25 °C).

Klargøring af Neogen® Molecular Detection Chill Heat Insert

Anbring Neogen Molecular Detection Heat Block Insert i en tørblokvarmer til dobbelt blok. Tænd for tørblokvarmeren, og indstil temperaturen, så Neogen Molecular Detection Heat Block Insert kan nå og opretholde en temperatur på 100 ± 1 °C.

BEMÆRK: Afhængigt af varmeapparatet skal der gå ca. 30 minutter, før Neogen Molecular Detection Heat Block Insert når temperaturen. Ved hjælp af et passende kalibreret termometer (f.eks. et termometer til delvis nedsænkning, et digitalt termoelementtermometer, et termometer, der ikke er til fuldstændig nedsænkning) placeret på det angivne sted skal du kontrollere, at Neogen Molecular Detection Heat Block Insert er på 100 ± 1°C.

Klargøring af Neogen® Molecular Detection Instrument

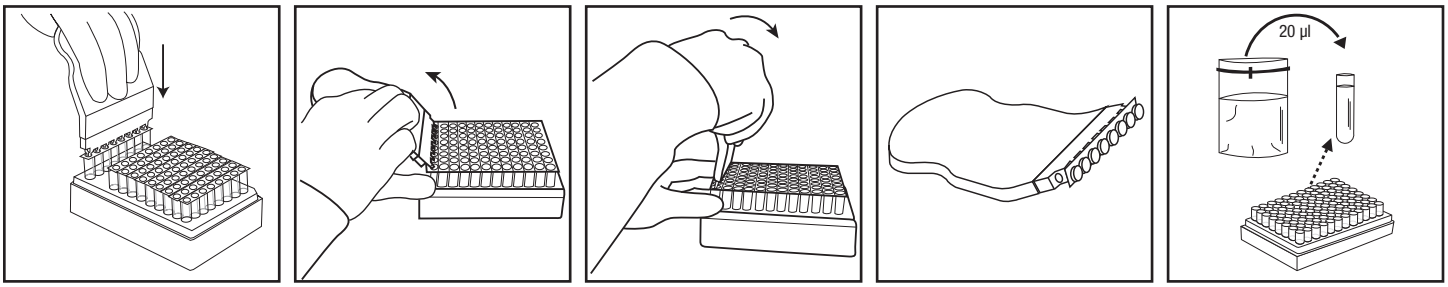
1. Start Neogen® Molecular Detection Software, og log på. Kontakt din Neogen Food Safety-repræsentant for at sikre, at du har den mest opdaterede version af softwaren.
2. Tænd Neogen Molecular Detection Instrument.
3. Opret eller rediger en kørsel med data for hver prøve. Se brugervejledningen til Neogen® Molecular Detection System for at få flere oplysninger.

BEMÆRK: Neogen Molecular Detection Instrument skal nå og opretholde en temperatur på 60 °C, før Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray isættes med reaktionsrør. Dette opvarmningstrin tager ca. 20 minutter og indikeres af et ORANGE lys på instrumentets statuslinje. Når instrumentet er klar til at starte en kørsel, bliver statuslinjen GRØN.

Lysering

1. Lad rørene med Neogen Lysis Solution varme op ved at stille racket ved stuetemperatur (20-25 ° C) natten over (16-18 timer). Alternativer til at ækvilibrere Neogen Lysis Solution-rørene til stuetemperatur er at stille Neogen Lysis Solution-rørene på laboratoriebordet i mindst 2 timer, inkubere Neogen Lysis Solution-rørene i en 37 ± 1 °C varm inkubator i 1 time eller placere dem i en tørblokvarmer til dobbelt blok i 30 sekunder ved 100 °C.
2. Vend de lukkede rør for at blande indholdet. Fortsæt til næste trin inden for 4 timer.
3. Tag berigelsesbouillon ud af inkubatoren.
4. Det kræves ét Neogen Lysis Solution tube til hver prøve og den negative kontrol (NC)-prøve (sterilt berigelsesmedie).
   - 4.1 Neogen Lysis Solution-rørstrimler kan tilskæres til det ønskede antal Neogen Lysis Solution-rør. Vælg det nødvendige antal individuelle Neogen Lysis Solution-rør eller 8-rørsstrimler. Anbring rørene med Neogen Lysis Solution i et tomt rack.
   - 4.2 For at undgå krydskontaminering skal du fjerne lågene på én Neogen Lysis Solution-rørstrimmel ad gangen og bruge en ny pipettespids til hvert overførselstrin.
   - 4.3 Overfør beriget prøve til Neogen Lysis Solution-rørene som beskrevet nedenfor:

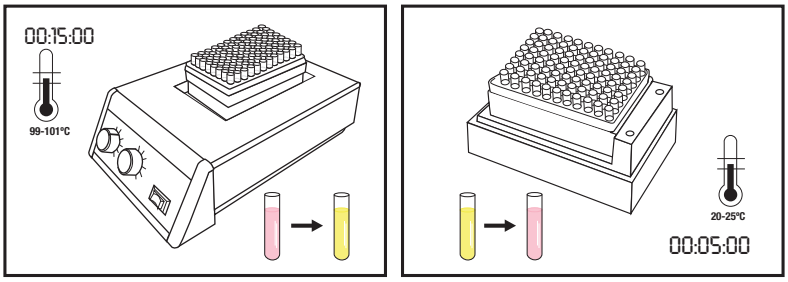
     Overfør **først** hver beriget prøve til et individuelt Neogen Lysis Solution-rør**.** Overfør NC **til sidst**.
   - 4.4 Brug Neogen® Molecular Detection Cap/Decap Tool-Lysis til at tage låget af én Neogen Lysis Solution-rørstrimmel – én strimmel ad gangen.
   - 4.5 Kassér låget fra Neogen Lysis Solution-røret – Hvis der bevares lysat til gentest, skal du anbringe lågene i en ren beholder, så de kan genanvendes eller lyseringen.
     - 4.5.1 Se tillæg A for at få oplysninger om behandling af bevaret lysat.
   - 4.6 Overfør 20 µl prøve til et Neogen Lysis Solution-rør, medmindre andet er angivet i protokoltabel 2, 3 og 4.



5. Gentag trin 4.3, indtil hver enkelt prøve er tilsat i et modsvarende Neogen Lysis Solution-rør i rørstrimlen.
6. Gentag trin 4.1 til 4.6 efter behov for det antal prøver, der skal testes.
7. Når alle prøver er overført, overføres 20 µl NC (sterilt berigelsesmedie, f.eks. BPW ISO) til et Neogen Lysis Solution-rør. Brug ikke vand som NC.
8. Kontroller, at temperaturen på Neogen Molecular Detection Heat Block Insert er på 100 ± 1 °C.
9. Sæt det afækkede rack med Neogen Lysis Solution-rør i Neogen Molecular Detection Heat Block Insert og opvarm det i 15 ± 1 minutter Under opvarmning vil Neogen Lysis Solution skifte fra pink (kølig) til gul (varm).

   Prøver, der ikke er blevet ordentligt varmebehandlet under analysens lysetrin, kan betragtes som potentielt biologisk risikomateriale og må IKKE indsættes i Neogen Molecular Detection Instrument.
10. Fjern det afdækkede rack med Neogen Lysis Solution-rør fra varmeblokken, og lad det afkøle i Neogen Molecular Detection Chill Block Insert i mindst 5 minutter og højst 10 minutter. Neogen Molecular Chill Block Insert, der anvendes ved omgivelsestemperatur uden Neogen Molecular Detection Chill Block Tray, skal stå direkte på laboratoriebordet. Når det er køligt, får lysisopløsningen sin lyserøde farve tilbage.

11. Fjern racket med Neogen Lysis Solution-rør fra Neogen Molecular Detection Chill Block Insert.

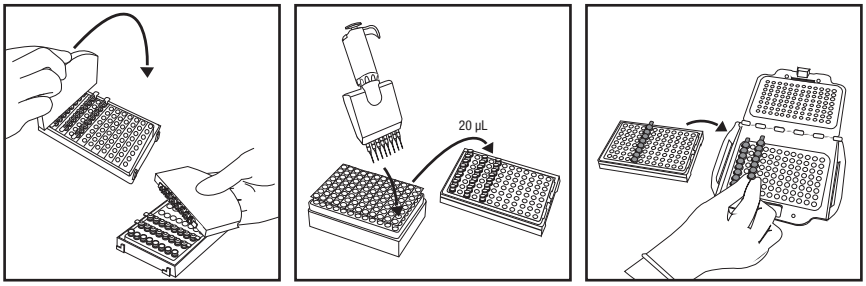


Amplifikation

1. Der kræves ét Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7)-reagensrør for hver prøve og NC.
   - 1.1 Rørstrimler kan skæres til det ønskede rørantal. Vælg det nødvendige antal individuelle Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7)-reagensrør eller 8-rørsstrimler.
   - 1.2 Sæt Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7)-reagensrør i et tomt rack.
   - 1.3 Undgå at hvirvle reagenspellets i bunden af rørene rundt.
2. Vælg ét Neogen Reagent Control-rør og sæt det i rack.
3. For at undgå krydskontaminering skal du fjerne lågene på én Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7)-reagensrørstrimmel ad gangen og bruge en ny pipettespids til hvert overførselstrin.
4. Overfør lysat til et Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7)-reagensrør og et Neogen Reagent Control-rør som beskrevet nedenfor:

Overfør **først** hvert prøvelysat til individuelle Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7)-reagensrør efterfulgt af NC'en. Hydrer Neogen Reagent Control-røret **til sidst**.

5. Brug Neogen® Molecular Detection Cap/Decap Tool-Reagent til at tage låget af Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7)-reagensrøret – én rørstrimmel ad gangen. Kassér låget.
   - **5.1 Overfør 20 µl prøvelysat fra den øverste halvdel af væsken (undgå bundfald) i Neogen Lysis Solution-røret til det modsvarende** Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7)**-reagensrør. Dispenser i en vinkel for at undgå at hvirvle pellets rundt. Bland ved forsigtigt at pipettere op og ned 5 gange.**
   - 5.2 Gentag trin 5.1, indtil individuelt prøvelysat er blevet tilsat i et modsvarende Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7)-reagensrør i strimlen.
   - 5.3 Tildæk Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7)-reagensrørene med de medfølgende ekstra låg, og brug den afrundede side af Neogen Molecular Detection Cap/Decap Tool-Reagent til at påføre tryk i en frem og tilbage-bevægelse og sikre, at låget er stramt påsat.
   - 5.4 Gentag trin 5.1 til 5.3 efter behov for det antal prøver, der skal testes.
   - 5.5 Når alle prøvelysater er blevet overført, gentages 5.1 til 5.3 for at overføre 20 µl NC-lysat til et Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7)-reagensrør.
   - 5.6 Overfør **20 µl <u>NC-lysat</u> til et Neogen Reagent Control-rør.** Dispenser i en vinkel for at undgå at hvirvle pellets rundt. Bland ved forsigtigt at pipettere op og ned 5 gange.
6. Sæt rør med låg i en ren og dekontamineret Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray. Luk og lås derefter låget.



7. Gennemgå og bekræft den konfigurerede kørsel i Neogen Molecular Detection Software.
8. Klik på Start-knappen i softwaren, og vælg det instrument, der skal bruges. Låget på det valgte instrument åbnes automatisk.

9. Anbring Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray i Neogen Molecular Detection Instrument, og luk låget for at starte assayet. Resultaterne vises inden for 60 minutter, men positive resultater detekteres muligvis tidligere.
10. Når analysen er afsluttet, skal du fjerne Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray fra Neogen Molecular Detection Instrument og bortskaffe de kontaminerede rør ved først at lægge dem i blød i en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsblegemiddelopløsning i 1 time et andet sted end i assayklargøringsområdet.

BEMÆRK: For at minimere risikoen for falsk positive resultater på grund af krydskontaminering må du aldrig åbne reagensrør, der indeholder amplificeret DNA. Disse omfatter Neogen Reagent Control, Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7) Reagent Tube og Neogen Matrix Control Tubes. Bortskaf altid de forseglede reagensrør ved først at lægge dem i blød i en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsblegemiddelopløsning i 1 time et andet sted end i assayklargøringsområdet.

Resultater og fortolkning

En algoritme fortolker den lysoutputkurve, der genereres ved påvisningen af nukleinsyreamplifikationen. Resultaterne analyseres automatisk af softwaren og farvekodes baseret på resultatet. Et positivt eller negativt resultat bestemmes ved analyse af en række unikke kurveparametre. Formodet positive resultater rapporteres i realtid, mens negative resultater, og resultater, der kræver brugerinspektion, vises, når kørslen er fuldført.

Formodet positive prøver skal bekræftes i henhold til laboratoriet standarddriftsprocedurer eller ved at følge den relevante referencemetodebekræftelse[1,2,3], begyndende med overførsel fra den primære BPW ISO-berigelses- til sekundære berigelsesbouillon efterfulgt af efterfølgende udpladning og bekræftelse af isolater ved hjælp af passende biokemiske og serologiske metoder.

BEMÆRK: Selv en negativ prøve vil ikke give en nul-aflæsning, da systemet og Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7)-amplifikationsreagenser har en "baggrunds"-aflæsning af relative lysenheder (RLU).

I det sjældne tilfælde af noget usædvanligt lysoutput, mærker algoritmen dette som "Inspicer". Neogen anbefaler brugeren at gentage analysen for alle Inspicer-prøver. Hvis resultatet fortsat er Inspicer, skal du fortsætte til bekræftelsestest ved hjælp af din foretrukne metode eller som specificeret i lokale regler.

I tilfælde af uoverensstemmende resultater (formodet positive med Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7), ikke bekræftet på en af de ovenfor beskrevne måder, og især for latexagglutinationstesten) skal laboratoriet følge de nødvendige trin for at sikre gyldigheden af de opnåede resultater.

Bekræftelse af resultater i henhold til den NF VALIDATION-certificerede metode

I forbindelse med NF VALIDATION skal alle prøver, der identificeres som positive med Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7) skal bekræftes med en af følgende tests:

Mulighed 1: Brug af ISO 16654[3]-standarden med udgangspunkt i bufferet peptonvand[3]-berigelse.

Mulighed 2: Implementering af en bekræftelsesmetode bestående af følgende: Stryg 50 µl af den bufrede peptonvand[3]-berigelse på en Cefixime Potassium Tellurite Sorbitol MacConkey (CT-SMAC)[3]-agarplade. Inkuberes i 24 ±3 timer ved 37 °C. Stryg karakteristiske kolonier på næringsagar, og udfør latexagglutinationstest direkte på isolerede kolonier. Hvis de opnåede resultater med Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7) ikke er bekræftet, skal du udføre et immunomagnetisk separationstrin og derefter stryge 50 µl på CT-SMAC.

Mulighed 3: Brug af nukleinsyreprober som beskrevet i EN ISO 7218[5]-standarden, udført på isolerede kolonier (oprenset eller ej) fra CT-SMAC (se mulighed 1 eller 2). Nukleinsyreproberne må ikke være de samme som dem, der anvendes i Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7).

Mulighed 4: Brug af enhver anden certificeret NF VALIDATION-metode, hvis princip skal være anderledes end den for Neogen Molecular Detection Assay 2 - *E. coli* O157 (inklusive H7). Den fuldstændige protokol, der er beskrevet for denne anden validerede metode, skal anvendes. Alle trin før bekræftelsesstart skal være fælles for begge metoder.

I tilfælde af uoverensstemmende resultater (formodet positive med den alternative metode og ikke bekræftet på en af de ovenfor beskrevne måder) skal laboratoriet følge de nødvendige trin for at sikre gyldigheden af det opnåede resultat.

Hvis du har spørgsmål om specifikke anvendelsesformål eller procedurer, kan du besøge vores websted på www.neogen.com eller kontakte din lokale Neogen-repræsentant eller autoriserede Neogen-distributør.

Tillæg A. Protokolafbrydelse: Opbevaring og gentestning af prøver

1. For at opbevare et varmebehandlet lysat skal lysisrøret lukkes igen med et rent låg (se afsnittet **Lysis**, 4.5)
2. For at opbevare en beriget prøve skal den inkuberes i mindst 18 timer før opbevaring.
3. Opbevares ved 4 til 8 °C i op til 72 timer.
4. Klargør en opbevaret prøve til amplifikation ved at vende den 2-3 gange for at blande indholdet.
5. Tag låget af rørene.
6. Sæt de omblandede lysatrør på Neogen Molecular Detection Heat Block Insert, og opvarm dem til 100 ± 1 °C i 5 ± 1 minutter.

7. Fjern racket med Neogen Lysis Solution-rør fra varmeblokken, og lad det afkøle i Neogen Molecular Detection Chill Block Insert i mindst 5 minutter og højst 10 minutter.
8. Fortsæt protokollen fra afsnittet **Amplifikation**, der er beskrevet ovenfor.

Litteraturhenvisninger:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli.* November 2015.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 5.09. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. Ikrafttrædelsesdato: 15. january 2015.
3. DS/EN ISO 16654:2001 Mikrobiologisk undersøgelse af fødevarer og foderstoffer – Horisontal metode til bestemmelse af *Escherichia coli* O 157.
4. DS/EN ISO/IEC 17025. Generelle krav til prøvnings- og kalibreringslaboratoriers kompetence.
5. DS/EN ISO 7218. Mikrobiologisk undersøgelse af fødevarer og foderstoffer – Generelle krav og vejledning for mikrobiologiske undersøgelser.
6. DS/EN ISO 6887. Mikrobiologiske undersøgelser i fødevarekæden – Forberedelse af prøvemateriale, første fortynding og tifoldsfortyndinger til mikrobiologiske undersøgelser.
7. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Neogen Food Safety.

Forklaring af symboler

info.neogen.com/symbols

AOAC er et registreret varemærke tilhørende AOAC INTERNATIONAL

Official Methods er et registreret mærke for tjenesteydelser tilhørende AOAC INTERNATIONAL

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

NEOGEN®

Produktinstruksjoner

Molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7)

Produktbeskrivelse og tiltenkt bruk

Neogen® molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) brukes med Neogen® system for molekylær detektering for rask og spesifikk detektering av *E. coli* O157 (inkludert H7) i anrikede næringsmiddel- og fôrprøver.

Neogen molekylære deteksjonstester bruker sløyfemediert isotermisk amplifikasjon for raskt å amplifisere nukleinsyresekvenser med høy spesifisitet og sensitivitet, kombinert med bioluminescens for å registrere amplifikasjonen. Presumptive positive resultater rapporteres i sanntid, mens negative resultater vises etter at testen er fullført. Presumptivt positive resultater skal bekreftes ved bruk av din foretrukne metode eller som spesifisert av lokale forskrifter[1, 2, 3].

Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) er beregnet for bruk i et laboratoriemiljø av fagpersoner opplært i laboratorieteknikker. Neogen har ikke dokumentert bruk av dette produktet i andre bransjer enn næringsmidler eller drikkevarer. For eksempel har Neogen ikke dokumentert dette produktet for testing av miljøprøver, farmasøytiske prøver, kosmetikkprøver, kliniske prøver eller veterinærprøver. Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) har ikke blitt evaluert med alle mulige næringsmiddelprodukter, næringsmiddelprosesser, testprotokoller eller med alle mulige stammer av bakterier.

Som med alle testmetoder kan kilden, formuleringen og kvaliteten til anrikningsmediet påvirke resultatene. Faktorer som prøvetakingsmetoder, testprotokoller, prøvepreparering, håndtering og laboratorieteknikk kan også påvirke resultatene. Neogen anbefaler evaluering av metoden inkludert anrikningsmediet i brukerens miljø ved bruk av et tilstrekkelig antall prøver med bestemte næringsmidler og mikrobielle utfordringer for å sikre at den valgte testmetoden oppfyller brukerens kriterier.

Neogen har evaluert Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) med bufret peptonvann ISO.

Neogen® instrument for molekylær detektering er beregnet for bruk med prøver som har gjennomgått varmebehandling under testens lysistrinn, som er utformet for å ødelegge organismer som er til stede i prøven. Prøver som ikke har blitt riktig varmebehandlet under testens lysistrinn, kan anses som en potensiell biologisk fare og skal IKKE settes inn i Neogen instrument for molekylær detektering.

Neogen næringsmiddelsikkerhet er ISO (Den internasjonale standardiseringsorganisasjonen) 9001-sertifisert for design og produksjon.

Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7)-testsettet inneholder 96 tester, beskrevet i tabell 1.

Tabell 1. Komponenter i Neogen molekylær deteksjonstest-sett

Element	Identifikasjon	Antall	Innhold	Kommentarer
Neogen® lysisløsning (LS)	Rosa løsning i gjennom-siktige rør	96 (12 remser med 8 rør)	580 µl Neogen lysisløsning per rør	I stativ og klare til bruk
Neogen® molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) reagensrør	Rosa rør	96 (12 remser med 8 rør)	Lyofilisert spesifikk amplifikasjons- og deteksjonsblanding	Klare til bruk
Ekstra lokk	Rosa lokk	96 (12 remser med 8 lokk)		Klare til bruk
Neogen® reagenskontroll (RC)	Gjennomsiktige rør med flipp-topp	16 (2 poser med 8 individuelle rør)	Lyofilisert kontroll-DNA-, amplifikasjons- og deteksjonsblanding	Klare til bruk

Den negative kontrollen, følger ikke med i settet, er et sterilt anrikningsmedium, f.eks. BPW ISO. Ikke bruk vann som en negativ kontroll.

Sikkerhet

Brukeren skal lese, forstå og følge all sikkerhetsinformasjon i instruksjonene for Neogen system for molekylær detektering og Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7). Ta vare på sikkerhetsinstruksjonene for fremtidig referanse.

⚠ **ADVARSEL:** Indikerer en farlig situasjon som kan føre til dødsfall eller alvorlig personskade og/eller materiell skade hvis den ikke unngås.

VARSEL: Indikerer en potensielt farlig situasjon som kan føre til materiell skade hvis den ikke unngås.

⚠ ADVARSEL

Ikke bruk Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) til å stille diagnose for tilstander hos mennesker eller dyr.

Brukeren må lære opp personalet sitt i gjeldende riktige testteknikker: for eksempel god laboratoriepraksis, ISO/IEC 17025[4] eller ISO 7218[5].

Slik reduserer du risikoene forbundet med et falskt negativt resultat som fører til utsending av kontaminert produkt:

- Følg protokollen og utfør testene nøyaktig som beskrevet i produktinstruksjonene.
- Bruk medium forvarmet til 41,5 ± 1 °C. Ikke la mediet falle under inkubasjonstemperaturintervallet under prøvepreparering.
- Oppbevar Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) som angitt på emballasjen og i produktinstruksjonene.
- Bruk alltid Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) innen utløpsdatoen.
- Bruk Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) med næringsmiddelprøver, fôrprøver og miljøprøver fra næringsmiddelprosesser som har blitt validert internt eller av en tredjepart.
- Bruk Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) kun med overflater, desinfeksjonsmidler, protokoller og bakteriestammer som har blitt validert internt eller av en tredjepart.
- For en miljøprøve som inneholder nøytraliserende buffer (NB) med arylsulfonatkompleks, utfører du en 1:2-fortynning før testing (1 del prøve i 1 del steril anrikningsnæringsvæske). Et annet alternativ er å overføre 10 µl av nøytraliseringsbufferanrikningen til Neogen lysisløsningrørene. Neogen® prøvehåndteringsprodukter som inkluderer Neogen® nøytraliseringsbuffer med arylsulfonatkompleks: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XSLSSL10NB, HS10NB og HS119510NB.

Slik reduserer du risikoene forbundet med eksponering for kjemikalier og biologiske farer:

- Utfør patogentesting i et riktig utstyrt laboratorium under kontroll av opplært personell. Inkuberte anrikningsmedier og utstyr eller overflater som har kommet i kontakt med inkuberte anrikningsmedier, kan inneholde patogener i nivåer som er tilstrekkelige til å forårsake risiko for menneskers helse.
- Følg alltid standard laboratoriesikkerhetspraksis, inkludert bruk av passende beskyttelsesklær og øyevern mens du håndterer reagenser og kontaminerte prøver.
- Unngå kontakt med innholdet i anrikningsmediet og reagensrørene etter amplifikasjon.
- Avhend anrikede prøver og tilhørende kontaminert avfall i henhold til gjeldende lokale/regionale/nasjonale standarder og bransjestandarder.
- Ikke overskrid den anbefalte temperaturinnstillingen på varmeelementet.
- Ikke overskrid den anbefalte oppvarmingstiden.
- Bruk et egnet, kalibrert termometer til å verifisere temperaturen til Neogen® molekylær detektering, varmeblokkinnsats (f.eks. et delvis nedsenkbart termometer eller et digitalt termoelementtermometer, ikke et fullstendig nedsenkbart termometer). Termometere må plasseres på det utpekte stedet i Neogen molekylær detektering, varmeblokkinnsats.

Slik reduserer du risikoene forbundet med krysskontaminasjon ved klargjøring av testen:

- Bruk alltid hansker (for å beskytte brukeren og forhindre introduksjon av nukleaser).

Slik reduserer du risikoene forbundet med eksponering for varme væsker:

- Ikke overskrid den anbefalte temperaturinnstillingen på varmeelementet.
- Ikke overskrid den anbefalte oppvarmingstiden.
- Bruk et egnet, kalibrert termometer til å verifisere temperaturen til Neogen® molekylær detektering, varmeblokkinnsats (f.eks. et delvis nedsenkbart termometer eller et digitalt termoelementtermometer, ikke et fullstendig nedsenkbart termometer). Termometere må plasseres på det utpekte stedet i Neogen molekylær detektering, varmeblokkinnsats.

VARSEL

Slik reduserer du risikoene forbundet med krysskontaminasjon ved klargjøring av testen:

- Bruk av sterile pipettespisser av molekylærbiologikvalitet med aerosolbarriere (filtrert) anbefales.
- Bruk en ny pipettespiss for hver prøveoverføring.
- Bruk god laboratoriepraksis for å overføre prøven fra anrikningen til lysisrøret. For å unngå pipettekontaminering kan brukeren velge å legge til et mellomliggende overføringstrinn. Brukeren kan for eksempel overføre hver anrikede prøve til et sterilt rør.
- Bruk en molekylærbiologiarbeidsstasjon som inneholder bakteriedrepende lampe, når tilgjengelig.

Slik reduserer du risikoene forbundet med et falskt positivt resultat:

- Åpne aldri rør etter amplifikasjon.
- Avhend alltid de kontaminerte rørene ved å bløtlegge dem i en 1–5 % (volumprosent i vann) løsning av klorholdig husholdningsblekemiddel i 1 time og unna testklargjøringsområdet.

Se sikkerhetsdatabladet for ytterligere informasjon og lokale forskrifter for avhending.

Besøk nettstedet vårt på www.neogen.com eller kontakt din lokale Neogen-representant eller Neogen-distributør hvis du har spørsmål om spesifikke bruksområder eller prosedyrer.

Brukerens ansvar

Brukerne har selv ansvaret for å sette seg inn i produktanvisningene og -informasjonen. Besøk nettstedet vårt på **www.neogen.com** eller kontakt din lokale Neogen-representant eller -distributør for mer informasjon.

Når en testmetode velges, er det viktig å være klar over at eksterne faktorer som prøvetakingsmetoder, testprotokoller, prøvepreparering, håndtering og laboratorieteknikk kan påvirke resultatene.

Det er brukerens ansvar ved valg av testmetode eller produkt å evaluere et tilstrekkelig antall prøver med egnede matrikser og mikrobielle utfordringer for å forsikre brukeren om at den valgte testmetoden oppfyller brukerens kriterier.

Det er også brukerens ansvar å bestemme at eventuelle testmetoder og resultater oppfyller kravene til brukerens kunder og leverandører.

Som med enhver testmetode utgjør ikke resultater oppnådd ved bruk av noe Neogen næringsmiddelsikkerhetsprodukt en garanti for kvaliteten på de testede matriksene eller prosessene.

Neogen har utviklet Neogen® matrikskontrollsett for molekylær detektering for å hjelpe kunder med å evaluere metoden for forskjellige næringsmiddelmatrikser. Ved behov bruker du matrikskontrollen (MC) til å bestemme om matriksen har evne til å påvirke resultatene til Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7). Test flere prøver som er representative for matriksen, dvs. prøver som er innhentet fra ulike opprinnelsessteder, under enhver valideringsperiode når Neogen-metoden tas i bruk eller ved testing av nye eller ukjente matrikser eller matrikser som har gjennomgått endringer i råmateriale eller prosess.

En matriks kan defineres som en type produkt med iboende egenskaper som for eksempel sammensetning og prosess. Forskjeller mellom matrikser kan være så enkle som effektene forårsaket av forskjeller i deres prosessering eller presentasjon, for eksempel rå kontra pasteurisert, fersk kontra tørket, osv.

Begrensning av garantier / begrenset rettsmiddel

MED UNNTAK AV DET SOM UTTRKKELIG ER UTTRYKT I ET AVSNITT OM BEGRENSET GARANTI PÅ INDIVIDUELL PRODUKTEMBALLASJE, FRASKRIVER NEOGEN SEG ALLE UTTRYKTE OG UNDERFORSTÅTTE GARANTIER, INKLUDERT, MEN IKKE BEGRENSET TIL, ALLE GARANTIER OM SALGBARHET ELLER EGNETHET FOR ET BESTEMT BRUKSOMRÅDE. Hvis et Neogen næringsmiddelsikkerhetsprodukt er defekt, vil Neogen eller dets autoriserte distributør, etter eget valg, erstatte eller refundere kjøpesummen for produktet. Dette er dine eneste rettsmidler. Du må umiddelbart varsle Neogen innen seksti dager etter oppdagelse av eventuelle mistenkte defekter i et produkt og returnere det til Neogen. Kontakt Neogen-representanten din eller en autorisert Neogen-distributør hvis du har flere spørsmål.

Begrensning av Neogens ansvar

NEOGEN VIL IKKE VÆRE ANSVARLIG FOR NOE TAP ELLER NOEN SKADER, ENTEN DE ER DIREKTE, INDIREKTE, SPESIELLE, TILFELDIGE ELLER FØLGEMESSIGE SKADER, INKLUDERT, MEN IKKE BEGRENSET TIL, TAPT FORTJENESTE. Under ingen omstendigheter skal Neogens ansvar under noen juridisk teori overstige kjøpesummen for produktet som påstås å være defekt.

Oppbevaring og avhending

Oppbevar Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) ved 2–8 °C. Skal ikke fryses. Hold settet borte fra lys under oppbevaring. Etter at du har åpnet settet, må du kontrollere at folieposen er uskadet. Skal ikke brukes hvis posen er skadet. Etter åpning skal ubrukte reagensrør alltid oppbevares i den gjenlukkbare posen med tørkemidlet inni for å opprettholde holdbarheten til lyofiliserte reagenser. Oppbevar gjenlukkbare poser ved 2–8 °C i maksimalt 60 dager.

Ikke bruk Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) etter utløpsdatoen. Utløpsdato og lotnummer er notert på eskens ytre etikett. Etter bruk kan rørene med anrikningsmediet og Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) potensielt inneholde patogene materialer. Når testingen er fullført, følger du gjeldende bransjestandarder for avhending av kontaminert avfall. Se sikkerhetsdatabladet for ytterligere informasjon og lokale forskrifter for avhending.

Anvisninger for bruk

Følg alle anvisningene nøye. Unnlatelse av å gjøre det kan føre til unøyaktige resultater.

Brukeren skal fullføre brukerkvalifikasjonsopplæringen for Neogen system for molekylær detektering, som beskrevet i dokumentet «Protokoller og instruksjoner for installasjonskvalifikasjon (IQ) / driftskvalifikasjon (OQ) for Neogen system for molekylær detektering»[7].

Dekontaminer periodisk laboratoriebenker og utstyr (pipetter, verktøy for lukking/åpning osv.) med en 1–5 % (volumprosent i vann) løsning av klorholdig husholdningsblekemiddel eller DNA-fjerningsløsning.

Se avsnittet «Spesifikke instruksjoner for validerte metoder» når det gjelder spesifikke krav:

Tabell 3 for anrikningsprotokoller i henhold til AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2017.01

Tabell 4 for anrikningsprotokoller i henhold til NF Validation-sertifikat 3M 01/18-05/17

Prøveanrikning

Tabell 2, 3 eller 4 inneholder veiledning for anrikningsprotokoller for næringsmidler. Det er brukerens ansvar å validere alternative prøvetakingsprotokoller eller fortynningsforhold for å sikre at denne testmetoden oppfyller brukerens kriterier.

Næringsmidler

1. Forvarm BPW ISO-anrikningsmedium til 41,5 ± 1 °C.
2. Kombiner anrikningsmediet og prøven aseptisk i henhold til tabell 2, 3 eller 4. For alle kjøttprøver og alle prøver med høyt partikkelinnhold anbefales bruk av filterposer.
3. Homogeniser alle matrikser unntatt bladgrønnsaker og frukt grundig ved å kjøre i blender, «stomaching» eller håndblande i 2 ± 0,2 minutter. Inkuber ved 41,5 ± 1 °C i riktig tidsperiode i henhold til tabell 2, 3 eller 4.

Tabell 2. Generelle anrikningsprotokoller

Prøvematriks[a]	Prøve-størrelse	Anrikningsnærings-væskevolum (ml)	Anrikningstemperatur (± 1 °C)	Anrikningstid (timer)
Rått storfekjøtt inkludert kjøttdeig og avskjær	325 g	975 BPW ISO (forvarmet)	41,5	10–18
Rått kjøtt inkludert rått storfe, svin, fjærfe, lam og bison	25 g	225 BPW ISO (forvarmet)	41,5	8–18
Bladgrønnsaker[b]	200 g	450 BPW ISO (forvarmet)	41,5	18–24
Andre næringsmidler inkludert frukt[b], grønnsaker, frukt-/grønnsaksjuicer, friske urter, rå sjømat, rå egg, rå melk, kjeksdeig og bearbeidede kjøttprodukter	25 g	225 BPW ISO (forvarmet)	41,5	18–24
Valnøtter eller nøtteblandinger som inneholder valnøtter (denne protokollen er egnet for andre nøtter inkludert pekannøtter, mandler, pistasjer, kasjunøtter og kastanjer	25 g	225 rekonstituert skummet tørrmelk	41,5	18–24

(a) Fryste prøver skal nå en temperatur på 4–8 °C før de tilsettes i anrikningsnæringsvæske.

(b) Bladgrønnsaks- og fruktprøver skal blandes forsiktig for hånd i 5 minutter. Ikke kjør i blender eller «stomach».

Spesifikke instruksjoner for validerte metoder

AOAC® *Official Methods of Analysis℠* 2017.01

I AOAC *Official Method of Analysis℠*-programmer ble Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) funnet å være en effektiv metode for detektering av *E. coli* O157:H7. Matriksene som ble testet i studien, vises i tabell 3.

Tabell 3. Anrikningsprotokoller ved bruk av forvarmet BPW ISO ved 41,5 ± 1 °C i henhold til AOAC® *Official Methods℠* 2017.01

Prøvematriks	Prøve-størrelse	Anrikningsnæringsvæske-vlum (ml)	Anrikningstid (timer)	Homogenisert
Rå kjøttdeig av storfe (73 % mager)	325 g	975	10–18	Manuelt for hånd eller med «stomach»
Rå spinat i pose[a]	200 g	450	18–24	Bland forsiktig for hånd i 5 minutter, ikke homogeniser
Ferske spirer	25 g	225	18–24	Bland forsiktig for hånd i 5 minutter, ikke homogeniser
Frosne blåbær[a][b]	25 g	225	18–24	Bland forsiktig for hånd i 5 minutter, ikke homogeniser

(a) Bladgrønnsaks- og fruktprøver skal blandes forsiktig for hånd i 5 minutter. Ikke kjør i blender eller «stomach».

(b) Fryste prøver skal nå en temperatur på 4–8 °C før de tilsettes i anrikningsnæringsvæske.

NF Validation fra AFNOR Certification:

3M 01/18-05/17

ALTERNATIVE TESTMETODER FOR LANDBRUKSVIRKSOMHET

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

For mer informasjon om opphør av gyldighet, se NF VALIDATION-sertifikatet tilgjengelig på nettstedet nevnt ovenfor.

NF VALIDATION-sertifisert metode i samsvar med ISO 16140-2[8] sammenlignet med ISO 16654[3]

Valideringens omfang: Råtт storfekjøtt, rå melkeprodukter, rå frukt og grønnsaker

Prøveklargjøring: Prøvene skal klargjøres i henhold til EN ISO 16654 og EN ISO 6887[6]

Programvareversjon: Se sertifikatet

Tabell 4. Anrikningsprotokoller ved bruk av forvarmet BPW ISO ved 41,5 ± 1 °C i henhold til NF VALIDATION-sertifisert metode 3M 01/18-05/17

Protokoll	Prøvestør-relse	Anrikningsnærings-væskevolum (ml)	Anrikningstemperatur (±1 °C)	Anrikningstid (timer)
Rå melkeprodukter, rå frukt og rå grønnsaker	25 g	225	41,5	18–24
Råtт storfekjøtt	25 g	225	41,5	8–24

MERKNADER:

- Prøver større enn 25 g er ikke testet i NF VALIDATION-studien.
- De anbefalte protokollavbruddspunktene er etter anrikning eller etter prøvelysis. Anrikningsnæringsvæske eller prøvelysat kan oppbevares ved 2–8 °C i opptil 72 timer. Etter å ha tatt anrikningsnæringsvæsken ut av oppbevaringen, gjenopptar du testingen fra trinn 1 i avsnittet **Lysis**. Etter å ha tatt prøvelysatet ut av oppbevaringen, gjenopptar du testingen fra trinn 7 i avsnittet **Lysis**. Lysatet kan også oppbevares ved –20 °C.
- Korte anrikningsprotokoller er følsomme for inkubasjonsforhold, og temperaturene som er angitt i protokollen, må følges. Temperaturen til vannbadet eller inkubatoren der næringsvæskene forvarmes, skal verifiseres for å sikre at anrikningsnæringsvæsken når den nødvendige temperaturen. Den totale tiden for prøvepreparering, inkludert forsinkelsen mellom slutten av trinnet med oppvarming av mediet og begynnelsen av inkubasjonen av næringsmiddelprøven, må ikke overstige 45 minutter. Det anbefales å bruke en ventilert inkubator under inkuberingen.

Klargjøring av Neogen® molekylær detektering hurtiglastebrett

1. Fukt en klut eller et engangshåndkle med en 1–5 % (volumprosent i vann) løsning av klorholdig husholdningsblekemiddel og tørk av Neogen molekylær detektering hurtiglastebrett.
2. Skyll Neogen molekylær detektering hurtiglastebrett med vann.
3. Bruk et engangshåndkle til å tørke Neogen molekylær detektering hurtiglastebrett.
4. Sørg for at Neogen molekylær detektering hurtiglastebrett er tørt før bruk.

Klargjøring av Neogen® molekylær detektering kjøleblokkinnsats

Plasser Neogen molekylær detektering kjøleblokkinnsats direkte på laboratoriebenken: Neogen molekylær detektering kjøleblokkbrett brukes ikke. Bruk blokken ved laboratoriets romtemperatur (20–25 °C).

Klargjøring av Neogen® molekylær detektering varmeblokkinnsats

Plasser Neogen molekylær detektering varmeblokkinnsats i en dobbel tørrblokkvarmerenhet. Slå på tørrblokkvarmerenheten og still inn temperaturen slik at Neogen molekylær detektering varmeblokkinnsats kan nå og opprettholde en temperatur på 100 ± 1 °C.

MERK: Avhengig av varmerenheten kan det ta ca. 30 minutter før Neogen molekylær detektering varmeblokkinnsatsen når temperaturen. Bruk et egnet, kalibrert termometer (f.eks. et delvis nedsenkbart termometer eller et digitalt termoelementtermometer, ikke et fullstendig nedsenkbart termometer) plassert på det utpekte stedet til å verifisere at temperaturen til Neogen molekylær detektering varmeblokkinnsatsen er på 100 ± 1 °C.

Klargjøring av Neogen® instrument for molekylær detektering

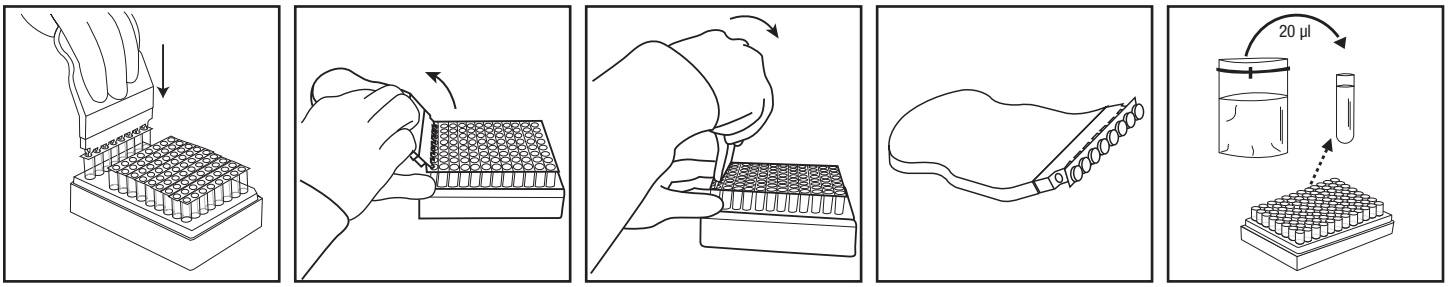
1. Start Neogen® programvare for molekylær detektering og logg inn. Kontakt din Neogen næringsmiddelsikkerhetsrepresentant for å sikre at du har den mest oppdaterte versjonen av programvaren.
2. Slå på Neogen instrument for molekylær detektering.
3. Opprett eller rediger en kjøring med data for hver prøve. Se brukermanualen for Neogen® system for molekylær detektering for detaljer.

MERK: Neogen instrument for molekylær detektering må nå og opprettholde en temperatur på 60 °C før Neogen molekylær detektering hurtiglastebrett med reaksjonsrør settes inn. Dette oppvarmingstrinnet tar omtrent 20 minutter og indikeres av en ORANSJE lampe på instrumentets statuslinje. Når instrumentet er klart til å starte en kjøring, blir statuslinjen GRØNN.

Lysis

1. La Neogen lysisløsningsrørene varmes opp ved å sette stativet i romtemperatur (20–25 °C) over natten (16–18 timer). Alternativer til å la Neogen lysisløsningsrørene nå romtemperatur er å sette Neogen lysisløsningsrørene på laboratoriebenken i minst 2 timer, inkubere Neogen lysisløsningsrørene i en 37 ± 1 °C inkubator i 1 time eller plassere dem i en dobbel tørrblokkvarmer i 30 sekunder ved 100 °C.
2. Inverter de lukkede rørene for å blande. Gå videre til neste trinn innen 4 timer.
3. Ta anrikningsnæringsvæsken ut av inkubatoren.
4. Det kreves ett Neogen lysisløsningsrør for hver prøve og den negative kontroll (NC)-prøven (sterilt anrikningsmedium).
   - 4.1 Neogen lysisløsningsrørremser kan kuttes til ønsket antall Neogen lysisløsningsrør. Velg det nødvendige antallet individuelle Neogen lysisløsningsrør eller 8-rørs remser. Sett Neogen lysisløsningsrørene i et tomt stativ.
   - 4.2 For å unngå krysskontaminering tar du lokkene av én remse med Neogen lysisløsningsrør om gangen og bruker en ny pipettespiss for hvert overføringstrinn.
   - 4.3 Overfør anriket prøve til Neogen lysisløsningsrør som beskrevet ovenfor:

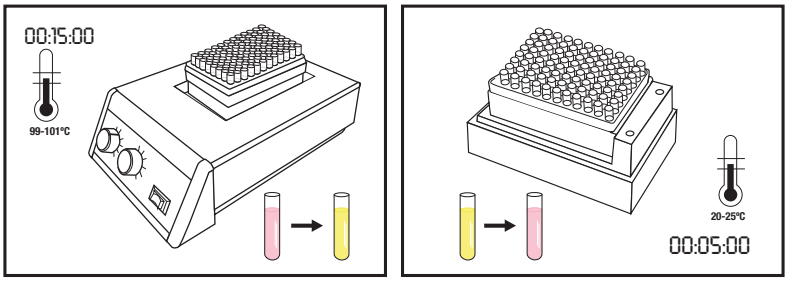
     Overfør **først** hver anrikede prøve til et individuelt Neogen lysisløsningsrør. Overfør den negative kontrollen **sist**.
   - 4.4 Bruk Neogen® molekylær detektering, verktøy for lukking/åpning av lysisrør til å åpne én Neogen lysisløsningsrørremse – én remse om gangen.
   - 4.5 Kast Neogen lysisløsningsrørlokket – Hvis lysat skal beholdes for ny test, plasserer du lokkene i en ren beholder for ny påsetting etter lysis.
     - 4.5.1 Se vedlegg A for prosessering av beholdt lysat.
   - 4.6 Overfør 20 µl prøve til et Neogen lysisløsningsrør med mindre noe annet er angitt i protokolltabell 2, 3 og 4.



5. Gjenta trinn 4.3 til hver enkelt prøve er tilsatt i et tilhørende Neogen lysisløsningsrør i remsen.
6. Gjenta trinn 4.1 til 4.6 etter behov, for antall prøver som skal testes.
7. Når alle prøvene er overført, overfører du 20 µl negativ kontroll (sterilt anrikningsmedium, f.eks. BPW ISO) til et Neogen lysisløsningsrør. Ikke bruk vann som en negativ kontroll.
8. Kontroller at temperaturen til Neogen molekylær detektering, varmeblokkinnsats er på 100 ± 1 °C.
9. Plasser det utildekkede stativet med Neogen lysisløsningsrør i Neogen molekylær detektering, varmeblokkinnsatsen i 15 ± 1 minutter Under oppvarming vil Neogen lysisløsningen endres fra rosa (kjølig) til gul (varm).

   Prøver som ikke har blitt riktig varmebehandlet under testens lysistrinn, kan anses som en potensiell biologisk fare og skal IKKE settes inn i Neogen instrument for molekylær detektering.
10. Fjern det utildekkede stativet med Neogen lysisløsningsrør fra varmeblokken og la den avkjøles i Neogen molekylær detektering, kjøleblokkinnsatsen i minst 5 minutter og maksimalt 10 minutter. Neogen molekylær detektering, kjøleblokkinnsatsen, som brukes ved omgivelsestemperatur uten Neogen molekylær detektering, kjøleblokkbrettet, skal sitte direkte på laboratoriebenken. Når den er avkjølt, vil lysisløsningen gå tilbake til en rosa farge.

11. Fjern stativet med Neogen lysisløsningsrør fra Neogen molekylær detektering, kjøleblokkinnsatsen.

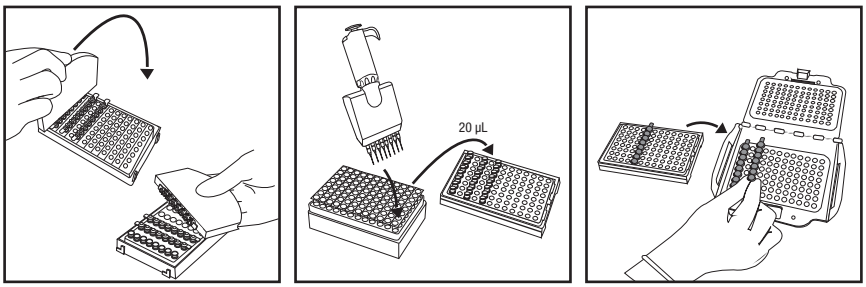


Amplifikasjon

1. Det kreves ett reagensrør for Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) for hver prøve og for den negative kontrollen.
   - 1.1 Rørremser kan kuttes til ønsket antall rør. Velg antallet individuelle reagensrør eller 8-rørs remser for Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) som trengs.
   - 1.2 Plasser reagensrør for Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) i et tomt stativ.
   - 1.3 Unngå å forstyrre reagenspelletsene fra bunnen av rørene.
2. Velg ett Neogen reagenskontrollrør og plasser det i stativet.
3. For å unngå krysskontaminering tar du lokkene av én remse med reagensrør for Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) om gangen og bruker en ny pipettespiss for hvert overføringstrinn.
4. Overfør lysat til et reagensrør for Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) og et Neogen reagenskontrollrør som beskrevet nedenfor:

Overfør hvert prøvelysat **først** til individuelle reagensrør for Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) etterfulgt av den negative kontrollen. Hydrer Neogen reagenskontrollrøret **sist**.

5. Bruk Neogen® molekylær detektering, verktøy for lukking/åpning av reagensrør til å ta lokket av reagensrøret for Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) – én rørremse om gangen. Kast lokket.
   - **5.1 Overfør 20 µl prøvelysat fra den øvre halvparten av væsken (unngå bunnfall) i Neogen lysisløsningsrøret til tilhørende reagensrør for** Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7)**. Dispenser på skrå for å unngå å forstyrre pelletsene. Bland ved å pipettere forsiktig opp og ned 5 ganger.**
   - 5.2 Gjenta trinn 5.1 til individuelt prøvelysat er tilsatt i et tilhørende reagensrør for Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) i remsen.
   - 5.3 Lukk reagensrørene for Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) med de medfølgende ekstra lokkene og bruk den avrundede siden av Neogen molekylær detektering, verktøy for lukking/åpning av reagensrør til å påføre trykk i en frem-og-tilbake-bevegelse, og sørg for at lokket er satt skikkelig på.
   - 5.4 Gjenta trinn 5.1 til 5.3 etter behov, for antall prøver som skal testes.
   - 5.5 Når alle prøvelysatene er overført, gjentar du 5.1 til 5.3 for å overføre 20 µl NC-lysat til et prøverør for Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7).
   - 5.6 Overfør **20 µl <u>NC-lysat</u> til et Neogen reagenskontrollrør**. Dispenser på skrå for å unngå å forstyrre pelletsene. Bland ved å pipettere forsiktig opp og ned 5 ganger.
6. Plasser lukkede rør i et rent og dekontaminert Neogen molekylær detektering, hurtiglastebrett. Deretter lukker og låser du lokket.



7. Gå gjennom og bekreft den konfigurerte kjøringen i Neogen programvare for molekylær detektering.
8. Klikk på startknappen i programvaren og velg instrumentet som skal brukes. Det valgte instrumentets lokk åpnes automatisk.
9. Plasser Neogen molekylær detektering, hurtiglastebrettet i Neogen instrument for molekylær detektering og lukk lokket for å starte testen. Resultatene gis innen 60 minutter, selv om positive kan detekteres tidligere.

10. Etter at testen er fullført, tar du Neogen molekylær detektering, hurtiglastebrettet ut av Neogen instrument for molekylær detektering og avhender de kontaminerte rørene ved å bløtlegge dem i en 1–5 % (volumprosent i vann) løsning av klorholdig husholdningsblekemiddel i 1 time og unna testklargjøringsområdet.

> **VARSEL:** For å minimere risikoen for falske positive resultater på grunn av krysskontaminering må du aldri åpne reagensrør som inneholder amplifisert DNA. Dette inkluderer Neogen reagenskontroll, reagensrør for Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7), og Neogen matrikskontrollrør. Avhend alltid forseglede reagensrør ved å bløtlegge dem i en 1–5 % (volumprosent i vann) løsning av klorholdig husholdningsblekemiddel i 1 time og unna testklargjøringsområdet.

Resultater og tolkning

En algoritme tolker lysutgangskurven som følger av detekteringen av nukleinsyreamplifikasjonen. Resultatene analyseres automatisk av programvaren og fargekodes basert på resultatet. Et positivt eller negativt resultat bestemmes ved analyse av en rekke unike kurveparametere. Presumptivt positive resultater rapporteres i sanntid, mens negative resultater og kontroller-resultater vil vises etter at kjøringen er fullført.

Presumptivt positive prøver skal bekreftes i henhold til laboratoriets standard driftsprosedyrer eller ved å følge den riktige referansemetodebekreftelsen[1,2,3], som starter med overføring fra den primære BPW ISO-anrikningen til sekundære anrikningsnæringsvæsker etterfulgt av etterfølgende plating og bekreftelse av isolater med egnede biokjemiske og serologiske metoder.

> **MERK:** Selv en negativ prøve vil ikke gi en nullavlesning siden systemet og amplifikasjonsreagensene til Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) har en avlesning av «bakgrunns-RLU» (relativ lysenhet).

I de sjeldne tilfellene med en uvanlig lysutgang merker algoritmen denne som «Kontroller». Neogen anbefaler at brukeren gjentar testen for Kontroller-prøver. Hvis resultatet fortsatt er Kontroller, går du videre til bekreftelsestest med din foretrukne metode eller som spesifisert av lokale forskrifter.

I tilfelle avvikende resultater (presumptivt positiv med Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7), ikke-bekreftet av et av midlene beskrevet ovenfor, og spesielt for lateksagglutinasjonstesten, må laboratoriet følge de nødvendige trinnene for å sikre validiteten til de oppnådde resultatene.

Bekreftelse av resultater i henhold til den NF VALIDATION-sertifiserte metoden

I forbindelse med NF VALIDATION må alle prøver identifisert som positive av Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) bekreftes av en av de følgende testene:

Alternativ 1: Ved bruk av ISO 16654[3]-standarden fra anrikningen med bufret peptonvann[3].

Alternativ 2: Implementering av en bekreftelsesmetode som består av følgende: Stryk ut 50 µl av anrikningen med bufret peptonvann[3] på en Cefixime Potassium Tellurite Sorbitol MacConkey (CT-SMAC)[3] agarskål. Inkuber i 24 ± 3 timer ved 37 °C. Stryk ut karakteristiske kolonier på næringsagar og utfør lateksagglutinasjonstest direkte på isolerte kolonier. Hvis resultatene til Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7) ikke bekreftes, utfører du et immunomagnetisk separasjonstrinn og stryker deretter ut 50 µl på CT-SMAC.

Alternativ 3: Ved bruk av nukleinsyreprober som beskrevet i EN ISO 7218[5]-standarden, utført på isolerte kolonier (rensede eller ikke) fra CT-SMAC (se alternativ 1 eller 2). Nukleinsyreprobene må være forskjellige fra dem brukt i Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7).

Alternativ 4: Ved bruk av en hvilken som helst annen metode sertifisert NF VALIDATION med et prinsipp som må være forskjellige fra Neogen molekylær deteksjonstest 2 – *E. coli* O157 (inkludert H7). Den fullstendige protokollen beskrevet for denne andre validerte metoden må brukes. Alle trinn før start av bekreftelsen må være felles for begge metodene.

I tilfelle avvikende resultater (presumptivt positiv med den alternative metoden, ikke-bekreftet av en av metodene beskrevet ovenfor) må laboratoriet følge de nødvendige trinnene for å sikre validiteten til det oppnådde resultatet.

Besøk nettstedet vårt på www.neogen.com eller kontakt din lokale Neogen-representant eller Neogen-distributør hvis du har spørsmål om spesifikke bruksområder eller prosedyrer.

Vedlegg A. Protokollavbrudd: Oppbevaring og retesting av prøver

1. For å oppbevare et varmebehandlet lysat lukker du lysisrøret med et rent lokk (se avsnittet **Lysis**, 4.5)
2. For å oppbevare en anriket prøve, inkuber i minst 18 timer før oppbevaring.
3. Oppbevar ved 4 til 8 °C i opptil 72 timer.
4. Klargjør en oppbevart prøve for amplifikasjon ved å snu opp ned 2–3 ganger for å blande.
5. Ta lokket av rørene.
6. Plasser de blandede lysatrørene på Neogen molekylær detektering, varmeblokkinnsats ved 100 ± 1 °C i 5 ± 1 minutter.
7. Fjern stativet med Neogen lysisløsningsrør fra varmeblokken og la dem avkjøles i Neogen molekylær detektering, kjøleblokkinnsatsen i minst 5 minutter og maksimalt 10 minutter.
8. Fortsett protokollen ved avsnittet **Amplifikasjon** beskrevet ovenfor.

Referanser:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli.* November 2015.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 5.09. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. Ikrafttredelsesdato: 15. januar 2015.
3. ISO 16654:2001 Fôr- og næringsmiddelmikrobiologi – Horisontal metode for påvisning av *Escherichia coli* O157.
4. ISO/IEC 17025. Generelle krav til prøvings- og kalibreringslaboratoriers kompetanse.
5. ISO 7218. Mikrobiologi i matvarer og dyrefor – Generelle krav og veiledning for mikrobiologiske undersøkelser.
6. ISO 6887. Mikrobiologi i næringsmidler og fôr – Opparbeiding av analyseprøver, opprinnelig suspensjon og tierfortynninger for mikrobiologisk undersøkelse.
7. Installasjonskvalifikasjon (IQ) / driftskvalifikasjon (OQ) for Neogen® system for molekylær detektering. Neogen næringsmiddelsikkerhet.

Symbolforklaring

info.neogen.com/symbols

AOAC er et registrert varemerke for AOAC INTERNATIONAL

Official Methods er et registrert tjenestemerke for AOAC INTERNATIONAL

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

NEOGEN

Tuoteohjeet

Molekulaarinen testisetti 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7)

Tuotteen kuvaus ja käyttötarkoitus

Neogen®-yhtiön molekulaarinen testisetti 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) -tuotetta käytetään molekulaarisen Neogen®-testijärjestelmän kanssa nopeaan ja spesifiseen *E. coli* O157:n (sisältäen H7) havaitsemiseen rikastetuista elintarvike- ja rehunäytteistä.

Molekulaarinen Neogen-testisetti käyttää silmukkavälitteistä isotermistä monistusta nukleiinihapposekvenssien nopeaan monistamiseen suurella spesifisyydellä ja herkkyydellä yhdessä bioluminesenssin kanssa, millä tunnistetaan monistuminen. Oletetut positiiviset tulokset raportoidaan reaaliajassa, kun taas negatiiviset tulokset näytetään määrityksen päätyttyä. Oletetut positiiviset tulokset pitää vahvistaa käyttämällä halutulla menetelmällä tai paikallisten määräysten mukaisesti [1, 2, 3].

Molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) on tarkoitettu laboratoriotekniikoihin koulutettujen ammattilaisten käytettäväksi laboratorioympäristössä. Neogen ei ole dokumentoinut tämän tuotteen käyttöä muilla aloilla kuin elintarvike- tai juomateollisuudessa. Neogen ei ole esimerkiksi dokumentoinut tämän tuotteen käyttöä ympäristö-, lääke-, kosmetiikka-, kliinisten tai eläinlääkintänäytteiden testaamisessa. Molekulaarista Neogen-testisettiä 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) ei ole arvioitu kaikilla mahdollisilla elintarvikkeilla, elintarvikeprosesseilla, testausprotokollilla tai kaikilla mahdollisilla bakteerikannoilla.

Kuten kaikissa testimenetelmissä, rikastusaineen lähde, koostumus ja laatu voivat vaikuttaa tuloksiin. Sellaiset tekijät kuin näytteenottomenetelmät, testausprotokollat, näytteen valmistelu, käsittely ja laboratoriotekniikka voivat myös vaikuttaa tuloksiin. Neogen suosittelee menetelmän, myös rikastusväliaineen, arviointia käyttöympäristössä käyttämällä riittävää määrää näytteitä tiettyjen elintarvike- ja mikrobialtistusten kanssa. Näin varmistetaan, että menetelmä vastaa käyttäjän kriteerejä.

Neogen on arvioinut molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) puskuroidulla ISO-peptonivedellä.

Molekulaarinen Neogen®-testilaite on tarkoitettu käytettäväksi sellaisten näytteiden kanssa, joille on tehty määrityksen lyysausvaiheessa lämpökäsittely, jonka tarkoitus on tuhota näytteessä olevat organismit. Näytteitä, joita ei ole lämpökäsitelty asianmukaisesti määrityksen lyysausvaiheen aikana, voidaan pitää mahdollisesti biovaarallisina, EIKÄ niitä saa laittaa molekulaarisen Neogen-testilaitteen sisään.

Neogen Food Safety on sertifioitu ISO (International Organization for Standardization) 9001 -standardin mukaisesti suunnittelun ja valmistuksen osalta.

Molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) testipakkaus sisältää 96 testiä, jotka on kuvattu taulukossa 1.

Taulukko 1. molekulaarisen Neogen-testisetin pakkauksen komponentit

Tuote	Tunnistetiedot	Määrä	Sisällys	Kommentit
Neogen®-lyysausliuos (LS)	Vaaleanpunainen liuos kirkkaissa putkissa	96 (12 liuskaa, joissa on kussakin on 8 putkea)	580 µl Neogen-lyysausliuosta putkea kohti	Telineessä ja käyttövalmiina
Molekulaarisen Neogen®-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) reagenssiputket	Vaaleanpunaiset putket	96 (12 liuskaa, joissa on kussakin on 8 putkea)	Kylmäkuivattu spesifinen monistus- ja tunnistusseos	Käyttövalmis
Ylimääräiset korkit	Vaaleanpunaiset korkit	96 (12 liuskaa, joissa on kussakin 8 korkkia)		Käyttövalmis
Neogen®-reagenssikontrolli (RC)	Kirkkaat käännettävän korkin sisältävät putket	16 (2 pussia, joissa kummassakin on 8 yksittäistä putkea)	Kylmäkuivattu kontrolli-DNA, monistus- ja tunnistusseos	Käyttövalmis

Negatiivinen kontrolli, joka ei sisälly pakkaukseen, on steriili rikastusaine, esim. BPW ISO. Älä käytä vettä negatiivisena kontrollina.

Turvallisuus

Käyttäjän pitää lukea huolella ja ymmärtää kaikki molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän ja molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) ohjeet sekä noudattaa niitä. Säilytä turvallisuusohjeet tulevaa tarvetta varten.

⚠ **VAKAVA VAROITUS:** osoittaa vaaratilanteen, joka voi johtaa kuolemaan tai vakavaan henkilövahinkoon ja/tai omaisuusvahinkoon, jos tilannetta ei vältetä.

ILMOITUS: osoittaa mahdollisesti vaarallisen tilanteen, joka voi johtaa omaisuusvahinkoihin, jos tilannetta ei vältetä.

⚠ VAKAVA VAROITUS

Älä käytä molekulaarista Neogen-testisettiä 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) ihmisten tai eläinten sairauksien diagnosointiin.

Käyttäjän on koulutettava henkilöstönsä ajantasaisten asianmukaisten testaustekniikoiden käyttöön: esimerkiksi hyvät laboratoriokäytännöt, ISO/IEC 17025[4] tai ISO 7218[5].

Jotta voidaan vähentää riskejä, jotka liittyvät väärään negatiiviseen tulokseen, joka johtaa kontaminoituneen tuotteen luovutukseen:

- Noudata protokollaa ja suorita testit täsmälleen tuotteen ohjeiden mukaisesti.
- Käytä väliainetta, joka on esilämmitetty 41,5 ± 1 °C:seen. Älä anna väliaineen laskea alle inkubointilämpötila-alueen näytteen valmistelun aikana.
- Säilytä molekulaarinen Neogen-testisetti 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) sen pakkauksen ja tuoteohjeiden mukaisesti.
- Käytä molekulaarinen Neogen-testisetti 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) aina viimeiseen käyttöpäivään mennessä.
- Käytä molekulaarista Neogen-testisettiä 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) sellaisille elintarvikkeiden, rehujen ja elintarvikeprosessien ympäristönäytteille, jotka on validoitu sisäisesti tai jotka on validoinut kolmas osapuoli.
- Käytä molekulaarista Neogen-testisettiä 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) vain sellaisten pintojen, puhdistusaineiden, protokollien ja bakteerikantojen kanssa, jotka on validoitu sisäisesti tai jotka on validoinut kolmas osapuoli.
- Jos ympäristönäyte sisältää neutralointipuskuria (NB) ja aryylisulfonaattikompleksia, suorita 1:2-laimennus ennen testausta (1 osa näytettä 1 osaan steriiliä rikastuslientä). Toinen vaihtoehto on siirtää 10 µl neutralointipuskurin rikastetta Neogen-lyysausliuosputkiin. Neogen®-näytteenkäsittelytuotteet, jotka sisältävät Neogen®-neutralointipuskuria, jossa on aryylisulfonaattikompleksia: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XSLSSL10NB, HS10NB ja HS119510NB.

Kemikaaleille ja biologisille vaaroille altistumiseen liittyvien riskien vähentämiseksi:

- Suorita patogeenitesti asianmukaisesti varustellussa laboratoriossa koulutetun henkilöstön valvonnassa. Inkuboidut rikastusaineet ja laitteet tai pinnat, jotka ovat joutuneet kosketuksiin inkuboitujen rikastusaineiden kanssa, voivat sisältää taudinaiheuttajia sellaisina määrinä, jotka riittävät aiheuttamaan riskin ihmisten terveydelle.
- Noudata aina normaaleja laboratorioturvallisuuskäytäntöjä, mukaan lukien asianmukaisten suojavaatteiden ja silmänsuojainten käyttö, kun käsittelet reagensseja ja kontaminoituneita näytteitä.
- Vältä kosketusta rikastusväliaineen ja reagenssiputkien sisällön kanssa monistuksen jälkeen.
- Hävitä rikastetut näytteet ja niihin liittyvä kontaminoitunut jäte voimassa olevien paikallisten/alueellisten/kansallisten/alan standardien mukaisesti.
- Älä ylitä lämmityslaitteen suurinta suositeltua lämpötila-asetusta.
- Älä ylitä suositeltua lämmitysaikaa.
- Käytä sopivaa, kalibroitua lämpömittaria molekulaarisen Neogen®-testijärjestelmän lämpöblokin sisäkkeen lämpötilan tarkistamiseen (esim. osittain upotettavaa lämpömittaria tai digitaalista lämpöparilämpömittaria, ei kokonaan upotettavaa lämpömittaria). Lämpömittari on sijoitettava määrättyyn paikkaan molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän lämpöblokin sisäkkeeseen.

Jotta voidaan pienentää ristikontaminaatioon liittyviä riskejä määritystä valmisteltaessa:

- Käytä aina käsineitä (käyttäjän suojaamiseksi ja nukleaasien järjestelmään pääsyn estämiseksi).

Kuumille nesteille altistumiseen liittyvien riskien vähentämiseksi:

- Älä ylitä lämmityslaitteen suurinta suositeltua lämpötila-asetusta.
- Älä ylitä suositeltua lämmitysaikaa.
- Käytä sopivaa, kalibroitua lämpömittaria molekulaarisen Neogen®-testijärjestelmän lämpöblokin sisäkkeen lämpötilan tarkistamiseen (esim. osittain upotettavaa lämpömittaria tai digitaalista lämpöparilämpömittaria, ei kokonaan upotettavaa lämpömittaria). Lämpömittari on sijoitettava määrättyyn paikkaan molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän lämpöblokin sisäkkeeseen.

ILMOITUS

Jotta voidaan pienentää ristikontaminaatioon liittyviä riskejä määritystä valmisteltaessa:

- Suosittelemme steriilien, aerosoliesteellisten (suodatettujen), molekyylibiologisten pipetinkärkien käyttöä.
- Käytä jokaiseen näytteensiirtoon uutta pipetinkärkeä.
- Käytä hyviä laboratoriokäytäntöjä näytteen siirrossa rikastetusta näytteestä lyysausputkeen. Pipetin kontaminaation välttämiseksi käyttäjä voi halutessaan lisätä välisiirtovaiheen. Käyttäjä voi esimerkiksi siirtää jokaisen rikastetun näytteen steriiliin putkeen.
- Käytä molekyylibiologista työasemaa, joka sisältää bakteereja tappavan valo, jos vain mahdollista.

Voit vähentää vääriin positiivisiin tuloksiin liittyviä riskejä seuraavasti:

- Älä koskaan avaa putkia monistuksen jälkeen.
- Hävitä saastuneet putket aina liottamalla niitä 1–5-prosenttisessa (tilavuus:tilavuus vedessä) kotitalouskäyttöön tarkoitetussa valkaisuaineliuoksessa 1 tunnin ajan ja erillään määrityksen valmistelualueelta.

Katso lisätietoja ja paikalliset hävittämistä koskevat määräykset käyttöturvallisuustiedotteesta.

Jos sinulla on kysyttävää tietyistä käyttökohteista tai menettelyistä, käy verkkosivuillamme osoitteessa www.neogen.com tai ota yhteyttä paikalliseen Neogen-edustajaan tai jakelijaan.

Käyttäjän vastuu

Käyttäjien pitää tutustua tuoteohjeisiin ja -tietoihin. Käy verkkosivuillamme osoitteessa **www.neogen.com** tai ota yhteyttä paikalliseen Neogen-edustajaan tai jakelijaan, jos haluat lisätietoja.

Testausmenetelmää valittaessa on tärkeää huomata, että tuloksiin voivat vaikuttaa ulkoiset tekijät, kuten näytteenottomenetelmät, testausprotokollat, näytteen valmistelu, käsittely ja laboratoriotekniikka.

Käyttäjän pitää arvioida riittävä määrä näytteitä sopivilla matrikseilla ja mikrobialtistuksilla testausmenetelmien tai tuotteiden valintaa varten, jotta käyttäjä voi varmistua siitä, että valittu testimenetelmä täyttää käyttäjän kriteerit.

Käyttäjän vastuulla on myös varmistaa, että kaikki testimenetelmät ja tulokset vastaavat asiakkaiden ja toimittajien vaatimuksia.

Kuten minkä tahansa testimenetelmän kohdalla, minkä tahansa Neogen Food Safety -tuotteen käytöstä saadut tulokset eivät takaa testattujen matriksien tai prosessien laatua.

Neogen haluaa auttaa asiakkaita arvioimaan menetelmän käyttöä erilaisille ruokamatrikseille, ja siksi Neogen on kehittänyt molekulaarisen Neogen®-testijärjestelmän matriksikontrollipakkauksen. Käytä tarvittaessa matriksikontrollia (MC) sen määrittämiseen, pystyykö matriksi vaikuttamaan molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) tuloksiin. Testaa useita matriksia edustavia näytteitä eli eri alkuperää olevia näytteitä minkä tahansa validointijakson aikana, kun otat käyttöön Neogen-menetelmää tai kun testaat uusia tai tuntemattomia matrikseja tai matrikseja, joihin on tehty raaka-ainetta tai prosessia koskevia muutoksia.

Matriksi voidaan määritellä sellaiseksi tuotteeksi, jolla on luontaisia ominaisuuksia, kuten koostumus ja prosessi. Matriksien väliset erot voivat olla niinkin yksinkertaisia kuin niiden käsittelyn tai esillepanon erojen aiheuttamia vaikutuksia, joita voivat olla esimerkiksi käsittelemätön vs. pastöroitu; tuore vs. kuivattu jne.

Takuun rajoitukset / rajoitettu korvauksenhaku

ELLEI YKSITTÄISEN TUOTTEEN PAKKAUKSEN RAJOITETUN TAKUUN OSIOSSA NIMENOMAISESTI TOISIN MAINITA, NEOGEN KIISTÄÄ KAIKKI NIMENOMAISET JA KONKLUDENTTISET TAKUUT, MUKAAN LUKIEN MUUN MUASSA KAIKKI TAKUUT MYYNTIKELPOISUUDESTA TAI SOVELTUVUUDESTA TIETTYYN KÄYTTÖÖN. Jos jokin Neogen Food Safety -tuote on viallinen, Neogen tai sen valtuutettu jälleenmyyjä harkintansa mukaan joko korvaa tuotteen tai palauttaa tuotteen ostohinnan. Nämä ovat ainoita korvauksenhakukeinojasi. Sinun on ilmoitettava Neogenille viipymättä kuudenkymmenen päivän kuluessa vioista, joita epäilet tuotteessa olevan, ja palautettava tuote Neogenille. Ota yhteys Neogen-edustajaan tai valtuutettuun Neogen-jälleenmyyjään, jos sinulla on muuta kysyttävää.

Neogenin vastuun rajoitus

NEOGEN EI OLE VASTUUSSA MISSÄÄN MENETYKSISTÄ TAI VAHINGOISTA, SEKÄ SUORISTA, EPÄSUORISTA, ERITYISISTÄ, SATUNNAISISTA ETTÄ VÄLILLISISTÄ VAHINGOISTA, MUKAAN LUKIEN MUUN MUASSA TUOTTOJEN MENETYS. Neogenin vastuu ei missään tapauksessa minkään oikeusteorian perusteella ylitä vialliseksi väitetyn tuotteen ostohintaa.

Säilyttäminen ja hävittäminen

Säilytä molekulaarista Neogen-testisettiä 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) 2–8 °C:n lämpötilassa. Se ei saa jäätyä. Pidä pakkaus valolta suojattuna säilytyksen ajan. Tarkista pakkauksen avaamisen jälkeen, että foliopussi on ehjä. Jos pussi on vaurioitunut, älä käytä tuotetta. Avaamisen jälkeen käyttämättömät reagenssiputket on aina säilytettävä uudelleen suljettavassa pussissa, jonka sisällä on kuivausainetta, joka takaa kylmäkuivattujen reagenssien säilymisen. Säilytä uudelleen suljettuja pusseja 2–8 °C:ssa enintään 60 päivää.

Älä käytä molekulaarista Neogen-testisettiä 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) sen viimeisen käyttöpäivän jälkeen. Viimeinen käyttöpäivä ja eränumero on merkitty laatikon ulkopuolelle etikettiin. Käytön jälkeen rikastusaine ja molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) putket voivat sisältää mahdollisesti patogeenisiä materiaaleja. Kun testaus on valmis, noudata voimassa olevia alan standardeja saastuneen jätteen hävittämisessä. Katso lisätietoja ja paikalliset hävittämistä koskevat määräykset käyttöturvallisuustiedotteesta.

Käyttöohjeet

Noudata kaikkia ohjeita huolellisesti. Jos ohjeita ei noudateta, tulokset voivat olla epätarkkoja.

Käyttäjän on suoritettava molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän käyttäjän pätevyyskoulutus, joka on kuvattu asiakirjassa ”Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System” document[7].

Dekontaminoi laboratoriopöydät ja -laitteet (pipetit, korkinkiinnitys- ja avaustyökalut jne.) säännöllisesti 1–5-prosenttisella (tilavuus:tilavuus vedessä) kotitalouskäyttöön tarkoitetulla valkaisuaineliuoksella tai DNA:n poistoliuoksella.

Katso erityisvaatimukset ”Validoitujen menetelmien erityisohjeet” -kohdasta:

Taulukko 3 koskee rikastusprotokollia, jotka noudattavat AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2017.01 -menetelmää.

Taulukko 4 koskee rikastusprotokollia, jotka ovat NF Validation -todistuksen 3M 01/18-05/17 mukaisia.

Näytteen rikastus

Taulukoissa 2, 3 tai 4 on ohjeita elintarvikkeiden rikastusprotokollia varten. Käyttäjän tehtävänä on vaihtoehtoisten näytteenottoprotokollien tai laimennussuhteiden validointi, jotta voidaan varmistaa, että kyseinen testimenetelmä täyttää käyttäjän kriteerit.

Elintarvikkeet

1. Esilämmitä BPW ISO -rikastusaine 41,5 ± 1 °C:seen.
2. Yhdistä rikastusaine ja näyte aseptisesti taulukoiden 2, 3 tai 4 mukaisesti. Kaikille lihanäytteille ja suuren hiukkaspitoisuuden näytteille suositellaan suodatinpussien käyttöä.
3. Homogenoi kaikki matriksit, lehdekkäitä elintarvikkeita ja hedelmiä lukuun ottamatta, perusteellisesti sekoittamalla, stomaching-sekoituksella tai käsin sekoittamalla 2 ± 0,2 minuutin ajan. Inkuboi 41,5 ± 1 °C:ssa sopivan ajan taulukoiden 2, 3 tai 4 mukaisesti.

Taulukko 2. Yleiset rikastusprotokollat

Näytematriksi[a]	Näytekoko	Rikastusliemen tilavuus (ml)	Rikastuslämpötila (±1 °C)	Rikastusaika (tuntia)
Raaka naudanliha, mukaan lukien jauhettu liha / jauheliha ja leikkeet	325 g	975 BPW ISO (esilämmitetty)	41,5	10-18
Raaka liha, mukaan lukien raaka naudanliha, sianliha, siipikarja, lammas ja biisoni	25 g	225 BPW ISO (esilämmitetty)	41,5	8-18
Lehdekkäät elintarvikkeet[b]	200 g	450 BPW ISO (esilämmitetty)	41,5	18-24
Muut elintarvikkeet, mukaan lukien hedelmät[b], vihannekset, hedelmä-/vihannesmehut, tuoreet yrtit, raa'at merenelävät, raa'at munat, raakamaito, keksitaikina ja jalostettu liha	25 g	225 BPW ISO (esilämmitetty)	41,5	18-24
Saksanpähkinät tai saksanpähkinöitä sisältävät pähkinäseokset (tämä protokolla soveltuu muille pähkinöille, mukaan lukien pekaanipähkinät, mantelit, pistaasipähkinät, cashewpähkinät ja kastanjat)	25 g	225 ennastettu rasvaton kuivamaito	41,5	18-24

(a) Pakastetut näytteet on tasapainotettava 4–8 °C:seen ennen niiden lisäämistä rikastusliemeen.

(b) Lehdekkäitä näytteitä ja hedelmänäytteitä on ravistettava varovasti käsin 5 minuutin ajan. Älä sekoita tai käytä sekoittamiseen stomaching-sekoitusmenetelmää.

Validoitujen menetelmien erityisohjeet

AOAC® *Official Methods of Analysis*℠ 2017.01

AOAC *Official Method of Analysis*℠ -ohjelmassa molekulaarinen Neogen-testisetti 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) todettiin tehokkaaksi menetelmäksi *E. coli* O157:H7-tunnistuksen suhteen. Tutkimuksessa testatut matriksit on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Rikastusprotokollat, joissa käytetään esilämmitettyä BPW ISO:a 41,5 ± 1 °C:ssa AOAC® *Official Methods*℠ 2017.01 -menetelmien mukaisesti

Näytematriksi	Näytekoko	Rikastusliemen tilavuus (ml)	Rikastusaika (tuntia)	Homogenoitu
Raaka jauheliha (73 %, vähärasvainen)	325 g	975	10–18	Käsin tai stomaching-sekoittimella
Raaka pussitettu pinaatti[a]	200 g	450	18–24	Sekoita varovasti käsin 5 minuuttia, älä homogenisoi
Tuoreet idut	25 g	225	18–24	Sekoita varovasti käsin 5 minuuttia, älä homogenisoi
Pakastetut mustikat[a][b]	25 g	225	18–24	Sekoita varovasti käsin 5 minuuttia, älä homogenisoi

(a) Lehdekkäitä näytteitä ja hedelmänäytteitä on ravistettava varovasti käsin 5 minuutin ajan. Älä sekoita tai käytä sekoittamiseen stomaching-sekoitusmenetelmää.

(b) Pakastetut näytteet on tasapainotettava 4–8 °C:seen ennen niiden lisäämistä rikastusliemeen.

NF Validation AFNOR-sertifioinnin avulla

3M 01/18-05/17

VAIHTOEHTOISET ANALYYSIMENETELMÄT MAATALOUSALALLA

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

Lisätietoja voimassaolon päättymisestä on NF VALIDATION -todistuksessa, joka on saatavilla yllä mainitusta verkkosivustosta.

ISO 16140-2 -standardin[8] mukainen NF VALIDATION -sertifioitu menetelmä verrattuna ISO 16654 -standardiin[3]

Validoinnin soveltamisala: Raaka naudanliha, raa'at maitotuotteet, raa'at hedelmät ja vihannekset.

Näytteen valmistelu: Näytteet on valmistettava EN ISO 16654- ja EN ISO 6887 -standardien[6] mukaisesti.

Ohjelmistoversio: Katso todistus.

Taulukko 4. Rikastusprotokollat, joissa käytetään esilämmitettyä BPW ISO:a 41,5 ± 1 °C:ssa NF VALIDATION -sertifioidun menetelmän 3M 01/18-05/17 mukaisesti.

Protokolla	Näytekoko	Rikastusliemen tilavuus (ml)	Rikastuslämpötila (±1 °C)	Rikastusaika (tuntia)
Raa'at maitotuotteet, raa'at hedelmät ja raa'at vihannekset	25 g	225	41,5	18-24
Raaka naudanliha	25 g	225	41,5	8-24

HUOMAUTUKSIA:

- Yli 25 g:n näytteitä ei ole testattu NF VALIDATION -tutkimuksessa.
- Suositellut protokollan keskeytyskohdat ovat rikastuksen tai näytteen hajotuksen jälkeen. Rikastuslientä tai näytelysaattia voidaan säilyttää 2–8 °C:ssa enintään 72 tuntia. Kun olet poistanut rikastusliemen säilytyksestä, aloita testaus **Lyysaus**-osion vaiheesta 1. Kun olet poistanut näytelysaatin säilytyksestä, aloita testaus **Lyysaus**-osion vaiheesta 7. Lysaattia voidaan säilyttää myös –20 °C:ssa.
- Lyhyet rikastusprotokollat ovat herkkiä inkubointiolosuhteille, ja protokollassa määriteltyjä lämpötiloja on noudatettava. Vesihauteen tai inkubaattorin lämpötila, jossa liemet esilämmitetään, pitää tarkistaa, jotta voidaan varmistua siitä, että rikastusliemi saavuttaa vaaditun lämpötilan. Näytteen valmisteluun kuluva kokonaisaika, mukaan lukien aineen esilämmitysvaiheen päättymisen ja elintarvikenäytteen inkuboinnin alkamisen välinen viive, ei saa ylittää 45 minuuttia. Ilmanvaihdollisen inkubaattorin käyttö inkuboinnin aikana on suositeltavaa.

Molekulaarisen Neogen®-testijärjestelmän pikalatausalustan valmistelu

1. Kostuta liina tai kertakäyttöpyyhe 1–5-prosenttisella (tilavuus:tilavuus vedessä) kotitalouskäyttöisellä valkaisuaineliuoksella ja pyyhi sillä molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän pikalatausalusta.
2. Huuhtele molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän pikalatausalusta vedellä.
3. Pyyhi molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän pikalatausalusta kuivaksi kertakäyttöpyyhkeellä.
4. Varmista, että molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän pikalatausalusta on kuiva ennen käyttöä.

Molekulaarisen Neogen®-testijärjestelmän jäähdytysblokin sisäkkeen valmistelu

Aseta molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän jäähdytysblokin sisäke suoraan laboratoriopöydälle: Molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän jäähdytysblokin alustaa ei käytetä. Käytä blokkia laboratoriossa ympäristönlämpötilassa (20–25 °C).

Molekulaarisen Neogen®-testijärjestelmän lämpöblokin sisäkkeen valmistelu

Aseta molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän lämpöblokin sisäke kuivaan kahden blokin lämmityslaitteeseen. Kytke kuivablokin lämmitysyksikkö päälle ja säädä lämpötila niin, että molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän lämpöblokin sisäke saavuttaa 100 ± 1 °C:n lämpötilan, jossa se myös pysyy.

HUOMAUTUS: odota noin 30 minuuttia, jotta molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän lämpöblokin sisäke saavuttaa halutun lämpötilan; tämä aika vaihtelee hieman lämmitysyksikön mukaan. Varmista sopivalla, kalibroidulla lämpömittarilla (esim. osittain upotettava lämpömittari, digitaalinen lämpöparilämpömittari, ei kokonaan upotettava lämpömittari), joka on sijoitettu määrättyyn paikkaan, että molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän lämpöblokin sisäkkeen lämpötila on 100 ± 1 °C.

Molekulaarisen Neogen®-testilaitteen valmistelu

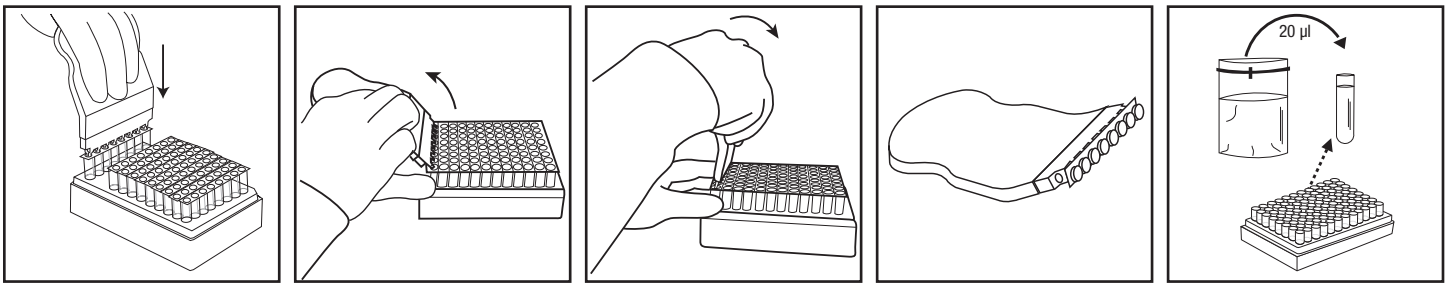
1. Käynnistä molekulaarisen Neogen®-testijärjestelmän ohjelmisto ja kirjaudu sisään. Ota yhteys Neogen Food Safetyn edustajaan, jos sinun on varmistettava, onko käytössäsi ohjelmiston uusin versio.
2. Käynnistä molekulaarinen Neogen-testilaite.
3. Luo tai muokkaa ajo, jossa on tiedot jokaiselle näytteelle. Katso lisätietoja molekulaarisen Neogen®-testijärjestelmän käyttöoppaasta.

HUOMAUTUS: molekulaarisen Neogen-testilaitteen on saavutettava 60 °C:n lämpötila ja sen on pysyttävä tässä lämpötilassa, ennen kuin molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän pikalatausalusta asetetaan paikalleen reaktioputkineen. Tämä lämmitysvaihe kestää noin 20 minuuttia, ja sen ilmaisee ORANSSI valo laitteen tilapalkissa. Kun laite on valmis aloittamaan ajon, tilapalkki muuttuu VIHREÄKSI.

Lyysaus

1. Anna Neogen-lyysausliuoksen putkien lämmetä asettamalla teline huoneenlämpöön (20–25 °C) yön ajaksi (16–18 tunniksi). Vaihtoehtoisesti Neogen-lyysausliuoksen putket voidaan tasapainottaa huoneenlämpöön asettamalla Neogen-lyysausliuoksen putket laboratoriopöydälle vähintään 2 tunniksi, inkuboimalla Neogen-lyysausliuoksen putkia 37 ± 1 °C:n lämpöisessä inkubaattorissa 1 tunnin ajan tai laittamalla ne kuivaan kaksiblokkiseen lämmittimeen 30 sekunnin ajaksi käyttäen 100 °C:n lämpötilaa.
2. Kääntele korkilla suljettuja putkia ylösalaisin niiden sekoittamiseksi. Jatka seuraavaan vaiheeseen 4 tunnin kuluessa.
3. Poista rikastusliemi inkubaattorista.
4. Jokaista näytettä ja negatiivista kontrolli (NC) -näytettä (steriili rikastusaine) kohden tarvitaan yksi Neogen-lyysausliuoksen putki.
   - 4.1 Neogen-lyysausliuoksen putkiliuskat voidaan leikata halutuksi määräksi Neogen-lyysausliuoksen putkia. Valitse tarvittava yksittäisten Neogen-lyysausliuoksen putkien tai 8 putken liuskojen lukumäärä. Laita Neogen-lyysausliuoksen putket tyhjään telineeseen.
   - 4.2 Jotta vältetään ristikontaminaatio, poista korkki yhdestä Neogen-lyysausliuoksen putkiliuskasta kerrallaan ja käytä uutta pipetinkärkeä jokaisessa siirtovaiheessa.
   - 4.3 Siirrä rikastettu näyte Neogen-lyysausliuoksen putkiin alla kuvatulla tavalla:

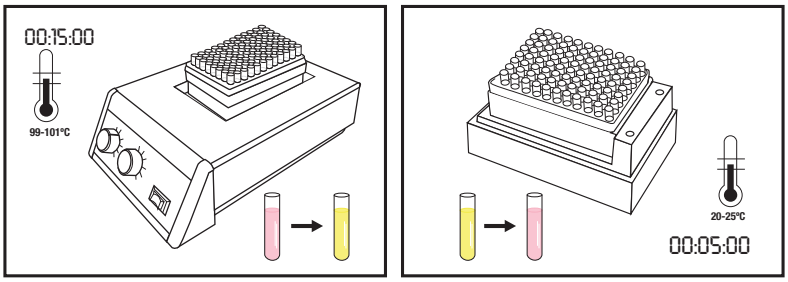
     Siirrä jokainen rikastettu näyte **ensin** yksittäiseen Neogen-lyysausliuoksen putkeen. Siirrä NC **viimeisenä.**
   - 4.4 Käytä molekulaarisen Neogen®-testijärjestelmän korkin kiinnitys-irrotustyökalua (lyysaus) korkin irrottamiseen yhdestä Neogen-lyysausliuoksen putkiliuskasta – yksi liuska kerrallaan.
   - 4.5 Hävitä Neogen-lyysausliuoksen putken korkki. Jos lysaatti säilytetään uudelleentestausta varten, aseta korkit puhtaaseen astiaan ja kiinnitä ne uudelleen lyysauksen jälkeen.
     - 4.5.1 Katso tiedot säilytetyn lysaatin käsittelystä liitteestä A.
   - 4.6 Siirrä 20 µl näytettä Neogen-lyysausliuoksen putkeen, ellei protokollataulukoissa 2, 3 ja 4 toisin mainita.



5. Toista vaihetta 4.3, kunnes jokainen yksittäinen näyte on lisätty liuskan vastaavaan Neogen-lyysausliuoksen putkeen.
6. Toista tarvittaessa vaiheet 4.1–4.6 testattavalle määrälle näytteitä.
7. Kun kaikki näytteet on siirretty, siirrä 20 µl NC:tä (steriili rikastusaine, esim. BPW ISO) Neogen-lyysausliuoksen putkeen. Älä käytä vettä NC:nä.
8. Varmista, että molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän lämpöblokin sisäkkeen lämpötila on 100 ± 1 °C.
9. Aseta peittämätön Neogen-lyysausliuoksen putkiteline molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän lämpöblokin sisäkkeeseen ja kuumenna 15 ± 1 minuuttia. Kuumennuksen aikana Neogen-lyysausliuos muuttuu vaaleanpunaisesta (kylmä) keltaiseksi (kuuma).

   Näytteitä, joita ei ole lämpökäsitelty asianmukaisesti määrityksen lyysausvaiheen aikana, voidaan pitää mahdollisesti biovaarallisina, EIKÄ niitä saa laittaa molekulaarisen Neogen-testilaitteen sisään.

10. Irrota peittämätön Neogen-lyysausliuosputkien teline lämpöblokista ja anna molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän jäähdytysblokin sisäkkeen jäähtyä vähintään 5 minuuttia ja enintään 10 minuuttia. Molekulaarisen Neogen-jäähdytysblokin sisäkkeen, jota käytetään ympäristön lämpötilassa ilman molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän jäähdytysblokin alustaa, pitää olla suoraan laboratoriopöydällä. Jäähtyessään lyysausliuos muuttuu vaaleanpunaiseksi.
11. Poista Neogen-lyysausliuoksen putkiteline molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän jäähdytysblokin sisäkkeestä.

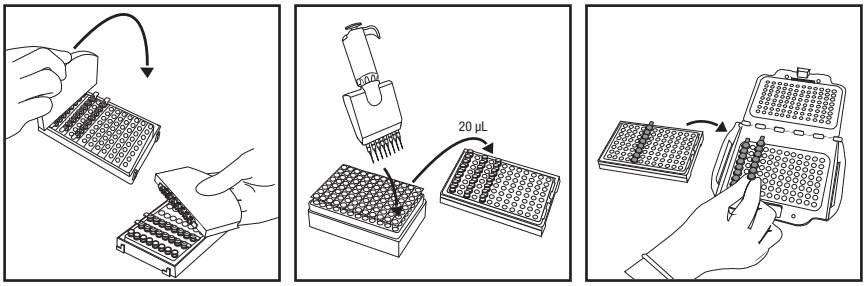


Monistus

1. Jokaista näytettä ja NC:tä varten tarvitaan yksi molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) reagenssiputki.
   1.1 Putkiliuskat voidaan leikata halutuksi määräksi putkia. Valitse tarvittavien yksittäisten molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) reagenssiputkien tai 8-putkisten liuskojen lukumäärä.
   1.2 Aseta molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) reagenssiputket tyhjään telineeseen.
   1.3 Vältä kajoamasta putkien pohjalla oleviin reagenssipelletteihin.
2. Valitse yksi Neogenin reagenssikontrollin putki ja aseta se telineeseen.
3. Ristikontaminaation välttämiseksi poista yksi molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) reagenssiputkiliuska kerrallaan ja käytä uutta pipetin kärkeä jokaisessa siirtovaiheessa.
4. Siirrä lysaatti molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) reagenssiputkeen ja Neogenin reagenssikontrollin putkeen alla kuvatulla tavalla:

Siirrä jokainen näytelysaatti **ensin** yksittäisiin molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) reagenssiputkiin ja sitten NC-putkiin. Kostuta Neogenin reagenssikontrollin putki **viimeisenä**.

5. Käytä molekulaarisen Neogen®-testijärjestelmän korkin kiinnitys-irrotustyökalua (reagenssi) molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) reagenssiputken poistamiseen – yksi putkiliuska kerrallaan. Hävitä korkki.
   5.1 Siirrä 20 µl näytelysaattia Neogen-lyysausliuoksen putken nesteen ylemmästä puoliskosta (vältä sakkaa) vastaavaan molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) **reagenssiputkeen. Annostele vinosti, jotta pelletit eivät rikkoonnu. Sekoita pipetoimalla varovasti ylös-alas 5 kertaa.**
   5.2 Toista vaihe 5.1, kunnes yksittäinen näytelysaatti on lisätty liuskan vastaavaan molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) reagenssiputkeen.
   5.3 Peitä molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) reagenssiputket mukana toimitetuilla ylimääräisillä korkeilla ja paina niitä molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän korkin kiinnitys-irrotustyökalun (reagenssi) pyöristetyn puolen edestakaisen liikkeen avulla varmistaen, että korkki kiinnittyy tiukasti.
   5.4 Toista tarvittaessa vaiheet 5.1–5.3 testattavalle määrälle näytteitä.
   5.5 Kun kaikki näytelysaatit on siirretty, toista vaiheet 5.1–5.3 20 µl:n NC-lysaattimäärän siirtämiseen molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) reagenssiputkeen.
   5.6 Siirrä **20 µl <u>NC-lysaattia</u> Neogenin reagenssikontrollin putkeen.** Annostele vinosti, jotta pelletit eivät rikkoonnu. Sekoita pipetoimalla varovasti ylös-alas 5 kertaa.
6. Laita korkilla suljetut putket puhtaalle ja dekontaminoidulle molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän pikalatausalustalle. Sulje ja lukitse sitten kansi.



7. Tarkista ja vahvista määritetty ajo molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän ohjelmistossa.
8. Napsauta ohjelmiston Start (Aloita) -painiketta ja valitse käytettävä laite. Valitun laitteen kansi avautuu automaattisesti.
9. Aseta molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän pikalatausalusta molekulaariseen Neogen-testilaitteeseen ja aloita määritys sulkemalla kansi. Tulokset saadaan 60 minuutin kuluessa, vaikkakin positiiviset tulokset voidaan havaita aikaisemmin.
10. Kun määritys on valmis, poista molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän pikalatausalusta molekulaarisesta Neogen-testilaitteesta ja hävitä putket liottamalla niitä 1–5-prosenttisessa (tilavuus:tilavuus vedessä) kotitalouskäyttöisessä valkaisuaineliuoksessa tunnin ajan erillään määrityksen valmistelualueelta.

ILMOITUS: Ristikontaminaation aiheuttamien väärien positiivisten tulosten riskin minimoimiseksi monistettua DNA:ta sisältäviä reagenssiputkia ei saa koskaan avata. Tämä koskee Neogenin reagenssikontrollin putkia, molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) reagenssiputkia sekä Neogenin matriksikontrollin putkia. Hävitä suljetut reagenssiputket aina liottamalla niitä 1–5-prosenttisessa (tilavuus:tilavuus vedessä) kotitalouskäyttöön tarkoitetussa valkaisuaineliuoksessa 1 tunnin ajan ja erillään määrityksen valmistelualueelta.

Tulokset ja niiden tulkitseminen

Algoritmi tulkitsee valotehokäyrän, joka syntyy nukleiinihapon monistumisen havaitsemisesta. Ohjelmisto analysoi tulokset automaattisesti ja värikoodaa ne tulostyypin perusteella. Positiivinen tai negatiivinen tulos määritetään analysoimalla useita yksilöllisiä käyräparametreja. Oletetut positiiviset tulokset raportoidaan reaaliajassa, kun taas negatiiviset ja tarkastusta edellyttävät tulokset näkyvät ajon päätyttyä.

Oletetut positiiviset näytteet on vahvistettava laboratorion standarditoimintamenettelyjen mukaisesti tai noudattamalla asianmukaista vertailumenetelmävahvistusta [1,2,3] alkaen siirrosta ensisijaisesta BPW ISO -rikastusaineesta toissijaiseen rikastusliemeen / toissijaisiin rikastusliemiin, mitä seuraa myöhemmin levyille latominen ja isolaattien vahvistaminen sopivilla biokemiallisilla ja serologisilla menetelmillä.

HUOMAUTUS: Edes negatiivinen näyte ei anna nollalukemaa, koska järjestelmällä ja molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) monistusreagensseilla on tietty ”taustan” RLU-lukema.

Niissä harvinaisissa tapauksissa, joissa valoteho on poikkeava, algoritmi merkitsee tuloksen ”Inspect” (Tarkista) -merkinnällä. Neogen suosittelee käyttäjää toistamaan määrityksen kaikille Inspect (Tarkista) -merkinnällä merkityille näytteille. Jos tulos on edelleen Inspect (Tarkista), jatka vahvistustestiin, jonka voit suorittaa valitsemallasi menetelmällä tai paikallisten määräysten mukaisesti.

Jos tulokset ovat ristiriitaisia (molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) oletettu positiivinen tulos, jota ei ole vahvistettu jollakin edellä kuvatuista tavoista ja erityisesti lateksiagglutinaatiotestillä), laboratorion on noudatettava tarvittavia vaiheita saatujen tulosten oikeellisuuden varmistamiseksi.

Tulosten vahvistus NF VALIDATION -sertifioidun menetelmän mukaisesti

NF VALIDATION -menetelmän yhteydessä kaikki näytteet, jotka on tunnistettu positiivisiksi molekulaarisella Neogen-testisetillä 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7), on vahvistettava jollakin seuraavista testeistä:

Vaihtoehto 1: ISO 16654 -standardin[3] käyttö alkaen puskuroidun peptoniveden[3] rikastuksesta.

Vaihtoehto 2: Seuraavista koostuvan vahvistusmenetelmän toteuttaminen: Sivele 50 µl puskuroitua peptoniveden[3] rikastetta kefiks iimikaliumtelluriittisorbitoli-MacConkey (CT-SMAC)[3] -agarlevylle. Inkuboi 24 ± 3 tuntia 37 °C:ssa. Sivele tunnusomaisia pesäkkeitä ravinneagarille ja suorita lateksiagglutinaatiotesti suoraan eristetyille pesäkkeille. Jos molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) tuloksia ei vahvisteta, suorita immunomagneettinen erotusvaihe ja sivele sitten 50 µl CT-SMAC-levylle.

Vaihtoehto 3: Nukleiinihappokoettimien käyttö EN ISO 7218 -standardissa[5] kuvatulla tavalla suorittamalla menettely CT-SMAC-levyiltä saaduille eristetyille pesäkkeille (puhdistetuille tai puhdistamattomille) (katso vaihtoehdot 1 tai 2). Nukleiinihappokoettimien on oltava erilaisia kuin molekulaarisessa Neogen-testisetissä 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7) käytettyjen.

Vaihtoehto 4: Minkä tahansa muun sellaisen NF VALIDATION -sertifioidun menetelmän käyttö, jonka toimintaperiaatteen on oltava erilainen kuin molekulaarisen Neogen-testisetin 2 – *E. coli* O157 (sisältäen H7). Tässä toisessa validoidussa menetelmässä on käytettävä kuvattua täydellistä protokollaa. Kaikkien vahvistuksen aloittamista edeltävien vaiheiden on oltava samoja molemmissa menetelmissä.

Jos tulokset ovat ristiriitaisia (vaihtoehtoisella menetelmällä saatiin oletettu positiivinen tulos, jota ei ole vahvistettu jollakin edellä kuvatuista tavoista), laboratorion on noudatettava tarvittavia vaiheita saatujen tulosten oikeellisuuden varmistamiseksi.

Jos sinulla on kysyttävää tietyistä käyttökohteista tai menettelyistä, käy verkkosivuillamme osoitteessa www.neogen.com tai ota yhteyttä paikalliseen Neogen-edustajaan tai jakelijaan.

Liite A. Protokollan keskeytys: Näytteiden säilytys ja uusintatestaus

1. Säilytä lämpökäsiteltyä lysaattia sulkemalla lyysausputki uudelleen puhtaalla korkilla (katso **Lyysaus**-osio 4.5).
2. Inkuboi rikastettua näytettä vähintään 18 tuntia ennen sen säilytykseen laittamista.
3. Säilytä 4–8 °C:ssa enintään 72 tuntia.
4. Valmistele säilytyksessä ollut näyte monistusta varten kääntelemällä sitä ylösalaisin 2–3 kertaa sen sekoittamiseksi.
5. Ota korkit pois putkista.

6. Aseta sekoitetut lysaattiputket molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän lämpöblokin sisäkkeen päälle ja kuumenna niitä 100 ± 1 °C:ssa 5 ± 1 minuuttia.
7. Irrota Neogen-lyysausliuosputkien teline lämpöblokista ja anna molekulaarisen Neogen-testijärjestelmän jäähdytysblokin sisäkkeen jäähtyä vähintään 5 minuuttia ja enintään 10 minuuttia.
8. Jatka protokollaa edellä kuvatusta **Monistus**-osiosta.

Kirjallisuusviitteet:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli.* Marraskuu 2015.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 5.09. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. Voimaantulopäivä: 15. tammikuuta 2015.
3. ISO 16654:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157. (Elintarvikkeiden ja rehujen mikrobiologia – Horisontaalinen menetelmä Escherichia coli O157:n havaitsemiseksi.)
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. (Testaus- ja kalibrointilaboratorioiden pätevyyden yleiset vaatimukset)
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination. (Elintarvikkeiden ja rehujen mikrobiologia – Mikrobiologisen testauksen yleissäännöt.)
6. ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. (Elintarvikkeiden ja rehujen mikrobiologia – Testinäytteiden, alkususpension ja desimaalilaimennosten valmistus mikrobiologista tutkimusta varten.)
7. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. (Molekulaarisen Neogen®-testijärjestelmän asennuspätevyys ja käyttöpätevyys) Neogen Food Safety.

Symbolien selitykset

info.neogen.com/symbols

AOAC on AOAC INTERNATIONALin rekisteröity tavaramerkki

Official Methods on AOAC INTERNATIONALin rekisteröity palvelutuotemerkki

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

NEOGEN®

Instruções do produto

Ensaio de Detecção Molecular 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7)

Descrição do produto e uso pretendido

O Ensaio de Detecção Molecular Neogen® 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) é usado com o Sistema de Detecção Molecular Neogen® para a detecção rápida e específica de *E. coli* O157 (incluindo H7) em alimentos enriquecidos e amostras de rações.

Os Ensaios de Detecção Molecular Neogen usam amplificação isotérmica mediada por loop para amplificar rapidamente sequências de ácidos nucleicos com alta especificidade e sensibilidade, combinadas com bioluminescência para detectar a amplificação. Os resultados positivos presuntivos são relatados em tempo real, enquanto os resultados negativos são exibidos após a conclusão do ensaio. Resultados presumivelmente positivos devem ser confirmados usando o método de sua preferência ou conforme especificado pelas regulamentações locais [1, 2, 3].

O Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) destina-se ao uso em ambiente laboratorial por profissionais treinados em técnicas laboratoriais. A Neogen não documentou o uso deste produto em outras indústrias além de alimentos ou bebidas. Por exemplo, a Neogen não documentou este produto para testar amostras ambientais, farmacêuticas, cosméticas, clínicas ou veterinárias. O Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) não foi avaliado com todos os produtos alimentares possíveis, processos alimentares, protocolos de testes ou com todas as cepas possíveis de bactérias.

Tal como acontece com todos os métodos de teste, a fonte, a formulação e a qualidade do meio de enriquecimento podem influenciar os resultados. Fatores como métodos de amostragem, protocolos de teste, preparo da amostra, manuseio e técnica laboratorial também podem influenciar os resultados. A Neogen recomenda a avaliação do método, incluindo o meio de enriquecimento, no ambiente do usuário, usando um número suficiente de amostras com alimentos e desafios microbianos específicos para garantir que o método atenda aos critérios do usuário.

A Neogen avaliou o Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) com água peptonada tamponada ISO.

O Instrumento de Detecção Molecular Neogen® destina-se ao uso com amostras que foram submetidas a tratamento térmico durante a etapa de lise do ensaio, que é projetada para destruir organismos presentes na amostra. Amostras que não foram adequadamente tratadas termicamente durante a etapa de lise do ensaio podem ser consideradas um risco biológico em potencial e NÃO devem ser inseridas no Instrumento de Detecção Molecular Neogen.

A Neogen Food Safety é certificada pela ISO (International Organization for Standardization) 9001 para projeto e fabricação.

O kit de teste do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) contém 96 testes, descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes do kit do Ensaio de Detecção Molecular Neogen

Item	Identificação	Quantidade	Conteúdo	Comentários
Solução de Lise Neogen® (LS)	Solução rosa em tubos transparentes	96 (12 tiras de 8 tubos)	580 µL de Solução de Lise Neogen por tubo	Montado e pronto para uso
Tubos de reagente do Ensaio de Detecção Molecular Neogen® 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7)	Tubos rosa	96 (12 tiras de 8 tubos)	Mistura específica liofilizada de amplificação e detecção	Pronto para uso
Tampas extras	Tampas rosa	96 (12 tiras de 8 tampas)		Pronto para uso
Controle de Reagente Neogen® (RC)	Tubos flip-top transparentes	16 (2 bolsas de 8 tubos individuais)	DNA de controle liofilizado, mistura de amplificação e detecção	Pronto para uso

O Controle Negativo, não fornecido no kit, é um meio de enriquecimento estéril, por exemplo, BPW ISO. Não utilize água como Controle Negativo.

Segurança

O usuário deve ler, compreender e seguir todas as informações de segurança nas instruções do Sistema de Detecção Molecular Neogen e do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7). Guarde as instruções de segurança para referência futura.

⚠ **AVISO:** Indica uma situação perigosa que, se não for evitada, poderá resultar em morte ou ferimentos graves e/ou danos materiais.

OBSERVAÇÃO: Indica uma situação possivelmente perigosa que, se não for evitada, poderá resultar em danos materiais.

⚠ AVISO

Não use o Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) no diagnóstico de doenças em humanos ou animais.

O usuário deve treinar seu pessoal nas técnicas de teste adequadas e atuais: por exemplo, Boas Práticas de Laboratório, ISO/IEC 17025[4] ou ISO 7218[5].

Para reduzir os riscos associados a um resultado falso-negativo que levam à libertação de produto contaminado:

- Siga o protocolo e realize os testes exatamente conforme indicado nas instruções do produto.
- Use meio pré-aquecido a 41,5 ± 1 °C. Não permita que o meio caia abaixo da faixa de temperatura de incubação durante a preparação da amostra.
- Armazene o Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) conforme indicado na embalagem e nas instruções do produto.
- Sempre use o Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) até a data de validade.
- Use o Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) com amostras ambientais de alimentos, rações e processamento de alimentos que foram validadas internamente ou por terceiros.
- Use o Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) somente com superfícies, produtos de limpeza, protocolos e cepas bacterianas que foram validadas internamente ou por terceiros.
- Para uma amostra ambiental contendo tampão neutralizante (NB) com complexo aril sulfonato, realize uma diluição 1:2 antes do teste (1 parte de amostra em 1 parte de caldo de enriquecimento estéril). Outra opção é transferir 10 µL do enriquecimento do tampão neutralizante para os tubos da Solução de Lise Neogen. Produtos para manuseio de amostras Neogen® que incluem o Tampão Neutralizante Neogen® com complexo de aril sulfonato: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XSLSSL10NB, HS10NB e HS119510NB.

Para reduzir os riscos associados à exposição a produtos químicos e aos riscos biológicos:

- Realize testes de patógenos em um laboratório devidamente equipado sob o controle de pessoal treinado. Os meios de enriquecimento incubados e os equipamentos ou superfícies que tenham entrado em contato com meios de enriquecimento incubados podem conter agentes patogênicos a níveis suficientes para causar riscos para a saúde humana.
- Siga sempre as práticas de segurança laboratoriais padrão, incluindo o uso de vestuário de proteção adequado e proteção para os olhos ao manusear reagentes e amostras contaminadas.
- Evite o contato com o conteúdo do meio de enriquecimento e dos tubos reagentes após a amplificação.
- Descarte as amostras enriquecidas e os resíduos contaminados associados de acordo com os padrões locais/regionais/nacionais/indústria atuais.
- Não exceda a definição de temperatura recomendada no aquecedor.
- Não exceda o tempo de aquecimento recomendado.
- Use um termômetro calibrado apropriado para verificar a temperatura do inserto do Bloco de Calor de Detecção Molecular Neogen® (por exemplo, um termômetro de imersão parcial ou um termômetro de termopar digital, não um termômetro de imersão total). O termômetro deve ser colocado no local designado no Inserto do Bloco de Calor para Detecção Molecular Neogen.

Para reduzir os riscos associados à contaminação cruzada ao preparar o ensaio:

- Utilize sempre luvas (para proteger o usuário e evitar a introdução de nucleases).

Para reduzir os riscos associados à exposição a líquidos quentes:

- Não exceda a definição de temperatura recomendada no aquecedor.
- Não exceda o tempo de aquecimento recomendado.
- Use um termômetro calibrado apropriado para verificar a temperatura do inserto do Bloco de Calor de Detecção Molecular Neogen® (por exemplo, um termômetro de imersão parcial ou um termômetro de termopar digital, não um termômetro de imersão total). O termômetro deve ser colocado no local designado no Inserto do Bloco de Calor para Detecção Molecular Neogen.

OBSERVAÇÃO

Para reduzir os riscos associados à contaminação cruzada ao preparar o ensaio:

- Recomenda-se o uso de pontas de pipeta estéreis, com barreira contra aerossóis (filtradas) e de qualidade para biologia molecular.
- Use uma ponta de pipeta nova para cada transferência de amostra.
- Use Boas Práticas de Laboratório para transferir a amostra do enriquecimento para o tubo de lise. Para evitar a contaminação do pipetador, o usuário pode optar por adicionar uma etapa de transferência intermediária. Por exemplo, o usuário pode transferir cada amostra enriquecida para um tubo estéril.
- Use uma estação de trabalho de biologia molecular contendo lâmpada germicida, quando disponível.

Para reduzir os riscos associados a um resultado falso-positivo:

- Nunca abra os tubos após a amplificação.
- Elimine sempre os tubos contaminados mergulhando-os em uma solução alvejante doméstica a 1-5% (v:v em água) durante 1 hora e longe da área de preparação do ensaio.

Consulte a Ficha de Dados de Segurança para obter informações adicionais e regulamentações locais para descarte.

Se tiver dúvidas sobre aplicações ou procedimentos específicos, visite o nosso site em www.neogen.com ou entre em contato com seu representante ou distribuidor local da Neogen.

Responsabilidade do usuário

Os usuários são responsáveis por se familiarizar com as instruções e informações do produto. Acesse nosso site em **www.neogen.com** ou entre em contato com o representante local ou distribuidor da Neogen para obter mais informações.

Ao selecionar um método de teste, é importante reconhecer que fatores externos como métodos de amostragem, protocolos de teste, preparação da amostra, manuseio e técnica laboratorial podem influenciar os resultados.

O usuário é responsável por selecionar qualquer método de teste ou produto para avaliar um número suficiente de amostras com as matrizes e desafios microbianos adequados para convencer o usuário de que o método de ensaio escolhido satisfaz os critérios do usuário.

Também é responsabilidade do usuário determinar se quaisquer métodos e resultados de teste satisfazem os requisitos de seus clientes e fornecedores.

Como acontece com qualquer método de teste, os resultados obtidos com o uso de qualquer produto de segurança alimentar da Neogen não constituem garantia da qualidade das matrizes ou processos testados.

Para ajudar os clientes a avaliar o método para diversas matrizes alimentares, a Neogen desenvolveu o kit de Controle da Matriz de Detecção Molecular Neogen®. Quando necessário, use o controle de matriz (MC) para determinar se a matriz tem a capacidade de afetar os resultados do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7). Teste diversas amostras, representativas da matriz, ou seja, amostras obtidas de origem diferente, durante qualquer período de validação ao adotar o método da Neogen ou ao testar matrizes novas ou desconhecidas ou matrizes que sofreram alterações de matéria-prima ou processo.

Uma matriz pode ser definida como um tipo de produto com propriedades intrínsecas como composição e processo. As diferenças entre matrizes podem ser tão simples como os efeitos causados por diferenças no seu processamento ou apresentação, por exemplo, cru versus pasteurizado; fresco versus seco etc.

Limitação de garantias/recurso limitado

EXCETO CONFORME EXPRESSAMENTE DECLARADO EM UMA SEÇÃO DE GARANTIA LIMITADA DA EMBALAGEM INDIVIDUAL DO PRODUTO, a NEOGEN SE ISENTA DE TODAS AS GARANTIAS EXPRESSAS E IMPLÍCITAS, INCLUINDO, MAS NÃO SE LIMITANDO A, QUAISQUER GARANTIAS DE COMERCIALIZAÇÃO OU ADEQUAÇÃO A UM USO ESPECÍFICO. Se algum Produto da Neogen Food Safety apresentar defeito, a Neogen ou seu distribuidor autorizado vai, a seu critério, substituir ou reembolsar o preço de compra do produto. Estes são os reparos exclusivos. Você deve notificar imediatamente a Neogen dentro de sessenta dias após a descoberta de qualquer suspeita de defeitos em um produto e devolvê-lo à Neogen. Entre em contato com seu representante da Neogen ou distribuidor autorizado da Neogen para qualquer dúvida adicional.

Limitação de responsabilidade da Neogen

A NEOGEN NÃO SERÁ RESPONSÁVEL POR QUAISQUER PERDAS OU DANOS, SEJAM DANOS DIRETOS, INDIRETOS, ESPECIAIS, INCIDENTAIS OU CONSEQUENCIAIS, INCLUINDO, MAS NÃO SE LIMITANDO A LUCROS CESSANTES. Em nenhuma circunstância, a responsabilidade da Neogen sob qualquer teoria legal excederá o preço de compra do produto alegadamente defeituoso.

Armazenamento e descarte

Guarde o Ensaio de Detecção Molecular Neogen® 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) entre 2 °C e 8 °C. Não congele. Mantenha o kit longe da luz durante o armazenamento. Depois de abrir o kit, verifique se a bolsa de papel alumínio não está danificada. Se a bolsa estiver danificada, não use. Após a abertura, os tubos de reagente não utilizados devem ser sempre armazenados na bolsa revedável com o dessecante em seu interior para manter a estabilidade dos reagentes liofilizados. Armazene as embalagens vedadas novamente entre 2 °C e 8 °C por no máximo 60 dias.

Não use o Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) depois da data de validade. A data de validade e o número do lote são anotados na etiqueta externa da caixa. Após o uso, o meio de enriquecimento e os tubos do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) podem conter materiais patogênicos. Quando os testes estiverem concluídos, siga os padrões atuais da indústria para o descarte de resíduos contaminados. Consulte a Ficha de Dados de Segurança para obter informações adicionais e regulamentações locais para descarte.

Instruções de Uso

Siga todas as instruções cuidadosamente. Não fazer isso pode levar a resultados imprecisos.

O usuário deve concluir o treinamento de qualificação de operador do Sistema de Detecção Molecular Neogen, conforme descrito no documento "Protocolos e instruções de qualificação de instalação (IQ) / Qualificação operacional (OQ) para o Sistema de Detecção Molecular Neogen".[7].

Descontamine periodicamente as bancadas e equipamentos do laboratório (pipetas, ferramentas para tampar/destampar etc.) com uma solução de alvejante doméstico de 1 a 5% (v:v em água) ou solução de remoção de DNA.

Consulte a seção "Instruções específicas para métodos validados" para obter requisitos específicos:

Tabela 3 para protocolos de enriquecimento de acordo com AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2017.01

Tabela 4 para protocolos de enriquecimento de acordo com o certificado de validação de NF 3M 01/18-05/17

Enriquecimento da amostra

As Tabelas 2, 3 ou 4 apresentam orientações para protocolos de enriquecimento de alimentos. É responsabilidade do usuário validar protocolos de amostragem alternativos ou taxas de diluição para garantir que este método de teste atenda aos critérios do usuário.

Alimentos

1. Pré-aqueça o meio de enriquecimento BPW ISO a 41,5 ± 1 °C.
2. Combine assepticamente o meio de enriquecimento e a amostra de acordo com as Tabelas 2, 3 ou 4. Para todas as amostras de carne e altamente particuladas, recomenda-se o uso de sacos filtrantes.
3. Homogenize todas as matrizes, exceto produtos folhosos e frutos, completamente, misturando, triturando ou misturando manualmente por 2 ±0,2 minutos. Incube a 41,5 ± 1°C durante o tempo apropriado de acordo com as Tabelas 2, 3 ou 4.

Tabela 2. Protocolos gerais de enriquecimento

Matriz de amostra[a]	Tamanho da amostra	Volume de caldo de enriquecimento (mL)	Temperatura de enrique-cimento (±1 °C)	Tempo de enrique-cimento (horas)
Carne crua incluindo moída/picada e guarnição	325 g	975 BPW ISO (pré-aquecido)	41,5	10-18
Carnes cruas, incluindo carne crua, porco, aves, cordeiro e bisão	25 g	225 BPW ISO (pré-aquecido)	41,5	8-18
Produtos folhosos[b]	200 g	450 BPW ISO (pré-aquecido)	41,5	18-24
Outros alimentos, incluindo frutas[b], vegetais, sucos de frutas/vegetais, ervas frescas, frutos do mar crus, ovos crus, leite cru, massa de biscoito e carnes processadas	25 g	225 BPW ISO (pré-aquecido)	41,5	18-24
Nozes ou misturas contendo nozes (este protocolo é apropriado para outras nozes, incluindo nozes, amêndoas, pistache, castanha de caju e castanhas,	25 g	225 leite em pó desnatado reconstituído	41,5	18-24

(a) As amostras congeladas devem ser equilibradas a 4-8 °C antes da adição ao caldo de enriquecimento.

(b) As amostras de produtos folhosos e frutas devem ser agitadas suavemente à mão durante 5 minutos. Não misture ou triture.

Instruções específicas para métodos validados

AOAC® *Official Methods of Analysis*℠ 2017.01

No programa AOAC *Official Method of Analysis*℠, o Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 – *E. coli* O157 (incluindo H7) foi considerado um método eficaz para a detecção de *E. coli* O157:H7. As matrizes testadas no estudo são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3. Protocolos de enriquecimento usando BPW ISO pré-aquecido a 41,5 ± 1 °C de acordo com AOAC® *Official Methods*℠ 2017.01

Matriz de amostra	Tamanho da amostra	Volume de caldo de enriquecimento (mL)	Tempo de enriquecimento (horas)	Homogenizado
Carne moída crua (73% magra)	325 g	975	10-18	Manualmente à mão ou triturado
Espinafre cru ensacado[a]	200 g	450	18-24	Agitado suavemente à mão por 5 minutos, não homogeneizar
Brotos frescos	25 g	225	18-24	Agitado suavemente à mão por 5 minutos, não homogeneizar
Mirtilos congelados[a][b]	25 g	225	18-24	Agitado suavemente à mão por 5 minutos, não homogeneizar

(a) As amostras de produtos folhosos e frutas devem ser agitadas suavemente à mão durante 5 minutos. Não misture ou triture.

(b) As amostras congeladas devem ser equilibradas a 4-8 °C antes da adição ao caldo de enriquecimento.

Certificação NF Validation da AFNOR

3M 01/18-05/17

MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA O AGRONEGÓCIO

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

Para mais informações sobre o fim da validade, consulte o certificado NF VALIDATION disponível no site mencionado acima.

Método de certificação NF VALIDATION em conformidade com ISO 16140-2[8] em comparação com ISO 16654[3]

Escopo da validação: carne bovina crua, laticínios crus, frutas e vegetais crus

Preparo da amostra: as amostras devem ser preparadas de acordo com EN ISO 16654 e EN ISO 6887[6]

Versão do software: consulte o certificado

Tabela 4. Protocolos de enriquecimento usando BPW ISO pré-aquecido a 41,5 ± 1 °C de acordo com o método de certificação NF VALIDATION 3M 01/18-05/17

Protocolo	Tamanho da amostra	Volume de caldo de enriquecimento (mL)	Temperatura de enriquecimento (±1 °C)	Tempo de enriquecimento (horas)
Laticínios crus, frutas e vegetais crus	25 g	225	41,5	18-24
Carne bovina crua	25 g	225	41,5	8-24

OBSERVAÇÕES:

- Amostras maiores que 25 g não foram testadas no estudo NF VALIDATION.
- Os pontos de interrupção do protocolo recomendados são após o enriquecimento ou após a lise da amostra. O caldo de enriquecimento ou o lisado da amostra podem ser armazenados a 2-8 °C por até 72 horas. Depois de remover o caldo de enriquecimento do armazenamento, retome o teste da Etapa 1 na seção **Lise**. Depois de remover o lisado da amostra do armazenamento, retome o teste da Etapa 7 na seção **Lise**. O lisado também pode ser armazenado a -20 °C.
- Protocolos de enriquecimento curtos são sensíveis às condições de incubação e as temperaturas especificadas no protocolo devem ser seguidas. A temperatura do banho-maria ou da incubadora onde os caldos são pré-aquecidos deve ser verificada para garantir que o caldo de enriquecimento está atingindo a temperatura necessária. O tempo total de preparação da amostra, incluindo o atraso entre o final da fase de pré-aquecimento médio e o início da incubação da amostra de alimentos, não deve exceder 45 minutos. Recomenda-se o uso de uma incubadora ventilada durante a incubação.

Preparação da Bandeja do Carregador Rápido de Detecção Molecular Neogen®

1. Umedeça um pano ou toalha descartável com uma solução de alvejante doméstico de 1-5% (v:v em água) e limpe a Bandeja do Carregador Rápido de Detecção Molecular Neogen.
2. Enxágue a Bandeja do Carregador Rápido de Detecção Molecular Neogen com água.
3. Use uma toalha descartável para secar a Bandeja do Carregador Rápido de Detecção Molecular Neogen.
4. Verifique se a Bandeja do Carregador Rápido de Detecção Molecular Neogen está seca antes de usar.

Preparação do Inserto do Bloco de Resfriamento de Detecção Molecular Neogen®

Coloque o Inserto do Bloco de Resfriamento de Detecção Molecular Neogen direto na bancada do laboratório: a Bandeja de Bloco de Resfriamento de Detecção Molecular Neogen não é usada. Use o bloco à temperatura ambiente de laboratório (20-25 °C).

Preparação do Inserto do Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular Neogen®

Coloque o Inserto do Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular Neogen em um aquecedor de bloco duplo seco. Ligue a unidade de aquecimento de bloco seco e ajuste a temperatura para permitir que o Inserto do Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular Neogen atinja e mantenha uma temperatura de 100 ± 1 °C.

OBSERVAÇÃO: dependendo do aquecedor, aguarde aproximadamente 30 minutos para que o Inserto do Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular Neogen atinja a temperatura. Usando um termômetro calibrado apropriado (por exemplo, um termômetro de imersão parcial, um termômetro de termopar digital, não um termômetro de imersão total) colocado no local designado, verifique se o Inserto do Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular Neogen está a 100 ± 1 °C.

Preparo do Instrumento de Detecção Molecular Neogen®

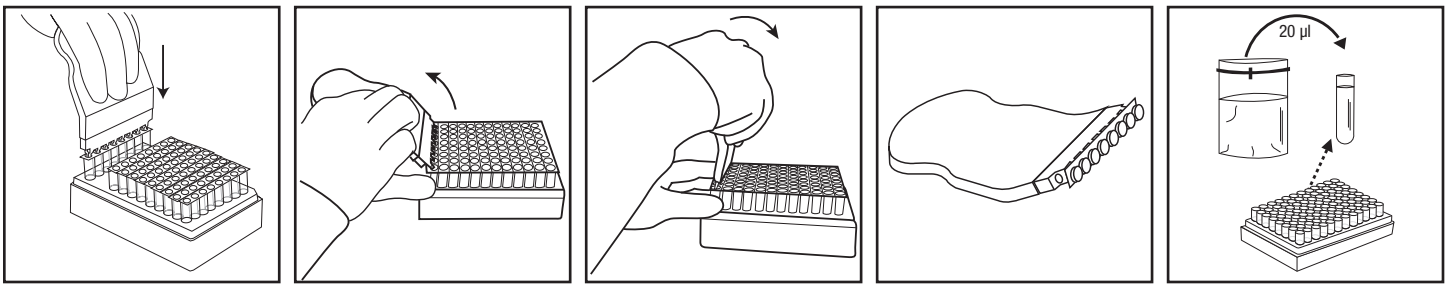
1. Inicie o Software de Detecção Molecular Neogen® e faça login. Entre em contato com seu representante da Neogen Food Safety para garantir que você tenha a versão mais atualizada do software.
2. Ligue o Instrumento de Detecção Molecular Neogen.
3. Crie ou edite uma execução com dados para cada exemplo. Consulte o Manual do Usuário do Sistema de Detecção Molecular Neogen® para obter detalhes.

OBSERVAÇÃO: o Instrumento de Detecção Molecular Neogen deve atingir e manter a temperatura de 60 °C antes de inserir a Bandeja do Carregador Rápido de Detecção Molecular Neogen com tubos de reação. Esta etapa de aquecimento leva aproximadamente 20 minutos e é indicada por uma luz LARANJA na barra de status do instrumento. Quando o instrumento estiver pronto para iniciar uma execução, a barra de status ficará VERDE.

Lise

1. Deixe os tubos da Solução de Lise Neogen aquecerem ajustando o rack à temperatura ambiente (20-25 °C) durante a noite (16-18 horas). Alternativas para equilibrar os tubos da Solução de Lise Neogen à temperatura ambiente são colocar os tubos da Solução de Lise Neogen na bancada do laboratório por pelo menos 2 horas, incubar os tubos da Solução de Lise Neogen em uma incubadora a 37 ± 1 °C por 1 hora ou colocá-los em um aquecedor de bloco duplo seco por 30 segundos a 100 °C.
2. Inverta os tubos tampados para misturar. Prossiga para a próxima etapa dentro de 4 horas.
3. Retire o caldo de enriquecimento da incubadora.
4. É necessário um tubo da Solução de Lise Neogen para cada amostra e a amostra de Controle Negativo (NC) (meio de enriquecimento estéril).
   - 4.1 As tiras de tubo da Solução de Lise Neogen podem ser cortadas de acordo com o número desejado de tubo da Solução de Lise Neogen. Selecione o número de tubos individuais da Solução de Lise Neogen ou tiras de 8 tubos necessários. Coloque os tubos da Solução de Lise Neogen em um rack vazio.
   - 4.2 Para evitar contaminação cruzada, destampe uma tira de tubos da Solução de Lise Neogen de cada vez e use uma nova ponta de pipeta para cada etapa de transferência.
   - 4.3 Transfira a amostra enriquecida para tubos da Solução de Lise Neogen conforme descrito abaixo:

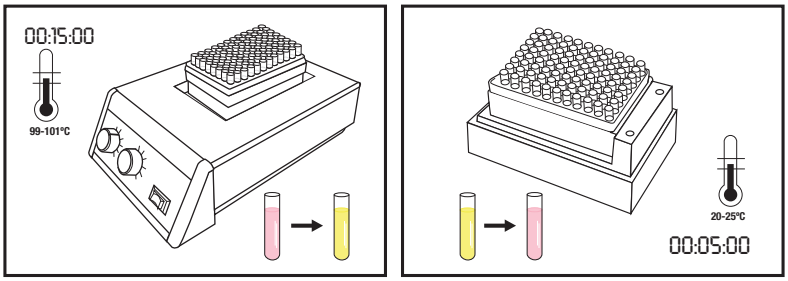
     Transfira cada amostra enriquecida para um tubo individual da Solução de Lise Neogen **primeiro.** Transfira o NC **por último.**
   - 4.4 Use a Ferramenta de Tampar/Destampar de Detecção Molecular Neogen® - Lise para destampar uma tira de tubo de Solução de Lise Neogen - uma tira de cada vez.
   - 4.5 Descarte a tampa do tubo da Solução de Lise Neogen – Se o lisado for retido para novo teste, coloque as tampas em um recipiente limpo para reaplicação após a lise.
     - 4.5.1 Para processamento do lisado retido, consulte o Apêndice A.
   - 4.6 Transfira 20 µL de amostra para um tubo da Solução de Lise Neogen, salvo indicação em contrário nas Tabelas de Protocolo 2, 3 e 4.



5. Repetir a etapa 4.3 até que cada amostra individual tenha sido adicionada a um tubo correspondente de Solução de Lise Neogen na tira.
6. Repita as etapas 4.1 a 4.6 conforme necessário, para o número de amostras a serem testadas.
7. Quando todas as amostras tiverem sido transferidas, transfira 20 µL de NC (meio de enriquecimento estéril, por exemplo, BPW ISO) para um tubo de Solução de Lise Neogen. Não utilize água como NC.
8. Verifique se a temperatura do Inserto do Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular Neogen está em 100 ± 1 °C.
9. Coloque o rack descoberto de tubos de Solução de Lise Neogen no Inserto do Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular Neogen e aqueça por 15 ± 1 minutos. Durante o aquecimento, a Solução de Lise Neogen mudará de rosa (fria) para amarela (quente).

   Amostras que não foram adequadamente tratadas termicamente durante a etapa de lise do ensaio podem ser consideradas um risco biológico em potencial e NÃO devem ser inseridas no Instrumento de Detecção Molecular Neogen.

10. Remova o rack descoberto dos tubos da Solução de Lise Neogen do bloco de aquecimento e deixe esfriar no Inserto do Bloco de Resfriamento de Detecção Molecular Neogen pelo menos 5 minutos e no máximo 10 minutos. O Inserto do Bloco de Resfriamento Molecular Neogen, usado à temperatura ambiente sem a Bandeja do Bloco de Resfriamento de Detecção Molecular Neogen, deve ficar diretamente na bancada do laboratório. Quando esfriar, a solução de lise reverterá para uma cor rosa.
11. Remova o rack de tubos da Solução de Lise Neogen do Inserto do Bloco de Resfriamento de Detecção Molecular Neogen.

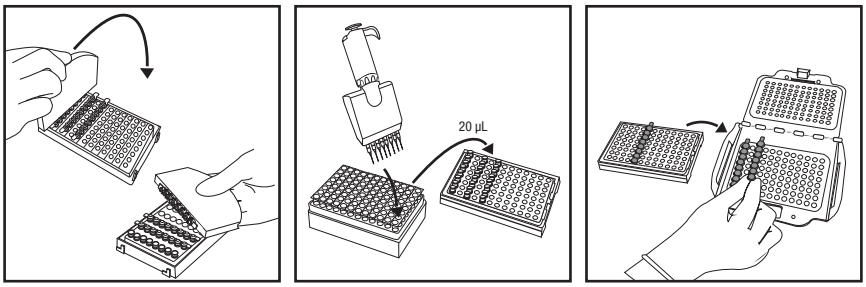


Ampliação

1. Um tubo de reagente do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) é necessário para cada amostra e o NC.
   - 1.1 As tiras de tubo podem ser cortadas de acordo com o número de tubo desejado. Selecione o número de tubos de reagente individuais do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) ou tiras de 8 tubos necessárias.
   - 1.2 Coloque os tubos de reagente do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) em um rack vazio.
   - 1.3 Evite mexer nos pellets de reagentes do fundo dos tubos.
2. Selecione um tubo de controle de reagente Neogen e coloque-o no rack.
3. Para evitar contaminação cruzada, destampe uma tira de tubos de reagente do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) de cada vez e use uma nova ponta de pipeta para cada etapa de transferência.
4. Transfira o lisado para um tubo de reagente do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) e o tubo de controle de reagente Neogen conforme descrito abaixo:

Transfira cada lisado de amostra para tubos de reagente individuais do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) **primeiro** seguido pelo NC. Hidrate o tubo de controle de reagente Neogen **por último.**

5. Use a Ferramenta de Tampar/Destampar de Detecção Molecular Neogen® - Reagente para destampar o tubo de reagente do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) – uma tira de tubos de cada vez. Descarte a tampa.
   - **5.1 Transfira 20 µL de lisado de amostra da metade superior do líquido (evite precipitar) no tubo da Solução de Lise Neogen para o tubo de reagente do** Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) **correspondente. Dispense em ângulo para não perturbar os pellets. Misture pipetando com cuidado para cima e para baixo 5 vezes.**
   - 5.2 Repita a etapa 5.1 até cada lisado de amostra ter sido adicionado a um tubo de reagente do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) correspondente na tira.
   - 5.3 Tampe os tubos de reagente do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) com as tampas extras fornecidas e use o lado arredondado da Ferramenta de Tampar/Destampar de Detecção Molecular Neogen - Reagente para aplicar pressão indo para frente e para trás, garantindo que a tampa fique bem apertada.
   - 5.4 Repita as etapas 5.1 a 5.3 conforme necessário, para o número de amostras a serem testadas.
   - 5.5 Quando todos os lisados de amostra tiverem sido transferidos, repita as etapas 5.1 a 5.3 para transferir 20 µL de lisado NC para um tubo de reagente do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7).
   - 5.6 Transfira **20 µL de lisado de NC para um tubo de controle de reagente Neogen.** Dispense em ângulo para não perturbar os pellets. Misture pipetando com cuidado para cima e para baixo 5 vezes.
6. Coloque tubos tampados em uma bandeja limpa e descontaminada do Carregador Rápido de Detecção Molecular Neogen. Depois, feche e trave a tampa.



7. Revise e confirme a execução configurada no Software de Detecção Molecular Neogen.
8. Clique no botão Iniciar no software e selecione o instrumento a ser usado. A tampa do instrumento selecionado abre automaticamente.
9. Coloque a Bandeja do Carregador Rápido de Detecção Molecular Neogen no instrumento de detecção molecular Neogen e feche a tampa para iniciar o ensaio. Os resultados são fornecidos dentro de 60 minutos, embora os positivos possam ser detectados mais cedo.
10. Após a conclusão do ensaio, remova a Bandeja do Carregador Rápido de Detecção Molecular Neogen do Instrumento de Detecção Molecular Neogen e descarte os tubos mergulhando-os em uma solução de alvejante doméstico de 1-5% (v:v em água) por 1 hora e longe do área de preparação do ensaio.

OBSERVAÇÃO: para minimizar o risco de falso-positivos devido à contaminação cruzada, nunca abra tubos reagentes contendo DNA amplificado. Isso inclui controle de reagente Neogen, tubo de reagente do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) e tubos de controle de matriz Neogen. Elimine sempre os tubos de reagente vedados mergulhando-os em uma solução alvejante doméstica a 1-5% (v:v em água) durante 1 hora e longe da área de preparação do ensaio.

Resultados e interpretação

Um algoritmo interpreta a curva de emissão de luz resultante da detecção da amplificação do ácido nucleico. Os resultados são analisados automaticamente pelo software e são codificados por cores com base no resultado. Um resultado Positivo ou Negativo é determinado pela análise de uma série de parâmetros de curva únicos. Os resultados positivos presuntivos são relatados em tempo real, enquanto os resultados negativos e de inspeção serão exibidos após a conclusão da execução.

Amostras presumivelmente positivas devem ser confirmadas de acordo com os procedimentos operacionais padrão do laboratório ou seguindo a confirmação do método de referência apropriado[1,2,3], começando com a transferência do enriquecimento BPW ISO primário para caldo(s) de enriquecimento secundário, seguido de subsequente plaqueamento e confirmação de isolados utilizando métodos bioquímicos e serológicos apropriados.

OBSERVAÇÃO: mesmo uma amostra negativa não fornecerá uma leitura zero, pois o sistema e os reagentes de amplificação do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) têm uma leitura de unidade de luz relativa (RLU) de “fundo”.

No caso raro de qualquer saída de luz incomum, o algoritmo rotula isso como "Inspecionar". A Neogen recomenda que o usuário repita o ensaio para qualquer amostra de inspeção. Se o resultado continuar sendo Inspecionar, prossiga com o teste de confirmação usando o método de sua preferência ou conforme especificado pelas regulamentações locais.

Em caso de resultados descordantes (supostamente positivo com o Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7), não confirmados por um dos meios descritos acima, e em particular para o teste de aglutinação em látex), o laboratório deverá seguir as etapas necessárias para garantir a validade dos resultados obtidos.

Confirmação de resultados de acordo com o método de certificação NF VALIDATION

No contexto de NF VALIDATION, todas as amostras identificadas como positivas pelo Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) devem ser confirmadas por um dos seguintes testes:

Opção 1: usando o padrão ISO 16654[3] a partir do enriquecimento da água peptonada tamponada[3].

Opção 2: implementação de um método de confirmação que consiste no seguinte: coloque 50 µL de água peptonada tamponada[3] enriquecida em uma placa de ágar Cefixima Potássio Telurito Sorbitol MacConkey (CT-SMAC)[3]. Incube por 24 ±3 horas a 37 °C. Coloque colônias características em ágar nutriente e realize o teste de aglutinação em látex diretamente em colônias isoladas. Se os resultados do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7) não forem confirmados, realize uma etapa de separação imunomagnética e coloque 50 µL em CT-SMAC.

Opção 3: usando sondas de ácido nucleico conforme descrito na norma EN ISO 7218[5], realizadas em colônias isoladas (purificadas ou não) de CT-SMAC (consulte as Opções 1 ou 2). As sondas de ácido nucleico devem ser diferentes das usadas no Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7).

Opção 4: utilizando qualquer outro método de certificação NF VALIDATION, cujo princípio deve ser diferente do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 - *E. coli* O157 (incluindo H7). Deve-se utilizar o protocolo completo descrito para este segundo método validado. Todas as etapas antes do início da confirmação devem ser comuns a ambos os métodos.

Em caso de resultados descordantes (supostamente positivo com o método alternativo, não confirmado por um dos meios descritos acima), o laboratório deverá seguir as etapas necessárias para garantir a validade do resultado obtido.

Se tiver dúvidas sobre aplicações ou procedimentos específicos, visite o nosso site em www.neogen.com ou entre em contato com seu representante ou distribuidor local da Neogen.

Apêndice A. Interrupção do protocolo: armazenamento e novo teste das amostras

1. Para armazenar um lisado tratado termicamente, tampe novamente o tubo de lise com uma tampa limpa (consulte a seção **Lise**, 4.5)

2. Para armazenar uma amostra enriquecida, incube por um mínimo de 18 horas antes do armazenamento.
3. Armazene de 4 a 8 °C por até 72 horas.
4. Prepare uma amostra armazenada para amplificação invertendo 2-3 vezes para misturar.
5. Destampe os tubos.
6. Coloque os tubos de lisado misto no Inserto do Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular Neogen e aqueça a 100 ± 1 °C durante 5 ± 1 minutos.
7. Remova o rack dos tubos da Solução de Lise Neogen do bloco de aquecimento e deixe esfriar no Inserto do Bloco de Resfriamento de Detecção Molecular Neogen pelo menos 5 minutos e no máximo 10 minutos.
8. Continue o protocolo na seção **Ampliação** detalhada acima.

Referências:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli.* Novembro de 2015.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 5.09. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. Data de vigência: 15 de janeiro de 2015.
3. ISO 16654:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.
7. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Neogen Food Safety.

Explicação dos símbolos

info.neogen.com/symbols

AOAC é uma marca comercial registrada da AOAC INTERNATIONAL

Official Methods é uma marca de serviço registrada da AOAC INTERNATIONAL

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

NEOGEN®

Οδηγίες προϊόντος

Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7)

Περιγραφή του προϊόντος και προβλεπόμενη χρήση

Η Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) της Neogen® χρησιμοποιείται με το Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης Neogen® για την ταχεία και εξειδικευμένη ανίχνευση του *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) σε εμπλουτισμένα δείγματα τροφίμων και ζωοτροφών.

Οι δοκιμασίες μοριακής ανίχνευσης της Neogen χρησιμοποιούν τη μέθοδο ισοθερμικής ενίσχυσης με μεσολάβηση βρόχου για ταχύ πολλαπλασιασμό αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, σε συνδυασμό με τη μέθοδο της βιοφωταύγειας για την ανίχνευση της ενίσχυσης. Τα πιθανολογούμενα θετικά αποτελέσματα αναφέρονται σε πραγματικό χρόνο, ενώ τα αρνητικά αποτελέσματα εμφανίζονται μετά την ολοκλήρωση της δοκιμασίας. Τα πιθανολογούμενα θετικά αποτελέσματα θα πρέπει να επιβεβαιώνονται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της προτίμησής σας ή όπως καθορίζεται από τους τοπικούς κανονισμούς[1, 2, 3].

Η δοκιμασία μοριακής ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) της Neogen προορίζεται για χρήση σε εργαστηριακό περιβάλλον από επαγγελματίες εκπαιδευμένους στις εργαστηριακές τεχνικές. Η Neogen δεν έχει τεκμηριώσει τη χρήση αυτού του προϊόντος σε βιομηχανίες εκτός από αυτές των τροφίμων ή ποτών. Για παράδειγμα, η Neogen δεν έχει τεκμηριώσει αυτό το προϊόν για τον έλεγχο περιβαλλοντικών, φαρμακευτικών, καλλυντικών, κλινικών ή κτηνιατρικών δειγμάτων. Η Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) της Neogen δεν έχει αξιολογηθεί για όλα τα πιθανά προϊόντα τροφίμων, διεργασίες επεξεργασίας τροφίμων, πρωτόκολλα ελέγχου ή με όλα τα πιθανά στελέχη βακτηριδίων.

Όπως και με όλες τις μεθόδους εξέτασης, η προέλευση, η σύνθεση και η ποιότητα του μέσου εμπλουτισμού μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Παράγοντες όπως οι μέθοδοι δειγματοληψίας, τα πρωτόκολλα ελέγχου, η προετοιμασία των δειγμάτων, ο χειρισμός τους και η εργαστηριακή τεχνική μπορούν επίσης να επηρεάσουν τα αποτελέσματα. Η Neogen συνιστά την αξιολόγηση της μεθόδου στο περιβάλλον του χρήστη, συμπεριλαμβανομένου του μέσου εμπλουτισμού, με τη χρήση επαρκούς αριθμού δειγμάτων με συγκεκριμένα τρόφιμα και μικροβιακές προκλήσεις ώστε να διασφαλιστεί ότι η μέθοδος πληροί τα κριτήρια του χρήστη.

Η Neogen έχει αξιολογήσει τη Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) Neogen με Ρυθμιστικό Νερό Πεπτόνης ISO.

Το Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης Neogen® προορίζεται για χρήση με δείγματα που έχουν υποβληθεί σε θερμική επεξεργασία κατά τη διάρκεια του σταδίου λύσης της δοκιμασίας, το οποίο είναι σχεδιασμένο για την καταστροφή των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο δείγμα. Δείγματα που δεν έχουν υποβληθεί στην κατάλληλη θερμική επεξεργασία κατά τη διάρκεια του σταδίου λύσης της δοκιμασίας μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανός βιολογικός κίνδυνος και ΔΕΝ πρέπει να εισάγονται στο Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης Neogen.

Η Neogen Food Safety φέρει πιστοποίηση σύμφωνα με το πρότυπο του Διεθνούς Οργανισμού Τυποποίησης (ISO) 9001 για σχεδιασμό και παραγωγή.

Το κιτ ελέγχου Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) Neogen περιέχει 96 τεστ που περιγράφονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Στοιχεία του κιτ Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης Neogen

Είδος	Ταυτοποίηση	Ποσότητα	Περιεχόμενα	Σχόλια
Διάλυμα Λύσης (LS) Neogen®	Ροζ διάλυμα σε διαφανή σωληνάρια	96 (12 σειρές των 8 σωληναρίων)	580 µL Διάλυμα Λύσης Neogen ανά σωληνάριο	Σε στατώ και έτοιμο προς χρήση
Σωληνάρια αντιδραστηρίου Neogen® Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7)	Ροζ σωληνάρια	96 (12 σειρές των 8 σωληναρίων)	Λυοφιλοποιημένο ειδικό μίγμα ενίσχυσης και ανίχνευσης	Έτοιμο προς χρήση
Επιπλέον πώματα	Ροζ πώματα	96 (12 σειρές των 8 πωμάτων)		Έτοιμο προς χρήση
Μάρτυρας αντιδραστηρίου (RC) Neogen®	Διαφανή σωληνάρια με αρθρωτό πώμα	16 (2 σακουλάκια των 8 μεμονωμένων σωληναρίων)	Λυοφιλοποιημένο DNA ελέγχου, μίγμα ενίσχυσης και ανίχνευσης	Έτοιμο προς χρήση

Ως αρνητικό μάρτυρα, που δεν παρέχεται στο κιτ, θα πρέπει να χρησιμοποιείται στείρο μέσο εμπλουτισμού, π.χ. Ρυθμιστικό νερό πεπτόνης (BPW) ISO. Μη χρησιμοποιείτε νερό ως αρνητικό μάρτυρα.

Ασφάλεια

Ο χρήστης πρέπει να διαβάσει, να κατανοήσει και να ακολουθήσει όλες τις πληροφορίες ασφαλείας που βρίσκονται στις οδηγίες του Συστήματος Μοριακής Ανίχνευσης της Neogen και της Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) της Neogen. Διατηρήστε τις οδηγίες ασφαλείας για μελλοντική αναφορά.

⚠ **ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ:** Υποδεικνύει μια επικίνδυνη κατάσταση, η οποία, εάν δεν αποφευχθεί, ενδέχεται να προκαλέσει θάνατο ή σοβαρό τραυματισμό ή/και υλικές ζημιές.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Υποδεικνύει μια δυνητικά επικίνδυνη κατάσταση η οποία, αν δεν αποφευχθεί, θα μπορούσε να προκαλέσει υλικές ζημιές.

⚠ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Μη χρησιμοποιείτε τη Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) της Neogen για τη διάγνωση παθήσεων σε ανθρώπους ή ζώα.

Ο χρήστης πρέπει να εκπαιδεύσει το προσωπικό του στις τρέχουσες κατάλληλες τεχνικές ελέγχου: για παράδειγμα, Ορθή εργαστηριακή πρακτική, πρότυπο ISO/IEC 17025[4] ή ISO 7218[5].

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα που οδηγεί σε αποδέσμευση επιμολυσμένου προϊόντος:

- Ακολουθείτε το πρωτόκολλο και διενεργείτε τους ελέγχους ακριβώς όπως περιγράφεται στις πληροφορίεςτου προϊόντος.
- Χρησιμοποιείτε μέσο προθερμασμένο στους 41,5 ± 1 °C. Μην επιτρέπετε στο μέσο να πέσει κάτω από το εύρος της θερμοκρασίας επώασης κατά την προετοιμασία του δείγματος.
- Φυλάσσετε τη Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) της Neogen όπως υποδεικνύεται στη συσκευασία και στις πληροφορίες του προϊόντος.
- Χρησιμοποιείτε πάντα τη Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) της Neogen μέχρι την ημερομηνία λήξης της.
- Χρησιμοποιείτε τη Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) της Neogen με περιβαλλοντικά δείγματα τροφίμων, ζωοτροφών και διεργασίες επεξεργασίας τροφίμων που έχουν επικυρωθεί εσωτερικά ή από τρίτο μέρος.
- Χρησιμοποιείτε τη Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) της Neogen μόνο με επιφάνειες, αποστειρωτικά μέσα, πρωτόκολλα και βακτηριακά στελέχη που έχουν επικυρωθεί εσωτερικά ή από τρίτο μέρος.
- Για ένα περιβαλλοντικό δείγμα που περιέχει Ρυθμιστικό διάλυμα ουδετεροποίησης (NB) με αρυλ-σουλφονικό σύμπλοκο, πραγματοποιήστε αραίωση 1:2 πριν την εξέταση (1 μέρος δείγματος σε 1 μέρος στείρου ζωμού εμπλουτισμού). Μια άλλη επιλογή είναι η μεταφορά 10 μL ουδετεροποιητικού ρυθμιστικού διαλύματος εμπλουτισμού μέσα σε σωληνάρια Διαλύματος Λύσης Neogen. Προϊόντα χειρισμού δειγμάτων Neogen® που περιέχουν ρυθμιστικό διάλυμα ουδετεροποίησης με αρυλ-σουλφονικό σύμπλοκο Neogen®: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XSLSSL10NB, HS10NB και HS119510NB.

Για να μειώσετε τον κίνδυνο που σχετίζεται με την έκθεση σε χημικές ουσίες και βιολογικούς κινδύνους:

- Διενεργείτε την εξέταση για παθογόνα σε κατάλληλα εξοπλισμένο εργαστήριο που βρίσκεται υπό τον έλεγχο εκπαιδευμένου προσωπικού. Επωασμένα μέσα εμπλουτισμού και εξοπλισμός ή επιφάνειες που έχουν έρθει σε επαφή με επωασμένα μέσα εμπλουτισμού ενδέχεται να περιέχουν παθογόνους παράγοντες σε επίπεδα επαρκή ώστε να προκαλέσουν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία.
- Τηρείτε πάντοτε τις τυποποιημένες πρακτικές εργαστηριακής ασφάλειας, όπως η χρήση κατάλληλων προστατευτικών ενδυμάτων και εξοπλισμού προστασίας των ματιών, όταν χειρίζεστε αντιδραστήρια και μολυσμένα δείγματα.
- Αποφεύγετε την επαφή με τα περιεχόμενα των μέσων εμπλουτισμού και με τα σωληνάρια αντιδραστηρίου μετά την ενίσχυση.
- Απορρίπτετε τα εμπλουτισμένα δείγματα και τα μολυσμένα απόβλητα που σχετίζονται με αυτά τα δείγματα σύμφωνα με τα τρέχοντα τοπικά/περιφερειακά/εθνικά/κανονιστικά πρότυπα.
- Μην υπερβαίνετε τη συνιστώμενη ρύθμιση θερμοκρασίας στον θερμαντήρα.
- Μην υπερβαίνετε τον συνιστώμενο χρόνο θέρμανσης.
- Χρησιμοποιείτε ένα κατάλληλο, βαθμονομημένο θερμόμετρο για να επαληθεύσετε τη θερμοκρασία του Ένθετου θέρμανσης σωληναρίων του θερμαντήρα μοριακής ανίχνευσης Neogen® (π.χ. θερμόμετρο μερικής εμβύθισης ή ψηφιακό θερμόμετρο θερμοστοιχείου, όχι θερμόμετρο ολικής εμβύθισης). Το θερμόμετρο πρέπει να τοποθετείται στην προβλεπόμενη θέση στο Ένθετο θέρμανσης σωληναρίων θερμαντήρα μοριακής ανίχνευσης.

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με διασταυρούμενη μόλυνση κατά την προετοιμασία της δοκιμασίας:

- Φοράτε πάντοτε γάντια (για την προστασία του χρήστη και την πρόληψη εισαγωγής νουκλεασών).

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με την έκθεση σε καυτά υγρά:

- Μην υπερβαίνετε τη συνιστώμενη ρύθμιση θερμοκρασίας στον θερμαντήρα.
- Μην υπερβαίνετε τον συνιστώμενο χρόνο θέρμανσης.
- Χρησιμοποιείτε ένα κατάλληλο, βαθμονομημένο θερμόμετρο για να επαληθεύσετε τη θερμοκρασία του Ένθετου θέρμανσης σωληναρίων του θερμαντήρα μοριακής ανίχνευσης Neogen® (π.χ. θερμόμετρο μερικής εμβύθισης ή ψηφιακό θερμόμετρο θερμοστοιχείου, όχι θερμόμετρο ολικής εμβύθισης). Το θερμόμετρο πρέπει να τοποθετείται στην προβλεπόμενη θέση στο Ένθετο θέρμανσης σωληναρίων θερμαντήρα μοριακής ανίχνευσης.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με διασταυρούμενη μόλυνση κατά την προετοιμασία της δοκιμασίας:

- Συνιστάται η χρήση αποστειρωμένων ρυγχών πιπέτας, με φραγμό για αερολύματα (με φίλτρο), κατηγορίας μοριακής βιολογίας.
- Χρησιμοποιείτε νέο ρύγχος πιπέτας για κάθε μεταφορά δείγματος.
- Χρησιμοποιείτε ορθές εργαστηριακές πρακτικές για τη μεταφορά του δείγματος από το σωληνάριο εμπλουτισμού στο σωληνάριο λύσης. Για να αποφευχθεί η μόλυνση της πιπέτας, ο χρήστης μπορεί να επιλέξει να προσθέσει ένα ενδιάμεσο βήμα μεταφοράς. Για παράδειγμα, ο χρήστης μπορεί να μεταφέρει κάθε εμπλουτισμένο δείγμα μέσα σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο.
- Χρησιμοποιείτε σταθμό εργασίας μοριακής βιολογίας που να περιλαμβάνει μικροβιοκτόνο λυχνία, όπου είναι διαθέσιμη.

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με ψευδώς θετικό αποτέλεσμα:

- Μην ανοίγετε ποτέ τα σωληνάρια μετά την ενίσχυση.
- Απορρίπτετε πάντοτε τα μολυσμένα σωληνάρια μουλιάζοντάς τα σε διάλυμα οικιακής χλωρίνης 1-5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) για 1 ώρα και σε σημείο που βρίσκεται μακριά από την περιοχή προετοιμασίας της δοκιμασίας.

Για επιπλέον πληροφορίες συμβουλευθείτε το Δελτίο Δεδομένων Ασφαλείας και τους τοπικούς κανονισμούς σχετικά με την απόρριψη.

Εάν έχετε ερωτήσεις σχετικά με συγκεκριμένες εφαρμογές ή διαδικασίες, παρακαλούμε επισκεφθείτε την ιστοσελίδα μας στη διεύθυνση www.neogen.com, ή επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο ή διανομέα της Neogen.

Ευθύνη του χρήστη

Οι χρήστες φέρουν την ευθύνη της ατομικής τους εξοικείωσης με τις οδηγίες και τις πληροφορίες του προϊόντος. Επισκεφθείτε την ιστοσελίδα μας στη διεύθυνση **www.neogen.com,** ή επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο ή διανομέα της Neogen για περισσότερες πληροφορίες.

Κατά την επιλογή μιας μεθόδου εξέτασης, είναι σημαντικό να αναγνωριστεί ότι εξωτερικοί παράγοντες όπως οι μέθοδοι δειγματοληψίας, τα πρωτόκολλα εξέτασης, η προετοιμασία του δείγματος, ο χειρισμός και η εργαστηριακή τεχνική μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα.

Αποτελεί ευθύνη του χρήστη η επιλογή οποιασδήποτε μεθόδου ή προϊόντος εξέτασης, για να αξιολογήσει έναν επαρκή αριθμό δειγμάτων με κατάλληλα είδη τροφίμων και μικροβιακές προκλήσεις, ώστε η επιλεγμένη μέθοδος να ικανοποιεί τα κριτήρια του χρήστη.

Αποτελεί επίσης ευθύνη του χρήστη να καθορίσει ότι όλες οι μέθοδοι εξέτασης και τα αποτελέσματα ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις των πελατών και των προμηθευτών του.

Όπως και με κάθε μέθοδο εξέτασης, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τη χρήση οποιουδήποτε προϊόντος Neogen Food Safety δεν συνιστούν εγγύηση της ποιότητας των τροφίμων ή των διαδικασιών που υποβάλλονται σε έλεγχο.

Για να βοηθήσει τους πελάτες να αξιολογήσουν τη μέθοδο για τις διάφορες μήτρες τροφίμων, η Neogen έχει αναπτύξει το κιτ Molecular Detection Matrix Control (Κιτ μήτρας ελέγχου τροφίμων μοριακής ανίχνευσης)® Neogen. Όταν χρειάζεται, χρησιμοποιήστε τη Μήτρα ελέγχου (MC) για να προσδιορίσετε εάν η μήτρα έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει τα αποτελέσματα της Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) της Neogen. Ελέγξτε διάφορα δείγματα που είναι αντιπροσωπευτικά της μήτρας, δηλ. δείγματα που λαμβάνονται από διαφορετική προέλευση, κατά τη διάρκεια οποιασδήποτε περιόδου επικύρωσης όταν υιοθετείτε τη μέθοδο της Neogen, ή όταν ελέγχετε νέες ή άγνωστες μήτρες ή μήτρες που έχουν υποστεί αλλαγές στις πρώτες ύλες ή στην επεξεργασία.

Ως μήτρα μπορεί να οριστεί ένας τύπος προϊόντος με ενδογενείς ιδιότητες όπως η σύνθεση και η επεξεργασία. Οι διαφορές μεταξύ των μητρών μπορεί να είναι απλές, όπως οι επιδράσεις που προκαλούνται από διαφορές στην επεξεργασία ή στην εμφάνισή τους, για παράδειγμα, ακατέργαστο έναντι παστεριωμένου, φρέσκο έναντι αποξηραμένου κτλ.

Περιορισμός εγγυήσεων / Περιορισμένη αποκατάσταση

ΕΚΤΟΣ ΕΑΝ ΔΗΛΩΝΕΤΑΙ ΡΗΤΑ ΣΕ ΕΝΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΕΝΗΣ ΕΓΓΥΗΣΗΣ ΣΤΗ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ, Η NEOGEN ΠΑΡΑΙΤΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΡΗΤΕΣ ΚΑΙ ΣΙΩΠΗΡΕΣ ΕΓΓΥΗΣΕΙΣ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΑΛΛΩΝ, ΟΠΟΙΩΝΔΗΠΟΤΕ ΕΓΓΥΗΣΕΩΝ ΕΜΠΟΡΕΥΣΙΜΟΤΗΤΑΣ Ή ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΜΙΑ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ. Εάν οποιοδήποτε προϊόν Neogen Food Safety είναι ελαττωματικό, η Neogen ή ο εξουσιοδοτημένος διανομέας της, σύμφωνα με την κρίση τους, θα αντικαταστήσουν ή θα επιστρέψουν την αξία αγοράς του προϊόντος. Αυτή θα είναι η αποκλειστική σας αποζημίωση. Πρέπει άμεσα και εντός εξήντα ημερών να γνωστοποιήσετε στη Neogen την ανεύρεση των πιθανολογούμενων ελαττωμάτων του προϊόντος και να επιστρέψετε το προϊόν στη Neogen. Επικοινωνήστε με τον αντιπρόσωπο ή τον εξουσιοδοτημένο διανομέα της Neogen για περαιτέρω ερωτήσεις.

Περιορισμός ευθύνης της Neogen

Η NEOGEN ΔΕΝ ΕΥΘΥΝΕΤΑΙ ΓΙΑ ΟΠΟΙΑΔΗΠΟΤΕ ΑΠΩΛΕΙΑ Ή ΖΗΜΙΑ, ΕΙΤΕ ΑΜΕΣΗ, ΕΜΜΕΣΗ, ΕΙΔΙΚΗ, ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΗ Ή ΑΠΟΘΕΤΙΚΗ ΖΗΜΙΑ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΑΛΛΩΝ ΤΩΝ ΔΙΑΦΥΓΟΝΤΩΝ ΚΕΡΔΩΝ. Η ευθύνη της Neogen δεν υπερβαίνει σε καμία περίπτωση και υπό καμία νομική θεωρία την αξία αγοράς του προϊόντος που φέρεται να είναι ελαττωματικό.

Αποθήκευση και απόρριψη

Φυλάσσετε τη Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) στους 2-8 °C. Μην καταψύχετε. Κατά τη διάρκεια αποθήκευσης διατηρείτε το κιτ μακριά από το φως. Αφού ανοίξετε το κιτ, ελέγξτε ότι το αλουμινένιο σακουλάκι είναι άθικτο. Εάν το αλουμινένιο σακουλάκι έχει υποστεί ζημιά, μη χρησιμοποιήσετε το προϊόν. Μετά το άνοιγμα, τα αχρησιμοποίητα σωληνάρια αντιδραστηρίων πρέπει πάντοτε να φυλάσσονται στο επανασφραγιζόμενο σακουλάκι που περιέχει αφυγραντικό μέσο, ώστε να διατηρείται η σταθερότητα των λυοφιλοποιημένων αντιδραστηρίων. Φυλάσσετε τα επανασφραγισμένα σακουλάκια στους 2-8 °C για χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο από 60 ημέρες.

Μη χρησιμοποιείτε τη Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) της Neogen μετά την ημερομηνία λήξης. Η ημερομηνία λήξης και ο αριθμός παρτίδας επισημαίνονται στην εξωτερική ετικέτα του κουτιού. Μετά τη χρήση, το μέσο εμπλουτισμού και τα σωληνάρια της Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) μπορεί ενδεχομένως να περιέχουν παθογόνα υλικά. Μετά την ολοκλήρωση της δοκιμασίας, τηρείτε τα τρέχοντα πρότυπα του κλάδου σχετικά με την απόρριψη μολυσμένων αποβλήτων. Για επιπλέον πληροφορίες συμβουλευθείτε το Δελτίο Δεδομένων Ασφαλείας και τους τοπικούς κανονισμούς σχετικά με την απόρριψη.

Οδηγίες χρήσης

Ακολουθήστε προσεκτικά όλες τις οδηγίες. Η μη τήρηση των οδηγιών μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβή αποτελέσματα.

Ο χρήστης πρέπει να ολοκληρώσει την εκπαίδευση πιστοποίησης χειριστή για το Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης της Neogen, όπως περιγράφεται στο έγγραφο «Πρωτόκολλα και οδηγίες πιστοποίησης εγκατάστασης (IQ) / πιστοποίησης λειτουργίας (OQ) για το Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης της Neogen»[7].

Πραγματοποιείτε περιοδικά απολύμανση των πάγκων και του εξοπλισμού του εργαστηρίου (πιπέτες, εργαλεία σφράγισης/αποσφράγισης κτλ.) με διάλυμα οικιακής χλωρίνης 1-5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) ή με διάλυμα απομάκρυνσης DNA.

Δείτε την ενότητα «Ειδικές οδηγίες για επικυρωμένες μεθόδους» για τις ειδικές απαιτήσεις:

Πίνακας 3 για πρωτόκολλα εμπλουτισμού σύμφωνα με την AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2017.01

Πίνακας 4 για τα πρωτόκολλα εμπλουτισμού σύμφωνα με το NF Validation certificate 3M 01/18-05/17

Εμπλουτισμός του δείγματος

Οι Πίνακες 2, 3 ή 4 αναφέρουν οδηγίες για πρωτόκολλα εμπλουτισμού για τρόφιμα. Αποτελεί ευθύνη του χρήστη η επικύρωση εναλλακτικών πρωτοκόλλων δειγματοληψίας ή αναλογιών αραίωσης, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι η παρούσα μέθοδος εξέτασης πληροί τα κριτήρια του χρήστη.

Τρόφιμα

1. Προθερμάνετε το μέσο εμπλουτισμού BPW ISO στους 41,5 ± 1 °C.
2. Συνδυάστε με άσηπτη τεχνική το μέσο εμπλουτισμού και το δείγμα, σύμφωνα με τους Πίνακες 2, 3 ή 4. Για όλα τα δείγματα κρέατος και τα δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε σωματιδιακή ύλη, συνιστάται η χρήση ασκών φιλτραρίσματος.
3. Ομογενοποιήστε καλά όλες τις μήτρες εκτός από αυτές των φυλλωδών λαχανικών και φρούτων, με ανάδευση, ομογενοποίηση (διαδικασία τύπου stomaching) ή ανάμειξη με το χέρι για 2 ± 0,2 λεπτά. Επωάστε στους 41,5 ± 1 °C για κατάλληλη χρονική διάρκεια σύμφωνα με τους Πίνακες 2, 3 ή 4.

Πίνακας 2. Γενικά πρωτόκολλα εμπλουτισμού

Μήτρα δείγματος(α)	Μέγεθος δείγματος	Όγκος ζωμού εμπλουτισμού (mL)	Θερμοκρασία εμπλουτισμού (±1 °C)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)
Ωμό βοδινό, συμπεριλαμβανομένου κιμά και τριμμάτων	325 g	975 BPW ISO (προθερμασμένο)	41,5	10-18
Ωμό κρέας, συμπεριλαμβανομένων ωμού βοδινού, χοιρινού, πουλερικών, αρνιού και βίσωνα	25 g	225 BPW ISO (προθερμασμένο)	41,5	8-18
Φυλλώδη λαχανικά((β)	200 g	450 BPW ISO (προθερμασμένο)	41,5	18-24
Άλλα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων φρούτων((β), λαχανικών, χυμών φρούτων/λαχανικών, φρέσκων βοτάνων, ωμών θαλασσινών, ωμών αυγών, ωμού γάλακτος, ζύμης μπισκότων και επεξεργασμένου κρέατος	25 g	225 BPW ISO (προθερμασμένο)	41,5	18-24
Καρύδια ή μίγματα ξηρών καρπών που περιέχουν καρύδια (αυτό το πρωτόκολλο είναι κατάλληλο για άλλους ξηρούς καρπούς, όπως καρύδια πεκάν, αμύγδαλα, φιστίκια, κάσιους και κάστανα),	25 g	225 ανασυσταμένο αφυδατωμένο γάλα χωρίς λιπαρά	41,5	18-24

(α) Τα κατεψυγμένα δείγματα πρέπει να ισορροπήσουν στους 4-8 °C πριν από την εισαγωγή τους στον ζωμό εμπλουτισμού.

(β) Τα δείγματα φυλλωδών λαχανικών και φρούτων πρέπει να αναταράσσονται ήπια με το χέρι για 5 λεπτά. Μην αναδεύετε και μην ομογενοποιείτε (διαδικασία τύπου stomaching).

Ειδικές οδηγίες για επικυρωμένες μεθόδους

AOAC® *Official Methods of Analysis℠* 2017.01

Στο πρόγραμμα AOAC *Official Method of Analysis℠*, η Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) της Neogen κρίθηκε αποτελεσματική μέθοδος για την ανίχνευση του *E. coli* O157:H7. Οι μήτρες που ελέγχθηκαν στη μελέτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Πρωτόκολλα εμπλουτισμού με χρήση προθερμασμένου BPW ISO στους 41,5 ± 1 °C σύμφωνα με το AOAC® *Official Methods℠* 2017.01

Μήτρα δείγματος	Μέγεθος δείγματος	Όγκος ζωμού εμπλουτισμού (mL)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)	Ομογενοποιημένο
Ωμός βοδινός κιμάς (73% άπαχος)	325 g	975	10-18	Διαδικασία με τα χέρια ή με διαδικασία τύπου stomaching
Ωμό συσκευασμένο σπανάκι(α)	200 g	450	18-24	Αναταράξτε απαλά με το χέρι για 5 λεπτά, μην ομογενοποιείτε
Νωποί βλαστοί	25 g	225	18-24	Αναταράξτε απαλά με το χέρι για 5 λεπτά, μην ομογενοποιείτε
Κατεψυγμένα βατόμουρα(α)(β)	25 g	225	18-24	Αναταράξτε απαλά με το χέρι για 5 λεπτά, μην ομογενοποιείτε

(α) Τα δείγματα φυλλωδών λαχανικών και φρούτων πρέπει να αναταράσσονται ήπια με το χέρι για 5 λεπτά. Μην αναδεύετε και μην ομογενοποιείτε (διαδικασία τύπου stomaching).

(β) Τα κατεψυγμένα δείγματα πρέπει να ισορροπήσουν στους 4-8 °C πριν από την εισαγωγή τους στον ζωμό εμπλουτισμού.

Επικύρωση NF Validation από την AFNOR Certification

3M 01/18-05/17

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη λήξη της επικύρωσης, παρακαλούμε ανατρέξτε στο πιστοποιητικό NF VALIDATION που διατίθεται στον ιστότοπο που αναφέρεται παραπάνω.

Μέθοδος πιστοποίησης NF VALIDATION σύμφωνα με το πρότυπο ISO 16140-2[8] σε σύγκριση με το πρότυπο ISO 16654[3]

Πεδίο εφαρμογής της επικύρωσης: Ωμό βοδινό κρέας, ωμά γαλακτοκομικά προϊόντα, ωμά φρούτα και λαχανικά

Προετοιμασία δείγματος: Τα δείγματα πρέπει να προετοιμάζονται σύμφωνα με τα πρότυπα EN ISO 16654 και EN ISO 6887[6]

Έκδοση λογισμικού: Βλ. πιστοποιητικό

Πίνακας 4. Πρωτόκολλα εμπλουτισμού με χρήση προθερμασμένου BPW ISO στους 41,5 ± 1 °C σύμφωνα με την πιστοποιημένη μέθοδο NF VALIDATION 3M 01/18-05/17

Πρωτόκολλο	Μέγεθος δείγματος	Όγκος ζωμού εμπλουτισμού (mL)	Θερμοκρασία εμπλουτισμού (±1 °C)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)
Ωμά γαλακτοκομικά προϊόντα, ωμά φρούτα και ωμά λαχανικά	25 g	225	41,5	18-24
Ωμό βοδινό κρέας	25 g	225	41,5	8-24

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ:

- Δεν έχουν ελεγχθεί στη μελέτη NF VALIDATION δείγματα μεγαλύτερα των 25 g.
- Τα συνιστώμενα από το πρωτόκολλο σημεία παρέμβασης είναι μετά τον εμπλουτισμό ή μετά από τη λύση του δείγματος. Ο ζωμός εμπλουτισμού ή το προϊόν λύσης του δείγματος μπορεί να φυλαχθεί στους 2-8 °C για έως 72 ώρες. Μετά την αφαίρεση του ζωμού εμπλουτισμού από τη φύλαξη, συνεχίστε τις δοκιμασίες από το Βήμα 1 στην ενότητα **Λύση**. Μετά την αφαίρεση του προϊόντος λύσης του δείγματος από τη φύλαξη, συνεχίστε τις δοκιμασίες από το Βήμα 7 στην ενότητα **Λύση**. Το προϊόν λύσης μπορεί επίσης να φυλαχθεί στους -20 °C.
- Τα πρωτόκολλα σύντομου εμπλουτισμού επηρεάζονται από τις συνθήκες επώασης και θα πρέπει να τηρούνται οι θερμοκρασίες που ορίζονται στο πρωτόκολλο. Η θερμοκρασία του υδατόλουτρου ή του επωαστήρα όπου προθερμαίνονται οι ζωμοί θα πρέπει να επαληθεύεται, προκειμένου να διασφαλίζεται η επίτευξη της απαιτούμενης θερμοκρασίας του ζωμού εμπλουτισμού. Ο συνολικός χρόνος προετοιμασίας του δείγματος, συμπεριλαμβανομένης της καθυστέρησης μεταξύ της ολοκλήρωσης του σταδίου προθέρμανσης του μέσου και της έναρξης της επώασης του δείγματος τροφίμων, δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 45 λεπτά. Προτείνεται η χρήση επωαστήρα με εξαερισμό κατά τη διάρκεια της επώασης.

Προετοιμασία του Δίσκου Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης Neogen®

1. Βρέξτε ένα πανί ή μια πετσέτα μίας χρήσης με διάλυμα οικιακής χλωρίνης 1-5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) και σκουπίστε τον Δίσκο ταχείας φόρτωσης μοριακής ανίχνευσης Neogen.
2. Ξεπλύνετε τον Δίσκο ταχείας φόρτωσης μοριακής ανίχνευσης Neogen με νερό.
3. Χρησιμοποιήστε μια πετσέτα μίας χρήσης για να στεγνώσετε τον Δίσκο ταχείας φόρτωσης μοριακής ανίχνευσης Neogen.
4. Διασφαλίστε ότι ο Δίσκος ταχείας φόρτωσης μοριακής ανίχνευσης Neogen είναι στεγνός πριν από τη χρήση.

Προετοιμασία του Ένθετου ψύξης σωληναρίων μοριακής ανίχνευσης Neogen®

Τοποθετήστε το Ένθετο ψύξης σωληναρίων μοριακής ανίχνευσης Neogen απευθείας στον πάγκο του εργαστηρίου: Ο Δίσκος του ένθετου ψύξης σωληναρίων μοριακής ανίχνευσης Neogen δεν χρησιμοποιείται. Χρησιμοποιήστε το ένθετο σωληναρίων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος εργαστηρίου (20-25 °C).

Προετοιμασία του Ένθετου θέρμανσης σωληναρίων θερμαντήρα μοριακής ανίχνευσης Neogen®

Τοποθετήστε το Ένθετο θέρμανσης σωληναρίων θερμαντήρα μοριακής ανίχνευσης Neogen σε ένα διπλό ένθετο σωληναρίων ξηρής θέρμανσης. Ενεργοποιήστε τη μονάδα ξηρής θέρμανσης και ρυθμίστε τη θερμοκρασία για να επιτρέψετε στο Ένθετο θέρμανσης σωληναρίων θερμαντήρα μοριακής ανίχνευσης Neogen να φτάσει και να διατηρήσει θερμοκρασία 100 ± 1 °C.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Ανάλογα με τη μονάδα θερμαντήρα, επιτρέψτε στο Ένθετο θέρμανσης σωληναρίων θερμαντήρα μοριακής ανίχνευσης Neogen χρόνο περίπου 30 λεπτών για να φθάσει στην κατάλληλη θερμοκρασία. Με χρήση κατάλληλου, βαθμονομημένου θερμόμετρου (π.χ. θερμόμετρο μερικής εμβύθισης, ψηφιακό θερμόμετρο θερμοστοιχείου, όχι θερμόμετρο ολικής εμβύθισης) τοποθετημένο στην καθορισμένη θέση, επαληθεύστε ότι το Ένθετο θέρμανσης σωληναρίων του θερμαντήρα μοριακής ανίχνευσης Neogen βρίσκεται στους 100 ± 1°C.

Προετοιμασία του Οργάνου μοριακής ανίχνευσης της Neogen®

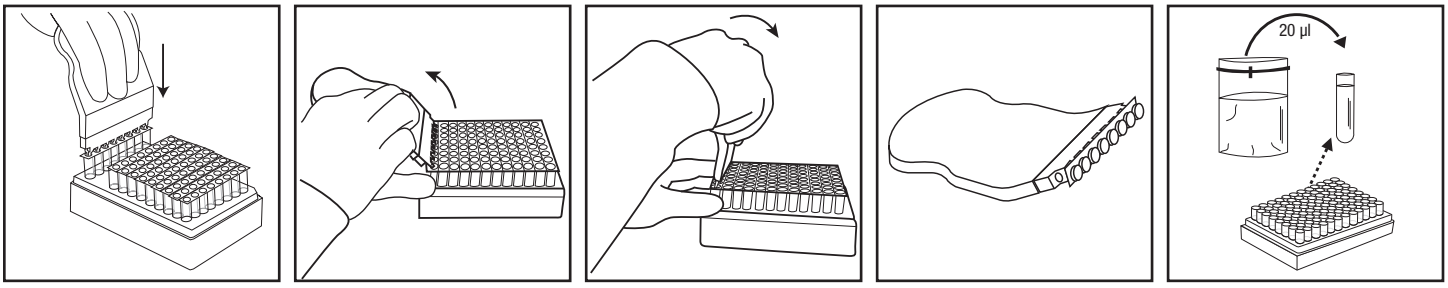
1. Εκκινήστε το Λογισμικό μοριακής ανίχνευσης Neogen® και συνδεθείτε. Επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο της Neogen Food Safety για να διασφαλίσετε ότι η έκδοση του λογισμικού που διαθέτετε είναι η πλέον πρόσφατη.
2. Ενεργοποιήστε το Όργανο μοριακής ανίχνευσης της Neogen.
3. Δημιουργήστε ή επεξεργαστείτε μια εκτέλεση με δεδομένα για κάθε δείγμα. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του Συστήματος Μοριακής Ανίχνευσης της Neogen® για λεπτομέρειες.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το Όργανο μοριακής ανίχνευσης της Neogen πρέπει να φτάσει και να διατηρήσει θερμοκρασία 60 °C πριν από την εισαγωγή του Δίσκου ταχείας φόρτωσης μοριακής ανίχνευσης Neogen με τα σωληνάρια της αντίδρασης. Αυτό το βήμα θέρμανσης διαρκεί περίπου 20 λεπτά και υποδεικνύεται από μια ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ λυχνία στη γραμμή κατάστασης του οργάνου. Όταν το όργανο είναι έτοιμο να ξεκινήσει μια εκτέλεση, η γραμμή κατάστασης θα γίνει ΠΡΑΣΙΝΗ.

Λύση

1. Αφήστε τα σωληνάρια Διαλύματος Λύσης Neogen να θερμανθούν αφήνοντας το στατώ σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) ολονύκτια (16-18 ώρες). Εναλλακτικές λύσεις για την εξισορρόπηση των σωληναρίων Διαλύματος Λύσης Neogen σε θερμοκρασία δωματίου είναι να αφήσετε τα σωληνάρια Διαλύματος Λύσης Neogen επάνω στον πάγκο του εργαστηρίου για τουλάχιστον 2 ώρες, να επωάσετε τα σωληνάρια Διαλύματος Λύσης Neogen σε επωαστήρα 37 ± 1 °C για 1 ώρα ή να τα τοποθετήσετε σε διπλό ένθετο σωληναρίων ξηρής θέρμανσης για 30 δευτερόλεπτα στους 100 °C.
2. Αναστρέψτε τα πωματισμένα σωληνάρια για να αναμίξετε. Προχωρήστε στο επόμενο βήμα εντός 4 ωρών.
3. Αφαιρέστε το ζωμό εμπλουτισμού από τον επωαστήρα.
4. Απαιτείται ένα σωληνάριο Διαλύματος Λύσης Neogen για κάθε δείγμα και δείγμα Αρνητικού μάρτυρα (NC) (στείρο μέσο εμπλουτισμού).
   - 4.1 Οι σειρές των σωληναρίων Διαλύματος Λύσης Neogen μπορούν να κοπούν στον επιθυμητό αριθμό σωληναρίων Διαλύματος Λύσης Neogen. Επιλέξτε τον αριθμό των μεμονωμένων σωληναρίων Διαλύματος Λύσης Neogen ή τις απαιτούμενες σειρές των 8 σωληναρίων. Τοποθετήστε τα σωληνάρια Διαλύματος Λύσης Neogen σε ένα κενό στατώ.
   - 4.2 Για να αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση, αποσφραγίζετε μία σειρά σωληναρίων Διαλύματος Λύσης Neogen κάθε φορά, και χρησιμοποιείτε νέο ρύγχος πιπέτας για κάθε βήμα μεταφοράς.
   - 4.3 Μεταφέρετε το εμπλουτισμένο δείγμα στα σωληνάρια Διαλύματος Λύσης Neogen όπως περιγράφεται παρακάτω:

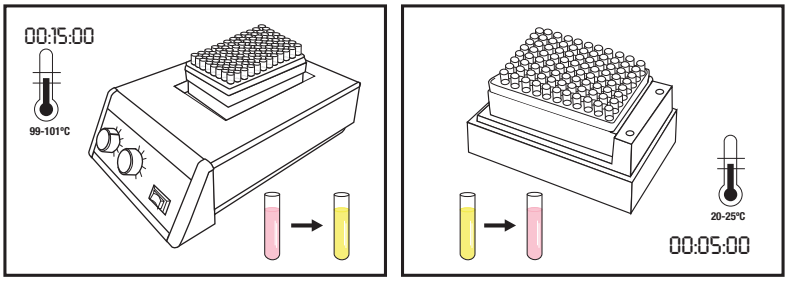
     Μεταφέρετε κάθε εμπλουτισμένο δείγμα σε μεμονωμένο σωληνάριο Διαλύματος Λύσης Neogen **πρώτα.** Μεταφέρετε το NC **τελευταίο.**
   - 4.4 Χρησιμοποιήστε το Εργαλείο σφράγισης / αποσφράγισης - λύσης μοριακής ανίχνευσης Neogen® για να αποσφραγίσετε μία σειρά σωληναρίων Διαλύματος Λύσης Neogen - μία σειρά κάθε φορά.
   - 4.5 Απορρίψτε το πώμα του σωληναρίου Διαλύματος Λύσης – Εάν το προϊόν λύσης θα φυλαχθεί για επανέλεγχο, τοποθετήστε τα πώματα σε καθαρό δοχείο για εκ νέου εφαρμογή μετά τη λύση.
     - 4.5.1 Για την επεξεργασία του προϊόντος λύσης που έχει φυλαχθεί, βλ. Παράρτημα Α.
   - 4.6 Μεταφέρετε 20 µL δείγματος σε ένα σωληνάριο Διαλύματος Λύσης Neogen εκτός εάν υποδεικνύεται διαφορετικά στους Πίνακες Πρωτοκόλλου 2, 3 και 4.



5. Επαναλάβετε το βήμα 4.3 έως ότου κάθε επιμέρους δείγμα προστεθεί σε ένα αντίστοιχο σωληνάριο Διαλύματος Λύσης Neogen της σειράς.
6. Επαναλάβετε τα βήματα 4.1 έως 4.6 όπως απαιτείται, για τον αριθμό των δειγμάτων υπό έλεγχο.
7. Όταν έχει γίνει η μεταφορά όλων των δειγμάτων, μεταφέρετε 20 µL NC (στείρο μέσο εμπλουτισμού π.χ. BPW ISO) σε σωληνάριο Διαλύματος Λύσης Neogen. Μη χρησιμοποιείτε νερό ως NC.
8. Επαληθεύστε ότι η θερμοκρασία του Ένθετου θέρμανσης σωληναρίων θερμαντήρα μοριακής ανίχνευσης Neogen βρίσκεται στους 100 ± 1 °C.
9. Τοποθετήστε το ακάλυπτο στατώ των σωληναρίων Διαλύματος Λύσης Neogen στο Ένθετο θέρμανσης σωληναρίων θερμαντήρα μοριακής ανίχνευσης Neogen και θερμάνετε για 15 ± 1 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της θέρμανσης, το Διάλυμα Λύσης Neogen θα αλλάξει χρώμα, από ροζ (ψυχρό) σε κίτρινο (θερμό).

   Δείγματα που δεν έχουν υποβληθεί στην κατάλληλη θερμική επεξεργασία κατά τη διάρκεια του σταδίου λύσης της δοκιμασίας μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανός βιολογικός κίνδυνος και ΔΕΝ πρέπει να εισάγονται στο Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης Neogen.

10. Αφαιρέστε το ακάλυπτο στατώ σωληναρίων Διαλύματος Λύσης Neogen από το ένθετο θέρμανσης και αφήστε το να κρυώσει στο Ένθετο ψύξης σωληναρίων μοριακής ανίχνευσης Neogen για τουλάχιστον 5 λεπτά και μέγιστο χρόνο 10 λεπτά. Το Ένθετο ψύξης σωληναρίων μοριακής ανίχνευσης Neogen, όταν χρησιμοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος χωρίς τον Δίσκο του ένθετου ψύξης σωληναρίων μοριακής ανίχνευσης Neogen, πρέπει να τοποθετείται απευθείας επάνω στον πάγκο του εργαστηρίου. Όταν κρυώσει, το διάλυμα λύσης θα αποκτήσει ξανά ροζ χρώμα.
11. Αφαιρέστε το στατώ των σωληναρίων Διαλύματος Λύσης Neogen από το Ένθετο ψύξης σωληναρίων μοριακής ανίχνευσης Neogen.

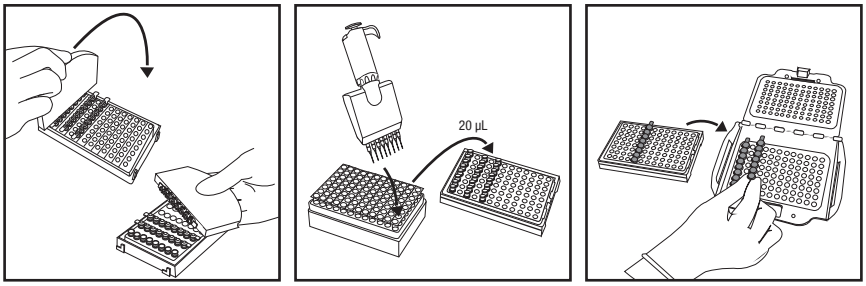


Ενίσχυση

1. Απαιτείται ένα σωληνάριο αντιδραστηρίου Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) Neogen για κάθε δείγμα και για το NC.
   1.1 Οι σειρές των σωληναρίων μπορούν να κοπούν στον επιθυμητό αριθμό σωληναρίων. Επιλέξτε τον απαιτούμενο αριθμό των μεμονωμένων σωληναρίων αντιδραστηρίου Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) Neogen ή τις απαιτούμενες σειρές των 8 σωληναρίων.
   1.2 Τοποθετήστε τα σωληνάρια αντιδραστηρίου Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) Neogen σε ένα κενό στατώ.
   1.3 Αποφύγετε να διαταράξετε τα σφαιρίδια του αντιδραστηρίου από τον πυθμένα των σωληναρίων.
2. Επιλέξτε ένα σωληνάριο Μάρτυρα αντιδραστηρίου Neogen και τοποθετήστε το στο στατώ.
3. Για να αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση, αποσφραγίστε μία σειρά σωληναρίων αντιδραστηρίου Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) Neogen κάθε φορά, και χρησιμοποιήστε νέο ρύγχος πιπέτας για κάθε βήμα μεταφοράς.
4. Μεταφέρετε το προϊόν λύσης σε ένα σωληνάριο αντιδραστηρίου Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) Neogen και σε σωληνάριο Μάρτυρα αντιδραστηρίου Neogen όπως περιγράφεται παρακάτω:

Μεταφέρετε κάθε προϊόν λύσης στα επιμέρους σωληνάρια αντιδραστηρίου Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) Neogen **πρώτα** και κατόπιν το NC. Ενυδατώστε το σωληνάριο Μάρτυρα αντιδραστηρίου Neogen **τελευταίο.**

5. Χρησιμοποιήστε το Εργαλείο σφράγισης / αποσφράγισης - αντιδραστηρίου μοριακής ανίχνευσης της Neogen® για να αποσφραγίσετε μία σειρά σωληναρίων αντιδραστηρίου Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) Neogen – μία σειρά σωληναρίων κάθε φορά. Απορρίψτε το πώμα.
   5.1 Μεταφέρετε 20 μL του προϊόντος λύσης του δείγματος από το επάνω ½ του υγρού (αποφύγετε το ίζημα) του σωληναρίου Διαλύματος Λύσης Neogen στο αντίστοιχο σωληνάριο αντιδραστηρίου Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) **Neogen. Διανείμετε υπό γωνία για να αποφύγετε να διαταράξετε τα σφαιρίδια. Αναμίξτε πιπετάροντας ήπια πάνω-κάτω 5 φορές.**
   5.2 Επαναλάβετε το βήμα 5.1 μέχρι το επιμέρους προϊόν λύσης του δείγματος να έχει προστεθεί σε ένα αντίστοιχο σωληνάριο αντιδραστηρίου Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) Neogen στη σειρά.
   5.3 Καλύψτε τα σωληνάρια αντιδραστηρίου Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) της Neogen με τα παρεχόμενα επιπλέον πώματα και χρησιμοποιήστε τη στρογγυλεμένη πλευρά του Εργαλείου σφράγισης / αποσφράγισης - αντιδραστηρίου μοριακής ανίχνευσης της Neogen για να ασκήσετε πίεση με μια κίνηση εμπρός-πίσω διασφαλίζοντας έτσι ότι το πώμα έχει εφαρμοστεί σφιχτά.
   5.4 Επαναλάβετε τα βήματα 5.1 έως 5.3 όπως απαιτείται, για τον αριθμό των δειγμάτων υπό έλεγχο.
   5.5 Όταν έχει γίνει η μεταφορά όλων των προϊόντων λύσης του δείγματος, επαναλάβετε τα βήματα 5.1 έως 5.3 για να μεταφέρετε 20 μL του προϊόντος λύσης του NC σε ένα σωληνάριο αντιδραστηρίου Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) Neogen.
   5.6 Μεταφέρετε **20 μL του <u>προϊόντος λύσης του NC</u> σε ένα σωληνάριο Μάρτυρα αντιδραστηρίου Neogen.** Διανείμετε υπό γωνία για να αποφύγετε να διαταράξετε τα σφαιρίδια. Αναμίξτε πιπετάροντας ήπια πάνω-κάτω 5 φορές.
6. Φορτώστε τα σφραγισμένα σωληνάρια σε έναν καθαρό και απολυμασμένο Δίσκο ταχείας φόρτωσης μοριακής ανίχνευσης Neogen. Στη συνέχεια, κλείστε και ασφαλίστε το καπάκι.



7. Επιθεωρήστε και επιβεβαιώστε τη διαμορφωμένη εκτέλεση στο Λογισμικό μοριακής ανίχνευσης Neogen.
8. Κάντε κλικ στο κουμπί Start (Έναρξη) στο λογισμικό και επιλέξτε το όργανο που θα χρησιμοποιηθεί. Το καπάκι του επιλεγμένου οργάνου ανοίγει αυτόματα.
9. Τοποθετήστε τον Δίσκο ταχείας φόρτωσης μοριακής ανίχνευσης Neogen στο Όργανο μοριακής ανίχνευσης Neogen και κλείστε το καπάκι για να ξεκινήσει η δοκιμασία. Τα αποτελέσματα παρέχονται εντός 60 λεπτών, αν και τα θετικά ενδέχεται να ανιχνευθούν νωρίτερα.
10. Αφού ολοκληρωθεί η δοκιμασία, αφαιρέστε τον Δίσκο ταχείας φόρτωσης μοριακής ανίχνευσης Neogen από το Όργανο μοριακής ανίχνευσης Neogen και απορρίψτε τα σωληνάρια μουλιάζοντάς τα σε διάλυμα οικιακής χλωρίνης 1-5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) για 1 ώρα και σε σημείο που βρίσκεται μακριά από την περιοχή προετοιμασίας της δοκιμασίας.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Για να ελαχιστοποιήσετε τον κίνδυνο λήψης ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων λόγω διασταυρούμενης μόλυνσης, ποτέ μην ανοίγετε τα σωληνάρια αντιδραστηρίων που περιέχουν ενισχυμένο DNA. Σε αυτά περιλαμβάνονται το σωληνάριο Μάρτυρα αντιδραστηρίου, το σωληνάριο αντιδραστηρίου Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) Neogen και τα σωληνάρια Μήτρας ελέγχου Neogen. Απορρίπτετε πάντοτε τα σφραγισμένα σωληνάρια αντιδραστηρίου μουλιάζοντάς τα σε διάλυμα οικιακής χλωρίνης 1-5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) για 1 ώρα και σε σημείο που βρίσκεται μακριά από την περιοχή προετοιμασίας της δοκιμασίας.

Αποτελέσματα και ερμηνεία

Ένας αλγόριθμος ερμηνεύει την καμπύλη εξόδου φωτός που προκύπτει από την ανίχνευση του πολλαπλασιασμού των νουκλεϊνικών οξέων. Τα αποτελέσματα αναλύονται αυτόματα από το λογισμικό και κωδικοποιούνται χρωματικά με βάση το αποτέλεσμα. Ένα θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα καθορίζεται μέσω ανάλυσης ενός αριθμού μοναδικών παραμέτρων της καμπύλης. Τα πιθανολογούμενα θετικά αποτελέσματα αναφέρονται σε πραγματικό χρόνο, ενώ τα αρνητικά καθώς και τα αποτελέσματα προς επιθεώρηση εμφανίζονται μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης.

Τα πιθανολογούμενα θετικά αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται σύμφωνα με τις τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας του εργαστηρίου ή ακολουθώντας την κατάλληλη επιβεβαίωση της μεθόδου αναφοράς[1,2,3], αρχίζοντας με τη μεταφορά από τον πρωτογενή εμπλουτισμό BPW ISO σε δευτερογενή/είς ζωμό/ούς εμπλουτισμού και στη συνέχεια επίστρωση σε τρυβλία και επιβεβαίωση των απομονωθέντων στελεχών χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες βιοχημικές και οροδιαγνωστικές μεθόδους.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Ακόμα και ένα αρνητικό δείγμα δεν θα δώσει μηδενική ένδειξη, καθώς το σύστημα και τα αντιδραστήρια ενίσχυσης Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) Neogen έχουν μια σχετική μονάδα φωτός (RLU) «υπόβαθρου».

Στη σπάνια περίπτωση ασυνήθιστου φωτισμού, ο αλγόριθμος το επισημαίνει ως «Προς Επιθεώρηση». Η Neogen συνιστά στον χρήστη να επαναλάβει τη δοκιμασία για όλα τα δείγματα Προς Επιθεώρηση. Εάν το αποτέλεσμα συνεχίζει να είναι Προς Επιθεώρηση, προχωρήστε στον έλεγχο επιβεβαίωσης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της προτίμησής σας ή όπως καθορίζεται από τους τοπικούς κανονισμούς.

Σε περίπτωση ασυμφωνίας των αποτελεσμάτων (πιθανολογούμενα θετικά με τη Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) Neogen, που δεν έχουν επιβεβαιωθεί με έναν από τους τρόπους που περιγράφονται παραπάνω, και συγκεκριμένα με δοκιμασία συγκόλλησης λάτεξ), το εργαστήριο πρέπει να ακολουθήσει τα απαραίτητα βήματα ώστε να διασφαλίσει την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται.

Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων σύμφωνα με τη μέθοδο πιστοποίησης NF VALIDATION

Στο πλαίσιο της NF VALIDATION, όλα τα δείγματα που αναγνωρίζονται ως θετικά από τη Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) της Neogen πρέπει να επιβεβαιώνονται με τα παρακάτω τεστ:

Επιλογή 1: Χρησιμοποιώντας το πρότυπο ISO 16654[3] ξεκινώντας από τον εμπλουτισμό του ρυθμιστικού νερού πεπτόνης[3].

Επιλογή 2: Με την εφαρμογή μεθόδου επιβεβαίωσης που περιλαμβάνει τα ακόλουθα: Απλώστε 50 µL του εμπλουτισμού ρυθμιστικού νερού πεπτόνης[3] σε ένα τρυβλίο άγαρ Cefixime Potassium Tellurite Sorbitol MacConkey (CT-SMAC)[3]. Επωάστε για 24 ±3 ώρες στους 37 °C. Απλώστε χαρακτηριστικές αποικίες σε θρεπτικό άγαρ και εκτελέστε δοκιμασία συγκόλλησης λάτεξ απευθείας στις απομονωμένες αποικίες. Εάν τα αποτελέσματα της Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) της Neogen δεν επαληθευτούν, πραγματοποιήστε ένα βήμα ανοσομαγνητικού διαχωρισμού και απλώστε 50 µL σε τρυβλίο CT-SMAC.

Επιλογή 3: Χρησιμοποιώντας ανιχνευτές νουκλεϊνικών οξέων, όπως περιγράφεται στο πρότυπο EN ISO 7218[5] σε απομονωμένες αποικίες (καθαρές ή μη) από τρυβλίο CT-SMAC (βλ. Επιλογές 1 ή 2). Οι ανιχνευτές νουκλεϊνικών οξέων πρέπει να διαφέρουν από αυτούς που χρησιμοποιήθηκαν στη Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *E. coli* O157 (εμπεριέχον H7) της Neogen.

Επιλογή 4: Χρησιμοποιώντας οποιαδήποτε άλλη μέθοδο πιστοποίησης NF VALIDATION, η αρχή της οποίας πρέπει να διαφέρει από αυτήν της Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης - *E. coli* O157(εμπεριέχον H7) της Neogen. Πρέπει να χρησιμοποιείται το πλήρες πρωτόκολλο που περιγράφεται για αυτήν τη δεύτερη μέθοδο επικύρωσης. Όλα τα βήματα πριν από την έναρξη της επιβεβαίωσης πρέπει να είναι κοινά και για τις δύο μεθόδους.

Σε περίπτωση ασυμφωνίας των αποτελεσμάτων (πιθανολογούμενα θετικά με την εναλλακτική μέθοδο, που δεν έχουν επιβεβαιωθεί με έναν από τους τρόπους που περιγράφονται παραπάνω) το εργαστήριο θα πρέπει να ακολουθήσει τα απαραίτητα βήματα προκειμένου να διασφαλίσει την εγκυρότητα του αποτελέσματος που λαμβάνεται.

Εάν έχετε ερωτήσεις σχετικά με συγκεκριμένες εφαρμογές ή διαδικασίες, παρακαλούμε επισκεφθείτε την ιστοσελίδα μας στη διεύθυνση www.neogen.com ή επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο ή διανομέα της Neogen.

Παράρτημα Α. Διακοπή του πρωτοκόλλου: Φύλαξη και επανέλεγχος των δειγμάτων

1. Για να αποθηκεύσετε ένα θερμικά επεξεργασμένο προϊόν λύσης, επαναπωματίστε το σωληνάριο λύσης με ένα καθαρό πώμα (βλ. ενότητα **Λύση,** 4.5)
2. Για την αποθήκευση ενός εμπλουτισμένου δείγματος, επωάστε για τουλάχιστον 18 ώρες πριν από τη φύλαξη.
3. Αποθηκεύστε στους 4 έως 8 °C για έως 72 ώρες.
4. Προετοιμάστε ένα αποθηκευμένο δείγμα για ενίσχυση αναστρέφοντας 2–3 φορές για να αναμίξετε.
5. Αφαιρέστε το πώμα από τα σωληνάρια.
6. Τοποθετήστε τα σωληνάρια με το αναμεμιγμένο προϊόν λύσης στο Ένθετο θέρμανσης σωληναρίων θερμαντήρα μοριακής ανίχνευσης Neogen και θερμάνετε στους 100 ± 1 °C για 5 ± 1 λεπτά.
7. Αφαιρέστε το στατώ σωληναρίων Διαλύματος Λύσης Neogen από το ένθετο θέρμανσης και αφήστε το να κρυώσει στο Ένθετο ψύξης σωληναρίων μοριακής ανίχνευσης Neogen για τουλάχιστον 5 λεπτά και μέγιστο χρόνο 10 λεπτά.
8. Συνεχίστε με το πρωτόκολλο στην ενότητα **Ενίσχυση** που περιγράφεται λεπτομερώς παραπάνω.

Παραπομπές:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli.* November 2015.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 5.09. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. Effective Date: 15 January 2015.
3. ISO 16654:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.
7. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Neogen Food Safety.

Επεξήγηση συμβόλων

info.neogen.com/symbols

Το AOAC είναι σήμα κατατεθέν της AOAC INTERNATIONAL

Το Official Methods είναι καταχωρισμένο σήμα υπηρεσιών της AOAC INTERNATIONAL

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

NEOGEN®

Informacje dotyczące produktu

Test do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7)

Opis produktu i jego przeznaczenie

Test Neogen® do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) jest używany z systemem Neogen® do diagnostyki molekularnej do szybkiego i dokładnego wykrywania *E. coli* O157 (w tym H7) w próbkach żywności wzbogaconej i paszy.

Testy Neogen do diagnostyki molekularnej wykorzystują amplifikację izotermiczną za pośrednictwem pętli do szybkiej amplifikacji sekwencji kwasu nukleinowego z wysoką czułością i swoistością w połączeniu z bioluminescencją w celu wykrycia amplifikacji. Przypuszczalne wyniki dodatnie można otrzymać w czasie rzeczywistym, natomiast wyniki ujemne wyświetlają się po zakończeniu testu. Przypuszczalne wyniki dodatnie należy potwierdzić przy użyciu preferowanej metody lub zgodnie z przepisami prawa miejscowego[1, 2, 3].

Test Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) jest przeznaczony do stosowania w środowisku laboratoryjnym przez profesjonalistów przeszkolonych w zakresie praktyki laboratoryjnej. Firma Neogen nie udokumentowała zastosowania tego produktu w branży innej niż branża spożywcza. Na przykład firma Neogen nie udokumentowała tego produktu do testowania próbek środowiskowych, farmaceutycznych, kosmetycznych, klinicznych lub weterynaryjnych. Test Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) nie został oceniony w odniesieniu do wszystkich możliwych produktów spożywczych, procesów spożywczych, protokołów testowych ani wszystkich możliwych szczepów bakterii.

Podobnie jak w przypadku wszystkich metod testowych źródło, skład i jakość podłoża wzbogacającego mogą mieć wpływ na wyniki. Czynniki takie jak metody pobierania próbek, protokoły testów, przygotowanie próbki, obsługa i praktyka laboratoryjna mogą również wpływać na wyniki. Firma Neogen zaleca ocenę metody, łącznie z podłożem wzbogacającym, w środowisku użytkownika przy użyciu wystarczającej liczby próbek z określoną żywnością i z uwzględnieniem zagrożeń powodowanych przez mikroorganizmy, aby upewnić się, że metoda spełnia kryteria użytkownika.

Firma Neogen oceniła test Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) przy użyciu wody peptonowej buforowanej ISO.

Urządzenie Neogen® do diagnostyki molekularnej jest przeznaczone do pracy z próbkami poddanymi obróbce cieplnej podczas etapu lizy w teście, którego zadaniem jest zniszczenie organizmów obecnych w próbce. Próbki, które nie zostały poddane odpowiedniej obróbce cieplnej podczas etapu lizy w teście, można uznać za potencjalne zagrożenie biologiczne i NIE należy ich umieszczać w urządzeniu Neogen do diagnostyki molekularnej.

Firma Neogen Food Safety posiada certyfikat ISO (ang. International Organization for Standardization, Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) 9001 w zakresie projektowania i produkcji.

Zestaw testów Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) zawiera 96 testów opisanych w Tabeli 1.

Tabela 1. Elementy zestawu testów Neogen do diagnostyki molekularnej

Pozycja	Oznaczenie	Ilość	Zawartość opakowania	Komentarze
Roztwór do lizy Neogen®	Różowy roztwór w przezroczystych probówkach	96 (12 pasków po osiem probówek)	580 µl roztworu do lizy Neogen na probówkę	W statywie i gotowe do użycia
Próbki z odczynnikami testu Neogen® do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7)	Różowe probówki	96 (12 pasków po osiem probówek)	Liofilizowana mieszanka swoista do amplifikacji i wykrywania	Gotowe do użycia
Dodatkowe zatyczki	Różowe zatyczki	96 (12 pasków po osiem zatyczek)		Gotowe do użycia
Kontrola odczynnika Neogen®	Przezroczyste probówki typu flip-top	16 (dwa woreczki po osiem pojedynczych probówek)	Liofilizowany DNA kontrolny, mieszanina do amplifikacji i detekcji	Gotowe do użycia

Kontrola ujemna, niedołączona do zestawu, to jałowe podłoże wzbogacające, np. BPW ISO. Nie używaj wody jako Kontroli ujemnej.

Bezpieczeństwo

Przeczytaj ze zrozumieniem i przestrzegaj wszystkich informacji dotyczących bezpieczeństwa zawartych w instrukcjach dotyczących systemu Neogen do diagnostyki molekularnej i testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7). Zachowaj instrukcje bezpieczeństwa do wykorzystania w przyszłości.

⚠ **OSTRZEŻENIE:** Wskazuje na niebezpieczną sytuację, która w razie zaistnienia może skutkować zgonem, poważnymi obrażeniami ciała lub powstaniem szkód materialnych.

UWAGA: Wskazuje na potencjalnie niebezpieczną sytuację, która w razie zaistnienia może skutkować szkodami materialnymi.

⚠ OSTRZEŻENIE

Nie stosuj testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) w diagnostyce schorzeń u ludzi i zwierząt.

Przeszkól personel w zakresie aktualnych odpowiednich praktyk dotyczących badań: na przykład Dobre Praktyki Laboratoryjne, ISO/IEC 17025[4] lub ISO 7218[5].

Aby zmniejszyć ryzyko związane z wynikiem fałszywie ujemnym prowadzącym do wydania zanieczyszczonego produktu:

- Postępuj zgodnie z protokołem i wykonuj testy według informacji w instrukcji produktu.
- Używaj podłoża wstępnie podgrzanego do 41,5°C (±1). Nie dopuść do spadku temperatury podłoża poniżej zakresu inkubacji podczas przygotowywania próbki.
- Przechowuj test Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) zgodnie z informacją na opakowaniu i w instrukcji produktu.
- Nie używaj testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) po upływie daty ważności.
- Używaj testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) z próbkami środowiskowymi żywności, pasz i procesów spożywczych, które zostały zatwierdzone wewnętrznie lub przez osoby trzecie.
- Używaj testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) tylko z powierzchniami, środkami dezynfekującymi, protokołami i szczepami bakterii, które zostały zatwierdzone wewnętrznie lub przez osoby trzecie.
- W przypadku próbki środowiskowej zawierającej bufor neutralizujący (ang. Neutralizing Buffer, NB) z kompleksem sulfonianu arylu przed badaniem dokonaj rozcieńczenia 1:2 (1 część próbki na 1 część jałowego bulionu wzbogacającego). Inną opcją jest przeniesienie 10 µl wzbogaconego buforu neutralizującego do probówek z roztworem do lizy Neogen. Produkty Neogen® do obsługi próbek, w tym bufor neutralizujący Neogen® z kompleksem sulfonianu arylu: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XSLSSL10NB, HS10NB i HS119510NB.

Aby ograniczyć ryzyko związane z ekspozycją na chemikalia i zagrożenia biologiczne:

- Wykonuj badania na obecność patogenów w odpowiednio wyposażonym laboratorium pod kontrolą przeszkolonego personelu. Inkubowane podłoża wzbogacające oraz sprzęt lub powierzchnie, które miały kontakt z inkubowanymi podłożami wzbogacającymi, mogą zawierać patogeny w ilościach wystarczających, aby spowodować zagrożenie dla zdrowia ludzkiego.
- Zawsze przestrzegaj standardowych laboratoryjnych praktyk bezpieczeństwa – noś odpowiednią odzież ochronną i stosuj ochronę oczu podczas pracy z odczynnikami i zanieczyszczonymi próbkami.
- Po amplifikacji unikaj kontaktu z zawartością podłoża wzbogacającego i probówek z odczynnikiem.
- Wzbogacone próbki i powiązane z nimi skażone odpady należy utylizować zgodnie z obowiązującymi normami lokalnymi/regionalnymi/krajowymi/branżowymi.
- Nie przekraczaj zalecanego ustawienia temperatury na cieplarce.
- Nie przekraczaj zalecanego czasu nagrzewania.
- Użyj odpowiedniego, skalibrowanego termometru do sprawdzenia temperatury wkładu Neogen® bloku grzewczego urządzenia do diagnostyki molekularnej (np. termometru o zanurzeniu częściowym lub cyfrowego termometru termopary zamiast termometru o zanurzeniu całkowitym). Termometr umieść w wyznaczonym miejscu we wkładzie Neogen bloku grzewczego urządzenia do diagnostyki molekularnej.

Aby zmniejszyć ryzyko związane z zanieczyszczeniem krzyżowym podczas przygotowywania testu:

- Zawsze noś rękawiczki (w celu ochrony i zapobiegania przedostawaniu się nukleaz).

Aby zmniejszyć ryzyko związane z narażeniem na działanie gorących płynów:

- Nie przekraczaj zalecanego ustawienia temperatury na cieplarce.
- Nie przekraczaj zalecanego czasu nagrzewania.
- Użyj odpowiedniego, skalibrowanego termometru do sprawdzenia temperatury wkładu Neogen® bloku grzewczego urządzenia do diagnostyki molekularnej (np. termometru o zanurzeniu częściowym lub cyfrowego termometru termopary zamiast termometru o zanurzeniu całkowitym). Termometr umieść w wyznaczonym miejscu we wkładzie Neogen bloku grzewczego urządzenia do diagnostyki molekularnej.

UWAGA

Aby zmniejszyć ryzyko związane z zanieczyszczeniem krzyżowym podczas przygotowywania testu:

- Używaj jałowych końcówek pipet z barierą aerozolową (z filtrem) do zastosowań w biologii molekularnej.
- Używaj nowej końcówki pipety za każdym razem, gdy przenosisz próbkę.
- Aby przenieść próbkę ze wzbogacenia do probówki do lizy, postępuj zgodnie z Dobrą Praktyką Laboratoryjną. Aby uniknąć zanieczyszczenia pipetora, można wprowadzić pośredni etap przenoszenia. Na przykład można przenieść każdą wzbogaconą próbkę do jałowej probówki.
- Jeśli to możliwe, skorzystaj ze stacji roboczej przystosowanej do biologii molekularnej z lampą bakteriobójczą.

Aby zmniejszyć ryzyko związane z wynikiem fałszywie dodatnim:

- Nigdy nie otwieraj probówek po amplifikacji.
- Zawsze usuwaj zanieczyszczone probówki poprzez namoczenie ich w 1–5% (v:v w wodzie) roztworze domowego wybielacza przez godzinę i z dala od miejsca przygotowywania testu.

Dodatkowe informacje i przepisy prawa miejscowego dotyczące utylizacji znajdują się w karcie charakterystyki.

Jeśli masz pytania dotyczące konkretnych zastosowań lub czynności w ramach badania, odwiedź naszą stronę internetową www.neogen.com lub skontaktuj się z lokalnym przedstawicielem lub dystrybutorem firmy Neogen.

Obowiązki użytkownika

Użytkownicy muszą zapoznać się z instrukcjami i informacjami dotyczącymi produktu. Odwiedź naszą stronę internetową pod adresem **www.neogen.com** lub skontaktuj się z lokalnym przedstawicielem bądź dystrybutorem firmy Neogen, aby uzyskać więcej informacji.

Wybierając metodę testową, należy pamiętać, że takie czynniki zewnętrzne jak metody pobierania próbek, protokoły badań, przygotowanie próbek, obsługa i technika laboratoryjna mogą mieć wpływ na wyniki.

Przy wyborze jakiejkolwiek metody badawczej lub produktu obowiązkiem użytkownika jest ocena wystarczającej liczby próbek z odpowiednimi macierzami i z uwzględnieniem zagrożeń powodowanych przez mikroorganizmy, tak aby wybrana metoda testowa spełniała kryteria określone przez użytkownika.

Obowiązkiem użytkownika jest również sprawdzenie, czy wszelkie metody i wyniki testów spełniają wymagania klientów i dostawców.

Podobnie jak w przypadku każdej innej metody badawczej wyniki uzyskane przy użyciu dowolnego produktu Neogen Food Safety nie stanowią gwarancji jakości testowanych macierzy ani procesów.

Aby pomóc klientom ocenić metodę w przypadku różnych macierzy żywności, firma Neogen opracowała zestaw Kontroli macierzy Neogen® do diagnostyki molekularnej. W razie potrzeby użyj Kontroli macierzy, aby określić, czy macierz ma zdolność wpływania na wynik testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7). Zbadaj kilka próbek reprezentatywnych dla macierzy, tj. próbek uzyskanych z różnych źródeł podczas dowolnego okresu walidacji w przypadku przyjęcia metody firmy Neogen lub podczas badania nowych lub nieznanych macierzy lub macierzy, które przeszły zmiany pod względem surowca lub przeprowadzonych czynności.

Macierz można zdefiniować jako rodzaj produktu o swoistych właściwościach, takich jak skład i przeprowadzane czynności. Różnice pomiędzy macierzami mogą dotyczyć skutków spowodowanych różnicami w ich sposobach przetwarzania lub postaci dostarczania, np. produkt surowy i pasteryzowany; świeży i suszony itp.

Ograniczenie gwarancji / Ograniczone środki zaradcze

WYJĄTKIEM SĄ PRZYPADKI WYRAŹNIE OKREŚLONE W SEKCJI OGRANICZONEJ GWARANCJI DOTYCZĄCEJ OPAKOWAŃ JEDNOSTKOWYCH PRODUKTÓW. FIRMA NEOGEN ZRZEKA SIĘ WSZELKICH WYRAŹNYCH I DOROZUMIANYCH GWARANCJI, W TYM M.IN. WSZELKICH GWARANCJI WARTOŚCI HANDLOWEJ LUB PRZYDATNOŚCI DO OKREŚLONEGO ZASTOSOWANIA. Jeśli jakikolwiek produkt Neogen Food Safety jest wadliwy, firma Neogen lub jej autoryzowany dystrybutor według własnego uznania wymieni produkt lub zwróci cenę zakupu. Opisano tutaj wyłącznie środki zaradcze użytkownika. Niezwłocznie powiadom firmę Neogen w ciągu sześćdziesięciu dni od wykrycia wszelkich podejrzeń o wadach produktu i zwróć go firmie Neogen. W przypadku dalszych pytań prosimy o kontakt z przedstawicielem firmy Neogen lub autoryzowanym dystrybutorem firmy Neogen.

Ograniczenie odpowiedzialności firmy Neogen

FIRMA NEOGEN NIE BĘDZIE ODPOWIEDZIALNA ZA STRATY ANI SZKODY BEZPOŚREDNIE, POŚREDNIE, SPECJALNE, PRZYPADKOWE LUB WYNIKOWE, W TYM M.IN. UTRATĘ ZYSKÓW. W żadnym przypadku odpowiedzialność firmy Neogen na mocy jakichkolwiek przepisów prawnych nie przekroczy ceny zakupu produktu uznanego za wadliwy.

Przechowywanie i utylizacja

Przechowuj test Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) w temperaturze od 2 do 8°C. Nie zamrażaj. Przechowuj zestaw z dala od światła. Po otwarciu zestawu sprawdź, czy woreczek foliowy nie został uszkodzony. Jeżeli woreczek jest uszkodzony, nie używaj produktu. Po otwarciu niezużyte probówki z odczynnikami przechowuj zawsze w zamykanym woreczku ze środkiem osuszającym w środku, aby zachować stabilność liofilizowanych odczynników. Ponownie zamknięte woreczki przechowuj w temperaturze od 2 do 8°C nie dłużej niż 60 dni.

Nie stosuj testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) po upływie daty ważności. Data ważności i numer serii podano na zewnętrznej etykiecie pudełka. Po użyciu probówki z podłożem wzbogacającym i testem Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) mogą potencjalnie zawierać materiały patogenne. Po zakończeniu testów postępuj zgodnie z obowiązującymi normami branżowymi dotyczącymi utylizacji zanieczyszczonych odpadów. Dodatkowe informacje i przepisy prawa miejscowego dotyczące utylizacji znajdują się w karcie charakterystyki.

Instrukcja użytkowania

Postępuj zgodnie ze wszystkimi instrukcjami. Niezastosowanie się do wytycznych może skutkować niedokładnymi wynikami.

Użytkownik powinien ukończyć szkolenie kwalifikacyjne dla operatora systemu Neogen do diagnostyki molekularnej zgodnie z opisem w dokumencie „Protokoły i instrukcje dotyczące kwalifikacji do instalacji/obsługi systemu Neogen do diagnostyki molekularnej”[7].

Okresowo odkażaj stoły laboratoryjne i sprzęt (pipety, narzędzia do zakładania/zdejmowania zatyczek itp.) za pomocą 1–5% (v:v w wodzie) roztworu domowego wybielacza lub roztworu do usuwania DNA.

Aby zapoznać się ze szczegółowymi wymaganiami, patrz sekcja „Szczegółowe instrukcje dotyczące zweryfikowanych metod”:

W Tabeli 3 przedstawiono protokoły wzbogacania zgodnie z oficjalną metodą analizy AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2017.01

W Tabeli 4 zawarto protokoły wzbogacania zgodnie z certyfikatem walidacyjnym NF 3M 01/18-05/17

Wzbogacanie próbek

W Tabelach 2, 3 oraz 4 zawarto wytyczne dotyczące protokołów wzbogacania żywności. Użytkownik odpowiada za weryfikację alternatywnych protokołów pobierania próbek lub współczynników rozcieńczeń, aby upewnić się, że dana metoda testowa spełnia kryteria użytkownika.

Żywność

1. Podgrzej wstępnie podłoże wzbogacające BPW ISO do temperatury 41,5°C (±1).
2. Połącz podłoże wzbogacające i próbkę techniką aseptyczną zgodnie z Tabelami 2, 3 lub 4. W przypadku wszystkich próbek mięsa i próbek o dużej zawartości cząstek stałych zaleca się stosowanie worków filtracyjnych.
3. Dokonaj homogenizacji wszystkich macierzy z wyjątkiem produktów liściastych i owoców, dokładnie blendując, mieszając w stomacherze lub mieszając ręcznie przez 2 minuty (±0,2). Pozostaw do inkubacji w temperaturze 41,5°C (±1) przez odpowiedni czas zgodnie z Tabelami 2, 3 lub 4.

Tabela 2. Ogólne protokoły wzbogacania

Przykładowa macierz[a]	Rozmiar próbki	Objętość bulionu wzbogacającego (ml)	Temperatura wzbogacania (±1°C)	Czas wzbogacania (godziny)
Surowa wołowina, w tym mielona/siekana	325 g	975 BPW ISO (wstępnie ogrzany)	41,5	10-18
Surowe mięso, w tym surowa wołowina, wieprzowina, drób, jagnięcina i mięso z bizona	25 g	225 BPW ISO (wstępnie ogrzany)	41,5	8-18
Produkty liściaste[b]	200 g	450 BPW ISO (wstępnie ogrzany)	41,5	18-24
Inne produkty spożywcze, w tym owoce[b], warzywa, soki owocowe/warzywne, świeże zioła, surowe owoce morza, surowe jaja, mleko surowe, ciasto na ciasteczka i przetwory mięsne	25 g	225 BPW ISO (wstępnie ogrzany)	41,5	18-24
Orzechy włoskie lub mieszanki orzechów zawierające orzechy włoskie (protokół ten jest odpowiedni w przypadku innych orzechów, w tym orzesznika jadalnego, migdałów, pistacji, orzechów nerkowca i kasztanów)	25 g	225 odtworzone odtłuszczone mleko w proszku	41,5	18-24

(a) Zamrożone próbki należy doprowadzić do temperatury 4–8°C przed dodaniem do bulionu wzbogacającego.

(b) Próbki produktów liściastych i owoców należy delikatnie wstrząsnąć ręcznie przez pięć minut. Nie blenduj ani nie mieszaj w stomacherze.

Szczegółowe instrukcje dotyczące zweryfikowanych metod

Oficjalne metody analizy AOAC® *Official Methods of Analysis*℠ 2017.01

W programie AOAC *Official Method of Analysis*℠ test Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) uznano za skuteczną metodę do diagnostyki *E. coli* O157:H7. Testowane w badaniu macierze przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Protokoły wzbogacania przy użyciu wstępnie ogrzanego podłoża BPW ISO w temperaturze 41,5°C (±1) zgodnie z oficjalnymi metodami AOAC® *Official Methods*℠ 2017.01

Przykładowa macierz	Rozmiar próbki	Objętość bulionu wzbogacającego (ml)	Czas wzbogacania (godziny)	Sposób homogenizacji
Surowa mielona wołowina (73% chudego mięsa)	325 g	975	10-18	Ręcznie lub w stomacherze
Surowy szpinak w workach[a]	200 g	450	18-24	Delikatnie wstrząsano ręcznie przez pięć minut, nie homogenizować
Świeże kiełki	25 g	225	18-24	Delikatnie wstrząsano ręcznie przez pięć minut, nie homogenizować
Mrożone jagody[a][b]	25 g	225	18-24	Delikatnie wstrząsano ręcznie przez pięć minut, nie homogenizować

(a) Próbki produktów liściastych i owoców należy delikatnie wstrząsnąć ręcznie przez pięć minut. Nie blenduj ani nie mieszaj w stomacherze.

(b) Zamrożone próbki należy doprowadzić do temperatury 4–8°C przed dodaniem do bulionu wzbogacającego.

Certyfikat walidacyjny NF zgodnie z certyfikatem AFNOR

3M 01/18-05/17

ALTERNATYWNE METODY ANALITYCZNE DLA AGROBIZNESU

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

Więcej informacji na temat końca ważności można znaleźć w certyfikacie walidacyjnym NF VALIDATION dostępnym na wyżej wymienionej stronie internetowej.

Certyfikat walidacyjny NF VALIDATION zgodny z normą ISO 16140-2[8] w porównaniu z normą ISO 16654[3]

Zakres walidacji: Surowe mięso wołowe, surowe produkty mleczne, surowe owoce i warzywa

Przygotowanie próbek: Próbki przygotuj zgodnie z normami EN ISO 16654 i EN ISO 6887[6]

Wersja oprogramowania: Patrz certyfikat

Tabela 4. Protokoły wzbogacania przy użyciu wstępnie podgrzanego podłoża BPW ISO w temperaturze 41,5°C (±1) zgodnie z certyfikatem walidacyjnym NF VALIDATION 3M 01/18-05/17

Protokół	Rozmiar próbki	Objętość bulionu wzbogacającego (ml)	Temperatura wzbogacania (±1°C)	Czas wzbogacania (godziny)
Surowe produkty mleczne, surowe owoce i surowe warzywa	25 g	225	41,5	18-24
Surowe mięso wołowe	25 g	225	41,5	8-24

UWAGI:

- W badaniu z certyfikatem walidacyjnym NF VALIDATION nie brano pod uwagę próbek większych niż 25 g.
- Zalecane punkty przerwania protokołu to moment po wzbogaceniu lub lizie próbki. Bulion wzbogacający lub lizat próbki można przechowywać w temperaturze od 2 do 8°C przez maksymalnie 72 godziny. Po wyjęciu bulionu wzbogacającego z miejsca przechowywania wznów testowanie od kroku 1 w sekcji **Liza**. Po wyjęciu lizatu próbki z miejsca przechowywania wznów badanie od kroku 7 w sekcji **Liza**. Lizat można także przechowywać w temperaturze -20°C.
- Krótkie protokoły wzbogacania są wrażliwe na warunki inkubacji i należy przy nich przestrzegać temperatur określonych w protokole. Sprawdź temperaturę łaźni wodnej lub inkubatora, gdzie wstępnie podgrzewa się buliony, aby upewnić się, że bulion wzbogacający osiągnął wymaganą temperaturę. Całkowity czas przygotowania próbki, włączając opóźnienie między zakończeniem etapu wstępnego podgrzewania podłoża a początkiem inkubacji próbki żywności, nie może przekraczać 45 minut. Podczas inkubacji zaleca się stosowanie wentylowanego inkubatora.

Przygotowanie tacy Neogen® do szybkiego ładowania urządzenia do diagnostyki molekularnej

1. Zwilż szmatkę lub jednorazowy ręcznik roztworem domowego wybielacza o stężeniu 1–5% (v:v w wodzie) i wytrzyj tacę Neogen do szybkiego ładowania urządzenia do diagnostyki molekularnej.
2. Opłucz wodą tacę Neogen do szybkiego ładowania urządzenia do diagnostyki molekularnej.
3. Użyj jednorazowego ręcznika, aby wytrzeć do sucha tacę Neogen do szybkiego ładowania urządzenia do diagnostyki molekularnej.
4. Przed użyciem upewnij się, że taca Neogen do szybkiego ładowania urządzenia do diagnostyki molekularnej jest sucha.

Przygotowanie wkładu Neogen® bloku chłodzącego urządzenia do diagnostyki molekularnej

Umieść wkład Neogen bloku chłodzącego urządzenia do diagnostyki molekularnej bezpośrednio na stole laboratoryjnym: Taca Neogen bloku chłodzącego urządzenia do diagnostyki molekularnej nie jest w użyciu. Blok należy stosować w temperaturze otoczenia w laboratorium (20–25°C).

Przygotowanie wkładu Neogen® bloku grzewczego urządzenia do diagnostyki molekularnej

Umieścić wkład Neogen bloku grzewczego urządzenia do diagnostyki molekularnej w suchej jednostce podwójnego bloku grzewczego. Włącz jednostkę suchego bloku grzewczego i ustaw temperaturę, aby wkład Neogen bloku grzewczego urządzenia do diagnostyki molekularnej osiągnął i utrzymał temperaturę 100°C (±1).

UWAGA: W zależności od jednostki grzewczej należy odczekać około 30 minut, aż wkład Neogen bloku grzewczego urządzenia do diagnostyki molekularnej osiągnie daną temperaturę. Za pomocą odpowiedniego, skalibrowanego termometru (np. termometru o zanurzeniu częściowym, cyfrowego termometru termopary zamiast termometru o zanurzeniu całkowitym) umieszczonego w wyznaczonym miejscu sprawdź, czy wkład Neogen bloku grzewczego urządzenia do diagnostyki molekularnej ma temperaturę 100°C (±1).

Przygotowanie urządzenia Neogen® do diagnostyki molekularnej

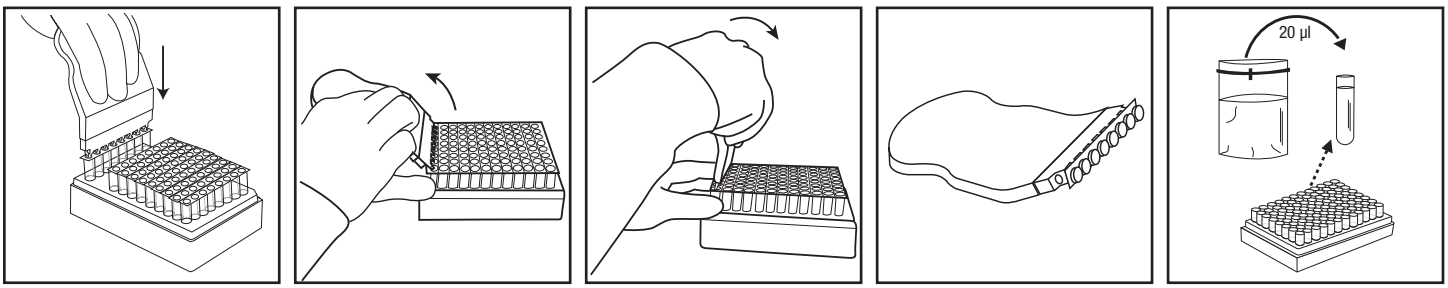
1. Uruchom oprogramowanie Neogen® do diagnostyki molekularnej i zaloguj się. Skontaktuj się z przedstawicielem firmy Neogen Food Safety, aby upewnić się, że posiadasz najnowszą wersję oprogramowania.
2. Włącz urządzenie Neogen do diagnostyki molekularnej.
3. Utwórz lub edytuj badanie z danymi dla każdej próbki. Szczegółowe informacje można znaleźć w instrukcji obsługi systemu Neogen® do diagnostyki molekularnej.

UWAGA: Urządzenie Neogen do diagnostyki molekularnej musi osiągnąć i utrzymać temperaturę 60°C przed włożeniem tacy Neogen do szybkiego ładowania z probówkami z odczynnikami. Etap nagrzewania trwa około 20 minut i jest sygnalizowany POMARAŃCZOWĄ kontrolką na pasku stanu urządzenia. Gdy urządzenie będzie gotowe do rozpoczęcia badania, pasek stanu zmieni kolor na ZIELONY.

Liza

1. Poczekaj, aż probówki z roztworem do lizy Neogen ogrzeją się, ustawiając statyw w temperaturze pokojowej (20–25°C) na noc (16–18 godzin). Alternatywne metody doprowadzenia temperatury probówek z roztworem do lizy Neogen do temperatury pokojowej polegają na umieszczeniu probówek z roztworem do lizy Neogen na stole laboratoryjnym na co najmniej dwie godziny, inkubowaniu probówek z roztworem do lizy Neogen w inkubatorze o temperaturze 37°C (±1) przez godzinę lub umieszczeniu ich w suchym podwójnym bloku grzewczym przez 30 sekund w temperaturze 100°C.
2. Odwróć zatkane probówki w celu wymieszania. Przejdź do następnego kroku w ciągu czterech godzin.
3. Wyjmij bulion wzbogacający z inkubatora.
4. Na każdą próbkę i próbkę Kontroli ujemnej (jałowe podłoże wzbogacające) wymagana jest jedna probówka z roztworem do lizy Neogen.
   - 4.1 Paski probówek z roztworem do lizy Neogenu można przyciąć, aby uzyskać pożądaną liczbę probówek z roztworem do lizy Neogenu. Wybierz liczbę potrzebnych pojedynczych probówek z roztworem do lizy Neogen lub pasek z ośmioma probówkami. Umieść probówki z roztworem do lizy Neogen na pustym statywie.
   - 4.2 Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, otwieraj po jednym pasku probówek roztworu do lizy Neogen i przy każdym etapie przenoszenia używaj nowej końcówki pipety.
   - 4.3 Przenieść wzbogaconą próbkę do probówek z roztworem do lizy Neogen w sposób opisany poniżej:

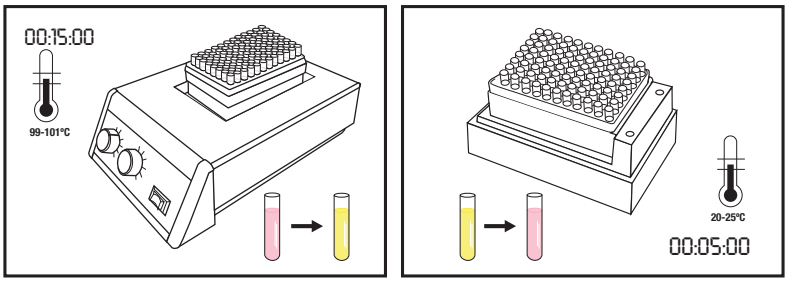
     Przenieś **najpierw** każdą wzbogaconą próbkę do osobnej probówki z roztworem do lizy Neogen. **Na koniec** przenieś próbkę Kontroli ujemnej.
   - 4.4 Użyj narzędzia Neogen® do zakładania/zdejmowania zatyczek probówek do diagnostyki molekularnej – liza, aby ściągnąć zatyczki z paska z probówkami z roztworem do lizy Neogen – jeden pasek naraz.
   - 4.5 Wyrzuć zatyczkę probówki z roztworem do lizy Neogen – jeżeli zostanie trochę lizatu do ponownego testu, umieść zatyczki w czystym pojemniku w celu ponownego zastosowania po lizie.
     - 4.5.1 Informacje na temat przetwarzania lizatu, który pozostał, znajdują się w Załączniku A.
   - 4.6 Przenieść 20 µl próbki do probówki z roztworem do lizy Neogen, chyba że w Tabelach protokołu 2, 3 i 4 wskazano inaczej.



5. Powtarzaj krok 4.3, aż każda pojedyncza próbka zostanie dodana do odpowiedniej probówki z roztworem do lizy Neogen w pasku.
6. W razie potrzeby powtórz kroki od 4.1 do 4.6 w zależności od liczby próbek do zbadania.
7. Po przeniesieniu wszystkich próbek przenieś 20 µl próbki Kontroli ujemnej (jałowego podłoża wzbogacającego, np. BPW ISO) do probówki z roztworem do lizy Neogen. Nie używaj wody jako Kontroli ujemnej.
8. Sprawdź, czy temperatura wkładu Neogen bloku grzewczego urządzenia do diagnostyki molekularnej wynosi 100°C (±1).
9. Umieścić odkryty statyw z probówkami z roztworem do lizy Neogen we wkładzie Neogen bloku grzewczego urządzenia do diagnostyki molekularnej i podgrzewaj przez 15 minut (±1). Podczas ogrzewania roztwór do lizy Neogen zmieni kolor z różowego (chłodny) na żółty (gorący).

   Próbki, które nie zostały poddane odpowiedniej obróbce cieplnej podczas etapu lizy w teście, można uznać za potencjalne zagrożenie biologiczne i NIE należy ich umieszczać w urządzeniu Neogen do diagnostyki molekularnej.

10. Wyjmij odsłonięty statyw z probówkami z roztworem do lizy Neogen z bloku grzewczego i pozostaw do ostygnięcia we wkładzie Neogen bloku chłodzącego urządzenia do diagnostyki molekularnej przez co najmniej pięć minut i maksymalnie 10 minut. Wkład Neogen bloku chłodzącego urządzenia do diagnostyki molekularnej używany w temperaturze otoczenia bez tacy Neogen do bloku chłodzącego urządzenia do diagnostyki molekularnej powinien znajdować się bezpośrednio na stole laboratoryjnym. Po ochłodzeniu roztwór do lizy przybierze z powrotem różowy kolor.
11. Wyjmij statyw z probówkami z roztworem do lizy Neogen z wkładu Neogen bloku chłodzącego urządzenia do diagnostyki molekularnej.

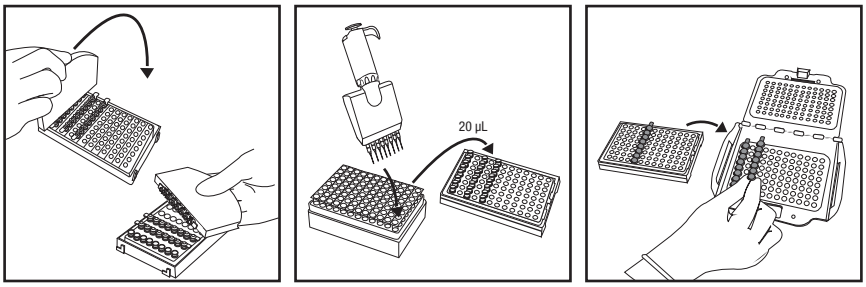


Amplifikacja

1. Jedna probówka z odczynnikiem testu Neogenu do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) jest wymagana do każdej próbki i próbki Kontroli ujemnej.
   1.1 Paski z probówkami można przyciąć, aby uzyskać pożądaną liczbę probówek. Wybierz liczbę probówek z odczynnikiem pojedynczych testów Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) lub pasek z ośmioma probówkami.
   1.2 Umieść probówki z odczynnikiem testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 - *E. coli* O157 (w tym H7) na pustym statywie.
   1.3 Unikaj usuwania granulek odczynnika z dna probówek.
2. Wybierz jedną probówkę z Kontrolą odczynnika Neogen i umieść ją na stojaku.
3. Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, usuwaj po jednej zatyczce probówki z odczynnikiem na pasku testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) i używaj nowej końcówki pipety przy każdym etapie przenoszenia.
4. Przenieś lizat do probówki z odczynnikiem i probówki z Kontrolą odczynnika Neogen testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7), jak opisano poniżej:

Przenieś każdą próbkę lizatu do poszczególnych probówek z odczynnikiem testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7), a następnie próbkę Kontroli ujemnej. **Na koniec** dodaj wodę do probówki z Kontrolą odczynnika Neogen.

5. Użyj narzędzia Neogen® do zakładania/zdejmowania zatyczek probówek do diagnostyki molekularnej – odczynnik, aby otworzyć probówkę z odczynnikiem testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) – jeden pasek naraz. Wyrzuć zatyczkę.
   5.1 Przenieś 20 µl lizatu próbki z górnej połowy cieczy (unikaj wytrącania się) w probówce z roztworem do lizy Neogen do odpowiedniej probówki z odczynnikiem testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7). **Dozuj pod kątem, aby zapobiec przemieszczaniu się granulek. Mieszaj delikatnie, pipetując pięć razy w górę i w dół.**
   5.2 Powtarzaj krok 5.1, aż dodasz lizat pojedynczej próbki do odpowiedniej probówki z odczynnikiem testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) na pasku.
   5.3 Zamknij próbki z odczynnikiem testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) dodatkowymi zatyczkami i użyj zaokrąglonej strony narzędzia Neogen do zakładania/zdejmowania zatyczek probówek do diagnostyki molekularnej – odczynnik, aby wywrzeć ciśnienie za pomocą ruchu tam i z powrotem, upewniając się, że zatyczka jest szczelnie założona.
   5.4 W razie potrzeby powtórz kroki od 5.1 do 5.3 w zależności od liczby próbek do zbadania.
   5.5 Po przeniesieniu wszystkich lizatów próbek powtórz kroki od 5.1 do 5.3, aby przenieść 20 µl lizatu Kontroli ujemnej do próbek z odczynnikiem testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7).
   5.6 Przenieś **20 µl <u>lizatu Kontroli ujemnej</u> do probówki Kontroli odczynnika Neogen.** Dozuj pod kątem, aby zapobiec przemieszczaniu się granulek. Mieszaj, delikatnie pipetując pięć razy w górę i w dół.
6. Załaduj zamknięte zatyczkami probówki do czystej i odkażonej tacy Neogen do szybkiego ładowania urządzenia do diagnostyki molekularnej. Następnie zamknij i zatrzaśnij pokrywę.



7. Przejrzyj i potwierdź skonfigurowane badanie w oprogramowaniu Neogen do diagnostyki molekularnej.
8. Kliknij przycisk Start w oprogramowaniu i wybierz urządzenie, którego chcesz użyć. Pokrywa wybranego urządzenia otwiera się automatycznie.
9. Umieść tacę Neogen do szybkiego ładowania urządzenia do diagnostyki molekularnej w urządzeniu Neogen do diagnostyki molekularnej i zamknij pokrywę, aby rozpocząć test. Wyniki są dostępne w ciągu 60 minut, chociaż wynik dodatni można wykryć wcześniej.
10. Po zakończeniu testu wyjmij tacę Neogen do szybkiego ładowania urządzenia do diagnostyki molekularnej z urządzenia Neogen do diagnostyki molekularnej i zutylizuj probówki poprzez zanurzenie w 1–5% (v:v w wodzie) roztworze domowego wybielacza na godzinę z dala od miejsca przygotowania testu.

UWAGA: Aby zminimalizować ryzyko uzyskania fałszywie dodatnich wyników spowodowanych zanieczyszczeniem krzyżowym, nigdy nie otwieraj probówek z odczynnikami zawierających amplifikowane DNA. Obejmuje to Kontrolę odczynnika Neogen, probówkę z odczynnikiem testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) i probówki Kontroli macierzy Neogen. Zawsze utylizuj zamknięte probówki z odczynnikami, zanurzając je w 1–5% (v:v w wodzie) roztworze domowego wybielacza na godzinę z dala od miejsca przygotowywania testu.

Wyniki i interpretacja

Algorytm interpretuje krzywą strumienia świetlnego wynikającą z detekcji amplifikacji kwasu nukleinowego. Wyniki są automatycznie analizowane przez oprogramowanie i na ich podstawie oznaczone kolorami. Dodatni lub ujemny wynik jest określany poprzez analizę szeregu różnych parametrów krzywej. Przypuszczalne wyniki dodatnie można otrzymać w czasie rzeczywistym, natomiast wyniki Ujemne i Do sprawdzenia zostaną wyświetlone po zakończeniu badania.

Próbki przypuszczalnie dodatnie należy potwierdzić zgodnie ze standardowymi czynnościami procedur obsługi laboratorium lub postępując zgodnie z odpowiednią metodą referencyjną[1,2,3], rozpoczynając od przeniesienia z pierwotnego bulionu wzbogacającego BPW ISO do bulionów wtórnych wzbogacających a następnie posiewu i potwierdzenia izolatów przy użyciu odpowiednich metod biochemicznych i serologicznych.

UWAGA: Nawet ujemna próbka nie zapewni odczytu zerowego, ponieważ system i odczynniki do amplifikacji testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) mają odczyt względnej jednostki światła tła (RLU).

W rzadkich przypadkach nietypowego strumienia świetlnego algorytm wyświetli wynik Do sprawdzenia. Firma Neogen zaleca użytkownikowi powtórzenie testu w przypadku wszystkich próbek z takim wynikiem. Jeśli wynik nadal będzie mieć status Do sprawdzenia, przejdź do testu potwierdzającego, stosując metodę preferowaną lub zgodną z przepisami prawa miejscowego.

W przypadku rozbieżnych wyników (przypuszczalnie dodatni wynik testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) niepotwierdzony jednym ze sposobów opisanych powyżej, a w szczególności testem aglutynacji lateksowej) laboratorium musi podjąć niezbędne kroki, aby zadbać o ważność uzyskanych wyników.

Potwierdzenie wyników zgodnie z certyfikowaną metodą NF VALIDATION

W kontekście certyfikatu walidacyjnego NF VALIDATION wszystkie próbki zidentyfikowane jako dodatnie w teście Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) należy potwierdzić jednym z następujących testów:

Opcja 1: Użycie standardu ISO 16654[3] rozpoczynającego się od wzbogacenia wodą[3] peptonową buforową.

Opcja 2: Wdrożenie metody potwierdzania składającej się z następujących elementów: Rozprowadź 50 µl wzbogaconej wody[3] peptonowej buforowanej na płytce Cefixime Potassium Tellurite Sorbitol MacConkey (CT-SMAC)[3]. Inkubuj przez 24 godziny (±3) w temperaturze 37°C. Rozprowadź charakterystyczne kolonie na agarze odżywczym i wykonaj test aglutynacji lateksowej bezpośrednio na izolowanych koloniach. Jeśli wyniki testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7) nie zostały potwierdzone, wykonaj etap separacji immunomagnetycznej, a następnie rozprowadź 50 µl na płytce CT-SMAC.

Opcja 3: Stosowanie sond kwasów nukleinowych opisanych w standardzie EN ISO 7218[5], które zostały przeprowadzone na izolowanych koloniach (oczyszczonych lub nieoczyszczonych) na płytce CT-SMAC (patrz Opcje 1 lub 2). Sondy kwasów nukleinowych muszą różnić się od tych stosowanych w teście Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7).

Opcja 4: Zastosowanie dowolnej innej metody zgodnej z certyfikatem walidacyjnym NF VALIDATION, której zasada musi różnić się od metody testu Neogen do diagnostyki molekularnej 2 – *E. coli* O157 (w tym H7). Należy zastosować pełny protokół opisany w przypadku drugiej zatwierdzonej metody. Wszystkie kroki poprzedzające rozpoczęcie potwierdzania muszą być wspólne dla obu metod.

W przypadku rozbieżnych wyników (przypuszczalnie dodatni wynik metodą alternatywną niepotwierdzony jedną z metod opisanych powyżej) laboratorium musi podjąć niezbędne kroki, aby zadbać o ważność uzyskanego wyniku.

Jeśli masz pytania dotyczące konkretnych zastosowań lub czynności w ramach badania, odwiedź naszą stronę internetową www.neogen.com lub skontaktuj się z lokalnym przedstawicielem lub dystrybutorem firmy Neogen.

Załącznik A. Przerwanie protokołu: Przechowywanie i ponowne badanie próbek

1. Aby przechowywać lizat poddany obróbce cieplnej, należy ponownie zamknąć probówkę do lizy czystą zatyczką (patrz sekcja **Liza**, 4.5)
2. Aby przechowywać wzbogaconą próbkę, należy ją inkubować przez co najmniej 18 godzin przed przechowywaniem.
3. Przechowuj w temperaturze od 4 do 8°C przez maksymalnie 72 godziny.
4. Przygotuj przechowywaną próbkę do amplifikacji, odwracając ją 2–3 razy w celu wymieszania.
5. Otwórz probówki.

6. Umieścić probówki z mieszanym lizatem na wkładzie Neogen bloku grzewczego urządzenia do diagnostyki molekularnej i ogrzewaj w temperaturze 100°C (±1) przez 5 minut (±1).
7. Wyjmij statyw z probówkami z roztworem do lizy Neogen z bloku grzewczego i pozostaw do ostygnięcia we wkładzie Neogen bloku chłodzącego urządzenia do diagnostyki molekularnej przez co najmniej pięć minut i maksymalnie 10 minut.
8. Postępuj dalej zgodnie z protokołem w sekcji **Amplifikacja** powyżej.

Dane referencyjne:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. November 2015.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 5.09. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. Effective Date: 15 January 2015.
3. ISO 16654:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.
7. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Neogen Food Safety.

Objaśnienie symboli

info.neogen.com/symbols

AOAC jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy AOAC INTERNATIONAL

Oficjalne metody są zastrzeżonym znakiem usługowym firmy AOAC INTERNATIONAL

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

Дата выпуска: 2024-01

NEOGEN®

Инструкции по использованию продукта

Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)

Описание и предназначение продукта

Анализ Neogen® «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» используется с системой молекулярного обнаружения Neogen® для быстрого и специфического обнаружения *E. coli* O157 (включая H7) в обогащенных пробах пищи и кормов.

В анализах Neogen «Молекулярная диагностика» используется петлевая изотермическая амплификация, позволяющая быстро амплифицировать последовательности нуклеиновых кислот с высокими специфичностью и чувствительностью и сочетающаяся с биолюминесценцией для обнаружения амплификации. Предварительно положительные результаты сообщаются в реальном времени, в то время как отрицательные результаты отображаются после завершения анализа. Предварительно положительные результаты нужно подтверждать с помощью предпочитаемого вами метода или в соответствии с требованиями местных постановлений [1, 2, 3].

Анализ Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» предназначен для использования в лабораторной среде специалистами, обученными применению лабораторных методов. Компания Neogen не задокументировала использование этого продукта в других отраслях, кроме производства продуктов питания или напитков. Например, компания Neogen не задокументировала этот продукт для тестирования проб внешней среды и фармацевтических, косметических, клинических или ветеринарных проб. Анализ Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» исследовался не со всеми возможными пищевыми продуктами и процессами, протоколами тестирования или штаммами бактерий.

Как и в случае со всеми методами тестирования, на результаты могут влиять источник, состав и качество обогатительной среды. На результаты также могут влиять такие факторы, как методы отбора проб, протоколы тестирования, подготовка проб, обращение с ними и лабораторный метод. Чтобы убедиться в соответствии метода критериям пользователя, Neogen рекомендует исследовать метод, включая обогатительную среду, в рабочих условиях пользователя на основании достаточного количества проб с конкретными пищевыми продуктами и микробными нагрузками.

Компания Neogen исследовала свой анализ «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» с буферной пептонной водой (ISO).

Прибор молекулярного обнаружения Neogen® предназначен для использования с пробами, которые прошли термическую обработку на этапе лизиса для уничтожения присутствующих в них микроорганизмов. Пробы, не прошедшие надлежащую термическую обработку на этапе лизиса, могут считаться потенциальной биологической опасностью, и их НЕЛЬЗЯ помещать в прибор молекулярного обнаружения Neogen.

Компания Neogen Food Safety прошла сертификацию на соответствие стандарту ISO (International Organization for Standardization, Международная организация по стандартизации) 9001 в отношении проектирования и производства.

Тестовый комплект анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» содержит 96 тестов, описанных в таблице 1.

Таблица 1. Компоненты комплекта анализа Neogen «Молекулярная диагностика»

Компонент	Отличительные особенности	Количество	Содержание	Комментарии
Раствор Neogen® для лизиса (Lysis Solution, LS)	Розовый раствор в прозрачных пробирках	96 (12 полосок с 8 пробирками)	580 мкл раствора Neogen для лизиса в каждой пробирке	Пробирки помещены в штатив и готовы к исполь зованию
Пробирки с реагентами для анализа Neogen® «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)»	Розовые пробирки	96 (12 полосок с 8 пробирками)	Лиофилизированная смесь для специфических амплификации и обнаружения	Готовы к использованию
Дополнительные колпачки	Розовые колпачки	96 (12 полосок с 8 колпачками)		Готовы к использованию
Контроль реагентов Neogen® (Reagent Control, RC)	Прозрачные пробирки с откидной крышкой	16 (2 пакета с 8 отдельными пробирками)	Лиофилизированная смесь с контрольной ДНК для амплификации и обнаружения	Готовы к использованию

Отрицательный контроль, не входящий в комплект, — стерильная обогатительная среда, например буферная пептонная вода (ISO). Не используйте в качестве отрицательного контроля воду.

Безопасность

Пользователь должен прочитать, понять и выполнять все указания по безопасности в инструкциях по применению системы молекулярного обнаружения Neogen и анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)». Сохраните инструкции по безопасности для дальнейшего использования.

⚠ **ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ.** Указывает на опасную ситуацию, которая, если ее не избежать, может привести к смерти или серьезной травме и (либо) повреждению имущества.

ПРИМЕЧАНИЕ. Указывает на потенциально опасную ситуацию, которая, если ее не избежать, может привести к повреждению имущества.

⚠ ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ

Не используйте анализ Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» для диагностики состояний у людей или животных.

Пользователь должен обучать свой персонал надлежащим методам тестирования, например надлежащей лабораторной практике, стандарту ISO/IEC 17025[4] или ISO 7218[5].

Для снижения рисков, которые связаны с ложноотрицательным результатом, приводящим к выпуску зараженного продукта, соблюдайте указанные ниже инструкции.

- Следуйте протоколу и выполняйте тесты в точном соответствии с инструкциями по использованию продукта.
- Используйте среду, предварительно нагретую до 41,5 ± 1 °C. Во время подготовки проб не допускайте падения температуры среды ниже диапазона инкубационных температур.
- Храните анализ Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)», как указано на упаковке и в инструкциях по использованию продукта.
- Всегда используйте анализ Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» до даты истечения срока годности.
- Используйте анализ Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» с пробами пищи, кормов и внешней среды при производстве пищевых продуктов, подтвержденными во внутреннем порядке или третьим лицом.
- Используйте анализ Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» только с поверхностями, дезинфицирующими средствами, протоколами и штаммами бактерий, подтвержденными во внутреннем порядке или третьим лицом.
- Пробу внешней среды, содержащей нейтрализующий буфер (Neutralizing Buffer, NB) с комплексом арилсульфоната, перед тестированием разведите в соотношении 1:2 (1 часть пробы, 1 часть стерильного обогатительного бульона). Другой вариант — перенести 10 мкл обогатительной среды с нейтрализующим буфером в пробирки с раствором Neogen для лизиса. Продукты Neogen® для обращения с пробами, содержащие нейтрализующий буфер Neogen® с комплексом арилсульфоната: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XSLSSL10NB, HS10NB и HS119510NB.

Для снижения рисков, связанных с воздействием химических веществ и биологических опасностей, соблюдайте указанные ниже инструкции.

- Выполняйте тестирование на патогены в надлежащим образом оборудованной лаборатории под контролем обученного персонала. Инкубированные обогатительные среды и оборудование или поверхности, контактировавшие с такими средами, могут содержать патогены в количествах, достаточных для того, чтобы представлять опасность для здоровья человека.
- При обращении с реагентами и зараженными пробами всегда соблюдайте стандартные лабораторные правила техники безопасности, включая ношение соответствующей защитной одежды и средств защиты глаз.
- Избегайте контакта с содержимым обогатительных сред и пробирок с реагентами после амплификации.
- Утилизируйте обогащенные пробы и оставшиеся от них зараженные отходы в соответствии с местными, региональными, национальными и отраслевыми стандартами.
- Не превышайте рекомендуемое значение температуры на нагревателе.
- Не превышайте рекомендуемое время нагревания.
- Для проверки температуры вставного нагревательного блока системы молекулярного обнаружения Neogen® используйте подходящий откалиброванный термометр (например, термометр частичного погружения или цифровой термометр с термопарой, но не термометр полного погружения). Термометр нужно помещать в обозначенное место вставного нагревательного блока системы молекулярного обнаружения Neogen.

Для снижения рисков, связанных с перекрестным заражением при подготовке анализа, соблюдайте указанные ниже инструкции.

- Всегда носите перчатки (для защиты пользователя и предотвращения внесения нуклеаз).

Для снижения рисков, связанных с воздействием горячих жидкостей, соблюдайте указанные ниже инструкции.

- Не превышайте рекомендуемое значение температуры на нагревателе.
- Не превышайте рекомендуемое время нагревания.
- Для проверки температуры вставного нагревательного блока системы молекулярного обнаружения Neogen® используйте подходящий откалиброванный термометр (например, термометр частичного погружения или цифровой термометр с термопарой, но не термометр полного погружения). Термометр нужно помещать в обозначенное место вставного нагревательного блока системы молекулярного обнаружения Neogen.

ПРИМЕЧАНИЕ

Для снижения рисков, связанных с перекрестным заражением при подготовке анализа, соблюдайте указанные ниже инструкции.

- Рекомендуется использовать стерильные наконечники пипеток с аэрозольным барьером (фильтром) для применения в молекулярной биологии.
- Для каждого переноса пробы используйте новый наконечник пипетки.
- Руководствуйтесь надлежащей лабораторной практикой при переносе пробы из обогатительной среды в пробирку для лизиса. Чтобы избежать загрязнения пипетатора, пользователь может добавить этап промежуточного переноса. Например, пользователь может переносить каждый обогащенный образец в стерильную пробирку.
- По возможности используйте рабочую станцию для молекулярной биологии с бактерицидной лампой.

Для снижения рисков, связанных с ложноположительными результатами, соблюдайте указанные ниже инструкции.

- Никогда не открывайте пробирки после амплификации.
- Всегда утилизируйте зараженные пробирки, замачивая их в растворе бытового отбеливателя 1–5 % (в объемном соотношении в воде) на 1 час вдали от зоны подготовки анализа.

Дополнительную информацию и местные постановления об утилизации см. в паспорте безопасности продукта.

Если у вас есть вопросы о конкретных способах применения или процедурах, посетите наш веб-сайт www.neogen.com либо обратитесь к местному представителю или дилеру Neogen.

Обязанности пользователя

Пользователи несут ответственность за ознакомление с инструкциями по использованию продукта и информацией о нем. Для получения дополнительной информации посетите наш веб-сайт **www.neogen.com** либо обратитесь к местному представителю или дилеру Neogen.

При выборе метода тестирования важно понимать, что на результаты могут влиять внешние факторы, такие как методы отбора проб, протоколы тестирования, подготовка проб и обращение с ними и лабораторные методы.

Пользователь отвечает при выборе метода или продукта для проведения тестирования за оценку достаточного количества проб с подходящими матрицами и микробными нагрузками с целью выяснения того, соответствует ли выбранный метод тестирования критериям пользователя.

Пользователь также несет ответственность за определение того, соответствуют ли любые методы и результаты тестирования требованиям его клиентов и поставщиков.

Как и в случае любого другого метода тестирования, результаты, полученные при использовании любого продукта Neogen Food Safety, не гарантируют качество тестируемых матриц или процессов.

Чтобы помочь клиентам оценить метод для разных матриц пищевых продуктов, компания Neogen разработала комплект контроля матриц для системы молекулярного обнаружения Neogen®. При необходимости используйте контроль матриц (Matrix Control, MC) для определения того, может ли матрица влиять на результаты, получаемые с помощью анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)». При принятии метода Neogen или тестировании новых либо неизвестных матриц или матриц с изменившимся сырьем или процессом протестируйте несколько проб, характерных для матрицы, т. е. проб, полученных из разных источников, в ходе любого валидационного периода.

Матрицу можно определить как тип продукта с присущими ему свойствами, такими как состав и процесс. Различия между матрицами могут быть обусловлены просто различиями в их обработке или состоянии. Например, сырые и пастеризованные, свежие и сушеные и т. д.

Ограничение гарантий и ограниченное средство правовой защиты

ЗА ИСКЛЮЧЕНИЕМ СЛУЧАЕВ, ПРЯМО УКАЗАННЫХ В РАЗДЕЛЕ «ОГРАНИЧЕННАЯ ГАРАНТИЯ» НА УПАКОВКЕ ОТДЕЛЬНО ВЗЯТОГО ПРОДУКТА, NEOGEN ОТКАЗЫВАЕТСЯ ОТ ВСЕХ ПРЯМЫХ И КОСВЕННЫХ ГАРАНТИЙ, В ЧАСТНОСТИ ЛЮБЫХ ГАРАНТИЙ ПРИГОДНОСТИ ДЛЯ ПРОДАЖИ ИЛИ КОНКРЕТНОГО СПОСОБА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ. Если какой-либо продукт Neogen Food Safety имеет дефекты, компания Neogen или ее официальный дилер по своему усмотрению заменит такой продукт или возместит цену, по которой он был куплен. Это ваши исключительные средства правовой защиты. Вы должны незамедлительно уведомить Neogen о любых предполагаемых дефектах в продукте в течение шестидесяти дней с момента их обнаружения и вернуть этот продукт в компанию Neogen. По любым дополнительным вопросам обращайтесь к представителю или официальному дилеру Neogen.

Ограничение ответственности Neogen

NEOGEN НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА КАКИЕ-ЛИБО ПОТЕРИ ИЛИ УБЫТКИ, БУДЬ ТО ПРЯМЫЕ, ОПОСРЕДОВАННЫЕ, ОБУСЛОВЛЕННЫЕ ОСОБЫМИ ОБСТОЯТЕЛЬСТВАМИ, СЛУЧАЙНЫЕ ИЛИ КОСВЕННЫЕ УБЫТКИ, В ЧАСТНОСТИ ЗА УПУЩЕННУЮ ВЫГОДУ. Ни при каких обстоятельствах ответственность Neogen по любым правовым основаниям не может превышать цену покупки продукта, который, как утверждается, имеет дефекты.

Хранение и утилизация

Храните анализ Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» при температуре 2–8 °C. Не замораживайте его. Комплект должен храниться вдали от света. После открытия комплекта убедитесь, что пакет из фольги не поврежден. Если пакет поврежден, не используйте комплект. После открытия неиспользованные пробирки с реагентами всегда следует хранить в повторно закрываемом пакете с влагопоглотителем внутри, чтобы сохранить стабильность лиофилизированных реагентов. Храните повторно закрытые пакеты при температуре 2–8 °C не дольше 60 дней.

Не используйте анализ Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» после истечения срока годности. Срок годности и номер партии указаны на внешней этикетке коробки. После использования обогатительная среда и пробирки для анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» могут потенциально содержать патогенные материалы. После завершения тестирования утилизируйте зараженные отходы в соответствии с действующими отраслевыми стандартами. Дополнительную информацию и местные постановления об утилизации см. в паспорте безопасности продукта.

Инструкции по использованию

Внимательно следуйте всем инструкциям. В противном случае могут быть получены неточные результаты.

Пользователь должен пройти обучение для получения права на эксплуатацию системы молекулярного обнаружения Neogen, как описано в документе «Протоколы и инструкции для получения права на установку (Installation Qualification, IQ) или эксплуатацию (Operational Qualification, OQ) системы молекулярного обнаружения Neogen»[(7)].

Периодически обеззараживайте лабораторные столы и оборудование (пипетки, инструменты для установки и снятия колпачков и т. д.) раствором бытового отбеливателя 1–5 % (в объемном соотношении в воде) или раствором для удаления ДНК.

Конкретные требования см. в разделе «Конкретные инструкции для подтвержденных методов»:

в таблице 3 — протоколы обогащения согласно AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2017.01;

в таблице 4 — протоколы обогащения согласно сертификату NF Validation 3M 01/18-05/17.

Обогащение проб

Указания по протоколам обогащения для пищевых продуктов представлены в таблице 2, 3 или 4. Пользователь обязан проверить альтернативные протоколы отбора проб или соотношения разведения, чтобы убедиться в соответствии этого метода тестирования своим критериям.

Пищевые продукты

1. Предварительно нагрейте обогатительную среду в виде буферной пептонной воды (ISO) до 41,5 ± 1 °C.
2. С соблюдением правил асептики объедините обогатительную среду и пробу в соответствии с таблицей 2, 3 или 4. Для всех проб мяса и проб с высоким содержанием твердых частиц рекомендуется использовать фильтровальные мешки.
3. Тщательно гомогенизируйте все матрицы, кроме листовых продуктов и фруктов, путем смешивания, обработки в стерильном пакете в лопастной мешалке или ручного перемешивания в течение 2 ± 0,2 минуты. Проведите инкубацию при 41,5 ± 1° C в течение необходимого времени согласно таблице 2, 3 или 4.

Таблица 2. Общие протоколы обогащения

Матрица пробы[a]	Размер пробы	Объем обогатительного бульона (мл)	Температура обогащения (±1 °C)	Время обогащения (в часах)
Сырая говядина, в том числе фарш с разными способами приготовления и тримминг	325 г	975, буферная пептонная вода (ISO, предварительно нагретая)	41,5	10-18
Сырое мясо, включая сырые говядину, свинину, мясо птицы, ягнятину и мясо бизона	25 г	225, буферная пептонная вода (ISO, предварительно нагретая)	41,5	8-18
Листовые продукты[б]	200 г	450, буферная пептонная вода (ISO, предварительно нагретая)	41,5	18-24
Другие пищевые продукты, включая фрукты[б], овощи, фруктовые и овощные соки, свежие травы, сырые морепродукты, сырые яйца, сырое молоко, песочное тесто и обработанное мясо	25 г	225, буферная пептонная вода (ISO, предварительно нагретая)	41,5	18-24
Грецкие орехи или ореховые смеси с ними (этот протокол подходит для других орехов, включая пекан, миндаль, фисташки, кешью и каштаны)	25 г	225, восстановленное обезжиренное сухое молоко	41,5	18-24

(а) Перед добавлением в обогатительный бульон замороженные пробы нужно довести до температуры 4–8 °C.

(б) Пробы листовых продуктов и фруктов нужно аккуратно потрясти рукой 5 минут. Не смешивайте их и не обрабатывайте их в стерильном пакете в лопастной мешалке.

Конкретные инструкции для подтвержденных методов

AOAC® *Official Methods of Analysis*℠ 2017.01

В рамках программы AOAC *Official Method of Analysis*℠ было установлено, что анализ Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» — эффективный метод обнаружения штамма *E. coli* O157:H7. Матрицы, протестированные в ходе исследования, указаны в таблице 3.

Таблица 3. Протоколы обогащения с использованием предварительно нагретой буферной пептонной воды (ISO) при температуре 41,5 ± 1 °C согласно AOAC® *Official Methods*℠ 2017.01

Матрица пробы	Размер пробы	Объем обогатительного бульона (мл)	Время обогащения (в часах)	Гомогенизация
Сырой фарш (73 % постного мяса)	325 г	975	10-18	Вручную или в стерильном пакете в лопастной мешалке
Сырой шпинат в мешках[а]	200 г	450	18-24	Аккуратно потрясти рукой 5 минут, не гомогенизировать
Молодые побеги	25 г	225	18-24	Аккуратно потрясти рукой 5 минут, не гомогенизировать
Замороженная голубика[а][б]	25 г	225	18-24	Аккуратно потрясти рукой 5 минут, не гомогенизировать

(а) Пробы листовых продуктов и фруктов нужно аккуратно потрясти рукой 5 минут. Не смешивайте их и не обрабатывайте их в стерильном пакете в лопастной мешалке.

(б) Перед добавлением в обогатительный бульон замороженные пробы нужно довести до температуры 4–8 °C.

Сертификат NF Validation компании AFNOR Certification

3M 01/18-05/17

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ АГРОБИЗНЕСА

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

Дополнительную информацию об окончании срока действия см. в сертификате NF VALIDATION, доступном на упомянутом выше веб-сайте.

Метод, сертифицированный по программе NF VALIDATION и соответствующий ISO 16140-2[8], в сравнении с ISO 16654[3]

Область подтверждения: сырая говядина, сырые молочные продукты, сырые фрукты и овощи

Подготовка проб: пробы нужно подготавливать в соответствии с EN ISO 16654 и EN ISO 6887[6]

Версия программного обеспечения: см. сертификат

Таблица 4. Протоколы обогащения с использованием предварительно нагретой буферной пептонной воды (ISO) при температуре 41,5 ± 1 °C согласно методу 3M 01/18-05/17, сертифицированному по программе NF VALIDATION

Протокол	Размер пробы	Объем обогатительного бульона (мл)	Температура обогащения (±1 °C)	Время обогащения (в часах)
Сырые молочные продукты, сырые фрукты и сырые овощи	25 г	225	41,5	18-24
Сырая говядина	25 г	225	41,5	8-24

ПРИМЕЧАНИЯ:

- пробы массой более 25 г не тестировались в исследовании NF VALIDATION;
- рекомендуемые точки прерывания протокола — после обогащения или после лизиса пробы. Обогатительный бульон или лизат пробы можно хранить при температуре 2–8 °C до 72 часов. После взятия обогатительного бульона из места хранения возобновляйте тестирование с шага 1 раздела **«Лизис»**. После взятия лизата пробы из места хранения возобновляйте тестирование с шага 7 раздела **«Лизис»**. Лизат также можно хранить при температуре –20 °C;
- протоколы кратковременного обогащения чувствительны к условиям инкубации, и необходимо соблюдать температуру, указанную в протоколе. Чтобы убедиться в том, что обогащенный бульон достигает необходимой температуры, нужно проверить температуру водяной бани или инкубатора, где предварительно нагревается бульон. Общее время подготовки проб, включая задержку между окончанием этапа предварительного нагрева среды и началом инкубации пробы пищевого продукта, не должно превышать 45 минут. Во время инкубации рекомендуется использовать вентилируемый инкубатор.

Подготовка лотка устройства быстрой загрузки для системы молекулярного обнаружения Neogen®

1. Смочите ткань или одноразовую салфетку раствором бытового отбеливателя 1–5 % (в объемном соотношении в воде) протрите лоток устройства быстрой загрузки для системы молекулярного обнаружения Neogen.
2. Сполосните водой лоток устройства быстрой загрузки для системы молекулярного обнаружения Neogen.
3. Вытрите лоток устройства быстрой загрузки для системы молекулярного обнаружения Neogen одноразовой салфеткой досуха.
4. Перед использованием убедитесь, что лоток устройства быстрой загрузки для системы молекулярного обнаружения Neogen сухой.

Подготовка вставного охладительного блока для системы молекулярного обнаружения Neogen®

Положите вставной охладительный блок для системы молекулярного обнаружения Neogen непосредственно на лабораторный стол: лоток охладительного блока для системы молекулярного обнаружения Neogen не используется. Используйте блок при температуре лабораторной окружающей среды (20–25 °C).

Подготовка вставного нагревательного блока для системы молекулярного обнаружения Neogen®

Поместите вставной нагревательный блок для системы молекулярного обнаружения Neogen в сухой двухблочный нагреватель. Включите сухой блочный нагреватель и установите температуру, при которой вставной нагревательный блок для системы молекулярного обнаружения Neogen сможет нагреться до температуры 100 ± 1 °C и поддерживать ее.

ПРИМЕЧАНИЕ. В зависимости от нагревателя подождите примерно 30 минут, пока вставной нагревательный блок для системы молекулярного обнаружения Neogen не нагреется до нужной температуры. С помощью подходящего откалиброванного термометра (например, термометра частичного погружения или цифрового термометра с термопарой, но не термометра полного погружения), помещенного в обозначенное место, убедитесь, что температура вставного нагревательного блока системы молекулярного обнаружения Neogen составляет 100 ± 1 °C.

Подготовка прибора молекулярного обнаружения Neogen®

1. Запустите программное обеспечение для молекулярного обнаружения Neogen® и войдите в систему. Чтобы узнать, установлена ли у вас последняя версия программного обеспечения, обратитесь к представителю Neogen Food Safety.
2. Включите прибор молекулярного обнаружения Neogen.
3. Создайте или отредактируйте прогон с данными для каждой пробы. Подробные сведения см. в руководстве пользователя системы молекулярного обнаружения Neogen®.

ПРИМЕЧАНИЕ. Перед установкой лотка устройства быстрой загрузки для системы молекулярного обнаружения Neogen прибор молекулярного обнаружения Neogen должен достичь температуры 60 °C и поддерживать ее. Этот этап нагрева занимает около 20 минут, и на него указывает ОРАНЖЕВЫЙ свет на панели состояния прибора. Когда прибор готов к запуску, панель состояния начинает светиться ЗЕЛЕНЫМ.

Лизис

1. Дайте пробиркам с раствором Neogen для лизиса нагреться, оставив штатив при комнатной температуре (20–25 °C) на ночь (16–18 часов). Альтернативные способы довести пробирки с раствором Neogen для лизиса до комнатной температуры: оставить их на лабораторном столе не менее чем на 2 часа, инкубировать их в инкубаторе с температурой 37 ± 1 °C в течение 1 часа или поместить их в сухой двухблочный нагреватель с температурой 100 °C на 30 секунд.
2. Переверните закрытые колпачками пробирки, чтобы перемешать их содержимое. Переходите к следующему шагу в пределах 4 часов.
3. Достаньте обогатительный бульон из инкубатора.
4. Для каждой пробы, в том числе пробы для отрицательного контроля (стерильная обогатительная среда), требуется одна пробирка с раствором Neogen для лизиса.

   4.1 Полоски с пробирками с раствором Neogen для лизиса можно обрезать до желаемого количества пробирок. Выберите необходимое количество отдельных пробирок с раствором Neogen для лизиса или полосок с 8 пробирками. Поместите пробирки с раствором Neogen для лизиса в пустой штатив.

   4.2 Чтобы избежать перекрестного заражения, снимайте колпачки с пробирок с раствором Neogen для лизиса на одной полоске за раз и используйте новый наконечник пипетки на каждом этапе переноса.

   4.3 Перенесите обогащенную пробу в пробирки с раствором Neogen для лизиса, как описано ниже.

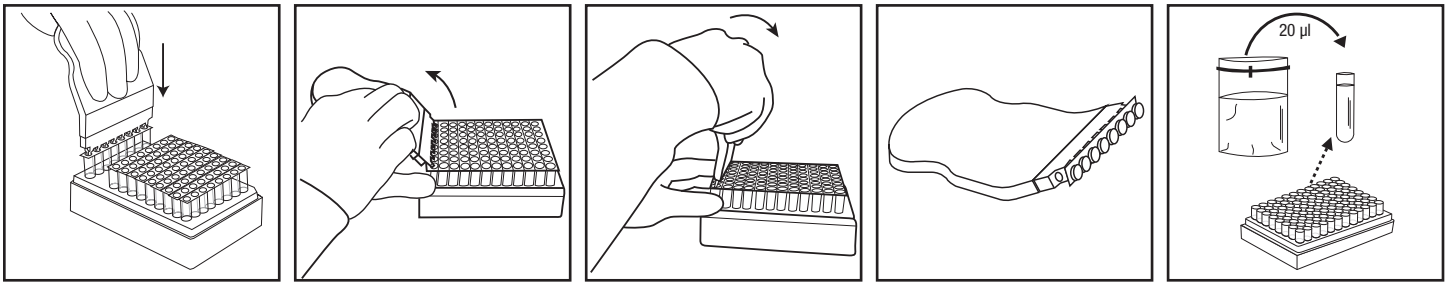
   Перенесите каждую обогащенную пробу в отдельную пробирку с раствором Neogen для лизиса **в первую очередь.** Перенесите пробу для отрицательного контроля **в последнюю очередь.**

   4.4 Воспользуйтесь инструментом установки и снятия колпачков (лизис) для системы молекулярного обнаружения Neogen®, чтобы снять колпачки с пробирок с раствором Neogen для лизиса на одной полоске за раз.

   4.5 Выбросьте колпачок пробирки с раствором Neogen для лизиса. Если лизат сохраняется для повторного тестирования, поместите колпачки в чистый контейнер для повторного применения после лизиса.

   4.5.1 Информацию об обработке сохраненного лизата см. в приложении A.

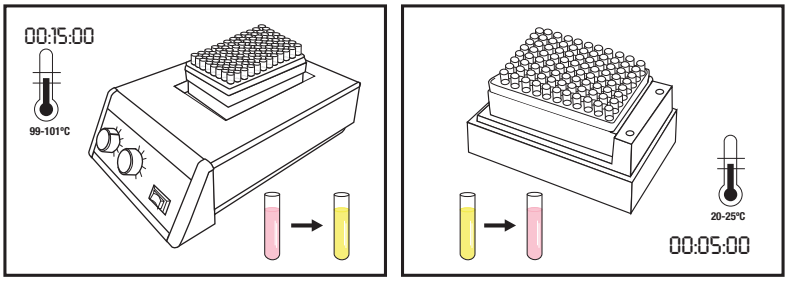
   4.6 Перенесите 20 мкл пробы в пробирку с раствором Neogen для лизиса, если в таблицах 2, 3 и 4 с информацией о протоколах не указано иное.



5. Повторяйте шаг 4.3 до тех пор, пока каждая отдельная проба не будет добавлена в соответствующую пробирку с раствором Neogen для лизиса на полоске.
6. При необходимости повторите шаги 4.1–4.6 для количества проб, которые нужно протестировать.
7. После переноса всех проб перенесите 20 мкл отрицательного контроля (стерильная обогатительная среда, например буферная пептонная вода [ISO]) в пробирку с раствором Neogen для лизиса. Не используйте в качестве отрицательного контроля воду.
8. Убедитесь, что температура вставного нагревательного блока системы молекулярного обнаружения Neogen составляет 100 ± 1 °C.
9. Поместите ненакрытый штатив с пробирками с раствором Neogen для лизиса во вставной нагревательный блок системы молекулярного обнаружения Neogen и нагревайте штатив в течение 15 ± 1 минут. Во время нагревания цвет раствора Neogen для лизиса изменяется с розового (низкая температура) на желтый (высокая температура).

   Пробы, не прошедшие надлежащую термическую обработку на этапе лизиса, могут считаться потенциальной биологической опасностью, и их НЕЛЬЗЯ помещать в прибор молекулярного обнаружения Neogen.

10. Достаньте ненакрытый штатив с пробирками с раствором Neogen для лизиса из нагревательного блока и дайте штативу остыть во вставном охладительном блоке для системы молекулярного обнаружения Neogen в течение 5–10 минут. Вставной охладительный блок для системы молекулярного обнаружения Neogen, используемый при температуре окружающей среды без лотка охладительного блока для системы молекулярного обнаружения Neogen, должен располагаться непосредственно на лабораторном столе. Когда раствор для лизиса остывает, он снова приобретает розовый цвет.
11. Достаньте штатив с пробирками с раствором Neogen для лизиса из вставного охладительного блока для системы молекулярного обнаружения Neogen.

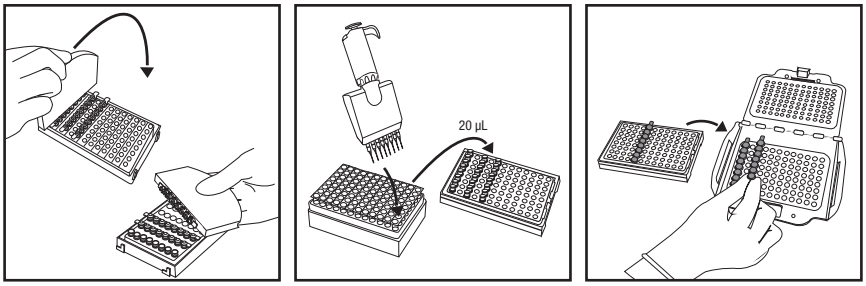


Амплификация

1. Для каждой пробы и каждого отрицательного контроля нужна одна пробирка с реагентом для анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)».
   1.1 Полоски с пробирками можно обрезать до желаемого количества пробирок. Выберите необходимое количество отдельных пробирок с реагентами или полосок с 8 пробирками для анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)».
   1.2 Поместите пробирки с реагентами для анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» в пустой штатив.
   1.3 Избегайте возмущения осадка реагента на дне пробирок.
2. Выберите одну пробирку с контролем реагентов Neogen и поместите ее в штатив.
3. Чтобы избежать перекрестного заражения, снимайте колпачки с пробирок с реагентом для анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» на одной полоске за раз и используйте новый наконечник пипетки на каждом этапе переноса.
4. Перенесите в пробирку с реагентом для анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» и пробирку с контролем реагентов Neogen лизат, как описано ниже.

Перенесите лизат каждой пробы в отдельные пробирки с реагентами для анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» **в первую очередь**, после чего перенесите отрицательный контроль. Гидратируйте пробирку с контролем реагентов Neogen **в последнюю очередь.**

5. Воспользуйтесь инструментом для установки и снятия колпачков (реагенты) для системы молекулярного обнаружения Neogen®, чтобы снять колпачки с пробирок с реагентами для анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)», по одной полоске с пробирками за раз. Выкиньте колпачки.
   5.1 Перенесите 20 мкл лизата пробы с верхних ½ жидкости (избегайте осадка) из пробирки с раствором Neogen для лизиса в соответствующую пробирку с реагентом для анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)»**. Переносите лизат под определенным углом, чтобы не возмутить осадок. Перемешайте лизат в пробирке с помощью пипетки (наберите и выпустите жидкость из пипетки 5 раз).**
   5.2 Повторяйте шаг 5.1, пока лизат отдельных проб не будет добавлен в соответствующую пробирку с реагентом для анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» на полоске.
   5.3 Закройте дополнительными колпачками из комплекта поставки пробирки с реагентами для анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» и скругленной стороной инструмента для установки и снятия колпачков (реагенты) для системы молекулярного обнаружения Neogen надавливайте на колпачки движением вперед и назад, чтобы они плотно прилегали к пробиркам.
   5.4 При необходимости повторите шаги 5.1–5.3 для количества проб, которые нужно протестировать.
   5.5 После переноса лизатов всех проб повторите шаги 5.1–5.3, чтобы перенести 20 мкл лизата отрицательного контроля в пробирку с реагентом для анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)».
   5.6 Перенесите **20 мкл <u>лизата отрицательного контроля</u> в пробирку с контролем реагентов Neogen.** Переносите лизат под определенным углом, чтобы не возмутить осадок. Перемешайте лизат в пробирке с помощью пипетки (наберите и выпустите жидкость из пипетки 5 раз).
6. Загрузите пробирки с колпачками в чистый и обеззараженный лоток устройства скоростной загрузки для системы молекулярного обнаружения Neogen. Закройте и зафиксируйте защелками крышку.



7. Проверьте и подтвердите настроенный прогон в программном обеспечении для молекулярного обнаружения Neogen.
8. Нажмите кнопку Start (Пуск) в программном обеспечении и выберите прибор для использования. Крышка выбранного прибора автоматически откроется.
9. Поместите лоток устройства скоростной загрузки для системы молекулярного обнаружения Neogen в прибор молекулярного обнаружения Neogen и закройте крышку, чтобы начать анализ. Результаты предоставляются в течение 60 минут, хотя положительные результаты могут быть обнаружены раньше.
10. После завершения анализа достаньте лоток устройства скоростной загрузки для системы молекулярного обнаружения Neogen из прибора молекулярного обнаружения Neogen и утилизируйте пробирки, замочив их в растворе бытового отбеливателя 1–5 % (в объемном соотношении в воде) на 1 час вдали от зоны подготовки анализа.

ПРИМЕЧАНИЕ. Чтобы свести к минимуму риск ложноположительных результатов из-за перекрестного заражения, никогда не открывайте пробирки с реагентами, содержащие амплифицированную ДНК. Сюда входят пробирки с контролем реагентов Neogen, пробирка с реагентом для анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» и пробирки с контролем матриц Neogen. Всегда утилизируйте запечатанные пробирки с реагентами, замачивая их в растворе бытового отбеливателя 1–5 % (в объемном соотношении в воде) на 1 час вдали от зоны подготовки анализа.

Результаты и интерпретация

Алгоритм интерпретирует кривую световой отдачи, построенную в результате выявления амплификации нуклеиновых кислот. Программное обеспечение автоматически анализирует результаты и снабжает их цветовыми кодами. Анализ уникальных параметров кривой позволяет определить положительный или отрицательный результат. Предварительно положительные результаты сообщаются в реальном времени, в то время как отрицательные и подлежащие проверке результаты отображаются после завершения прогона.

Предварительно положительные результаты следует подтверждать в соответствии со стандартными лабораторными операционными процедурами или в соответствии с подходящим стандартным контрольным методом[1,2,3]. Начать необходимо с переноса проб из первичной обогатительной среды в виде буферной пептонной воды (ISO) во вторичный обогатительный бульон с последующим культивированием и подтверждением изолятов с помощью подходящих биохимических и серологических методов.

ПРИМЕЧАНИЕ. Результаты анализа не могут быть нулевыми даже в случае тестирования отрицательной пробы, поскольку система и амплификационные реагенты для анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)» обладают «фоновой» относительной световой единицей (Relative Light Unit, RLU).

В редких случаях получения необычных световых данных алгоритм заносит соответствующие результаты в категорию информации, требующей проверки. Neogen рекомендует проводить повторный анализ проб, требующих проверки. Если результат анализа не меняется, проверьте его предпочтительным для вас методом или в соответствии с местными нормативными требованиями.

При получении несогласующихся результатов (предварительно положительных при использовании анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 [включая H7]», не подтвержденных с помощью одного из описанных выше средств, и особенно в случае теста на латексную агглютинацию) лаборатория должна выполнить необходимые действия, чтобы убедиться в действительности полученных результатов.

Подтверждение результатов в соответствии с методом, сертифицированным по программе NF VALIDATION

В контексте NF VALIDATION все пробы, определенные как положительные с помощью анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)», необходимо подтверждать одним из следующих тестов.

Вариант 1. На основе стандарта ISO 16654[3]. Нужно начинать с обогатительной среды в виде буферной пептонной воды[3].

Вариант 2. Реализация метода подтверждения, предполагающего следующее. Посейте штрихом 50 мкл обогатительной среды в виде буферной пептонной воды[3] на чашку с агаром Cefixime Potassium Tellurite Sorbitol MacConkey (CT-SMAC)[3]. Выполните инкубацию в течение 24 ± 3 часов при температуре 37 °C. Посейте штрихом характерные колонии на питательный агар и проведите тест на латексную агглютинацию непосредственно на изолированных колониях. Если результаты, полученные с помощью анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)», не подтверждаются, выполните иммуномагнитную сепарацию и посейте 50 мкл штрихом на чашку с агаром CT-SMAC.

Вариант 3. Использование зондов для нуклеиновых кислот (как описано в стандарте EN ISO 7218[5]), которые применяются к изолированным колониям (очищенным или нет) из чашки с агаром CT-SMAC (см. вариант 1 или 2). Зонды для нуклеиновых кислот должны отличаться от тех, что используются в анализе Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)».

Вариант 4. Использование любого другого метода, сертифицированного по программе NF VALIDATION, с принципом, который отличается от принципа анализа Neogen «Молекулярная диагностика 2 — *E. coli* O157 (включая H7)». Необходимо использовать полный протокол, описанный для этого второго подтвержденного метода. Все шаги, предшествующие началу подтверждения, должны быть одинаковыми для обоих методов.

При получении несогласующихся результатов (предварительно положительных при использовании альтернативного метода, не подтвержденных с помощью одного из описанных выше средств) лаборатория должна выполнить необходимые действия, чтобы убедиться в действительности полученных результатов.

Если у вас есть вопросы о конкретных способах применения или процедурах, посетите наш веб-сайт www.neogen.com либо обратитесь к местному представителю или дилеру Neogen.

Приложение A. Прерывание протокола: хранение и повторное тестирование проб

1. Чтобы поместить термически обработанный лизат на хранение, закройте пробирку для лизиса чистым колпачком (см. пункт 4.5 раздела **«Лизис»**).
2. Чтобы поместить на хранение обогащенную пробу, перед этим инкубируйте ее не менее 18 часов.
3. Храните пробирку при температуре от 4 до 8 °C не дольше 72 часов.
4. Подготовьте пробу, которая была на хранении, к амплификации путем переворачивания пробирки 2–3 раза для перемешивания ее содержимого.
5. Снимите колпачки с пробирок.
6. Поместите пробирки с перемешанным лизатом во вставной нагревательный блок системы молекулярного обнаружения Neogen и нагревайте их при температуре 100 ± 1 °C в течение 5 ± 1 минуты.
7. Достаньте штатив с пробирками с раствором Neogen для лизиса из нагревательного блока и дайте штативу остыть во вставном охладительном блоке для системы молекулярного обнаружения Neogen в течение 5–10 минут.
8. Продолжите выполнять протокол с шагов, подробно описанных в разделе **«Амплификация»** выше.

Список литературы

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. November 2015.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 5.09. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. Effective Date: 15 January 2015.
3. ISO 16654:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.
7. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Neogen Food Safety.

Объяснение символов

info.neogen.com/symbols

AOAC — зарегистрированный товарный знак AOAC INTERNATIONAL

Official Methods — зарегистрированный сервисный знак AOAC INTERNATIONAL

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

NEOGEN®

Ürün Talimatları

Moleküler Tayin Testi - *E. coli* O157 (H7 dahil)

Ürün Açıklaması ve Kullanım Amacı

Neogen® Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil), Neogen® Moleküler Tayin Sistemiyle birlikte, zenginleştirilmiş gıda ve yem numunelerinde *E. coli* O157 (H7 dahil) tespiti için kullanılır.

Neogen Moleküler Tayin Testlerinde, nükleik asit dizgelerini yüksek özgüllük ve duyarlılıkla hızlı biçimde amplifiye etmek için döngü aracılığı izotermal amplifikasyonla birlikte, amplifikasyonu saptamak için biyoluminesans kullanılır. Varsayımsal pozitif sonuçlar gerçek zamanlı olarak rapor edilirken, negatif sonuçlar, test tamamlandıktan sonra görüntülenir. Varsayımsal pozitif sonuçlar, tercih edilen yönteminiz kullanılarak ya da yerel düzenlemelerde belirtildiği şekilde onaylanmalıdır [1, 2, 3].

Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil), laboratuvar teknikleriyle ilgili eğitimli uzmanlar tarafından, laboratuvar ortamında kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Neogen, bu ürünün gıda veya içecek dışındaki sanayilerde kullanımını belgelendirmemiştir. Örneğin Neogen, bu ürünü, çevresel, farmasötik, kozmetik, klinik veya veterinerlik numunelerinin test edilmesi için belgelendirmemiştir. Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil), olası tüm gıda ürünleri, gıda prosesleri, test protokolleriyle veya olası tüm bakteri suşlarıyla değerlendirilmemiştir.

Tüm test yöntemlerinde olduğu gibi, kaynak, formülasyon ve zenginleştirme besiyeri kalitesi, sonuçları etkileyebilir. Numune alma yöntemleri, test protokolleri, numune hazırlama, işleme ve laboratuvar tekniği gibi faktörler de sonuçları etkileyebilir. Neogen, yöntemin kullanıcı kriterlerine uymasını sağlamak üzere, belirli gıdalarla ve mikrobiyal sınamalarla yeterli sayıda numune kullanılarak, kullanıcının ortamında, zenginleştirme besiyeri dahil olmak üzere yöntemin değerlendirilmesini önerir.

Neogen, Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157'yi (H7 dahil), Tamponlu Pepton Suyu ISO ile değerlendirilmiştir.

Neogen® Moleküler Tayin Cihazı, numunede mevcut olan organizmaları yok etmek üzere tasarlanmış olan test lizis adımı esnasında ısıl işlemden geçirilmiş numunelerle kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Testin lizis adımı esnasında düzgün şekilde ısıl işlemden geçirilmemiş numuneler, potansiyel biyotehlike olarak kabul edilebilir ve Neogen Moleküler Tayin Cihazına YERLEŞTİRİLMEMELİDİR.

Neogen Gıda Güvenliği, tasarım ve üretim için ISO (Uluslararası Standartlar Örgütü) 9001 sertifikalıdır.

Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) test kiti, Tablo 1'de açıklandığı gibi 96 test içerir.

Tablo 1. Neogen Moleküler Tayin Test Kiti Bileşenleri

Öğe	Tanımlama	Miktar	İçerik	Yorumlar
Neogen® Lizis Çözeltisi (LS)	Şeffaf tüplerde pembe çözelti	96 (8 tüpün 12 stripi)	Tüp başına 580 µl Neogen Lizis Çözeltisi	Raklara alınmış ve kullanıma hazır
Neogen® Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) Reaktif Tüpleri	Pembe tüpler	96 (8 tüpün 12 stripi)	Liyofilize spesifik amplifikasyon ve tespit karışımı	Kullanıma hazır
Ekstra kapaklar	Pembe kapaklar	96 (8 kapağın 12 stripi)		Kullanıma hazır
Neogen® Reaktif Kontrolü (RC)	Şeffaf, kaldırılarak açılan kapaklı tüpler	16 (8 tekil tüpten oluşan 2 cep)	Liyofilize kontrol DNA, amplifikasyon ve tespit karışımı	Kullanıma hazır

Kit içinde temin edilmeyen Negatif Kontrol, steril bir zenginleştirme besiyeridir, ör. BPW ISO. Negatif Kontrol olarak su kullanmayın.

Güvenlik

Kullanıcı, Neogen Moleküler Tayin Sistemi ve Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) için olan talimatlardaki tüm güvenlik bilgilerini okumalı, anlamalı ve bunlara uymalıdır. İleride başvurmak üzere, güvenlik talimatlarını saklayın.

⚠ **UYARI:** Önüne geçilmediği takdirde ölüm veya ciddi yaralanma ve/veya maddi hasarla sonuçlanabilecek tehlikeli bir durumu belirtir.

DUYURU: Önüne geçilmediği takdirde maddi hasara neden olabilecek potansiyel tehlikeli bir durumu belirtir.

⚠ UYARI

Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157'yi (H7 dahil), insanların veya hayvanların durum teşhisinde kullanmayın.

Kullanıcı, kendi personeline, güncel doğru test teknikleriyle ilgili eğitim vermelidir. örneğin, İyi Laboratuvar Uygulamaları, ISO/IEC 17025[4] veya ISO 7218[5].

Kontamine ürünün serbest bırakılmasına yol açan yanlış-negatif sonuçla ilişkili riskleri azaltmak için:

- Protokolü izleyin ve testleri, ürün talimatlarında tam olarak belirtildiği gibi yapın.
- 41,5±1 °C'ye önceden ısıtılmış besiyeri kullanın. Numune hazırlama esnasında besiyerinin, inkübasyon sıcaklık aralığının altına düşmesine izin vermeyin.
- Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157'yi (H7 dahil), ambalajın üzerinde ve ürün talimatlarında belirtildiği gibi saklayın.
- Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157'yi (H7 dahil) daima, son kullanma tarihine kadar kullanın.
- Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157'yi (H7 dahil), dahili olarak ya da üçüncü tarafça valide edilmiş gıda, yem veya gıda prosesi çevre numuneleriyle kullanın.
- Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157'yi (H7 dahil) yalnızca, dahili olarak ya da üçüncü tarafça valide edilmiş yüzeyler, dezenfektanlar, protokoller ve bakteriyel suşlarla kullanın.
- Aril sülfonat kompleksli Nötralize Edici Tampon (NB) içeren çevresel bir numune için, testten önce 1:2 seyreltme gerçekleştirin (1 kısım steril zenginleştirme sıvı besiyeri içine 1 kısım numune). Diğer bir seçenek, 10 µl nötralize edici tampon zenginleştirmesinin, Neojen Lizis Çözeltisi tüplerine aktarılmasıdır. Aril sülfonat kompleksli Neogen® Nötralizan Tamponu içeren Neogen® Numune İşleme ürünleri: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XSLSSL10NB, HS10NB ve HS119510NB.

Kimyasallara ve biyotehlikelere maruz kalmayla ilişkili riskleri azaltmak için:

- Patojen testini, eğitimli personelin kontrolü altında, uygun ekipmanların bulunduğu bir laboratuvarda gerçekleştirin. İnkübe edilmiş zenginleştirme besiyeriyle temas etmiş ekipmanlar veya yüzeyler ya da inkübe edilmiş zenginleştirme besiyeri, insan sağlığı için risk oluşturmaya yetecek seviyelerde patojenler içerebilir.
- Reaktifleri ve kontamine numuneleri tutarken, uygun koruyucu giysiler ve göz koruması giyme/takma da dahil olmak üzere, standart laboratuvar güvenliği uygulamalarına daima uyun.
- Amplifikasyondan sonra zenginleştirme besiyerinin ve reaktif tüplerinin içeriği ile temas etmeyin.
- Zenginleştirilmiş numuneleri ve ilgili kontamine atığı, güncel yerel/bölgesel/ulusal standartlara veya endüstri standartlarına uygun şekilde elden çıkarın.
- Isıtıcıda önerilen sıcaklık ayarını aşmayın.
- Önerilen ısıtma süresini aşmayın.
- Neogen® Moleküler Tayin Isı Bloğu Ek Parçasının sıcaklığını doğrulamak için, uygun, kalibre edilmiş bir termometre kullanın (ör. tam daldırmalı termometre değil, kısmi daldırmalı termometre veya dijital termokupl termometre). Termometre, Neogen Moleküler Tayin Isı Bloğu Ek Parçasında belirtilen konuma yerleştirilmelidir.

Testi hazırlarken çapraz kontaminasyonla ilişkili riskleri azaltmak için:

- Daima eldiven giyin (kullanıcıyı koruması ve nükleaz girişini önlemesi için).

Sıcak sıvılara maruz kalmayla ilişkili riskleri azaltmak için:

- Isıtıcıda önerilen sıcaklık ayarını aşmayın.
- Önerilen ısıtma süresini aşmayın.
- Neogen® Moleküler Tayin Isı Bloğu Ek Parçasının sıcaklığını doğrulamak için, uygun, kalibre edilmiş bir termometre kullanın (ör. tam daldırmalı termometre değil, kısmi daldırmalı termometre veya dijital termokupl termometre). Termometre, Neogen Moleküler Tayin Isı Bloğu Ek Parçasında belirtilen konuma yerleştirilmelidir.

DUYURU

Testi hazırlarken çapraz kontaminasyonla ilişkili riskleri azaltmak için:

- Steril, aerosol bariyer (filtrelenmiş), moleküler biyoloji kalitesinde pipet uçları kullanılması önerilir.
- Her bir numune aktarımı için yeni bir pipet ucu kullanın.
- Numuneyi, zenginleştirme işleminden lizis tüpüne aktarmak için, İyi Laboratuvar Uygulamalarını kullanın. Pipetleyici kontaminasyonunu önlemek için, kullanıcı, bir ara aktarım adımı eklemeyi tercih edebilir. Örneğin kullanıcı, her bir zenginleştirilmiş numuneyi, steril bir tüpe aktarabilir.
- Kullanılabilir olduğunda, antiseptik lamba içeren bir moleküler biyoloji iş istasyonu kullanın.

Yanlış pozitif sonuçla ilişkili riskleri azaltmak için:

- Amplifikasyondan sonra tüpleri asla açmayın.
- Kontamine olmuş tüpleri daima, %1-5 (suda h:h) ev tipi ağartıcı çözelti içinde 1 saat boyunca ve test hazırlama alanından uzakta ıslatarak elden çıkarın.

Elden çıkarmayla ilgili ilave bilgiler ve yerel düzenlemeler için, Güvenlik Veri Sayfasına bakın.

Belirli uygulamalar veya prosedürlerle ilgili sorunuz varsa lütfen www.neogen.com adresindeki web sitemizi ziyaret edin ya da yerel Neogen temsilciniz veya distribütörünüz ile iletişim kurun.

Kullanıcı Sorumluluğu

Kullanıcılar, ürün talimatlarını ve bilgilerini öğrenmekten sorumludur. Daha fazla bilgi edinmek için, **www.neogen.com** adresindeki web sitemizi ziyaret edin ya da yerel Neogen temsilciniz veya distribütörünüz ile iletişim kurun.

Bir test yöntemi seçerken, numune alma yöntemleri, test protokolleri, numune hazırlama, tutma ve laboratuvar teknikleri gibi harici faktörlerin, sonuçları etkileyebileceğini bilmek önemlidir.

Herhangi bir test yöntemi veya ürün seçilirken, seçilen test yönteminin kullanıcının kriterlerini karşıladığı konusunda kullanıcıyı tatmin etmesi adına uygun matrisler ve mikrobiyal sınamalarla yeterli sayıda numunenin değerlendirilmesi, kullanıcının sorumluluğundadır.

Ayrıca, herhangi bir test yönteminin ve sonucunun, müşterilerinin ve tedarikçilerinin gereksinimlerini karşıladığını belirlemek de kullanıcının sorumluluğundadır.

Herhangi bir test yöntemiyle olduğu gibi, herhangi bir Neogen Gıda Güvenliği ürünü kullanılarak elde edilen sonuçlar, test edilen matrislerin ya da proseslerin kalitesine ilişkin bir garanti oluşturmaz.

Müşterilerin çeşitli gıda matrislerine ilişkin yöntemi değerlendirmesine yardımcı olmak üzere Neogen tarafından, Neogen® Moleküler Tayin Matris Kontrol kiti geliştirilmiştir. Gerektiğinde, matrisin Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) sonuçlarını etkileme becerisi olup olmadığını belirlemek üzere Matris Kontrolünü (MC) kullanın. Neogen yöntemini benimserken ya da yeni veya bilinmeyen matrisleri ya da hammadde veya proses değişiklikleri geçirmiş matrisleri test ederken, herhangi bir validasyon döneminde, matrisi temsil eden çeşitli numuneleri, yani farklı kaynaktan alınan numuneleri test edin.

Matris, örneğin bileşim ve proses gibi kendine özgü özellikleri olan bir ürün tipi olarak tanımlanabilir. Matrisler arasındaki farklar, işlenmelerindeki veya sunumlarındaki farklılıkların neden olduğu etkiler kadar basit olabilir, örneğin ham-pastörize; taze-kuru vb.

Garantilerin Kısıtlanması / Sınırlı Kanuni Çözüm

TEKİL ÜRÜN AMBALAJININ SINIRLI GARANTİ BÖLÜMÜNDE AÇIKÇA BELİRTİLEN DURUM DIŞINDA, NEOGEN, HERHANGİ BİR TİCARİ GARANTİ YA DA BELİRLİ BİR AMAÇ İÇİN UYGUNLUK GARANTİSİ DAHİL OLMAK ÜZERE ANCAK BUNLARLA SINIRLI OLMAMAK KAYDIYLA, AÇIK VE ZIMNİ TÜM GARANTİLERİ REDDEDER. Herhangi bir Neogen Gıda Güvenliği Ürünü kusurluysa, Neogen veya yetkili distribütörü, kendi takdirine bağlı olarak, ürünü değiştirecek veya satın alma fiyatını iade edecektir. Bunlar sizin yegane kanuni çözüm yollarınızdır. Bir üründe herhangi bir şüpheli kusur saptandıktan sonra altmış gün içinde Neogen'i derhal bilgilendirmeli ve ürünü Neogen'e iade etmelisiniz. Diğer her türlü sorunuz için lütfen Neogen temsilciniz veya yetkili Neogen distribütörünüz ile iletişim kurun.

Neogen'in Sorumluluk Kısıtlaması

NEOGEN, KAR KAYIPLARI DAHİL OLMAK ÜZERE ANCAK BUNUNLA SINIRLI OLMAMAK KAYDIYLA, DOĞRUDAN, İNDİREKT, ÖZEL, ARIZİ VEYA DOLAYLI HERHANGİ BİR HASAR VEYA KAYIP İÇİN SORUMLULUK ÜSTLENMEZ. Hiçbir durumda, Neogen'in herhangi bir hukuk teorisi kapsamındaki sorumluluğu, kusurlu olduğu iddia edilen ürünün satın alma fiyatını aşamaz.

Saklama ve Elden Çıkarma

Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157'yi (H7 dahil) 2-8 °C'de saklayın. Dondurmayın. Saklarken, kiti ışıktan uzak tutun. Kiti açtıktan sonra, folyo poşetin hasarsız olduğunu kontrol edin. Poşet hasarlıysa kullanmayın. Açıldıktan sonra, kullanılmayan reaktif tüpleri daima, liyofilize reaktiflerin stabilitesini korumak üzere, içinde kurutucu madde bulunan, yeniden kapatılabilir poşette saklanmalıdır. Yeniden kapatılan poşetleri en fazla 60 gün boyunca 2-8 °C'de saklayın.

Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157'yi (H7 dahil), son kullanma tarihinden sonra kullanmayın. Son kullanma tarihi ve lot numarası, kutunun dış etiketinde belirtilmiştir. Kullanıldıktan sonra, zenginleştirme besiyeri ve Neogen Moleküler Tespit Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) tüpleri, patojenik materyaller içerebilir. Test tamamlandığında, kontamine atıkları elden çıkarmak için güncel endüstri standartlarını izleyin. Elden çıkarmayla ilgili ilave bilgiler ve yerel düzenlemeler için, Güvenlik Veri Sayfasına bakın.

Kullanım Talimatları

Tüm talimatlara dikkatlice uyun. Bunun yapılmaması halinde, hatalı sonuçlar oluşabilir.

Kullanıcı, "Neogen Moleküler Tayin Sistemi için Kurulum Kalifikasyonu (IQ) / Operasyonel Kalifikasyon (OQ) Protokolleri ve Talimatları" belgesinde açıklandığı şekilde, Neogen Moleküler Tayin Sistemi operatör kalifikasyonu eğitimini tamamlamalıdır[7].

Laboratuvar tezgahlarını ve ekipmanlarını (pipetler, kapak takma/kapak çıkarma aletleri vb.) %1-5 (su içinde h:h) ev tipi ağartıcı çözelti veya DNA giderme çözeltisiyle periyodik olarak dekontamine edin.

Spesifik gereksinimler için, bkz. Bölüm "Valide edilmiş yöntemler için Spesifik Talimatlar":

AOAC® *Resmi Analiz Yöntemi*℠ 2017.01 uyarınca zenginleştirme protokolleri için, Tablo 3

NF Validasyon sertifikası 3M 01/18-05/17 uyarınca zenginleştirme protokolleri için, Tablo 4

Numune Zenginleştirme

Tablo 2, 3 veya 4'te, gıdaya yönelik zenginleştirme protokolleri için kılavuz sunulmaktadır. Bu test yönteminin, kullanıcının kriterlerini karşıladığından emin olmak üzere alternatif numune alma protokollerinin veya seyreltme oranlarının valide edilmesi, kullanıcının sorumluluğundadır.

Gıdalar

1. BPW ISO zenginleştirme besiyerini 41,5±1 °C'ye önceden ısıtın.
2. Zenginleştirme besiyerini ve numuneyi, Tablo 2, 3 veya 4'e göre aseptik olarak birleştirin. Et numuneleri ve yüksek partiküllü numunelerin tümü için, filtre torbaları kullanılması tavsiye edilir.
3. Yapraklı ürünler ve meyveler dışındaki tüm matrisleri, 2 ±0,2 dakika makineyle karıştırarak, ezerek veya elle karıştırarak iyice homojenize edin. Tablo 2, 3 veya 4'e göre uygun süre boyunca 41,5 ±1 °C'de inkübe edin.

Tablo 2. Genel zenginleştirme protokolleri

Numune Matrisi[(a)]	Numune Büyüklüğü	Zenginleştirme Sıvı Besiyeri Hacmi (ml)	Zenginleştirme Sıcaklığı (±1 °C)	Zenginleştirme Süresi (saat)
Kıyma ve küçük artıkları içeren çiğ sığır eti	325 g	975 BPW ISO (önceden ısıtılmış)	41,5	10-18
Çiğ sığır eti, domuz eti, kümes hayvanları eti, kuzu eti ve bizon etini içeren çiğ etler	25 g	225 BPW ISO (önceden ısıtılmış)	41,5	8-18
Yapraklı ürünler[(b)]	200 g	450 BPW ISO (önceden ısıtılmış)	41,5	18-24
Meyveler[(b)], sebzeler, meyve/sebze suları, taze şifalı bitkiler, çiğ deniz ürünleri, pişmemiş yumurtalar çiğ süt, kurabiye hamuru ve işlenmiş etler gibi diğer gıdalar	25 g	225 BPW ISO (önceden ısıtılmış)	41,5	18-24
Cevizler veya ceviz içeren kabuklu yemiş karışımları (bu protokol, pekan cevizi, badem, antep fıstığı, kaju ve kestaneyi içeren diğer kuru yemişler için uygundur,	25 g	225 sulandırılmış, yağsız süt tozu	41,5	18-24

(a) Dondurulmuş numuneler, zenginleştirme sıvı besiyerine eklenmeden önce 4-8 °C'ye dengelenmelidir.

(b) Yapraklı ürünler ve meyve numuneleri 5 dakika boyunca elle nazikçe karıştırılmalıdır. Makinede karıştırmayın veya ezmeyin.

Valide Edilmiş Yöntemler için Özel Talimatlar

AOAC® *Resmi Analiz Yöntemleri*℠ 2017.01

AOAC *Resmi Analiz Yöntemi*℠ programında, Neogen Moleküler Tayin Testi 2 – *E. coli* O157'nin (H7 dahil), *E. coli* O157:H7 tayini için etkili bir yöntem olduğu saptanmıştır. Çalışmada test edilen matrisler, Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. AOAC® *Resmi Yöntemlerine*℠ 2017.01 göre 41,5±1 °C'de önceden ısıtılmış BPW ISO kullanılan zenginleştirme protokolleri

Numune Matrisi	Numune Büyüklüğü	Zenginleştirme Sıvı Besiyeri Hacmi (ml)	Zenginleştirme Süresi (saat)	Homojenize
Çiğ sığır kıyması (%73 yağsız)	325 g	975	10-18	Elle veya Ezerek
Torbalanmış çiğ ıspanak[(a)]	200 g	450	18-24	5 dakika boyunca elle nazikçe karıştırılır, homojenize etmeyin
Taze filizler	25 g	225	18-24	5 dakika boyunca elle nazikçe karıştırılır, homojenize etmeyin
Donmuş yaban mersini[(a)(b)]	25 g	225	18-24	5 dakika boyunca elle nazikçe karıştırılır, homojenize etmeyin

(a) Yapraklı ürünler ve meyve numuneleri 5 dakika boyunca elle nazikçe karıştırılmalıdır. Makinede karıştırmayın veya ezmeyin.

(b) Dondurulmuş numuneler, zenginleştirme sıvı besiyerine eklenmeden önce 4-8 °C'ye dengelenmelidir.

AFNOR Sertifikasyon tarafından NF Onayı:

3M 01/18-05/17

TARIM ENDÜSTRİSİ İÇİN ALTERNATİF ANALİTİK YÖNTEMLER

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

Geçerliliğin bitişiyle ilgili daha fazla bilgi edinmek için lütfen yukarıda belirtilen web sitesinde yer alan NF VALİDASYON sertifikasına bakın.

ISO 16654'e kıyasla ISO 16140-2'ye[8] uygun şekilde NF VALIDATION Sertifikalı yöntem[3]

Validasyon kapsamı: Çiğ sığır eti, çiğ süt ürünleri, çiğ meyveler ve sebzeler

Numune hazırlama: Numuneler, EN ISO 16654 ve EN ISO 6887'ye uygun şekilde hazırlanmalıdır[6]

Yazılım Sürümü: Bkz. sertifika

Tablo 4. NF VALIDATION sertifikalı yöntem 3M 01/18-05/17'ye uygun şekilde 41,5±1 °C'de önceden ısıtılmış BPW ISO kullanılan zenginleştirme protokolleri

Protokol	Numune Büyüklüğü	Zenginleştirme Sıvı Besiyeri Hacmi (ml)	Zenginleştirme Sıcaklığı (±1 °C)	Zenginleştirme Süresi (saat)
Çiğ süt ürünleri, çiğ meyveler ve çiğ sebzeler	25 g	225	41,5	18-24
Çiğ sığır eti	25 g	225	41,5	8-24

NOTLAR:

- NF VALIDATION çalışmasında 25 g'dan büyük numuneler test edilmemiştir.
- Önerilen protokol kesinti noktaları, zenginleştirmeden sonra veya numune lizizinden sonradır. Zenginleştirme sıvı besiyeri veya numune lizatı, 2-8 °C'de 72 saate kadar saklanabilir. Zenginleştirme sıvı besiyerini, saklama aşamasından çıkardıktan sonra, testlere, **Lizis** bölümündeki 1. Adımdan devam edin. Numune lizatını, saklama aşamasından çıkardıktan sonra, testlere, **Lizis** bölümündeki 7. Adımdan devam edin. Lizat da -20 °C'de saklanabilir.
- Kısa zenginleştirme protokolleri, inkübasyon koşullarına duyarlıdır ve protokolde belirtilen sıcaklıklara uyulmalıdır. Zenginleştirme sıvı besiyerinin gerekli sıcaklığa ulaştığından emin olmak için, besiyerlerinin önceden ısıtıldığı inkübatörün veya su banyosunun sıcaklığı doğrulanmalıdır. Besiyerini önceden ısıtma adımının sonu ile gıda numunesi inkübasyonunun başlangıcı arasındaki gecikme de dahil olmak üzere, numune hazırlama için toplam süre 45 dakikayı aşmamalıdır. İnkübasyon esnasında, havalandırmalı bir inkübatör kullanılması önerilir.

Neogen® Moleküler Tayin Hızlı Yükleme Tepsisini hazırlama

1. Bir bezi veya tek kullanımlık havluyu, %1-5 (su içinde h:h) ev tipi ağartıcı çözeltiyle ıslatın ve Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleme Tepsisini silin.
2. Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleme Tepsisini suyla durulayın.
3. Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleme Tepsisini silerek kurutmak için, tek kullanımlık havlu kullanın.
4. Kullanmadan önce, Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleme Tepsisinin kuru olduğundan emin olun.

Neogen® Moleküler Tayin Soğutma Bloğu Ek Parçasını hazırlama

Neogen Moleküler Tayin Soğutma Bloğu Ek Parçasını, doğrudan laboratuvar tezgahı üzerine koyun: Neojen Moleküler Tayin Soğutma Bloğu Tepsisi kullanılmaz. Bloğu ortam laboratuvar sıcaklığında (20-25 °C) kullanın.

Neogen® Moleküler Tayin Isı Bloğu Ek Parçasını hazırlama

Neogen Moleküler Tayin Isı Bloğu Ek Parçasını, kuru, çift bloklu ısıtıcı ünitesi içine koyun. Kuru blok ısıtıcı ünitesini açın ve sıcaklığı, Neojen Moleküler Tayin Isı Bloğu Ek Parçasının 100±1 °C sıcaklığa ulaşmasını ve bu sıcaklığı korumasını sağlayacak şekilde ayarlayın.

NOT: Isıtıcı ünitesine bağlı olarak, Neojen Moleküler Tayin Isı Bloğu Ek Parçasının sıcaklığa ulaşması için yaklaşık 30 dakika bekleyin. Belirlenen konuma yerleştirilmiş, uygun, kalibre edilmiş bir termometre (ör. tam daldırmalı termometre değil, kısmi daldırmalı termometre veya dijital termokupl termometre) kullanarak, Neogen Moleküler Tayin Isı Bloğu Ek Parçasının 100±1 °C'de olduğunu doğrulayın.

Neogen® Moleküler Tayin Cihazını hazırlama

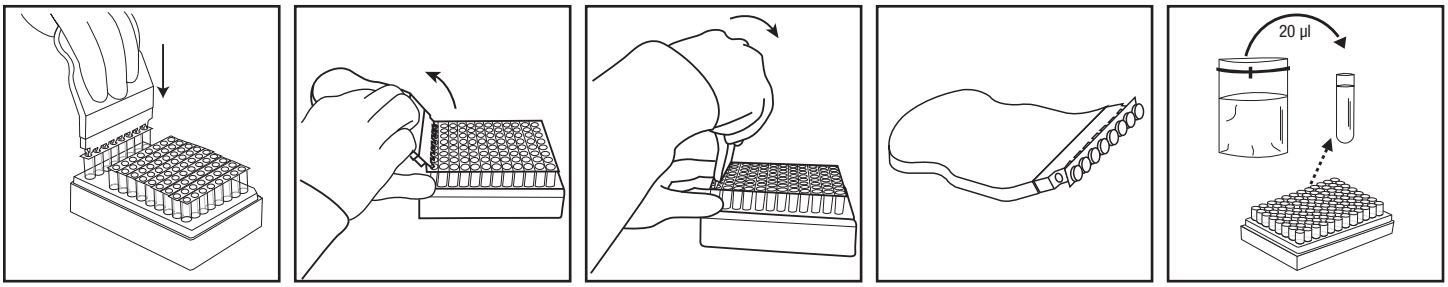
1. Neogen® Moleküler Tayin Yazılımını başlatın ve oturum açın. Yazılımın en güncel sürümüne sahip olduğunuzdan emin olmak üzere Neogen Gıda Güvenliği temsilcinizle iletişime geçin.
2. Neogen Moleküler Tayin Cihazını açın.
3. Her numune için, verilerle bir çalıştırma oluşturun veya düzenleyin. Ayrıntılı bilgi için, bkz. Neogen® Moleküler Tayin Sistemi Kullanım Kılavuzu.

NOT: Neojen Moleküler Tayin Hızlı Yükleme Tepsisini reaksiyon tüpleriyle yerleştirmeden önce, Neojen Moleküler Tayin Cihazı 60 °C sıcaklığa ulaşmalı ve bu sıcaklığı korumalıdır. Bu ısıtma adımı yaklaşık 20 dakika sürer ve cihazın durum çubuğunda TURUNCU renkli ışıkla gösterilir. Cihaz bir çalıştırma başlatmaya hazır olduğunda, durum çubuğu YEŞİL olacaktır.

Lizis

1. Rakı, gece boyunca (16-18 saat) oda sıcaklığına (20-25 °C) ayarlayarak, Neogen Lizis Çözeltisi tüplerinin ısınmasını sağlayın. Neogen Lizis Çözeltisi tüplerinin oda sıcaklığına dengelenmesi için alternatif yöntemler, Neogen Lizis Çözeltisi tüplerini en az 2 saat laboratuvar tezgahına koymak, Neogen Lizis Çözeltisi tüplerini 37±1 °C inkübatörde 1 saat inkübe etmek veya onları 100 °C'de 30 saniye boyunca, kuru çift bloklu ısıtıcıya koymaktır.
2. Karıştırmak için, kapaklı tüpleri ters çevirin. 4 saat içinde bir sonraki adıma geçin.
3. Zenginleştirme sıvı besiyerini, inkübatörden çıkarın.
4. Her bir numune ve Negatif Kontrol (NC) numunesi için bir Neogen Lizis Çözelti tüpü gerekir (steril zenginleştirme besiyeri).
   - 4.1 Neojen Lizis Çözeltisi tüp stripleri, istenen Neojen Lizis Çözeltisi tüp numarasına kadar kesilebilir. Tekil Neogen Lizis Çözeltisi tüplerinin veya 8 tüp striplerinin gereken sayısını seçin. Neogen Lizis Çözeltisi tüplerini boş bir rak içine koyun.
   - 4.2 Çapraz kontaminasyonu önlemek için, bir defada bir adet Neogen Lizis Çözeltisi tüp stripinin kapağını çıkarın ve her aktarım adımı için yeni bir pipet ucu kullanın.
   - 4.3 Zenginleştirilmiş numuneyi, Neogen Lizis Çözeltisi tüplerine, aşağıda açıklandığı gibi aktarın:

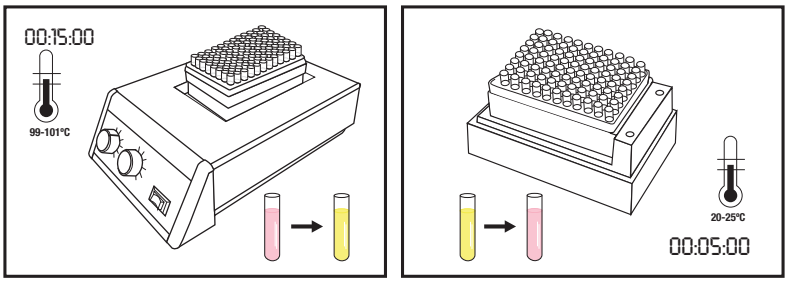
     Her bir zenginleştirilmiş numuneyi, önce tek bir Neogen Lizis Çözeltisi tüpüne **aktarın.** Son olarak NC'yi **aktarın.**
   - 4.4 Bir Neogen Lizis Çözeltisi tüp stripinin kapağını çıkarmak üzere (bir defada bir strip), Neogen® Moleküler Tayin Kapak Takma/Kapak Çıkarma Aleti-Lizis'i kullanın.
   - 4.5 Neogen Lizis Çözeltisi tüp kapağını atın – Lizat yeniden test için muhafaza edilecekse, lizisten sonra yeniden uygulama için kapakları temiz bir kaba koyun.
     - 4.5.1 Muhafaza edilen lizatın yeniden işlenmesi için, bkz. Ek A.
   - 4.6 Protokol Tabloları 2, 3 ve 4'te aksi belirtilmediyse, 20 µl numuneyi, bir Neogen Lizis Çözeltisi tüpüne aktarın.



5. Tekil numune, stripteki karşılık gelen bir Neogen Lizis Çözeltisi tüpüne eklenene kadar, adım 4.3'ü tekrarlayın.
6. Test edilecek numune sayısı için, adım 4.1 ila 4.6'yı gerektiği şekilde tekrarlayın.
7. Tüm numuneler aktarıldığında, 20 µl NC'yi (steril zenginleştirme besiyeri, ör. BPW ISO) bir Neogen Lizis Çözeltisi tüpüne aktarın. NC olarak su kullanmayın.
8. Neogen Moleküler Tayin Isı Bloğu Ek Parçası sıcaklığının 100±1 °C'de olduğunu doğrulayın.
9. Neogen Lizis Çözeltisi tüplerinin açık rakını, Neogen Moleküler Tayin Isı Bloğu Ek Parçasına koyun ve 15±1 dakika ısıtın. Isıtma esnasında, Neogen Lizis çözeltisi pembe renkliyken (soğuk) sarı renkli (sıcak) hale gelir.

   Testin lizis adımı esnasında düzgün şekilde ısıl işlemden geçirilmemiş numuneler, potansiyel biyotehlike olarak kabul edilebilir ve Neogen Moleküler Tayin Cihazına YERLEŞTİRİLMEMELİDİR.

10. Neogen Lizis Çözeltisi tüplerinin açık rakını, ısıtma bloğundan çıkarın ve Neogen Moleküler Tayin Soğutma Bloğu Ek Parçasında en az 5 dakika ve en fazla 10 dakika soğumaya bırakın. Neogen Moleküler Tayin Soğutma Bloğu Tepsisi olmadan oda sıcaklığında kullanılan Neogen Moleküler Tayin Soğutma Bloğu Ek Parçası, doğrudan laboratuvar tezgahında durmalıdır. Soğuduğunda, lizis çözeltisi pembe renge dönecektir.
11. Neogen Lizis Çözeltisi tüplerinin rakını, Neogen Moleküler Tayin Soğutma Bloğu Ek Parçasından çıkarın.

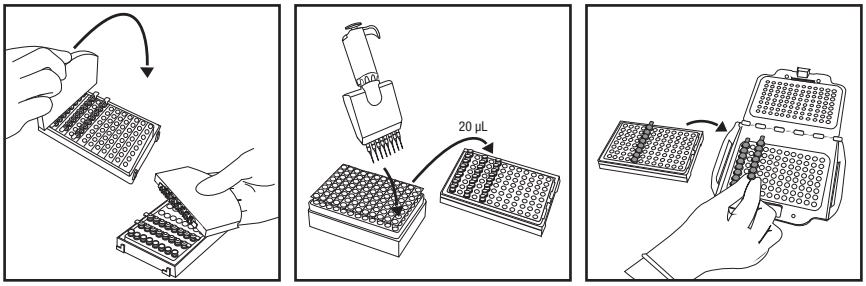


Amplifikasyon

1. Her bir numune ve NC için, bir adet Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) Reaktif Tüpü gerekir.
   1.1 Tüp stripleri, istenen tüp sayısına kadar kesilebilir. Tekil Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) Reaktif Tüplerini veya 8 tüplü stripleri gereken sayıda seçin.
   1.2 Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) Reaktif Tüplerini boş bir raka koyun.
   1.3 Tüplerin altından reaktif peletlerini dağıtmaktan kaçının.
2. Bir adet Neogen Reaktif Kontrol tüpü seçin ve raka yerleştirin.
3. Çapraz kontaminasyonu önlemek için, bir defada bir adet Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) Reaktif Tüpü stripinin kapağını çıkarın ve her aktarım adımı için yeni bir pipet ucu kullanın.
4. Lizatı, bir Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) Reaktif Tüpüne ve Neogen Reaktif Kontrol tüpüne, aşağıda açıklandığı gibi aktarın:

   Her bir numune lizatını, **önce**, tekil Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) Reaktif Tüplerine, ardından NC'ye aktarın. **Son olarak** Neogen Reaktif Kontrol tüpünü hidratlayın.

5. Neogen® Moleküler Tayin Kapak Takma/Kapak Çıkarma Aleti-Reaktif'i kullanarak, Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) Reaktif Tüpünün kapağını çıkarın – bir defada bir tüp stripinde işlem yapılmalıdır. Kapağı atın.
   5.1 **20 µl Numune lizatını, Neogen Lizis Çözeltisi içinde sıvının üst yarısından (çökeltiden kaçının), ilgili** Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) **Reaktif tüpü içine aktarın. Peletleri bozmamak için, belirli bir açıyla dağıtın. Yukarı aşağı 5 kez pipetleyerek nazikçe karıştırın.**
   5.2 Tekil numune lizatı, stripteki ilgili bir Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) Reaktif Tüpüne eklenene kadar, adım 5.1'i tekrarlayın.
   5.3 Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) Reaktif Tüplerini, temin edilen ekstra kapaklarla kapatın ve kapağın sıkıca uygulanmasını sağlayarak ileri geri hareketli basınç uygulamak için, Neogen Moleküler Tayin Kapak Takma/Kapak Çıkarma Aleti-Reaktif'in yuvarlak tarafını kullanın.
   5.4 Test edilecek numune sayısı için, adım 5.1 ila 5.3'ü gerektiği şekilde tekrarlayın.
   5.5 Tüm numune lizatları aktarıldıktan sonra, 20 µl NC lizatı bir Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) Reaktif Tüpü içine aktarmak için, adım 5.1 ila 5.3'ü tekrarlayın.
   5.6 **20 µl <u>NC lizatını,</u> bir Neogen Reaktif Kontrol tüpü içine aktarın.** Peletleri bozmamak için, belirli bir açıyla dağıtın. Yukarı aşağı 5 kez pipetleyerek nazikçe karıştırın.
6. Kapaklı tüpleri, temiz ve dekontamine edilmiş bir Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleme Tepsisine yükleyin. Ardından, tepsi kapağını kapatıp kilitleyin.



7. Neogen Moleküler Tayin Yazılımında, yapılandırılmış çalışmayı inceleyip onaylayın.
8. Yazılımdaki Başlat düğmesine tıklayın ve kullanılacak cihazı seçin. Seçilen cihazın kapağı otomatik olarak açılır.
9. Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleme Tepsisini, Neogen Moleküler Tayin Cihazına yerleştirin ve testi başlatmak için kapağı kapatın. Sonuçlar 60 dakika içinde verilir, ancak pozitifler daha erken tespit edilebilir.
10. Test tamamlandıktan sonra, Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleme Tepsisini Neogen Moleküler Tayin Cihazından çıkarın ve tüpleri,%1-5 (su içinde h:h) ev tipi ağartıcı çözelti içinde 1 saat boyunca ve test hazırlama alanından uzakta ıslatarak atın.

DUYURU: Çapraz kontaminasyon nedeniyle yanlış pozitif riskini en aza indirmek için, amplifiye DNA içeren reaktif tüplerini asla açmayın. Bu, Neogen Reaktif Kontrolü, Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) Reaktif tüpü ve Neogen Matris Kontrol Tüplerini içerir. Kapatılmış reaktif tüplerini daima, %1-5 (suda h:h) ev tipi ağartıcı çözelti içinde 1 saat boyunca ve test hazırlama alanından uzakta ıslatarak elden çıkarın.

Sonuçlar ve Yorum

Bir algoritma, nükleik asit amplifikasyonunun tespitinden ortaya çıkan ışık çıktısı eğrisini yorumlar. Sonuçlar yazılım tarafından otomatik olarak analiz edilir ve sonuca göre renk kodludur. Pozitif veya Negatif sonuç, bir dizi benzersiz eğri parametresinin analiziyle belirlenir. Varsayımsal pozitif sonuçlar gerçek zamanlı olarak rapor edilirken, Negatif sonuçlar ve İncele sonuçları, çalışma tamamlandıktan sonra görüntülenir.

Varsayımsal pozitif numuneler, laboratuvarın standart çalışma prosedürlerine göre veya ilgili referans yöntem onayı yapılarak onaylanmalı,[1,2,3], birincil BPW ISO zenginleştirmeden başlanıp ikinci zenginleştirme sıvı besiyerlerine devam edilmeli, ardından, uygun biyokimyasal ve serolojik yöntemler kullanılarak izolatlar plakalanmalı ve onaylanmalıdır.

NOT: Sistem ve Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) amplifikasyon reaktiflerinin "arka plan" bağıl ışık ünitesi (RLU) okuması olduğundan, negatif bir numune dahi, sıfır değeri vermeyecektir.

Olağan dışı ışık çıktısı oluşabilecek, nadir görülen durumda, algoritma bunu "İncele" şeklinde etiketler. Neogen, herhangi bir 'İncele' numunesi için, testin tekrarlanmasını önerir. Sonuç 'İncele' olmaya devam ederse, tercih edilen yönteminizi kullanarak ya da yerel düzenlemelerde belirtildiği şekilde, onay testine geçin.

Uyumsuz sonuçlar olduğunda (Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) ile varsayımsal pozitif olmuş, yukarıdaki yöntemlerin biriyle onaylanmamış ve özellikle lateks aglutinasyon testi için), laboratuvar, elde edilen sonuçların doğruluğundan emin olmak üzere gerekli adımları uygulamalıdır.

Sonuçların, NF VALIDATION Sertifikalı Yönteme Göre Onaylanması

NF VALIDATION bağlamında, Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) ile pozitif olduğu belirlenen tüm numuneler, aşağıdaki testlerin biriyle onaylanmalıdır:

Seçenek 1: ISO 16654[3] standardını, tamponlu pepton suyu[3] zenginleştirmeden başlayıp kullanarak.

Seçenek 2: Aşağıdakilerden oluşan bir onay yöntemi uygulayarak: 50 µl tamponu pepton suyu[3] zenginleştirmeyi, bir Cefixime Potasyum Tellürit Sorbitol MacConkey (CT-SMAC)[3] agar plakası üzerine çizgi halinde uygulayın. 37 °C'de 24±3 saat inkübe edin. Karakteristik kolonileri, besleyici agar üzerine çizgi halinde uygulayın ve lateks aglütinasyon testini, izole edilmiş koloniler üzerine doğrudan uygulayın. Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157 (H7 dahil) sonuçları onaylanmazsa, bir immünomanyetik ayırma adımı uygulayın ve ardından CT-SMAC üzerine 50 µl çizgi halinde uygulayarak.

Seçenek 3: CT-SMAC'den izole edilmiş koloniler (saflaştırılmış veya saflaştırılmamış) üzerinde gerçekleştirilen, EN ISO 7218[5] standardında açıklandığı gibi nükleik asit probları kullanarak (bkz. Seçenek 1 veya 2). Nükleik asit probları, Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157'de (H7 dahil) kullanılanlardan farklı olmalıdır.

Seçenek 4: İlkesi Neogen Moleküler Tayin Testi 2 - *E. coli* O157'den (H7 dahil) farklı olması gereken diğer herhangi bir yöntem sertifikalı NF VALIDATION' kullanılarak. Bu ikinci valide edilmiş yöntem için açıklanan protokolün tamamı kullanılmalıdır. Onayın başlamasından önceki tüm adımlar, her iki yöntem için de ortak olmalıdır.

Uyumsuz sonuçlar olması halinde (alternatif yöntemle varsayımsal pozitif olmuş, yukarıda açıklanan yöntemlerin biriyle onaylanmamış), laboratuvar, elde edilen sonucun doğruluğundan emin olmak üzere gerekli adımları uygulamalıdır.

Belirli uygulamalar veya prosedürlerle ilgili sorunuz varsa lütfen www.neogen.com adresindeki web sitemizi ziyaret edin ya da yerel Neogen temsilciniz veya distribütörünüz ile iletişim kurun.

Ek A. Protokol Kesintisi: Numuneleri saklama ve yeniden test etme

1. Isıl işlenmiş bir lizatı saklamak için, lizis tüpünü temiz bir kapakla yeniden kapatın (bkz. **Lizis** bölüm, 4.5)
2. Zenginleştirilmiş bir numuneyi saklamak için, saklama öncesinde en az 18 saat inkübe edin.
3. 4 ila 8 °C'de 72 saate kadar saklayın.
4. Saklanan bir numuneyi, karıştırmak üzere 2-3 kez ters çevirerek, amplifikasyon için hazırlayın.
5. Tüplerin kapağını çıkarın.
6. Karıştırılmış lizat tüplerini, Neogen Moleküler Tayin Isı Bloğu Ek Parçasına koyun ve 100±1 °C'de 5±1 dakika ısıtın.

7. Neogen Lizis Çözeltisi tüplerinin rakını, ısıtma bloğundan çıkarın ve Neogen Moleküler Tayin Soğutma Bloğu Ek Parçasında en az 5 dakika ve en fazla 10 dakika soğumaya bırakın.
8. Yukarıda ayrıntılı olarak verilen **Amplifikasyon** bölümündeki protokole devam edin.

Referanslar:

1. ABD Gıda ve İlaç Dairesi Bakteriyolojik Analitik Kılavuz. Bölüm 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli.* Kasım 2015.
2. ABD Tarım Bakanlığı (USDA) FSIS Mikrobiyoloji Laboratuvarı El Kitabı 5.09. Et Ürünleri ve Karkas ve Çevre Süngerlerinden *Escherichia coli* O157:H7 Tespiti, İzolasyonu ve Tanımlaması. Geçerlilik Tarihi: 15 Ocak 2015.
3. ISO 16654:2001 Gıda ve hayvan yemi maddelerinin mikrobiyolojisi – *Escherichia coli* O157 tayini için yatay yöntem.
4. ISO/IEC 17025. Test ve kalibrasyon laboratuvarlarının yetkinliğine yönelik genel gerekler.
5. ISO 7218. Gıda ve hayvan yemi maddelerinin mikrobiyolojisi – Mikrobiyolojik inceleme için genel kurallar.
6. ISO 6887. Gıda ve hayvan yemi maddelerinin mikrobiyolojisi – Test numunelerinin, ilk süspansiyonun ve ondalık seyreltmelerin, mikrobiyolojik inceleme için hazırlanması.
7. Kurulum Kalifikasyonu (IQ)/Operasyonel Kalifikasyon (OQ) Neogen® Moleküler Tayin Sistemi. Neogen Gıda Güvenliği.

Sembollerin Açıklaması

info.neogen.com/symbols

AOAC, AOAC INTERNATIONAL'ın tescilli ticari markasıdır

Official Methods, AOAC INTERNATIONAL'ın tescilli hizmet markasıdır

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

NEOGEN

製品説明

病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む)

製品の説明と使用目的

Neogen® 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) は、Neogen® 病原菌検出システムと一緒に使用することで、強化食品および飼料検体に含まれる *大腸菌* O157 (H7 含む) を迅速かつ的確に検出できます。

Neogen 病原菌検出アッセイは、ループ媒介等温増幅を使用して、高い特異性と感度で核酸配列を迅速に増幅させ、生物発光と組み合わることで増幅を検出します。推定陽性結果はリアルタイムで報告され、アッセイ完了後に陰性結果が表示されます。推定陽性結果は、好みの方法または地域の規制に従って確認する必要があります [1, 2, 3]。

Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) は、実験技術の訓練を受けた専門家が実験環境で使用することを目的としています。 Neogen は、食品または飲料以外の業界向けにはこの製品の使用を文書化していません。たとえば、 Neogen は、環境、医薬品、化粧品、臨床または獣医検体の検査用にこの製品を文書化していません。
Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) は、考えられるすべての食品、食品プロセス、試験のプロトコル、または考えられるすべての細菌株を使用して評価されたわけではありません。

すべての試験方法に共通の注意事項として、濃縮培地の供給源、配合、品質が結果に影響を与える可能性があります。 サンプリング方法、試験のプロトコル、検体の準備、取り扱い、検査室技術などの要因も結果に影響を与える可能性があります。 Neogen は、試験方法がユーザーの基準を満たしていることを確認するために、特定の食品および微生物課題を伴う十分な数の検体を使用して、ユーザーの環境で濃縮培地を含む試験方法を評価することを推奨します。

Neogen は、緩衝化ペプトン水 ISO を使用して Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) を評価しました。

Neogen® 病原菌検出装置には、アッセイのライシス ステップ中に熱処理を行った検体が用いられることになっています。熱処理は、検体中に存在する有機体を分解するために行われます。アッセイのライシス ステップ中に適切な熱処理を行っていない検体は、潜在的バイオハザードとみなされる場合があるので、 Neogen 病原菌検出装置内には入れないでください。

Neogen 食品衛生部門は、設計および製造において ISO (国際標準化機構) 9001 の認証を取得しています。

Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) 検査キットには、表 1 のように 96 個の検査が含まれています。

表 1. Neogen 病原菌検出アッセイ キットの内容

項目	根拠	数量	内容	コメント
Neogen® Lysis Solution (LS)	透明なチューブに入ったピンク色の溶液	96 (チューブ 8 本のストリップ 12 本)	チューブ 1 本につき 580 µL の Neogen 溶菌液チューブ	ラックに収納されており、すぐに使用可能
Neogen® 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) 試薬チューブ	ピンク色のチューブ	96 (チューブ 8 本のストリップ 12 本)	凍結乾燥された特定の増幅および検出ミックス	すぐに使用可能
予備のキャップ	ピンク色のキャップ	96 (キャップ 8 個のストリップ 12 本)		すぐに使用可能
Neogen® 試薬管理 (RC)	透明なフリップトップチューブ	16 (8 本の個々のチューブが入ったパウチ 2 個)	凍結乾燥されたコントロール DNA、増幅および検出ミックス	すぐに使用可能

ネガティブ コントロール (キットには含まれていない) は、 BPW ISO などの滅菌濃縮培地です。水をネガティブ コントロールとして使用しないでください。

安全性

ユーザーは説明書に記載されている Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) のすべての安全情報を読み、理解し、従う必要があります。安全上の注意は、後で参照できるように保管しておいてください。

⚠ **警告:** 回避しないと死亡または重傷および/または物的損害につながる可能性のある危険な状況を示します。

注記: 回避しないと物的損害につながる可能性のある潜在的に危険な状況を示します。

⚠ 警告

Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) は、人間や動物の状態の診断には使用しないでください。

ユーザーは、最新の適切な試験技術について担当者を訓練する必要があります(例: Good Laboratory Practices、 ISO/IEC 17025[4]、または ISO 7218 など)。[5]

汚染された製品の放出につながる偽陰性の結果に関連するリスクを軽減するには、次の手順に従ってください。

- プロトコルに従い、製品の説明書に記載されているとおりに正確に検査を行ってください。
- 41.5 ± 1 °C に予熱した培地を使用してください。検体の準備中は、培地が培養温度範囲よりも低くならないようにしてください。
- Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) をパッケージや製品の説明書に記載されている方法で保管してください。
- Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) は必ず有効期限までに使用してください。
- Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) は、内部または第三者によって検証された食品、飼料、食品加工の環境検体と一緒に使用してください。
- Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) は、必ず内部または第三者によって検証された表面、消毒剤、プロトコル、細菌株と一緒に使用してください。
- 中和バッファー (NB) とアリールスルホン酸複合体を含む環境検体の場合は、検査前に 1:2 に希釈します (検体と滅菌濃縮液が 1:1 の割合)。別の方法として、中和バッファー濃縮液 10 µL を Neogen 溶菌液チューブに移すことも可能です。 Neogen® 検体取り扱い製品 (アリールスルホン酸錯体の入った Neogen® 中和緩衝液を含む): RS96010NB、 RS9604NB、 SSL10NB、 XSLSSL10NB、 HS10NB、 HS119510NB。

化学物質やバイオハザードへの曝露に関連するリスクを軽減する方法:

- 適切な設備のある検査室で、訓練を受けた担当者の管理の下、病原体検査を実施します。培養濃縮培地、および培養濃縮培地と接触した機器または表面には、人間の健康に被害を引き起こすのに十分なレベルの病原体が含まれている可能性があります。
- 試薬や汚染された検体を扱う際は、適切な保護服や目の保護具を着用するなど、検査室の標準的な安全慣行に従ってください。
- 増幅後は、濃縮培地や試薬チューブの中身に触れることを避けてください。
- 濃縮検体および関連する汚染廃棄物は、現在の行政区域/地域/国/業界の基準に従って廃棄してください。
- ヒーターの設定は推奨温度を超えないようにしてください。
- 推奨加熱時間を超えないようにしてください。
- 適切に校正済みの温度計 (例: 全浸漬温度計ではなく、部分浸漬温度計またはデジタル熱電対温度計)を使用して Neogen® 病原菌検出熱ブロック インサートの温度を確認してください。温度計は、 Neogen® 病原菌検出熱ブロック インサートの指定された場所に配置する必要があります。

アッセイの準備中の二次汚染に関連するリスクを軽減するには、次の手順に従ってください。

- 常に手袋を着用する (ユーザーを保護し、ヌクレアーゼの侵入を防ぐため)。

熱い液体への曝露に関連するリスクを軽減する方法:

- ヒーターの設定は推奨温度を超えないようにしてください。
- 推奨加熱時間を超えないようにしてください。
- Neogen® 適切に校正済みの温度計 (例: 全浸漬温度計ではなく、部分浸漬温度計またはデジタル熱電対温度計)を使用して病原菌検出熱ブロック インサートの温度を確認してください。温度計は、 Neogen 病原菌検出熱ブロック インサートの指定された場所に配置する必要があります。

注記

アッセイの準備中の二次汚染に関連するリスクを軽減するには、次の手順に従ってください。

- 滅菌済み、エアロゾルバリア (フィルタ付き)、分子生物学グレードのピペットチップの使用を推奨。
- 検体を移すたびに新しいピペットチップを使用する。
- Good Laboratory Practices を使用して、検体を濃縮液から溶解チューブに移す。ピペッターの汚染を避けるため、ユーザーは中間移送ステップを追加することを選択できます。たとえば、ユーザーは濃縮検体を 1 つずつ滅菌チューブに移すことができます。
- 利用可能な場合は、殺菌灯を備えた分子生物学ワークステーションを使用してください。

偽陰性の結果に関連するリスクを軽減する方法:

- 増幅後はチューブを開けない。
- 汚染されたチューブは必ず 1 ～ 5% (水中 v:v) の家庭用漂白剤溶液に 1 時間浸して、アッセイ準備エリアから離れた場所に廃棄する。

追加情報および廃棄に関する地域の規制については、安全データシートを参照してください。

特定の用途や手順についてご不明な点がございましたら、当社ウェブサイト (www.neogen.com) をご覧いただくか、最寄りの Neogen の担当者または代理店にお問い合わせください。

ユーザーの責任

お客様には、製品説明書および製品情報を熟知していただく責任があります。詳しくは当社ウェブサイト (**www.neogen.com**) をご覧いただくか、最寄りの Neogen の担当者または代理店にお問い合わせください。

試験方法を選択する際には、サンプリングの方法、試験のプロトコル、検体の準備、取り扱い方法、実験技術などの外的要因が結果に影響を与える可能性があることを認識しておくことが重要です。

選択した試験方法がユーザーの基準を満たすことをユーザーに満足させるために、適切なマトリックスと微生物の課題で十分な数の検体を評価することは、任意の試験方法または製品を選択する際のユーザーの責任です。

また、試験方法と結果が顧客とサプライヤーの要件を満たしているかどうかを判断するのもユーザーの責任です。

すべての試験方法に共通の注意事項として、 Neogen 食品衛生管理製品を使用して得られた結果は、検査したマトリックスまたはプロセスの品質を保証するものではありません。

お客様がさまざまな食品マトリックスの方法を評価できるように、 Neogen は Neogen® 病原菌検出マトリックス コントロール キットを開発しました。必要に応じて、マトリックス コントロール (MC) を使用して、マトリックスが Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) の結果に影響を与える力があるかどうかを判断します。 Neogen の方法を採用する場合、または新規または未知のマトリックス、または原材料やプロセスが変更されたマトリックスを検査する場合は、バリデーション期間中に、マトリックスの代表的な検体、つまり出所の異なる検体を複数検査します。

マトリックスは、組成やプロセスなどの固有の特性を持つ製品のタイプとして定義できます。マトリックスの違いは、処理や表示方法の違いによって起きる影響と同じくらい単純な場合があります。たとえば、生と低温殺菌の違い、生と乾燥の違いなどがあります。

保証の制限/限定的な救済

個々の製品パッケージの限定保証セクションに明示的に記載されている場合を除き、 NEOGEN は、商品性または特定の用途への適合性の保証を含み、かつこれに限定されない、すべての明示的および黙示的な保証を否認します。 Neogen 食品衛生管理製品に欠陥がある場合、 Neogen またはその正規代理店は、その選択により、製品を交換するか、購入代金を返金します。これ以外の救済策はありません。製品の欠陥が疑われる場合は、発見から 60 日以内に速やかに Neogen に連絡して、製品を Neogen に返却してください。ご不明な点がございましたら、 Neogen の担当者または正規代理店にお問い合わせください。

Neogen の責任の制限

NEOGEN、直接的、間接的、特別、偶発的、結果的損害を問わず、いかなる損失または損害についても責任を負いません。これには、逸失利益を含まれますが、これに限定されません。いかなる場合も、いかなる法理論の下でも、 Neogen の責任は、欠陥があると主張された製品の購入価格を超えることはありません。

保管と廃棄

Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) は 2 ～ 8 °C で保管してください。凍らせないでください。保管中はキットを光から遠ざけてください。キットを開封した後、ホイル パウチに損傷がないことを確認してください。パウチが破損している場合は使用しないでください。開封後は、凍結乾燥試薬の安定性を維持するために、未使用の試薬チューブは必ず乾燥剤を入れた再密封可能なパウチに保管してください。再封したパウチを保管できるのは 2 ～ 8 °C で 60 日間までです。

有効期限を過ぎた Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) は使用しないでください。賞味期限とロット番号は、箱の外側のラベルに記載されています。使用後の Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) チューブには病原性物質が含まれている可能性があります。検査が完了したら、汚染廃棄物の処分に関する現在の業界標準に従ってください。追加情報および廃棄に関する地域の規制については、安全データシートを参照してください。

使用説明書

すべての指示に注意深く従ってください。従っていない場合、結果が不正確になる可能性があります。

ユーザーは、「Neogen 病原菌検出システムの設置適格性 (IQ)/実施適格性 (OQ) プロトコルと手順」文書[7]に記載されている Neogen 病原菌検出システムオペレーター資格トレーニングを修了する必要があります。

検査台と器具 (ピペット、キャップ/デキャップ ツールなど) の汚染を 1 ～ 5% (水中での v:v) の家庭用漂白剤または DNA 除去溶液で定期的に除去してください。

具体的な要件については、「検証された方法に関する具体的な指示」のセクションをご参照ください。

表 3、AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2017.01 に基づく濃縮プロトコル

表 4、NF バリデーション認証 3M 01/18-05/17 に基づく濃縮プロトコル

検体の濃縮

表 2、3、または 4 は食品用濃縮プロトコルのガイダンスです。この試験方法がユーザーの基準を満たしていることを確認するために、代替サンプリング プロトコルまたは希釈率を検証するのはユーザーの責任です。

食品

1. BPW ISO 濃縮培地を 41.5±1 °C に予熱しておきます。
2. 濃縮培地と検体を表 2、3 または 4 に従って無菌的に混合します。肉および高粒子の検体には、すべてフィルタ バッグを使用することをお勧めします。
3. 葉物野菜と果物を除くすべてのマトリックスを、2±0.2 分間、ブレンド処理、消化処理、または手で混ぜることにより、完全に均質化します。表 2、3、または 4 に従って、41.5 ± 1 °C で適切な時間、培養します。

表 2. 一般的な濃縮プロトコル

検体マトリックス[a]	検体サイズ	濃縮培養液容量 (mL)	濃縮温度 (±1 °C)	濃縮時間 (時間)
生の牛肉 (ひき肉/ミンチ、屑肉を含む)	325 g	975 BPW ISO (温めておくこと)	41.5	10-18
生の牛肉、豚肉、鶏肉、子羊肉、野牛などの生肉	25 g	225 BPW ISO (温めておくこと)	41.5	8-18
葉物野菜[b]	200 g	450 BPW ISO (温めておくこと)	41.5	18-24
その他の食品 (果物[b]、野菜、果物/野菜ジュース、フレッシュ ハーブ、生魚介類、生卵、生乳、クッキー生地、加工肉など)	25 g	225 BPW ISO (温めておくこと)	41.5	18-24
クルミ、またはクルミを含むナッツ ミックス (このプロトコルは、ピーカンナッツ、アーモンド、ピスタチオ、カシューナッツ、栗などの他のナッツに適しています。	25 g	225 再構成無脂肪粉乳	41.5	18-24

(a) 冷凍されている検体は、濃縮ブロスに添加する前に 4 ～ 8 °C に平衡化する必要があります。

(b) 葉物野菜や果物の検体は、手で 5 分間軽くほぐす必要があります。撹拌したり、消化処理したりしないでください。

検証された方法に関する具体的な指示

AOAC® *Official Methods of Analysis℠* 2017.01

AOAC *Official Method of Analysis℠* プログラムで、Neogen 病原菌検出アッセイ 2 – *大腸菌* O157 (H7 含む) は、*大腸菌* O157:H7 の検出に有効な方法であることが判明しました。スタディで検査されたマトリックスは、表 3 に示されています。

表 3. AOAC® *Official Methods℠* 2017.01 に従って、41.5 ± 1 °C に予熱した BPW ISO を使用した濃縮プロトコル

検体マトリックス	検体サイズ	濃縮培養液容量 (mL)	濃縮時間 (時間)	均質化済み
生の牛ひき肉 (赤身 73%)	325 g	975	10～18	手または胃で
生の袋入りほうれん草[a]	200 g	450	18～24	5分間、手で軽くかき混ぜます。均質化しないでください。
新鮮なもやし	25 g	225	18～24	5分間、手で軽くかき混ぜます。均質化しないでください。
冷凍ブルーベリー[a][b]	25 g	225	18～24	5分間、手で軽くかき混ぜます。均質化しないでください。

(a) 葉物野菜や果物の検体は、手で 5 分間軽くほぐす必要があります。撹拌したり、消化処理したりしないでください。

(b) 冷凍されている検体は、濃縮ブロスに添加する前に 4 ～ 8 °C に平衡化する必要があります。

AFNOR 認証機関による NF バリデーション

3M 01/18-05/17

アグリビジネス用の代替分析方法

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

有効期間の終了の詳細については、上記のウェブサイトで入手できる NF バリデーション証明書を参照してください。

ISO 16654[3]を参照法とし、ISO 16140-2[8] に従う NF バリデーション認証法

妥当性確認の範囲: 生の牛肉、生の乳製品、生の果物と野菜

検体の準備: 検体の準備は、 EN ISO 16654 および EN ISO 6887[6] に従って行う必要がある

ソフトウェア バージョン: 証明書を参照

表 4. NF バリデーション認証法 3M 01/18-05/17 に従って、41.5 ± 1 °C に予熱した BPW ISO を使用した増菌法プロトコル

プロトコル	検体サイズ	濃縮培養液容量 (mL)	濃縮温度 (±1 °C)	濃縮時間 (時間)
生の乳製品、生の果物、および生の野菜	25 g	225	41.5	18-24
生の牛肉	25 g	225	41.5	8-24

注:

- 25 g より大きい検体は、 NF バリデーション スタディで検査されたことがありません。
- 推奨されるプロトコル中断ポイントは、増菌後または検体ライシス後です。増菌液または検体溶菌液は、2～8 °C で最長 72 時間保存できます。増菌液を貯蔵庫から取り除いた後、「**ライシス**」セクションのステップ 1 から検査を再開します。検体溶菌液を貯蔵庫から取り出した後、「**ライシス**」セクションのステップ 7 から検査を再開します。溶菌液は -20 °C で保存することもできます。
- 短時間の増菌法プロトコルは、インキュベーション条件に敏感であり、プロトコルで指定されている温度に従う必要があります。ブロスが予熱されているウォーターバスまたはインキュベーターの温度を検証して、増菌ブロスが必要な温度に達していることを確認する必要があります。検体の準備の合計時間は、培地の予熱ステップの終了から食品検体のインキュベーションの開始までの遅延も含め、45 分を超えてはなりません。インキュベーション中、換気式インキュベーターを使用することが推奨されます。

Neogen® 病原菌検出スピード ローダー トレイの準備

1. 布または使い捨てタオルを 1～5% (水中 v:v) の家庭用漂白剤溶液で濡らし、Neogen 病原菌検出スピード ローダー トレイを拭きます。
2. Neogen 病原菌検出スピード ローダー トレイを水でゆすぎます。
3. 使い捨てタオルを使用して Neogen 病原菌検出スピード ローダー トレイを拭いて乾かします。
4. 使用する前に、Neogen 病原菌検出スピード ローダー トレイが乾いていることを確認します。

Neogen® 病原菌検出チル ブロック インサートの準備

Neogen 病原菌検出チル ブロック インサートを実験台の上に直接置きます。 Neogen 病原菌検出チル ブロック トレイは使用しません。ブロックは検査室の常温 (20～25 °C) で使用してください。

Neogen® 病原菌検出熱ブロック インサートの準備

Neogen 病原菌検出熱ブロック インサートをドライ ダブル ブロック ヒーター ユニットに置きます。ドライ ブロック ヒーター ユニットの電源を入れ、 Neogen 病原菌検出熱ブロック インサートが 100 ± 1 ° Cの温度に達して維持されるように温度を設定します。

注: ヒーター ユニットにもよりますが、Neogen 病原菌検出熱ブロック インサートが指定温度に達するまで、約 30 分待ちます。適切に校正済みの温度計 (例: 全浸漬温度計ではなく、部分浸漬温度計またはデジタル熱電対温度計) を指定場所に置いて使用して、Neogen 病原菌検出熱ブロック インサートの温度が 100 ± 1 °C であることを確認します。

Neogen® 病原菌検出装置の準備

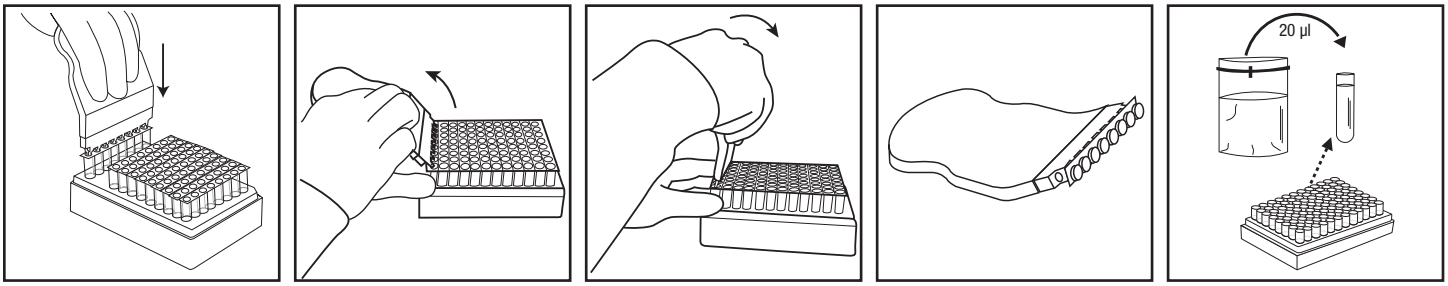
1. Neogen® 病原菌検出ソフトウェアを起動し、ログインします。Neogen 食品衛生部門の担当者に連絡して、最新版のソフトウェアを使用していることを確認してください。
2. Neogen 病原菌検出装置の電源を入れます。
3. 各検体のデータを使用して、ランを作成または編集します。詳細については、『Neogen® システム ユーザー マニュアル』を参照してください。

注: Neogen 病原菌検出装置は、Neogen 病原菌検出スピード ローダー トレイを反応チューブと一緒に挿入する前に、60 °C の温度に達してそれを維持している必要があります。この加熱ステップには約 20 分かかり、完了すると装置のステータス バーがオレンジ色に点灯します。装置でランを開始する準備が整うと、ステータス バーが緑色に変わります。

ライシス

1. ラックを室温 (20～25 °C) で一晩 (16～18 時間) 置いて、Neogen 溶菌液チューブを温めます。Neogen 溶菌液チューブを室温と平衡化させるための別の方法として、Neogen 溶菌液チューブを実験台の上に 2 時間以上置き、Neogen 溶菌液チューブを 37 ± 1 °C のインキュベーターに 1 時間インキュベートするか、あるいはチューブをドライ ダブル ブロック ヒーターに 100 °C で 30 秒間入れます。
2. キャップ付きのチューブを転倒混和します。4 時間以内に次のステップに進みます。
3. インキュベーターから増菌ブロスを取り出します。
4. 検体 1 件およびネガティブ コントロール (NC) 検体 (滅菌増菌培地) 1 件あたり、Neogen 溶菌液チューブが 1 本必要です。
   - 4.1 Neogen 溶菌液チューブ ストリップは、目的の Neogen 溶菌液チューブ数に合わせて切断することができる。個々の Neogen 溶菌液チューブの本数を選ぶか、必要な 8 チューブ ストリップ数を選びます。Neogen 溶菌液チューブを空のラックに入れます。
   - 4.2 二次汚染を避けるため、Neogen 溶菌液チューブ ストリップのキャップは一度に 1 本ずつ外し、移し替えステップごとに新しいピペット チップを使用してください。
   - 4.3 濃縮検体を以下のように Neogen 溶菌液チューブに移し替えます。

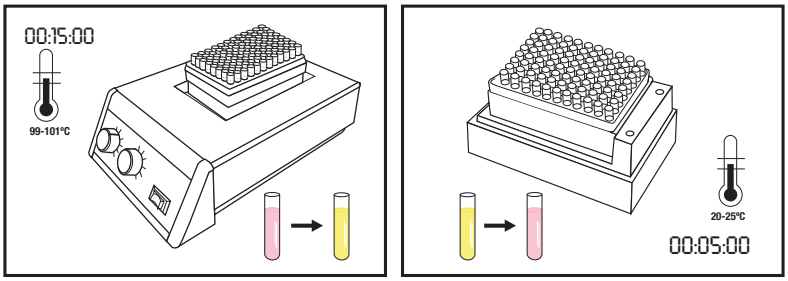
     各増菌検体を個々の Neogen 溶菌液チューブに**最初に**移し替えます。NC は**最後**に移し替えてください。
   - 4.4 Neogen® 病原菌検出キャップ/デキャップ ツール溶菌を使用して、Neogen 溶菌液チューブ ストリップ 1 本のキャップを外します。一度に 1 ストリップずつ行ってください。
   - 4.5 Neogen 溶菌液チューブ キャップを廃棄します。再検査のために溶菌液を保管しておく場合は、キャップを清潔な容器に入れておき、ライシス後に再びはめます。
     - 4.5.1 保管しておいた溶菌液の処理については、「付録 A」を参照してください。
   - 4.6 プロトコル表 2、3、および 4 で別途指定されていない限り、20 µL の検体を Neogen 溶菌液チューブに移し替えます。



5. 個々の検体がストリップ内の対応する Neogen 溶菌液チューブに添加されるまで、ステップ 4.3 を繰り返します。
6. 必要に応じて、検査する検体の件数分だけステップ 4.1 ～ 4.6 を繰り返します。
7. すべての検体を移し替え終えたら、20 µL の NC (滅菌増菌培地。BPW ISO など) を Neogen 溶菌液チューブに移し替えます。水を NC として使用しないでください。
8. Neogen 病原菌検出熱ブロック インサートの温度が、100 ± 1 °C であることを確認します。
9. 覆っていない Neogen 溶菌液チューブのラックを Neogen 病原菌検出熱ブロック インサートに置き、15 ± 1 分間加熱します。加熱中、Neogen 溶菌液はピンク色 (低温) から黄色 (高温) に変化します。

   アッセイのライシス ステップ中に適切な熱処理を行っていない検体は、潜在的バイオハザードとみなされる場合があるので、Neogen 病原菌検出装置内には入れないでください。

10. 覆っていない Neogen 溶菌液チューブのラックを加熱ブロックから取り出し、Neogen 病原菌検出チル ブロック インサートで少なくとも 5 分間、最長 10 分間冷却します。Neogen 病原菌検出チル ブロック インサートは、Neogen 病原菌検出チル ブロック トレイなしに常温で使用し、実験台に直接置く必要があります。冷えると、溶菌液はピンク色に戻ります。
11. Neogen 溶菌液チューブのラックを Neogen 病原菌検出チル ブロック インサートから取り出します。

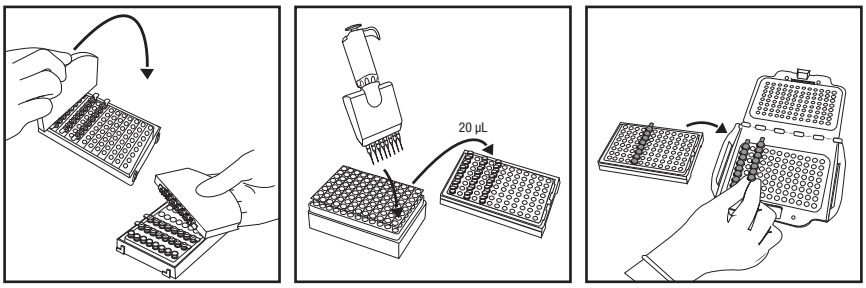


増幅

1. 検体と NC ごとに Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) 試薬チューブが 1 本必要です。
   1.1 チューブ ストリップは、目的のチューブ数に合わせて切断できます。個々の Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) 試薬チューブの本数を選ぶか、必要な 8 チューブ ストリップ数を選びます。
   1.2 Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) 試薬チューブを空のラックに入れます。
   1.3 チューブの底にある試薬ペレットをかき乱さないでください。
2. Neogen 試薬コントロール チューブを 1 本選び、ラックに入れます。
3. 二次汚染を避けるため、Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) 試薬チューブ ストリップのキャップは一度に 1 本ずつ外し、移し替え手順ごとに新しいピペット チップを使用してください。
4. 溶菌液を Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) 試薬チューブと Neogen 試薬コントロール チューブを以下のように移し替えます。

   各検体溶菌液を個々の Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) 試薬チューブに**先に**移し替え、その後 NC を移し替えます。Neogen 試薬コントロール チューブは**最後に**水和させます。

5. Neogen® 病原菌検出キャップ/デキャップ ツール試薬を使用して、Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) 試薬チューブのキャップを外します。一度にチューブ ストリップ 1 本ずつ行ってください。キャップは廃棄します。
   5.1 20 µL の検体溶菌液を Neogen 溶菌液チューブの上澄み ½ (沈殿物を避けるため) から、対応する Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) **試薬チューブに移し替えます。ペレットを乱さないように、斜めに注いでください。上下にピペットで 5 回移して、優しく混和します。**
   5.2 個々の検体溶菌液が、ストリップ内の対応する Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) 試薬チューブに添加されるまで、ステップ 5.1 を繰り返します。
   5.3 Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) 試薬チューブを付属の追加キャップで覆い、Neogen 病原菌検出キャップ/デキャップ ツール試薬の丸い側面を使用して圧力を前後にかけて、キャップがしっかり閉まっていることを確認します。
   5.4 必要に応じて、検査する検体の件数分だけステップ 5.1 ～ 5.3 を繰り返します。
   5.5 すべての検体溶菌液を移し替え終えたら、ステップ 5.1～5.3 を繰り返して 20 µL の NC 溶菌液を Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) 試薬チューブに移し替えます。
   5.6 **20 µL の NC 溶菌液を Neogen 試薬コントロール チューブに移し替えます。**ペレットを乱さないように、斜めに注いでください。上下にピペットで 5 回移して、優しく混和します。
6. キャップを付けたチューブを清潔で除染された Neogen 病原菌検出スピード ローダー トレイに載せます。次に、蓋を閉じて掛け金を下ろします。



7. 構成済みのランを Neogen 病原菌検出ソフトウェアでレビューし確定します。
8. ソフトウェアの [Start (開始)] ボタンをクリックし、使用する装置を選択します。選択した装置の蓋が自動的に開きます。
9. Neogen 病原菌検出スピード ローダー トレイを Neogen 病原菌検出装置に置き、蓋を閉めてアッセイを開始します。結果は 60 分以内に提示されますが、陽性はそれより早く検出される可能性があります。
10. アッセイ完了後、Neogen 病原菌検出スピード ローダー トレイを Neogen 病原菌検出装置から取り出し、チューブを 1 ～ 5% (水中 v:v) の家庭用漂白剤溶液に 1 時間浸して、アッセイ準備エリアから離れた場所に廃棄します。

注記: 二次汚染による偽陽性のリスクを最小限に抑えるために、増幅された DNA を入れた試薬チューブは絶対に開けないでください。これには Neogen 試薬コントロール、Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) 試薬チューブ、および Neogen マトリックス コントロール チューブが含まれます。密封された試薬チューブは必ず 1 ～ 5% (水中 v:v) の家庭用漂白剤溶液に 1 時間浸して、アッセイ準備エリアから離れた場所に廃棄してください。

結果および解釈

核酸増幅を検出した結果として生じる光出力曲線は、あるアルゴリズムにより解釈されます。結果はソフトウェアによって自動的に分析され、結果に基づいて色分けされます。結果が陽性なのかそれとも陰性なのかは、いくつかの固有の曲線パラメータの分析によって判定されます。推定陽性結果はリアルタイムで報告されるのに対して、陰性結果および調査結果はラン完了後に表示されます。

推定陽性検体の確定は、検査室の標準操作手順に準拠してまたは適切な参照方法の確定手順[1,2,3] に従って行う必要があります。その際、一次 BPW ISO 増菌から二次増菌ブロスへの移し替えから始めて、それ以降は適切な生化学的、血清学的方法を使用した分離株のプレーティングと確定に移ります。

注: 陰性検体でも、読み取り値がゼロになることはありませんが、これは本システムおよび Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) 増幅試薬に「背景」相対発光量 (RLU) 値があるためです。

通常とは異なる光出力があることがまれにありますが、その場合はアルゴリズムがこれに「調査」というラベルを付けます。調査検体に対してはアッセイを繰り返すことをお勧めします。結果が引き続き「調査」である場合は、好みの方法または地域の規制に従って確定検査に進んでください。

結果が一致しない場合 (Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) で推定陽性で、上記のいずれか 1 つの方法で確定されず、特にラテックス凝集検査でそうなる)、検査室は必要な手順に従って、得られた結果の妥当性を確認する必要があります。

NF バリデーション認証法に準拠した結果の確定

NF バリデーション認証法で、Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) により陽性と同定された検体はすべて、以下のうちいずれかの検査で確定する必要があります。

選択肢 1: ISO 16654[3] 規格を使用して、緩衝ペプトン水[3] 増菌液から開始する。

選択肢 2: 次の要素で構成される確定方法を実施します:50 µL の緩衝ペプトン水[3] 増菌液を Cefixime Potassium Tellurite Sorbitol MacConkey (CT-SMAC)[3] 寒天平板の上にストリークします。37 °C で 24±3 時間インキュベートします。特徴的なコロニーを栄養寒天培地上にストリークし、単離されたコロニーにラテックス凝集検査を直接実施します。Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) 結果が確定されない場合は、免疫磁気分離法を実施した後に 50 µL を CT-SMAC の上にストリークしてください。

選択肢 3: EN ISO 7218[5] 規格で説明されている核酸プローブを使用して、CT-SMAC から分離コロニー (精製されているかどうかは問わない) に対して実施します (選択肢 1 または 2 を参照)。これらの核酸プローブは、Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) で使用されたものとは異なるプローブでなければなりません。

選択肢 4: 他のいずれかの NF バリデーション認証法を使用します。その原理は、Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - *大腸菌* O157 (H7 含む) で使用されたものとは異なる原理でなければなりません。この 2 番目の検証済み方法で説明した完全なプロトコルを使用する必要があります。確定開始前のすべての手順は、両方の方法に共通している必要があります。

結果が一致しない場合 (代替法で推定陽性で、上記のいずれか 1 つの方法で確定されず、特にラテックス凝集検査でそうなる)、検査室は必要な手順に従って、得られた結果の妥当性を確認する必要があります。

特定の用途や手順についてご不明な点がございましたら、当社ウェブサイト (www.neogen.com) をご覧いただくか、最寄りの Neogen の担当者または代理店にお問い合わせください。

付録 A. プロトコル中断: 検体の保管および再検査

1. 熱処理された溶菌液を保管するには、清潔なキャップを使用して溶菌液チューブに再びキャップをします (「**ライシス**」セクション 4.5 を参照)。
2. 増菌した検体を保管するには、貯蔵前に最低 18 時間インキュベートします。
3. 4 ～ 8 °C で最長 72 時間保管します。
4. 保管しておいた検体を 2～3 回転倒混和して、増幅に備えます。
5. チューブのキャップを外します。

6. 混和した溶菌液チューブを Neogen 病原菌検出熱ブロック インサートに置き、100 ± 1 °C で 5 ± 1 分間加熱します。
7. Neogen 溶菌液チューブのラックを加熱ブロックから取り出し、Neogen 病原菌検出チル ブロック インサートで少なくとも 5 分間、最長 10 分間冷却します。
8. 前述の「**増幅**」セクションのプロトコルを続行します。

参考文献:

1. 『米国食品医薬品局微生物学的分析マニュアル』。第 4A 章: 下痢原性*大腸菌*。2015 年 11 月。
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 5.09.Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.発効日: 2015 年 1 月 15 日。
3. ISO 16654:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.
4. ISO / IEC 17025。検査及び校正を行う検査所の能力に関する一般要求。
5. ISO 7218. 食品および動物飼料の微生物学 — 微生物学的検査の一般的な要件。
6. ISO 6887. 食品および動物飼料の微生物学 — 微生物学的検査のための検査検体、初期懸濁液および小数希釈液の準備。
7. 設置適格性 (IQ)/実施適格性 (OQ) Neogen® 病原菌検出システム。Neogen 食品衛生部門。

記号の説明

info.neogen.com/symbols

AOAC は、AOAC International の登録商標です

Official Methods は、AOAC International の登録済みサービス マークです

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

发布日期：2024-01

NEOGEN®

产品说明

大肠杆菌 O157（包括 H7）分子检测分析 2

产品说明和预期用途

Neogen® *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 旨在与 Neogen® 分子检测系统配合使用，用于富集食品和饲料样本中*大肠杆菌* O157（包括 H7）的快速特异性检测。

Neogen 分子检测分析使用环介导等温扩增快速扩增核酸序列，具有高特异性和高灵敏度，并可结合生物发光检测扩增情况。推定阳性结果可实时报告，而阴性结果则在分析完成后显示。如果出现推定阳性结果，则应使用您偏好的方法或按照当地法规的规定进行确认[1, 2, 3]。

Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 旨在由受过实验室技术培训的专业人员在实验室环境中使用。Neogen 尚未记录该产品在食品或饮料以外的行业中的使用情况。例如，Neogen 尚未记录该产品用于测试环境、制药、化妆品、临床或兽医样本的情况。尚未针对所有可能的食品、食品工艺、测试方案或所有可能的细菌菌株对 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 进行评估。

与所有测试方法一样，富集培养基的来源、配方和质量都会影响结果。取样方法、测试方案、样品制备、操作处理和实验室技术等因素也可能影响结果。Neogen 建议在用户的环境中使用数量足够的样本来评估该方法（包括富集培养基），以确保该方法符合用户的标准，所用样本需具有特定食品和微生物挑战。

Neogen 已使用缓冲蛋白胨水 ISO 对 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 进行了评估。

Neogen® 分子检测仪器适合检测在分析裂解步骤（该步骤旨在破坏样本中存在的生物体）中经过热处理的样本。在分析裂解步骤中未经适当热处理的样本可能被视为潜在的生物危害，不得将其插入 Neogen 分子检测仪器。

Neogen Food Safety 已通过 ISO（国际标准化组织）9001 设计和制造认证。

Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 测试试剂盒可进行 96 次测试，如表 1 所示。

表 1. Neogen 分子检测分析试剂盒组件

商品	性状	数量	内容物	备注
Neogen® 裂解液 (LS)	透明管中的粉红色溶液	96 管（12 联管，每联管 8 管）	每管含 580 µL Neogen 裂解液	插在管架上，即用型
Neogen® *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 试剂管	粉红色管	96 管（12 联管，每联管 8 管）	冻干特异性扩增和检测混合液	即用型
额外盖	粉红色盖	96 只盖（12 联盖，每联盖 8 只盖）		即用型
Neogen® 试剂对照 (RC)	透明翻盖管	16 管（2 袋，每袋 8 支单独管）	冻干对照 DNA、扩增和检测混合液	即用型

阴性对照（试剂盒中未提供）为无菌富集培养基，例如 BPW ISO。请勿使用水作为阴性对照。

安全性

用户应阅读、理解并遵循 Neogen 分子检测系统和 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 说明中的所有安全信息。请留存安全说明以备将来参考。

⚠ **警告：** 表示危险情况，如果不避免，可能会导致死亡或重伤和/或财产损失。

注意： 表示潜在的危险情况，如果不避免，可能会导致财产损失。

⚠ 警告

请勿将 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 用于人类或动物疾病的诊断。

用户必须对其人员就当前正确的测试技术进行培训：例如，药物非临床研究质量管理规范、ISO/IEC 17025[4] 或 ISO 7218[5]。

为了降低假阴性结果导致放行受污染产品的风险：

- 请遵循测试方案并严格按照产品说明中的规定进行测试。
- 请使用预热至 41.5 ± 1°C 的培养基。在样品制备过程中，请勿让培养基温度降至孵育温度范围以下。
- 请按照包装和产品说明中的说明储存 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2。
- 请务必在 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 的有效期内使用。
- 请将 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 用于经过内部验证或第三方验证的食品、饲料和食品加工环境样本。
- *仅限将 Neogen 大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 用于经过内部验证或第三方验证的表面、消毒剂、方案和细菌菌株。
- 如果是含有含芳基磺酸盐络合物的中和缓冲液 (NB) 的环境样本，请在测试前进行 1:2 稀释（将 1 份样本放入 1 份无菌增菌液体培养基中）。另一种选择是将 10 µL 中和缓冲液富集液转移到 Neogen 裂解液管中。Neogen® 样本处理产品（包括含芳基磺酸盐络合物的 Neogen® 中和缓冲液）：RS96010NB、RS9604NB、SSL10NB、XSLSSL10NB、HS10NB 和 HS119510NB。

为了降低接触化学品和生物危害带来的风险：

- 请在训练有素的人员的控制下，在设备齐全的实验室中进行病原体检测。孵育后的富集培养基以及与孵育后的富集培养基接触的设备或表面可能含有足以对人体健康造成风险的病原体。
- 请务必遵循标准的实验室安全管理规范，包括在处理试剂和受污染样本时穿戴适当的防护服和护目镜。
- 扩增后，避免接触富集培养基和试剂管的内容物。
- 请根据地方/地区/国家/行业现行标准处置富集样品和相关受污染的废物。
- 请勿超过加热器上建议的温度设置。
- 请勿超过建议的加热时间。
- 请使用适当的温度计来验证 Neogen® 分子检测加热插块的温度（例如，可使用部分浸入式温度计或数字热电偶温度计，勿使用全浸入式温度计），并预先校准。温度计必须放置在 Neogen 分子检测加热插块的指定位置。

在准备分析时，为了降低交叉污染带来的风险：

- 请务必佩戴手套（以保护用户并防止引入核酸酶）。

为了降低接触高温液体带来的风险：

- 请勿超过加热器上建议的温度设置。
- 请勿超过建议的加热时间。
- 请使用适当的温度计来验证 Neogen® 分子检测加热插块的温度（例如，可使用部分浸入式温度计或数字热电偶温度计，勿使用全浸入式温度计），并预先校准。温度计必须放置在 Neogen 分子检测加热插块的指定位置。

注意

在准备分析时，为了降低交叉污染带来的风险：

- 建议使用带气溶胶屏障（经过滤处理）的分子生物学级无菌移液器吸头。
- 每次进行样品转移时，请使用新的移液器吸头。
- 将样品从富集液转移到裂解管时，请遵循药物非临床研究质量管理规范。为避免移液器污染，用户可以选择增加中间转移步骤。例如，用户可以将每个富集样品转移到无菌管中。
- 在可用的情况下，请使用带有杀菌灯的分子生物学工作站。

为了降低假阳性结果带来的风险：

- 切勿在扩增后将管打开。
- 请务必将受污染的管浸泡在 1-5%（水溶液，v:v）的家用漂白剂溶液中 1 小时并远离分析准备区，从而通过这种方式进行处置。

有关处置的附加信息和当地法规，请参阅化学品安全技术说明书。

如果您对特定应用或程序有疑问，请访问我们的网站（网址：www.neogen.com）或联系您当地的 Neogen 代表或经销商。

用户责任

用户有责任熟悉产品说明和信息。有关更多信息，请访问我们的网站（网址：**www.neogen.com**）或联系您当地的 Neogen 代表或经销商。

在选择测试方法时，一定要认识到，诸如取样方法、测试方案、样品制备、操作处理和实验室技术等外部因素可能会影响结果。

在选择任何测试方法或产品时，用户有责任对数量足够的样本进行评估，从而让用户确信所选的测试方法符合自己的标准，所用样本需具有适当的基质和微生物挑战。

用户也有责任确定任何测试方法和结果是否都符合客户和供应商的要求。

与任何测试方法一样，使用任何 Neogen Food Safety 产品获得的结果并不构成对所测试基质或工艺质量的保证。

为了帮助客户评估适用于各种食品基质的测试方法，Neogen 已开发出 Neogen® 分子检测基质对照试剂盒。必要时，请使用基质对照 (MC) 来确定基质是否会影响 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 的结果。在任何验证期内，当采用 Neogen 方法或测试新基质、未知基质或经历过原材料或工艺变化的基质时，请对基质的几个代表性样本（即从不同来源获得的样本）进行测试。

“基质”可以定义为一种具有固有性质（如成分和工艺）的产品。可以将基质之间的差异理解为其在加工或呈现方式方面的差异会带来不同影响，例如，未经处理的基质 vs. 经过巴氏杀菌的基质；新鲜基质 vs. 干基质等。

保证限制/有限补救措施

除个别产品包装的有限保证部分明确规定外，NEOGEN 否认所有明示和暗示保证，包括但不限于对适销性或特定用途适用性的任何保证。如果有任何 Neogen Food Safety 产品存在缺陷，Neogen 或其授权经销商将自行选择更换产品还是退还与产品的购买价格相等的费用。这些是您的专属补救措施。您必须在发现产品存在任何可疑缺陷后六十天内立即通知 Neogen，并将其退回给 Neogen。如有任何其他疑问，请联系您的 Neogen 代表或 Neogen 授权经销商。

Neogen 责任限制

对于任何损失或损害，无论是直接损害、间接损害、特殊损害、附带损害还是后果性损害，包括但不限于利润损失，NEOGEN 概不负责。在任何情况下，Neogen 在任何法律理论下的责任均不得超过被指控有缺陷的产品的购买价格。

储存与处置

请将 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 储存在 2-8°C 下。请勿冷冻贮藏。储存期间，请将试剂盒置于避光处。打开试剂盒后，请检查铝箔袋是否完好无损。如果铝箔袋已损坏，请勿使用。打开后，未使用的试剂管应始终存放在可重复密封的袋子中，袋子内应装有干燥剂，以保持冻干试剂的稳定性。请将重新密封的袋子在 2-8°C 下储存，最长不超过 60 天。

超过 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 的有效期后，请勿使用。有效期和批号标注在包装盒的外标签上。使用后，富集培养基和 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 试管可能含有致病物质。测试完成后，请遵循行业现行标准来处置受污染的废物。有关处置的附加信息和当地法规，请参阅化学品安全技术说明书。

使用说明

请仔细遵循所有说明。否则可能会导致结果不准确。

用户应完成“Neogen 分子检测系统安装认证 (IQ) / 操作认证 (OQ) 方案和说明”.文件[7]中所述的 Neogen 分子检测系统操作员资格培训。

请定期用 1-5%（水溶液，v:v）家用漂白剂溶液或可去除 DNA 的溶液对实验室工作台和设备（移液器、加盖/去盖工具等）进行去污处理。

有关具体要求，请参见“验证方法的具体说明”一节：

有关根据 AOAC® *Official Method of Analysis℠*（2017 年 1 月）制定的富集方案，请参见表 3

有关根据 NF Validation 证书 3M 01/18-05/17 制定的富集方案，请参见表 4

样本富集

表 2、表 3 或表 4 提供了针对食品的富集方案指南。用户有责任对备用取样方案或稀释率进行验证，以确保该测试方法符合用户的标准。

食品

1. 将 BPW ISO 富集培养基预热至 41.5 ± 1°C。
2. 根据表 2、表 3 或表 4 无菌混合富集培养基和样本。对于所有肉类和高颗粒样本，建议使用滤袋。
3. 掺和、消化或手动混合 2 ± 0.2 分钟，即可使除叶类农产品和水果外的所有基质完全均质化。根据表 2、表 3 或表 4，在 41.5 ± 1°C 下孵育适当的时间。

表 2. 富集总体方案

样本基质[a]	样本量	增菌液体培养基体积 (mL)	富集温度 (±1°C)	富集时间 (小时)
生牛肉，包括绞肉/肉糜和切边	325 g	975 BPW ISO（经预热处理）	41.5	10-18
生肉，包括生牛肉、生猪肉、生家禽肉、生羊肉和生野牛肉	25 g	225 BPW ISO（经预热处理）	41.5	8-18
叶类农产品[b]	200 g	450 BPW ISO（经预热处理）	41.5	18-24
其他食品，包括水果[b]、蔬菜、果汁/蔬菜汁、新鲜香草、生海鲜、生鸡蛋、生牛奶、饼干面团和加工肉类	25 g	225 BPW ISO（经预热处理）	41.5	18-24
核桃或含有核桃的混合坚果（本方案适用于其他坚果，包括山核桃、杏仁、开心果、腰果和栗子）	25 g	225 复原脱脂奶粉	41.5	18-24

(a) 如果是冷冻贮藏的样本，应在加入增菌液体培养基之前将其平衡至 4-8°C。

(b) 如果是叶类农产品和水果样本，则应手动缓缓搅拌 5 分钟。请勿掺和或消化。

验证方法的具体说明

AOAC® *Official Methods of Analysis℠* (2017 年 1 月)

在 AOAC *Official Method of Analysis℠* 程序中，发现 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 是可高效检测*大肠杆菌* O157:H7 的方法。研究中测试的基质如表 3 所示。

表 3. 根据 AOAC® *Official Methods℠* (2017 年 1 月) 使用在 41.5 ± 1°C 下经预热处理的 BPW ISO 的富集方案

样本基质	样本量	增菌液体培养基体积 (mL)	富集时间 (小时)	经均质化处理
生碎牛肉（73% 瘦肉）	325 g	975	10-18	手动混合或消化
袋装生菠菜[a]	200 g	450	18-24	手动缓缓搅拌 5 分钟，请勿均质化
新鲜芽苗菜	25 g	225	18-24	手动缓缓搅拌 5 分钟，请勿均质化
冷冻蓝莓[a][b]	25 g	225	18-24	手动缓缓搅拌 5 分钟，请勿均质化

(a) 如果是叶类农产品和水果样本，则应手动缓缓搅拌 5 分钟。请勿掺和或消化。

(b) 如果是冷冻贮藏的样本，应在加入增菌液体培养基之前将其平衡至 4-8°C。

AFNOR 认证的 NF Validation

3M 01/18-05/17

农业综合企业的替代分析方法

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

有关有效期终止的更多信息，请参阅上述网站上提供的 NF VALIDATION 证书。

经 NF VALIDATION 认证的方法符合 ISO 16140-2[8] 的要求，而非 ISO 16654[3] 的要求

验证范围：生牛肉、生乳制品、生水果和蔬菜

样品制备：应根据 EN ISO 16654 和 EN ISO 6887[6] 制备样品

软件版本：请参见证书

表 4.根据经 NF VALIDATION 认证的方法 3M 01/18-05/17 使用在 41.5 ± 1°C 下经预热处理的 BPW ISO 的富集方案

方案	样本量	增菌液体培养基体积 (mL)	富集温度 (±1°C)	富集时间 (小时)
生乳制品、生水果和蔬菜	25 g	225	41.5	18-24
生牛肉	25 g	225	41.5	8-24

说明：

- NF VALIDATION 研究中未对大于 25 g 的样本进行测试。
- 推荐的方案中断点是富集后或样本裂解后。增菌液体培养基或样本裂解物可在 2-8°C 下储存最长 72 小时。从仓库中取出增菌液体培养基后，从**裂解**一节中的步骤 1 开始继续进行测试。从仓库中取出样本裂解物后，从**裂解**一节中的步骤 7 开始继续进行测试。裂解物也可以在 -20°C 下储存。
- 短时间富集方案对孵育条件较敏感，因此必须遵循方案中规定的温度。应验证预热液体培养基的水浴或培养箱的温度，以确保增菌液体培养基能够达到所需温度。样品制备的总时间（包括培养基预热步骤结束和食品样本开始孵育之间耽搁的时间）不得超过 45 分钟。建议在孵育过程中使用通风的培养箱。

准备 Neogen® 分子检测快速装载托盘

1. 用 1-5%（水溶液，v:v）家用漂白剂溶液弄湿抹布或一次性毛巾，然后擦拭 Neogen 分子检测快速装载托盘。
2. 用水冲洗 Neogen 分子检测快速装载托盘。
3. 使用一次性毛巾将 Neogen 分子检测快速装载托盘擦干。
4. 使用前，请确保 Neogen 分子检测快速装载托盘处于干燥状态。

准备 Neogen® 分子检测冷却插块

将 Neogen 分子检测冷却插块直接放置在实验室工作台上：无需使用 Neogen 分子检测冷却块托盘。请在实验室环境温度 (20-25°C) 下使用该冷却插块。

准备 Neogen® 分子检测加热插块

将 Neogen 分子检测加热插块放入干燥的双插块加热器中。打开干燥的插块加热器并设置温度，使 Neogen 分子检测加热插块达到 100 ± 1°C 的温度并保持在该水平。

说明：根据加热器的不同，Neogen 分子检测加热插块需要大约 30 分钟才能达到所需温度。请使用适当的温度计（例如，可使用部分浸入式温度计、数字热电偶温度计，勿使用全浸入式温度计）来验证 Neogen 分子检测加热插块的温度是否为 100 ± 1°C，验证时需对温度计进行预先校准并放置在指定位置。

准备 Neogen® 分子检测仪器

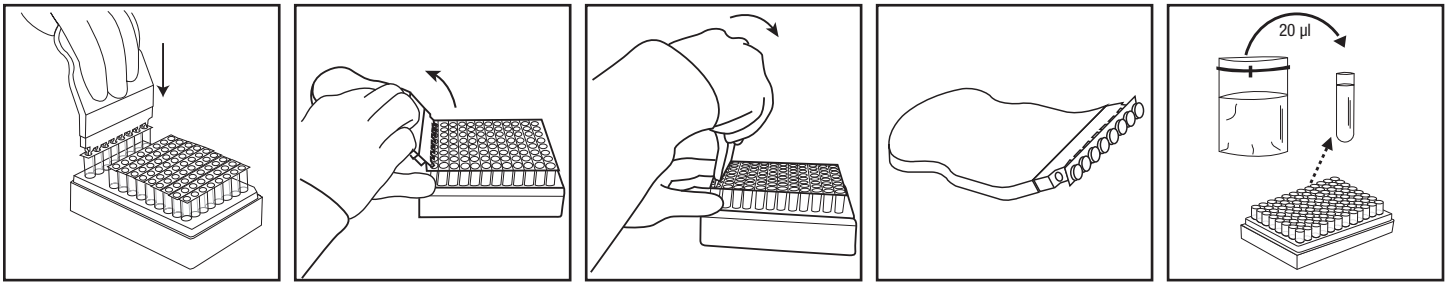
1. 启动 Neogen® 分子检测软件并登录。请联系您的 Neogen Food Safety 代表，确保您拥有该软件的最新版本。
2. 开启 Neogen 分子检测仪器。
3. 使用每个样品的数据创建或编辑运行。有关详细信息，请参阅 Neogen® 分子检测系统用户手册。

说明：Neogen 分子检测仪器必须达到 60°C 的温度并保持在该水平，然后才能插入带有反应管的 Neogen 分子检测快速装载托盘。大约需要 20 分钟才能完成该加热步骤，仪器状态栏上的橙色指示灯亮起时即表示处于加热状态。当仪器准备就绪可以开始运行时，状态栏将变为绿色。

裂解

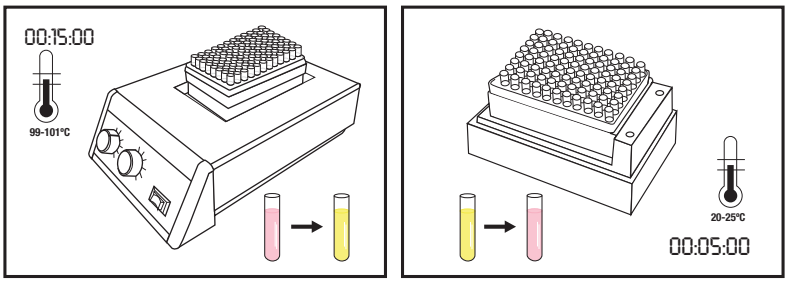
1. 将管架置于室温 (20-25°C) 过夜（16-18 小时），从而让 Neogen 裂解液管预热。要将 Neogen 裂解液管平衡至室温，还有种替代方法，即将 Neogen 裂解液管放置在实验室工作台上至少 2 小时，然后在 37 ± 1°C 的培养箱中孵育 1 小时，或将其放置在 100°C 的干燥双插块加热器中 30 秒。
2. 倒置加盖的试管进行混合。在 4 小时内进行下一步。
3. 从培养箱中取出增菌液体培养基。
4. 每个样品和阴性对照 (NC) 样品（无菌富集培养基）都需要用到一支 Neogen 裂解液管。
   - 4.1 可以将 Neogen 裂解液联管切割成所需管数的 Neogen 裂解液。选择所需管数的 Neogen 裂解液或 8 联管。将 Neogen 裂解液管放置在空管架中。
   - 4.2 为避免交叉污染，每次只给一联管的 Neogen 裂解液去盖，并在每个转移步骤中使用新的移液器吸头。
   - 4.3 将富集样品转移到 Neogen 裂解液管中，如下所述：

     首先将每个富集样品转移到单独的 Neogen 裂解液管中。**最后**转移 NC。
   - 4.4 使用 Neogen® 分子检测加盖/去盖工具（裂解）给一联管的 Neogen 裂解液去盖，每次只给一联管去盖。
   - 4.5 丢弃 Neogen 裂解液管盖，如果需要保留裂解物以备复测，请将管盖放入干净的容器中，以便在裂解后重新应用。
     - 4.5.1 关于保留裂解物的处理方式，请参见附录 A。
   - 4.6 除非方案表 2、表 3 和表 4 中另有说明，否则将 20 µL 样品转移到 Neogen 裂解液管中。



5. 重复步骤 4.3，直到将每个单独的样本添加到联管中相应的 Neogen 裂解液管中。
6. 根据需要，重复步骤 4.1 至 4.6，以获得所需数量的待测试样品。
7. 转移完所有样品后，将 20 µL NC（无菌富集培养基，例如 BPW ISO）转移到 Neogen 裂解液管中。请勿使用水作为 NC。
8. 请验证 Neogen 分子检测加热插块的温度是否为 100 ± 1°C。
9. 将未加盖的 Neogen 裂解液管架放入 Neogen 分子检测加热插块中，加热 15 ± 1 分钟。在加热过程中，Neogen 裂解液将从粉红色（低温）变为黄色（高温）。

   在分析裂解步骤中未经适当热处理的样本可能被视为潜在的生物危害，不得将其插入 Neogen 分子检测仪器。
10. 从加热块上取下未加盖的 Neogen 裂解液管架，然后在 Neogen 分子检测冷却插块中冷却至少 5 分钟，但不得超过 10 分钟。在室温下使用且未用到 Neogen 分子检测冷却块托盘的情况下，Neogen 分子冷却插块应直接放在实验室工作台上。冷却后，裂解液将恢复为粉红色。
11. 从 Neogen 分子检测冷却插块中取下 Neogen 裂解液管架。



扩增

1. 每个样品和 NC 都需要用到一支 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 试剂管。
   - 1.1 可以将联管切割成所需的管数。选择所需管数的单支 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 试剂管或 8 联管。
   - 1.2 将 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 试剂管放置在空管架中。
   - 1.3 避免搅起管底部的试剂颗粒。

2. 选择一支 Neogen 试剂对照管，将其放置在管架中。
3. 为避免交叉污染，每次只给一联管的 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 试剂管去盖，并在每个转移步骤中使用新的移液器吸头。
4. 将裂解物转移到 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 试剂管和 Neogen 试剂对照管中，如下所述：

> **首先**将每个样品裂解物转移到单支 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 试剂管中，然后再转移 NC。**最后**将 Neogen 试剂对照管润湿。

5. 使用 Neogen® 分子检测加盖/去盖工具（试剂）给 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 试剂管去盖，每次只给一联管去盖。丢弃管盖。

   5.1 将 20 µL 样品裂解液从 Neogen 裂解液管中的液体上部 ½（避免沉淀）转移到相应的 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 **试剂管中。以一定角度分液，以避免搅起颗粒。缓缓地上下吸 5 次，使其混合。**

   5.2 重复步骤 5.1，直到将单个样品裂解物添加到联管中相应的 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 试剂管中。

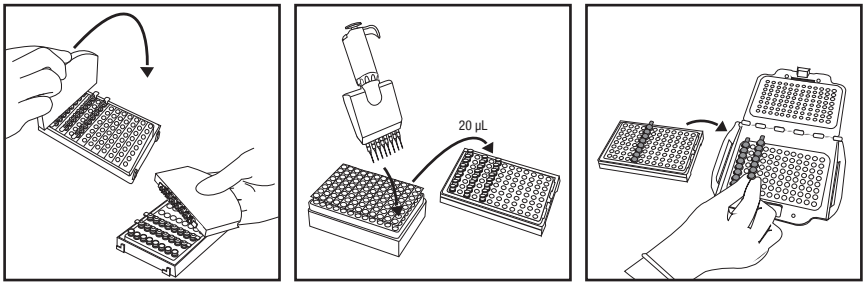
   5.3 用提供的额外管盖盖住 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 试剂管，然后使用 Neogen 分子检测加盖/去盖工具（试剂）的圆形侧面以来回运动的方式施加压力，确保紧紧地压上管盖。

   5.4 根据需要，重复步骤 5.1 至 5.3，以获得所需数量的待测试样品。

   5.5 转移完所有样品裂解物后，重复 5.1 至 5.3，将 20 µL NC 裂解物转移到 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 试剂管中。

   5.6 将 **20 µL NC 裂解物转移到 Neogen 试剂对照管中。**以一定角度分液，以避免搅起颗粒。缓缓地上下吸 5 次，使其混合。

6. 将加盖的试管装入清洁且已去污的 Neogen 分子检测快速装载托盘中。然后合上盖子并插上插销。



7. 在 Neogen 分子检测软件中查看已配置的运行并确认。
8. 单击软件中的“开始”按钮，然后选择要使用的仪器。所选仪器的仪器盖会自动打开。
9. 将 Neogen 分子检测快速装载托盘放入 Neogen 分子检测仪器，然后合上盖子开始分析。60 分钟内即可出具结果，不过检测到阳性所需的时间可能会更短。
10. 分析完成后，将 Neogen 分子检测快速装载托盘从 Neogen 分子检测仪器中取出，将试管浸泡在 1-5%（水溶液，v:v）的家用漂白剂溶液中 1 小时并远离分析准备区，从而通过这种方式进行处置。

> **注意：**为了最大限度地降低因交叉污染而导致的假阳性风险，切勿打开含有扩增 DNA 的试剂管。这包括 Neogen 试剂对照、Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 试剂管和 Neogen 基质对照管。请务必将密封试剂管浸泡在 1-5%（水溶液，v:v）的家用漂白剂溶液中 1 小时并远离分析准备区，从而通过这种方式进行处置。

结果与解读

算法会对检测核酸扩增而产生的光输出曲线进行解读。结果由软件自动分析，并根据结果的不同对其进行颜色编码。对多个具有唯一性的曲线参数进行分析，即可确定结果是阳性还是阴性。推定阳性结果可实时报告，而“阴性并检查”结果则在运行完成后显示。

应根据实验室标准操作程序或遵循适当的参考方法对推定阳性样本进行确认[1,2,3]，首先将初级 BPW ISO 富集液转移到二级增菌液体培养基，然后使用适当的生化和血清学方法对分离株进行电镀和确认。

> **说明：**由于系统和 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 扩增试剂本身就具有“背景”相对光单位 (RLU) 读数，因此即使样品为阴性，读数也不会为零。

如果出现光输出异常的小概率事件，算法会将其标记为“检查”。Neogen 建议用户对任何“检查”样品重复进行分析。如果结果仍然是“检查”，则请使用您偏好的方法或按照当地法规的规定进行确认测试。

如果出现结果不一致的情况[推定阳性与 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 所测得的结果不一致，且未通过上述方法之一进行确认，尤其是乳胶凝集试验]，则实验室必须采取必要步骤确保所获得结果的有效性。

根据经 NF VALIDATION 认证的方法确认结果

按照 NF VALIDATION 的规定，所有由 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 确定为阳性的样本必须通过以下测试之一进行确认：

选项 1：使用 ISO 16654[3] 标准，从缓冲蛋白胨水[3]富集液开始。

选项 2：实施确认方法，具体步骤如下：将 50 µL 缓冲蛋白胨水[3]富集液滴在头孢克肟亚碲酸钾山梨醇麦康凯 (CT-SMAC)[3] 琼脂平板上。在 37°C 下孵育 24 ± 3 小时。将特征菌落划到营养琼脂上，然后直接在分离的菌落上进行乳胶凝集试验。如果 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 的结果未经过确认，则执行免疫磁分离步骤，然后滴 50 µL 到 CT-SMAC 上。

选项 3：使用 EN ISO 7218[5] 标准中所述的核酸探针，对来自 CT-SMAC 的分离菌落（经纯化或未经纯化）进行测试（请参见选项 1 或选项 2）。所用的核酸探针必须与 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 所用的核酸探针不同。

选项 4：使用任何其他经 NF VALIDATION 认证的方法，该方法的原理必须与 Neogen *大肠杆菌* O157（包括 H7）分子检测分析 2 的原理不同。必须使用为该第二种验证方法描述的完整方案。确认开始之前的所有步骤必须对这两种方法通用。

如果出现结果不一致的情况（推定阳性与替代方法所测得的结果不一致，且未通过上述方法之一进行确认），则实验室必须采取必要步骤确保所获得结果的有效性。

如果您对特定应用或程序有疑问，请访问我们的网站（网址：www.neogen.com）或联系您当地的 Neogen 代表或经销商。

附录 A. 方案中断：样品的储存和复测

1. 如需储存经过热处理的裂解物，请用干净的管盖重新盖住裂解管（请参见**裂解**一节，4.5）
2. 如需储存富集样品，请在储存前将其孵育至少 18 小时。
3. 请在 4 至 8°C 下储存，最长不超过 72 小时。
4. 倒置 2-3 次进行混合，从而使储存样品为扩增做好准备。
5. 去掉试管的管盖。
6. 将混合裂解物管放置在 Neogen 分子检测加热插块上，然后在 100 ± 1°C 下加热 5 ± 1 分钟。
7. 从加热块上取下 Neogen 裂解液管架，然后在 Neogen 分子检测冷却插块中冷却至少 5 分钟，但不得超过 10 分钟。
8. 继续执行以上详述的**扩增**一节中的方案。

参考文献：

1. 美国食品药品监督管理局细菌学分析手册。第 4A 章：腹泻性*大肠杆菌*。2015 年 11 月。
2. 美国农业部 (USDA) FSIS 微生物实验室指南 5.09。肉制品、胴体和环境海绵动物中*大肠杆菌* O157:H7 的检测、分离和鉴定。生效日期：2015 年 1 月 15 日。
3. ISO 16654:2001 食品和动物饲料微生物学：*大肠杆菌* O157 的水平检测法。
4. ISO/IEC 17025. 测试和校准实验室能力的一般要求。
5. ISO 7218. 食品和动物饲料微生物学：微生物检验的一般规则。
6. ISO 6887. 食品和动物饲料微生物学：用于微生物检验的供试品、初始悬浮液和十倍稀释液的制备。
7. Neogen® 分子检测系统安装认证 (IQ) /操作认证 (OQ)。Neogen Food Safety。

符号解释

info.neogen.com/symbols

AOAC 是 AOAC INTERNATIONAL 的注册商标

Official Methods 是 AOAC INTERNATIONAL 的注册服务标志

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

NEOGEN®

คำแนะนำผลิตภัณฑ์

ชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7)

คำอธิบายผลิตภัณฑ์และวัตถุประสงค์การใช้งาน

ชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen® ใช้กับระบบการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen® สำหรับการตรวจหาเชื้อ*อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) แบบรวดเร็วและเฉพาะเจาะจงในตัวอย่างอาหารและอาหารสัตว์หลังเพิ่มจำนวนเชื้อ

ชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุลของ Neogen ใช้การเพิ่มขยายจำนวนโดยอาศัยบริเวณลูปที่อุณหภูมิเดียว (loop-mediated isothermal amplification) เพื่อเพิ่มขยายจำนวนชิ้นกรดนิวคลีอิกอย่างรวดเร็วโดยมีความเฉพาะเจาะจงและความไวสูง ร่วมกับการเรืองแสงทางชีวภาพสำหรับการตรวจหาการเพิ่มขยายจำนวน ผลที่สันนิษฐานว่าเป็นบวกจะได้รับการรายงานแบบเรียลไทม์ในขณะที่ผลลบจะแสดงหลังจากการทดสอบเสร็จสมบูรณ์แล้ว ผลที่สันนิษฐานว่าเป็นบวกควรได้รับการยืนยันโดยใช้วิธีการที่คุณเลือกใช้หรือตามที่ข้อบังคับท้องถิ่นกำหนดไว้[1, 2, 3]

ชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen มีวัตถุประสงค์สำหรับใช้ในสภาพแวดล้อมของห้องปฏิบัติการโดยผู้เชี่ยวชาญที่ผ่านการฝึกอบรมเทคนิคในห้องปฏิบัติการ Neogen ยังไม่ได้จัดทำเอกสารเกี่ยวกับการใช้ผลิตภัณฑ์นี้ในอุตสาหกรรมอื่นนอกเหนือจากอาหารหรือเครื่องดื่ม ตัวอย่างเช่น Neogen ยังไม่ได้จัดทำเอกสารเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์นี้สำหรับการทดสอบตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างยา ตัวอย่างเครื่องสำอาง ตัวอย่างทางคลินิก หรือตัวอย่างทางสัตวแพทย์ ชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen ยังไม่ได้รับการประเมินกับผลิตภัณฑ์อาหาร การแปรรูปอาหาร โปรโตคอลการทดสอบที่เป็นไปได้ทั้งหมด หรือประเมินกับแบคทีเรียที่เป็นไปได้ทุกสายพันธุ์

เช่นเดียวกับวิธีการทดสอบทุกวิธี แหล่งที่มา สูตร และคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้ออาจส่งผลต่อผลที่ได้ อีกทั้งปัจจัยต่าง ๆ เช่น วิธีการสุ่มตัวอย่าง โปรโตคอลการทดสอบ การเตรียมตัวอย่าง การจัดการ และเทคนิคในห้องปฏิบัติการก็อาจส่งผลต่อผลที่ได้เช่นกัน Neogen แนะนำให้ทำการประเมินวิธีการ รวมทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ ในสภาพแวดล้อมของผู้ใช้ โดยใช้ตัวอย่างในจำนวนที่เพียงพอซึ่งมีอาหารและการจงใจเติมเชื้อบางอย่าง เพื่อให้แน่ใจว่าวิธีการนั้นตรงตามเกณฑ์ของผู้ใช้

Neogen ได้ประเมินชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen กับน้ำเพปโทนที่มีบัฟเฟอร์ (Buffered Peptone Water ISO)

เครื่องมือการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen® มีวัตถุประสงค์สำหรับใช้กับตัวอย่างที่ผ่านการให้ความร้อนในระหว่างขั้นตอนการย่อยสลายเซลล์ (lysis) ในการทดสอบ ซึ่งออกแบบมาเพื่อทำลายเชื้อที่มีอยู่ในตัวอย่าง ตัวอย่างที่ยังไม่ผ่านการให้ความร้อนอย่างเหมาะสมในระหว่างขั้นตอนการย่อยสลายเซลล์ในการทดสอบอาจถือเป็นสิ่งที่อาจเป็นอันตรายทางชีวภาพ และไม่ควรใส่เข้าไปในเครื่องมือการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen

Neogen Food Safety ได้รับการรับรองตามมาตรฐานองค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน (ISO) 9001 สำหรับการออกแบบและการผลิต

ชุดตรวจสำหรับทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen ประกอบด้วยชุดทดสอบ 96 ตัวอย่างตามที่อธิบายไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1.ส่วนประกอบของชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุลของ Neogen

รายการ	การพิสูจน์เอกลักษณ์	จำนวน	สิ่งที่บรรจุอยู่	ความคิดเห็น
สารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen (Neogen® Lysis Solution (LS))	สารละลายสีชมพูในหลอดใส	96 (12 แถว แถวละ 8 หลอด)	สารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen หลอดละ 580 ไมโครลิตร	จัดเรียงในชั้นวางและพร้อมใช้งาน
หลอดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาในชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen®	หลอดสีชมพู	96 (12 แถว แถวละ 8 หลอด)	สารผสมแบบผงแห้งแช่แข็งสำหรับการเพิ่มขยายจำนวนและการตรวจหาแบบเฉพาะเจาะจง	พร้อมใช้งาน
ฝาสำรอง	ฝาสีชมพู	96 (12 แถว แถวละ 8 ฝา)		พร้อมใช้งาน
ตัวควบคุมดูผลของสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาของ Neogen (Neogen® Reagent Control (RC))	หลอดใสแบบฝาฟลิป	16 (2 ถุง ถุงละ 8 หลอดเดี่ยว ๆ)	สารผสมแบบผงแห้งแช่แข็งของ DNA ที่เป็นตัวควบคุมสำหรับการเพิ่มขยายจำนวนและการตรวจหา	พร้อมใช้งาน

ตัวควบคุมเชิงลบที่ไม่ได้ให้มาในชุดทดสอบคืออาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ เช่น BPW ISO ห้ามใช้น้ำเป็นตัวควบคุมเชิงลบ

ความปลอดภัย

ผู้ใช้ควรอ่าน ทำความเข้าใจ และปฏิบัติตามข้อมูลความปลอดภัยทั้งหมดในคำแนะนำสำหรับระบบการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen และชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen เก็บรักษาคำแนะนำด้านความปลอดภัยไว้เพื่อใช้อ้างอิงในอนาคต

⚠ **คำเตือน:** บ่งชี้สถานการณ์ที่เป็นอันตราย ซึ่งหากไม่หลีกเลี่ยง อาจส่งผลให้เกิดการเสียชีวิตหรือบาดเจ็บสาหัส และ/หรือทรัพย์สินเสียหายได้

ข้อสังเกต บ่งชี้สถานการณ์ที่อาจเป็นอันตราย ซึ่งหากไม่หลีกเลี่ยง อาจส่งผลให้ทรัพย์สินเสียหายได้

⚠ คำเตือน

ห้ามใช้ชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ในการวินิจฉัยภาวะต่าง ๆ ในมนุษย์หรือสัตว์

ผู้ใช้ต้องฝึกอบรมบุคลากรเกี่ยวกับเทคนิคการทดสอบที่เหมาะสมในปัจจุบัน: ตัวอย่างเช่น แนวทางปฏิบัติที่ดีในห้องปฏิบัติการ (Good Laboratory Practices), ISO/IEC 17025[4] หรือ ISO 7218[5]

เพื่อลดความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับผลลบลวงที่นำไปสู่การตรวจปล่อยผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อน:

- ปฏิบัติตามโปรโตคอลและทำการทดสอบตรงตามที่ระบุไว้ในคำแนะนำผลิตภัณฑ์ทุกประการ
- ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่อุ่นล่วงหน้าให้มีอุณหภูมิ 41.5 ± 1°C ห้ามปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิต่ำกว่าช่วงอุณหภูมิการบ่มเพาะเชื้อในระหว่างการเตรียมตัวอย่าง
- เก็บชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen ตามที่ระบุไว้บนบรรจุภัณฑ์และในคำแนะนำผลิตภัณฑ์
- ใช้ชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen ก่อนวันหมดอายุเสมอ
- ใช้ชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) กับตัวอย่างอาหาร ตัวอย่างอาหารสัตว์ และตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมในการแปรรูปอาหาร ซึ่งได้ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องภายในหรือโดยบุคคลภายนอกแล้ว
- ใช้ชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) กับพื้นผิว น้ำยาฆ่าเชื้อ โปรโตคอล และแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งได้ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องภายในหรือโดยบุคคลภายนอกแล้ว
- สำหรับตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมซึ่งประกอบด้วยบัฟเฟอร์สำหรับทำให้เป็นกลาง (Neutralizing Buffer หรือ NB) ที่มีสารประกอบเชิงซ้อนเอริลซัลโฟเนต ให้ทำการเจือจางในอัตราส่วน 1:2 ก่อนการทดสอบ (เติมตัวอย่าง 1 ส่วน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปราศจากเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ 1 ส่วน) อีกทางเลือกหนึ่งคือการดูดอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อที่มีบัฟเฟอร์สำหรับทำให้เป็นกลาง 10 ไมโครลิตร ไปเติมลงในหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen ผลิตภัณฑ์สำหรับการจัดการตัวอย่างของ Neogen® ซึ่งประกอบด้วยบัฟเฟอร์ที่ทำให้เป็นกลางของ Neogen® ที่มีสารประกอบเชิงซ้อนเอริลซัลโฟเนต: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XSLSSL10NB, HS10NB และ HS119510NB

เพื่อลดความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการสัมผัสสารเคมีและสิ่งที่เป็นอันตรายทางชีวภาพ:

- ทำการทดสอบจุลินทรีย์ก่อโรคในห้องปฏิบัติการที่มีอุปกรณ์เหมาะสมภายใต้การควบคุมของบุคลากรที่ผ่านการฝึกอบรม อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อซึ่งผ่านการบ่มเพาะเชื้อแล้ว รวมทั้งอุปกรณ์หรือพื้นผิวต่าง ๆ ที่มีการสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อซึ่งผ่านการบ่มเพาะเชื้อแล้วอาจมีจุลินทรีย์ก่อโรคในระดับเพียงพอที่จะก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์
- ปฏิบัติตามแนวทางปฏิบัติมาตรฐานด้านความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการเสมอ ซึ่งรวมถึงการสวมชุดป้องกันและอุปกรณ์ป้องกันดวงตาที่เหมาะสมขณะจัดการกับสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาและตัวอย่างที่มีการปนเปื้อน
- หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับสิ่งที่บรรจุอยู่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อและหลอดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาหลังจากการเพิ่มขยายจำนวน
- กำจัดตัวอย่างหลังเพิ่มจำนวนเชื้อและของเสียที่มีการปนเปื้อนที่เกี่ยวข้องตามมาตรฐานของท้องถิ่น/ภูมิภาค/ประเทศ/อุตสาหกรรมในปัจจุบัน
- ห้ามตั้งอุณหภูมิเครื่องทำความร้อนเกินอุณหภูมิที่แนะนำ
- ห้ามให้ความร้อนเกินเวลาที่แนะนำ
- ใช้เทอร์โมมิเตอร์ที่เหมาะสมและสอบเทียบแล้วเพื่อตรวจสอบยืนยันอุณหภูมิของฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen® (เช่น เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มบางส่วนหรือเทอร์โมมิเตอร์คู่ควบอุณหภูมิแบบดิจิทัล ที่ไม่ใช่เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มทั้งหมด) โดยจะต้องวางเทอร์โมมิเตอร์ในบริเวณที่กำหนดไว้ของฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen

เพื่อลดความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนข้ามในขณะที่เตรียมชุดทดสอบ:

- สวมถุงมือเสมอ (เพื่อปกป้องผู้ใช้และป้องกันการเกิดนิวคลีเอส)

เพื่อลดความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการสัมผัสของเหลวร้อน:

- ห้ามตั้งอุณหภูมิเครื่องทำความร้อนเกินอุณหภูมิที่แนะนำ
- ห้ามให้ความร้อนเกินเวลาที่แนะนำ
- ใช้เทอร์โมมิเตอร์ที่เหมาะสมและสอบเทียบแล้วเพื่อตรวจสอบยืนยันอุณหภูมิของฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen® (เช่น เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มบางส่วนหรือเทอร์โมมิเตอร์คู่ควบอุณหภูมิแบบดิจิทัล ที่ไม่ใช่เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มทั้งหมด) โดยจะต้องวางเทอร์โมมิเตอร์ในบริเวณที่กำหนดไว้ของฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen

ข้อสังเกต

เพื่อลดความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนข้ามในขณะที่เตรียมชุดทดสอบ:

- แนะนำให้ใช้ปิเปตที่ประดับชีววิทยาโมเลกุลที่มีตัวกันละอองลอย (มีตัวกรอง) และปราศจากเชื้อ
- ใช้ปิเปตทิปอันใหม่สำหรับการดูดจ่ายตัวอย่างแต่ละครั้ง
- ใช้แนวทางปฏิบัติที่ดีในห้องปฏิบัติการในการดูดจ่ายตัวอย่างจากหลอดเพิ่มจำนวนเชื้อไปยังหลอดย่อยสลายเซลล์ เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของปิเปต ผู้ใช้อาจเลือกที่จะเพิ่มขั้นตอนขั้นกลางในการดูดจ่ายตัวอย่าง ตัวอย่างเช่น ผู้ใช้อาจดูดจ่ายตัวอย่างหลังเพิ่มจำนวนเชื้อแต่ละตัวอย่างลงในหลอดปราศจากเชื้อ
- ใช้โต๊ะปฏิบัติการทางชีววิทยาโมเลกุลที่มีหลอดไฟฆ่าเชื้อ หากมี

เพื่อลดความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับผลบวกลวง:

- ห้ามเปิดหลอดต่าง ๆ หลังการเพิ่มขยายจำนวน
- กำจัดหลอดที่มีการปนเปื้อนแล้วเสมอ โดยแช่ในสารละลายฟอกขาวในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (โดยปริมาตรในน้ำ) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และห่างจากบริเวณที่เตรียมชุดทดสอบ

ศึกษาเอกสารข้อมูลความปลอดภัยสำหรับข้อมูลเพิ่มเติมและข้อบังคับการกำจัดของท้องถิ่น

หากคุณมีข้อสงสัยเกี่ยวกับแอปพลิเคชันหรือขั้นตอนที่เฉพาะเจาะจง โปรดไปที่เว็บไซต์ของเราที่ www.neogen.com หรือติดต่อตัวแทนหรือผู้จัดจำหน่าย Neogen ในท้องถิ่นของคุณ

ความรับผิดชอบของผู้ใช้

ผู้ใช้มีหน้าที่รับผิดชอบในการทำความคุ้นเคยกับคำแนะนำและข้อมูลผลิตภัณฑ์ โปรดไปที่เว็บไซต์ของเราที่ **www.neogen.com** หรือติดต่อตัวแทนหรือผู้จัดจำหน่าย Neogen ในท้องถิ่นของคุณหากต้องการข้อมูลเพิ่มเติม

เมื่อเลือกวิธีการทดสอบ สิ่งสำคัญคือต้องตระหนักว่าปัจจัยภายนอก เช่น วิธีการสุ่มตัวอย่าง โปรโตคอลการทดสอบ การเตรียมตัวอย่าง การจัดการ และเทคนิคในห้องปฏิบัติการ อาจส่งผลต่อผลที่ได

ผู้ใช้มีหน้าที่รับผิดชอบในการเลือกวิธีการทดสอบหรือผลิตภัณฑ์ใด ๆ เพื่อประเมินตัวอย่างในจำนวนที่เพียงพอซึ่งมีเมทริกซ์และการจงใจเติมเชื้อที่เหมาะสม เพื่อให้ผู้ใช้แน่ใจว่าวิธีการทดสอบที่เลือกตรงตามเกณฑ์ของผู้ใช้

นอกจากนี้ผู้ใช้ยังมีหน้าที่รับผิดชอบในการประเมินว่าวิธีการทดสอบใด ๆ และผลที่ได้นั้นเป็นไปตามข้อกำหนดของลูกค้าและซัพพลายเออร์

เช่นเดียวกับวิธีการทดสอบใด ๆ ผลที่ได้จากการใช้ผลิตภัณฑ์ Neogen Food Safety ใดก็ตามไม่ถือเป็นการรับประกันคุณภาพของเมทริกซ์หรือกระบวนการที่ทดสอบ

เพื่อช่วยลูกค้าประเมินวิธีการสำหรับเมทริกซ์ชนิดต่าง ๆ ในอาหาร Neogen ได้พัฒนาชุดตัวควบคุมดูผลของเมทริกซ์ในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen® เมื่อต้องการ ให้ใช้ตัวควบคุมดูผลของเมทริกซ (Matrix Control หรือ MC) เพื่อประเมินว่าเมทริกซสามารถส่งผลกระทบหรือไม่ต่อผลที่ได้จากชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์กอโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen โดยให้ทดสอบหลาย ๆ ตัวอย่างซึ่งเป็นตัวแทนของเมทริกซ กลาวคือ ตัวอย่างที่ได้มาจากแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกัน ในช่วงระยะเวลาใด ๆ ของการตรวจสอบความถูกต้อง เมื่อนำวิธีการของ Neogen มาใช้ หรือเมื่อทดสอบเมทริกซ์ใหม่หรือเมทริกซ์ที่ไม่รู้จักหรือเมทริกซ์ที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบหรือกระบวนการ

เมทริกซ์สามารถหมายถึงผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติในตัว เช่น ส่วนประกอบและกระบวนการ ความแตกต่างระหว่างเมทริกซ์ชนิดต่าง ๆ อาจเป็นเพียงผลที่เกิดจากความแตกต่างของการแปรรูปหรือสภาพลักษณะ ตัวอย่างเช่น ดิบเทียบกับผ่านการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอไรส์ สดเทียบกับแห้ง

การจำกัดการรับประกัน / การชดเชยแบบจำกัด

ยกเว้นตามที่ระบุไว้อย่างชัดแจ้งในหัวข้อการรับประกันแบบจำกัดในบรรจุภัณฑ์ของผลิตภัณฑ์แต่ละชิ้น NEOGEN ปฏิเสธการรับประกันโดยชัดแจ้งและโดยนัยทั้งหมด ซึ่งรวมถึงแต่ไม่จำกัดเพียงการรับประกันใด ๆ ถึงความสามารถในการวางจำหน่ายหรือความเหมาะสมสำหรับการใช้งานโดยเฉพาะ หากผลิตภัณฑ์ใด ๆ ของ Neogen Food Safety มีข้อบกพร่อง Neogen หรือผู้จัดจำหน่ายที่ได้รับอนุญาตจะพิจารณาเลือกเปลี่ยนแทนผลิตภัณฑ์หรือคืนเงินตามราคาซื้อของผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ซึ่งเป็นการชดเชยพิเศษของคุณ คุณต้องแจ้ง Neogen ทันทีภายในหกสิบวันหลังจากเกิดข้อสงสัยว่าผลิตภัณฑ์มีข้อบกพร่องใด ๆ และส่งผลิตภัณฑ์คืนให้กับ Neogen โปรดติดต่อตัวแทน Neogen ของคุณหรือผู้จัดจำหน่าย Neogen ที่ได้รับอนุญาตหากมีคำถามเพิ่มเติม

การจำกัดความรับผิดของ Neogen

NEOGEN จะไม่รับผิดต่อความสูญเสียหรือความเสียหายใด ๆ ไม่ว่าจะเป็นความเสียหายโดยตรง ความเสียหายโดยอ้อม ความเสียหายเฉพาะ ความเสียหายอันเนื่องมาจากการผิดสัญญา หรือความเสียหายสืบเนื่อง ซึ่งรวมถึงแต่ไม่จำกัดเพียงการสูญเสียผลกำไร ไม่ว่าในกรณีใดก็ตาม ความรับผิดของ Neogen ภายใต้ทฤษฎีทางกฎหมายใดก็ตามจะไม่เกินราคาซื้อของผลิตภัณฑ์ที่ถูกกล่าวหาว่ามีข้อบกพร่อง

การจัดเก็บและการกำจัด

เก็บชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์กอโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen ไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C ห้ามแช่แข็ง เก็บชุดทดสอบให้พ้นแสงในระหว่างการจัดเก็บ หลังจากเปิดชุดทดสอบแล้ว ให้ตรวจสอบว่าถุงฟอยล์ไม่ได้รับความเสียหาย ห้ามใช้หากถุงได้รับความเสียหาย หลังจากเปิดแล้ว ควรเก็บหลอดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาที่ยังไม่ได้ใช้ไว้ในถุงที่ปิดผนึกซ้ำได้เสมอโดยมีสารดูดความชื้นอยู่ภายในเพื่อรักษาความคงตัวของสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาซึ่งเป็นผงแห้งแช่แข็ง เก็บถุงที่ปิดผนึกซ้ำไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C เป็นเวลาไม่เกิน 60 วัน

ห้ามใช้ชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen เมื่อเลยวันหมดอายุไปแล้ว วันหมดอายุและหมายเลขล็อตมีระบุไว้บนฉลากด้านนอกของกล่อง หลังจากใช้งาน อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อและหลอดของชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์กอโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) อาจมีสารกอโรคอยู่ เมื่อการทดสอบเสร็จสมบูรณ์ ให้ปฏิบัติตามมาตรฐานอุตสาหกรรมในปัจจุบันสำหรับการกำจัดของเสียที่มีการปนเปื้อน ศึกษาเอกสารข้อมูลความปลอดภัยสำหรับข้อมูลเพิ่มเติมและข้อบังคับการกำจัดของท้องถิ่น

คำแนะนำการใช้งาน

ปฏิบัติตามคำแนะนำทั้งหมดอย่างละเอียดรอบคอบ การไม่ปฏิบัติตามอาจทำให้ได้ผลที่ไม่ถูกต้อง

ผู้ใช้ควรผ่านการฝึกอบรมการตรวจรับรองผู้ปฏิบัติงานระบบการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen ตามที่อธิบายไว้ในเอกสาร “โปรโตคอลการตรวจรับรองการติดตั้ง (Installation Qualification หรือ IQ) / การตรวจรับรองการทำงาน (Operational Qualification หรือ OQ) และคำแนะนำสำหรับระบบการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen”[7]

ฆ่าเชื้อโต๊ะปฏิบัติการและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ (ปีเปต เครื่องมือเปิด/ปิดฝา เป็นต้น) เป็นระยะ ๆ ด้วยสารละลายฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (โดยปริมาตรในน้ำ) หรือสารละลายกำจัดดีเอ็นเอ

ดูหัวข้อ “คำแนะนำเฉพาะสำหรับวิธีที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้อง” หากต้องการทราบข้อกำหนดที่เฉพาะเจาะจง

ตารางที่ 3 สำหรับโปรโตคอลการเพิ่มจำนวนเชื้อตาม AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2017.01

ตารางที่ 4 สำหรับโปรโตคอลการเพิ่มจำนวนเชื้อตามใบรับรองการตรวจสอบ NF เลขที่ 3M 01/18-05/17

การเพิ่มจำนวนเชื้อในตัวอย่าง

ตารางที่ 2, 3 หรือ 4 นำเสนอคำแนะนำสำหรับโปรโตคอลการเพิ่มจำนวนเชื้อสำหรับอาหาร ผู้ใช้มีหน้าที่รับผิดชอบในการตรวจสอบความถูกต้องของโปรโตคอลการสุ่มตัวอย่างสำรองหรืออัตราส่วนในการเจือจาง เพื่อให้แน่ใจว่าวิธีการทดสอบนี้ตรงตามเกณฑ์ของผู้ใช้

อาหาร

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ BPW ISO ที่อุ่นล่วงหน้าให้มีอุณหภูมิ 41.5 ± 1°C
2. ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อกับตัวอย่างด้วยเทคนิคปลอดเชื้อตามตารางที่ 2, 3 หรือ 4 แนะนำให้ใช้ถุงกรองสำหรับตัวอย่างเนื้อสัตว์และและตัวอย่างที่มีอนุภาคจำนวนมากทั้งหมด
3. ปั่นผสมให้เมทริกซ์ทั้งหมดเป็นเนื้อเดียวกันโดยสมบูรณ์ด้วยการปั่น การตีบดผสมจากนอกถุง หรือการผสมด้วยมือเป็นเวลา 2 ± 0.2 นาที ยกเว้นพืชผักที่เป็นใบและผลไม้ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 41.5 ± 1°C เป็นเวลาที่เหมาะสมตามตารางที่ 2, 3 หรือ 4

ตารางที่ 2. โปรโตคอลการเพิ่มจำนวนเชื้อโดยทั่วไป

เมทริกซ์ในตัวอย่าง(ก)	ขนาดตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ (มิลลิลิตร)	อุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (±1°C)	เวลาในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)
เนื้อวัวดิบ รวมทั้งที่บด / สับและตัดแต่ง	325 กรัม	BPW ISO (อุ่นล่วงหน้า) 975 มิลลิลิตร	41.5	10-18
เนื้อสัตว์ดิบ รวมทั้งเนื้อวัวดิบ เนื้อหมูดิบ เนื้อสัตว์ปีกดิบ เนื้อแกะดิบ และเนื้อวัวกระทิงดิบ	25 กรัม	BPW ISO (อุ่นล่วงหน้า) 225 มิลลิลิตร	41.5	8-18
พืชผักที่เป็นใบ(ข)	200 กรัม	BPW ISO (อุ่นล่วงหน้า) 450 มิลลิลิตร	41.5	18-24
อาหารอื่น ๆ รวมทั้งผลไม้(ข) ผัก น้ำผลไม้/น้ำผัก สมุนไพรสด อาหารทะเลดิบ ไข่ดิบ นมดิบ แป้งคุกกี้ และเนื้อสัตว์แปรรูป	25 กรัม	BPW ISO (อุ่นล่วงหน้า) 225 มิลลิลิตร	41.5	18-24
วอลนัทหรือถั่วผสมที่มีวอลนัท (โปรโตคอลนี้เหมาะสำหรับถั่วอื่น ๆ รวมทั้งพีแคน อัลมอนด์ ถั่วพิสตาชิโอ เม็ดมะม่วงหิมพานต์ และเกาลัด	25 กรัม	นมผงขาดมันเนยผสมน้ำก่อนใช้ 225 มิลลิลิตร	41.5	18-24

(ก) ควรปรับสมดุลตัวอย่างแช่แข็งให้อยู่ที่อุณหภูมิ 4-8°C ก่อนเติมอาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ

(ข) ตัวอย่างพืชผักที่เป็นใบและตัวอย่างผลไม้ควรเขย่าด้วยมือเบา ๆ เป็นเวลา 5 นาที ห้ามปั่นหรือตีบดผสมจากนอกถุง

คำแนะนำเฉพาะสำหรับวิธีที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้อง

AOAC® *Official Methods of Analysis*℠ 2017.01

ในโปรแกรม AOAC *Official Method of Analysis*℠ พบว่าชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจหาเชื้อ*อีโคไล* O157:H7 เมทริกซ์ที่ทดสอบในการศึกษาวิจัยแสดงอยู่ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3. โปรโตคอลการเพิ่มจำนวนเชื้อโดยใช้ BPW ISO ที่อุ่นล่วงหน้าให้มีอุณหภูมิ 41.5 ± 1°C ตาม AOAC® *Official Methods*℠ 2017.01

เมทริกซ์ในตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ (มิลลิลิตร)	เวลาในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)	ปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว
เนื้อวัวดิบบด (เนื้อแดง 73%)	325 กรัม	975	10-18	ด้วยตนเองโดยใช้มือหรือโดยการตีบดผสมจากนอกถุง
ผักโขมดิบบรรจุถุง(ก)	200 กรัม	450	18-24	เขย่าด้วยมือเบา ๆ เป็นเวลา 5 นาที ห้ามปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
ถั่วงอกสด	25 กรัม	225	18-24	เขย่าด้วยมือเบา ๆ เป็นเวลา 5 นาที ห้ามปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
บลูเบอร์รี่แช่แข็ง(ก)(ข)	25 กรัม	225	18-24	เขย่าด้วยมือเบา ๆ เป็นเวลา 5 นาที ห้ามปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

(ก) ตัวอย่างพืชผักที่เป็นใบและตัวอย่างผลไม้ควรเขย่าด้วยมือเบา ๆ เป็นเวลา 5 นาที ห้ามปั่นหรือตีบดผสมจากนอกถุง

(ข) ควรปรับสมดุลตัวอย่างแช่แข็งให้อยู่ที่อุณหภูมิ 4-8°C ก่อนเติมอาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ

การตรวจสอบ NF ที่ได้รับการรับรองจาก AFNOR

3M 01/18-05/17

วิธีการตรวจวิเคราะห์ทางเลือกสำหรับธุรกิจการเกษตร

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

หากต้องการข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับการสิ้นสุดอายุการใช้งาน โปรดดูใบรับรองการตรวจสอบ NF ที่มีอยู่ในเว็บไซต์ที่กล่าวถึงข้างต้น

วิธีการตรวจสอบ NF ที่ได้รับการรับรองซึ่งปฏิบัติตาม ISO 16140-2[8] โดยเปรียบเทียบ ISO 16654[3]

ขอบเขตของการตรวจสอบ: เนื้อวัวดิบ ผลิตภัณฑ์นมดิบ ผลไม้และผักดิบ

การเตรียมตัวอย่าง: ควรเตรียมตัวอย่างตาม EN ISO 16654 และ EN ISO 6887[6]

เวอร์ชันของซอฟต์แวร์: ดูใบรับรอง

ตารางที่ 4. โปรโตคอลการเพิ่มจำนวนเชื้อโดยใช้ BPW ISO ที่อุ่นล่วงหน้าให้มีอุณหภูมิ 41.5 ± 1°C ตามวิธีการตรวจสอบ NF ที่ได้รับการรับรอง 3M 01/18-05/17

โปรโตคอล	ขนาดตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ (มิลลิลิตร)	อุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (±1°C)	เวลาในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)
ผลิตภัณฑ์นมดิบ ผลไม้ดิบ และผักดิบ	25 กรัม	225	41.5	18-24
เนื้อวัวดิบ	25 กรัม	225	41.5	8-24

หมายเหตุ:

- ตัวอย่างที่มีขนาดมากกว่า 25 กรัมยังไม่ได้รับการทดสอบในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการตรวจสอบ NF
- จุดที่แนะนำในการหยุดโปรโตคอลชั่วคราวคือหลังจากการเพิ่มจำนวนเชื้อหรือหลังจากการยอยสลายตัวอย่าง อาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อหรือสารจากการยอยสลายตัวอย่าง (sample lysate) สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C ได้ไม่เกิน 72 ชั่วโมง หลังจากนำอาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อออกจากที่จัดเก็บแล้ว ให้ทำการทดสอบต่อจากขั้นตอนที่ 1 ในหัวข้อ**การยอยสลายเซลล์** หลังจากนำสารจากการยอยสลายตัวอย่างออกจากที่จัดเก็บแล้ว ให้ทำการทดสอบต่อจากขั้นตอนที่ 7 ในหัวข้อ**การยอยสลายเซลล์** สารจากการยอยสลายตัวอย่างสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ได้อีกด้วย
- โปรโตคอลการเพิ่มจำนวนเชื้อแบบสั้นมีความไวต่อสภาวะการบ่มเพาะเชื้อและต้องใช้อุณหภูมิที่ระบุไว้ในโปรโตคอล ควรตรวจสอบยืนยันอุณหภูมิของอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิหรือตู้บ่มเพาะเชื้อที่ใช้อุ่นอาหารเหลวล่วงหน้าเพื่อให้แน่ใจว่าอาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อมีอุณหภูมิที่ต้องการ เวลาทั้งหมดสำหรับการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งรวมถึงการเสียเวลาระหว่างจุดสิ้นสุดของขั้นตอนการอุ่นอาหารเลี้ยงเชื้อล่วงหน้ากับจุดเริ่มต้นของการบ่มเพาะเชื้อตัวอย่างอาหารต้องไม่เกิน 45 นาที แนะนำให้ใช้ตู้บ่มเพาะเชื้อที่มีการระบายอากาศ

การเตรียมถาดสำหรับใส่หลอดทดสอบแบบรวดเร็วในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen (Neogen® Molecular Detection Speed Loader Tray)

1. ชุบผ้าหรือกระดาษเช็ดมือแบบใช้แล้วทิ้งในสารละลายฟอกขาวในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (โดยปริมาตรในน้ำ) แล้วเช็ดถาดสำหรับใส่หลอดทดสอบแบบรวดเร็วในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen
2. ใช้น้ำล้างถาดสำหรับใส่หลอดทดสอบแบบรวดเร็วในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen
3. ใช้กระดาษเช็ดมือแบบใช้แล้วทิ้งเช็ดถาดสำหรับใส่หลอดทดสอบแบบรวดเร็วในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen ให้แห้ง
4. ตรวจสอบให้แน่ใจว่าถาดสำหรับใส่หลอดทดสอบแบบรวดเร็วในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen แห้งสนิทก่อนใช้งาน

การเตรียมชิลบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen (Neogen® Molecular Detection Chill Block Insert)

วางชิลบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen ไว้บนโต๊ะปฏิบัติการโดยตรง: ไม่ได้ใช้ถาดชิลบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen ใช้บล็อกที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการโดยรอบ (20-25°C)

การเตรียมฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert)

ใส่ฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen ลงในชุดเครื่องทำความร้อนแบบบล็อกคู่แห้ง: เปิดชุดเครื่องทำความร้อนแบบบล็อกแห้งและตั้งอุณหภูมิเพื่อให้ฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen มีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึงและคงอยู่ที่ 100 ± 1°C

หมายเหตุ: ขึ้นอยู่กับเครื่องทำความร้อน ให้รอประมาณ 30 นาทีเพื่อให้ฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen มีอุณหภูมิที่กำหนด ตรวจสอบยืนยันว่าฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen มีอุณหภูมิ 100 ± 1°C โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ที่เหมาะสมและสอบเทียบแล้ว (เช่น เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มบางส่วน เทอร์โมมิเตอร์คู่ควบอุณหภูมิแบบดิจิทัล ที่ไม่ใช่เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มทั้งหมด) วางไว้ในบริเวณที่กำหนด

การเตรียมเครื่องมือการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen (Neogen® Molecular Detection Instrument)

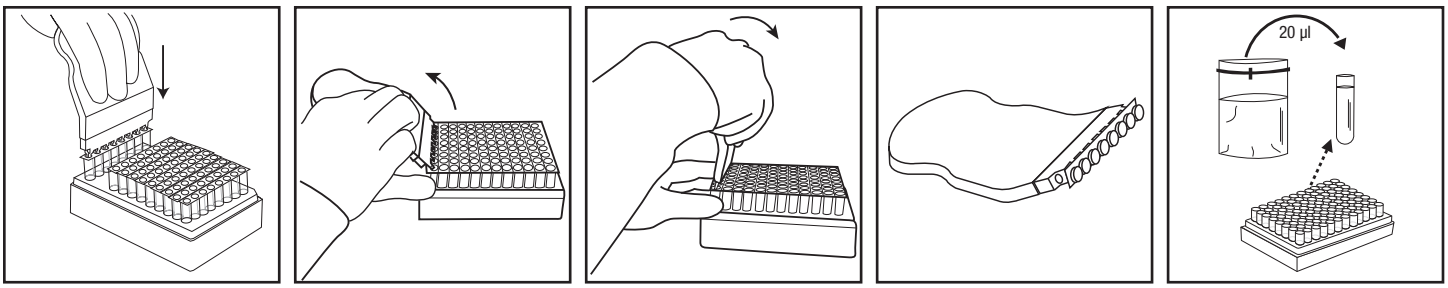
1. เริ่มต้นการใช้งานซอฟต์แวร์การตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen (Neogen® Molecular Detection Software) และเข้าสู่ระบบ ติดต่อตัวแทน Neogen Food Safety ของคุณเพื่อให้แน่ใจว่าคุณมีซอฟต์แวร์เวอร์ชันที่อัปเดตล่าสุด
2. เปิดเครื่องมือการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen
3. สร้างหรือแก้ไขการรันด้วยข้อมูลสำหรับแต่ละตัวอย่าง ดูรายละเอียดในคู่มือการใช้ระบบการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen®

หมายเหตุ: เครื่องมือการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen ต้องมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึงและคงอยู่ที่ 60°C ก่อนที่จะใส่ถาดสำหรับใส่หลอดทดสอบแบบรวดเร็วในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen ซึ่งมีหลอดปฏิกิริยาอยู่ ขั้นตอนการทำความร้อนนี้ใช้เวลาประมาณ 20 นาทีและจะบ่งชี้ด้วยไฟสีส้มบนแถบสถานะของเครื่องมือ เมื่อเครื่องมือพร้อมที่จะเริ่มต้นการรัน แถบสถานะจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว

การย่อยสลายเซลล์

1. ปล่อยให้หลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen อุ่นขึ้นโดยวางชั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20-25°C) ข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) ทางเลือกอื่น ๆ ในการปรับสมดุลหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen ให้อยู่ที่อุณหภูมิห้องคือการวางหลอดหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen ไว้บนโต๊ะปฏิบัติการเป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง บ่มหลอดหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen ในตู้บ่มเพาะเชื้อที่มีอุณหภูมิ 37 ± 1°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือวางไว้ในเครื่องทำความร้อนแบบบล็อกคู่แห้งเป็นเวลา 30 วินาทีที่อุณหภูมิ 100°C
2. พลิกกลับหลอดที่ปิดฝาแล้วเพื่อผสม ดำเนินการขั้นตอนต่อไปภายใน 4 ชั่วโมง
3. นำอาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อออกจากตู้บ่มเพาะเชื้อ
4. ต้องใช้สารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen หนึ่งหลอดสำหรับแต่ละตัวอย่างและตัวอย่างที่เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (Negative Control หรือ NC) (อาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ)
   - 4.1 สามารถตัดแถวของหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen ให้มีจำนวนหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen ที่ต้องการได้ เลือกจำนวนหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen เดี่ยว ๆ หรือจำนวนแถวที่มี 8 หลอดตามที่ต้องการ ใส่หลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen ลงในชั้นวางเปล่า
   - 4.2 เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนข้าม ให้เปิดฝาหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen ออกทีละแถว และใช้ปีเปตทิปอันใหม่สำหรับการดูดจ่ายแต่ละขั้นตอน
   - 4.3 ดูดจ่ายตัวอย่างหลังเพิ่มจำนวนเชื้อใส่ลงในหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen ตามที่อธิบายไว้ด้านล่าง:

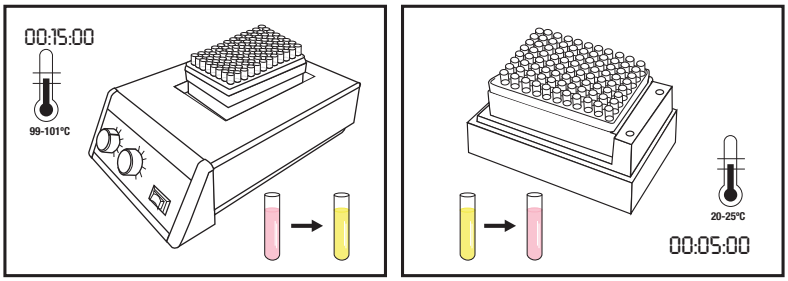
     ดูดจ่ายตัวอย่างหลังเพิ่มจำนวนเชื้อแต่ละตัวอย่างใส่ลงในหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen แต่ละหลอด**ก่อน** ดูดจ่ายตัวควบคุมเชิงลบ (NC) **หลังสุด**
   - 4.4 ใช้เครื่องมือเปิด/ปิดฝาในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen (Neogen® Molecular Detection Cap/Decap Tool) สำหรับการย่อยสลายเซลล เพื่อเปิดฝาหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen ออกหนึ่งแถวโดยเปิดทีละแถว
   - 4.5 ทิ้งฝาหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen แต่หากจะเก็บสารจากการย่อยสลายเซลล์ไว้เพื่อทดสอบซ้ำ ให้ใส่ฝาลงในภาชนะที่สะอาดเพื่อนำไปใช้ซ้ำหลังจากการย่อยสลายเซลล์
     - 4.5.1 หากต้องการข้อมูลเกี่ยวกับการจัดการกับสารจากการย่อยสลายเซลล์ที่เก็บไว้ ดูภาคผนวก ก
   - 4.6 ดูดตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ไปเติมลงในหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen เว้นแต่จะระบุไว้เป็นอย่างอื่นในโปรโตคอลตามตารางที่ 2, 3 และ 4



5. ทำขั้นตอนที่ 4.3 ซ้ำจนกว่าจะเติมแต่ละตัวอย่างลงในหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen สำหรับตัวอย่างนั้นจนครบทั้งแถว
6. ทำขั้นตอนที่ 4.1 ถึง 4.6 ซ้ำเท่าที่จำเป็นตามจำนวนตัวอย่างที่จะทดสอบ
7. เมื่อดูดจ่ายตัวอย่างทั้งหมดแล้ว ให้ดูด NC (อาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ เช่น BPW ISO) 20 ไมโครลิตร ไปเติมลงในหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen ห้ามใช้น้ำเป็น NC
8. ตรวจสอบยืนยันว่าฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen มีอุณหภูมิ 100 ± 1°C
9. นำชั้นวางที่มีหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen ซึ่งไม่ปิดฝาไปวางในฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen แล้วให้ความร้อนเป็นเวลา 15 ± 1 นาที ในระหว่างการให้ความร้อน สารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen จะเปลี่ยนจากสีชมพู (เย็น) เป็นสีเหลือง (ร้อน)

   ตัวอย่างที่ยังไม่ผ่านการให้ความร้อนอย่างเหมาะสมในระหว่างขั้นตอนการย่อยสลายเซลล์ในการทดสอบอาจถือเป็นสิ่งที่อาจเป็นอันตรายทางชีวภาพและไม่ควรใส่เข้าไปในเครื่องมือการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen

10. นำชั้นวางที่มีหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen ซึ่งไม่ปิดฝาออกจากบล็อกทำความร้อน และปล่อยให้เย็นในซิลบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen อย่างน้อย 5 นาทีและไม่เกิน 10 นาที หากใช้ที่อุณหภูมิโดยรอบโดยไม่มีถาดซิลบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen ควรวางซิลบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen ไว้บนโต๊ะปฏิบัติการโดยตรง เมื่อเย็นแล้วสารละลายย่อยสลายเซลล์จะเปลี่ยนกลับเป็นสีชมพู
11. นำชั้นวางที่มีหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen ออกจากซิลบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen

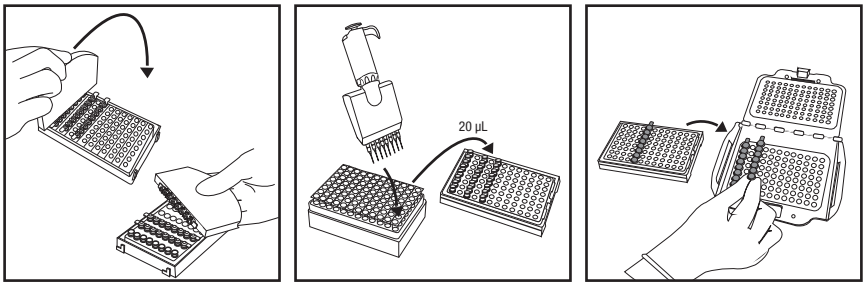


การเพิ่มขยายจำนวน

1. ต้องใช้หลอดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาในชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) หนึ่งหลอดสำหรับแต่ละตัวอย่างและ NC
   1.1 สามารถตัดแถวของหลอดให้มีจำนวนหลอดที่ต้องการได้ เลือกจำนวนหลอดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาในชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) เดี่ยว ๆ หรือจำนวนแถวที่มี 8 หลอดตามที่ต้องการ
   1.2 ใส่หลอดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาในชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen ลงในชั้นวางเปล่า
   1.3 หลีกเลี่ยงการรบกวนเม็ดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาขึ้นมาจากก้นหลอด
2. เลือกหลอดตัวควบคุมดูผลของสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาของ Neogen มาหนึ่งหลอดแล้วใส่ลงในชั้นวาง
3. เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนข้าม ให้เปิดฝาหลอดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาในชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ออกทีละแถว และใช้ปิเปตทิปอันใหม่สำหรับการดูดจายแต่ละขั้นตอน
4. ดูดจ่ายสารจากการย่อยสลายเซลล์ใส่ลงในหลอดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาในชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) หนึ่งหลอด และหลอดตัวควบคุมดูผลของสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาของ Neogen อีกหนึ่งหลอด ตามที่อธิบายไว้ด้านล่าง:

> ดูดจ่ายสารจากการย่อยสลายแต่ละตัวอย่างใส่ลงในหลอดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาในชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) แต่ละหลอด**ก่อน** แล้วค่อยดูดจาย NC เติมน้ำลงในหลอดตัวควบคุมดูผลของสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาของ Neogen **หลังสุด**

5. ใช้เครื่องมือเปิด/ปิดฝาในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen® สำหรับสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา เพื่อเปิดฝาหลอดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาในชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ออกทีละแถว แล้วทิ้งฝา
   5.1 ดูดสารจากการย่อยสลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร จากของเหลวครึ่งบน (หลีกเลี่ยงตะกอน) ในหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen ไปเติมลงในหลอดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาในชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) **ของ Neogen โดยปล่อยสารละลายด้านข้างหลอดเพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนเม็ดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา ผสมโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นและปล่อยลงเบา ๆ 5 ครั้ง**
   5.2 ทำขั้นตอนที่ 5.1 ซ้ำจนกว่าจะเติมสารจากการย่อยสลายแต่ละตัวอย่างลงในหลอดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาในชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen สำหรับตัวอย่างนั้นจนครบทั้งแถว
   5.3 ปิดหลอดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาในชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen ด้วยฝาสำรองที่ให้มา แล้วใช้ด้านโค้งมนของเครื่องมือเปิด/ปิดฝาในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen สำหรับสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา เพื่อออกแรงกดกลับไปกลับมาให้แน่ใจว่าฝาปิดแน่นแล้ว
   5.4 ทำขั้นตอนที่ 5.1 ถึง 5.3 ซ้ำเท่าที่จำเป็นตามจำนวนตัวอย่างที่จะทดสอบ
   5.5 เมื่อดูดจ่ายสารจากการย่อยสลายตัวอย่างทั้งหมดแล้ว ให้ทำขั้นตอนที่ 5.1 ถึง 5.3 ซ้ำเพื่อดูดสารจากการย่อยสลาย NC 20 ไมโครลิตร ไปเติมลงในหลอดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาในชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen
   5.6 ดูดสารจากการย่อยสลาย NC **20 ไมโครลิตร ไปเติมลงในหลอดตัวควบคุมดูผลของสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาของ Neogen** โดยปล่อยสารละลายด้านข้างหลอดเพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนเม็ดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา ผสมโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นและปล่อยลงเบา ๆ 5 ครั้ง
6. ใส่หลอดที่ปิดฝาแล้วลงในถาดสำหรับใส่หลอดทดสอบแบบรวดเร็วในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen ที่สะอาดและขจัดสิ่งปนเปื้อนแล้ว จากนั้นปิดและใส่สลักฝาปิดเครื่องมือ



7. ตรวจสอบและยืนยันการรันที่กำหนดค่าไว้ในซอฟต์แวร์การตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen
8. คลิกปุ่ม เริ่มต้น ในซอฟต์แวร์และเลือกเครื่องมือที่จะใช้ ฝาปิดเครื่องมือที่เลือกจะเปิดโดยอัตโนมัติ
9. วางถาดสำหรับใส่หลอดทดสอบแบบรวดเร็วในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen ลงในเครื่องมือการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen แล้วปิดฝาเพื่อเริ่มการทดสอบ จะได้รับผลภายใน 60 นาที แม้ว่าอาจตรวจพบผลบวกได้เร็วกว่านี้
10. หลังจากการทดสอบเสร็จสมบูรณ์ ให้นำถาดสำหรับใส่หลอดทดสอบแบบรวดเร็วในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen ออกจากเครื่องมือการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen แล้วกำจัดหลอดต่าง ๆ โดยแช่ในสารละลายฟอกขาวในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (โดยปริมาตรในน้ำ) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และห่างจากบริเวณที่เตรียมชุดทดสอบ

ข้อสังเกต: เพื่อลดความเสี่ยงของผลบวกลวงอันเนื่องมาจากการปนเปื้อนข้าม ห้ามเปิดหลอดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาซึ่งมีดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายจำนวนแล้ว ซึ่งรวมถึงหลอดตัวควบคุมดูผลของสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาของ Neogen หลอดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาในชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์กอโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) และหลอดตัวควบคุมดูผลของเมทริกซ์ของ Neogen กำจัดหลอดสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาซึ่งปิดสนิทแล้วเสมอ โดยแช่ในสารละลายฟอกขาวในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (โดยปริมาตรในน้ำ) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และห่างจากบริเวณที่เตรียมชุดทดสอบ

ผลและการแปลผล

อัลกอริทึมจะแปลผลกราฟของแสงที่ปล่อยออกมาซึ่งเกิดจากการตรวจพบการเพิ่มขยายจำนวนกรดนิวคลีอิก ซอฟต์แวร์จะทำการวิเคราะห์ผลโดยอัตโนมัติแล้วทำการเข้ารหัสสีตามผลที่ได้ ผลบวกหรือผลลบประเมินโดยการวิเคราะห์พารามิเตอร์เฉพาะจำนวนหนึ่งจากกราฟ ผลที่สันนิษฐานว่าเป็นบวกจะได้รับการรายงานแบบเรียลไทม์ในขณะที่ผลลบและผลที่ต้องตรวจสอบจะแสดงหลังจากการรันเสร็จสมบูรณ์แล้ว

ตัวอย่างซึ่งให้ผลที่สันนิษฐานว่าเป็นบวกควรได้รับการยืนยันตามขั้นตอนการปฏิบัติงานมาตรฐานในห้องปฏิบัติการหรือโดยปฏิบัติตามการยืนยันวิธีการอ้างอิงที่เหมาะสม[1,2,3] โดยเริ่มต้นด้วยการดูดจายจากอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อ BPW ISO หลักใส่ลงในอาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อลำดับที่สอง ตามด้วยการเพาะเชื้อและการยืนยันเชื้อที่แยกได้ในภายหลังโดยใช้วิธีทางชีวเคมีและซีรัมวิทยาที่เหมาะสม

หมายเหตุ: แม้แต่ตัวอย่างซึ่งให้ผลลบก็จะไม่ให้ค่าที่เป็นศูนย์เนื่องจากระบบและสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยาเพิ่มขยายจำนวนในชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์กอโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen มีค่าหน่วยแสงสัมพัทธ์ (relative light unit หรือ RLU) ที่อ่านได้เป็น “พื้นหลัง”

ในกรณีที่พบน้อยว่ามีแสงที่ปล่อยออกมาผิดปกติ อัลกอริธึมจะติดป้ายกำกับว่า "ตรวจสอบ (Inspect)" Neogen แนะนำให้ผู้ใช้ทำการทดสอบซ้ำสำหรับตัวอย่างใด ๆ ที่ให้ผลว่าต้องตรวจสอบ หากผลยังคงเป็นต้องตรวจสอบ ให้ดำเนินการทดสอบยืนยันโดยใช้วิธีการที่คุณเลือกใช้หรือตามที่ข้อบังคับท้องถิ่นกำหนดไว้

ในกรณีที่ได้ผลไม่สอดคล้องกัน (สันนิษฐานว่าเป็นบวกในชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์กอโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) โดยไม่ได้รับการยืนยันด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งที่อธิบายไว้ข้างต้น และโดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับการทดสอบการเกาะกลุ่มของอนุภาคน้ำยาง (latex agglutination test)) ห้องปฏิบัติการต้องปฏิบัติตามขั้นตอนที่จำเป็นเพื่อให้แน่ใจว่าผลที่ได้มีความถูกต้อง

การยืนยันผลตามวิธีการตรวจสอบ NF ที่ได้รับการรับรอง

ในบริบทของการตรวจสอบ NF ตัวอย่างทั้งหมดที่ชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์กอโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen ระบุว่าให้ผลบวกนั้นต้องได้รับการยืนยันยืนยันโดยการทดสอบต่อไปนี้อย่างใดอย่างหนึ่ง:

ตัวเลือกที่ 1: การใช้มาตรฐาน ISO 16654[3] โดยเริ่มจากอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อคือน้ำเพปโทนที่มีบัฟเฟอร์[3]

ตัวเลือกที่ 2: การใช้วิธีการยืนยันซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่อไปนี้: ดูดอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อคือน้ำเพปโทนที่มีบัฟเฟอร์ 50 ไมโครลิตร[3] มาลากบนเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ Cefixime Potassium Tellurite Sorbitol MacConkey (CT-SMAC)[3] ที่เป็นวุ้นแข็ง บ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C เขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะมาลากบนวุ้นเลี้ยงเชื้อและทำการทดสอบการเกาะกลุ่มของอนุภาคน้ำยางโดยตรงกับโคโลนีที่แยกได้ หากผลจากชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์กอโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ไม่ได้รับการยืนยัน ให้ทำขั้นตอนการแยกด้วยเม็ดแม่เหล็กที่เคลือบด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแบคทีเรียเป้าหมาย (immunomagnetic separation) จากนั้นดูด 50 ไมโครลิตร มาลากบนเพลท CT-SMAC

ตัวเลือกที่ 3: การใช้โพรบชนิดกรดนิวคลีอิกตามที่อธิบายไว้ในมาตรฐาน EN ISO 7218[5] ซึ่งทำกับโคโลนีที่แยกได้ (ทำให้บริสุทธิ์แล้วหรือไม่ก็ตาม) จากเพลท CT-SMAC (ดูตัวเลือกที่ 1 หรือ 2) โพรบชนิดกรดนิวคลีอิกต้องแตกต่างจากที่ใช้ในชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์กอโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen

ตัวเลือกที่ 4: การใช้วิธีอื่นใดก็ตามที่ได้รับการรับรองโดยการตรวจสอบ NF โดยต้องมีหลักการแตกต่างจากชุดทดสอบเชื้อจุลินทรีย์กอโรคระดับโมเลกุล 2 - *อีโคไล* O157 (รวมทั้ง H7) ของ Neogen และต้องใช้โปรโตคอลเต็มที่อธิบายไว้สำหรับวิธีที่สองที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องแล้วนี้ ขั้นตอนทั้งหมดก่อนเริ่มการยืนยันจะต้องเหมือนกันในทั้งสองวิธี

ในกรณีที่ได้ผลไม่สอดคล้องกัน (สันนิษฐานว่าเป็นบวกด้วยวิธีอื่น โดยไม่ได้รับการยืนยันด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งที่อธิบายไว้ข้างต้น) ห้องปฏิบัติการต้องปฏิบัติตามขั้นตอนที่จำเป็นเพื่อให้แน่ใจว่าผลที่ได้มีความถูกต้อง

หากคุณมีข้อสงสัยเกี่ยวกับแอปพลิเคชันหรือขั้นตอนที่เฉพาะเจาะจง โปรดไปที่เว็บไซต์ของเราที่ www.neogen.com หรือติดต่อตัวแทนหรือผู้จัดจำหน่าย Neogen ในท้องถิ่นของคุณ

ภาคผนวก ก. การหยุดโปรโตคอลชั่วคราว: การจัดเก็บและการทดสอบตัวอย่างซ้ำ

1. หากต้องการเก็บสารจากการย่อยสลายเซลล์ที่ผ่านการให้ความร้อน ให้ปิดหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ด้วยฝาสะอาด (ดูหัวข้อ**การย่อยสลายเซลล์,** 4.5)
2. หากต้องการเก็บตัวอย่างหลังเพิ่มจำนวนเชื้อ ให้บ่มเพาะเชื้อเป็นเวลาอย่างน้อย 18 ชั่วโมงก่อนการจัดเก็บ
3. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ถึง 8°C เป็นเวลาไม่เกิน 72 ชั่วโมง
4. เตรียมตัวอย่างที่เก็บไว้สำหรับการเพิ่มขยายจำนวนโดยการพลิกกลับหลอด 2-3 ครั้งเพื่อผสม
5. เปิดฝาหลอด

6. นำหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ที่ผสมแล้วไปวางบนฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 ± 1°C เป็นเวลา 5 ± 1 นาที
7. นำชั้นวางที่มีหลอดสารละลายย่อยสลายเซลล์ของ Neogen ออกจากบล็อกทำความร้อน และปล่อยให้เย็นในชิลบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบในการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen อย่างน้อย 5 นาทีและไม่เกิน 10 นาที
8. ทำตามโปรโตคอลต่อไปในหัวข้อ**การเพิ่มขยายจำนวน**ตามรายละเอียดข้างต้น

เอกสารอ้างอิง:

1. คู่มือการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา บทที่ 4A: เชื้อ*อีโคไล*ที่ทำให้ท้องเสีย พฤศจิกายน 2558
2. คู่มือห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่ให้บริการด้านความปลอดภัยและการตรวจสอบอาหาร (FSIS) 5,09 ของกระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา (US Department of Agriculture หรือ USDA) การตรวจหา การแยก และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 จากผลิตภัณฑ์และซากเนื้อสัตว์และฟองน้ำจากสิ่งแวดล้อม วันที่มีผลบังคับใช้: 15 มกราคม 2558
3. ISO 16654:2001 จุลชีววิทยาของอาหารและอาหารสัตว์ – วิธีการแนวนอนสำหรับการตรวจหาเชื้อ *Escherichia coli* O157
4. ISO/IEC 17025. ข้อกำหนดทั่วไปสำหรับความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ
5. ISO 7218. จุลชีววิทยาของอาหารและอาหารสัตว์ – กฎทั่วไปสำหรับการตรวจทางจุลชีววิทยา
6. ISO 6887. จุลชีววิทยาของอาหารและอาหารสัตว์ - การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบ การแขวนลอยเบื้องต้น และการเจือจางสิบเท่าสำหรับการตรวจสอบทางจุลชีววิทยา
7. การตรวจรับรองการติดตั้ง (Installation Qualification หรือ IQ) / การตรวจรับรองการทำงาน (Operational Qualification หรือ OQ) ระบบการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen® Neogen Food Safety

คำอธิบายสัญลักษณ์

info.neogen.com/symbols

AOAC เป็นเครื่องหมายการค้าจดทะเบียนของ AOAC INTERNATIONAL

Official Methods เป็นเครื่องหมายบริการจดทะเบียนของ AOAC INTERNATIONAL

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

NEOGEN

제품 지침

분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함)

제품 설명 및 사용 목적

Neogen® 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함)은 증균 식품 및 사료 시료에서 신속하고 명확한 *E. coli* O157(H7 포함)의 검출을 위해 Neogen® 분자 검출 시스템과 함께 사용됩니다.

Neogen 분자 검출 분석은 증폭을 검출하기 위한 생체발광과 결합하여, 높은 특이성과 민감도를 가진 신속한 핵산 증폭을 위해 루프 매개 등온 증폭을 사용합니다. 추정 양성 결과는 실시간으로 보고되는 반면 음성 결과는 분석이 완료된 후 표시됩니다. 추정 양성 결과는 선호하는 방법 또는 현지 규정에 의해 지정된 방법을 사용하여 확인되어야 합니다.[1, 2, 3].

Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함)은 실험실 기법을 훈련받은 전문가가 실험실 환경에서 사용하기 위한 것입니다. Neogen은 식품 또는 음료 이외의 산업에서 이 제품의 사용을 서류로 입증하지 않았습니다. 예를 들어, Neogen은 환경, 제약, 화장품, 임상 또는 수의학 시료를 테스트하기 위해 이 제품을 서류로 입증하지 않았습니다. Neogen 분자 검출 분속 2 - *E. coli* O157(H7 포함)은 가능한 모든 식품 제품, 식품 공정, 테스트 프로토콜 또는 가능한 모든 박테리아 균주로 평가되지 않았습니다.

모든 실험 방법과 마찬가지로 증균 배지의 공급원, 제형, 품질은 결과에 영향을 미칠 수 있습니다. 샘플링 방법, 테스트 프로토콜, 샘플 준비, 취급 및 실험실 기술과 같은 요소도 결과에 영향을 미칠 수 있습니다. Neogen은 증균 배지를 포함하여 해당 방법이 사용자의 기준을 충족하는지 보장하기 위해서 특정 식품 및 미생물 부하로 사용자의 환경에서 충분한 수의 시료를 사용하여 방법을 평가하는 것을 권장합니다.

Neogen은 완충 펩톤수 ISO로 Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함)을 평가하였습니다.

Neogen® 분자 검출 기기는 분석 용해 단계 동안에 시료에서 미생물의 존재를 파괴하기 위해 고안된 열처리를 한 시료와 함께 사용하기 위한 것입니다. 분석 용해 단계 동안에 충분히 열처리되지 않은 시료는 잠재적인 생물학적 위험이 있는 것으로 간주될 수 있으며 Neogen 분자 검출 기기에 삽입해서는 안 됩니다.

Neogen Food Safety는 설계 및 제조에 대해 ISO(International Organization for Standardization 국제표준화기구) 9001 인증을 받았습니다.

Neogen 분자 검출 분석 2- *E coli* O157(H7 포함) 테스트 키트에는 96회 테스트 분량을 포함하고 있으며, 표 1에 설명되어 있습니다.

표 1. Neogen 분자 검출 분석 키트 구성품

항목	식별	수량	내용물	비고
Neogen® 용해 용액(LS)	투명 튜브에 들어있는 분홍색 용액	96개(8개 튜브가 12줄)	튜브당 Neogen 용해 용액 580 µL	랙에 거치되어 있으며 즉시 사용 가능
Neogen® 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함) 시약 튜브	분홍색 튜브	96개(8개 튜브가 12줄)	동결건조된 특정 증폭 및 검출 혼합물	즉석 사용 가능
여분 캡	분홍색 캡	96개(8개 캡이 12줄)		즉석 사용 가능
Neogen® 대조군 시약(RC)	뚜껑을 밀어 올려서 여는 투명한 튜브	16개(개별 튜브 8개가 들어 있는 파우치 2개)	동결건조된 대조군 DNA, 증폭 및 검출 혼합물	즉석 사용 가능

음성 대조군은 예를 들어 BPW ISO 같은 멸균 증균 배지이며 키트에서 제공되지 않습니다. 물을 음성 대조군으로 사용하지 마십시오.

안전

사용자는 Neogen 분자 검출 시스템 및 Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함)을 위한 지침에 있는 모든 안전성 정보를 읽고, 이해하고, 따라야 합니다. 나중에 참조할 수 있도록 안전 지침을 보관하십시오.

⚠ **경고:** 피하지 않을 경우 사망이나 중상 및/또는 재산 피해를 초래할 수 있는 위험한 상황을 나타냅니다.

알림: 피하지 않을 경우 재산 피해를 초래할 수 있는 잠재적으로 위험한 상황을 나타냅니다.

⚠ 경고

Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함)을 인간 또는 동물의 질병 진단에 사용하지 마십시오.

사용자는 현재 적절한 테스트 기술에 대해 직원을 훈련시켜야 합니다. 예를 들어 비임상시험규정(Good Laboratory Practices), ISO/IEC 17025[4], 또는 ISO 7218[5].

오염된 제품 출시로 이어지는 위음성 결과와 관련된 위험 피하기:

- 프로토콜을 따르고 테스트를 제품 지침에 명시된 대로 정확하게 수행하십시오.
- 41.5 ± 1°C로 예열된 배지를 사용하십시오. 시료 준비 중에 배지가 배양 온도 범위 아래로 떨어지지 않도록 하십시오.
- Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함)을 포장 및 제품 지침에 표시된 대로 보관하십시오.
- Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함)을 항상 유효 기간까지 사용하십시오.
- Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함)을 내부적으로 또는 제3자에 의해 검증된 식품, 사료, 식품 공정 환경 시료와 함께 사용하십시오.
- Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함)을 내부적으로 또는 제3자에 의해 검증된 표면, 살균제, 프로토콜, 박테리아 균주와 함께 사용하십시오.
- 아릴 설포네이트 복합체가 함유된 중화 완충액(NB)이 포함된 환경 시료의 경우 테스트 전에 1:2 희석을 수행합니다(시료 1부를 멸균 증균액 1부로 포함). 또 다른 옵션은 중화 완충액 농축액 10µL를 Neogen 용해 용액 튜브로 옮기는 것입니다. 아릴 설포네이트 복합체가 함유된 Neogen® 중화 완충액이 포함된 Neogen® 시료 취급 제품: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XSLSSL10NB, HS10NB 및 HS119510NB.

화학물질 및 생물학적 위험물질에 대한 노출과 관련된 위험 줄이기:

- 교육을 받은 직원의 통제 하에 적절한 장비를 갖춘 실험실에서 병원균 테스트를 수행합니다. 배양된 증균 배지 및 장비 또는 배양된 증균 배지와 접촉한 표면에는 인체 건강에 위험을 초래하기에 충분한 수준의 병원체가 포함되어 있을 수 있습니다.
- 시약 및 오염된 시료를 취급할 때는 적절한 보호복 및 눈의 보호를 포함하여 항상 실험실 안전 표준 관행을 따르십시오.
- 증폭 후 증균 배지 및 시약 튜브의 내용물과의 접촉을 피하십시오.
- 증균 시료 및 관련 오염 폐기물은 현재 현지/지역/국가/산업 표준에 따라 폐기하십시오.
- 히터에 설정된 권장 온도를 초과하지 마십시오.
- 권장 가열 시간을 초과하지 마십시오.
- Neogen® 분자 검출 가열 블록 인서트 온도를 검증하기 위해 적절하고 보정된 온도계를 사용하십시오(예를 들어 담금선이 있는 온도계 또는 디지털 열전대 온도계. 담금선이 없는 온도계는 아님). 온도계는 Neogen 분자 검출 가열 블록 인서트의 지정된 위치에 위치해야 합니다.

분석을 준비하는 동안 교차오염과 관련된 위험 피하기:

- 항상 장갑을 착용하십시오(사용자를 보호하고 뉴클레아제 유입을 방지하기 위함).

뜨거운 액체에 대한 노출과 관련된 위험 줄이기:

- 히터에 설정된 권장 온도를 초과하지 마십시오.
- 권장 가열 시간을 초과하지 마십시오.
- Neogen® 분자 검출 가열 블록 인서트 온도를 검증하기 위해 적절하고 보정된 온도계를 사용하십시오(예를 들어 담금선이 있는 온도계 또는 디지털 열전대 온도계. 담금선이 없는 온도계는 아님). 온도계는 Neogen 분자 검출 가열 블록 인서트의 지정된 위치에 위치해야 합니다.

알림

분석을 준비하는 동안 교차오염과 관련된 위험 피하기:

- 멸균된 에어로졸 장벽(여과됨), 분자 생물학 등급의 피펫 팁 사용이 권장됩니다.
- 각 시료 전달마다 새 피펫을 사용하십시오.
- 시료를 증균 튜브에서 용해 튜브로 이송하기 위해서 비임상시험규정을 사용하십시오. 피펫터 오염을 방지하기 위해 사용자는 중간 이송 단계를 추가하도록 선택할 수 있습니다. 예를 들어, 사용자는 각 증균 시료를 멸균 튜브로 이송시킬 수 있습니다.
- 가능한 경우 살균 램프가 포함된 분자 생물학 워크스테이션을 사용하십시오.

위양성 결과와 관련된 위험 줄이기:

- 증폭 후 절대 튜브를 열지 마십시오.
- 오염된 튜브는 항상 1–5%(물에 대한 부피 백분율) 가정용 표백제 용액에 1시간 동안 담궈 놓았다가 분석 준비 지역으로부터 떨어진 곳에 폐기하십시오.

추가 정보는 물질안전보건자료를 참고하고 폐기는 현지 규정을 참고하십시오.

특정 애플리케이션 또는 절차에 대한 질문이 있으면, www.neogen.com 웹사이트를 참조하거나 지역 Neogen 담당자 또는 공인 대리점에 문의하십시오.

사용자 책임 사항
사용자는 제품 지침 및 정보를 숙지할 책임이 있습니다. 자세한 내용은 **www.neogen.com** 웹사이트를 참조하거나 지역 Neogen 담당자 또는 공인 대리점에 문의하십시오.

검사 방법을 선택할 때는 샘플링 방법, 검사 프로토콜, 시료 준비, 취급 및 실험실 기술과 같은 외부적 요인이 결과에 영향을 미칠 수 있음을 인지하고 있어야 합니다.

선택한 테스트 방법이 사용자의 기준을 충족하여 사용자를 만족시키도록 적절한 매트릭스 및 미생물 부하로 충분한 수의 시료를 평가하기 위해 테스트 방법 또는 제품을 선택하는 것은 사용자의 책임입니다.

또한 모든 테스트 방법과 결과가 고객 및 공급 업체의 요구 사항을 충족하는지 확인하는 것은 사용자의 책임입니다.

모든 테스트 방법과 마찬가지로, 모든 Neogen Food Safety 제품으로부터 획득된 결과는 테스트된 매트릭스 또는 공정의 품질을 보장하는 것이 아닙니다.

고객들이 여러 식품 매트릭스에 대한 방법을 평가하는 데 도움이 되기 위해, Neogen은 Neogen® 분자 검출 Matrix Control 키트를 개발하였습니다. 필요한 경우, Matrix Control(MC)를 사용하여 매트릭스가 Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157 (H7 포함) 결과에 영향을 미칠 수 있는지 확인하십시오. Neogen 방법을 적용할 때 또는 새롭거나 알려지지 않은 매트릭스 혹은 원재료나 공정 변화가 있는 매트릭스를 테스트할 때 모든 검증 기간 동안에 매트릭스를 대표하는, 즉 각기 다른 유래로부터 획득된 시료인 여러 시료를 테스트하십시오.

매트릭스는 조성 및 공정 같은 내재적 특성이 있는 제품의 한 유형으로 정의될 수 있습니다. 매트릭스 간의 차이점은 예를 들어 원재료 대 저온살균, 신선 대 건조 등과 같이 공정 또는 준비의 차이로 인해 유발되는 영향처럼 간단할 수 있습니다.

보증의 제한 / 제한적 구제
개별 제품 포장의 제한된 보증 섹션에 명백하게 명시된 것을 제외하고, NEOGEN은 상품성 보증 또는 특정 사용에 대한 적합성을 포함하되 그에 국한되지 않고 모든 명시적 및 묵시적 보증을 거부합니다. Neogen Food Safety 제품에 결함이 있는 경우 Neogen 또는 공인 대리점은 재량에 따라 해당 제품 구매 가격을 교체하거나 환불합니다. 이러한 것들은 귀하의 배타적 구제수단입니다. 귀하는 제품에서 의심되는 결함을 발견한 날로부터 60일 이내에 Neogen에 즉시 통지하고 Neogen에 해당 제품을 반환해야 합니다. 추가 질문이 있으시면 Neogen 담당자 또는 Neogen 공인 대리점에 문의하십시오.

Neogen 법적 책임의 한계
NEOGEN은 이익 손실을 포함하되 그에 국한되지 않는 직접, 간접, 특별, 우발 또는 중대한 손해에 관계없이 모든 손실 또는 손해에 대해 책임이 없습니다. 어떠한 경우에도 법적 이론에 따른 Neogen의 책임은 결함이 있다고 주장되는 제품의 구매 가격을 초과하지 않습니다.

보관 및 폐기
Neogen® 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함)은 2–8°C에서 보관하십시오. 얼리지 마십시오. 보관하는 동안 키트에 빛이 닿지 않게 하십시오. 키트를 개봉한 후 포일 파우치가 손상되지 않았는지 확인하십시오. 파우치가 훼손된 경우에는 사용하지 마십시오. 개봉 후 사용하지 않은 시약 튜브는 동결건조된 시약의 안정성을 유지하기 위해 항상 건조제가 들어 있는 재밀봉 가능한 파우치에 보관해야 합니다. 재밀봉된 파우치는 2–8°C에서 60일이 넘지 않도록 보관하십시오.

유효 기간이 지난 Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함)은 사용하지 마십시오. 유효 기간과 로트 번호는 상자의 외부 라벨에 표시되어 있습니다. 사용 후, 증균 배지 및 Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함) 튜브는 잠재적으로 병원성 물질을 포함할 수 있습니다. 테스트가 완료되면 오염된 폐기물 처리에 대한 현재 산업 표준을 따르십시오. 추가 정보는 물질안전보건자료를 참고하고 폐기는 현지 규정을 참고하십시오.

사용 지침
모든 지침을 주의 깊게 따르십시오. 그렇게 하지 않으면 부정확한 결과가 발생할 수 있습니다.

사용자는 "설치 적격성 평가(IQ) / 운전 적격성 평가(OQ) 프로토콜 및 Neogen 분자 검출 시스템" 문서[7]지침에 설명된 대로, Neogen 분자 검출 시스템 운전 적격성 평가 훈련을 완료해야 합니다.

정기적으로 실험실 벤치 및 장비(피펫, 캡/디캡 도구 등)의 오염을 1–5%(물에 대한 부피 백분율) 가정용 표백제 용액 또는 DNA 제거 용액으로 제거하십시오.

특정 요구사항에 대해서는 "검증된 방법에 대한 특정 지침" 섹션을 참조하십시오.

표 3 AOAC®에 따른 증균 프로토콜 *공식 분석 방법℠* 2017.01

표 4 NF 유효성 검사 인증 3M 01/18-05/17에 따른 증균 프로토콜

시료 증균

표 2, 3 또는 4 식품에 대한 증균 프로토콜을 위한 현재 지침. 이 테스트 방법이 사용자의 기준을 충족하도록 보장하는 대체 샘플링 프로토콜 또는 희석 비율의 검증은 사용자의 책임입니다.

식품

1. BPW ISO 증균 배지를 41.5 ± 1°C로 예열합니다.
2. 증균 배지와 시료를 표 2, 3 또는 4에 따라 무균 혼합합니다. 모든 육류 및 고입자 시료의 경우 필터 백 사용이 권장됩니다.
3. 잎이 많은 농산물과 과일을 제외한 모든 매트릭스를 2 ± 0.2분 동안 블렌딩, 소화 또는 수동으로 혼합하여 완전히 균질화합니다. 표 2, 3 또는 4에 따라 적절한 시간 동안 41.5 ± 1°C에서 배양합니다.

표 2. 일반적인 증균 프로토콜

시료 매트릭스[a]	시료 크기	증균 배지 부피(mL)	증균 온도 (±1°C)	증균 시간(시)
분쇄/다짐/손질을 포함한 생쇠고기	325 g	975 BPW ISO(예열됨)	41.5	10-18
생쇠고기, 돼지고기, 가금육, 양, 들소를 포함한 생고기	25 g	225 BPW ISO(예열됨)	41.5	8-18
잎이 많은 농산물[b]	200 g	450 BPW ISO(예열됨)	41.5	18-24
과일[b]을 포함한 기타 식품, 채소, 과일/채소 쥬스, 신선 허브, 날해산물, 날계란, 생우유, 쿠키 반죽, 가공육	25 g	225 BPW ISO(예열됨)	41.5	18-24
호두 또는 호두가 포함된 견과류 믹스(이 프로토콜은 피칸, 아몬드, 피스타치오, 캐슈, 밤을 포함하여 기타 견과류에 적합,	25 g	환원된 탈지 분유 225	41.5	18-24

(a) 냉동 시료는 증균 배지에 추가되기 전에 4–8°C로 평형을 유지해야 합니다.

(b) 잎이 많은 농산물 및 과일 시료는 손으로 5분간 조심스럽게 저어야 합니다. 섞거나 소화시켜서는 안 됩니다.

검증된 방법에 대한 구체적인 지침

AOAC® *공식 분석 방법℠* 2017.01

AOAC *공식 분석 방법℠* 프로그램에서, Neogen 분자 검출 분석 2 – *E. coli* O157(H7 포함)은 *E. coli* O157:H7의 검출을 위한 효과적인 방법인 것으로 밝혀졌습니다. 해당 연구에서 테스트된 매트릭스는 표 3에 나와 있습니다.

표 3. AOAC® *공식 방법℠* 2017.01에 따라 41.5 ± 1°C에서 예열된 BPW ISO를 이용한 증균 프로토콜

시료 매트릭스	시료 크기	증균 배지 부피(mL)	증균 시간(시)	균질화
분쇄 생쇠고기(73% 살코기)	325 g	975	10-18	손으로 수작업 또는 소화
생시금치 봉지째[a]	200 g	450	18-24	손으로 5분간 부드럽게 흔들고, 균질화하지는 않음
신선한 새싹	25 g	225	18-24	손으로 5분간 부드럽게 흔들고, 균질화하지는 않음
얼린 블루베리[a][b]	25 g	225	18-24	손으로 5분간 부드럽게 흔들고, 균질화하지는 않음

(a) 잎이 많은 농산물 및 과일 시료는 손으로 5분간 조심스럽게 저어야 합니다. 섞거나 소화시켜서는 안 됩니다.

(b) 냉동 시료는 증균 배지에 추가되기 전에 4–8°C로 평형을 유지해야 합니다.

AFNOR 인증에 의한 NF 유효성 검사

3M 01/18-05/17

기업식 농업을 위한 대체 분석 방법

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

유효성 종료에 대한 자세한 내용은 위에서 언급한 웹 사이트에서 제공되는 NF 유효성 검사 인증을 참조하십시오.

ISO 16654[3]과 비교하여 ISO 16140-2[8]을 준수하는 NF 유효성 검사 방법

유효성 검사 범위: 생쇠고기, 원유 제품, 생과일 및 채소

시료 준비: 시료는 EN ISO 16654 및 EN ISO 6887[6]에 따라 준비되어야 합니다

소프트웨어 버전: 인증을 확인하십시오

표 4. NF 유효성 검사 인증 방법 3M 01/18-05/17에 따라 41.5 ± 1°C에서 예열된 BPW ISO를 이용한 증균 프로토콜

프로토콜	시료 크기	증균 배지 부피(mL)	증균 온도(±1°C)	증균 시간(시)
원유 제품, 생과일 및 생채소	25 g	225	41.5	18-24
생쇠고기	25 g	225	41.5	8-24

참고:

- 25 g보다 큰 시료는 NF 유효성 검사 연구에서 테스트되지 않았습니다.
- 권장되는 프로토콜 중단 지점은 증균 후 또는 시료 용해 후입니다. 증균 배지 또는 시료 용해물은 2–8°C에서 최대 72시간 동안 보관할 수 있습니다. 증균 배지를 저장에서 제거한 뒤 **용해** 섹션 1단계부터 테스트를 재개하십시오. 시료 용해물을 저장에서 제거한 뒤 **용해** 섹션 7단계부터 테스트를 재개하십시오. 용해물은 -20°C에서도 보관할 수 있습니다.
- 짧은 증균 프로토콜은 배양 조건에 민감하며 프로토콜에 지정된 온도를 따라야 합니다. 증균 배지가 필요한 온도에 도달하는 것을 보장하기 위해 수조 또는 배지가 예열되는 인큐베이터의 온도를 확인해야 합니다. 배지 예열 단계 종료와 식품 시료 배양 시작 사이의 지연을 포함하여 시료 준비를 위한 총 시간은 45분을 초과해서는 안 됩니다. 배양하는 동안 환기식 배양기 사용을 권장합니다.

Neogen® 분자 검출 스피드 로더 트레이의 준비

1. 1-5%(물에 대한 부피 백분율) 가정용 표백제 용액으로 천 또는 일회용 타월을 적셔 Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이를 닦습니다.
2. Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이를 물로 씻어냅니다.
3. Neogen® 분자 검출 스피드 로더 트레이를 일회용 타월을 사용하여 닦아 건조시킵니다.
4. Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이가 사용 전에 확실히 건조되어 있도록 합니다.

Neogen® 분자 검출 냉각 블록 인서트의 준비

Neogen® 분자 검출 냉각 블록 인서트를 실험실 벤치 위에 직접 올려 놓습니다. Neogen 분자 검출 냉각 블록 트레이는 사용되지 않습니다. 주변 실험실 온도(20–25°C)에서 블록을 사용하십시오.

Neogen® 분자 검출 가열 블록 인서트의 준비

Neogen 분자 검출 가열 블록 인서트를 건조한 이중 블록 히터 장치에 위치시킵니다. 건조 블록 히터 장치를 켜고 Neogen 분자 검출 가열 블록 인서트가 100 ± 1°C의 온도에 도달하고 유지할 수 있도록 온도를 설정합니다.

참고: 히터 장치에 따라 Neogen 분자 검출 가열 블록 인서트가 온도에 도달할 때까지 약 30분 정도 기다립니다. 지정된 위치에 설치된 적절하고 보정된 온도계를 사용하여(예를 들어 담금선이 있는 온도계 또는 디지털 열전대 온도계. 담금선이 없는 온도계는 아님), Neogen 분자 검출 가열 블록 인서트가 100 ± 1°C인 것을 확인하십시오.

Neogen® 분자 검출기의 준비

1. Neogen® 분자 검출 소프트웨어를 실행하고 로그인하십시오. 가장 최신 소프트웨어인지 확인하려면 Neogen Food Safety 담장자에게 문의하십시오.
2. Neogen 분자 검출기를 켭니다.
3. 각 시료에 대한 데이터가 있는 실행을 만들거나 편집합니다. 자세한 내용은 Neogen® 분자 검출 시스템 사용 설명서를 참조하십시오.

참고: Neogen 분자 검출기는 반응 튜브가 있는 Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이를 삽입하기 전에 60°C의 온도에 도달하고 유지해야 합니다. 이 가열 단계는 약 20분이 소요되며 기기의 상태 표시줄에 주황색 표시등이 표시됩니다. 기기가 실행을 시작할 준비가 되면 상태 표시줄이 녹색으로 바뀝니다.

용해

1. 랙을 실온(20–25°C)에서 밤 동안(16–18시간) 놓아 두어 Neogen 용해 용액 튜브가 따뜻해지게 합니다. Neogen 용해 용액 튜브가 실온과 평형을 이루도록 하는 것의 대체 방법으로, Neogen 용해 용액 튜브를 실험실 벤치 위에 최소 2시간 동안 놓아 두었다가 Neogen 용해 용액 튜브를 37 ± 1°C에서 1시간 동안 배양하거나 튜브를 건조한 이중 블록 가열기에 100°C에서 30초간 위치시킵니다.
2. 캡이 있는 튜브를 뒤집어 혼합합니다. 4시간 이내에 다음 단계로 진행합니다.
3. 인큐베이터에서 증균 배지를 꺼냅니다.
4. 각 시료 및 음성 대조군(NC) 시료(멸균 증균 배지)당 하나의 Neogen 용해 용액 튜브가 필요합니다.

   4.1 Neogen 용해 용액 튜브 스트립은 원하는 Neogen 용해 용액 튜브 수대로 절단할 수 있습니다. 필요한 개별 Neogen 용해 용액 튜브 또는 8-튜브 스트립의 수를 선택하십시오. Neogen 용해 용액 튜브를 비어 있는 랙에 놓으십시오.

   4.2 교차 오염을 방지하기 위해 한 번에 하나의 Neogen 용해 용액 튜브 스트립의 캡을 제거하고 각 이송 단계마다 새 피펫 팁을 사용하십시오.

   4.3 아래에 설명하는 대로 증균 시료를 Neogen 용해 용액 튜브로 이송하십시오.

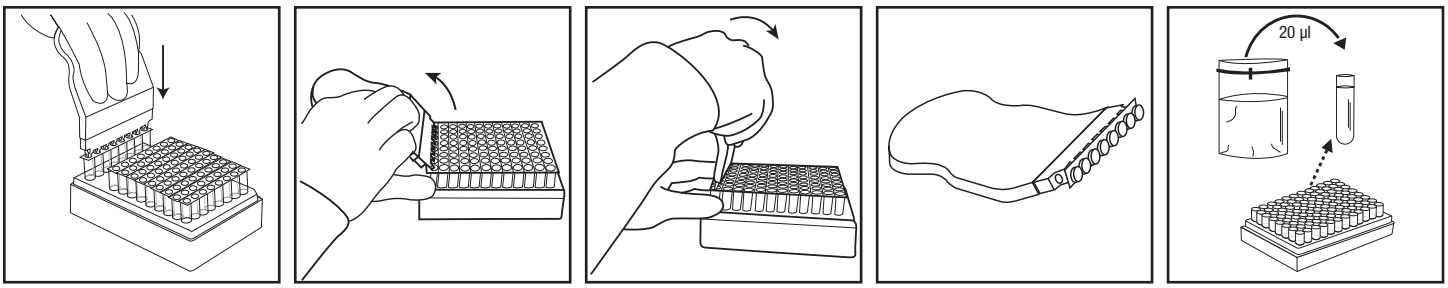
   먼저 각 증균 시료를 개별 Neogen 용해 용액 튜브로 이송하십시오. NC를 **마지막**에 이송하십시오.

   4.4 하나의 Neogen 용해 용액 튜브 스트립의 캡을 제거하기 위해서 Neogen® 분자 검출 캡/디캡 도구-용해를 사용하십시오. 한 번에 하나의 스트립을 제거합니다.

   4.5 Neogen 용해 용액 튜브 캡 폐기 – 재검사를 위해 용해물을 보관할 경우, 용해 후 재적용할 수 있도록 캡을 깨끗한 용기에 두십시오.

   4.5.1 잔류 용해물의 공정은 부록 A를 확인하십시오.

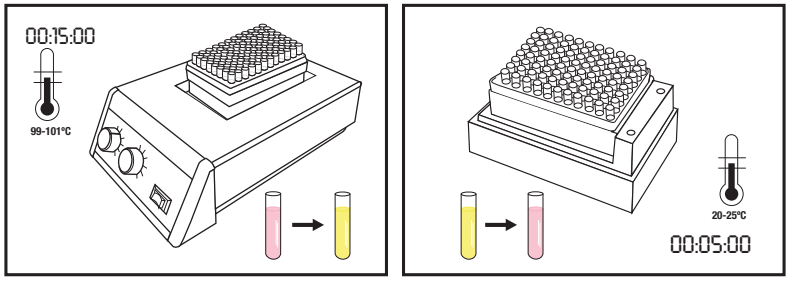
   4.6 표 2, 3, 4 프로토콜에서 달리 명시되지 않으면 시료 20 µL을 Neogen 용해 용액 튜브 안으로 이송시키십시오.



5. 각 개별 샘플이 스트립의 해당 Neogen Lysis Solution 튜브에 추가될 때까지 4.3단계를 반복합니다.
6. 테스트할 시료의 수에 따라 4.1 단계에서 4.6 단계까지 필요한 만큼 반복하십시오.
7. 모든 샘플이 이송되면 20µL의 NC(예를 들어 BPW ISO 같은 멸균 증균 배지)를 Neogen 용해 용액 튜브로 이송합니다. 물을 NC로 사용하지 마십시오.
8. Neogen 분자 검출 가열 블록 인서트의 온도가 100 ± 1°C인지 확인하십시오.
9. Neogen 용해 용액 튜브를 랙이 있는 채로 Neogen 분자 검출 가열 블록 인서트에서 놓고 15 ± 1분간 가열합니다. 가열하는 동안, Neogen 용해 용액은 분홍색(냉각됨)에서 노란색(가열됨)으로 변합니다.

   분석 용해 단계 동안에 충분히 열처리되지 않은 시료는 잠재적인 생물학적 위험이 있는 것으로 간주될 수 있으며 Neogen 분자 검출 기기에 삽입해서는 안 됩니다.

10. Neogen 용해 용액 튜브의 랙을 가열 블록에서 제거하고 Neogen 분자 검출 냉각 블록 인서트에서 최소 5분에서 최대 10분 동안 식도록 둡니다. Neogen 분자 검출 냉각 블록 트레이 없이 상온에서 사용되는 Neogen 분자 검출 냉각 블록 인서트는 실험실 벤치에 직접 놓아야 합니다. 냉각되면, 용해 용액이 분홍색으로 되돌아갑니다.
11. Neogen 분자 검출 냉각 블록 인서트에서 Neogen 용해 용액 튜브 랙을 제거합니다.

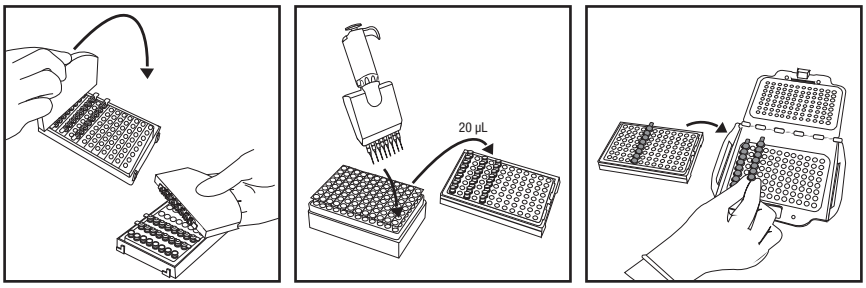


증폭

1. 각 시료 및 NC에 대해 Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함) 시약 튜브 하나가 필요합니다.
   1.1 튜브 스트립은 원하는 튜브 수로 절단할 수 있습니다. 개별 Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함) 시약 튜브의 수를 선택하십시오. 또는 8 튜브 스트립이 필요합니다.
   1.2 Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함) 시약 튜브를 비어 있는 랙에 위치시키십시오.
   1.3 튜브 바닥의 시약 펠릿을 흩뜨리지 않도록 하십시오.
2. Neogen 시약 대조군 튜브 하나를 선택하여 랙에 위치시키십시오.
3. 교차오염을 피하기 위해서, 한 번에 하나의 Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함) 시약 튜브 스트립 캡을 열고 각 이송 단계마다 새 피펫 팁을 사용하십시오.
4. 아래에 설명된 대로 용해물을 Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함) 시약 튜브 및 Neogen 시약 대조군 튜브로 이송시키십시오.

> 각 시료 용해물을 Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함) 시약 튜브로 **먼저** 이송하고 뒤이어 NC로 이송하십시오. Neogen 시약 대조군 튜브를 **마지막**에 수화시키십시오.

5. Neogen 분자 검출 분석 2 - ®*E. coli* O157(H7 포함) 시약 튜브의 캡을 제거하기 위해 Neogen 분자 검출 캡/디캡 도구-시약을 사용하십시오. 한 번에 하나의 튜브 스트립을 제거합니다. 캡을 폐기하십시오.
   5.1 **Neogen 용해 용액 튜브에서 액체의 상부 ½의 시료 용해물 20 µL(침전물이 피할 것)을 해당하는** Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함) **시약 튜브 안으로 이송합니다. 펠릿을 흩뜨리지 않도록 비스듬히 분배하십시오. 부드럽게 위아래로 5회 피펫팅하여 혼합하십시오.**
   5.2 각각의 시료 용해물이 해당하는 Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함) 시약 튜브에 추가될 때까지 5.1 단계를 반복하십시오.
   5.3 Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함) 시약 튜브를 제공된 여분의 캡으로 덮고 Neogen 분자 검출 캡/디캡 도구-시약의 둥근 면을 사용하여 앞뒤로 움직이면서 압력을 가하여 캡이 단단하게 적용되도록 확실히 합니다.
   5.4 테스트할 시료의 수에 따라 5.1 단계에서 5.3 단계까지 필요한 만큼 반복하십시오.
   5.5 모든 시료 용해물 이송되면, NC 용해물 20 µL을 Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함) 시약 튜브 안으로 이송하기 위해 5.1–5.3 단계를 반복하십시오.
   5.6 **20 µL의 NC 용해물을 Neogen 대조군 시약 튜브로 이송합니다.** 펠릿을 흩뜨리지 않도록 비스듬히 분배하십시오. 부드럽게 위아래로 5회 피펫팅하여 혼합하십시오.
6. 캡이 있는 튜브를 깨끗하고 오염이 제거된 Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이에 넣습니다. 그런 뒤 뚜껑을 닫아 잠그십시오.



7. Neogen 분자 검출 소프트웨어에서 구성을 검토하고 확인하십시오.
8. 소프트웨어에서 시작 버튼을 클릭하고 사용할 기기를 선택합니다. 선택한 기기의 뚜껑은 자동으로 개봉됩니다.
9. Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이를 Neogen 분자 검출기에 넣고 뚜껑을 닫아 분석을 시작합니다. 결과는 60분 이내에 제공되지만 양성이 더 빨리 감지될 수 있습니다.
10. 분석이 완료된 후, Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이를 Neogen 분자 검출 기기에서 제거하고 시약 튜브는 항상 1–5% (물에 대한 부피 백분율) 가정용 표백제 용액에 1시간 동안 담궈 놓았다가 분석 준비 지역으로부터 떨어진 곳에 폐기하십시오.

알림: 교차 오염으로 인한 위양성 위험을 최소화하려면 증폭된 DNA가 들어 있는 시약 튜브를 절대 열지 마십시오. 여기에는 Neogen 대조군 시약, Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함) 시약 튜브, Neogen 대조군 매트릭스 튜브가 포함됩니다. 밀봉된 시약 튜브는 항상 1–5%(물에 대한 부피 백분율) 가정용 표백제 용액에 1시간 동안 담궈 놓았다가 분석 준비 지역으로부터 떨어진 곳에 폐기하십시오.

결과 및 해석

알고리즘은 핵산 증폭 검출로 인한 광출력 곡선을 해석합니다. 결과는 소프트웨어에 의해 자동으로 분석되며 결과에 따라 색상으로 구분됩니다. 양성 또는 음성 결과는 여러 고유 곡선 매개변수의 분석에 의해 결정됩니다. 추정 양성 결과는 실시간으로 보고되는 반면 음성 및 검사 결과는 실행이 완료된 후 표시됩니다.

추정 양성 시료는 실험실 표준 운영 절차에 따라 또는 적절한 참조 방법 확인[1,2,3]을 따라 확인되어야 하며, 1차 BPW ISO 증균을 2차 증균 액체배지에 이송하면서 시작하고 뒤이어 적절한 생화학 및 혈청학적 방법을 사용하여 분리주를 플레이팅 및 확인합니다.

참고: 시스템 및 Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함) 증폭 시약이 "배경" 상대적 발광 단위(RLU) 판독값을 가지기 때문에 음성 시료라 하더라도 0의 판독값이 나오지 않을 것입니다.

모든 일반적이지 않은 광출력의 드문 경우에, 알고리즘은 이를 "검사(Inspect)"라고 표시합니다. Neogen은 사용자가 모든 검사 시료에 대해 분석을 반복하기를 권장합니다. 검사 결과는 선호하는 방법 또는 현지 규정에 의해 지정된 방법을 사용하여 확인되어야 합니다.

일치하지 않는 결과의 경우(Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함)으로 추정 양성이고, 위에서 설명한 방법 중 하나로 확인되지 않고, 특히 라텍스 응집 테스트인 경우) 실험실은 획득한 결과의 유효성을 보장하기 위해 필요한 단계를 따라야 합니다.

NF 유효성 검사 방법에 따라 결과를 확인

NF 유효성 검사의 맥락에서, Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함)에 의해 양성으로 파악된 모든 시료는 다음 테스트 중 하나로 확인해야 합니다.

옵션 1: ISO 16654[3] 표준을 사용하여 완충 펩톤수[3] 증균에서 시작.

옵션 2: 다음과 같이 구성된 확인 방법을 시행합니다. 50 µL 완충 펩톤수[3] 증균을 Cefixime Potassium Tellurite Sorbitol MacConkey (CT-SMAC)[3] 한천 플레이트에 선상도말합니다. 37°C에서 24±3 시간 동안 배양합니다. 특징적인 콜로니를 보통 한천 배지에 선상도말하고 분리된 콜로니에 직접 라텍스 응집 테스트를 수행합니다. Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함) 결과가 확인되지 않으면, 자기 면역 분리 단계를 수행한 후 CT-SMAC에 50 µL를 선상도말합니다.

옵션 3: EN ISO 7218[5] 표준에 기술된 대로 핵산 프로브를 사용하여 CT-SMAC에서 분리된 콜로니(정제 또는 비정제)에 수행합니다 (옵션 1 또는 2 확인). 핵산 프로브는 Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함)에 사용된 것과 달라야 합니다.

옵션 4: NF 유효성 검사에서 인증된 기타 다른 방법을 사용하여, Neogen 분자 검출 분석 2 - *E. coli* O157(H7 포함)의 원리와 달라야 합니다. 이 두 번째 유효성 검사 방법에 대해 설명된 전체 프로토콜을 사용해야 합니다. 확인 시작 전의 모든 단계는 두 방법 모두에 공통적이어야 합니다.

만약 결과가 일치하지 않으면(위에서 기술한 방법 중 하나로 확인되지 않은 대체 방법으로 추정 양성) 실험실은 획득한 결과의 유효성을 보장하기 위해 필요한 단계를 따라야 합니다.

특정 애플리케이션 또는 절차에 대한 질문이 있으면, www.neogen.com 웹사이트를 참조하거나 지역 Neogen 담당자 또는 공인 대리점에 문의하십시오.

부록 A. 프로토콜 중단: 시료의 보관 및 재검사

1. 열처리된 용해물을 저장하기 위해 깨끗한 캡으로 용해 튜브에 캡을 다시 씌우십시오(**용해** 섹션, 4.5 확인)
2. 증균 시료를 보관하려면 보관 전 최소 18시간 동안 배양합니다.
3. 4–8°C에서 최대 72 시간 보관합니다.
4. 저장된 시료를 2–3회 뒤집어서 혼합하여 증폭을 위해 준비하십시오.
5. 튜브의 캡을 제거합니다.
6. 혼합된 용해물 튜브를 Neogen 분자 검출 가열 블록 인서트에 위치 시키고 100 ± 1°C에서 5 ± 1 분간 가열하십시오.
7. Neogen 용해 용액 튜브의 랙을 가열 블록에서 제거하고 Neogen 분자 검출 냉각 블록 인서트에서 최소 5분에서 최대 10분 동안 식힙니다.
8. 위에서 상세히 설명한 **증폭** 섹션에서 프로토콜을 계속하십시오.

참고 문헌:

1. 미국 식품의약국 세균학적 분석 매뉴얼. 챕터 4A: 설사유발성 *대장균* 2015년 11월
2. 미국 농무부(USDA) FSIS 미생물학 실험실 가이드북 5.09. 식육제품과 사체 및 환경 스폰지의 *대장균* O157:H7의 검출, 분리 및 식별. 효력 발생일: 2015년 1월 15일.
3. ISO 16654:2001 식품 및 동물 사료의 미생물학 – *Escherichia coli* O157 검출을 위한 수평적 방법.
4. ISO/IEC 17025. 테스트 및 교정 실험실의 역량에 대한 일반 요구 사항.
5. ISO 7218. 식품 및 동물 사료의 미생물학 – 미생물 검사에 대한 일반 규칙.
6. ISO 6887. 식품 및 동물 사료의 미생물학 - 미생물 검사용 테스트 시료 준비, 초기 현탁 및 소수 희석.
7. 설치 적격성 평가(IQ)/운전 적격성 평가(OQ) Neogen® 분자 검출 시스템. Neogen Food Safety.

기호 설명

info.neogen.com/symbols

AOAC는 AOAC INTERNATIONAL의 등록 상표입니다

Official Methods는 AOAC INTERNATIONAL의 등록 서비스표입니다

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A

Tanggal Terbit: 2024-01

NEOGEN®

Petunjuk Produk

Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7)

Keterangan Produk dan Penggunaan yang Dimaksudkan

Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2® - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen digunakan dengan Sistem Deteksi Molekuler Neogen® untuk mendeteksi *E. coli* O157 (termasuk H7) secara cepat dan spesifik pada sampel makanan dan pakan.

Deteksi Molekuler untuk Pengujian Neogen menggunakan loop-mediated isothermal amplification untuk mengamplifikasi sekuens asam nukleat secara cepat dengan spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi, yang dikombinasikan dengan bioluminisensi untuk mendeteksi amplifikasi. Hasil dugaan positif dilaporkan secara real-time, sementara hasil negatif ditampilkan setelah pengujian selesai. Hasil dugaan positif harus dikonfirmasi dengan menggunakan metode pilihan Anda atau seperti yang ditentukan oleh peraturan setempat[1, 2, 3].

Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen dimaksudkan untuk digunakan di lingkungan laboratorium oleh para profesional yang terlatih dalam teknik-teknik laboratorium. Neogen belum mendokumentasikan penggunaan produk ini dalam industri selain makanan atau minuman. Sebagai contoh, Neogen belum mendokumentasikan produk ini untuk menguji sampel lingkungan, farmasi, kosmetik, klinis, atau hewan. Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen belum dievaluasi dengan semua kemungkinan produk makanan, proses makanan, protokol pengujian, atau dengan semua kemungkinan strain bakteri.

Seperti halnya semua metode pengujian, sumber, formulasi, dan kualitas media pengayaan dapat memengaruhi hasil. Faktor-faktor seperti metode pengambilan sampel, protokol pengujian, persiapan sampel, penanganan, dan teknik laboratorium juga dapat memengaruhi hasil. Neogen merekomendasikan evaluasi metode yang mencakup media pengayaan di lingkungan pengguna menggunakan sampel makanan dan uji mikroba tertentu dalam jumlah yang cukup untuk memastikan metode tersebut memenuhi kriteria pengguna.

Neogen telah mengevaluasi Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen dengan Buffered Peptone Water ISO.

Instrumen Deteksi Molekuler Neogen® dimaksudkan untuk digunakan dengan sampel yang telah menerima perlakuan panas selama langkah lisis pengujian, yang dirancang untuk menghancurkan organisme yang ada di dalam sampel. Sampel yang belum diberi perlakuan panas dengan benar selama langkah lisis pengujian dapat dianggap sebagai potensi bahaya biologis dan TIDAK boleh dimasukkan ke dalam Instrumen Deteksi Molekuler Neogen.

Neogen Food Safety disertifikasi oleh ISO (Organisasi Standardisasi Internasional) 9001 untuk desain dan produksi.

Kit Uji Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen berisi 96 uji, seperti dijelaskan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Komponen Kit Deteksi Molekuler untuk Pengujian Neogen

Item	Identifikasi	Jumlah	Isi	Komentar
Larutan Lisis (LS) Neogen®	Larutan merah muda dalam tabung bening	96 (12 strip 8 tabung)	580 µL Larutan Lisis Neogen per tabung	Ditata dalam rak dan siap digunakan
Tabung Reagen Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2® - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen	Tabung merah muda	96 (12 strip 8 tabung)	Campuran amplifikasi dan deteksi khusus liofilisasi	Siap digunakan
Tutup tambahan	Tutup merah muda	96 (12 strip 8 tutup)		Siap digunakan
Kontrol Reagen (RC) Neogen®	Tabung flip-top bening	16 (2 kantong masing-masing 8 tabung)	DNA kontrol terliofiliasi, campuran amplifikasi dan deteksi	Siap digunakan

Kontrol Negatif, tidak disediakan dalam kit, adalah media pengayaan steril, misalnya BPW ISO. Jangan gunakan air sebagai Kontrol Negatif.

Keamanan

Pengguna harus membaca, memahami, dan mengikuti semua informasi keselamatan dalam petunjuk Sistem Deteksi Molekuler Neogen dan Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen. Simpan petunjuk keselamatan untuk referensi di masa mendatang.

⚠ **PERINGATAN:** Menunjukkan situasi berbahaya yang, jika tidak dihindari, dapat mengakibatkan kematian atau cedera serius dan/atau kerusakan properti.

PERHATIAN: Menunjukkan situasi yang berpotensi berbahaya yang, jika tidak dihindari, dapat mengakibatkan kerusakan properti.

⚠ PERINGATAN

Jangan gunakan Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen dalam diagnosis kondisi pada manusia atau hewan.

Pengguna harus melatih personelnya perihal teknik pengujian yang tepat dan mutakhir: misalnya, Praktik Laboratorium yang Baik, ISO/IEC 17025[4], atau ISO 7218[5].

Untuk mengurangi risiko terkait hasil negatif palsu yang menyebabkan pelepasan produk yang terkontaminasi:

- Ikuti protokol dan lakukan pengujian persis seperti yang dijelaskan dalam petunjuk produk.
- Gunakan media yang telah dihangatkan ke suhu 41,5 ± 1 °C. Jangan biarkan suhu media turun di bawah kisaran suhu inkubasi selama persiapan sampel.
- Simpan Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen seperti yang tertera pada kemasan dan petunjuk produk.
- Selalu gunakan Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen sebelum tanggal kedaluwarsa.
- Gunakan Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen dengan sampel makanan, pakan, dan proses makanan yang telah divalidasi secara internal atau oleh pihak ketiga.
- Gunakan Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen hanya dengan permukaan, pembersih, protokol, dan strain bakteri yang telah divalidasi secara internal atau oleh pihak ketiga.
- Untuk sampel lingkungan yang mengandung Neutralizing Buffer (NB) dengan kompleks aril sulfonat, lakukan pengenceran 1:2 sebelum pengujian (1 bagian sampel ke dalam 1 bagian kaldu pengayaan steril). Pilihan lainnya adalah memindahkan 10 µL pengayaan buffer penetral ke dalam tabung Larutan Lisis Neogen. Produk Penanganan Sampel Neogen® yang menyertakan Buffer Penetral Neogen® dengan kompleks aril sulfonat: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XSLSSL10NB, HS10NB, dan HS119510NB.

Untuk mengurangi risiko terkait paparan bahan kimia dan bahaya biologis:

- Lakukan pengujian patogen di laboratorium yang dilengkapi dengan peralatan yang memadai di bawah pengawasan personel terlatih. Media pengayaan yang diinkubasi dan peralatan atau permukaan yang sudah bersentuhan dengan media pengayaan yang diinkubasi dapat mengandung patogen pada tingkat yang cukup dapat menyebabkan risiko bagi kesehatan manusia.
- Selalu ikuti praktik keselamatan laboratorium standar, termasuk mengenakan pakaian pelindung dan pelindung mata yang sesuai saat menangani reagen dan sampel yang terkontaminasi.
- Hindari sentuhan dengan isi media pengayaan dan tabung reagen setelah amplifikasi.
- Buang sampel yang telah diperkaya dan limbah terkontaminasi terkait dengan mematuhi standar lokal/regional/nasional/industri yang berlaku.
- Jangan mengatur suhu melebihi suhu yang disarankan pada pemanas.
- Jangan mengatur waktu pemanasan lebih lama dari yang disarankan.
- Gunakan termometer yang sesuai dan terkalibrasi untuk memverifikasi suhu Sisipan Blok Panas Deteksi Molekuler Neogen® (misalnya, termometer pencelupan sebagian atau termometer termokopel digital, bukan termometer pencelupan total). Termometer harus ditempatkan di lokasi yang ditentukan dalam Sisipan Blok Panas Deteksi Molekuler Neogen.

Untuk mengurangi risiko terkait kontaminasi silang saat menyiapkan pengujian:

- Selalu kenakan sarung tangan (untuk melindungi pengguna dan mencegah masuknya nuklease).

Untuk mengurangi risiko terkait paparan cairan panas:

- Jangan mengatur suhu melebihi suhu yang disarankan pada pemanas.
- Jangan mengatur waktu pemanasan lebih lama dari yang disarankan.
- Gunakan termometer yang sesuai dan terkalibrasi untuk memverifikasi suhu Sisipan Blok Panas Deteksi Molekuler Neogen® (misalnya, termometer pencelupan sebagian atau termometer termokopel digital, bukan termometer pencelupan total). Termometer harus ditempatkan di lokasi yang ditentukan dalam Sisipan Blok Panas Deteksi Molekuler Neogen.

PERHATIAN

Untuk mengurangi risiko terkait kontaminasi silang saat menyiapkan pengujian:

- Direkomendasikan untuk menggunakan ujung pipet kelas biologi molekuler yang steril dan berpenghalang aerosol (difilter).
- Gunakan ujung pipet baru untuk setiap pemindahan sampel.
- Gunakan Praktik Laboratorium yang Baik untuk memindahkan sampel dari pengayaan ke tabung lisis. Untuk menghindari kontaminasi pipettor, pengguna dapat memilih untuk menambahkan langkah pemindahan perantara. Misalnya, pengguna dapat memindahkan setiap sampel yang diperkaya ke dalam tabung steril.
- Gunakan stasiun kerja biologi molekuler yang mengandung lampu pembasmi kuman jika tersedia.

Untuk mengurangi risiko terkait hasil positif palsu:

- Jangan pernah membuka tabung setelah amplifikasi.
- Selalu buang tabung yang terkontaminasi dengan merendamnya dalam larutan pemutih rumah tangga 1-5% (v:v dalam air) selama 1 jam dan jauhkan dari area persiapan pengujian.

Baca Lembar Data Keselamatan untuk informasi tambahan dan peraturan setempat terkait pembuangan.

Jika Anda memiliki pertanyaan tentang aplikasi atau prosedur tertentu, silakan kunjungi situs web kami di www.neogen.com atau hubungi perwakilan atau distributor Neogen setempat.

Tanggung Jawab Pengguna

Pengguna bertanggung jawab untuk memahami petunjuk dan informasi produk. Kunjungi situs web kami di **www.neogen.com,** atau hubungi perwakilan atau distributor Neogen setempat untuk informasi lebih lanjut.

Ketika memilih metode pengujian, penting untuk mengetahui bahwa faktor eksternal seperti metode pengambilan sampel, protokol pengujian, persiapan sampel, penanganan, dan teknik laboratorium dapat memengaruhi hasil.

Dalam memilih metode pengujian atau produk apa pun, pengguna bertanggung jawab untuk mengevaluasi sampel dalam jumlah yang mencukupi dengan matriks dan tantangan mikroba yang sesuai untuk memastikan bahwa metode pengujian yang dipilih memenuhi kriteria mereka.

Pengguna juga bertanggung jawab untuk menentukan bahwa metode dan hasil pengujian apa pun memenuhi persyaratan pelanggan dan pemasoknya.

Seperti halnya metode pengujian lain, hasil yang diperoleh dari penggunaan produk Keamanan Pangan Neogen bukanlah jaminan kualitas matriks atau proses yang diuji.

Untuk membantu pelanggan mengevaluasi metode untuk berbagai matriks makanan, Neogen telah mengembangkan kit Kontrol Matriks Deteksi Molekuler Neogen®. Jika perlu, gunakan Kontrol Matriks (MC) untuk menentukan apakah matriks memiliki kemampuan untuk memengaruhi hasil Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen. Ujilah beberapa sampel, yang mewakili matriks, yaitu sampel yang diperoleh dari sumber yang berbeda-beda, selama periode validasi apa pun saat menggunakan metode Neogen atau saat menguji matriks baru atau yang tidak dikenal atau matriks yang telah mengalami perubahan bahan baku atau proses.

Matriks dapat didefinisikan sebagai jenis produk dengan sifat intrinsik seperti komposisi dan proses. Perbedaan antarmatriks mungkin hanya berupa efek yang disebabkan oleh perbedaan pemrosesan atau penyajiannya, misalnya, mentah versus dipasteurisasi; segar versus dikeringkan, dll.

Batasan Jaminan/Solusi Terbatas

KECUALI JIKA DINYATAKAN SECARA TEGAS DALAM BAGIAN JAMINAN TERBATAS PADA SETIAP KEMASAN PRODUK, NEOGEN MENAFIKAN SEMUA JAMINAN TERSURAT DAN TERSIRAT, TERMASUK NAMUN TIDAK TERBATAS PADA, JAMINAN KELAYAKAN UNTUK DIPERDAGANGKAN ATAU KESESUAIAN UNTUK PENGGUNAAN TERTENTU. Jika terdapat Produk Keamanan Makanan Neogen yang cacat, Neogen atau distributor resminya akan, berdasarkan pilihannya, mengganti atau mengembalikan dana pembelian produk. Ini adalah solusi eksklusif Anda. Anda harus segera memberi tahu Neogen dalam waktu enam puluh hari sejak ditemukannya dugaan kecacatan pada suatu produk dan mengembalikannya ke Neogen. Silakan hubungi perwakilan Neogen atau distributor resmi Neogen untuk pertanyaan lebih lanjut.

Batasan Kewajiban Neogen

NEOGEN TIDAK AKAN BERTANGGUNG JAWAB ATAS KERUGIAN ATAU KERUSAKAN, BAIK KERUGIAN LANGSUNG, TIDAK LANGSUNG, KHUSUS, INSIDENTAL, MAUPUN KONSEKUENSIAL, TERMASUK NAMUN TIDAK TERBATAS PADA KEHILANGAN KEUNTUNGAN. Dalam hal apa pun, tanggung jawab Neogen berdasarkan teori hukum apa pun tidak akan melebihi harga pembelian produk yang diduga cacat.

Penyimpanan dan Pembuangan

Simpan Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen pada suhu 2-8 °C. Jangan dibekukan. Simpan kit di tempat yang tidak terkena cahaya. Setelah membuka kit, periksa dan pastikan kantong foil tidak rusak. Jangan digunakan jika kantong rusak. Setelah dibuka, tabung reagen yang tidak digunakan harus selalu disimpan dalam kantong yang dapat ditutup kembali dengan pengering di dalamnya untuk menjaga stabilitas reagen terliofilisasi. Simpan kantong yang telah ditutup kembali pada suhu 2-8 °C tidak lebih dari 60 hari.

Jangan gunakan Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen setelah tanggal kedaluwarsa. Tanggal kedaluwarsa dan nomor lot tertera pada label luar kotak. Setelah digunakan, media pengayaan dan tabung Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen berpotensi dapat mengandung material patogenik. Setelah pengujian selesai, ikuti standar industri yang berlaku untuk pembuangan limbah yang terkontaminasi. Baca Lembar Data Keselamatan untuk informasi tambahan dan peraturan setempat terkait pembuangan.

Petunjuk Penggunaan

Ikuti semua petunjuk dengan hati-hati. Kelalaian dapat menyebabkan hasil yang tidak akurat.

Pengguna harus menyelesaikan pelatihan kualifikasi operator Sistem Deteksi Molekuler Neogen, seperti yang dijelaskan dalam dokumen “Protokol dan Petunjuk Kualifikasi Instalasi (IQ)/Kualifikasi Operasional (OQ) untuk Sistem Deteksi Molekuler Neogen”[7].

Lakukan dekontaminasi meja dan peralatan laboratorium (pipet, alat penutup/pembuka tutup, dll.) secara berkala dengan larutan pemutih rumah tangga 1-5% (v:v dalam air) atau larutan penghilang DNA.

Buka Bagian “Petunjuk Khusus untuk metode yang divalidasi” untuk melihat persyaratan khusus:

Tabel 3 untuk protokol pengayaan berdasarkan *Official Method of Analysis*℠ AOAC® 2017.01

Tabel 4 untuk protokol pengayaan berdasarkan sertifikat NF Validation 3M 01/18-05/17

Pengayaan Sampel

Tabel 2, 3, atau 4 menyajikan panduan untuk protokol pengayaan makanan. Pengguna bertanggung jawab untuk memvalidasi rasio pengenceran atau protokol pengambilan sampel alternatif untuk memastikan metode pengujian ini memenuhi kriteria pengguna.

Makanan

1. Lakukan pemanasan awal pada media pengayaan BPW ISO ke suhu 41,5 ± 1 °C.
2. Campurkan media pengayaan dan sampel secara aseptik sesuai dengan Tabel 2, 3, atau 4. Untuk semua sampel daging dan sampel yang sangat partikulat, disarankan menggunakan kantong filter.
3. Lakukan homogenisasi semua matriks kecuali sayuran daun dan buah secara menyeluruh dengan cara diblender, menggunakan stomacher, atau dicampur dengan tangan selama 2 ±0,2 menit. Lakukan inkubasi pada suhu 41,5 ± 1 °C selama waktu yang dijelaskan dalam Tabel 2, 3, atau 4.

Tabel 2. Protokol pengayaan umum

Matriks Sampel[a]	Ukuran Sampel	Volume Kaldu Pengayaan (mL)	Suhu Pengayaan (±1 °C)	Waktu Pengayaan (jam)
Daging sapi mentah termasuk daging giling dan sayat	325 g	975 BPW ISO (dipanaskan di awal)	41,5	10-18
Daging mentah termasuk daging sapi, babi, unggas, domba, dan bison mentah	25 g	225 BPW ISO (dipanaskan di awal)	41,5	8-18
Sayuran daun[b]	200 g	450 BPW ISO (dipanaskan di awal)	41,5	18-24
Makanan lain termasuk buah[b], sayuran, jus buah/sayur, bumbu segar, makanan laut mentah, telur mentah, susu mentah, adonan biskuit, dan daging olahan	25 g	225 BPW ISO (dipanaskan di awal)	41,5	18-24
Kacang kenari atau campuran kacang yang mengandung kacang kenari (protokol ini sesuai untuk kacang-kacangan lain termasuk kacang pecan, almon, pistasio, kacang mete, dan kastanye,	25 g	225 susu bubuk tanpa lemak yang dilarutkan	41,5	18-24

(a) Sampel beku harus diseimbangkan pada suhu 4-8 °C sebelum ditambahkan ke dalam kaldu pengayaan.

(b) Sampel sayuran berdaun dan buah harus diaduk perlahan dengan tangan selama 5 menit. Jangan diblender atau menggunakan stomacher.

Petunjuk Khusus untuk Metode yang Telah Divalidasi

***Official Methods of Analysis*℠ AOAC® 2017.01**

Dalam program *Official Method of Analysis*℠ AOAC, Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 – *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen terbukti sebagai metode efektif untuk deteksi *E. coli* O157:H7. Matriks yang diuji dalam penelitian ini ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Protokol pengayaan yang menggunakan BPW ISO yang telah dipanaskan di awal pada suhu 41,5 ± 1 °C menurut AOAC® *Official Methods*℠ 2017.01

Matriks Sampel	Ukuran Sampel	Volume Kaldu Pengayaan (mL)	Waktu Pengayaan (jam)	Dihomogenisasi
Daging sapi giling mentah (73% tanpa lemak)	325 g	975	10-18	Secara manual dengan tangan atau dengan alat Stomach
Bayam mentah dalam kantong[a]	200 g	450	18-24	Diaduk perlahan dengan tangan selama 5 menit, jangan dihomogenisasi
Kecambah segar	25 g	225	18-24	Diaduk perlahan dengan tangan selama 5 menit, jangan dihomogenisasi
Bluberi beku[a][b]	25 g	225	18-24	Diaduk perlahan dengan tangan selama 5 menit, jangan dihomogenisasi

(a) Sampel sayuran daun dan buah harus diaduk perlahan dengan tangan selama 5 menit. Jangan diblender atau menggunakan stomacher.

(b) Sampel beku harus diseimbangkan pada suhu 4-8 °C sebelum ditambahkan ke dalam kaldu pengayaan.

NF Validation oleh Sertifikasi AFNOR

3M 01/18-05/17

METODE ANALISIS ALTERNATIF UNTUK AGRIBISNIS

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

Untuk informasi lebih lanjut tentang akhir masa berlaku, silakan lihat sertifikat NF VALIDATION yang tersedia di situs web yang disebutkan di atas.

Metode Bersertifikasi NF VALIDATION sesuai dengan ISO 16140-2[8] dibandingkan dengan ISO 16654[3]

Cakupan validasi: Daging sapi mentah, produk susu mentah, buah dan sayuran mentah

Penyiapan sampel: Sampel harus disiapkan sesuai dengan EN ISO 16654 dan EN ISO 6887[6]

Versi Perangkat Lunak: Lihat sertifikat

Tabel 4. Protokol pengayaan menggunakan BPW ISO yang telah dipanaskan di awal pada suhu 41,5 ± 1 °C sesuai dengan metode bersertifikasi NF VALIDATION 3M 01/18-05/17

Protokol	Ukuran Sampel	Volume Kaldu Pengayaan (mL)	Suhu Pengayaan (±1 °C)	Waktu Pengayaan (jam)
Produk susu mentah, buah-buahan mentah, dan sayuran mentah	25 g	225	41,5	18-24
Daging sapi mentah	25 g	225	41,5	8-24

CATATAN:

- Sampel lebih dari 25 g belum pernah diuji dalam studi NF VALIDATION.
- Titik interupsi protokol yang direkomendasikan adalah setelah pengayaan atau setelah lisis sampel. Kaldu pengayaan atau lisat sampel dapat disimpan pada suhu 2-8 °C hingga 72 jam. Setelah mengeluarkan kaldu pengayaan dari penyimpanan, lanjutkan pengujian dari Langkah 1 di bagian **Lisis**. Setelah mengeluarkan lisat sampel dari penyimpanan, lanjutkan pengujian dari Langkah 7 di bagian **Lisis**. Lisat juga dapat disimpan pada suhu -20 °C.
- Protokol pengayaan singkat peka terhadap kondisi inkubasi, dan suhu yang ditentukan dalam protokol harus diikuti. Suhu penangas air atau inkubator tempat pemanasan awal kaldu harus diverifikasi untuk memastikan kaldu pengayaan mencapai suhu yang diperlukan. Total waktu untuk penyiapan sampel, termasuk jeda di antara akhir langkah pemanasan awal media dan permulaan inkubasi sampel makanan, tidak boleh lebih dari 45 menit. Disarankan menggunakan inkubator berventilasi selama inkubasi.

Penyiapan Baki Pemuatan Cepat Deteksi Molekuler Neogen®

1. Basahi kain atau handuk sekali pakai dengan larutan pemutih rumah tangga 1-5% (v:v dalam air) dan seka Baki Pemuatan Cepat Deteksi Molekuler Neogen.
2. Bilas Baki Pemuatan Cepat Deteksi Molekuler Neogen dengan air.
3. Gunakan handuk sekali pakai untuk mengelap Baki Pemuatan Cepat Deteksi Molekuler Neogen hingga kering.
4. Pastikan Baki Pemuatan Cepat Deteksi Molekuler Neogen dalam keadaan kering sebelum digunakan.

Penyiapan Sisipan Blok Dingin Deteksi Molekuler Neogen®

Tempatkan Sisipan Blok Dingin Deteksi Molekuler Neogen langsung di atas meja laboratorium: Baki Blok Dingin Deteksi Molekuler Neogen tidak digunakan. Gunakan blok pada suhu ruang laboratorium (20-25 °C).

Penyiapan Sisipan Blok Panas Deteksi Molekuler Neogen®

Tempatkan Sisipan Blok Panas Deteksi Molekuler Neogen di dalam unit pemanas blok ganda kering. Hidupkan unit pemanas blok kering dan atur suhu agar Sisipan Blok Panas Deteksi Molekuler Neogen dapat mencapai dan mempertahankan suhu 100 ± 1 °C.

CATATAN: Tergantung unit pemanasnya, tunggu sekitar 30 menit agar Sisipan Blok Panas Deteksi Molekuler Neogen mencapai suhu yang tepat. Menggunakan termometer yang sesuai dan terkalibrasi (misalnya, termometer pencelupan parsial, termometer termokopel digital, bukan termometer pencelupan total) yang ditempatkan di lokasi yang ditentukan, pastikan Sisipan Blok Panas Deteksi Molekuler Neogen berada pada suhu 100 ± 1 °C.

Penyiapan Instrumen Deteksi Molekuler Neogen®

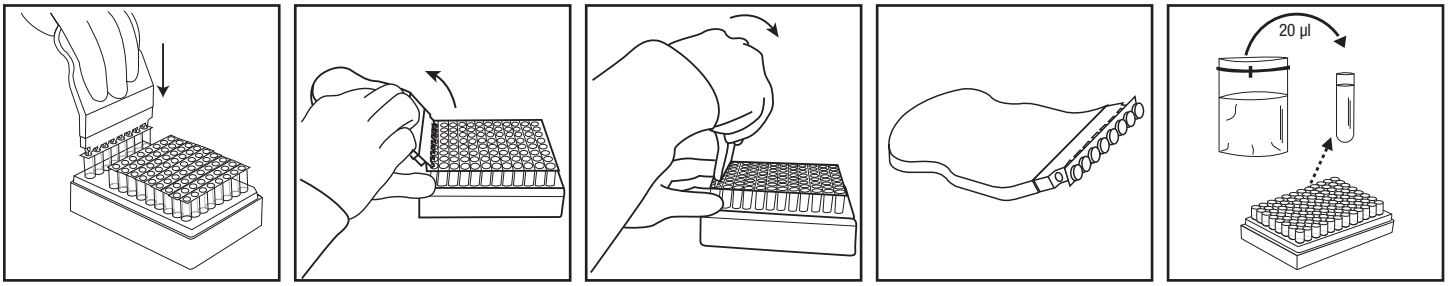
1. Buka Perangkat Lunak Deteksi Molekuler Neogen® dan masuk. Hubungi perwakilan Keamanan Makanan Neogen Anda untuk memastikan bahwa Anda memiliki versi perangkat lunak yang paling mutakhir.
2. Hidupkan Instrumen Deteksi Molekuler Neogen.
3. Buat atau edit sebuah proses dengan data untuk setiap sampel. Lihat Panduan Pengguna Sistem Deteksi Molekuler Neogen® untuk detail selengkapnya.

CATATAN: Instrumen Deteksi Molekuler Neogen harus mencapai dan mempertahankan suhu 60 °C sebelum memasukkan Baki Pemuatan Cepat Deteksi Molekuler Neogen dengan tabung reaksi. Langkah pemanasan ini memerlukan waktu sekitar 20 menit dan ditandai oleh lampu ORANYE pada bilah status instrumen. Ketika instrumen siap memulai proses, bilah status akan berubah menjadi HIJAU.

Lisis

1. Biarkan tabung Larutan Lisis Neogen menjadi hangat dengan mengatur suhu rak pada suhu ruang (20-25 °C) semalaman (16-18 jam). Alternatif untuk menyeimbangkan tabung Larutan Lisis Neogen ke suhu ruang adalah dengan meletakkan tabung Larutan Lisis Neogen di atas meja laboratorium setidaknya selama 2 jam, menginkubasi tabung Larutan Lisis Neogen di dalam inkubator 37 ± 1 °C selama 1 jam, atau meletakkannya di dalam pemanas blok ganda kering selama 30 detik pada suhu 100 °C.
2. Balik tabung yang tertutup untuk mencampur. Lanjutkan ke langkah berikutnya dalam waktu 4 jam.
3. Keluarkan kaldu pengayaan dari inkubator.
4. Satu tabung Larutan Lisis Neogen diperlukan untuk setiap sampel dan sampel Kontrol Negatif (NC) (media pengayaan steril).
   - 4.1 Strip tabung Larutan Lisis Neogen dapat dipotong sesuai dengan nomor tabung Larutan Lisis Neogen yang diinginkan. Pilih nomor tabung Larutan Lisis Neogen atau strip 8 tabung yang diperlukan. Tempatkan tabung Larutan Lisis Neogen di rak kosong.
   - 4.2 Untuk menghindari kontaminasi silang, buka satu strip tabung Larutan Lisis Neogen satu per satu dan gunakan ujung pipet baru untuk setiap langkah pemindahan.
   - 4.3 Pindahkan sampel yang telah diperkaya ke tabung Larutan Lisis Neogen seperti yang dijelaskan di bawah ini:

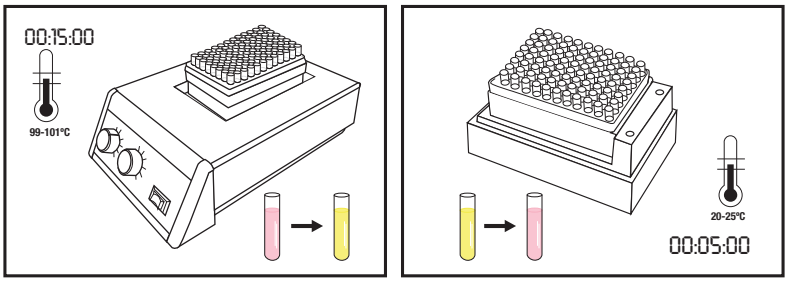
     Pindahkan setiap sampel yang diperkaya ke dalam tabung Larutan Lisis Neogen individu **terlebih dulu.** Pindahkan NC **terakhir.**
   - 4.4 Gunakan Alat Penutup/Pembuka-Lisis Deteksi Molekuler Neogen® untuk membuka strip tabung Larutan Lisis Neogen - satu per satu.
   - 4.5 Buang tutup tabung Larutan Lisis Neogen - Jika lisat akan disimpan untuk pengujian ulang, letakkan tutup tabung ke dalam wadah bersih untuk dipasang kembali setelah lisis.
     - 4.5.1 Untuk pemrosesan lisat yang sudah pernah digunakan, lihat Lampiran A.
   - 4.6 Pindahkan 20 µL sampel ke dalam tabung Larutan Lisis Neogen kecuali dinyatakan lain dalam Tabel Protokol 2, 3, dan 4.



5. Ulangi langkah 4.3 hingga setiap sampel ditambahkan ke tabung Larutan Lisis Neogen yang sesuai dalam strip.
6. Ulangi langkah 4.1 hingga 4.6 sesuai kebutuhan, untuk jumlah sampel yang akan diuji.
7. Setelah semua sampel dipindahkan, pindahkan 20 µL NC (media pengayaan steril, misalnya BPW ISO) ke dalam tabung Larutan Lisis Neogen. Jangan gunakan air sebagai NC.
8. Pastikan Sisipan Blok Panas Deteksi Molekuler Neogen berada pada suhu 100 ± 1 °C.
9. Tempatkan rak tabung Larutan Lisis Neogen yang tidak tertutup ke dalam Sisipan Blok Panas Deteksi Molekuler Neogen dan panaskan selama 15 ± 1 menit. Selama pemanasan, larutan Neogen Lysis akan berubah dari merah muda (dingin) menjadi kuning (panas).

   Sampel yang belum diberi perlakuan panas dengan benar selama langkah lisis pengujian dapat dianggap sebagai potensi bahaya biologis dan TIDAK boleh dimasukkan ke dalam Instrumen Deteksi Molekuler Neogen.

10. Keluarkan rak tabung Larutan Lisis Neogen yang tidak tertutup dari blok pemanas dan biarkan dingin di dalam Sisipan Blok Dingin Deteksi Molekuler Neogen sekurang-kurangnya 5 menit dan maksimal 10 menit. Sisipan Blok Dingin Molekuler Neogen, yang digunakan pada suhu ruang tanpa Baki Blok Dingin Deteksi Molekuler Neogen, harus diletakkan langsung di atas meja laboratorium. Setelah dingin, larutan lisis akan kembali berwarna merah muda.
11. Keluarkan rak tabung Larutan Lisis Neogen dari Sisipan Blok Dingin Deteksi Molekuler Neogen.

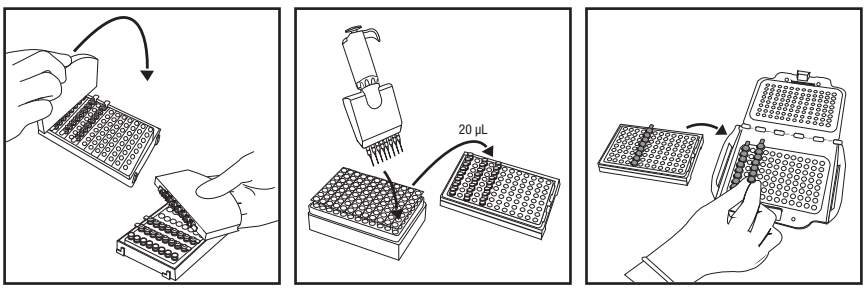


Amplifikasi

1. Satu Tabung Reagen Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen diperlukan untuk setiap sampel dan NC.
   - 1.1 Strip tabung dapat dipotong sesuai nomor tabung yang diinginkan. Pilih nomor Tabung Reagen Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen atau strip 8 tabung yang diperlukan.
   - 1.2 Tempatkan Tabun Reagen Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen di dalam rak kosong.
   - 1.3 Jangan mengganggu butiran reagen dari bagian bawah tabung.
2. Pilih satu tabung Kontrol Reagen Neogen dan letakkan di rak.
3. Untuk menghindari kontaminasi silang, buka strip Tabung Reagen Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen satu per satu dan gunakan ujung pipet baru untuk setiap langkah pemindahan.
4. Pindahkan lisat ke Tabung Reagen Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen dan tabung Kontrol Reagen Neogen seperti yang dijelaskan di bawah:

Pindahkan setiap sampel lisat ke dalam setiap Tabung Reagen Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen **terlebih dulu** dan diikuti dengan NC. Lakukan hidrasi pada tabung Kontrol Reagen Neogen **kemudian.**

5. Gunakan Alat Penutup/Pembuka-Reagen Deteksi Molekuler Neogen® untuk membuka tutup Tabung Reagen Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen – satu strip tabung secara bergantian. Buang tutup.
   - **5.1 Pindahkan 20 µL lisat Sampel dari ½ bagian atas cairan (hindari endapan) di dalam tabung Larutan Lisis Neogen ke dalam Tabung Reagen** Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) **Neogen yang sesuai. Keluarkan secara miring agar tidak mengganggu butiran. Campur dengan cara menyedot dan mengeluarkan dengan pipet secara perlahan sebanyak 5 kali.**
   - 5.2 Ulangi langkah 5.1 hingga setiap lisat sampel telah ditambahkan ke Tabung Reagen Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen yang sesuai di dalam strip.
   - 5.3 Tutup Tabung Reagen Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen dengan tutup tambahan yang disediakan dan gunakan sisi membulat pada Alat Penutup/Pembuka-Reagen Deteksi Molekuler Neogen untuk memberikan tekanan dengan gerakan maju-mundur untuk memastikan tutupnya terpasang erat.
   - 5.4 Ulangi langkah 5.1 hingga 5.3 sesuai kebutuhan, untuk jumlah sampel yang akan diuji.
   - 5.5 Ketika semua lisat sampel telah ditransfer, ulangi langkah 5.1 hingga 5.3 untuk memindahkan 20 µL lisat NC ke dalam Tabung Reagen Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen.
   - 5.6 Pindahkan **20 µL lisat NC ke dalam tabung Kontrol Reagen Neogen.** Keluarkan secara miring agar tidak mengganggu butiran. Campur dengan cara menyedot dan mengeluarkan dengan pipet secara perlahan sebanyak 5 kali.
6. Masukkan tabung yang telah ditutup ke dalam Baki Pemuatan Cepat Deteksi Molekuler Neogen yang bersih dan telah didekontaminasi. Kemudian tutup dan kencangkan penutupnya.



7. Tinjau dan konfirmasikan konfigurasi proses di dalam Perangkat Lunak Deteksi Molekuler Neogen.
8. Klik tombol Mulai pada perangkat lunak dan pilih instrumen yang akan digunakan. Tutup instrumen yang dipilih akan terbuka secara otomatis.
9. Tempatkan Baki Pemuatan Cepat Deteksi Molekuler Neogen ke dalam Instrumen Deteksi Molekuler Neogen dan pasang penutupnya untuk memulai pengujian. Hasil diberikan dalam waktu 60 menit, meskipun hasil positif dapat terdeteksi lebih cepat.
10. Setelah pengujian selesai, keluarkan Baki Pemuatan Cepat Deteksi Molekuler Neogen dari Instrumen Deteksi Molekuler Neogen dan singkirkan tabung dengan merendamnya dalam larutan pemutih rumah tangga 1-5% (v:v dalam air) selama 1 jam dan jauhkan dari area persiapan pengujian.

PERHATIAN: Untuk meminimalkan risiko positif palsu akibat kontaminasi silang, jangan sekali-kali membuka tabung reagen yang berisi DNA yang telah diamplifikasi. Termasuk di antaranya Kontrol Reagen Neogen, Tabung Reagen Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen, dan Tabung Kontrol Matriks Neogen. Selalu buang tabung reagen yang telah disegel dengan merendamnya dalam larutan pemutih rumah tangga 1-5% (v:v dalam air) selama 1 jam dan jauhkan dari area persiapan pengujian.

Hasil dan Penafsiran

Algoritma menginterpretasikan kurva output cahaya yang dihasilkan dari pendeteksian amplifikasi asam nukleat. Hasilnya dianalisis secara otomatis oleh perangkat lunak dan diberi kode warna berdasarkan hasilnya. Hasil Positif atau Negatif ditentukan oleh analisis sejumlah parameter kurva yang unik. Hasil dugaan positif dilaporkan secara real-time, sedangkan hasil Negatif dan Inspeksi akan ditampilkan setelah proses selesai.

Sampel terduga positif harus dikonfirmasi sesuai dengan prosedur operasional standar laboratorium atau dengan mengikuti konfirmasi metode referensi yang sesuai[1,2,3], dimulai dengan pemindahan dari kaldu pengayaan BPW ISO primer ke kaldu pengayaan sekunder, diikuti dengan pelapisan dan konfirmasi isolat menggunakan metode biokimia dan serologi yang sesuai.

CATATAN: Bahkan sampel negatif tidak akan memberikan pembacaan nol karena sistem dan reagen amplifikasi Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - E. coli O157 (termasuk H7) Neogen memiliki pembacaan unit cahaya relatif (RLU) “latar”.

Jika terjadi output cahaya yang tidak biasa, algoritma akan memberinya label “Inspeksi”. Neogen merekomendasikan pengguna untuk mengulangi pengujian untuk setiap sampel berlabel Inspeksi. Jika hasilnya tetap Inspeksi, lanjutkan ke tes konfirmasi menggunakan metode pilihan Anda atau seperti yang ditentukan oleh peraturan setempat.

Jika terjadi hasil yang tidak sesuai (dugaan positif dengan Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen, yang tidak dikonfirmasi dengan salah satu cara yang dijelaskan di atas, dan khususnya untuk uji aglutinasi lateks), laboratorium harus mengikuti langkah-langkah yang diperlukan untuk memastikan keabsahan hasil yang diperoleh.

Konfirmasi Hasil Menurut Metode Bersertifikasi NF VALIDATION

Dalam konteks NF VALIDATION, semua sampel yang diidentifikasi positif oleh Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen harus dikonfirmasi oleh salah satu tes berikut ini:

Opsi 1: Menggunakan standar ISO 16654[3] yang dimulai dari pengayaan larutan penyangga pepton[3].

Opsi 2: Menerapkan metode konfirmasi yang terdiri dari langkah berikut: Teteskan 50 µL pengayaan larutan penyangga pepton[3] ke cawan agar Cefixime Potassium Tellurite Sorbitol MacConkey (CT-SMAC)[3]. Lakukan inkubasi selama 24 ±3 jam pada suhu 37 °C. Teteskan koloni karakteristik pada agar nutrien dan lakukan uji aglutinasi lateks secara langsung pada koloni yang telah diisolasi. Jika hasil Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen tidak terkonfirmasi, lakukan langkah pemisahan imunomagnetik lalu teteskan 50 µL ke CT-SMAC.

Opsi 3: Menggunakan probe asam nukleat seperti yang dijelaskan di standar EN ISO 7218[5], yang dilakukan pada koloni yang diisolasi (dimurnikan atau tidak) dari CT-SMAC (lihat Opsi 1 atau 2). Probe asam nukleat harus berbeda dari yang digunakan dalam Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen.

Opsi 4: Menggunakan metode lain yang bersertifikasi NF VALIDATION, yang prinsipnya harus berbeda dari Deteksi Molekuler untuk Pengujian 2 - *E. coli* O157 (termasuk H7) Neogen. Protokol lengkap yang dijelaskan untuk metode tervalidasi kedua ini harus digunakan. Semua langkah sebelum dimulainya konfirmasi harus sama untuk kedua metode tersebut.

Jika terjadi hasil yang tidak sesuai (dugaan positif dengan metode alternatif, yang tidak dikonfirmasi dengan salah satu cara yang dijelaskan di atas), laboratorium harus mengikuti langkah-langkah yang diperlukan untuk memastikan keabsahan hasil yang diperoleh.

Jika Anda memiliki pertanyaan tentang aplikasi atau prosedur tertentu, silakan kunjungi situs web kami di www.neogen.com atau hubungi perwakilan atau distributor Neogen setempat.

Lampiran A. Interupsi Protokol: Penyimpanan dan pengujian ulang sampel

1. Untuk menyimpan lisat yang telah menerima perlakuan panas, tutup kembali tabung lisis dengan tutup yang bersih (lihat bagian **Lisis**, 4.5)
2. Untuk menyimpan sampel yang sudah diperkaya, lakukan inkubasi selama minimal 18 jam sebelum disimpan.
3. Simpan pada suhu 4 hingga 8 °C hingga 72 jam.
4. Siapkan sampel yang disimpan untuk amplifikasi dengan membalikkan 2-3 kali untuk mencampur.
5. Buka tutup tabung.

6. Tempatkan tabung lisat yang telah dicampur ke Sisipan Blok Panas Deteksi Molekuler Neogen dan panaskan pada suhu 100 ± 1 °C selama 5 ± 1 menit.
7. Keluarkan rak tabung Larutan Lisis Neogen dari blok panas dan biarkan dingin di dalam Sisipan Blok Dingin Deteksi Molekuler Neogen setidaknya selama 5 menit dan paling lama 10 menit.
8. Lanjutkan protokol di bagian **Amplifikasi** yang dijelaskan di atas.

Referensi:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli.* November 2015.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 5.09. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. Tanggal Berlaku: 15 Januari 2015.
3. ISO 16654:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.
7. Kualifikasi Instalasi (IQ)/Kualifikasi Operasional (OQ) Sistem Deteksi Molekuler Neogen®. Keamanan Makanan Neogen.

Penjelasan Simbol

info.neogen.com/symbols

AOAC adalah merek dagang terdaftar milik AOAC INTERNATIONAL

Official Methods adalah merek layanan terdaftar milik AOAC INTERNATIONAL

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
FS00827A