










-  **(EN)** Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*)
-  **(FR)** Kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*)
-  **(DE)** Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*)
-  **(ES)** Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*)
-  **(PT)** Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*)
-  **(JA)** 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*stx/eae*) 用
-  **(ZH)** 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因)
-  **(TH)** ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*stx* และ *eae*)
-  **(KO)** Molecular Detection Assay 2 - 시가독소 생성 대장균 (STEC)(*stx* 및 *eae*)

2

Product Instructions

Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*)

Product Description and Intended Use

The Neogen® Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*) is used with the Neogen® Molecular Detection System for the rapid and specific detection of Shiga toxin gene (*stx1* and/or *stx2*) and intimin gene (*eae*) from Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC, also known as “verocytotoxin-producing *E. coli*”) in enriched foods and food process environmental samples. The term STEC refers to *E. coli* pathotypes capable of producing Shiga toxin type 1 (Stx1), type 2 (Stx2), or both, encoded by *stx1* and *stx2* genes, respectively. STEC containing virulence genes for *stx1* and/or *stx2* and *eae* (intimin gene involved in attaching and effacing phenotype) are designated enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). The screening kit contains two separate reagent tubes, one to detect virulence genes *stx1* and/or *stx2* and the other to detect *eae* from STEC (EHEC). The Neogen® Molecular Detection System Software reports results separately for each of the assays and uses results from both assays to call the sample positive or negative for STEC (EHEC). For a presumptive positive for STEC (EHEC), both gene targets (*stx1* and/or *stx2* and *eae*) must be positive. The *stx* assay does not differentiate between *stx1* and *stx2*, but detects presence of *stx1* and/or *stx2*.

The Neogen Molecular Detection Assay uses 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^(1,2,3) or as specified by local regulations.

The Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*) 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 pharmaceutical, cosmetics, clinical or veterinary samples. The Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*) 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 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*) with buffered peptone water (BPW)-ISO enrichment broth.

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 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*) test kit contains 48 tests of each of *stx* and *eae* reagents, 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 LS per tube	Racked and ready to use
Neogen® Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (<i>stx</i>) Reagent Tubes	Orange tubes	48 (2 pouches; containing 3 strips of 8 tubes)	Lyophilized specific amplification and detection mix	Ready to use
Neogen® Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (<i>eae</i>) Reagent Tubes	Red tubes	48 (2 pouches; containing 3 strips of 8 tubes)	Lyophilized specific amplification and detection mix	Ready to use
Extra caps	Orange caps	96 (12 strips of 8 caps)		Ready to use
Extra caps	Red 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 (NC), not provided in the kit, is a sterile enrichment medium, e.g., BPW-ISO. Do not use water as a NC.

A quick start guide is available at www.neogen.com

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 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*). 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 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*) 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⁽⁴⁾, ISO/IEC 17025⁽⁵⁾, or ISO 7218⁽⁶⁾.

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.
- Store the Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*) as indicated on the package and in the product instructions.
- Always use the Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*) by the expiration date.
- Use the Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*) with food and environmental samples that have been validated internally or by a third party.
- Use the Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*) 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 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 Neutralizing Buffer with aryl sulfonate complex: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G, and HS2410NB2G.

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 according to current local/regional/national regulatory standards.
- 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.

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:

- Change gloves prior to reagent pellet hydration.
- 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.
- 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.

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

- Never open reagent 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.
- Never autoclave reagent tubes post amplification.

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, laboratory technique and the sample itself 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 Neogen Molecular Detection Matrix Control (MC) to determine if the matrix has the ability to impact the Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (stx and eae) 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 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*) at 2-8°C (35-47°F). 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 (35-47°F) for no longer than 90 days.

Do not use Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*) 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 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*) 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.

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.

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

See Section "Specific Instructions for Validated Methods" for specific requirements:

Table 3 for enrichment protocols according to *Performance Tested Method*SM (PTM) Certificate #071902.

Sample Enrichment

Tables 2 and 3 present guidance for general 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. Allow BPW ISO enrichment medium to equilibrate to 41.5 ±1°C.
2. Aseptically combine the enrichment medium and sample. For all meat and highly particulate samples, the use of filter bags is recommended.
3. Mix all matrices and incubate as outlined in the appropriate protocol table (see Table 2 or 3).

Environmental samples

WARNING: Should you select to use neutralizing buffer that contains aryl sulfonate complex as the hydrating solution for the sponge, it is required to perform a 1:2 dilution (1 part sample into 1 part sterile enrichment broth) of the enriched environmental sample before testing in order to reduce the risks associated with a false-negative result leading to the release of contaminated product. Another option is to transfer 10 µL of the neutralizing buffer enrichment into the Neogen Lysis Solution tubes.

It is the user's responsibility to validate alternate sampling protocols or dilution ratios to ensure this test method meets the user's criteria.

**Table 2.** General Enrichment Protocols.

Sample Matrix	Sample Size	Enrichment Broth Volume (mL) (pre-warmed)	Enrichment Temperature ($\pm 1^\circ\text{C}$)	Enrichment Time (hours)	Sample Analysis Volume (μL)
Raw ground beef , pieces and trim ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO	41.5	10-18	20
Raw Meat (pork, poultry, lamb, bison) ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO	41.5	10-18	20
Leafy Produce ^(b)	200 g	450 BPW-ISO	41.5	18-24	20
Sprouts ^(c)	25 g	225 BPW-ISO	41.5	18-24	20
Raw Dairy ^(d)	25 g or 25 mL	225 BPW-ISO	41.5	18-24	20

^(a) Hand massage the beef (ground beef, pieces and trim) and raw meat (ground pork, poultry and non-beef meat) samples for 30-60 seconds to disperse and break apart clumps after adding pre-warmed BPW-ISO.

^(b) For leafy produce, rinse enrichment broth (pre-warmed BPW-ISO) over leaves and agitate gently for 30-60 seconds. Do not massage or homogenize leaves.

^(c) For sprouts, rinse enrichment broth (pre-warmed BPW-ISO) over sprouts for 30-60 seconds and do not massage or homogenize.

^(d) Homogenize the raw dairy samples for 30 to 60 seconds after adding pre-warmed BPW-ISO.

Specific Instructions for Validated Methods

AOAC® Performance Tested MethodSM (PTM) Certificate #071902



In AOAC Research Institute PTMSM studies, the Neogen Molecular Detection Assay 2 – STEC Gene Screen (*stx* and *eae*) was found to be an effective method for the detection of STEC. The matrices tested in the study are shown in Table 3.

Table 3. Enrichment Protocols According to AOAC PTMSM Certificate #071902.

Sample Matrix	Sample Size	Enrichment Broth Volume (mL)	Enrichment Temperature ($\pm 1^\circ\text{C}$)	Enrichment Time (hours)	Sample Analysis Volume (μL)
Raw beef trim ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (pre-warmed)	41.5	10-18	20
Raw ground beef ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (pre-warmed)	41.5	10-18	20
Raw ground beef ^(a)	25 g	225 BPW-ISO (pre-warmed)	41.5	10-18	20
Raw ground pork ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (pre-warmed)	41.5	10-18	20
Raw poultry parts ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (pre-warmed)	41.5	10-18	20
Mechanically separated chicken	25 g	225 BPW-ISO (pre-warmed)	41.5	10-24	20
Spinach ^(b)	200 g	450 BPW-ISO (pre-warmed)	41.5	18-24	20
Sprouts ^(c)	25 g	225 BPW-ISO (pre-warmed)	41.5	18-24	20
Dried cannabis flower, dried hemp flower ⁽⁴⁾	10 g	90 BPW-ISO	41.5	28-32	20

^(a) For the beef samples (ground beef and trim) add pre-warmed BPW-ISO to the beef sample. Hand massage for 30-60 seconds to disperse and break apart clumps.



- (b) For spinach, add pre-warmed BPW-ISO to the matrix. Rinse liquid over leaves and agitate gently for 30-60 seconds. Do not massage or homogenize leaves.
- (c) For the sprouts, rinse enrichment broth (pre-warmed BPW-ISO) over sprouts for 30-60 seconds and do not massage or homogenize.
- (d) Dried cannabis flower (>0.3% THC) and dried hemp flower (≤0.3%THC)

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).

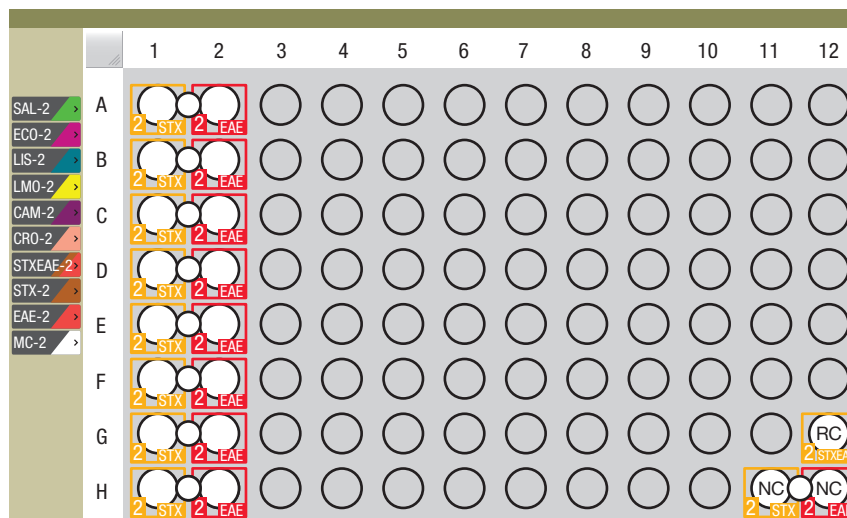
Preparation of the Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert

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 System 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.
 - 3.1. Selection of STXEAE-2 icon in software selects two adjacent wells (like A1, A2, B1, B2, etc.), one for *stx* and the other for *eae* reagent tube, as each sample is run with two assays. NC is set up for each of the reagent tube and one RC is set up for the kit.

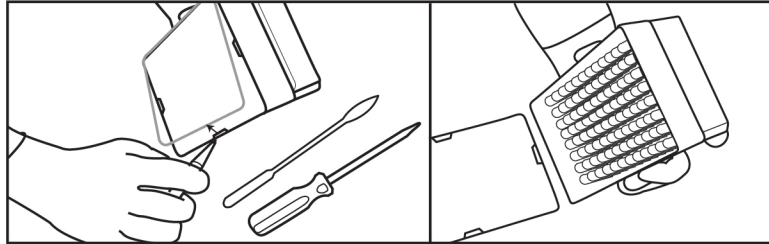




NOTE: The Neogen Molecular Detection Instrument must reach Ready state before inserting the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray with reaction tubes. This heating step takes approximately 20 minutes and is indicated by an ORANGE light on the instrument's status bar. When the instrument is ready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

Lysis

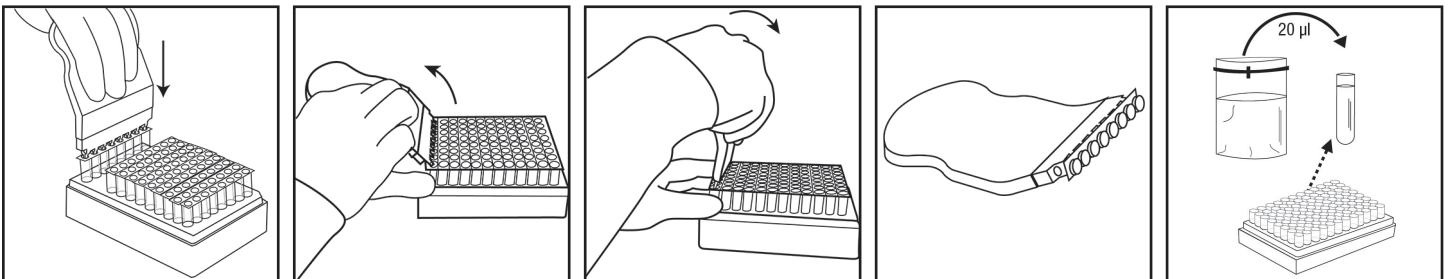
Remove the bottom of Neogen Lysis Solution Rack with a screwdriver or spatula before placing in the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert.



1. Allow the Neogen Lysis Solution tubes to warm up by setting the rack at ambient temperature (20-25°C) overnight (16-18 hours). Alternatives to equilibrate the Neogen Lysis Solution tubes to ambient 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 after inverting.
3. Remove the enriched sample from the incubator.
4. One Neogen Lysis Solution tube is required for each sample and the NC (sterile enrichment medium).
 - 4.1. Neogen Lysis Solution tube strips can be cut to desired tube number. Select the number of 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 tube 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**.

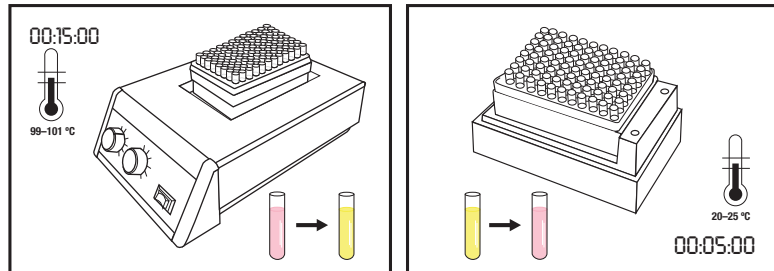
- 4.4. Use the Neogen® Molecular Detection Cap/Decap Tool-Lysis to decap one Neogen Lysis Solution tube strip - one strip at a time.
- 4.5. Discard the Neogen Lysis Solution tube cap - If lysate will be retained for retest, place the caps into a clean container for re-application after lysis.
 - 4.5.1.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



5. Repeat steps 4.4 to 4.6 as needed, for the number of samples to be tested.
6. When all samples have been transferred, transfer 20 µL of NC (sterile enrichment medium e.g. BPW) into Neogen Lysis Solution tube. Do not use water as a NC.
7. Verify that the temperature of the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert is at 100 ± 1°C.
8. 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).

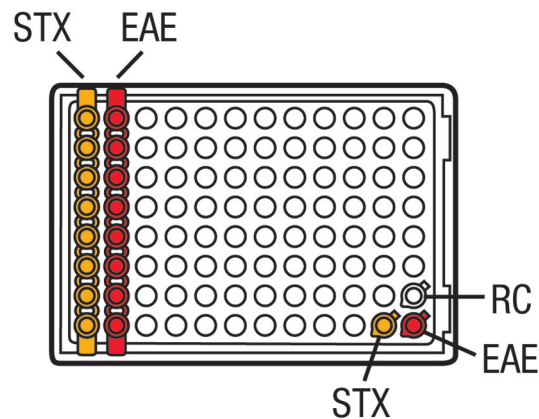


- 8.1. Samples that have not been properly heat treated during the assay lysis step may be considered a potential biohazard and should NOT be inserted into the Neogen Molecular Detection Instrument.
9. Remove the uncovered rack of Neogen Lysis Solution tubes from the Neogen Molecular Detection Heat Block 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 Detection 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 Neogen Lysis Solution will revert to a pink color.
10. Remove the rack of Neogen Lysis Solution tubes from the Neogen Molecular Detection Chill Block Insert.



Amplification

1. One Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx*) and one Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*eae*) 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 - STEC Gene Screen (*stx*) and Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*eae*) Reagent Tube or 8-tube strips needed.
 - 1.2. Place Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx*) tubes in an empty rack in one column.
 - 1.3. Place Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*eae*) tubes in the adjacent right column.
 - 1.4. Avoid disturbing the reagent pellets from the bottom of the tubes.
2. Select one Neogen Reagent Control Tube and place in rack.
3. For NC lysate, select one Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx*) Reagent Tube and one Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*eae*) Reagent Tube and place in rack.

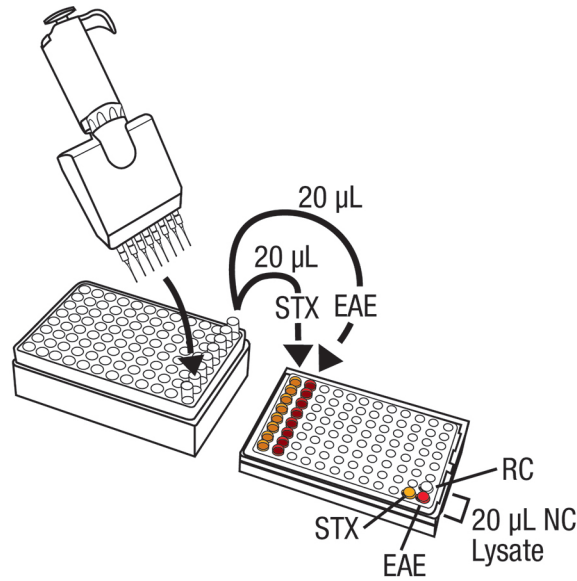


4. To avoid cross-contamination, decap one Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* or *eae*) Reagent Tube strip at a time and use a new pipette tip for each transfer step.
5. Transfer each of the lysate to a Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* or *eae*) Reagent Tube as described below.
 - 5.1. First, transfer each of the sample lysate to a Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx*) Reagent Tube as described in 5.5 and 5.6.
 - 5.2. Second, transfer each of the same sample lysate to a Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*eae*) Reagent Tube in the adjacent right column as described in 5.5 and 5.6.

NOTE: Use new pipette tip for each transfer. Do not use same pipette tip for transfer to *stx* and *eae* reagent tube from the same lysate sample.



- 5.3. After all sample lysate transfer, add NC lysate to each of Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx*) Reagent Tube and Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*eae*) Reagent Tube.
- 5.4. Transfer NC lysate last to Reagent Control Tube.



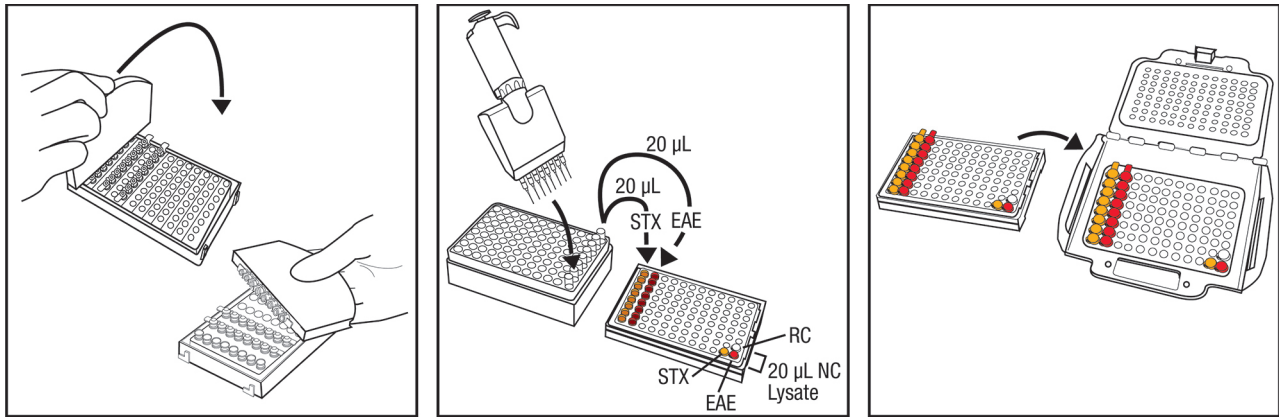
- 5.5. Use the Neogen® Molecular Detection Cap/Decap Tool-Reagent to decap the Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* or *eae*) Reagent Tubes - one strip at a time. Discard cap.
- 5.6. **Transfer 20 µL of sample lysate from the upper ½ of the liquid (avoid precipitate) in the Neogen Lysis Solution Tube into corresponding Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* or *eae*) Reagent Tube. Dispense at an angle to avoid disturbing the pellets. Mix by gently pipetting up and down 5 times.**

NOTE: Use new pipette tip for each transfer. Do not use same pipette tip for transfer to *stx* and *eae* reagent tube from the same lysate sample.

- 5.7. Repeat step 5.6 until individual sample lysate has been added to a corresponding Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* or *eae*) Reagent Tube in the strip.
- 5.8. Cover the Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* or *eae*) 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.
- 5.9. Repeat steps 5.6 to 5.8 as needed, for the number of samples to be tested for both Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*) reagent tubes.
- 5.10. When all sample lysates have been transferred, repeat 5.6 to 5.8 to transfer 20 µL of NC lysate into each of a Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx*) and Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*eae*) Reagent Tube.
- 5.11. 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.

Transfer each sample lysate into individual Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen Reagent Tube (*stx* or *eae*) first followed by the NC. Hydrate the Neogen Reagent Control Tube last.

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 System 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 Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*) Reagent, Neogen Reagent Control, 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.

The Neogen Molecular Detection System Software reports results separately for each of the assays (*stx* and *eae*) and uses results from both assays to call the sample positive or negative for STEC (EHEC) (see Figure below). For a presumptive positive for STEC (EHEC), both gene targets (*stx1* and/or *stx2* and *eae*) must be positive. **If any of the individual assays show error or inspect, the final result will be error or inspect. Retest is needed to properly callout the final result** (see result key). The software also allows to set up individual assays if needed and the sample lysate or fresh lysate from enrichment can be retested with the assays following steps as outlined in Appendix A for retained lysates and steps under Lysis and Amplification section for retained enrichment.



Enriched sample lysate result keys

	Both positive, final result positive
	stx positive, eae negative, final result negative
	stx positive, eae inspect, final result inspect, retest
	stx positive, eae error, final result error, retest
	stx negative, eae positive, final result negative
	stx negative, eae negative, final result negative
	stx negative, eae inspect, final result inspect, retest
	stx negative, eae error, final result error, retest
	stx inspect, eae positive, final result inspect, retest
	stx inspect, eae negative, final result inspect, retest
	stx inspect, eae inspect, final result inspect, retest
	stx inspect, eae error, final result error, retest
	stx error, eae positive, final result error, retest
	stx error, eae negative, final result error, retest
	stx error, eae inspect, final result error, retest
	stx error, eae error, final result error, retest

Negative control keys

	Valid for both, link valid
	Valid for one, other error, link error, retest
	Valid for one, other invalid, link invalid, retest
	Both error, link error, retest
	Both invalid, link invalid, retest
	One error, other invalid, link error, retest

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 enrichment broth to selective plates, confirmation of isolates using appropriate biochemical and serological methods. For matrices specified by MLG 5C, immunomagnetic separation (IMS) should be done prior to plating on selective medium.

NOTE: Even a negative sample will not give a zero reading as the system and Neogen Molecular Detection Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* and *eae*) 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^(1, 2, 3) or as specified by local regulations.



Table 4. Symbols and info for various software results.

Well Type	Well Result Symbol	Result	Interpretation
Sample		Positive	The sample is presumptive positive for the target pathogen.
Sample		Negative	The sample is negative for the target pathogen.
Sample		Inhibited	The sample matrix was inhibitory to the assay. A re-test may be required. Refer to the troubleshooting section and the assay kit Product Instructions for more information.
Sample		Inspect	The presence or absence of the target pathogen was indeterminate. A re-test may be required. Refer to the troubleshooting section and the assay kit Product Instructions for more information.
Sample		Error	No bioluminescence was detected. A re-test may be required. Refer to the troubleshooting section and the assay kit Product Instructions for more information.

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

1. To store a heat-treated lysate, re-cap the Neogen Lysis Solution 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 $100 \pm 1^\circ\text{C}$ for 5 ± 1 minutes.
7. Remove the rack of Neogen Lysis Solution tubes from the Neogen Molecular Detection Heat 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. Microbiology Laboratory Guidebook. U. S. Department of Agriculture (USDA) Food Safety and Inspection Service (FSIS) Microbiology Laboratory guidebook 5C.00. Detection and isolation of top seven Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STECs) from meat products and carcass and environmental sponges. Feb 4, 2019.
2. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. October 2018.
3. ISO/TS 13136:2012: Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups
4. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good laboratory practice for nonclinical laboratory studies.
5. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
6. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examination.
7. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.

Explanation of Symbols

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar 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 Leshar Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00918A

Instructions relatives au produit

Kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*)

Description et utilisation du produit

Le kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*) de Neogen® est utilisé avec le système de détection moléculaire Neogen® pour la détection rapide et spécifique du gène de shigatoxine (*stx1* et/ou *stx2*) et le gène de l'intimine (*eae*) des *E. coli* productrices de shigatoxine (STEC, également connues comme « *E. coli* productrices de vérocytotoxine ») dans les échantillons environnementaux d'aliments enrichis et de processus de transformation d'aliments. Le terme STEC se réfère à des pathotypes de *E. coli* capables de produire une shigatoxine de type 1 (*Stx1*), de type 2 (*Stx2*) ou les deux, codées respectivement par les gènes *stx1* et *stx2*. Les STEC contenant des gènes de virulence pour *stx1* et/ou *stx2* et *eae* (gène de l'intimine impliqué dans la fixation et l'effacement du phénotype) sont appelées *E. coli* entérohémorragiques (EHEC). Le kit de détection contient deux tubes de réactif distincts, l'un pour détecter les gènes de virulence *stx1* et/ou *stx2* et l'autre pour détecter les *eae* à partir des STEC (EHEC). Le logiciel du Système de détection moléculaire Neogen® rapporte les résultats séparément pour chacun des tests et utilise les résultats des deux tests pour considérer l'échantillon positif ou négatif pour les STEC (EHEC). Pour un positif présumé pour le STEC (EHEC), les deux cibles génétiques (*stx1* et/ou *stx2* et *eae*) doivent être positives. Le test *stx* ne fait pas de distinction entre *stx1* et *stx2*, mais détecte la présence de *stx1* et/ou *stx2*.

Le kit de détection moléculaire Neogen utilise la technique LAMP (amplification isotherme médiée par des boucles) afin d'amplifier rapidement les séquences d'acide nucléique de façon extrêmement spécifique et sensible, associée à la bioluminescence pour détecter l'amplification. Les résultats présumés positifs sont visibles en temps réel tandis que les résultats négatifs sont affichés à la fin de l'essai. Les résultats présumés positifs doivent être confirmés par vos méthodes usuelles^(1, 2, 3) ou en fonction des méthodes spécifiques répondant aux normes locales.

Le kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*) de Neogen est destiné à être utilisé en laboratoire par des professionnels formés aux techniques de laboratoire. Neogen n'a pas étudié l'utilisation de ce produit dans des secteurs autres que l'alimentaire et les boissons. Par exemple, Neogen n'a pas étudié ce produit dans le cadre de tests sur des échantillons de produits pharmaceutiques, cosmétiques, cliniques ou vétérinaires. Le kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*) Neogen n'a pas été évalué en utilisant tous les produits et processus de transformation alimentaire, tous les protocoles de test ou toutes les souches bactériennes possibles.

Comme avec 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 les techniques de laboratoires peuvent également influencer les résultats. Neogen recommande d'évaluer la méthode, notamment le milieu d'enrichissement, dans l'environnement de l'utilisateur à l'aide d'un nombre d'échantillons suffisant et avec des charges microbiennes déterminées pour répondre aux critères de l'utilisateur.

Neogen a évalué le kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*) Neogen avec du bouillon d'enrichissement à l'eau peptonée tamponnée ISO (BPW).

L'instrument de détection moléculaire Neogen® est conçu pour être utilisé avec des échantillons traités thermiquement pendant l'étape de lyse, procédé qui détruit les organismes présents dans l'échantillon. Les échantillons qui n'ont pas été soumis à un traitement thermique adéquat pendant l'étape de lyse peuvent être considérés comme potentiellement dangereux et ne doivent PAS être insérés dans l'instrument de détection moléculaire Neogen.

Neogen Sécurité Alimentaire respecte la norme ISO (International Organization for Standardization) 9001 en matière de conception et de fabrication.

Le kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*) de Neogen contient 48 tests de chacun des réactifs *stx* et *eae*, décrits dans le tableau 1.

Tableau 1. Composants du kit de détection moléculaire Neogen.

Élément	Identification	Quantité	Contenu	Commentaires
Solution de lyse (LS) Neogen®	Solution rose en tubes transparents	96 (12 barrettes de 8 tubes)	580 µL de LS par tube	Placé sur portoir et prêt à l'emploi
Tubes de réactifs du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (<i>stx</i>) de Neogen®	Tubes orange	48 (2 poches, contenant 3 barrettes de 8 tubes)	Mélange spécifique lyophilisé pour l'amplification et la détection	Prêts à l'emploi
Tubes de réactifs du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (<i>eae</i>) de Neogen®	Tubes rouges	48 (2 poches, contenant 3 barrettes de 8 tubes)	Mélange spécifique lyophilisé pour l'amplification et la détection	Prêts à l'emploi
Bouchons supplémentaires	Bouchons orange	96 (12 barrettes de 8 bouchons)		Prêts à l'emploi
Bouchons supplémentaires	Bouchons rouges	96 (12 barrettes de 8 bouchons)		Prêts à l'emploi
Contrôle de réactif Neogen® (RC)	Tubes « Flip-Top » transparents	16 (2 poches de 8 tubes individuels)	ADN témoin lyophilisé, mélange pour l'amplification et la détection	Prêts à l'emploi

Le témoin négatif (NC), non fourni dans le kit, est un milieu d'enrichissement stérile, par exemple BPW ISO. Ne pas utiliser d'eau comme NC.

Un guide de démarrage rapide est disponible à l'adresse www.neogen.com

Sécurité

L'utilisateur doit lire, comprendre et suivre toutes les informations de sécurité mentionnées dans les instructions relatives au système de détection moléculaire Neogen et au kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*) Neogen. Conserver ces consignes de sécurité pour référence ultérieure.

⚠️ AVERTISSEMENT : indique une situation dangereuse qui, si elle n'est pas évitée, pourrait entraîner un décès, des blessures graves et/ou des dommages matériels.

AVIS : indique une situation potentiellement dangereuse qui, si elle n'est pas évitée, pourrait entraîner des dommages matériels.

⚠️ AVERTISSEMENT

Ne pas utiliser le Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*) dans le diagnostic de maladies chez les humains ou les animaux.

L'utilisateur doit former son personnel aux techniques d'analyse actuelles appropriées, par exemple : les bonnes pratiques de laboratoire⁽⁴⁾, la norme ISO/CEI 17025⁽⁵⁾ ou ISO 7218⁽⁶⁾.

Afin de réduire les risques associés aux faux négatifs, qui peuvent entraîner la diffusion de produits contaminés :

- Se conformer au protocole et effectuer les tests en suivant exactement les instructions relatives au produit.
- Conserver le kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*) Neogen comme indiqué sur l'emballage et dans les instructions relatives au produit.
- Toujours utiliser le kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*) Neogen avant la date d'expiration.
- Utiliser le Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*) avec des échantillons alimentaires et environnementaux qui ont été validés en interne ou par un tiers.
- N'utiliser le Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*) qu'avec des surfaces, des désinfectants, des protocoles et des souches bactériennes validés en interne ou par une tierce partie.



- En cas d'échantillon environnemental contenant un tampon neutralisant avec un composé d'aryle sulfonate, diluer l'échantillon dans un bouillon d'enrichissement stérile 1:2 avant l'analyse (1 volume d'échantillon pour 1 volume de bouillon). Une autre option consiste à transférer 10 µL de l'enrichissement du tampon neutralisant dans les tubes de solution de lyse Neogen. Produits pour la manipulation des échantillons Neogen® comprenant un tampon neutralisant contenant un complexe d'aryle sulfonate : RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G et HS2410NB2G.

Afin de réduire les risques associés à l'exposition aux produits chimiques et aux dangers biologiques :

- Effectuer les analyses bactériologiques dans un laboratoire correctement équipé et sous la supervision de professionnels qualifiés. Les milieux et les équipements d'enrichissement incubés ou les surfaces ayant été en contact avec des milieux d'enrichissement incubés peuvent contenir des agents pathogènes à des niveaux suffisamment élevés pour entraîner des risques pour la santé humaine.
- Toujours respecter les consignes de sécurité courantes du laboratoire, porter des tenues et lunettes de protection adaptées lors de la manipulation de réactifs et d'échantillons contaminés.
- Éviter tout contact avec le contenu du milieu d'enrichissement et les tubes de réactifs après l'amplification.
- Éliminer les échantillons enrichis conformément aux normes locales/régionales/nationales/réglementaires actuelles.
- Les échantillons qui n'ont pas été soumis à un traitement thermique adéquat pendant l'étape de lyse peuvent être considérés comme potentiellement dangereux et ne doivent PAS être insérés dans l'instrument de détection moléculaire Neogen.

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

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

Afin de réduire les risques associés à l'exposition à des liquides très chauds :

- Ne pas dépasser le paramètre de température recommandé sur le dispositif de chauffe.
- Ne pas dépasser le temps de chauffe recommandé.
- Utiliser un thermomètre étalonné adapté pour vérifier la température du support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen® (p. ex. thermomètre à immersion partielle ou thermomètre à thermocouple numérique et non un thermomètre à immersion totale). Le thermomètre doit être placé à l'endroit indiqué du support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen.

AVIS**Afin de réduire les risques associés à la contamination croisée lors de la préparation de l'analyse :**

- Changer de gants avant l'hydratation des pastilles réactives.
- Utiliser de préférence des pipettes de qualité conforme à la biologie moléculaire, stériles et munies d'embouts à filtre.
- Utiliser une nouvelle pipette pour chaque transfert d'échantillon.
- Utiliser les bonnes pratiques de laboratoire pour transférer l'échantillon de l'enrichissement vers le tube de lyse. Pour éviter toute contamination des pipettes, 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 disposant si possible d'une lampe germicide.
- Décontaminer régulièrement les plans de travail et le matériel du laboratoire (pipettes, outils d'ouverture/de fermeture, etc.) avec une solution de 1-5 % d'eau de Javel (v:v dans de l'eau) ou avec une solution pour l'élimination de l'ADN.

Afin de réduire les risques associés à un résultat faux positif :

- Ne jamais ouvrir les tubes de réactif après amplification.
- Toujours éliminer les tubes contaminés en les faisant tremper dans une solution d'eau de Javel concentrée à 1-5 % (v:v dans l'eau) pendant 1 heure. Effectuer cette procédure à distance de la zone de préparation de l'analyse.
- Ne jamais stériliser à l'autoclave les tubes de réactifs après amplification.

Consulter la fiche de données de sécurité pour obtenir des informations supplémentaires et connaître la réglementation locale relative à la mise au rebut.

Pour toute question concernant des applications ou procédures spécifiques, consulter notre site Internet à l'adresse www.neogen.com ou contacter votre représentant ou distributeur Neogen local.

Responsabilité de l'utilisateur

Il incombe aux utilisateurs de prendre connaissance des instructions et des informations relatives au produit. Consulter notre site Web www.neogen.com pour obtenir davantage d'informations ou contacter votre représentant ou distributeur Neogen local.

Lors du choix d'une méthode d'analyse, il est important d'admettre que des facteurs externes comme les méthodes d'échantillonnage, les protocoles de test, la préparation des échantillons, la manipulation, les techniques de laboratoire et l'échantillon lui-même peuvent influencer les résultats.

Il incombe à l'utilisateur de sélectionner une méthode ou un produit d'analyse adapté pour évaluer un nombre suffisant d'échantillons avec les matrices et les souches microbiennes appropriées, afin de garantir que la méthode d'analyse est conforme à ses critères.

Il incombe également à l'utilisateur de déterminer si une méthode d'analyse et ses résultats répondent aux exigences de ses clients ou fournisseurs.

Comme pour toute méthode d'analyse, les résultats obtenus avec un produit Neogen Sécurité Alimentaire ne constituent pas une garantie de la qualité des matrices ou des processus testés.

Dans le but d'aider les clients à évaluer la méthode pour différentes matrices alimentaires, Neogen a élaboré le kit de contrôle de matrice pour système de détection moléculaire Neogen®. Lorsque cela est nécessaire, utilisez le kit de contrôle de matrice (MC) pour système de détection moléculaire Neogen pour déterminer si la matrice peut avoir un impact sur les résultats du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*) Neogen. Tester plusieurs échantillons représentatifs de la matrice, c.-à-d. des échantillons d'origines différentes, au cours de toute période de validation lors de l'adoption de la méthode Neogen ou dans le cadre d'analyses de matrices nouvelles, inconnues ou ayant subi des modifications de matières premières ou de processus.

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

Limitations de garanties/Limites de recours

SAUF SI EXPRESSÉMENT ÉTABLI DANS LA SECTION DE GARANTIE LIMITÉE D'UN EMBALLAGE DE PRODUIT INDIVIDUEL, NEOGEN RENONCE À TOUTE GARANTIE EXPLICITE ET IMPLICITE, Y COMPRIS, MAIS SANS S'Y LIMITER, TOUTE GARANTIE DE COMMERCIALISATION OU D'ADAPTATION POUR UN USAGE SPÉCIFIQUE. En cas de défaut de tout produit Neogen Sécurité Alimentaire, Neogen ou son distributeur agréé s'engage, à son entière discrétion, au remplacement ou au remboursement du prix d'achat du produit. Il s'agit de vos recours exclusifs. Tout défaut supposé du produit devra être notifié à Neogen dans un délai de soixante jours et le produit renvoyé à Neogen. Merci de contacter votre représentant Neogen ou votre distributeur Neogen agréé pour toute autre question.

Limitation de responsabilité de Neogen

NEOGEN NE SERA PAS TENUE RESPONSABLE DES PERTES OU DES DOMMAGES ÉVENTUELS, QU'ILS SOIENT DIRECTS, INDIRECTS, SPÉCIFIQUES, ACCIDENTELS OU CONSÉCUTIFS, Y COMPRIS, MAIS SANS S'Y LIMITER, LES PERTES DE PROFITS. En aucun cas et en aucune manière, la responsabilité de Neogen ne sera engagée au-delà du prix d'achat du produit prétendu défectueux.

Stockage et mise au rebut

Stocker le kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*) Neogen à 2 et 8 °C (35 et 47 °F). Ne pas congeler. Conserver à l'abri de la lumière. Une fois le kit ouvert, vérifier que le sachet en aluminium est intact. Si ce sachet est endommagé, ne pas utiliser le kit. Après ouverture, les tubes de réactif non utilisés doivent toujours être conservés dans le sachet refermable, en laissant l'agent déshydratant à l'intérieur afin de maintenir la stabilité des réactifs lyophilisés. Conserver les poches refermées à une température comprise entre 2 et 8 °C (entre 35 et 47 °F). Ne pas conserver plus de 90 jours.

Ne pas utiliser kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*) Neogen après la date d'expiration. La date de péremption et le numéro de lot sont inscrits sur l'étiquette extérieure de la boîte. Après utilisation, le milieu d'enrichissement et les tubes du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*) Neogen peuvent potentiellement contenir des matériaux pathogènes. Lorsque l'analyse est terminée, suivre les normes actuelles du secteur pour l'élimination des déchets contaminés. Consulter la fiche de données de sécurité pour obtenir des informations supplémentaires et connaître la réglementation locale relative à la mise au rebut.

Instructions d'utilisation

Suivre attentivement toutes les instructions. Dans le cas contraire, les résultats obtenus risquent d'être inexacts.

Décontaminer régulièrement les plans de travail et le matériel du laboratoire (pipettes, outils d'ouverture/de fermeture, etc.) avec une solution de 1-5 % d'eau de Javel (v:v dans de l'eau) ou avec une solution pour l'élimination de l'ADN.

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

Se référer à la section « Instructions spécifiques pour méthodes validées » pour connaître les exigences spécifiques : Tableau 3 pour l'enrichissement des protocoles en fonction du certificat n° 071902 de la *Performance Tested Method*SM (PTM).

Enrichissement de l'échantillon

Les tableaux 2 et 3 présentent des lignes directrices pour les protocoles généraux d'enrichissement des aliments.

Il incombe à l'utilisateur de valider des protocoles d'échantillonnage ou des proportions de dilution différent(e)s pour garantir que cette méthode d'analyse est conforme à ses critères.

Aliments

1. Laisser le milieu d'enrichissement BPW ISO s'équilibrer à 41,5 ± 1 °C.
2. Mélanger de manière aseptique le milieu d'enrichissement et l'échantillon. Pour tous les échantillons de viande et à forte teneur en particules, il est recommandé d'utiliser des sacs avec filtre.
3. Mélanger toutes les matrices et incuber comme indiqué dans le tableau de protocole approprié (Voir Tableau 2 ou 3).

Échantillons environnementaux

AVERTISSEMENT : si vous choisissez d'utiliser un tampon neutralisant contenant un complexe d'aryle sulfonate comme solution hydratante pour l'éponge, il sera nécessaire d'effectuer une dilution de 1:2 (1 volume d'échantillon pour 1 volume de bouillon d'enrichissement stérile) avant l'analyse, afin de réduire les risques associés aux résultats faux négatifs pouvant libérer du produit contaminé. Une autre option consiste à transférer 10 µL de l'enrichissement du tampon neutralisant dans les tubes de solution de lyse Neogen.

Il incombe à l'utilisateur de valider des protocoles d'échantillonnage ou des proportions de dilution différent(e)s pour garantir que cette méthode d'analyse est conforme à ses critères.

Tableau 2. Protocoles d'enrichissement généraux.

Matrice de l'échantillon	Taille de l'échantillon	Bouillon d'enrichissement Volume (mL) (préchauffé)	Température d'enrichissement (± 1 °C)	Durée d'enrichissement (h)	Volume d'échantillon d'analyse (µL)
Bœuf haché cru, morceaux et émincé ^(a)	375 g	1 125 BPW ISO	41,5	10-18	20
Viande crue (porc, volaille, agneau, boeuf) ^(a)	375 g	1 125 BPW ISO	41,5	10-18	20
Légumes-feuilles ^(b)	200 g	450 BPW ISO	41,5	18-24	20
Choux ^(c)	25 g	225 BPW ISO	41,5	18-24	20
Produits laitiers crus ^(d)	25 g ou 25 mL	225 BPW ISO	41,5	18-24	20

^(a) Malaxer à la main les échantillons de bœuf (bœuf haché, morceaux et émincé) et de viande crue (porc haché, volaille et viande non bovine) pendant 30 à 60 secondes afin de disperser et de briser les morceaux après l'ajout de BPW-ISO préchauffé.

^(b) Pour les légumes feuilles, rincer le bouillon d'enrichissement (BPW-ISO préchauffé) sur les feuilles et agiter doucement pendant 30 à 60 secondes. Ne pas malaxer ou homogénéiser les feuilles.

^(c) Pour les graines germées, rincer le bouillon d'enrichissement (BPW-ISO préchauffé) sur les graines germées pendant 30 à 60 secondes et ne pas malaxer ni homogénéiser.

^(d) Homogénéiser les échantillons laitiers crus pendant 30 à 60 secondes après l'ajout de BPW-ISO préchauffé.

Instructions spécifiques pour méthodes validées
AOAC® Performance Tested MethodSM (PTM) certificat N° 071902



Dans les études PTMSM de l'Institut de recherche de L'AOAC, le kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*) Neogen s'est avéré être une méthode efficace pour la détection des STEC. Les matrices testées au cours de l'étude sont répertoriées dans le tableau 3.

Tableau 3. Protocole d'enrichissement selon l'AOAC PTMSM Certificat n° 071902.

Matrice de l'échantillon	Taille de l'échantillon	Volume du bouillon d'enrichissement (mL)	Température d'enrichissement (± 1 °C)	Durée d'enrichissement (h)	Volume d'échantillon d'analyse (µL)
Émincé de bœuf cru ^(a)	375 g	1 125 BPW ISO (préchauffé)	41,5	10-18	20
Bœuf cru haché ^(a)	375 g	1 125 BPW ISO (préchauffé)	41,5	10-18	20
Bœuf cru haché ^(a)	25 g	225 BPW ISO (préchauffé)	41,5	10-18	20
Porc cru haché ^(a)	375 g	1 125 BPW ISO (préchauffé)	41,5	10-18	20
Morceaux de volaille crus ^(a)	375 g	1 125 BPW ISO (préchauffé)	41,5	10-18	20
Poulet séparé mécaniquement	25 g	EPT 225 ml (ISO) (pré-chauffée)	41,5	10-24	20
Épinards ^(b)	200 g	450 BPW ISO (préchauffé)	41,5	18-24	20
Choux ^(c)	25 g	225 BPW ISO (préchauffé)	41,5	18-24	20
Fleur de cannabis séchée, fleur de chanvre séchée ^(d)	10 g	EPT 90 ml (ISO)	41,5	28-32	20

^(a) Pour les échantillons de bœuf (bœuf haché et émincé), ajouter le BPW-ISO préchauffé à l'échantillon de bœuf. Malaxer à la main pendant 30-60 secondes pour disperser et briser les morceaux.

^(b) Pour les épinards, ajouter le BPW-ISO préchauffé à la matrice. Rincer le diluant sur les feuilles et agiter doucement pendant 30 à 60 secondes. Ne pas malaxer ou homogénéiser les feuilles.

^(c) Pour les graines germées, rincer le bouillon d'enrichissement (BPW-ISO préchauffé) sur les graines germées pendant 30 à 60 secondes et ne pas malaxer ni homogénéiser.

^(d) Fleur de cannabis séchée (> 0,3 % THC) et fleur de chanvre séchée (≤ 0,3 % THC)

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

- Humidifier un chiffon ou une serviette jetable à l'aide d'une solution de 1-5 % d'eau de Javel (v:v dans de l'eau) et nettoyer le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen.
- Rincer le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen à l'eau.
- Utiliser un chiffon jetable pour sécher le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen.
- S'assurer que le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen est sec avant toute utilisation.

**Préparation du support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen®**

Poser le support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen sur le plan de travail du laboratoire : le plateau de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen n'est pas utilisé. Utiliser le bloc refroidissant à la température ambiante du laboratoire (20 et 25 °C).

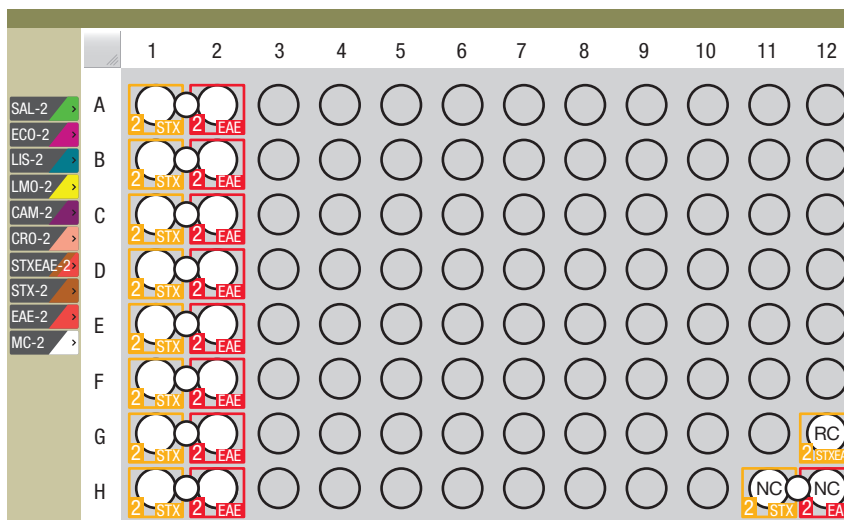
Préparation du support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen®

Placer le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen dans une unité de traitement thermique à sec à double bloc. Allumer l'unité de traitement thermique à sec et régler la température afin que le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen atteigne et conserve une température de 100 ± 1 °C.

REMARQUE : selon l'unité de traitement thermique utilisée, le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen atteint la température souhaitée en 30 minutes environ. Utiliser un thermomètre étalonné adapté (p. ex., un thermomètre à immersion partielle ou un thermomètre à thermocouple numérique, et non un thermomètre à immersion totale) placé à l'endroit indiqué du support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen afin de vérifier que sa température est de 100 ± 1 °C.

Préparation de l'instrument de détection moléculaire Neogen®

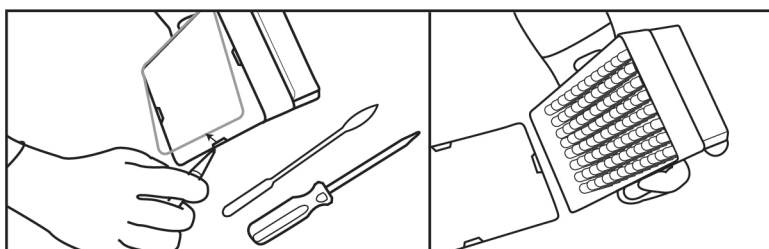
1. Lancer le logiciel du Système de détection moléculaire Neogen et ouvrir une session. Contacter le représentant Neogen Sécurité Alimentaire pour s'assurer d'avoir la version la plus récente du logiciel.
2. Mettre l'instrument de détection moléculaire Neogen sous tension.
3. Créer ou modifier une analyse en saisissant les données pour chaque échantillon. Pour plus de précisions, consulter le manuel d'utilisation du système de détection moléculaire Neogen.
 - 3.1. La sélection de l'icône STXEAE-2 dans le logiciel sélectionne deux puits adjacents (comme A1, A2, B1, B2, etc.), un pour *stx* et l'autre pour le tube de réactif *eae*, car chaque échantillon est soumis à deux tests. Le NC est configuré pour chaque tube de réactif et un RC est configuré pour le kit.



REMARQUE : l'instrument de détection moléculaire Neogen doit être prêt avant l'insertion du plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen, dans lequel sont placés les tubes de réactif. Cette étape de chauffage prend environ 20 minutes ; pendant ce processus, un voyant lumineux ORANGE s'allume sur la barre d'état de l'instrument. Lorsque l'instrument est prêt pour l'analyse, la barre d'état passe au VERT.

Lyse

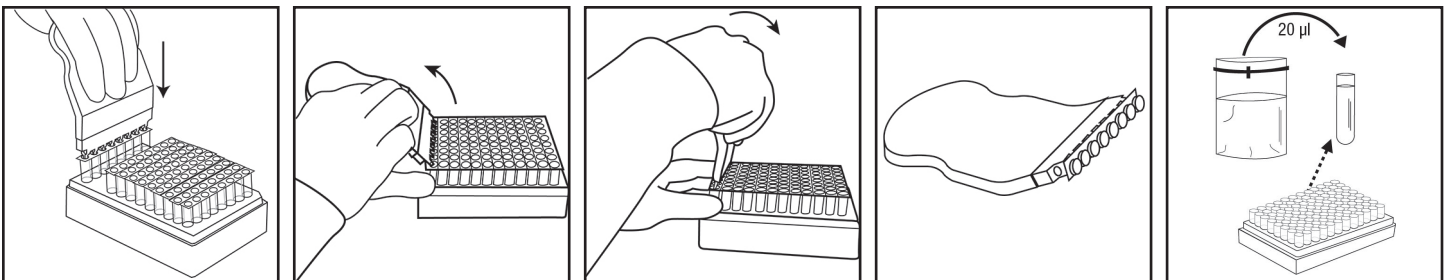
Retirer le portoir pour tubes de solution de lyse Neogen avec un tournevis ou une spatule avant de le placer dans le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen.



1. Laisser les tubes de solution de lyse Neogen se réchauffer en plaçant le support à température ambiante (20 et 25 °C) pendant une nuit (16 et 18 heures). Il est également possible d'amener les tubes de solution de lyse Neogen à température ambiante en les plaçant sur le plan de travail du laboratoire pendant au moins 2 heures, en incubant les tubes de solution de lyse Neogen dans un incubateur à 37 ± 1 °C pendant 1 heure ou en les plaçant dans une unité de traitement thermique à sec double bloc pendant 30 secondes à 100 °C.
2. Retourner les tubes recouverts d'un bouchon pour les mélanger. Passer à l'étape suivante dans un délai de 4 heures après avoir retourné les tubes.
3. Retirer l'échantillon enrichi de l'incubateur.
4. Un tube de solution de lyse Neogen est nécessaire pour chaque échantillon et pour l'échantillon NC (milieu d'enrichissement stérile).
 - 4.1. Les barrettes de tubes de solution de lyse Neogen peuvent être coupées de manière à obtenir le nombre de tubes souhaité. Sélectionner le nombre de tubes ou de barrettes de 8 tubes nécessaire. Placer les tubes de solution de lyse Neogen dans un portoir vide.
 - 4.2. Pour éviter toute contamination croisée, ouvrir une barrette de tube de solution de lyse Neogen à la fois et utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque étape de transfert.
 - 4.3. Transférer l'échantillon enrichi dans les tubes de solution de lyse Neogen comme indiqué ci-dessous :

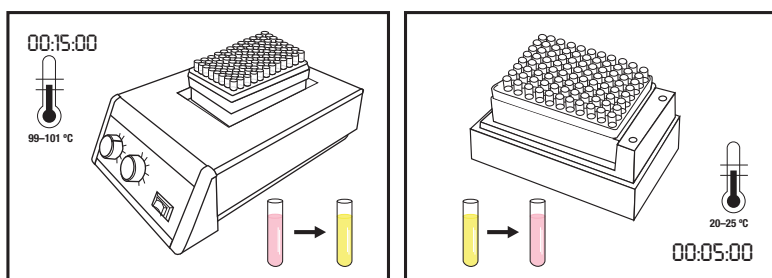
Transférer tout **d'abord** chaque échantillon enrichi dans des tubes de solution de lyse Neogen individuels.
Transférer le NC en **dernier**.

- 4.4. Ouvrir les barrettes de tubes de solution de lyse Neogen une à une à l'aide de l'outil d'ouverture/fermeture pour système de détection moléculaire Neogen® - Lyse.
- 4.5. Jeter le bouchon du tube de solution de lyse Neogen. Si le lysat doit être soumis à un nouveau test, placer les bouchons dans un récipient propre pour réapplication après la lyse.
 - 4.5.1. Pour le traitement du lysat conservé, voir l'annexe A.
- 4.6. Transférer 20 µL d'échantillon dans un tube de solution de lyse Neogen.



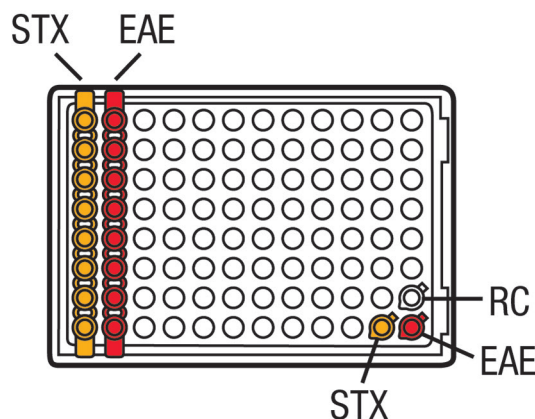
5. Répéter les étapes 4.4 à 4.6 en fonction des besoins pour tous les échantillons à analyser.
6. Une fois tous les échantillons transférés, transférer 20 µL de NC (milieu d'enrichissement stérile, p. ex. BPW) dans un tube de solution de lyse Neogen. Ne pas utiliser d'eau comme NC.
7. Vérifier que la température du support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen est de 100 ± 1 °C.
8. Placer le portoir non couvert de tubes de solution de lyse Neogen dans le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen et chauffer pendant 15 ± 1 minutes. Lors du chauffage, la solution de lyse Neogen passera de rose (froide) à jaune (chaude).
 - 8.1. Les échantillons qui n'ont pas été soumis à un traitement thermique adéquat pendant l'étape de lyse peuvent être considérés comme potentiellement dangereux et ne doivent PAS être insérés dans l'instrument de détection moléculaire Neogen.
9. Retirer le portoir non couvert de tubes de solution de lyse Neogen du bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen et laisser refroidir dans le support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen pendant au moins 5 minutes et au plus 10 minutes. Utilisé à température ambiante sans le plateau de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen®, le support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen doit être posé directement sur le plan de travail du laboratoire. Une fois froide, la solution de lyse Neogen retrouvera une couleur rose.

10. Retirer le couvercle des tubes de solution de lyse Neogen du support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen.



Amplification

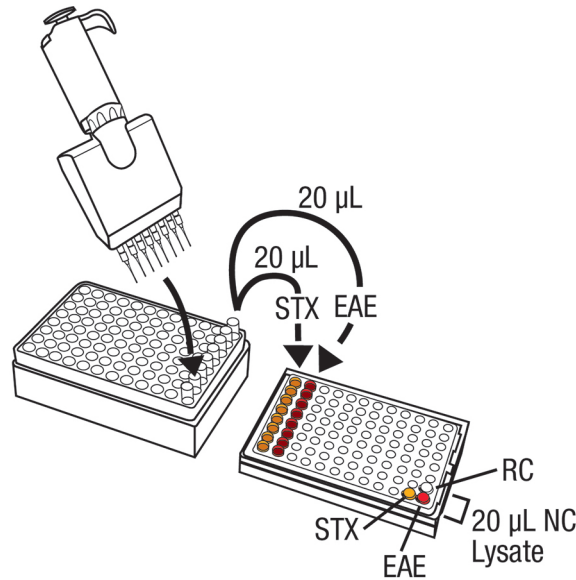
1. Un tube de réactif pour le kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx*) Neogen et un tube de réactif pour le kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*eae*) Neogen sont nécessaires pour chaque échantillon et pour le NC.
 - 1.1. Les barrettes de tubes peuvent être coupées de manière à obtenir le nombre de tubes souhaité. Sélectionnez le nombre nécessaire de tubes de réactif individuels ou de bandes de 8 tubes du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx*) et du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*eae*).
 - 1.2. Placer les tubes du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx*) dans un portoir vide dans une colonne.
 - 1.3. Placer les tubes du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes(*eae*) dans la colonne de droite adjacente.
 - 1.4. Éviter de toucher les pastilles réactives se trouvant au fond des tubes.
2. Sélectionner un tube de contrôle de réactif Neogen et le placer dans le portoir.
3. Pour le lysat NC, sélectionner un tube de réactif du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx*) Neogen et un tube de réactif du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*eae*) Neogen et les placer dans le portoir.



4. Afin d'éviter toute contamination croisée, ouvrir une barrette de tubes de réactif du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* ou *eae*) Neogen à la fois et utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque étape de transfert.
5. Transférer chacun des lysats dans un tube de réactif du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* ou *eae*) Neogen comme décrit ci-dessous.
 - 5.1. Tout d'abord, transférer chaque lysat d'échantillon dans un tube de réactif du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx*) Neogen comme décrit aux étapes 5.5 et 5.6.
 - 5.2. Ensuite, transférer chacun des mêmes lysats d'échantillon dans un tube de réactif du Kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*eae*) Neogen dans la colonne de droite adjacente comme décrit aux étapes 5.5 et 5.6.

REMARQUE : Utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque transfert. Ne pas utiliser le même embout de pipette pour le transfert dans le tube de réactif *stx* et *eae* du même échantillon de lysat.

- 5.3. Après tous les transferts de lysats d'échantillon, ajoutez le lysat de NC dans chacun des tubes de réactif du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx*) Neogen et du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*eae*) Neogen.
- 5.4. Transférer le lysat NC en dernier dans le tube de contrôle de réactif.



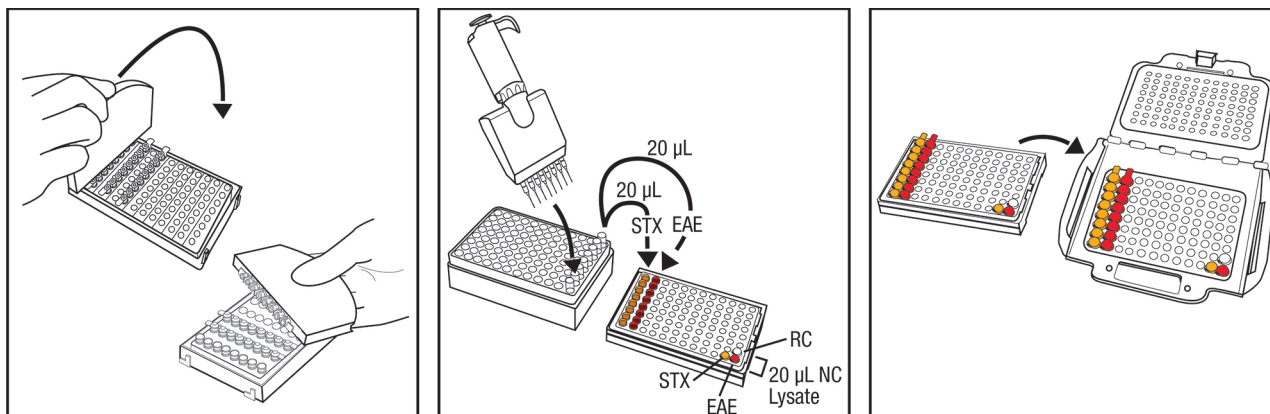
- 5.5. Ouvrir les tubes de réactif du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* ou *eae*) à l'aide de l'outil d'ouverture/fermeture pour système de détection moléculaire Neogen® - Réactif, une barrette à la fois. Jeter le bouchon.
- 5.6. **Transférer 20 µL de lysat d'échantillon de la moitié supérieure du liquide (éviter le précipité) du tube de solution de lyse Neogen dans le tube de réactif correspondant du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* ou *eae*). Incliner la pipette pour ne pas toucher les pastilles. Mélanger en effectuant 5 cycles d'aspiration / de refoulement avec la pipette.**

REMARQUE : Utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque transfert. Ne pas utiliser le même embout de pipette pour le transfert dans le tube de réactif *stx* et *eae* du même échantillon de lysat.

- 5.7. Répéter l'étape 5.6 jusqu'à ce que le lysat de l'échantillon individuel ait été ajouté à un tube de réactif correspondant du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* ou *eae*) Neogen dans la barrette.
- 5.8. Placer la capsule supplémentaire prévue à cet effet sur les tubes de réactif du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* ou *eae*) Neogen puis prendre le bord arrondi de l'outil d'ouverture/fermeture pour système de détection moléculaire Neogen - Réactif et appuyer dans un mouvement de va-et-vient afin de s'assurer que la capsule est fermement insérée sur le tube.
- 5.9. Répétez les étapes 5.6 à 5.8 au besoin, pour le nombre d'échantillons à tester pour les deux tubes de réactifs du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*) Neogen.
- 5.10. Lorsque tous les lysats d'échantillon ont été transférés, répéter 5.6 à 5.8 pour transférer 20 µL de lysat NC dans chaque tube de réactif du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx*) Neogen et du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*eae*) Neogen.
- 5.11. Transférer **20 µL de lysat de NC dans un tube de contrôle de réactif Neogen**. Incliner la pipette pour ne pas toucher les pastilles. Mélanger en effectuant 5 cycles d'aspiration / de refoulement avec la pipette.

Transférer chaque lysat d'échantillon dans un tube de réactif du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* ou *eae*) Neogen d'abord suivi par le NC. Hydrater le tube de contrôle de réactif Neogen en dernier.

6. Charger les tubes recouverts d'un bouchon dans un plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen propre et décontaminé, puis fermer et verrouiller le couvercle.



7. Examiner et confirmer l'analyse configurée sur le logiciel du système de détection moléculaire Neogen.
8. Cliquer sur l'icône « Démarrer » du logiciel et sélectionner l'instrument à utiliser. Le couvercle de l'appareil sélectionné s'ouvre automatiquement.
9. Placer le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen dans l'instrument de détection moléculaire Neogen et fermer le couvercle pour lancer l'essai. Les résultats sont obtenus en 60 minutes ; toutefois, les résultats positifs peuvent être détectés plus tôt.
10. Une fois l'analyse terminée, retirer le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen de l'instrument de détection moléculaire Neogen et tremper les tubes dans une solution d'eau de Javel à 1-5 % (v:v dans de l'eau) pendant 1 heure, et ce, à l'écart de la zone de préparation des analyses.

AVIS : pour réduire le risque de résultats faux positifs dus à une contamination croisée, ne jamais ouvrir les tubes de réactif contenant de l'ADN amplifié. Ceci inclut les tubes de réactif, de contrôle de réactif Neogen et de contrôle de matrice Neogen du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (*stx* et *eae*) Neogen. Toujours éliminer les tubes de réactif fermés en les trempant dans une solution d'eau de Javel à 1-5 % (v:v dans de l'eau) pendant 1 heure, et ce à l'écart de la zone de préparation des analyses.

Résultats et interprétation

Un algorithme interprète la courbe de résultats provenant de la détection de l'amplification de l'acide nucléique. 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 nombre de paramètres des courbes individuelles. Les résultats présumés positifs sont rapportés en temps réel tandis que les résultats négatifs ou à vérifier sont affichés à la fin de l'essai.

Le logiciel du Système de détection moléculaire Neogen rapporte les résultats séparément pour chacun des tests (*stx* et *eae*) et utilise les résultats des deux tests pour considérer l'échantillon positif ou négatif pour les STEC (EHEC) (voir Figure ci-dessous). Pour un positif présumé pour le STEC (EHEC), les deux cibles génétiques (*stx1* et/ou *stx2* et *eae*) doivent être positives. **Si l'un des dosages individuels montre une erreur ou une vérification, le résultat final sera « Erreur » ou « À vérifier ». Un nouveau test est nécessaire pour appeler correctement le résultat final** (voir touche de résultat). Le logiciel permet également de mettre en place des tests individuels si nécessaire, et le lysat d'échantillon ou le lysat frais provenant de l'enrichissement peuvent être testés à nouveau avec les tests, en suivant les étapes décrites à l'Annexe A pour les lysats conservés et les étapes de la section Lyse et Amplification pour l'enrichissement conservé.



Touches de résultat de lysat d'échantillon enrichi

	Deux résultats positifs, résultat final positif
	stx positif, eae négatif, résultat final négatif
	stx positif, eae à inspecter, résultat final à inspecter, analyser de nouveau
	stx positif, eae erroné, résultat final erroné, analyser de nouveau
	stx négatif, eae positif, résultat final négatif
	stx négatif, eae négatif, résultat final négatif
	stx négatif, eae à inspecter, résultat final à inspecter, analyser de nouveau
	stx négatif, eae erroné, résultat final erroné, analyser de nouveau
	stx à inspecter, eae positif, résultat final à inspecter, analyser de nouveau
	stx à inspecter, eae négatif, résultat final à inspecter, analyser de nouveau
	stx à inspecter, eae à inspecter, résultat final à inspecter, analyser de nouveau
	stx à inspecter, eae erroné, résultat final erroné, analyser de nouveau
	stx erroné, eae positif, résultat final erroné, analyser de nouveau
	stx erroné, eae négatif, résultat final erroné, analyser de nouveau
	stx erroné, eae à inspecter, résultat final erroné, analyser de nouveau
	stx erroné, eae erroné, résultat final erroné, analyser de nouveau

Touches de contrôle négatif

	Deux résultats valides, lien valide
	Un résultat valide, un résultat erroné, erreur de lien, analyser de nouveau
	Un résultat valide, un résultat non valide, lien non valide, analyser de nouveau
	Deux résultats erronés, lien erroné, analyser de nouveau
	Deux résultats non valides, lien non valide, analyser de nouveau
	Un résultat erroné, un résultat non valide, lien erroné, analyser de nouveau

Les échantillons présumés positifs doivent être confirmés conformément aux modes opératoires normalisés du laboratoire ou en suivant la confirmation par une méthode de référence appropriée^(1,2,3), en commençant par le transfert du bouillon d'enrichissement primaire vers des géloses sélectives et la confirmation des isolats à l'aide de méthodes biochimiques et sérologiques appropriées. Pour les matrices spécifiées par MLG 5C, la séparation immunomagnétique (IMS) doit être effectuée avant l'inoculation sur un milieu sélectif.

REMARQUE : même un échantillon négatif ne donnera pas de résultat égal à zéro, car le système et les réactifs d'amplification du kit de détection moléculaire version 2 - STEC Screening des Gènes (stx et eae) Neogen effectuent une lecture d'unité relative de lumière (RLU) « de base ».

Dans le cas peu probable d'un résultat inhabituel, l'algorithme considérera ce dernier comme « À vérifier ». Neogen recommande à l'utilisateur de recommencer l'essai pour tout échantillon considéré comme « À vérifier ». Si le résultat continue à être « À vérifier », passer au test de confirmation en utilisant la méthode^(1,2,3) de votre choix ou en utilisant une méthode conforme aux réglementations locales.



Tableau 4. Symboles et informations pour divers résultats logiciels.

Type de puits	Symbole du résultat du puits	Résultat	Interprétation
Échantillon		Positif	L'échantillon est présumé positif pour le pathogène cible.
Échantillon		Négatif	L'échantillon est négatif pour le pathogène cible.
Échantillon		Inhibé	La matrice de l'échantillon est inhibée pour le dosage. Un second test peut être nécessaire. Consulter la section de dépannage et les instructions relatives au produit du kit de détection pour obtenir plus de renseignements.
Échantillon		À vérifier	La présence ou l'absence du pathogène cible est indéterminée. Un second test peut être nécessaire. Consulter la section de dépannage et les instructions relatives au produit du kit de détection pour obtenir plus de renseignements.
Échantillon		Erreur	Aucune bioluminescence n'a été détectée. Un second test peut être nécessaire. Consulter la section de dépannage et les instructions relatives au produit du kit de détection pour obtenir plus de renseignements.

Annexe A. Interruption du protocole : conservation et nouveau test des échantillons

1. Pour conserver un lysat soumis à un traitement thermique, refermer le tube de solution de lyse Neogen avec un bouchon propre (se reporter à la section Lyse, 4.5).
2. Pour conserver un échantillon enrichi, incubé pendant au moins 18 heures avant la conservation.
3. Stocker à une température comprise entre 4 et 8 °C jusqu'à 72 heures.
4. Préparer un échantillon conservé pour amplification en retournant 2 à 3 fois pour mélanger.
5. Ouvrir les tubes.
6. Placer les tubes pour lysats mélangés dans le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen et chauffer à 100 ± 1 °C pendant 5 ± 1 minutes.
7. Retirer le portoir de tubes de solution de lyse Neogen du bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen et laisser refroidir dans le support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen pendant au moins 5 minutes et au plus 10 minutes.
8. Poursuivre le protocole à la section Amplification détaillée ci-dessus.

Références :

1. Microbiology Laboratory Guidebook. U. S. Department of Agriculture (USDA) Food Safety and Inspection Service (FSIS) Microbiology Laboratory guidebook 5C.00. Detection and isolation of top seven Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STECs) from meat products and carcass and environmental sponges. Feb 4, 2019.
2. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. October 2018.
3. ISO/TS 13136:2012: Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups
4. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good laboratory practice for nonclinical laboratory studies.
5. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
6. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examination.
7. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. Contacter un représentant de Neogen Sécurité Alimentaire pour obtenir un exemplaire de ce document.

Explication des symboles

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar 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 Leshar Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00918A

Gebrauchsanweisungen

Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*)

Produktbeschreibung und Verwendungszweck

Der Neogen® Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*) wird mit dem Neogen® Molekulares Detektionssystem für den schnellen und spezifischen Nachweis von Shigatoxin-Genen (*stx1* und *stx2*) und Intimin-Gen (*eae*) von Shigatoxin-produzierenden *E. coli* (STEC, auch als „Verotoxin-produzierende *E. coli*“ bezeichnet) in angereicherten Proben aus Lebensmitteln und Umgebungen der Lebensmittelverarbeitung verwendet. Der Begriff STEC bezieht sich auf *E. coli*-Pathotypen, die in der Lage sind, Shigatoxin-Typ1 (*stx1*), -Typ 2 (*stx2*) oder beide zu produzieren, die durch das Gen *stx1* bzw. *stx2*-Gen kodiert werden. STEC-enthaltende Virulenzgene für *stx1* und/oder *stx2* und *eae* (Am Attaching/Effacing des Phenotyps beteiligtes Intimin-Gen) sind designierte enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC). Das Screening-Kit enthält zwei separate Reagenzgefäße: eines für den Nachweis der virulenten Gene *stx1* und/oder *stx2* und das andere für den Nachweis von *eae* aus STEC (EHEC). Die Neogen® Molekulares Detektionssystem – Software meldet Ergebnisse separat für jeden Assay und verwendet Ergebnisse beider Assays, um die Probe als STEC (EHEC) positiv oder negativ zu bezeichnen. Für ein vorläufig positives Ergebnis für STEC (EHEC) müssen beide Geneziele (*stx1* und/oder *stx2* und *eae*) positiv sein. Der *stx*-Assay unterscheidet nicht zwischen *stx1* und *stx2*, weist jedoch das Vorhandensein von *stx1* und/oder *stx2* nach.

Der Neogen Molekulares Detektions Assay verwendet die mittels einer „Loop“ initiierte isotherme Amplifikation, um Nukleinsäuresequenzen mit hoher Spezifität, Sensitivität und Geschwindigkeit zu amplifizieren, und kombiniert diese mit Biolumineszenz für den Nachweis der Amplifikation. Die vorläufig positiven Ergebnisse werden in Echtzeit erstellt, während negative Ergebnisse erst nach Abschluss des Tests dargestellt werden. Die vorläufig positiven Ergebnisse sollten mithilfe eines Testverfahrens Ihrer Wahl^(1,2,3) oder gemäß den jeweils geltenden örtlichen Richtlinien bestätigt werden.

Der Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*) ist für den Gebrauch in Laboren bestimmt und muss von in Laborverfahren geschultem Fachpersonal angewendet werden. Neogen verfügt über keine Daten zur Anwendung dieses Produkts in anderen Industrien als der Lebensmittel- und Getränkeindustrie. Zum Beispiel verfügt Neogen über keine Daten zur Verwendung dieses Produkts mit Pharmazeutika-, Kosmetika- oder klinischen und tiermedizinischen Proben. Der Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*) wurde nicht für alle möglichen Lebensmittelprodukte, Lebensmittelverarbeitungsverfahren, Testprotokolle oder alle möglichen Bakterienstämme evaluiert.

Wie bei allen Testverfahren können die Ergebnisse durch die Quelle, Zusammensetzung und Qualität des Anreicherungsmediums beeinflusst werden. Faktoren wie Probennahme, Testprotokolle, Probenaufbereitung, Handhabung und Labortechnik können die Ergebnisse beeinflussen. Neogen empfiehlt die Beurteilung der Methode einschließlich Anreicherungsmedium in der Umgebung des Benutzers mit einer ausreichenden Anzahl an Proben mit bestimmten Lebensmitteln und mikrobiellen Pathogenen, um sicherzustellen, dass die Methode den Anforderungen des Benutzers entspricht.

Neogen hat den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*) mit gepuffertem Peptonwasser (BPW)-ISO als Anreicherungsbouillon evaluiert.

Das Neogen® Molekulares Detektion – Gerät ist für die Verwendung mit Proben bestimmt, die während der Assay-Lyse wärmebehandelt wurden, wodurch die in der Probe vorhandenen Organismen zerstört werden sollen. Proben, die während der Lyse nicht ordnungsgemäß wärmebehandelt wurden, stellen möglicherweise ein biologisches Risiko dar und sollten NICHT in das Neogen Molekulares Detektion – Gerät eingesetzt werden.

Neogen Food Safety hat für die Bereiche Entwicklung und Fertigung die Zertifizierung ISO 9001 der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erhalten.

Das Testkit für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*) enthält jeweils 48 Tests mit *stx*- und *eae*-Reagenzien, die in Tabelle 1 beschrieben werden.

Tabelle 1. Komponenten des Neogen Molekulares Detektions Assay-Kits.

Artikel	Kennzeichnung	Stückzahl	Inhalt	Kommentare
Neogen® Lyselösung (LS)	Rosafarbene Lösung in transparenten Gefäßen	96 (12 Streifen mit je 8 Gefäßen)	580 µl LS pro Gefäß	Abgefüllt und gebrauchsfertig
Reagenzgefäße für den Neogen® Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (<i>stx</i>)	Orangefarbene Röhrchen	48 (2 Beutel mit je 3 Streifen à 8 Gefäße)	Lyophilisierte spezifische Amplifikations- und Detektionsmischung	Gebrauchsfertig
Reagenzgefäße für den Neogen® Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (<i>eae</i>)	Rote Gefäße	48 (2 Beutel mit je 3 Streifen à 8 Gefäße)	Lyophilisierte spezifische Amplifikations- und Detektionsmischung	Gebrauchsfertig
Zusätzliche Kappen	Orangefarbene Kappen	96 (12 Streifen mit je 8 Kappen)		Gebrauchsfertig
Zusätzliche Kappen	Rote Kappen	96 (12 Streifen mit je 8 Kappen)		Gebrauchsfertig
Neogen® Reagenzkontrolle (RC)	Durchsichtige Gefäße	16 (2 Beutel mit 8 einzelnen Gefäßen)	Lyophilisierte Kontroll-DNS, Amplifikations- und Detektionsmatrix	Gebrauchsfertig

Die Negativkontrolle (NC), nicht im Kit enthalten, ist ein steriles Anreicherungsmedium, z. B. BPW-ISO. Als Negativkontrolle kein Wasser verwenden.

Eine Kurzanleitung finden Sie unter www.neogen.com

Sicherheit

Der Anwender muss sämtliche in der Gebrauchsanweisung des Neogen Molekulares Detektionssystem und des Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*) aufgeführten Sicherheitshinweise gelesen und verstanden haben. Bewahren Sie diese Sicherheitshinweise auf, um später auf sie zurückgreifen zu können.

⚠️ WARNUNG: Bezeichnet eine Gefahrensituation, die – wenn sie nicht vermieden wird – zum Tode oder zu schweren Verletzungen und/oder Sachschäden führen kann.

HINWEIS: Bezeichnet eine potenzielle Gefahrensituation, die – wenn sie nicht vermieden wird – zu Sachschäden führen kann.

⚠️ WARNUNG

Den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*) nicht zur Diagnose von Erkrankungen bei Menschen oder Tieren einsetzen.

Der Anwender muss sein Personal in den entsprechenden Testmethoden unterweisen: z. B. laut den Grundsätzen der guten Laborpraxis⁽⁴⁾, ISO/IEC 17025⁽⁵⁾ oder ISO 7218⁽⁶⁾.

Maßnahmen zur Reduzierung der mit einem falsch negativen Ergebnis verbundenen Risiken, die zur Freigabe eines kontaminierten Produkts führen können:

- Befolgen Sie das Protokoll und führen Sie die Tests genau wie in der Gebrauchsanweisung angegeben durch.
- Lagern Sie den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*) wie auf der Packung und in den Gebrauchsanweisungen beschrieben.
- Verwenden Sie den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*) stets vor Ablauf des Verfalldatums.
- Verwenden Sie den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*) mit Lebensmittel- und Umweltproben, die intern oder durch Dritte validiert wurden.
- Verwenden Sie den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*) nur mit Oberflächen, Desinfektionsmitteln, Protokollen und Bakterienstämmen, die intern oder durch Dritte validiert wurden.



- Wenn Sie eine Umgebungsprobe haben, die einen Neutralisationspuffer mit einem Acrylsulfonat-Komplex enthält, dann müssen Sie vor dem Testen der Probe eine 1:2 Verdünnung (1 Teil Probe in 1 Teil steriler Anreicherungsbouillon) vornehmen. Ebenso können Sie 10 µl Anreicherungsmedium mit Neutralisationspuffer in die Neogen Lysegefäße übertragen. Neogen® Produkte zur Probenhandhabung, die Neutralisationspuffer mit Acrylsulfonat-Komplex enthalten: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G und HS2410NB2G.

Zur Verminderung der Risiken, die mit der Exposition gegenüber Chemikalien und biogefährlichen Stoffen verbunden sind:

- Führen Sie die Testverfahren mit Pathogenen in einem entsprechend ausgerüsteten Labor und unter der Aufsicht von geschultem Fachpersonal durch. Inkubierte Anreicherungsmedien und Arbeitsgeräte oder Oberflächen, die in Kontakt mit inkubierten Anreicherungsmedien gekommen sind, können so stark mit Krankheitserregern belastet sein, dass ein Risiko für die menschliche Gesundheit besteht.
- Befolgen Sie stets die üblichen Labor-Sicherheitsmaßnahmen und tragen Sie bei der Handhabung von Reagenzien und kontaminierten Proben angemessene Schutzkleidung und geeigneten Augenschutz.
- Vermeiden Sie nach der Amplifikation den Kontakt mit dem Anreicherungsmedium und den Reagenzgefäßen.
- Die angereicherten Proben sind gemäß lokaler/regionaler/landesweiter regulatorischer Standards zu entsorgen.
- Proben, die während der Lyse nicht ordnungsgemäß wärmebehandelt wurden, stellen möglicherweise ein bio-logisches Risiko dar und sollten NICHT in das Neogen Molekulare Detektion – Gerät eingesetzt werden.

Zur Verminderung von Kreuzkontaminationsrisiken bei der Vorbereitung des Tests:

- Tragen Sie stets Handschuhe (sowohl zum Schutz des Anwenders als auch, um ein Einbringen von Nukleasen zu vermeiden).

Zur Verminderung der Risiken, die mit der Exposition gegenüber heißen Flüssigkeiten verbunden sind:

- Achten Sie darauf, die empfohlene Temperatur des Heizgeräts nicht zu überschreiten.
- Achten Sie darauf, die empfohlene Anwärmdauer nicht zu überschreiten.
- Verwenden Sie ein geeignetes, kalibriertes Thermometer, um sicherzustellen, dass der Neogen® Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz die richtige Temperatur aufweist (z. B. ein Thermometer zum partiellen Eintauchen oder ein Digitalthermometer, kein Tauchthermometer). Das Thermometer muss an der vorgesehenen Stelle des Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatzes platziert werden.

HINWEIS

Zur Verminderung von Kreuzkontaminationsrisiken bei der Vorbereitung des Tests:

- Wechseln Sie vor Hydratation der Reagenzpellets die Handschuhe.
- Es wird empfohlen, sterile, hochreine Pipettenspitzen mit Aerosolschutz (Filter) zu verwenden.
- Verwenden Sie für jede Probenübertragung eine neue Pipettenspitze.
- Wenden Sie die Grundsätze der Guten Laborpraxis bei der Übertragung der angereicherten Probe auf das Lysegefäß an. Um eine Kontamination der Pipette zu vermeiden, sollte der Anwender bei der Übertragung einen Zwischenschritt durchführen. Beispielsweise kann der Anwender jede angereicherte Probe auf ein steriles Gefäß übertragen.
- Sofern möglich, arbeiten Sie an einer molekularbiologischen Arbeitsstation mit Germizidlampe.
- Desinfizieren Sie die Laborbänke und Arbeitsgeräte (Pipetten, Cap/Decap-Werkzeuge usw.) regelmäßig mit einer 1–5%igen Haushaltsbleichmittellösung (v:v in Wasser) oder DNS-Entfernungslösung.

Zur Verminderung der Risiken, die mit einem falsch positiven Ergebnis verbunden sind:

- Öffnen Sie die Reagenzgefäße niemals nach der Amplifikation.
- Kontaminierte Gefäße immer aus dem Nachweis-Vorbereitungsbereich entfernen, in 1–5%iger (v:v in Wasser) Haushaltsbleichmittellösung für 1 Stunde einweichen und dann entsorgen.
- Autoklavieren Sie die Reagenzgefäße niemals nach der Amplifikation.

Weitere Informationen sowie die jeweils vor Ort geltenden Richtlinien zur Entsorgung entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt.

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

Verantwortung des Anwenders

Anwender müssen sich auf eigene Verantwortung mit den Gebrauchsanweisungen und Informationen des Produkts vertraut machen. Für weitere Informationen besuchen Sie unsere Website unter www.neogen.com oder wenden Sie sich an Ihren lokalen Neogen Verkaufsvertreter oder Händler.

Bei der Auswahl einer Testmethode ist zu beachten, dass externe Faktoren wie Probenahme, Testprotokoll, Probenaufbereitung, Handhabung, Labortechnik und die Probe selbst die Ergebnisse beeinflussen können.

Es liegt in der Verantwortung des Anwenders bei der Auswahl einer Testmethode oder eines Produkts, diese mit einer ausreichenden Anzahl von Proben und Kontrollen zu evaluieren, um sicherzustellen, dass die gewählte Testmethode seinen Anforderungen entspricht.

Der Anwender trägt ebenfalls die Verantwortung dafür, dass die angewendeten Testmethoden und Ergebnisse den Anforderungen seiner Kunden und Lieferanten entsprechen.

Wie bei allen Testmethoden, stellen die mit Neogen Lebensmittelsicherheitsprodukten erhaltenen Ergebnisse keine Garantie für die Qualität der untersuchten Matrices oder Prozesse dar.

Als Unterstützung von Kunden bei der Validierung der Methode für verschiedene Lebensmittel-Matrices hat Neogen das Set Neogen® Molekulare Detektion Matrixkontrolle entwickelt. Verwenden Sie bei Bedarf die Neogen Molekulare Detektion – Matrixkontrolle (MC), um zu bestimmen, ob die Matrix in der Lage ist, die Ergebnisse des Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*) zu beeinträchtigen. Testen Sie mehrere für die Matrix repräsentative Proben, d. h. Proben unterschiedlicher Herkunft, während einer Validierungsphase, wenn die Neogen Methode zum Einsatz kommt oder beim Testen neuer oder unbekannter Matrices oder Matrices, die Rohmaterial- oder Verfahrensänderungen durchlaufen haben.

Eine Matrix kann als eine Produktart mit spezifischen Eigenschaften, z. B. in Bezug auf ihre Zusammensetzung und Verarbeitung, definiert werden. Unterschiede zwischen Matrices können so einfach sein wie die Auswirkungen, die von Unterschieden bei deren Verarbeitung oder deren Präsentation (z. B. roh im Vergleich zu pasteurisiert; frisch im Vergleich zu getrocknet usw.) verursacht werden.

Haftungsbeschränkungen/Beschränkte Rechtsmittel

AUSSER ES WIRD AUSDRÜCKLICH ANDERS IM ABSCHNITT DER HAFTUNGSBESCHRÄNKUNGEN DER VERPACKUNG DES JEWEILIGEN PRODUKTS ANGEGEBEN, LEHNT NEOGEN ALLE AUSDRÜCKLICHEN UND STILLSCHWEIGENDEN GARANTIEEN, EINSCHLIESSLICH, JEDOCH NICHT BESCHRÄNKT AUF, DIE GEWÄHRLEISTUNG DER MARKTGÄNGIGKEIT ODER DER EIGNUNG FÜR EINEN BESTIMMTEN ZWECK AB. Sollte sich ein Produkt von Neogen Food Safety als defekt herausstellen, wird es von Neogen oder einem autorisierten Vertragshändler nach eigenem Ermessen ersetzt oder der Kaufpreis zurückerstattet. Gewährleistungsansprüche bestehen nicht. Sie sind verpflichtet, Neogen umgehend innerhalb von sechzig Tagen, nachdem die mutmaßlichen Defekte am Produkt festgestellt wurden, darüber zu informieren und das Produkt an Neogen zurückzusenden. Bei weiteren Fragen wenden Sie sich bitte an den Neogen-Verkaufsvertreter oder autorisierten Neogen-Händler.

Haftungsbeschränkungen von Neogen

NEOGEN HAFTET NICHT FÜR VERLUSTE ODER SCHÄDEN, GANZ GLEICH OB MITTELBARE, UNMITTELBARE, SPEZIELLE, NEBEN- ODER FOLGESCHÄDEN EINSCHLIESSLICH, ABER NICHT BESCHRÄNKT AUF ENTGANGENEN GEWINN. In keinem Fall übersteigt die Haftung von Neogen den Kaufpreis des angeblich defekten Produkts.

Lagerung und Entsorgung

Lagern Sie den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*) bei 2–8 °C (35–47 °F). Nicht einfrieren. Lichtgeschützt lagern. Vergewissern Sie sich nach dem Öffnen des Sets, dass der Folienbeutel unbeschädigt ist. Verwenden Sie das Set keinesfalls bei beschädigtem Beutel. Nach dem Öffnen sollten nicht verwendete Reagenzgefäße gemeinsam mit dem Trockenmittel stets im wiederverschließbaren Beutel verwahrt werden, um die Stabilität der lyophilisierten Reagenzien sicherzustellen. Wiederverschlossene Beutel höchstens 90 Tage lang bei 2–8 °C (35–47 °F) lagern.

Verwenden Sie den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*) nicht nach Ablauf des Verfalldatums. Das Verfalldatum und die Chargennummer sind auf dem äußeren Etikett der Packung angegeben. Nach dem Gebrauch können das Anreicherungsmedium und die Gefäße des Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*) pathogene Stoffe enthalten. Beachten Sie nach Abschluss der Testverfahren die gültigen Branchennormen für die Entsorgung von kontaminierten Abfällen. Weitere Informationen sowie die jeweils vor Ort geltenden Richtlinien zur Entsorgung entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt.

Gebrauchsanweisung

Befolgen Sie alle Anweisungen genau. Andernfalls werden möglicherweise ungenaue Ergebnisse erzielt.

Desinfizieren Sie die Laborbänke und Arbeitsgeräte (Pipetten, Cap/Decap-Werkzeuge usw.) regelmäßig mit einer 1–5%igen Haushaltsbleichmittellösung (v:v in Wasser) oder DNS-Entfernungslösung.

Der Anwender sollte die Funktionsqualifizierung (Operational Qualification, OQ) für das Neogen Molekulare Detektionssystem absolvieren wie im Dokument „Protokolle und Anweisungen für Installationsqualifizierung (IQ) / Funktionsqualifizierung (OQ) für das Neogen Molekulare Detektionssystem“ beschrieben⁽⁷⁾.

Spezifische Anweisungen finden Sie im Abschnitt „Spezielle Anweisungen für validierte Verfahren“: Für Anreicherungsprotokolle gemäß *Performance Tested Method*SM (PTM) Nr. 071902 in Tabelle 3.

Probenanreicherung

Tabelle 2 und 3 enthalten Richtlinien für das Anreichern von Lebensmittelproben.

Der Anwender ist selbst für die Validierung von alternativen Probennahmeprotokollen oder Verdünnungsverhältnissen verantwortlich, durch die sichergestellt werden muss, dass dieses Testverfahren den Anforderungen entspricht.

Lebensmittel

1. Anreicherungsmedium BPW ISO auf 41,5 ± 1 °C erwärmen.
2. Vereinen Sie das Anreicherungsmedium und die Probe gemäß einem aseptischen Verfahren. Bei der Handhabung von Fleisch- und partikelreichen Proben wird die Verwendung von Filterbeuteln empfohlen.
3. Mischen Sie alle Matrices und inkubieren Sie sie wie in der entsprechenden Protokolltabelle beschrieben (siehe Tabelle 2 oder 3).

Umgebungsproben

WARNUNG: Sollten Sie einen Neutralisationspuffer mit Acrylsulfonat-Komplex als Hydrierlösung für den Schwamm verwenden, müssen Sie vor dem Testen eine 1:2-Verdünnung (1 Teil Probe in 1 Teil steriler Anreicherungsbouillon) der angereicherten Umgebungsprobe vornehmen, um die mit einem falsch negativen Ergebnis verbundenen Risiken, die zur Freigabe eines kontaminierten Produkts führen können, zu verringern. Ebenso können Sie 10 µl Anreicherungsmedium mit Neutralisationspuffer in die Neogen Lysegefäße übertragen.

Der Anwender ist selbst für die Validierung von alternativen Probennahmeprotokollen oder Verdünnungsverhältnissen verantwortlich, durch die sichergestellt werden muss, dass dieses Testverfahren den Anforderungen entspricht.

Tabelle 2. Allgemeine Anreicherungsprotokolle.

Probenmatrix	Probengröße	Anreicherungs- bouillon Volumen (ml) (vorgewärmt)	Anreicherungs- temperatur (± 1 °C)	Anreicherungszeit (Stunden)	Probenanaly- sevolumen (µl)
Rohes Rinderhack- fleisch, Schabefleisch und Abschnitte ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO	41,5	10–18	20
Rohes Fleisch (Schwein, Geflügel, Lamm, Bison) ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO	41,5	10–18	20
Blattsalate ^(b)	200 g	450 BPW-ISO	41,5	18–24	20
Sprossen ^(c)	25 g	225 BPW-ISO	41,5	18–24	20
Rohmilchprodukte ^(d)	25 g oder 25 ml	225 BPW-ISO	41,5	18–24	20

^(a) Massieren Sie die Proben von Rindfleisch (Hackfleisch, Schabfleisch und Abschnitte) und Rohfleisch (Hackfleisch vom Schwein, Geflügel und anderes als Rindfleisch) 30–60 Sekunden, um Klumpen nach Zugabe von vorgewärmtem BPW-ISO aufzulösen und auseinanderzubrechen.

^(b) Gießen Sie bei Blattsalaten Anreicherungsbouillon (vorgewärmtes BPW-ISO) über die Blätter und schütteln Sie sie sanft 30–60 Sekunden lang. Blätter nicht massieren oder homogenisieren.

^(c) Gießen Sie bei Sprossen 30–60 Sekunden lang Anreicherungsbouillon (vorgewärmtes BPW-ISO) über die Sprossen und massieren oder homogenisieren Sie sie nicht.

^(d) Homogenisieren Sie die Rohmilchprodukt-Proben nach Zugabe von vorgewärmtem BPW-ISO 30–60 Sekunden lang.

Spezifische Anweisungen für validierte Verfahren
AOAC® Performance Tested MethodSM (PTM) Zertifikat-Nr. 071902



In PTMSM-Studien des AOAC-Forschungsinstituts wurde der Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*) als effektive Methode für den Nachweis von STEC bewertet. Die in der Studie getesteten Matrices sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3. Anreicherungsprotokolle gemäß AOAC PTMSM Zertifikat Nr. 071902.

Probenmatrix	Probengröße	Anreicherungsbouillon Volumen (ml)	Anreicherungs-temperatur (± 1 °C)	Anreicherungszeit (Stunden)	Probenanaly-sevolumen (µl)
Rohes Rindfleisch, Abschnitte ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (vorgewärmt)	41,5	10–18	20
Rohes Hackfleisch, Rind ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (vorgewärmt)	41,5	10–18	20
Rohes Hackfleisch, Rind ^(a)	25 g	225 BPW-ISO (vorgewärmt)	41,5	10–18	20
Rohes Hackfleisch, Schwein ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (vorgewärmt)	41,5	10–18	20
Rohgeflügel-Teile ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (vorgewärmt)	41,5	10–18	20
Mechanisch separiertes Hühnerfleisch	25 g	225 BPW-ISO (vorgewärmt)	41,5	10–24	20
Spinat ^(b)	200 g	450 BPW-ISO (vorgewärmt)	41,5	18–24	20
Sprossen ^(c)	25 g	225 BPW-ISO (vorgewärmt)	41,5	18–24	20
Getrocknete Cannabisblüten, getrocknete Hanfblüten ^(d)	10 g	90 BPW-ISO	41,5	28–32	20

^(a) Geben Sie für Rindfleischproben (Hack- und Schabfleisch) vorgewärmte BPW-ISO zur Rindfleischprobe. 30–60 Sekunden lang von Hand massieren, um Klumpen aufzulösen und zu zerteilen.

^(b) Geben Sie für Spinat vorgewärmtes BPW-ISO zur Matrix. Gießen Sie die Flüssigkeit über die Blätter und schütteln Sie sie sanft 30–60 Sekunden lang. Blätter nicht massieren oder homogenisieren.

^(c) Gießen Sie für Sprossen 30–60 Sekunden lang Anreicherungsbouillon (vorgewärmtes BPW-ISO) über die Sprossen und massieren oder homogenisieren Sie sie nicht.

^(d) Getrocknete Cannabisblüten (>0,3 % THC) und getrocknete Hanfblüten (≤0,3 % THC)

Vorbereitung der Neogen® Molekulare Detektion – Beladehilfe

1. Befeuchten Sie ein Tuch oder ein Einwegtuch mit einer 1-5%igen Haushaltsbleichmittellösung (v:v in Wasser) und wischen Sie die Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe ab.
2. Spülen Sie die Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe mit Wasser ab.

3. Trocknen Sie die Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe mit einem Einmalhandtuch.
4. Vergewissern Sie sich, dass die Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe vor dem Gebrauch trocken ist.

Vorbereitung des Neogen® Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatzes

Stellen Sie den Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz direkt auf die Laborbank: Der Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockträger wird nicht verwendet. Verwenden Sie den Block bei Laborraumtemperatur (20–25 °C).

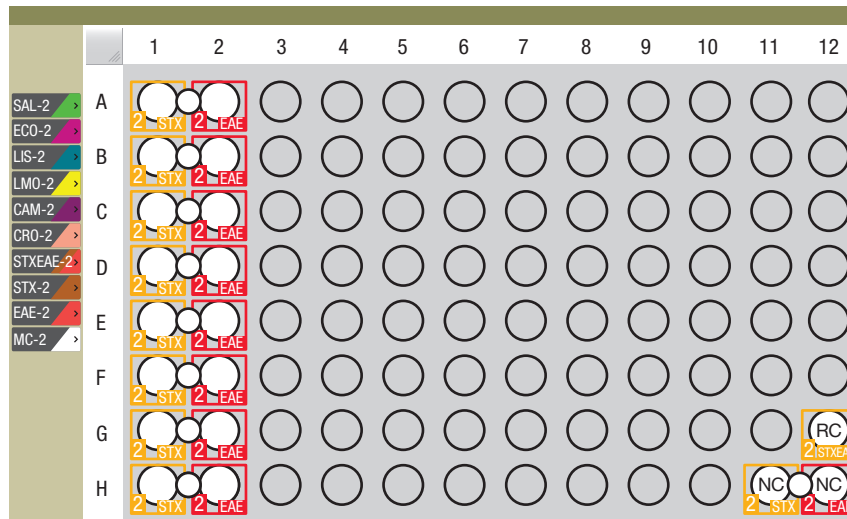
Vorbereitung des Neogen® Molekulare Detektion – Heizblockeinsatzes

Legen Sie den Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz in ein Trocken-Doppelblock-Heizgerät. Schalten Sie das Trockenblock-Heizgerät ein und stellen Sie die Temperatur für den Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz auf 100 ± 1 °C ein.

HINWEIS: Warten Sie je nach Heizgerät etwa 30 Minuten, bis der Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz die geeignete Temperatur erreicht hat. Stellen Sie mit einem kalibrierten Thermometer (z. B. ein Thermometer zum partiellen Eintauchen oder ein Digitalthermometer, kein Tauchthermometer) an der vorgesehenen Messposition fest, ob der Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz die erforderliche Temperatur von 100 ± 1 °C erreicht hat.

Vorbereitung des Neogen® Molekulare Detektion – Geräts

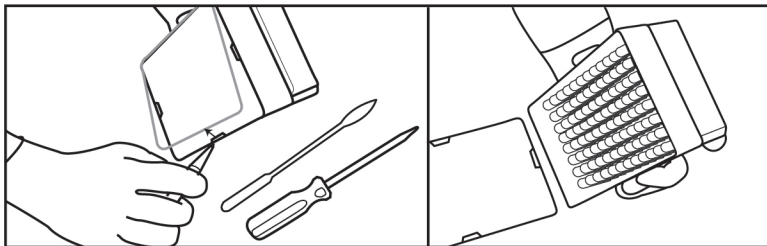
1. Starten Sie die Neogen Molekulares Detektionssystem – Software und loggen Sie sich ein. Setzen Sie sich mit dem Ihrem Neogen Food Safety Vertreter in Verbindung, um sicherzustellen, dass Sie über die aktuellste Softwareversion verfügen.
2. Schalten Sie das Neogen Molekulare Detektion – Gerät ein.
3. Erstellen oder bearbeiten Sie für jede Probe einen Testdurchlauf. Weitere Details entnehmen Sie bitte dem Benutzerhandbuch zum Neogen Molekularen Detektionssystem.
 - 3.1. Durch Auswahl des STXEAE-2-Symbols in der Software werden zwei nebeneinander liegende Vertiefungen (wie z. B. A1, A2, B1, B2 usw.) ausgewählt, eine für das stx- und die andere für das eae-Reagenzgefäß, da jede Probe mit zwei Assays durchgeführt wird. Die Negativkontrolle ist für die einzelnen Reagenzgefäße und eine Reagenzkontrolle ist für das Kit vorbereitet.



HINWEIS: Das Neogen Molekulare Detektion – Gerät muss bereit sein, bevor die Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe mit den Reaktionsgefäßen eingesetzt werden kann. Dieses Erwärmungsverfahren nimmt etwa 20 Minuten in Anspruch und wird durch eine ORANGEFARBENE Leuchte auf der Statusleiste des Geräts angezeigt. Sobald das Gerät einsatz-bereit ist, wechselt die Leuchte der Statusleiste auf GRÜN.

Lyse

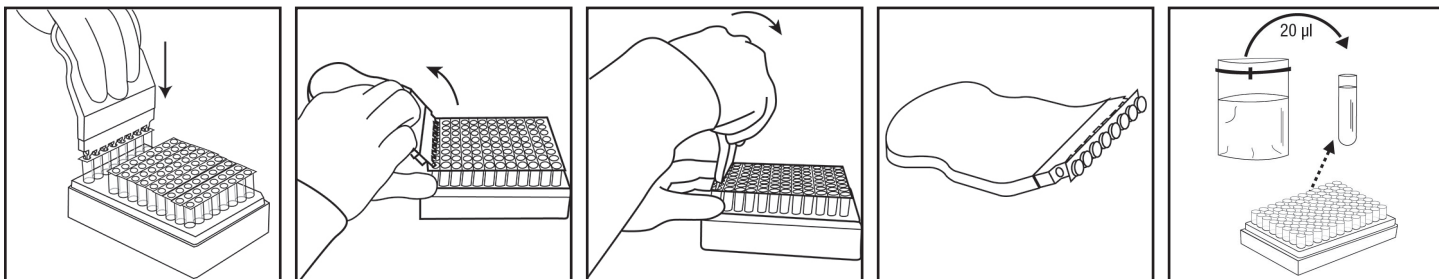
Entfernen Sie die Unterseite des Neogen Lyselösungsträgers mit einem Schraubendreher oder Spatel, bevor Sie ihn im Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz platzieren.



1. Lassen Sie die Neogen Lyselösung im Gefäß über Nacht (16–18 Stunden) bei Raumtemperatur (20–25 °C) aufwärmen. Um die Neogen Lysegefäße auf Raumtemperatur zu erwärmen, können Sie die Neogen Lysegefäße für mindestens 2 Stunden auf die Laborbank stellen, für 1 Stunde bei 37 ± 1 °C inkubieren oder die Neogen Lysegefäße für 30 Sekunden bei 100 °C in ein Trocken-Doppelblock-Heizgerät setzen.
2. Mischen Sie die mit Kappen verschlossenen Gefäße. Fahren Sie innerhalb von 4 Stunden nach dem Mischen mit dem nächsten Schritt fort.
3. Nehmen Sie die angereicherte Probe aus dem Inkubator.
4. Für jede Probe (steriles Anreicherungsmedium) und die NC wird jeweils ein Gefäß mit Neogen Lyselösung benötigt.
 - 4.1. Die Neogen Lysegefäßstreifen können auf die gewünschte Anzahl an Gefäßen zurechtgeschnitten werden. Wählen Sie die erforderliche Anzahl Gefäße oder Streifen mit 8 Gefäßen aus. Setzen Sie die Neogen Lysegefäße in einen leeren Gefäßträger.
 - 4.2. Um eine Kreuzkontamination zu vermeiden, öffnen Sie jeweils nur einen Neogen Lysegefäßstreifen und verwenden Sie bei jeder einzelnen Übertragung eine neue Pipette.
 - 4.3. Übertragen Sie die angereicherte Probe wie unten beschrieben auf die Neogen Lysegefäße:

Übertragen Sie **zuerst** die angereicherten Proben jeweils einzeln in ein Neogen Lysegefäß. Übertragen Sie die NC **zuletzt**.

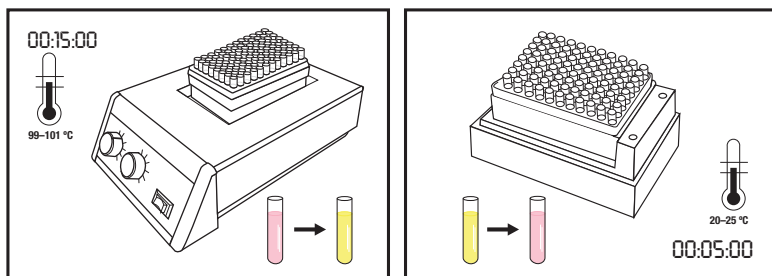
- 4.4. Öffnen Sie jeden Neogen Streifen mit Lysegefäßen einzeln mit dem Neogen® Molekulare Detektion – Cap/Decap-Werkzeug – Lyse.
- 4.5. Entsorgen Sie die Kappen der Neogen Lysegefäße. Wenn noch Lysat für weitere Tests übrig bleibt, bewahren Sie die Kappen in einem sauberen Behälter auf, um sie nach der Lyse wieder aufzusetzen.
 - 4.5.1. Informationen zur Verarbeitung von nicht verwendetem Lysat finden Sie in Anhang A.
- 4.6. Übertragen Sie 20 µl Probe in ein Neogen-Lysegefäß.



5. Wiederholen Sie bei Bedarf die Schritte 4.4 bis 4.6 bei allen zu prüfenden Proben.
6. Sobald Sie alle Proben übertragen haben, übertragen Sie 20 µl der Negativkontrolle (steriles Anreicherungsmedium, z. B. gepuffertes Peptonwasser BPW) in ein Neogen Lysegefäß. Als Negativkontrolle kein Wasser verwenden.
7. Stellen Sie fest, ob der Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz die erforderliche Temperatur von 100 ± 1 °C erreicht hat.
8. Stellen Sie den Träger ohne Deckel mit Neogen Lysegefäßen in den Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz und erwärmen Sie ihn 15 Minuten \pm 1 Minute lang. Dabei ändert sich die Farbe der Neogen Lyselösung von rosafarben (kalt) zu gelb (heiß).
 - 8.1. Proben, die während der Lyse nicht ordnungsgemäß wärmebehandelt wurden, stellen möglicherweise ein biologisches Risiko dar und sollten NICHT in das Neogen Molekulare Detektion – Gerät eingesetzt werden.

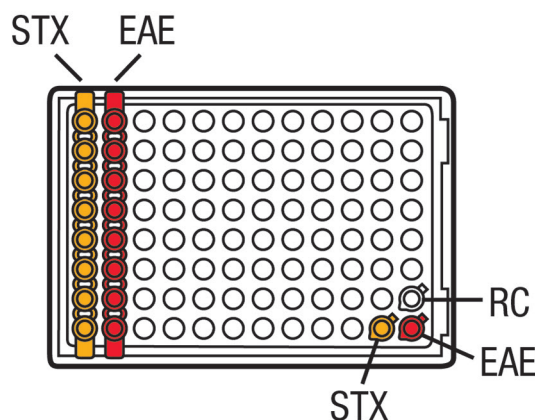


9. Nehmen Sie den Träger ohne Deckel mit den Neogen Lysegefäßen aus dem Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz. Lassen Sie ihn im Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz 5 bis 10 Minuten lang abkühlen. Der Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz wird bei Raumtemperatur ohne den Neogen® Molekulare Detektion – Kühlblockträger verwendet und sollte direkt auf die Laborbank gesetzt werden. Wenn die Neogen-Lyselösung abgekühlt ist, nimmt sie wieder eine rosa Farbe an.
10. Nehmen Sie den Träger mit den Neogen Lysegefäßen aus dem Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz.



Amplifikation

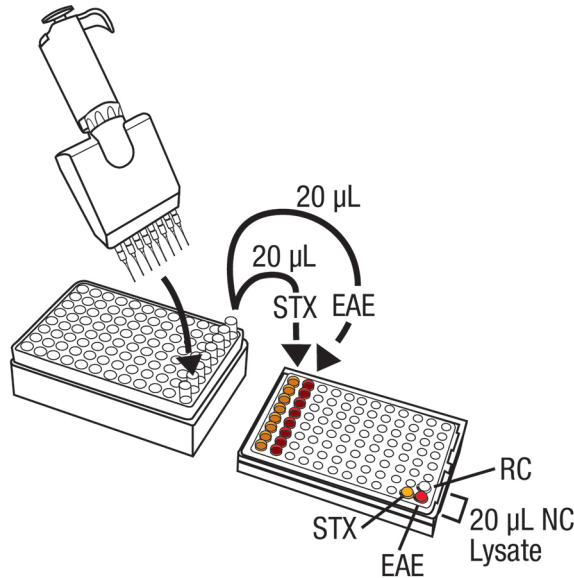
1. Für jede Probe und ihre Negativkontrolle ist ein Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx*)- und ein Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*eae*)-Reagenzgefäß erforderlich.
 - 1.1. Die Gefäßstreifen können auf die gewünschte Anzahl der Gefäße zurechtgeschnitten werden. Wählen Sie die Anzahl der erforderlichen Reagenzgefäße oder den Streifen mit 8 Gefäßen für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx*) oder den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*eae*) aus.
 - 1.2. Setzen Sie die Gefäße des Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx*) in eine Reihe eines leeren Trägergestells.
 - 1.3. Setzen Sie die Gefäße des Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*eae*) in die angrenzende rechte Reihe.
 - 1.4. Vermeiden Sie es, die Reagenzkügelchen im unteren Teil der Gefäße aufzurühren.
2. Wählen Sie ein Gefäß mit Neogen Reagenzkontrolle und stellen Sie es in den Gefäßträger.
3. Wählen Sie für das Negativkontroll-Lysat ein Reagenzgefäß für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx*) und eines für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*eae*) aus und stellen Sie sie in den Gefäßträger.



4. Um eine Kreuzkontamination zu vermeiden, öffnen Sie jeweils nur einen Reagenzgefäßstreifen des Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* oder *eae*) und verwenden Sie bei jedem Übertragungsschritt eine neue Pipettenspitze.
5. Übertragen Sie wie unten beschrieben die einzelnen Lysate in ein Reagenzgefäß für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* oder *eae*), wie unten beschrieben.
 - 5.1. Übertragen Sie zunächst die einzelnen Lysate in ein Reagenzgefäß für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx*), wie in 5.5. und 5.6 beschrieben.
 - 5.2. Übertragen Sie im zweiten Schritt alle gleichen Probenlysate auf ein Reagenzgefäß des Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*eae*) in der angrenzenden rechten Reihe, wie in 5.5 und 5.6 beschrieben.

HINWEIS: Verwenden Sie für jede Übertragung eine neue Pipettenspitze. Verwenden Sie nicht die gleiche Pipette für die Übertragung der gleichen Lysatprobe auf das *stx*- und *eae*-Reagenzgefäß.

- 5.3. Sobald Sie alle Probenlysate übertragen haben, geben Sie NC-Lysat in jedes Reagenzgefäß für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx*) und den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*eae*).
- 5.4. Übertragen Sie zuletzt das Negativkontroll-Lysat auf das Reagenzkontroll-Gefäß.



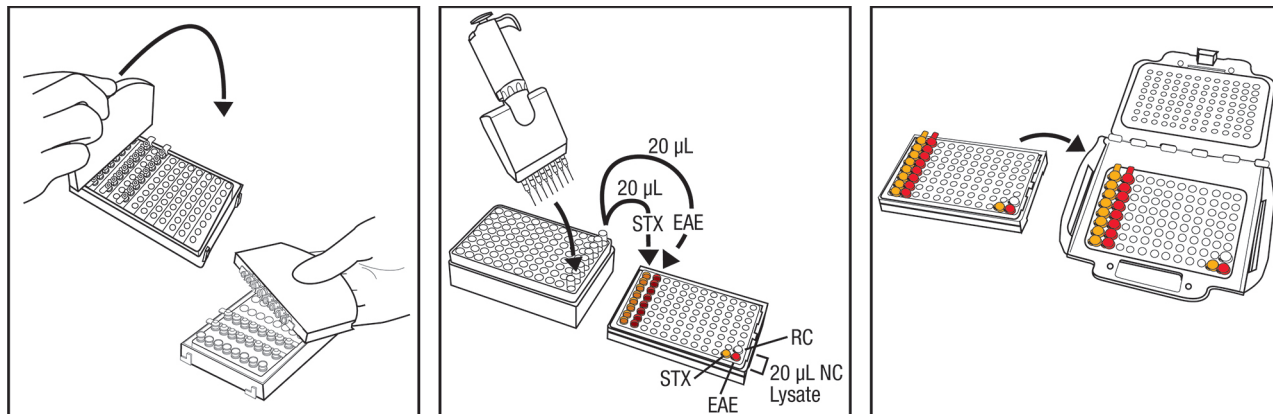
- 5.5. Öffnen Sie die Reagenzgefäße für den Neogen® Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* oder *eae*) mit dem Neogen Molekulare Detektion – Cap/Decap-Werkzeug – Reagenz, und zwar immer nur einen Streifen auf einmal. Werfen Sie die Kappe weg.
- 5.6. Übertragen Sie 20 µl des Probenlysats aus der oberen Hälfte der Flüssigkeit (Ablagerungen vermeiden) im Neogen Lysegefäß in das entsprechende Reagenzgefäß für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* oder *eae*). Pipettieren Sie schräg in die Gefäße, um ein Aufrühren der Kügelchen zu vermeiden. Mischen Sie anschließend den Gefäßinhalt, indem Sie ihn 5 Mal auf und ab pipettieren.

HINWEIS: Verwenden Sie für jede Übertragung eine neue Pipettenspitze. Verwenden Sie nicht die gleiche Pipette für die Übertragung der gleichen Lysatprobe auf das *stx*- und *eae*-Reagenzgefäß.

- 5.7. Wiederholen Sie Schritt 5.6, bis Sie jedes einzelne Probenlysate einem entsprechenden Reagenzgefäß für den Neogen Molekulare Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* oder *eae*) im Streifen hinzugefügt haben.
- 5.8. Verschließen Sie die Reagenzgefäße für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* oder *eae*) mit den mitgelieferten zusätzlichen Kappen und üben Sie mit der abgerundeten Seite des Neogen Molekulare Detektion – Cap/Decap-Werkzeugs – Reagenz in einer Vorwärts- und Rückwärtsbewegung Druck aus, um sicherzustellen, dass die Kappe fest sitzt.
- 5.9. Wiederholen Sie bei Bedarf die Schritte 5.6 bis 5.8 für die Anzahl der zu testenden Proben für die Reagenzgefäße des Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*).
- 5.10. Sobald Sie alle Probenlysate übertragen haben, wiederholen Sie die Schritte 5.6 bis 5.8, um 20 µl des NC-Lysats in ein Reagenzgefäß für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx*) und Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*eae*) zu übertragen.
- 5.11. Übertragen Sie 20 µl des **NC-Lysats** in ein Gefäß mit Neogen Reagenzkontrolle. Pipettieren Sie schräg in die Gefäße, um ein Aufrühren der Kügelchen zu vermeiden. Mischen Sie anschließend den Gefäßinhalt, indem Sie ihn 5 Mal auf und ab pipettieren.

Übertragen Sie jedes Probenlysate zuerst in ein eigenes Reagenzgefäß für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* oder *eae*), gefolgt von der Negativkontrolle. Hydrieren Sie das Gefäß mit Neogen Reagenzkontrolle als letztes.

6. Beladen Sie eine saubere und dekontaminierte Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe mit den mit Kappen verschlossenen Gefäßen. Anschließend die Klappe schließen und verriegeln.



7. Überprüfen und bestätigen Sie die Konfiguration des Durchlaufs in der Neogen Molekulare Detektion – Software.
8. Klicken Sie auf die Schaltfläche „Start“ in der Software und wählen Sie anschließend das zu verwendende Gerät aus. Die Klappe des gewählten Geräts öffnet sich automatisch.
9. Setzen Sie die Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe in das Neogen Molekulare Detektion – Gerät und schließen Sie die Klappe, um mit dem Test zu beginnen. Die Ergebnisse sind innerhalb von 60 Minuten verfügbar, obgleich positive Ergebnisse möglicherweise schneller erfasst werden.
10. Nehmen Sie nach Abschluss des Tests die Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe aus dem Neogen Molekulare Detektion – Gerät und entsorgen Sie die Gefäße, indem Sie sie 1 Stunde lang in ausreichender Entfernung vom Vorbereitungsbereich in einer 1–5%igen Haushaltsbleichmittellösung (v:v in Wasser) einweichen.

HINWEIS: Um das Risiko eines falsch positiven Ergebnisses infolge einer Kreuzkontamination zu minimieren, öffnen Sie niemals Reagenzgefäße, die amplifizierte DNS enthalten. Dies betrifft Reagenzien für den Neogen Molekularer Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (*stx* und *eae*) sowie Gefäße mit Neogen Reagenzkontrolle und Neogen Matrix-kontrolle. Entsorgen Sie die verschlossenen Reagenzgefäße, indem Sie sie 1 Stunde lang in ausreichender Entfernung vom Vorbereitungsbereich in einer 1–5%igen Haushaltsbleichmittellösung (v:v in Wasser) einweichen.

Interpretation der Ergebnisse

Die durch die Detektion der Nukleinsäureamplifikation entstehende Lichtkurve wird anhand eines Algorithmus ausgewertet. Die Ergebnisse werden automatisch von der Software analysiert und je nach Ergebnis farbcodiert. Ein positives oder negatives Ergebnis wird durch die Analyse einer bestimmten Anzahl an eindeutigen Kurvenparametern bestimmt. Die vorläufigen positiven Ergebnisse werden in Echtzeit erstellt, während negative und zu überprüfende Ergebnisse erst nach Abschluss des Testdurchlaufs dargestellt werden.

Die Neogen Molekulare Detektionssystem – Software meldet Ergebnisse separat für jeden Assay und verwendet Ergebnisse beider Assays (*stx* und *eae*), um die Probe als STEC (EHEC) positiv oder negativ zu bezeichnen. Für ein vorläufig positives Ergebnis für STEC (EHEC) müssen beide Ziele (*stx1* und/oder *stx2* und *eae*) positiv sein. **Wenn für einzelne Assays „Fehler“ oder „Zu überprüfen“ angezeigt wird, lautet das Endergebnis „Fehler“ oder „Zu überprüfen“. Der Test muss wiederholt werden, um die Endergebnisse richtig anzuzeigen** (siehe Ergebnisschlüssel). Die Software ermöglicht es zudem, bei Bedarf einzelne Assays einzurichten; das Probenlysate oder frische Lysat aus der Anreicherung kann mit den Assays erneut getestet werden, indem die in Anhang A beschriebenen Schritte für nicht verwendete Lysate und die Schritte m Abschnitt Lyse und Amplifikation für nicht verwendete Anreicherung durchgeführt werden.



Ergebnisschlüssel für das angereicherte Probenlysat

	Beide positiv, Endergebnis: positiv
	stx positiv, eae negativ, Endergebnis: negativ
	stx positiv, eae zu überprüfen, Endergebnis: zu überprüfen, Test wiederholen
	stx positiv, eae Fehler, Endergebnis: Fehler, Test wiederholen
	stx negativ, eae positiv, Endergebnis: negativ
	stx negativ, eae negativ, Endergebnis: negativ
	stx negativ, eae zu überprüfen, Endergebnis: zu überprüfen, Test wiederholen
	stx negativ, eae Fehler, Endergebnis: Fehler, Test wiederholen
	stx zu überprüfen, eae positiv, Endergebnis: zu überprüfen, Test wiederholen
	stx zu überprüfen, eae negativ, Endergebnis: zu überprüfen, Test wiederholen
	stx zu überprüfen, eae zu überprüfen, Endergebnis: zu überprüfen, Test wiederhole
	stx zu überprüfen, eae Fehler, Endergebnis: Fehler, Test wiederholen
	stx Fehler, eae positiv, Endergebnis: Fehler, Test wiederholen
	stx Fehler, eae negativ, Endergebnis: Fehler, Test wiederholen
	stx Fehler, eae zu überprüfen, Endergebnis: Fehler, Test wiederholen
	stx Fehler, eae Fehler, Endergebnis: Fehler, Test wiederholen

Schlüssel der Negativkontrolle






	Beide gültig, Link gültig
	Einer gültig, anderer fehlerhaft, Link fehlerhaft, Test wiederholen
	Einer gültig, anderer ungültig, Link ungültig, Test wiederholen
	Beide fehlerhaft, Link fehlerhaft, Test wiederholen
	Beide ungültig, Link ungültig, Test wiederholen
	Einer fehlerhaft, anderer ungültig, Link fehlerhaft, Test wiederholen

Vorläufig positive Ergebnisse sollten anhand der Standardarbeitsanweisung (SOP) für Laboratorien oder durch das anschließende Referenzverfahren^(1, 2, 3) bestätigt werden, beginnend mit der Übertragung primären Anreicherungsbouillon auf selektive Platten, Bestätigung von Isolat anhand entsprechender biochemischer, mikroskopischer und serologischer Verfahren. Für mit MLG 5C spezifizierte Matrices sollte vor der Ausplattierung auf einem selektiven Medium eine immunomagnetische (IMS) Separation erfolgen.

HINWEIS: Selbst ein negatives Ergebnis führt nicht zu einem Ergebnis von null, da das System und die Amplifikationsreagenzien des Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - STEC Gene Screen (stx und eae) über einen „Hintergrund“ verfügen, der in relativem Verhältnis zur Lichteinheit (RLU) steht.

Falls es in seltenen Fällen zu einer ungewöhnlichen Lichtleistung kommt, wird diese vom Algorithmus als „Zu überprüfen“ gekennzeichnet. Neogen empfiehlt, den Nachweis der so gekennzeichneten Proben zu wiederholen. Falls das Ergebnis weiterhin als „Zu überprüfen“ gekennzeichnet bleibt, bestätigen Sie das Ergebnis anhand Ihres bevorzugten Testverfahrens^(1, 2, 3) oder gemäß den jeweils geltenden Richtlinien.

Tabelle 4. Symbole und Informationen zu verschiedenen Softwareergebnissen.

Vertiefungstyp	Vertiefungsergebnissymbol	Ergebnis	Interpretation
Probe		Positiv	Die Probe wird vorläufig positiv für das Zielpathogen betrachtet.
Probe		Negativ	Die Probe wird negativ für das Zielpathogen betrachtet.
Probe		Inhibiert	Die Probenmatrix hat den Nachweis gehemmt. Ein neuer Test ist erforderlich. Weitere Informationen finden Sie im Problemlösungsabschnitt und der Gebrauchsanweisung des Testkits.
Probe		Zu überprüfen	Das Vorhandensein oder Fehlen des Zielpathogens war nicht ermittelbar. Ein neuer Test ist erforderlich. Weitere Informationen finden Sie im Problemlösungsabschnitt und der Gebrauchsanweisung des Testkits.
Probe		Fehler	Keine Biolumineszenz festgestellt. Ein neuer Test ist erforderlich. Weitere Informationen finden Sie im Problemlösungsabschnitt und der Gebrauchsanweisung des Testkits.

Anhang A. Protokoll-Unterbrechungen: Lagerung und erneutes Testen von Proben

- Um ein wärmebehandeltes Lysat zu lagern, verschließen Sie das Neogen Lysegefäß wieder mit einer sauberen Kappe (siehe Lyse, Abschnitt 4.5).
- Zum Lagern einer angereicherten Probe, inkubieren Sie diese mindestens 18 Stunden lang vor der Einlagerung.
- Lagern Sie sie bis zu 72 Stunden bei 4 bis 8 °C.
- Bereiten Sie eine gelagerte Probe zur Amplifikation vor, indem Sie sie zum Mischen 2 bis 3 Mal umdrehen.
- Öffnen Sie die Gefäße.
- Setzen Sie die gemischten Lysatgefäße in den Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsetz und erwärmen Sie sie 5 Minuten ± 1 Minute lang bei 100 ± 1 °C.
- Nehmen Sie den Träger mit den Neogen Lysegefäßen aus dem Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsetz. Lassen Sie ihn im Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsetz 5 bis 10 Minuten lang abkühlen.
- Setzen Sie das Protokoll ab dem oben beschriebenen Abschnitt Amplifikation fort.

Literaturnachweise:

- Microbiology Laboratory Guidebook. U. S. Department of Agriculture (USDA) Food Safety and Inspection Service (FSIS) Microbiology Laboratory guidebook 5C.00. Detection and isolation of top seven Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STECs) from meat products and carcass and environmental sponges. Feb 4, 2019.
- US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. October 2018.
- ISO/TS 13136:2012: Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups
- U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good laboratory practice for nonclinical laboratory studies.
- ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examination.
- Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. Eine Kopie dieses Dokuments erhalten Sie über Ihren Neogen Food Safety-Repräsentanten.

Erklärung der Symbole

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar 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 Leshar Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00918A

Instrucciones del Producto

Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*)

Descripción del producto y uso previsto

El Neogen® Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*) se usa con el Sistema de Detección Molecular Neogen® para la detección rápida y específica del gen de la toxina Shiga (*stx1* y/o *stx2*) y el gen intimina (*eae*) de *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC, también conocida como “*E. coli* productora de verocitotoxina”) en muestras ambientales de procesos de alimentos y alimentos enriquecidos. El término STEC se refiere a los patotipos de *E. coli* capaces de producir la toxina Shiga tipo 1 (Stx1), tipo 2 (Stx2) o ambas, codificados por los genes *stx1* y *stx2*, respectivamente. Las STEC que contienen genes de virulencia para *stx1* y/o *stx2* y *eae* (gen intimina involucrado en el fenotipo de adherencia y destrucción) son designados como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). El kit de detección contiene dos tubos de reactivo separados, uno para detectar los genes de virulencia *stx1* y/o *stx2* y el otro para detectar los *eae* de STEC (EHEC). El software del Sistema de Detección Molecular Neogen® informa los resultados por separado para cada uno de los ensayos y utiliza los resultados de ambos ensayos para denominar la muestra positiva o negativa para STEC (EHEC). Para un presunto positivo de STEC (EHEC), ambos objetivos genéticos (*stx1* y/o *stx2* y *eae*) deben ser positivos. El ensayo de *stx* no distingue entre *stx1* y *stx2*, pero detecta la presencia de *stx1* y/o *stx2*.

El Neogen Sistema de Detección Molecular usa amplificación isotérmica mediada por asas para amplificar rápidamente las secuencias de ácidos nucleicos con alta especificidad y sensibilidad, combinadas con bioluminiscencia para detectar la amplificación. Los resultados presuntamente positivos se reportan en tiempo real, mientras que los resultados negativos se revelan una vez terminado el ensayo. Los resultados presuntamente positivos se deben confirmar con el método que se prefiera^(1,2,3) o según lo especifiquen las regulaciones locales.

El Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*) está previsto para el uso en laboratorios con profesionales capacitados en el empleo de técnicas de laboratorio. Neogen no documentó el uso de este producto en otras industrias que no sean la alimentaria o la de bebidas. Por ejemplo, Neogen no documentó este producto para el análisis de muestras clínicas, veterinarias, cosméticas o farmacéuticas. El Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*) no ha sido evaluado con todos los productos alimenticios ni todos los procesos alimenticios, tampoco con todos los protocolos de evaluación ni con todas las cepas de bacterias posibles.

Como con todos los métodos de prueba, el origen, la formulación y la calidad del medio de enriquecimiento pueden influir sobre los resultados. Factores tales como los métodos de muestreo, los protocolos de análisis, la preparación de la muestra, la manipulación y la técnica de laboratorio también pueden afectar los resultados. Neogen recomienda la evaluación del método lo que incluye el medio de enriquecimiento usando un número suficiente de muestras en alimentos representativos y con exposición a ciertas cepas o bacterias desafiantes para garantizar que el método satisface los criterios del usuario en su propio entorno.

Neogen ha evaluado el Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*) con agua peptonada tamponada (BPW)-ISO como caldo de enriquecimiento.

El Equipo de Detección Molecular Neogen® está previsto para ser utilizado con muestras que hayan sido tratadas con calor durante el paso de lisis del ensayo, que se diseñó para destruir los microorganismos presentes en la muestra. Las muestras que no se hayan tratado debidamente con calor durante el paso de lisis del ensayo pueden considerarse un posible riesgo biológico y NO deben introducirse en el Equipo de Detección Molecular Neogen.

Neogen Food Safety cuenta con certificación de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO) 9001 de diseño y fabricación.

El kit de prueba del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*) contiene 48 pruebas de cada uno de los reactivos de *stx* y *eae*, que se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Componentes del kit del Neogen Sistema de Detección Molecular.

Artículo	Identificación	Cantidad	Contenido	Comentarios
Solución de Lisis (LS) Neogen®	Solución rosada en tubos transparentes	96 (12 tiras de 8 tubos)	580 µL de LS por tubo	En gradilla y lista para usar
Tubos de reactivo del Neogen® Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (<i>stx</i>)	Tubos naranjas	48 (2 bolsas con 3 tiras de 8 tubos)	Mezcla de detección y amplificación específica liofilizada	Listos para usar
Tubos de reactivo del Neogen® Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (<i>eae</i>)	Tubos rojos	48 (2 bolsas con 3 tiras de 8 tubos)	Mezcla de detección y amplificación específica liofilizada	Listos para usar
Tapas adicionales	Tapas naranjas	96 (12 tiras de 8 tapas)		Listos para usar
Tapas adicionales	Tapas rojas	96 (12 tiras de 8 tapas)		Listos para usar
Control de Reactivos Neogen® (RC)	Tubos transparentes con tapa de bisagra	16 (2 bolsas de 8 tubos individuales)	Mezcla de detección y amplificación de control liofilizado de DNA	Listos para usar

El Control Negativo (NC), no provisto en el kit, es un medio de enriquecimiento estéril, por ejemplo, BPW-ISO. No use agua como un NC.

Puede encontrar una guía de inicio rápido en www.neogen.com

Seguridad

El usuario debe leer, comprender y seguir toda la información de seguridad incluida en las instrucciones para el Sistema de Detección Molecular Neogen y el Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*). Guarde las instrucciones de seguridad para consultas futuras.

⚠️ ADVERTENCIA: Indica una situación peligrosa que, si no se evita, podría ocasionar la muerte o lesiones graves, o daños materiales.

⚠️ ATENCIÓN: Indica una situación potencialmente peligrosa que, si no se evita, podría ocasionar daños materiales.

⚠️ ADVERTENCIA

No utilice el Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*) para el diagnóstico de afecciones en seres humanos o animales.

El usuario debe capacitar a su personal en lo que respecta a las técnicas de prueba adecuadas, por ejemplo, Buenas prácticas de laboratorio⁽⁴⁾, ISO/IEC 17025⁽⁵⁾ o ISO 7218⁽⁶⁾.

Para reducir los riesgos asociados con un resultado falso negativo que provoque la liberación de productos contaminados:

- Siga el protocolo y realice las pruebas exactamente como se indica en las instrucciones del producto.
- Almacene el Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*) como se indica en el embalaje y en las instrucciones del producto.
- Siempre utilice el Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*) antes de su fecha de vencimiento.
- Utilice el Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*) con muestras ambientales y de alimentos que hayan sido validadas internamente o por un tercero.
- Utilice el Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*) solo con cepas bacterianas, superficies, desinfectantes y protocolos que hayan sido validados internamente o por un tercero.
- En el caso de muestras ambientales que contengan una solución amortiguadora neutralizante con un complejo de aril sulfonato, prepare una dilución en una proporción de 1:2 (1 parte de muestra en 1 parte de caldo de enriquecimiento estéril) antes de realizar la prueba. Otra opción es transferir 10 µL de la muestra de la solución amortiguadora neutralizante enriquecida a los tubos de Solución de Lisis Neogen. Productos para la manipulación de muestras Neogen® que incluyen una Solución Amortiguadora Neutralizante con el complejo aril sulfonato: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G y HS2410NB2G.

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

- Realice las pruebas de patógenos en un laboratorio debidamente equipado, bajo la supervisión de personal capacitado. El medio de enriquecimiento incubado y el equipo o las superficies que hayan entrado en contacto con el medio de enriquecimiento podrían contener patógenos en niveles suficientes para provocar un riesgo para la salud humana.
- Siempre proceda de acuerdo con las prácticas estándar de seguridad del laboratorio. Eso incluye usar la ropa de protección adecuada y protección para los ojos al manipular reactivos y muestras contaminadas.
- Evite el contacto con el contenido del medio de enriquecimiento y de los tubos de reactivos después de la amplificación.
- Deseche las muestras enriquecidas de acuerdo con las normas regulatorias locales/regionales/nacionales actuales.
- Las muestras que no se hayan tratado debidamente con calor durante el paso de lisis del ensayo pueden considerarse un posible riesgo biológico y NO deben introducirse en el Equipo de Detección Molecular Neogen.

Para reducir los riesgos relacionados con contaminación cruzada mientras se prepara el ensayo:

- Use siempre guantes (para proteger al usuario y evitar que se introduzcan nucleasas).

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

- No exceda la temperatura recomendada al configurar el calentador.
- No exceda el tiempo de calentamiento recomendado.
- Use un termómetro calibrado adecuado para verificar la temperatura del Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen® (p. ej., un termómetro de inmersión parcial o un termómetro digital termopar, no un termómetro de inmersión total). El termómetro debe colocarse en la ubicación designada en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen.

ATENCIÓN**Para reducir los riesgos relacionados con contaminación cruzada mientras se prepara el ensayo:**

- Cámbiese los guantes antes de hidratar los gránulos reactivos.
- Se recomienda usar puntas de pipetas estériles de calidad de biología molecular con barrera para aerosoles (con filtro).
- Use una nueva punta de pipeta para cada transferencia de muestra.
- Use las Buenas Prácticas de Laboratorio para transferir la muestra del enriquecimiento al tubo de lisis. Para evitar la contaminación de la pipeta, el usuario puede elegir agregar un paso de transferencia intermedia. Por ejemplo, el usuario puede transferir cada muestra enriquecida a un tubo estéril.
- Use una estación de trabajo de calidad para biología molecular con una lámpara germicida, siempre que disponga de una.
- Descontamine periódicamente las mesas y el equipo de laboratorio (pipetas, herramientas para tapar/destapar, etc.) con una solución de cloro de uso doméstico del 1 % al 5 % (v:v en agua) o en una solución para eliminación de DNA.

Para reducir los riesgos relacionados con un resultado falso positivo:

- Nunca abra los tubos de reactivos después de la amplificación.
- Siempre deseche los tubos contaminados sumergiéndolos en una solución de cloro de uso doméstico del 1 % al 5 % (v:v en agua) durante 1 hora y lejos del área en que se prepara el ensayo.
- Nunca ponga en autoclave los tubos de reactivos después de la amplificación.

Consulte la Hoja de Datos de Seguridad para obtener más información y conocer las normativas locales para el desecho de materiales.

Si tiene preguntas acerca de los procedimientos o las aplicaciones específicas, 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 e información del producto. Visite nuestro sitio web en www.neogen.com o póngase en contacto con su representante o distribuidor local de Neogen para obtener más información.

Al seleccionar un método de prueba, es importante reconocer que factores externos tales como los métodos de muestreo, los protocolos de prueba, la preparación de la muestra, la manipulación, la técnica de laboratorio y la muestra en sí pueden afectar los resultados.

Al seleccionar cualquier método de prueba o producto, es responsabilidad del usuario evaluar un número suficiente de muestras con retos microbianos y matrices apropiadas para satisfacer al usuario en cuanto a que el método de prueba cumple con los criterios necesarios.

Además, es responsabilidad del usuario determinar que cualquier método de prueba y sus resultados 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 calidad de las matrices ni de los procesos analizados.

Para ayudar a los clientes a evaluar el método de varias matrices, Neogen ha desarrollado el kit de Control de Matriz para Detección Molecular Neogen®. Cuando sea necesario, utilice el Control de Matriz (MC) para Detección Molecular Neogen para determinar si la matriz tiene la capacidad de influir en los resultados del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*). Analice varias muestras representativas de la matriz, es decir, las muestras obtenidas de diferente origen, durante cualquier periodo de validación al adoptar el método de Neogen o al analizar matrices nuevas o desconocidas, o matrices que hayan sido sometidas a cambios en el proceso o la materia prima.

Una matriz se puede definir como un tipo de producto con propiedades intrínsecas, tales como composición y proceso. Las diferencias entre las matrices pueden ser tan simples como los efectos causados por las diferencias en su procesamiento o presentación, por ejemplo, productos crudos versus pasteurizados; alimentos frescos versus secos, etc.

Limitación de garantía/Recurso limitado

SALVO LO EXPRESAMENTE ESTIPULADO EN UNA SECCIÓN DE GARANTÍA LIMITADA O EN EL EMBALAJE DE UN PRODUCTO ESPECÍFICO, NEOGEN RENUNCIA A TODAS LAS GARANTÍAS EXPRESAS Y TÁCITAS INCLUIDA, ENTRE OTRAS, CUALQUIER GARANTÍA DE COMERCIABILIDAD O IDONEIDAD PARA UN USO EN PARTICULAR. Si un producto de Neogen Food Safety es defectuoso, Neogen o su distribuidor autorizado reemplazará el producto o reembolsará el precio de compra del producto, a su elección. Estos son sus recursos exclusivos. Deberá notificar inmediatamente a Neogen en un lapso de sesenta días a partir del descubrimiento de cualquier sospecha de defecto en un producto y devolver dicho producto a Neogen. Póngase en contacto con su representante de Neogen o distribuidor autorizado de Neogen si tuviera cualquier otra pregunta.

Limitación de responsabilidad de Neogen

NEOGEN NO SERÁ RESPONSABLE DE NINGUNA PÉRDIDA O DAÑO, YA SEA DIRECTO, INDIRECTO, ESPECIAL, DAÑOS ACCIDENTALES O CONSECUENCIAS, INCLUIDOS ENTRE OTROS, LA PÉRDIDA DE BENEFICIOS. En ningún caso la responsabilidad de Neogen conforme a ninguna teoría legal excederá el precio de compra del producto supuestamente defectuoso.

Almacenamiento y desecho

Almacene el Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*) a 2 °C-8 °C (35 °F-47 °F). No lo congele. Durante el almacenamiento, mantenga el kit fuera del alcance de la luz. Después de abrir el kit, verifique que la bolsa de aluminio no esté dañada. Si la bolsa está dañada, no use el producto. Después de abrir el embalaje, los tubos de reactivo no utilizados se deberán guardar siempre en la bolsa resellable junto con el desecante para conservar la estabilidad de los reactivos liofilizados. Almacene las bolsas reselladas a 2 °C-8 °C (35 °F-47 °F) durante no más de 90 días.

No utilice el Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*) después de su fecha de vencimiento. La fecha de vencimiento y el número de lote están impresos en la etiqueta externa de la caja. Después de usarlo, el medio de enriquecimiento y los tubos del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*) podrían contener material patógenos. Una vez terminada la prueba, proceda de acuerdo con los estándares actuales de la industria para el desecho de residuos contaminados. Consulte la Hoja de Datos de Seguridad para obtener más información y conocer las normativas locales para el desecho de materiales.

Instrucciones de uso

Siga todas las instrucciones atentamente. De lo contrario, los resultados obtenidos podrían llegar a ser incorrectos.

Descontamine periódicamente las mesas y el equipo de laboratorio (pipetas, herramientas para tapar/destapar, etc.) con una solución de cloro de uso doméstico del 1 % al 5 % (v:v en agua) o en una solución para eliminación de DNA.

El usuario debe completar la capacitación de calificación del operador (OQ) del Sistema de Detección Molecular Neogen según se describe en el documento "Protocolos de Calificación para la Instalación (IQ)/Calificación Operativa (OQ) e Instrucciones para el Sistema de Detección Molecular Neogen"⁽⁷⁾.

Consulte la sección “Instrucciones específicas para métodos validados” para obtener requisitos específicos. Tabla 3 para los protocolos de enriquecimiento según el *Performance Tested Method*SM (PTM) N.º de certificado 071902.

Enriquecimiento de la muestra

En las Tablas 2 y 3 se presenta una guía para los protocolos de enriquecimiento generales para alimentos.

Es responsabilidad del usuario validar protocolos de muestreo o proporciones de dilución alternativos para garantizar que este método de prueba satisface los criterios del usuario.

Alimentos

1. Permita que el medio de enriquecimiento de BPW ISO se equilibre a 41,5 °C ± 1 °C.
2. Combine el medio de enriquecimiento y la muestra de forma aséptica. Para todas las muestras con alto contenido de partículas y carne, se recomienda utilizar bolsas con filtro.
3. Mezcle todas las matrices e incúbelas como se resume en la tabla del protocolo correspondiente (consulte la Tabla 2 o la Tabla 3).

Muestras ambientales

ADVERTENCIA: Si decidiera usar una solución amortiguadora neutralizante que contenga el complejo aril sulfonato como solución hidratante para la esponja, deberá preparar una dilución 1:2 (1 parte de muestra en 1 parte de caldo de enriquecimiento estéril) de la muestra ambiental enriquecida antes de realizar la prueba para reducir los riesgos asociados con un resultado falso negativo que provoque la liberación del producto contaminado. Otra opción es transferir 10 µL de la muestra de la solución amortiguadora neutralizante enriquecida a los tubos de Solución de Lisis Neogen.

Es responsabilidad del usuario validar protocolos de muestreo o proporciones de dilución alternativos para garantizar que este método de prueba satisface los criterios del usuario.

Tabla 2. Protocolos Generales de Enriquecimiento.

Matriz de la muestra	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento (mL) (precalentado)	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Volumen de análisis de la muestra (µL)
Carne de res molida cruda, trozos y recortes ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO	41,5	10-18	20
Carne cruda (cerdo, carne de ave, cordero, bisonte) ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO	41,5	10-18	20
vegetales de hoja ^(b)	200 g	450 BPW-ISO	41,5	18-24	20
germinados ^(c)	25 g	225 BPW-ISO	41,5	18-24	20
productos lácteos crudos ^(d)	25 g o 25 mL	225 BPW-ISO	41,5	18-24	20

^(a) Masajee con las manos las muestras de carne de res (carne de res molida, trozos y recortes) y de carne cruda (cerdo molido, carne de ave y carne que no sea de res) entre 30 y 60 segundos para dispersar y desintegrar los grumos después de agregar BPW-ISO precalentada.

^(b) En el caso de las vegetales de hoja, enjuague el caldo de enriquecimiento (BPW-ISO precalentada) sobre las hojas y agite suavemente entre 30 y 60 segundos. No masajee ni homogeneice las hojas.

^(c) En el caso de los germinados, enjuague el caldo de enriquecimiento (BPW-ISO precalentada) sobre los germinados entre 30 y 60 segundos sin masajear ni homogeneizar.

^(d) Homogeneice las muestras de productos lácteos crudos entre 30 y 60 segundos después de agregar BPW-ISO precalentada.

Instrucciones específicas para métodos validados
AOAC® Performance Tested MethodSM (PTM) N.º de certificado 071902



En los estudios de AOAC Research Institute PTMSM, se halló que el Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*) es un método efectivo para la detección de STEC. Las matrices evaluadas en el estudio se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Protocolos de enriquecimiento según AOAC PTMSM N.º de certificado 071902.

Matriz de la muestra	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento (mL)	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Volumen de análisis de la muestra (µL)
Recorte de carne de res cruda ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (precalentada)	41,5	10-18	20
Carne de res molida cruda ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (precalentada)	41,5	10-18	20
Carne de res molida cruda ^(a)	25 g	225 BPW-ISO (precalentada)	41,5	10-18	20
Carne de cerdo molida cruda ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (precalentada)	41,5	10-18	20
Piezas crudas de carne de ave ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (precalentada)	41,5	10-18	20
Pollo dividido mecánicamente	25 g	225 BPW-ISO (precalentado)	41,5	10-24	20
Espinacas ^(b)	200 g	450 BPW-ISO (precalentada)	41,5	18-24	20
germinados ^(c)	25 g	225 BPW-ISO (precalentada)	41,5	18-24	20
Flor de cannabis seca, planta de cannabis seca ^(d)	10 g	90 BPW-ISO	41,5	28-32	20

^(a) En el caso de las muestras de carne de res (carne de res molida y recortes), agregue BPW-ISO precalentada a la muestra de carne de res. Masajee con las manos entre 30 y 60 segundos para dispersar y desintegrar los grumos.

^(b) En el caso de las espinacas, agregue BPW-ISO precalentada a la matriz. Enjuague el líquido sobre las hojas y agite suavemente entre 30 y 60 segundos. No masajee ni homogeneice las hojas.

^(c) En el caso de los germinados, enjuague el caldo de enriquecimiento (BPW-ISO precalentada) sobre los germinados entre 30 y 60 segundos sin masajear ni homogeneizar.

^(d) Flor de cannabis seca (>0.3 % THC) y planta de cannabis seca (≤0.3 % THC)

Preparación de la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen®

1. Humedezca un paño o una toalla desechable con una solución de cloro de uso doméstico del 1 % al 5 % (v:v en agua) y limpie la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen.
2. Enjuague la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen con agua.
3. Utilice una toalla desechable para secar la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen.
4. Antes de utilizarla, asegúrese de que la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen esté seca.

Preparación del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen®

Coloque la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen directamente sobre la mesa de laboratorio: No se usa la Bandeja para el Bloque de Frío del Sistema de Detección Molecular Neogen. Use el bloque a temperatura ambiente del laboratorio (20 °C-25 °C).

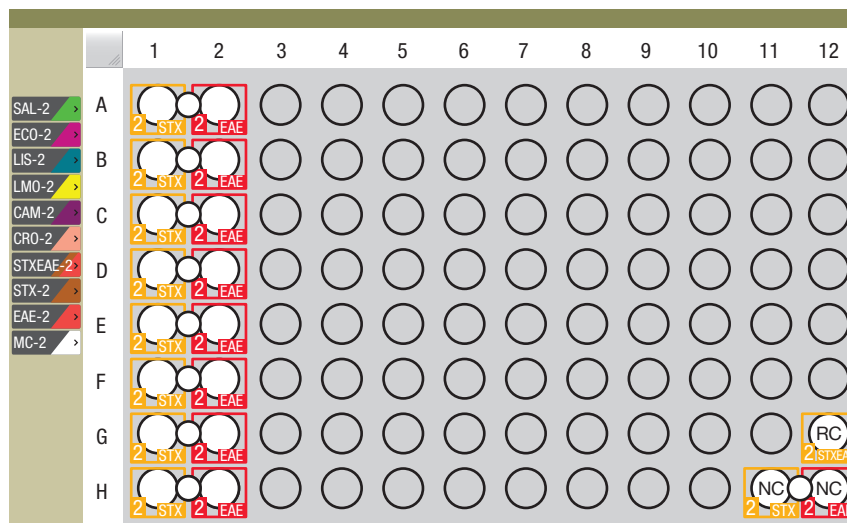
Preparación del Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen®

Coloque el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen en una unidad o plancha de calentamiento seca. Encienda la unidad de calentamiento de bloques seca y ajuste la temperatura para permitir que el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen alcance y mantenga una temperatura de 100 °C ± 1 °C.

NOTA: Según la unidad de calentamiento, espere aproximadamente 30 minutos para que el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen alcance la temperatura deseada. Con un termómetro calibrado apropiado (p. ej., un termómetro de inmersión parcial o un termómetro digital termopar, no un termómetro de inmersión total) colocado en la ubicación designada, verifique que el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen se encuentre a 100 °C ± 1 °C.

Preparación del Equipo de Detección Molecular Neogen®

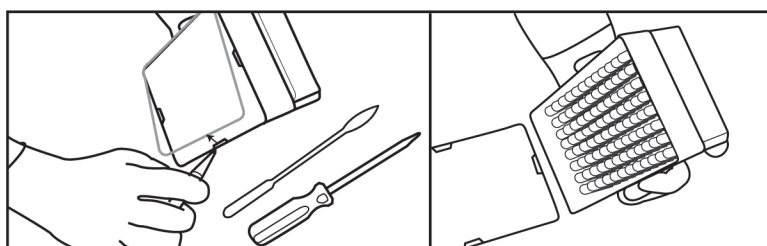
1. Inicie el software del Sistema de Detección Molecular Neogen e inicie sesión. Contacte a su representante de Neogen Food Safety para asegurarse de que tiene la última versión del software.
2. Encienda el Equipo de Detección Molecular Neogen.
3. Cree o edite un ensayo con datos para cada muestra. Para obtener detalles, consulte el Manual del Usuario del Sistema de Detección Molecular Neogen.
 - 3.1. La selección del ícono STXEAE-2 en el software selecciona dos pozos contiguos (como A1, A2, B1, B2, etc.), uno para el tubo de reactivo de eae y el otro para stx, puesto que cada muestra se hace con dos ensayos. El NC se configura para cada tubo de reactivo y un RC se configura para el kit.



NOTA: El Equipo de Detección Molecular Neogen debe alcanzar el estado de Listo antes de insertar la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen con los tubos de reacción. Este paso de calentamiento lleva unos 20 minutos y aparece indicado por una luz NARANJA en la barra de estado del equipo. Una vez que el equipo esté listo para iniciar un ensayo, la barra de estado se cambiará a color VERDE.

Lisis

Retire la parte inferior de la Gradilla para Solución de Lisis de Neogen con un destornillador o una espátula antes de colocarla en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen.

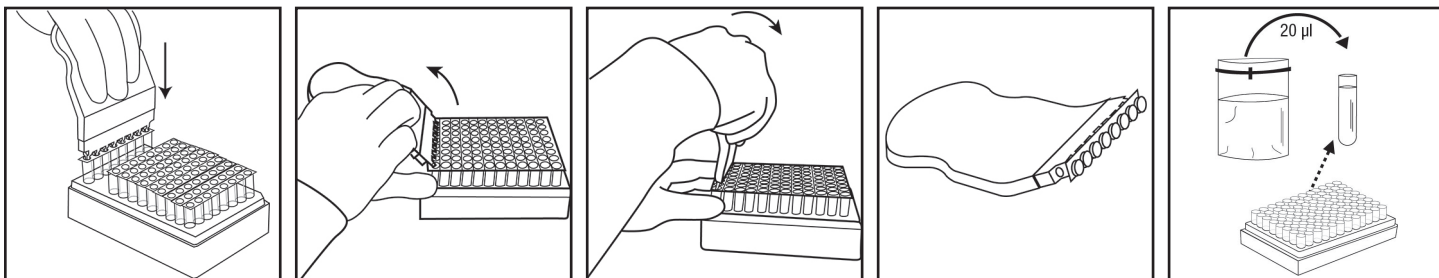




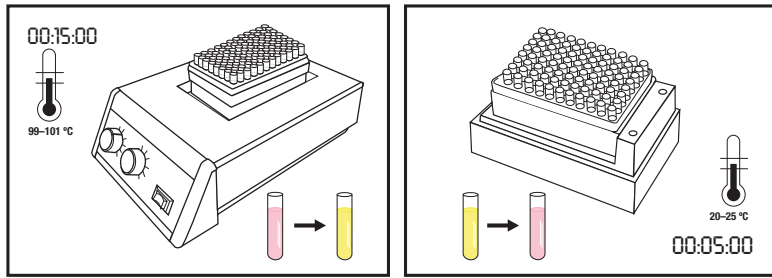
1. Permita que los tubos de Solución de Lisis Neogen se calienten colocando la gradilla a temperatura ambiente (20 °C-25 °C) durante la noche (16-18 horas). Las alternativas para que los tubos de Solución de Lisis Neogen alcancen temperatura ambiente son colocar los tubos de Solución de Lisis Neogen sobre la mesa de laboratorio durante por lo menos 2 horas, incubar los tubos de Solución de Lisis Neogen en una incubadora a 37 °C ± 1 °C durante 1 hora o colocarlos en una unidad de calentamiento de dos bloques seca durante 30 segundos a 100 °C.
2. Invierta los tubos tapados para mezclarlos. Proceda con el paso siguiente dentro de las 4 horas después de la inversión.
3. Retire la muestra enriquecida de la incubadora.
4. Se requiere un tubo de Solución de Lisis Neogen para cada muestra y el NC (medio de enriquecimiento estéril).
 - 4.1. Las tiras de tubos de Solución de Lisis Neogen pueden cortarse para obtener la cantidad deseada de tubos. Seleccione la cantidad de tubos o de tiras de 8 tubos necesarias. Coloque los tubos de Solución de Lisis Neogen en una gradilla vacía.
 - 4.2. Para evitar la contaminación cruzada, destape una tira de tubo de Solución de Lisis Neogen por vez y use una nueva punta de pipeta para cada paso de transferencia.
 - 4.3. Transfiera la muestra enriquecida a los tubos de Solución de Lisis Neogen como se describe a continuación:

Transfiera cada muestra enriquecida a un tubo de Solución de Lisis Neogen individual **primero**. Transfiera el NC **al final**.

- 4.4. Utilice la Herramienta para tapar/destapar del Sistema de Detección Molecular – Lisis 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 Solución de Lisis Neogen; si se conservará el lisado para una repetición de prueba, coloque las tapas en un envase limpio para su reapiación luego de la lisis.
 - 4.5.1. Para procesar el lisado conservado, consulte el Apéndice A.
- 4.6. Transfiera 20 µL de muestra a un tubo de Solución de Lisis Neogen.

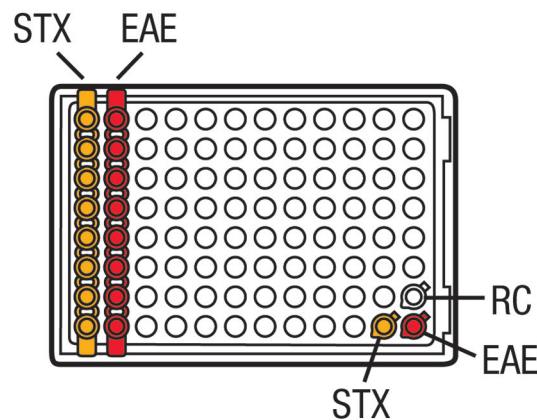


5. Repita los pasos 4.4 a 4.6 según sea necesario para la cantidad de muestras que se deben analizar.
6. Cuando se hayan transferido todas las muestras, transfiera 20 µL del NC (medio de enriquecimiento estéril, p. ej., BPW) a un tubo de Solución de Lisis Neogen. No use agua como un NC.
7. Verifique que la temperatura del Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen sea de 100 °C ± 1 °C.
8. Coloque la gradilla descubierta de tubos de Solución de Lisis Neogen en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen y caliente durante 15 ± 1 minutos. Durante el calentamiento, la Solución de Lisis Neogen cambiará de rosado (frío) a amarillo (caliente).
 - 8.1. Las muestras que no se hayan tratado debidamente con calor durante el paso de lisis del ensayo pueden considerarse un posible riesgo biológico y NO deben introducirse en el Equipo de Detección Molecular Neogen.
9. Retire la gradilla descubierta de tubos de Solución de Lisis Neogen del Bloque de Calor para la Detección Molecular Neogen y deje que se enfríe en la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen al menos durante 5 minutos y por un máximo de 10 minutos. Cuando se usa la Inserción del Bloque de Frío del Sistema de Detección Molecular Neogen a temperatura ambiente sin la Bandeja para el Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen®, debe colocarse directamente sobre la mesa de laboratorio. Cuando esté frío, la Solución de Lisis Neogen se revertirá a un color rosado.
10. Retire la gradilla de tubos de Solución de Lisis Neogen de la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen.



Amplificación

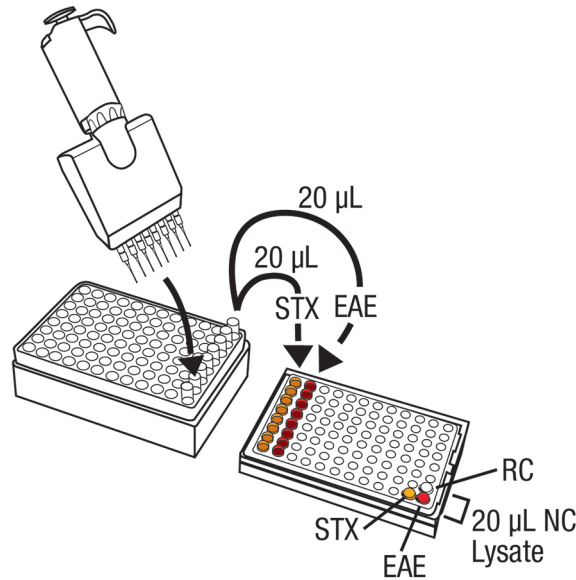
1. Para cada muestra y el NC, se requiere un tubo de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*eae*) y uno del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*).
 - 1.1. Las tiras de tubos pueden cortarse para obtener la cantidad deseada de tubos. Seleccione la cantidad de tubos de reactivos individuales del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*eae*) y del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) o las tiras de 8 tubos que se necesitan.
 - 1.2. Coloque los tubos del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) en una gradilla vacía en una columna.
 - 1.3. Coloque los tubos del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*eae*) en la columna derecha contigua.
 - 1.4. Evite mover las perlas de reactivo en el fondo de los tubos.
2. Seleccione un tubo de Control de Reactivos Neogen y colóquelo en la gradilla.
3. Para el lisado NC, seleccione un tubo de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) y un tubo de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*eae*) y colóquelos en la gradilla.



4. Para evitar la contaminación cruzada, destape una tira de tubos de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* o *eae*) por vez y utilice una nueva punta de pipeta para cada paso de transferencia.
5. Transfiera cada uno de los lisados a un tubo de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* o *eae*) como se describe a continuación.
 - 5.1. Primero, transfiera cada uno de los lisados de muestra a un tubo de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) como se describe en los pasos 5.5 y en 5.6.
 - 5.2. Segundo, transfiera cada uno de los mismos lisados de muestra a un tubo de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*eae*) en la columna derecha contigua como se describe en los pasos 5.5 y en 5.6.

NOTA: Use una nueva punta de pipeta para cada transferencia. No utilice la misma punta de pipeta para transferir al tubo de reactivo de *stx* y *eae* desde la misma muestra de lisado.

- 5.3. Después de transferir todo el lisado de muestra, agregue el lisado NC a cada uno de los tubos de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) y del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*eae*).
- 5.4. Transfiera el lisado NC al final al tubo de control de reactivos.



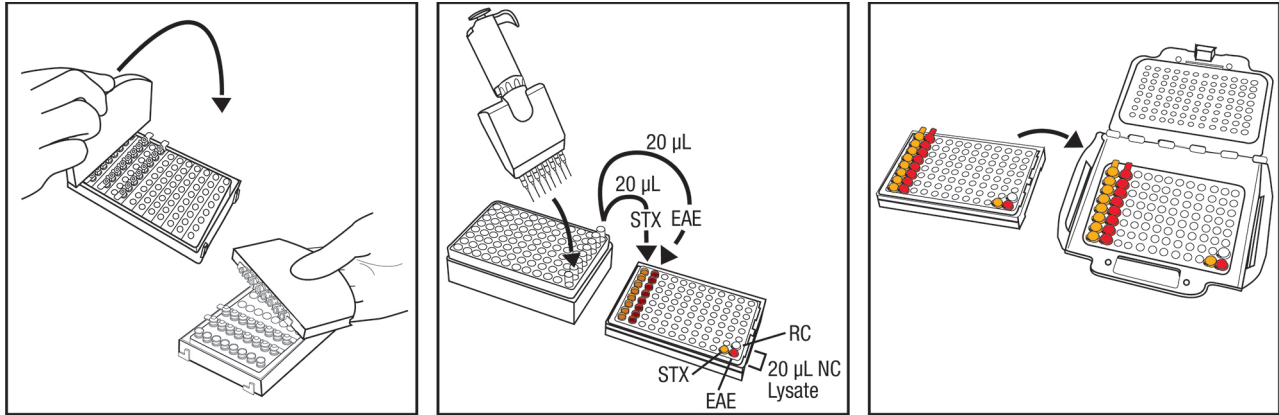
- 5.5. Utilice la Herramienta para tapar/destapar del Neogen® Sistema de Detección Molecular – Reactivo para destapar los tubos de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* o *eae*), una tira por vez. Deseche la tapa.
- 5.6. **Transfiera 20 µL del lisado de muestra de la ½ superior del líquido (evite el precipitado) en el tubo de Solución de Lisis Neogen al tubo de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* o *eae*) correspondiente. Aplique en un ángulo que permita evitar que se muevan los gránulos. Mezcle pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.**

NOTA: Use una nueva punta de pipeta para cada transferencia. No utilice la misma punta de pipeta para transferir al tubo de reactivo de *stx* y *eae* desde la misma muestra de lisado.

- 5.7. Repita el paso 5.6 hasta que se haya agregado el lisado de muestra individual a un tubo de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* o *eae*) correspondiente en la tira.
- 5.8. Cubra los tubos de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* o *eae*) con las tapas adicionales provistas y utilice el lado redondeado de la Herramienta para tapar/destapar del Neogen Sistema de Detección Molecular – Reactivo para aplicar presión con un movimiento hacia adelante y hacia atrás para asegurarse de que la tapa quede bien ajustada.
- 5.9. Repita los pasos 5.6 a 5.8 según sea necesario para la cantidad de muestras que se analizarán para ambos tubos de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*).
- 5.10. Cuando se hayan transferido todos los lisados de muestra, repita los pasos 5.6 a 5.8 para transferir 20 µL del lisado NC a cada uno de los tubos de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) y del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*eae*).
- 5.11. Transfiera **20 µL del lisado NC a un tubo de Control de Reactivos Neogen**. Aplique en un ángulo que permita evitar que se muevan los gránulos. Mezcle pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.

Transfiera cada lisado de muestra a un tubo de reactivo individual del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* o *eae*) primero, seguido por el NC. Hidrate el tubo de Control de Reactivos Neogen al final.

6. Cargue los tubos tapados en una Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen limpia y descontaminada. Luego cierre la tapa.



7. Revise y confirme la corrida configurada en el software del Sistema de Detección Molecular Neogen.
8. Haga clic en el botón de inicio del software y seleccione el equipo que usará. La tapa del equipo seleccionado se abrirá automáticamente.
9. Coloque la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen en el Equipo de Detección Molecular Neogen y cierre la tapa para comenzar con el ensayo. Obtendrá los resultados al cabo de 60 minutos, aunque los positivos pueden detectarse antes.
10. Después de completar el ensayo, retire la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen del Equipo de Detección Molecular Neogen y deseche los tubos sumergiéndolos en una solución de cloro de uso doméstico del 1 % al 5 % (v:v en agua) durante 1 hora y lejos del área en que se prepara el ensayo.

















ATENCIÓN: Para minimizar el riesgo de falsos positivos a causa de contaminación cruzada, nunca abra tubos de reactivo que contengan DNA amplificado. Esto incluye los tubos de Control de Matriz Neogen, el Control de Reactivos Neogen y el reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx* y *eae*). Siempre deseche los tubos de reactivo sellados sumergiéndolos en una solución de cloro de uso doméstico al 1 % a 5 % (v:v en agua) durante 1 hora y lejos del área en que se prepara el análisis.

Resultados e interpretación







Un algoritmo interpreta la curva de producción de luz que se obtiene de la detección de ácido nucleico amplificado. El software analiza automáticamente los resultados y los expresa en color según el resultado. Los resultados Positivo o Negativo se determinan mediante el análisis de una cantidad de parámetros característicos de la curva. Los resultados presuntivos positivos se informan en tiempo real, mientras que los resultados Negativo e Inspeccionar se muestran una vez terminado el análisis.

El software del Sistema de Detección Molecular Neogen informa los resultados por separado para cada uno de los ensayos (*stx* y *eae*) y utiliza los resultados de ambos ensayos para llamar a la muestra positiva o negativa de STEC (EHEC) (consulte la Figura que aparece a continuación). Para un presunto positivo de STEC (EHEC), ambos objetivos genéticos (*stx1* y/o *stx2* y *eae*) deben ser positivos. **Si alguno de los ensayos individuales indica un error o que se debe inspeccionar, el resultado final será error o inspeccionar. Repita la prueba para obtener el resultado final debido** (consulte las claves de resultados). El software también permite configurar ensayos individuales si es necesario y el lisado de muestra o el lisado fresco del enriquecimiento pueden volver a analizarse con los ensayos siguiendo los pasos que se resumen en el Apéndice A para los lisados conservados y los pasos en la sección Lisis y Amplificación para el enriquecimiento conservado.

Claves de resultados del lisado de muestra enriquecido

	Ambos positivos, resultado final positivo
	stx positivo, eae negativo, resultado final negativo
	stx positivo, eae inspeccionar, resultado final inspeccionar, repita la prueba
	stx positivo, eae error, resultado final error, repita la prueba
	stx negativo, eae positivo, resultado final negativo
	stx negativo, eae negativo, resultado final negativo
	stx negativo, eae inspeccionar, resultado final inspeccionar, repita la prueba
	stx negativo, eae error, resultado final error, repita la prueba
	stx inspeccionar, eae positivo, resultado final inspeccionar, repita la prueba
	stx inspeccionar, eae negativo, resultado final inspeccionar, repita la prueba
	stx inspeccionar, eae inspeccionar, resultado final inspeccionar, repita la prueba
	stx inspeccionar, eae error, resultado final error, repita la prueba
	stx error, eae positivo, resultado final error, repita la prueba
	stx error, eae negativo, resultado final error, repita la prueba
	stx error, eae inspeccionar, resultado final error, repita la prueba
	stx error, eae error, resultado final error, repita la prueba

Claves del control negativo






	Válido para ambos, enlace válido
	Válido para uno, error en el otro, error de enlace, repita la prueba
	Válido para uno, el otro inválido, enlace inválido, repita la prueba
	Error en ambos, error de enlace, repita la prueba
	Ambos inválidos, enlace inválido, repita la prueba
	Error en uno, el otro inválido, error de enlace, repita la prueba

Las muestras presuntamente positivas deben confirmarse de acuerdo con los procedimientos operativos estándar del laboratorio o mediante la confirmación del método de referencia apropiado^(1, 2, 3), comenzando con la transferencia del caldo de enriquecimiento primario a las placas selectivas y la confirmación de aislados usando los métodos serológicos y bioquímicos apropiados. En el caso de las matrices especificadas por el MLG 5C, la separación inmunomagnética (IMS) debe hacerse antes de preparar las placas en un medio selectivo.

NOTA: Incluso una muestra negativa no arrojará una lectura de cero ya que los reactivos de amplificación del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (stx y eae) y el sistema tienen una lectura de unidades relativas de luz de fondo (RLU).

En el raro caso de que se emita una señal de luz inusual, el algoritmo lo indicará como “Inspeccionar”. Neogen recomienda al usuario repetir el ensayo para aquellas muestras etiquetadas como Inspeccionar. Si el resultado sigue siendo Inspeccionar, proceda con la prueba de confirmación usando su método preferido^(1, 2, 3) o según se especifique en las regulaciones locales.

Tabla 4. Símbolos e información para diversos resultados del software.

Tipo de pozo	Símbolo del resultado del pozo	Resultado	Interpretación
Muestra		Positiva	La muestra es presuntamente positiva para el patógeno objetivo.
Muestra		Negativa	La muestra es negativa para el patógeno objetivo.
Muestra		Inhibida	La matriz de la muestra fue inhibidora para el ensayo. Es posible que se requiera una repetición de la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de solución de problemas y las instrucciones del producto del kit de ensayo.
Muestra		Inspeccionar	No se pudo determinar la presencia o ausencia del patógeno objetivo. Es posible que se requiera una repetición de la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de solución de problemas y las instrucciones del producto del kit de ensayo.
Muestra		Error	No se detectó bioluminiscencia. Es posible que se requiera una repetición de la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de solución de problemas y las instrucciones del producto del kit de ensayo.

Apéndice A. Interrupción por protocolo: Almacenamiento y nuevo análisis de las muestras

1. Para almacenar un lisado tratado con calor, vuelva a tapar el tubo de Solución de Lisis Neogen con una tapa limpia (consulte la sección 4.5, Lisis).
2. Para almacenar una muestra enriquecida, incube durante 18 horas como mínimo antes de almacenar.
3. Almacene entre 4 °C y 8 °C por hasta 72 horas.
4. Prepare una muestra almacenada para amplificación invirtiéndola 2 a 3 veces para mezclar.
5. Destape los tubos.
6. Coloque los tubos de lisado mezclados en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen y caliéntelos a 100 °C ± 1 °C durante 5 ± 1 minutos.
7. Retire la gradilla descubierta de tubos de Solución de Lisis Neogen del Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen y deje que se enfríe en la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen al menos durante 5 minutos y por un máximo de 10 minutos.
8. Siga el protocolo en la sección Amplificación que se detalla arriba.

Referencias:

1. Microbiology Laboratory Guidebook. U. S. Department of Agriculture (USDA) Food Safety and Inspection Service (FSIS) Microbiology Laboratory guidebook 5C.00. Detection and isolation of top seven Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STECs) from meat products and carcass and environmental sponges. Feb 4, 2019.
2. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. October 2018.
3. ISO/TS 13136:2012: Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups
4. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good laboratory practice for nonclinical laboratory studies.
5. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
6. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examination.
7. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. Contacte a su representante de Neogen Food Safety para obtener una copia de este documento.

Explicación de los símbolos

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar 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 Leshar Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00918A

Instruções do produto

Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*)

Descrição e uso recomendado do produto

O Neogen® Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*) é utilizado com o Neogen® Sistema de Detecção Molecular para a detecção rápida e específica dos genes de toxina de shiga (*stx1* e/ou *stx2*) e gene intimina (*eae*) da *E. coli* produtora de toxina de shiga (STEC, também conhecida como “*E. coli* produtora de verocitotoxina”) em alimentos enriquecidos e amostras ambientais de processos de alimentos. O termo STEC refere-se aos patótipos de *E. coli* capazes de produzir a toxina de shiga do tipo 1 (Stx1), tipo 2 (Stx2), ou ambos, codificada pelos genes *stx1* e *stx2*, respectivamente. STEC contendo genes de virulência para *stx1* e/ou *stx2* e *eae* (gene intimina envolvido na fixação e apagamento do fenótipo) são *E. coli* entero-hemorrágicas designadas (EHEC). O kit de triagem contém dois tubos de reagentes separados, um para detectar genes de virulência *stx1* e/ou *stx2* e outro para detectar *eae* de STEC (EHEC). O software do Neogen® Sistema de Detecção Molecular relata resultados separadamente para cada um dos ensaios e usa os resultados de ambos para chamar a amostra de positiva ou negativa para STEC (EHEC). Para uma positiva presuntiva de STEC (EHEC), ambos os alvos genéticos (*stx1* e/ou *stx2* e *eae*) devem ser positivos. O ensaio de *stx* não diferencia entre *stx1* e *stx2*, mas detecta a presença de *stx1* e/ou *stx2*.

O Neogen Ensaio de Detecção Molecular utiliza amplificação isotérmica mediada por alça 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. Os resultados positivos presuntivos devem ser confirmados por meio de seu método de preferência^(1,2,3) ou conforme especificado pelos regulamentos locais.

O Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*) destina-se ao uso em ambiente laboratorial por profissionais treinados em técnicas laboratoriais. A Neogen não documentou o uso deste produto em outros setores que não o de alimentos e bebidas. Por exemplo, a Neogen não documentou este produto para testar amostras farmacêuticas, de cosméticos, clínicas ou veterinárias. O Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*) não foi avaliado com todos os possíveis produtos e/ou processos alimentícios e protocolos de teste, tampouco com todas as estirpes de bactérias possíveis.

Assim como em 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, preparação de amostras, manuseio e técnica de laboratório também podem influenciar os resultados. A Neogen recomenda a avaliação do método, incluindo meio de enriquecimento no ambiente do usuário, usando um número suficiente de amostras com alimentos específicos e desafios microbianos para garantir que o método atenda aos critérios do usuário.

A Neogen avaliou o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*) com água peptonada tamponada (BPW ISO) como caldo de enriquecimento.

O Neogen® Equipamento de Detecção Molecular destina-se ao uso com amostras que passaram por tratamento térmico durante a etapa de lise do ensaio, projetado para destruir organismos presentes na amostra. Amostras que não foram tratadas com aquecimento de forma adequada durante a etapa de lise do ensaio podem ser consideradas um risco biológico potencial e NÃO devem ser inseridas no Neogen Equipamento de Detecção Molecular.

A Neogen Food Safety é certificada pela Organização Internacional de Normalização (ISO) 9001 para projeto e fabricação.

O kit de testes do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*) contém 48 testes de cada um dos reagentes *stx* e *eae*, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes do kit Neogen Ensaio para Detecção Molecular.

Item	Identificação	Quantidade	Conteúdo	Comentários
Neogen® Solução de Lise (LS)	Solução rosa em tubos transparentes	96 (12 tiras de 8 tubos)	580 µL de LS por tubo	Armazenados no rack e prontos para o uso
Tubos de reagentes do Neogen® Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (<i>stx</i>)	Tubos laranjas	48 (2 embalagens com 3 tiras de 8 tubos)	Mistura de detecção e amplificação específica liofilizada	Pronto para uso
Tubos de reagentes do Neogen® Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (<i>eae</i>)	Tubos vermelhos	48 (2 embalagens com 3 tiras de 8 tubos)	Mistura de detecção e amplificação específica liofilizada	Pronto para uso
Tampas adicionais	Tampas laranjas	96 (12 tiras de 8 tampas)		Pronto para uso
Tampas adicionais	Tampas vermelhas	96 (12 tiras de 8 tampas)		Pronto para uso
Neogen® Controle de Reagentes (RC)	Tubos transparentes com tampa articulada	16 (2 embalagens de 8 tubos individuais)	Mistura de DNA de controle, amplificação e detecção liofilizada	Pronto para uso

O Controle Negativo (NC), não fornecido no kit, é um meio de enriquecimento estéril, por exemplo, BPW ISO. Não use água como um NC.

Um guia de início rápido está disponível em www.neogen.com

Segurança

O usuário deve ler, entender e seguir todas as informações de segurança contidas nas instruções do Neogen Sistema de Detecção Molecular e do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*). Guarde as instruções sobre segurança para consulta posterior.

⚠️ ADVERTÊNCIA: indica uma situação de perigo que, se não evitada, pode resultar em morte ou ferimentos graves e/ou danos materiais.

AVISO: indica uma situação potencialmente perigosa que, se não evitada, pode resultar em danos materiais.

⚠️ ADVERTÊNCIA

Não use o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*) no diagnóstico de problemas de saúde em humanos ou animais.

O usuário deve treinar sua equipe com técnicas de testes atuais apropriadas: por exemplo, Boas Práticas de Laboratório⁽⁴⁾, ISO/IEC 17025⁽⁵⁾ ou ISO 7218⁽⁶⁾.

Para reduzir os riscos associados a um resultado falso-negativo levando à liberação do produto contaminado:

- Siga o protocolo e realize os testes exatamente conforme especificado nas instruções do produto.
- Armazene o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*) conforme indicado na embalagem e nas instruções do produto.
- Utilize sempre o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*) antes do vencimento.
- Utilize o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*) para amostras alimentares e ambientais que tenham sido validadas internamente ou por um terceiro.
- Utilize o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*) somente com superfícies, desinfetantes, protocolos e estirpes de bactérias que tenham sido validados internamente ou por um terceiro.



- Para uma amostra ambiental que contém um tampão neutralizante com complexo de sulfonato de arila, faça uma diluição de 1:2 antes de testar (1 parte da amostra em 1 parte do caldo de enriquecimento estéril). Outra opção é transferir 10 µL do enriquecimento do tampão neutralizante para os tubos de Neogen Solução de Lise. Produtos Neogen® Sample Handling que incluem tampão neutralizante com complexo de sulfonato de arila: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G e HS2410NB2G.

Para reduzir os riscos de exposição a produtos químicos e agentes biológicos nocivos:

- Execute testes de agentes patogênicos em um laboratório adequadamente equipado, sob o controle de pessoal bem treinado. O meio de enriquecimento incubado e equipamentos ou superfícies que tenham entrado em contato com o meio de enriquecimento incubado podem conter patógenos em níveis suficientes para apresentar riscos à saúde humana.
- Sempre adote as práticas de segurança padrão em laboratórios, como usar trajes de proteção adequados e óculos de proteção ao manipular reagentes e amostras contaminadas.
- Evite o contato com o conteúdo do meio de enriquecimento e dos tubos de reagentes após a amplificação.
- Descarte amostras enriquecidas de acordo com os regulamentos padrão locais/regionais/nacionais vigentes da indústria.
- Amostras que não foram tratadas com aquecimento de forma adequada durante a etapa de lise do ensaio podem ser consideradas um risco biológico potencial e NÃO devem ser inseridas no Neogen Equipamento de Detecção Molecular.

Para reduzir os riscos de contaminação cruzada ao preparar o ensaio:

- Sempre use luvas (para proteger o usuário e evitar a introdução de nucleases).

Para reduzir os riscos de exposição a líquidos quentes:

- Não exceda a temperatura recomendada ao ajustar o aquecedor.
- Não exceda o tempo de aquecimento recomendado.
- Utilize um termômetro calibrado adequado para verificar a temperatura do Neogen® Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular (por exemplo, um termômetro de imersão parcial ou termômetro termopar digital, e não um termômetro de imersão total). O termômetro deve ser colocado no local indicado do Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular.

AVISO**Para reduzir os riscos de contaminação cruzada ao preparar o ensaio:**

- Troque de luvas antes da hidratação do pellet dos reagentes.
- Recomenda-se o uso de ponteiros de pipeta estéreis, com barreira aerossol (filtros) e nível de biologia molecular.
- Utilize uma nova ponteira de pipeta para cada transferência de amostra.
- Utilize Boas Práticas Laboratoriais para transferir a amostra do meio de enriquecimento para o tubo de lise. Para evitar a contaminação da pipeta, o usuário pode decidir adicionar uma etapa de transferência intermediária. Por exemplo, o usuário pode transferir cada amostra enriquecida para um tubo estéril.
- Utilize uma estação de trabalho de biologia molecular contendo lâmpada germicida sempre que possível.
- Periodicamente, descontamine as bancadas e os equipamentos do laboratório (pipetas, ferramentas de tampar/destampar etc.) com uma solução de 1–5% (v:v em água) de água sanitária ou solução de remoção de DNA.

Para reduzir os riscos de um resultado falso-positivo:

- Nunca abra tubos de reagentes após a amplificação.
- Sempre descarte os tubos contaminados mergulhando-os em uma solução de água sanitária de 1–5% (v:v em água) por 1 hora, longe da área de preparação de ensaio.
- Nunca submeta os tubos de reagentes a autoclave após a amplificação.

Consulte a Planilha de Dados de Segurança para obter informações adicionais e informações sobre os regulamentos locais para descarte.

Em caso de dúvidas sobre aplicações ou procedimentos específicos, acesse nosso site www.neogen.com ou entre em contato com o seu representante ou distribuidor local Neogen.

Responsabilidade do usuário

Os usuários são responsáveis por se familiarizar com as informações e instruções do produto. Visite nosso site www.neogen.com ou entre em contato com o representante ou distribuidor Neogen local para obter mais informações.

Ao selecionar um método de teste, é importante considerar que fatores externos, como métodos de amostragem, protocolos de teste, preparo de amostras, manipulação, a técnica de laboratório utilizada e a própria amostra, podem influenciar nos resultados.

É de responsabilidade do usuário, ao selecionar qualquer método de teste ou produto, avaliar um número suficiente de amostras com as matrizes e testes microbiológicos que permitam assegurar que o método escolhido atenda aos critérios por ele estabelecidos.

Também é de responsabilidade do usuário determinar se o método de teste e os resultados atendem às exigências de seus clientes e fornecedores.

Como em qualquer outro método de teste, os resultados obtidos com qualquer produto da Neogen Food Safety não constituem garantia de qualidade das matrizes ou processos com eles testados.

Para ajudar os clientes a avaliar o método para diversas matrizes de alimentos, a Neogen desenvolveu o kit Neogen® Controle de Matriz para Detecção Molecular. Quando necessário, utilize o Neogen Controle de Matriz para Detecção Molecular (MC) para determinar se a matriz tem a capacidade de influenciar nos resultados do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*). Teste diversas amostras representativas da matriz, isto é, amostras obtidas a partir de diferentes origens, durante qualquer período de validação quando adotar o método da Neogen, quando testar matrizes novas ou desconhecidas ou matrizes que tiverem passado por mudanças de processo ou matéria-prima.

Uma matriz pode ser definida como um tipo de produto com propriedades intrínsecas, tais como composição e processamento. As diferenças entre matrizes podem ser tão simples quanto os efeitos causados pelas diferenças em seu processamento ou apresentação, por exemplo, cru vs. pasteurizado, fresco vs. desidratado etc.

Limitação de garantias/recurso limitado

SALVO CONFORME DECLARADO EXPRESSAMENTE EM UMA SEÇÃO DE GARANTIA DE EMPACOTAMENTO DE PRODUTO INDIVIDUAL, A NEOGEN REJEITA TODAS AS GARANTIAS EXPRESSAS E IMPLÍCITAS, INCLUINDO, ENTRE OUTRAS, QUAISQUER GARANTIAS DE COMERCIALIZAÇÃO OU ADEQUAÇÃO PARA UM DETERMINADO USO.

Se ficar provado que qualquer produto da Neogen Food Safety se encontra defeituoso, a Neogen ou seu distribuidor autorizado procederá à respectiva substituição ou, se assim o decidir, restituirá o dinheiro da compra do produto. Estes são os seus únicos termos de recurso. A Neogen deverá ser prontamente notificada em até sessenta dias após a descoberta de qualquer defeito suspeito no produto, o qual deverá ser devolvido à Neogen. Entre em contato com o representante da Neogen ou distribuidor autorizado da Neogen para qualquer dúvida adicional.

Limitações de responsabilidade da Neogen

A NEOGEN NÃO SE RESPONSABILIZARÁ POR QUAISQUER DANOS, SEJAM DIRETOS, INDIRETOS, ESPECIAIS, ACIDENTAIS OU SUBSEQUENTES, INCLUINDO, ENTRE OUTROS, PERDA DE LUCROS. Em nenhuma circunstância nem ao abrigo seja de qualquer teoria jurídica, a responsabilidade da Neogen deverá exceder o preço de compra dos produtos supostamente defeituosos.

Armazenamento e descarte

Armazene o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*) a 2–8 °C (35–47 °F). Não congele. Mantenha o kit longe de luz durante o armazenamento. Após abrir o kit, verifique se a embalagem de alumínio não está danificada. Se a embalagem estiver danificada, não utilize. Após a abertura, os tubos de reagentes não utilizados devem sempre ser armazenados na embalagem resselável, juntamente com o dessecante para manter a estabilidade dos reagentes liofilizados. Armazene as embalagens resseláveis a 2–8 °C (35–47 °F) por, no máximo, 90 dias.

Não utilize o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*) depois do vencimento. A data de validade e o número do lote estão anotados no rótulo externo da caixa. Após o uso, o meio de enriquecimento e os tubos Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*) podem conter materiais patogênicos. Quando o teste for concluído, siga os regulamentos padrão vigentes da indústria para descarte de resíduos contaminados. Consulte a Planilha de Dados de Segurança para obter informações adicionais e informações sobre os regulamentos locais para descarte.

Instruções de uso

Siga todas as instruções com atenção. Caso contrário, pode haver resultados imprecisos.

Periodicamente, descontamine as bancadas e os equipamentos do laboratório (pipetas, ferramentas de tampar/ destampar etc.) com uma solução de 1–5% (v:v em água) de água sanitária ou solução de remoção de DNA.

O usuário deve concluir o treinamento de qualificação do operador (QO) do Sistema de Detecção Molecular Neogen, conforme descrito no documento “Protocolos e Instruções de Qualificação de Instalação (QI)/Qualificação Operacional (QO) para o Neogen Sistema de Detecção Molecular”⁽⁷⁾.

Consulte a seção “Instruções Específicas para Métodos Comprovados” para obter os requisitos específicos: Tabela 3 para protocolos de enriquecimento conforme o *Performance Tested Method*SM (PTM) Certificado nº 071902.

Enriquecimento de amostra

As Tabelas 2 e 3 oferecem orientação para protocolos gerais de enriquecimento de alimentos.

É responsabilidade do usuário validar os protocolos de amostragem alternativos ou taxas de diluição para garantir que este método de teste atenda aos critérios do usuário.

Alimentos

1. Permita que o meio de enriquecimento BPW ISO mantenha o equilíbrio a $41,5 \pm 1$ °C.
2. Combine, de forma asséptica, o meio de enriquecimento e a amostra. Para carnes e amostras altamente particuladas, recomenda-se o uso de sacos de amostra com filtro.
3. Homogeneíze todas as matrizes e incube-as, conforme destacado na tabela do protocolo apropriado (vide Tabela 2 ou 3).

Amostras ambientais

ADVERTÊNCIA: caso escolha utilizar tampão neutralizador que contém complexos de sulfonato de arila como a solução hidratante para a esponja, será necessário que você execute uma diluição de 1:2 (1 parte da amostra em 1 parte do caldo de enriquecimento estéril) da amostra ambiental enriquecida antes de testar para reduzir os riscos de um resultado falso-negativo que levaria à liberação de produtos contaminados. Outra opção é transferir 10 µL do enriquecimento do tampão neutralizante para os tubos de Neogen Solução de Lise.

É responsabilidade do usuário validar os protocolos de amostragem alternativos ou taxas de diluição para garantir que este método de teste atenda aos critérios do usuário.

Tabela 2. Protocolos gerais de enriquecimento.

Matriz de amostra	Tamanho da amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento (mL) (pré-aquecido)	Temperatura de enriquecimento (± 1 °C)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Volume da Análise da Amostra (µL)
Carne moída crua, em pedaços e iscas ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO	41,5	10-18	20
Carnes cruas (suína, aves, ovina, bisão) ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO	41,5	10-18	20
Folhas frescas ^(b)	200 g	450 BPW-ISO	41,5	18-24	20
Brotos ^(c)	25 g	225 BPW-ISO	41,5	18-24	20
Laticínios crus ^(d)	25 g ou 25 mL	225 BPW-ISO	41,5	18-24	20

^(a) Massageie com as mãos as amostras de carne bovina (carne moída, em pedaços e tiras) e carne crua (carne de porco moída, ave e carne não bovina) por 30–60 segundos para dispersar e quebrar os aglomerados após a adição de BPW-ISO pré-aquecido.

^(b) Para as folhas frescas, enxágue as folhas com caldo de enriquecimento (BPW-ISO pré-aquecido) e agite-as por 30–60 segundos. Não massageie ou homogeneíze as folhas.

^(c) Para os brotos, enxágue-as com caldo de enriquecimento (BPW-ISO pré-aquecido) por 30–60 segundos e não as massageie ou homogeneíze.

^(d) Homogeneíze as amostras de laticínios crus por 30 a 60 segundos após adicionar BPW-ISO.

Instruções específicas para métodos comprovados
Certificado AOAC® Performance Tested MethodSM (PTM) n° 071902



Nos programas PTM do Instituto de Pesquisa AOACSM, o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*) foi constatado como um método eficiente para a detecção de STEC. As matrizes testadas no estudo são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Protocolos de enriquecimento segundo o Certificado AOAC PTMSM n° 071902.

Matriz de amostra	Tamanho da amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento (mL)	Temperatura de enriquecimento (± 1 °C)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Volume da Análise da Amostra (µL)
Carne bovina moída ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (pré-aquecido)	41,5	10-18	20
Carne moída crua ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (pré-aquecido)	41,5	10-18	20
Carne moída crua ^(a)	25 g	225 BPW-ISO (pré-aquecido)	41,5	10-18	20
Carne de porco moída crua ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (pré-aquecido)	41,5	10-18	20
Partes cruas de aves ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (pré-aquecido)	41,5	10-18	20
Frango separado mecanicamente	25 g	225 BPW-ISO (pré-aquecido)	41,5	10-24	20
Espinafre ^(b)	200 g	450 BPW-ISO (pré-aquecido)	41,5	18-24	20
Brotos ^(c)	25 g	225 BPW-ISO (pré-aquecido)	41,5	18-24	20
Flor de cannabis seca, flor de cânhamo seca ^(d)	10 g	90 BPW-ISO	41,5	28-32	20

^(a) Para as amostras de carne bovina (moída e iscas) adicione BPW-ISO pré-aquecido. Massageie-as com as mãos por 30–60 segundos para dispersar e quebrar os aglomerados.

^(b) Para espinafre, adicione BPW-ISO pré-aquecido à matriz. Enxágue as folhas com líquido e agite-as cuidadosamente por 30–60 segundos. Não massageie ou homogeneíze as folhas.

^(c) Para os brotos, enxágue-as com caldo de enriquecimento (BPW-ISO pré-aquecido) por 30–60 segundos e não as massageie ou homogeneíze.

^(d) Flor de cannabis seca (>0,3% THC) e flor de cânhamo seca (≤0,3% THC)

Preparo da Neogen® Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular

1. Umedeça um pano em uma solução de 1–5% (v:v em água) de água sanitária e limpe a Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular.
2. Enxágue a Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular com água.
3. Utilize uma toalha descartável para secar a Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular.
4. Certifique-se de que a Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular esteja seca antes de utilizá-la.

Preparação do Neogen® Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular

Coloque o Neogen Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular diretamente sobre a bancada do laboratório: a Neogen Bandeja de Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular não é utilizada. Utilize o bloco à temperatura ambiente do laboratório (20–25 °C).

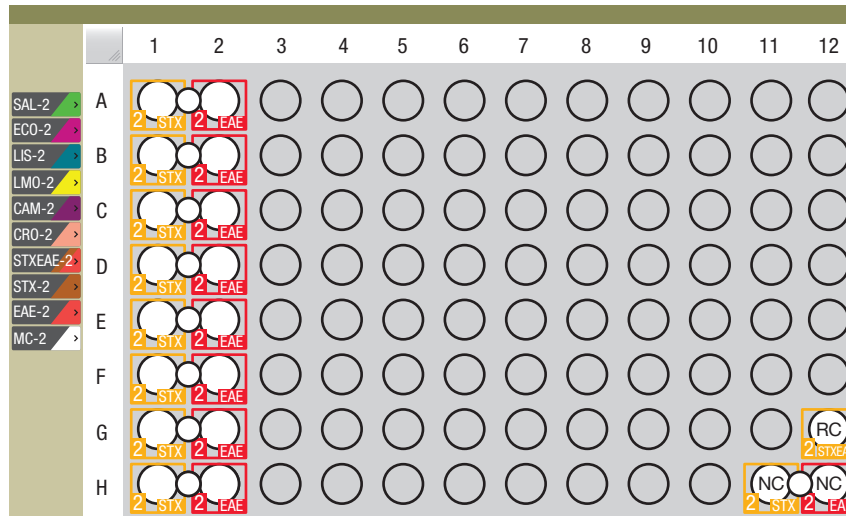
Preparo do Neogen® Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular

Coloque o Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular em uma unidade de aquecimento com bloco seco duplo. Ligue a unidade de aquecimento de bloco a seco e defina a temperatura para permitir que o Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular alcance e mantenha a temperatura de 100 ± 1 °C.

NOTA: dependendo da unidade de aquecimento, aguarde aproximadamente 30 minutos até que o Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular alcance a temperatura. Utilizando um termômetro calibrado adequado (por exemplo, um termômetro de imersão parcial ou um termômetro digital de termopares, não um termômetro de imersão total) colocado no local indicado, verifique se o Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular está a 100 ± 1 °C.

Preparo do Neogen® Equipamento de Detecção Molecular

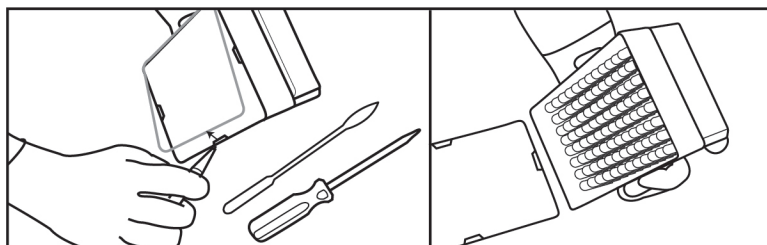
1. Inicie o Software Neogen Sistema de Detecção Molecular e faça log in. Entre em contato com o representante Neogen Food Safety para garantir que você possui a versão mais atualizada do software.
2. Ligue o Neogen Equipamento de Detecção Molecular.
3. Crie ou edite uma execução com dados para cada amostra. Consulte o Manual do Usuário do Neogen Sistema de Detecção Molecular para obter mais detalhes.
 - 3.1. A seleção do ícone STXEAE-2 no software seleciona duas cavidades adjacentes (como A1, A2, B1, B2, etc.), uma para o tubo do reagente *stx* e outra para o tubo do *eae*, pois cada amostra é executada com dois ensaios. O NC é configurado para cada tubo de reagente e um RC é configurado para o kit.



NOTA: o Neogen Equipamento de Detecção Molecular deve estar pronto para o uso antes de inserir a Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular com os 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 equipamento estiver pronto para iniciar uma execução, a barra de status ficará VERDE.

Lise

Remova o fundo do Neogen Rack de Solução de Lise com uma chave de fenda ou espátula antes de inserir o Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular.

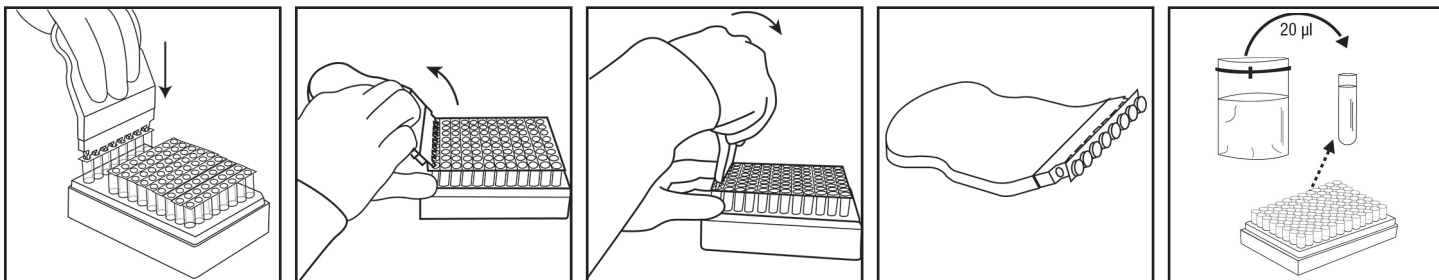




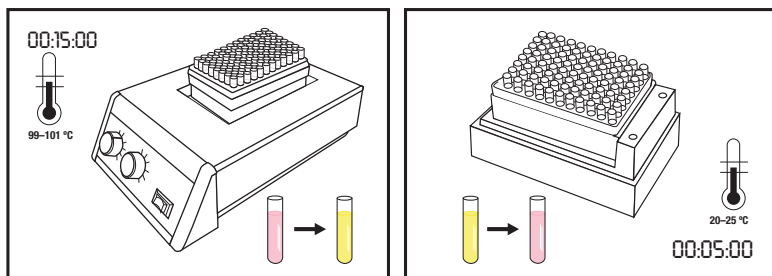
1. Deixe que os tubos de Neogen Solução de Lise cheguem à temperatura ambiente (20–25 °C), deixando os racks fora de refrigeração de um dia para o outro (16–18 horas). A alternativa para equilibrar os tubos Neogen Solução de Lise à temperatura ambiente é posicioná-los na bancada do laboratório durante pelo menos 2 horas, incubá-los em uma incubadora de 37 ± 1 °C por 1 hora ou colocá-los em um aquecedor com bloco seco duplo por 30 segundos a 100 °C.
2. Inverta os tubos com tampa para misturar. Prossiga para a próxima etapa em até 4 horas após a inversão.
3. Remova o caldo de enriquecimento da incubadora.
4. Um tubo de Neogen Solução de Lise é necessário para cada amostra e do NC (meio de enriquecimento esterilizado).
 - 4.1. As tiras de tubos de Neogen Solução de Lise podem ser cortadas para obter o número desejado de tubos. Selecione o número de tubos ou tiras de 8 tubos necessários. Coloque os tubos de Neogen Solução de Lise em um rack vazio.
 - 4.2. Para evitar contaminação cruzada, destampe uma tira de tubo de Neogen Solução de Lise de cada vez e utilize uma nova ponteira de pipeta para cada etapa da transferência.
 - 4.3. Transfira a amostra enriquecida para os tubos de Neogen Solução de Lise, conforme descrito abaixo:

Primeiro, transfira cada amostra enriquecida para um tubo Neogen Solução de Lise individual. **Por último**, transfira o NC.

- 4.4. Use a Neogen® Ferramenta de Tampar/Destampar para Detecção Molecular - Lise para destampar uma tira de tubos de Neogen Solução de Lise — uma tira de cada vez.
- 4.5. Descarte a tampa do tubo de Neogen Solução de Lise, se o lisado for mantido para novo teste, coloque as tampas em um recipiente limpo para reutilização após a lise.
 - 4.5.1. Para processar o lisado mantido, consulte o Apêndice A.
- 4.6. Transfira 20 µL de amostra para o tubo de Neogen Solução de Lise.

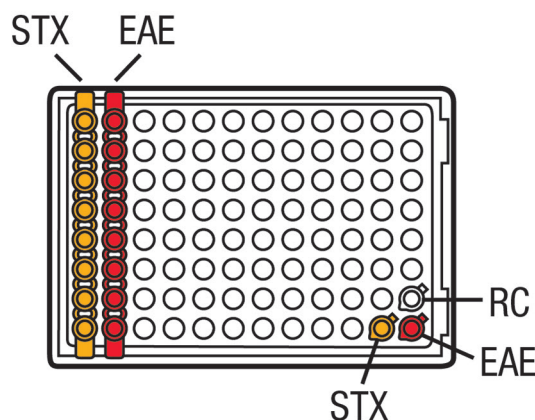


5. Repita as etapas 4.4 a 4.6, conforme necessário, para o número de amostras a serem testadas.
6. Quando todas as amostras tiverem sido transferidas, transfira 20 µL de NC (meio de enriquecimento estéril, por exemplo, BPW) para um tubo Neogen Solução de Lise. Não use água como um NC.
7. Verifique se a temperatura do Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular está a 100 ± 1 °C.
8. Coloque o rack descoberto de tubos Neogen Solução de Lise no Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular e aqueça por 15 ± 1 minuto. Durante o aquecimento, a Neogen Solução de Lise mudará da cor rosa (frio) para amarelo (quente).
 - 8.1. Amostras que não foram tratadas com aquecimento de forma adequada durante a etapa de lise do ensaio podem ser consideradas um risco biológico potencial e NÃO devem ser inseridas no Neogen Equipamento de Detecção Molecular.
9. Retire o rack descoberto de tubos de Neogen Solução de Lise do Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular e deixe esfriar no Neogen Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular por pelo menos 5 minutos e no máximo 10 minutos. O Neogen Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular, usado em temperatura ambiente sem a Neogen® Bandeja de Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular, deve ser colocado diretamente sobre a bancada do laboratório. Quando resfriada, a Neogen Solução de Lise voltará à cor rosa.
10. Retire o rack de tubos Neogen Solução de Lise do Neogen Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular.



Amplificação

1. Um tubo de reagente de Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) e um tubo de reagente de Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*eae*) é necessário para cada amostra e para o NC.
 - 1.1. As tiras de tubos podem ser cortadas para obter o número de tubos desejado. Selecione o número de tubos de reagentes individuais ou de tiras de 8 tubos individuais necessárias para o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) e para o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*eae*).
 - 1.2. Coloque os tubos do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) em um rack vazio de uma coluna.
 - 1.3. Coloque os tubos do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*eae*) na coluna adjacente da direita.
 - 1.4. Evite agitar os pellets dos reagentes da parte inferior dos tubos.
2. Selecione um tubo Neogen Controle de Reagentes e coloque-o no rack.
3. Para o lisado NC, selecione um tubo de reagentes para o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) e um para o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*eae*).

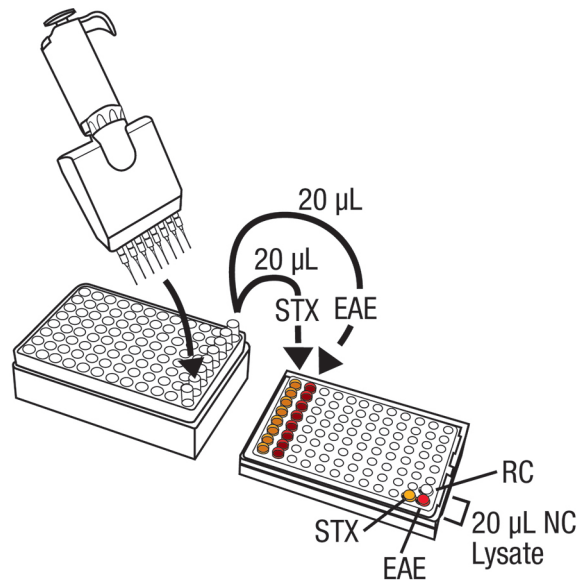


4. Para evitar contaminação cruzada, destampe uma tira do tubo de reagente de Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* ou *eae*) de cada vez e utilize uma nova ponteira de pipeta para cada etapa da transferência.
5. Transfira cada um dos lisados para um tubo de reagente Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* ou *eae*), conforme descrito abaixo.
 - 5.1. Primeiro, transfira cada um dos lisados para um tubo de reagente Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*), conforme descrito em 5.5 e 5.6.
 - 5.2. Depois, transfira cada um dos lisados para um tubo de reagente Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*eae*) na coluna adjacente da direita, conforme descrito em 5.5 e 5.6.

NOTA: utilize uma nova ponteira de pipeta para cada transferência. Não utilize a mesma ponteira de pipeta para o tubo de reagente do *stx* e do *eae* da mesma amostra de lisado.

- 5.3. Após todas as transferências de amostra de lisado, adicione o lisado NC a cada tubo de reagente do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) e do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*eae*).

5.4. Transfira o lisado NC por último ao tubo de controle de reagentes.



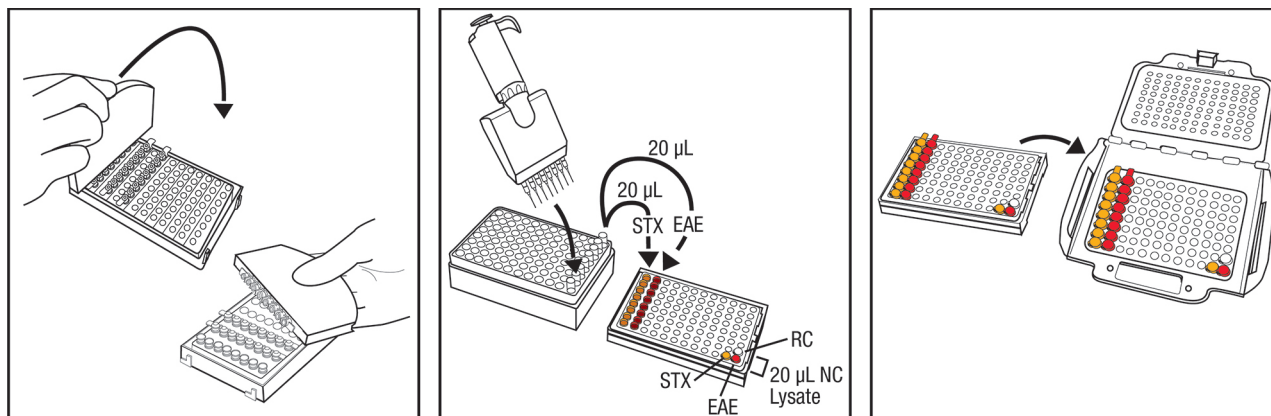
- 5.5. Use a Neogen® Ferramenta de Tampar/Destampar para Detecção Molecular - Reagente para destampar os tubos do reagente do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* ou *eae*), uma tira de cada vez. Descarte a tampa.
- 5.6. **Transfira 20 µL de amostra de lisado da ½ superior do líquido (evite o precipitado) no tubo de Neogen Solução de Lise para o tubo de reagente do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* ou *eae*) correspondente. Dispense em um ângulo que evite a agitação dos pellets. Misture pipetando gentilmente 5 vezes.**

NOTA: utilize uma nova ponteira de pipeta para cada transferência. Não utilize a mesma ponteira de pipeta para o tubo de reagente do *stx* e do *eae* da mesma amostra de lisado.

- 5.7. Repita a etapa 5.6 até que a amostra de lisado individual tenha sido adicionada a um tubo de reagente para o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* ou *eae*) correspondente na tira.
- 5.8. Cubra os tubos de reagentes do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* ou *eae*) com a tampa adicional fornecida e utilize o lado arredondado da Neogen Ferramenta de Tampar/Destampar para Detecção Molecular - Reagente para apertar com um movimento de vaivém, garantindo que a tampa fique bem apertada.
- 5.9. Repita as etapas 5.6 a 5.8 conforme necessário, para o número de amostras a serem testadas dos tubos de reagentes do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*).
- 5.10. Quando todas as amostras de lisado tiverem sido transferidas, repita as etapas de 5.6 a 5.8 para transferir 20 µL de lisado NC para um tubo de reagente do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) e do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*eae*).
- 5.11. **Transfira 20 µL de lisado NC para um tubo de Neogen Controle de Reagentes.** Dispense em um ângulo que evite a agitação dos pellets. Misture pipetando gentilmente 5 vezes.

Transfira cada amostra de lisado para os tubos de reagentes individuais de Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* ou *eae*) primeiro e, em seguida, para o NC. Por último, hidrate o tubo Neogen Controle de Reagentes.

6. Carregue os tubos tampados em uma Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular limpa e descontaminada e, em seguida, trave a tampa.



7. Analise e confirme a execução configurada no Software do Neogen Sistema de Detecção Molecular.
8. Clique no botão Iniciar do software e selecione o instrumento a utilizar. A tampa do instrumento selecionado abre automaticamente.
9. Posicione a Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular no Neogen Equipamento de Detecção Molecular e feche a tampa para iniciar o ensaio. Os resultados são fornecidos em 60 minutos, embora os positivos possam ser detectados ainda mais cedo.
10. Depois que o ensaio estiver concluído, remova a Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular do Neogen Equipamento de Detecção Molecular e descarte os tubos mergulhando-os em uma solução de 1–5% (v:v em água) de água sanitária por 1 hora, fora da área de preparação do ensaio.

AVISO: para minimizar o risco de falso-positivos por contaminação cruzada, nunca abra tubos de reagentes que contenham DNA amplificado. Isto inclui o reagente para Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx* e *eae*), o Neogen Controle de Reagentes e os tubos de Neogen Controle de Matriz. Sempre descarte os tubos de reagentes selados mergulhando-os em uma solução de 1–5% (v:v em água) de água sanitária por 1 hora, fora da área de preparação do ensaio.

Resultados e Interpretação

Um algoritmo interpreta a curva de saída de luz que resulta da detecção da amplificação do ácido nucleico.

Os resultados são analisados automaticamente pelo software e são codificados em cores de acordo com o resultado.

Um resultado é determinado positivo ou negativo pela análise de diversos parâmetros exclusivos das curvas. Resultados positivos presuntivos são relatados em tempo real, enquanto resultados negativos e resultados de inspeção serão exibidos após a conclusão da execução.

O software do Neogen Sistema de Detecção Molecular relata resultados separadamente para cada um dos ensaios (*stx* e *eae*) e usa os resultados de ambos para chamar a amostra de positiva ou negativa para STEC (EHEC) (consulte a Figura abaixo). Para uma positiva presuntiva de STEC (EHEC), ambos os alvos genéticos (*stx1* e/ou *stx2* e *eae*) devem ser positivos. **Se algum dos ensaios individuais apresentar erro ou inspeção, o resultado final será erro ou inspeção. É necessário refazer o teste para representar corretamente o resultado final** (consultar a tecla de resultado). O software também permite a configuração de ensaios individuais, se necessário, e a amostra de lisado ou lisado atual do enriquecimento pode ser testado novamente com os ensaios, seguindo as etapas descritas no Apêndice A para lisados mantidos e as etapas da seção Lise e Amplificação para o enriquecimento mantido.



Teclas de resultado da amostra enriquecida de lisado

	Ambos positivos, resultado final positivo
	stx positivo, eae negativo, resultado final negativo
	stx positivo, eae com Inspeccionar, resultado final com Inspeccionar, reteste
	stx positivo, eae com erro, resultado final com erro, reteste
	stx negativo, eae positivo, resultado final negativo
	stx negativo, eae negativo, resultado final negativo
	stx negativo, eae com Inspeccionar, resultado final com Inspeccionar, reteste
	stx negativo, eae com erro, resultado final com erro, reteste
	stx com Inspeccionar, eae positivo, resultado final com Inspeccionar, reteste
	stx com Inspeccionar, eae negativo, resultado final com Inspeccionar, reteste
	stx com Inspeccionar, eae com Inspeccionar, resultado final com Inspeccionar, reteste
	stx com Inspeccionar, eae com erro, resultado final com erro, reteste
	stx com erro, eae positivo, resultado final com erro, reteste
	stx com erro, eae negativo, resultado final com erro, reteste
	stx com erro, eae com Inspeccionar, resultado final com erro, reteste
	stx com erro, eae com erro, resultado final com erro, reteste

Teclas de controle negativo






	Válido para ambos, ligação válida
	Válido para um, outro com erro, link com erro, reteste
	Válido para um, outro inválido, link inválido, reteste
	Ambos com erro, link com erro, reteste
	Ambos inválidos, link inválido, reteste
	Um com erro, outro inválido, link com erro, reteste

Amostras positivas presuntivas devem ser confirmadas conforme os procedimentos operacionais padrão de laboratórios, ou seguindo o método de confirmação de referência apropriado^(1,2,3), começando com a transferência do caldo de enriquecimento primário para as placas seletivas e a confirmação de isolados por meio de métodos bioquímicos, microscópicos e sorológicos apropriados. Para matrizes especificadas pelo MLG 5C, a separação imunomagnética deve ser feita antes do plaqueamento no meio selecionado.

NOTA: até mesmo uma amostra negativa não resultará em leitura zero, pois o sistema e os reagentes de amplificação do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (stx e eae) tem uma leitura de Unidades Relativas de Luz (URL) em “plano de fundo”.

Em casos raros de saída de luz fora do comum, o algoritmo rotula o caso como Inspeccionar. A Neogen recomenda que o usuário repita o ensaio para qualquer amostra Inspeccionar. Se o resultado continuar como “Inspeccionar”, prossiga com o teste de confirmação utilizando o método de sua preferência^(1,2,3) ou conforme especificado pelos regulamentos locais.

Tabela 4. Símbolos e informações para diversos resultados de software.

Tipo de poço	Símbolo de resultado do poço	Resultado	Interpretação
Amostra		Positivo	A amostra é positiva presuntiva para o patógeno alvo.
Amostra		Negativo	A amostra é negativa presuntiva para o patógeno alvo.
Amostra		Inibido	A matriz da amostra foi inibitória para o ensaio. Pode ser necessário um novo teste. Consulte a seção de resolução de problemas e o kit de Instruções do Produto do ensaio para obter mais informações.
Amostra		Inspeccionar	A presença ou ausência do patógeno alvo foi indeterminada. Pode ser necessário um novo teste. Consulte a seção de resolução de problemas e o kit de Instruções do Produto do ensaio para obter mais informações.
Amostra		Erro	Não foi detectada bioluminescência. Pode ser necessário um novo teste. Consulte a seção de resolução de problemas e o kit de Instruções do Produto do ensaio para obter mais informações.

Apêndice A. Interrupção de protocolo: armazenamento e novo teste das amostras

1. Para armazenar um lisado tratado termicamente, tampe novamente o tubo de Neogen Solução de Lise com uma tampa limpa (consulte a seção “Lise”, 4.5).
2. Para armazenar uma amostra enriquecida, incube-a por no mínimo 18 horas antes do armazenamento.
3. Armazene entre 4 e 8 °C por até 72 horas.
4. Prepare uma amostra armazenada para amplificação invertendo de 2 a 3 vezes para misturar.
5. Destampe os tubos.
6. Coloque os tubos de lisado misturados no Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular e aqueça a 100 ± 1 °C por 5 ± 1 minuto.
7. Retire o rack de tubos Neogen Solução de Lise do Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular e deixe esfriar no Neogen Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular por pelo menos 5 minutos e no máximo 10 minutos.
8. Continue o protocolo na seção Amplificação detalhada acima.

Referências:

1. Microbiology Laboratory Guidebook. U. S. Department of Agriculture (USDA) Food Safety and Inspection Service (FSIS) Microbiology Laboratory guidebook 5C.00. Detection and isolation of top seven Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STECs) from meat products and carcass and environmental sponges. Feb 4, 2019.
2. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. October 2018.
3. ISO/TS 13136:2012: Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups
4. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good laboratory practice for nonclinical laboratory studies.
5. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
6. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
7. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. Contate seu representante da Neogen Food Safety para obter uma cópia deste documento.

Explicação dos símbolos

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar 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 Leshar Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00918A

病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx/eae) 用

製品の概要および用途

Neogen® 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx/eae) 用は、増菌した食品および食品製造工程の環境検体中における志賀毒素遺伝子 (stx1および/またはstx2) およびインチミン遺伝子 (eae) を志賀毒素産生性大腸菌 (STECあるいは「Vero毒素産生性大腸菌」とも呼ばれる) から特異的な病原体を迅速に検出するために、Neogen® 病原菌自動検出システムとともに使用されます。STECとはstx1遺伝子によってコードされる志賀毒素1 (Stx1) またはstx2遺伝子によってコードされる志賀毒素2 (Stx2) のいずれか、もしくはその両方を産生する大腸菌の病原型を指します。STECはstx1および/またはstx2およびeae (付着および消失表現型に關与するインチミン遺伝子) の病原性遺伝子を保有しており、腸管出血性大腸菌 (EHEC) とも称されます。キットには試薬チューブ2本が含まれます。1本はSTEC (EHEC) が保有する病原性遺伝子stx1および/もしくはstx2検出に使用し、残り1本はeae検出に使用します。Neogen® 病原菌自動検出システムのソフトはアッセイごとに別々の結果を表示し、両方のアッセイ結果をもとにSTEC (EHEC) 陽性または陰性の判定を行います。両方の標的遺伝子 (stx1および/またはstx2およびeae) が陽性になった場合、STEC (EHEC) 推定陽性と判断します。stxアッセイはstx1やstx2を特定することはできませんが、stx1および/またはstx2の存在を検出できます。

Neogen病原菌検出アッセイは、増幅した遺伝子を検出するために、高い特異性と感度で核酸配列を迅速に増幅するLAMP法と、生物発光を組み合わせています。推定陽性結果はリアルタイムに表示され、陰性結果は検査が完了してから表示されます。結果が陽性と推定される場合は、任意の別の方法^(1,2,3)または行政の規制によって指定されたとおりに確認する必要があります。

Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx/eae) 用は、検査技術の訓練を受けた技術者が検査室環境で使用することを想定しています。Neogenは、食品または飲料以外の産業における本製品の使用に関しては検証しておりません。たとえば、Neogenは、本製品を医薬品、化粧品、臨床または動物診断検体の検査で使用することについて検証しておりません。Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx/eae) 用は、可能性のあるすべての食品や食品製造工程、検査プロトコル、あるいはすべての菌株について評価されたわけではありません。

すべての検査法と同様に、増菌プロセスのメーカーや組成、品質などの要因が結果に影響する場合があります。採取方法、検査プロトコル、検体の準備、取り扱い、および検査手技などの要因が結果に影響する場合があります。Neogenは、検査方法がお客様の基準を確実に満たすように、お客様の環境において、特定の食品および菌株を用いて十分な数の検体で、増菌プロセスを含む検査方法を評価することをお勧めします。

Neogenは、緩衝ペプトン水 (BPW)-ISO前増菌プロセスを使用して、Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx/eae) 用を評価してきました。

Neogen® 病原菌自動検出システムの装置は、アッセイのライシスステップ中に熱処理を行った検体を測定することを目的としており、検体中に存在する微生物を溶菌するように設計されています。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考えられる可能性がありますので、Neogen病原菌自動検出システムの装置内には入れないでください。

Neogen 食品衛生管理製品部門は、設計と製造についてISO (国際標準化機構) 9001認証を取得しています。

Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx/eae) 用検査キットには表1に記載のとおり、stxおよびeaeのそれぞれ48回分の試薬が含まれます。



表1. Neogen病原菌検出アッセイキットの内容。

品目	特徴	数量	内容	コメント
Neogen® ライシス液 (LS溶液)	クリアチューブに入ったピンク色の液体	96検査分 (8連チューブ12セット)	チューブ1本につきLS 580 µL	ラック入り、調整済み
Neogen® 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx) 用試薬チューブ	オレンジ色チューブ	48検査分 (8連チューブ3セット入り2パウチ)	凍結乾燥済み特異的増幅試薬および検出試薬	調整済み
Neogen® 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (eae) 用試薬チューブ	赤色チューブ	48検査分 (8連チューブ3セット入り2パウチ)	凍結乾燥済み特異的増幅試薬および検出試薬	調整済み
予備キャップ	オレンジ色キャップ	96検体分 (8連キャップ12セット)		調整済み
予備キャップ	赤色キャップ	96検体分 (8連キャップ12セット)		調整済み
Neogen® 試薬コントロール (RC)	フリップトップ式クリアチューブ	16検査分 (チューブ8本入り2パウチ)	凍結乾燥済みコントロールDNA、増幅試薬および検出試薬	調整済み

陰性コントロール (NC) (キットには付属しません) は、BPW-ISOなどの滅菌済前増菌培地です。水は陰性コントロールとして使用しないでください。

クイックスタートガイドは、www.neogen.com でご覧いただけます。

安全性

Neogen病原菌自動検出システムとNeogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx/eae) 用の製品情報に記載のすべての安全情報を読み、理解し、遵守してください。また、今後参照できるように、この安全性指示を保管しておいてください。

▲警告：警告は、それを避けなければ死亡または重篤な傷害ないし物的損害が発生しうる危険な状況を示します。

注記：回避できない場合、物的損害が起り得る危険な状況を示します。

▲ 警告

Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx/eae) 用は、ヒトまたは動物の病態診断に使用しないでください。

検査実施担当者に適切な検査技術を身につけるように指導してください (例: Good Laboratory Practices⁽⁴⁾、ISO/IEC 17025⁽⁵⁾、ISO 7218⁽⁶⁾)。

汚染製品の出荷につながる偽陰性結果に伴うリスクを回避するために:

- プロトコルに従い、製品情報に記載のとおり検査を行ってください。
- Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx/eae) 用は、外箱表示および製品情報に記載のとおり保管してください。
- Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx/eae) 用は、有効期限までに必ず使用してください。
- Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx/eae) 用は、社内または第三者による検証を行った食品検体および環境検体に使用してください。
- Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx/eae) 用は、社内または第三者によるバリデーションが行われた表面、殺菌剤、プロトコル、菌株のみに使用してください。
- アリルスルホン酸塩添加中和緩衝液を含む環境検体については、試験前に1:2の希釈 (検体1に対して滅菌増菌ブロス1) を行ってください。別の方法としては、中和緩衝液増菌ブロス10 µLをNeogenライシスチューブに滴下します。Neogen® 検体処理製品のうち、アリルスルホン酸塩添加中和緩衝液を含む製品は、RS96010NB、RS9604NB、SSL10NB、SSL10NB2G、HS10NB、HS10NB2G、HS2410NB2Gです。

化学物質およびバイオハザードへの暴露に伴う危険を回避するために:

- 技能訓練を受けた検査実施担当者の管理下で、適切な設備のある検査室にて食中毒菌検査を行ってください。培養済み増菌ブロスおよび培養済み増菌ブロスと接触する機器または接触面には、人体に有害となりうる量の病原体が含まれている可能性があります。
- 試薬および汚染された検体を取り扱う際は、適切な保護衣、保護メガネの装着など、標準的な検査室の安全手順に常に従ってください。
- 増菌後のブロスや、増幅後の試薬チューブ内容物には触れないでください。

- 現行の地方／地域／国の規制基準に従って、増菌された検体を廃棄してください。
- 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考えられる可能性がありますので、Neogen病原菌自動検出システムの装置内には入れないでください。

アッセイ準備中の交差汚染に伴う危険を回避するために：

- 手袋を必ず着用してください(ユーザー保護と遺伝子の混入を避けるため)。

高温の液体への暴露に伴う危険を回避するために：

- ヒーターの温度設定を推奨温度以上にしないでください。
- 推奨される加熱時間を超えないでください。
- 適切な校正済みの温度計を使用して、Neogen® 病原菌検出ヒートブロックインサートの温度を確認してください(例：浸線付温度計またはデジタル熱電対温度計。全浸没温度計は使用しないこと)。温度計は、必ずNeogen病原菌検出ヒートブロックインサートの指定の部位に設置してください。

注記

アッセイ準備中の交差汚染に伴う危険を回避するために：

- 試薬ペレットを水和する前に、手袋を交換してください。
- 滅菌済みのエアロゾルバリア材(フィルター付)、分子生物学グレードのピペットチップの使用を推奨します。
- 検体ごとに新しいピペットチップを使用してください。
- GLP(医薬品安全性試験実施基準)に従って検体を増菌ブロスからライシスチューブに移してください。ピペットの汚染を回避するため、中間的な滴下ステップを追加することもできます。例えば、増菌された各検体を滅菌チューブに分注することができます。
- 利用可能な場合は、殺菌灯が装備された病原菌取扱エリアを使用してください。
- 検査室の作業台および備品(ピペット、キャップ/デキャップツール等)は、水で1～5%(v/v)に希釈した家庭用漂白液またはDNA除去用液を使用して定期的に除染してください。

偽陽性の結果に伴う危険を回避するために：

- 増幅後の試薬チューブは絶対に開けないでください。
- 汚染されたチューブは、常に、水で1～5%(v/v)に希釈した家庭用漂白液に1時間浸漬した後、アッセイの準備作業領域から隔離して、廃棄してください。
- 増幅後の試薬チューブは絶対にオートクレーブで加熱滅菌処理しないでください。

廃棄に関する詳細および行政の規制については、安全データシートをご参照ください。

具体的な用途や手順についてご質問がありましたら、当社のウェブサイト (www.neogen.com) をご覧いただくか、Neogen販売担当者または取り扱い販売店までお問い合わせください。

お客様の使用責任

お客様には、使用前に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。詳細につきましては、当社ウェブサイト www.neogen.com をご覧いただくか、お近くのNeogen販売担当者または販売店にお問い合わせください。

検査方法を選択する際には、採取方法、検査プロトコル、検体の準備、取り扱い、検査手技、検体自体などの外的要因が結果に影響することを認識することが重要です。

検査方法または製品を選択する際に、適切なマトリックスおよび微生物負荷を用いて十分数の検体を評価して、選択した試験方法がお客様の基準を満たすことをお客様の責任でご確認ください。

また、検査方法および結果が顧客または供給業者の要件を満たしているかについても、事前にお客様の責任でご確認ください。

どの検査方法を使用した場合でも、Neogen食品衛生管理製品を用いて得られた結果は、検査を実施した食品マトリックスまたは工程の品質を保証するものではありません。

各種食品マトリックスの検査方法の評価にご利用いただくため、NeogenではNeogen® 病原菌検出マトリックスコントロールキットをご用意しました。必要に応じて、Neogen病原菌検出マトリックスコントロール (MC) を使用し、対象マトリックスがNeogen病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx/eae) 用の検査結果に影響を及ぼすかどうかを判定してください。Neogenの検査法を採用する場合、または新規や由来の不明なマトリックス、あるいは原材料を加工したマトリックスや加工工程が変更されたマトリックスを検査する場合は、検証期間中に、マトリックスの標準となる複数の検体(由来の異なる検体)を検査してください。

マトリックスは、成分や加工状態など固有の特性を備える製品の種類として定義されます。マトリックス間の違いは、加工や外観(例：未加工か滅菌済みか、新鮮か乾物か、等)の違いに起因する効果と同じように単純な場合があります。

保証の範囲／賠償の制限

個々の製品パッケージの限定保証条項に明示されている場合を除き、NEOGENは明示または黙示を問わず、製品または特定の目的への適合性に関する保証を含むがこれに限定されない、いかなる種類の保証も負いかねます。Neogen食品衛生管理製品部門の製品に欠陥があった場合、Neogenまたは指定販売店で交換あるいは製品購入価格の払い戻しをいたします。対応は上記のみとさせていただきます。製品の欠陥が疑われる場合は、判明した時点から60日以内に速やかにNeogenに通知し、製品をNeogenに返品する必要があります。ご不明な点がございましたら、Neogenの担当者またはNeogenの正規代理店までお問い合わせください。

Neogenの保証責任範囲

NEOGENは、直接的、間接的、特殊なもの、偶発的または必然的であるかを問わず、利益損失を含むがこれに限定されないあらゆる損失または損害に対しての責任を負わないものとします。いかなる場合も、いかなる法的理論の下でも、Neogenの保証責任範囲は、欠陥と申し立てられた製品の購入金額を超えないものとします。

保管と廃棄

Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx/eae) 用は2~8°C (35~47°F) で保管してください。冷凍しないでください。冷暗所で保管してください。キット開封後は、ホイルパウチが破損してい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、使用しない試薬チューブは、凍結乾燥試薬の安定性を保つため、乾燥剤と共に再密閉可能なパウチ内に必ず保管してください。封をしたパウチは2~8°C (35~47°F) で、90日間保管できます。

有効期限が過ぎたNeogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx/eae) 用は使用しないでください。使用期限とロット番号は箱の外側のラベルに記載しています。使用後、前増菌培地およびNeogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx/eae) 用には病原性の物質が含まれている可能性があります。検査終了後は、汚染廃棄物に関する現行の業界基準に従って廃棄してください。廃棄に関する詳細および行政の規制については、安全データシートをご参照ください。

使用方法

すべての指示に、注意深く従ってください。従わない場合、正確な結果が得られないことがあります。

検査室の作業台および備品(ピペット、キャップ／デキャップツール等)は、水で1~5% (v/v) に希釈した家庭用漂白液またはDNA除去用液を使用して定期的に除染してください。

ユーザーは、「Neogen病原菌自動検出システムの設置資格(IQ)／操作資格(OQ)プロトコルと手順」⁽⁷⁾に記載のとおり、Neogen病原菌自動検出システムのオペレーター資格(OQ)トレーニングを受講する必要があります。

具体的な要件については、「バリデーション済みメソッドに関する具体的な指示」の項を参照してください。

表3. Performance Tested MethodSM (PTM) 認定証 #071902に基づく前増菌プロトコル。

検体の増菌

表2、3には、食品を増菌する場合の一般的なガイドラインを示しています。

この検査法がお客様の基準に合致するかを確かめるため、別の採取プロトコルまたは希釈率で事前に確認いただき、お客様の責任で使用の可否をご判断ください。

食品

1. BPW ISO前増菌培地を予め41.5 ± 1°Cになるように加温します。
2. 増菌培地と検体を無菌的に混合します。すべての肉検体および微粒子を多く含む検体に関しては、フィルター付きホモジナイザーバッグの使用を推奨します。
3. すべてのマトリックスを混合し、適切なプロトコル表(表2または表3を参照)の概要に従って培養します。

環境検体

警告: アリルスルホン酸複合体をスポンジの水和溶液として含む中和バッファーの使用を選択する場合には、汚染された製品の在庫につながる偽陰性の伴うリスクを回避するために、検査を行う前に増菌環境検体の1:2の希釈液(検体1に対し滅菌増菌ブロス1)を行う必要があります。別の方法としては、中和緩衝液増菌ブロス10 µLをNeogenライシチューブに滴下します。

この検査法がお客様の基準に合致するかを確かめるため、別の採取プロトコルまたは希釈率で事前に確認いただき、お客様の責任で使用の可否をご判断ください。

表2. 一般的な増菌プロトコル。

検体マトリックス	検体量	前増菌プロス量 (mL) (加温済み)	増菌温度 (± 1°C)	増菌時間 (時間)	検体の分析量 (μL)
生の牛ひき肉、角切り肉、切り落とし肉 ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO	41.5	10-18	20
生肉 (豚肉、鶏肉、子羊の肉、野牛の肉) ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO	41.5	10-18	20
葉状作物 ^(b)	200 g	450 BPW-ISO	41.5	18-24	20
もやし ^(c)	25 g	225 BPW-ISO	41.5	18-24	20
生乳 ^(d)	25 gもしくは25 mL	225 BPW-ISO	41.5	18-24	20

^(a) 加温済みBPW-ISOを加えた後、かたまりをほぐすために、牛肉(ひき肉、角切り肉、切り落とし肉)および生肉(豚肉、鶏肉、牛肉以外の肉)検体を30秒から60秒間手で揉みます。

^(b) 葉状作物に前増菌プロス(加温済みBPW-ISO)を注ぎ、30秒から60秒間静かにかき混ぜます。葉を揉んだり、ホモジナイズは行わないでください。

^(c) 30秒から60秒間前増菌プロス(加温済みBPW-ISO)をもやしに注ぎます。揉んだり、ホモジナイズは行わないでください。

^(d) 加温済みBPW-ISOを加えた後、生乳検体を30秒から60秒間ホモジナイズします。

バリデート済みメソッドに関する具体的な指示

AOAC® Performance Tested MethodSM (PTM) 認証 #071902



AOAC Research Institute PTMSM の試験において、Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx/eah) 用は、STECの検出に有効な方法であることが確認されています。上記試験において検査の対象となったマトリックスを表3に掲載します。

表3. AOAC PTMSM 認証 #071902に従う増菌プロトコル。

検体マトリックス	検体量	前増菌プロス量 (mL)	増菌温度 (± 1°C)	増菌時間 (時間)	検体の分析量 (μL)
生の牛切り落とし肉 ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (加温済み)	41.5	10-18	20
生の牛ひき肉 ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (加温済み)	41.5	10-18	20
生の牛ひき肉 ^(a)	25 g	225 BPW-ISO (加温済み)	41.5	10-18	20
生の豚ひき肉 ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (加温済み)	41.5	10-18	20
生の鶏肉 ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (加温済み)	41.5	10-18	20
機械分離鶏肉	25 g	225 BPW-ISO (温めておくこと)	41.5	10-24	20
ほうれん草 ^(b)	200 g	450 BPW-ISO (加温済み)	41.5	18-24	20
もやし ^(c)	25 g	225 BPW-ISO (加温済み)	41.5	18-24	20
乾燥大麻の花、乾燥麻の花 ^(d)	10 g	90 BPW-ISO	41.5	28-32	20

^(a) 牛肉検体(牛ひき肉、切り落とし肉)に加温済みBPW-ISOを加えます。かたまりをほぐすために、30秒から60秒間手で揉みます。

- (b) マトリックスに加温済みBPW-ISOを入れます。ほうれん草に前増菌ブロスを注ぎ、30秒から60秒間静かにかき混ぜてます。葉を揉んだり、ホモジナイズは行わないでください。
- (c) 30秒から60秒間前増菌ブロス(加温済みBPW-ISO)をもやしに注ぎます。揉んだり、ホモジナイズは行わないでください。
- (d) 乾燥大麻の花 (THCが 0.3% を上回る) と乾燥麻の花 (THC が 0.3% 未満)

Neogen® 病原菌検出スピードローダートレイの準備

1. 水で1~5%(v/v)に希釈した家庭用漂白液で湿らせた布か使い捨て用タオルを使って、Neogen病原菌検出スピードローダートレイを拭きます。
2. 水でNeogen病原菌検出スピードローダートレイを濯ぎます。
3. 使い捨てペーパータオル等で、Neogen病原菌検出スピードローダートレイを拭きます。
4. 使用前に、Neogen病原菌検出スピードローダートレイが乾燥していることを確認してください。

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作業台の上に直に置きます:Neogen 病原菌検出チルブロックインサートを室温(20~25℃)に置きます。

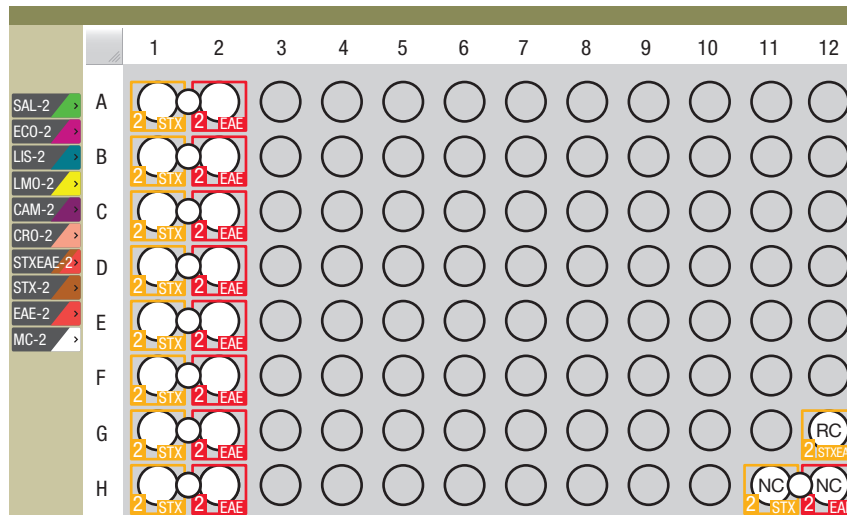
Neogen® 病原菌検出ヒートブロックインサートの準備

Neogen病原菌検出ヒート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入れます。ドライブロックヒーターユニットをオンにして、温度を100 ± 1℃に設定します。Neogen病原菌検出ヒートブロックインサートが設定温度に達したら、温度を保持します。

注:使用するヒーターユニットによっては、Neogen病原菌検出ヒートブロックインサートが設定温度に達するまでに約30分かかります。適切な校正済みの温度計(例:浸線付温度計またはデジタル熱電対温度計。全浸没温度計は使用しないこと)を指定の部位に設置し、Neogen病原菌検出ヒートブロックインサートが100 ± 1℃であることを確認します。

Neogen® 病原菌自動検出システムの準備

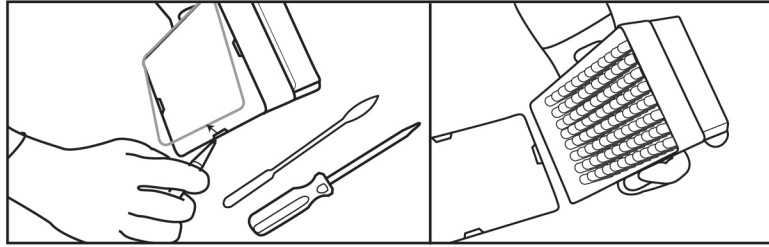
1. Neogen病原菌自動検出システム用ソフトウェアを起動してログインします。お使いのソフトウェアが最新バージョンであるかどうかを確認するには、Neogen食品衛生管理製品の営業担当者までお問い合わせください。
2. Neogen病原菌自動検出システムの装置の電源を入れます。
3. 各検体のデータを含む検出結果を作成、編集します。詳細については、Neogen病原菌自動検出システムユーザーマニュアルを参照してください。
 - 3.1. ソフトウェアのSTXEAE-2アイコンを選択すると、隣接する2つのウェル(例:A1、A2、B1、B2)が選択されます。2つのアッセイを用いて各検体を測定するため、*stx*試薬チューブおよび*eae*試薬チューブごとにウェルが1つ選択されます。各試薬チューブ用にNCが配置され、キット用に1つのRCが配置されます。



注:Neogen病原菌自動検出システムは、反応チューブと共にNeogen病原菌検出スピードローダートレイを入れる前に、スタンバイ状態になっ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、装置のステータスバーがオレンジ色に点灯します。装置の準備ができると、ステータスバーは緑色に変わります。

ライシス

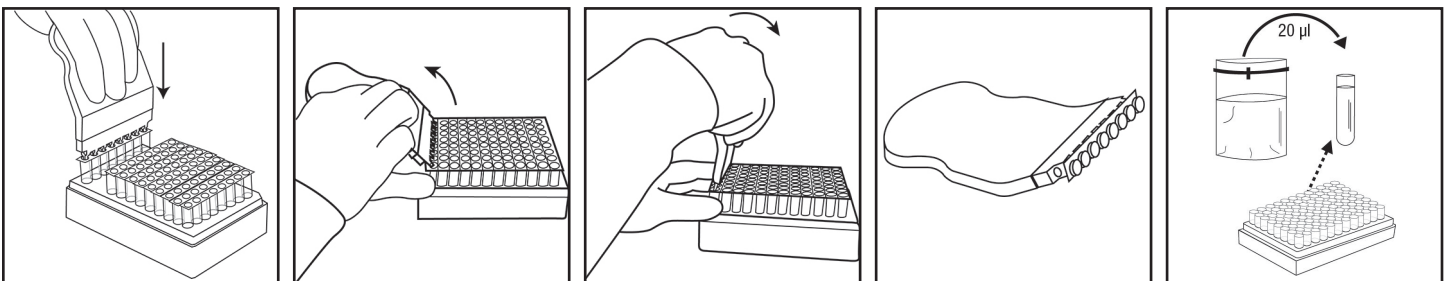
Neogen病原菌検出ヒートブロックインサートに入れる前に、ドライバーまたはスパークテルでNeogenライシスチューブブラックの底部を取り外します。



1. Neogenライシスチューブは、ラックに一晩(16~18時間)静置して、室温(20~25°C)に戻します。Neogenライシスチューブを室温に戻す別の方法としては、Neogenライシスチューブを作業台の上に2時間以上静置するか、Neogenライシスチューブを37 ± 1°Cの培養器内で1時間保温するか、Neogenライシスチューブをドライダブルブロックヒーターに入れて100°Cで30秒間加熱します。
2. キャップを閉めた状態のライシスチューブを反転させて中の液を混合させます。反転後4時間以内に次のステップに進みます。
3. 培養器から増菌済みブロスを取り出します。
4. 各検体およびNC(滅菌増菌ブロス)につきNeogenライシスチューブ1本が必要です。
 - 4.1. Neogenライシスチューブのストリップは、必要なチューブ数にカットすることができます。各チューブまたは8連チューブのストリップの数を選択してください。Neogenライシスチューブを空のラックに置きます。
 - 4.2. 交差汚染を回避するため、Neogenライシスチューブのキャップは一度に1ストリップずつ外し、滴下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. 以下に記載のとおり、増菌した検体をNeogenライシスチューブに滴下します：

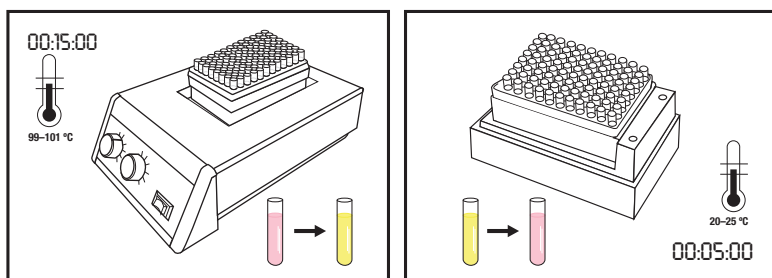
最初に、増菌した各検体を各Neogenライシスチューブに滴下します。最後にNCを滴下します。

- 4.4. Neogen® 病原菌検出キャップ/デキャップツール - ライシス、Neogenライシスチューブのキャップを一度に1ストリップずつ外します。
- 4.5. Neogenライシスチューブのキャップを廃棄します。ライシスを再検査用に保存する場合は、キャップを清潔な容器に入れておき、ライシス後に再度キャップを閉めます。
 - 4.5.1. 保存したライシスの処理については、付録Aを参照してください。
- 4.6. Neogenライシスチューブに検体20 µLを滴下します。



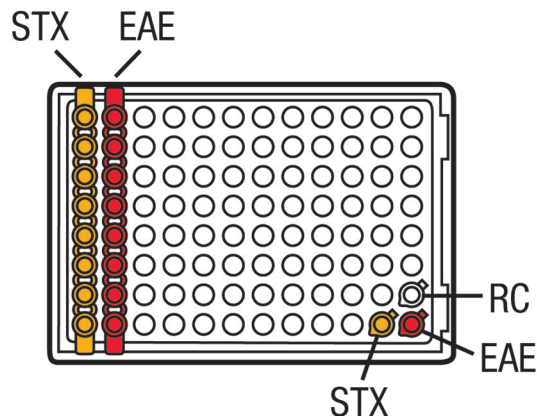
5. 検査する検体数に応じて、ステップ4.4~4.6を繰り返します。
6. すべての検体を移したら、NC(ネガティブコントロール用滅菌増菌ブロス、例:BPW) 20 µLをNeogenライシスチューブに滴下します。水は陰性コントロールとして使用しないでください。
7. Neogen病原菌検出ヒートブロックインサートの温度が100 ± 1°Cであることを確認してください。
8. Neogen病原菌検出ヒートブロックインサート内にカバーを外したNeogenライシスチューブブラックを入れて、15 ± 1分間加熱します。加熱中、Neogenライシス液はピンク色(低温)から黄色(高温)に変色します。
 - 8.1. 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考えられる可能性がありますので、Neogen病原菌自動検出システム装置内には入れないでください。
9. Neogen病原菌自動検出システム装置ヒートブロックからカバーを外したNeogenライシスチューブブラックを取り出し、Neogen病原菌検出チルブロックインサート内で5分間以上(最大10分間)冷却します。Neogen® チルブロックインサートは、実験台の上に直接置いてください。冷却されると、Neogenライシス液はピンク色に戻ります。

10. Neogen病原菌検出チルブロックインサートからNeogenライシスチューブラックを取り出します。



増幅

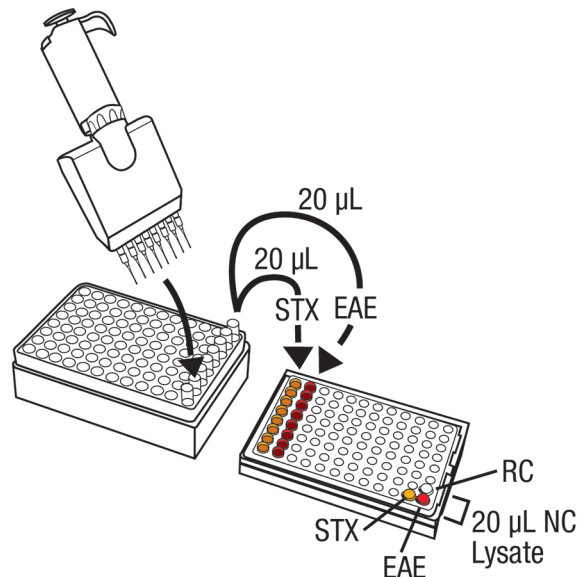
1. Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*stx*) 用およびNeogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*eae*) 用チューブが各検体およびNCにつき必要です。
 - 1.1. チューブのストリップは、必要な数に合わせてカットできます。Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*stx*) 用およびNeogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*eae*) 用の試薬チューブまたは8連チューブのストリップの数を選択してください。
 - 1.2. Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*stx*) 用チューブを1つの列の空のラックに置きます。
 - 1.3. Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*eae*) 用チューブを右隣の列に置きます。
 - 1.4. チューブの底の試薬ペレットを攪拌しないでください。
2. Neogen試薬コントロールチューブを1本選択して、ラックに置きます。
3. NCライセンスのために、Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*stx*) 用およびNeogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*eae*) 用の試薬チューブを各1本選択して、ラックに置きます。



4. 交差汚染を回避するため、Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*stx/eae*) 用試薬チューブのキャップは一度に1ストリップずつ外し、滴下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。
5. 下記のように、各ライシスをNeogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*stx/eae*) 用試薬チューブに滴下してください。
 - 5.1. 最初に、5.5および5.6に記載のとおり、各検体ライシスをNeogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*stx*) 用の試薬チューブに滴下してください。
 - 5.2. 次に、5.5および5.6に記載のとおり、各同一の検体ライシスを右隣の列にあるNeogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*eae*) 用試薬チューブに滴下してください。

注：滴下ごとに新しいピペットチップを使用してください。同一のライシス検体を *stx* および *eae* 試薬チューブに滴下する際に、同一のピペットチップを使用しないでください。

- 5.3. すべての検体ライシス滴下後、NCライシスをNeogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*stx*) 用およびNeogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*eae*) 用の各試薬チューブに添加します。
- 5.4. NCライシスを試薬コントロールチューブに滴下します。



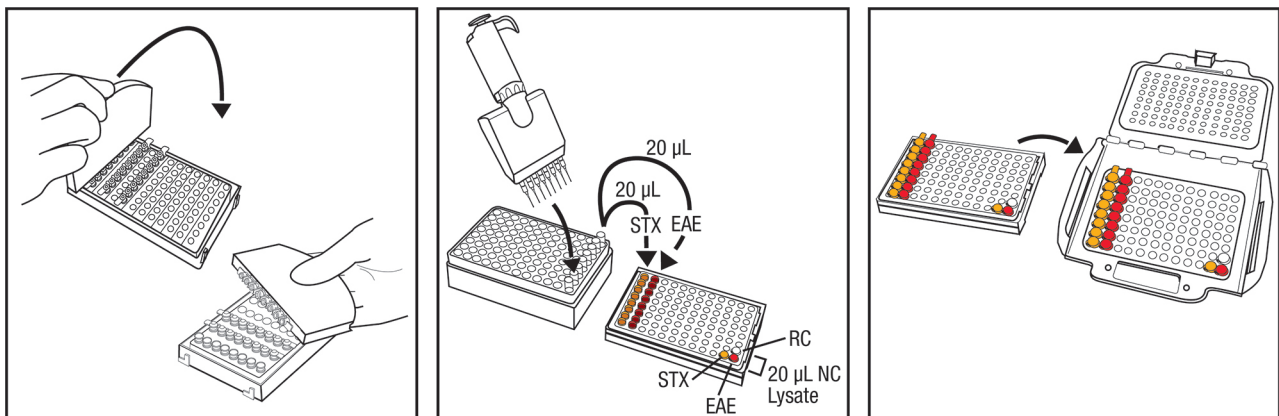
- 5.5. Neogen® 病原菌検出キャップ/デキャップツール 試薬用を使用して、Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*stx/eae*) 用試薬チューブのキャップを一度に1ストリップずつ外します。キャップを廃棄します。
- 5.6. 検液20 µLをNeogenライシチューブの液体の上部1/2 (沈澱物は避けてください) から取り、対応するNeogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*stx/eae*) 試薬チューブに分注します。ペレットが攪拌されないよう、一定の角度で分注します。ピペット操作で5回静かに混合します。

注：滴下ごとに新しいピペットチップを使用してください。同一のライシ検体を *stx* および *eae* 試薬チューブに滴下する際に、同一のピペットチップを使用しないでください。

- 5.7. 個々の検体ライシをストリップ内の対応するNeogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*stx/eae*) 用試薬チューブに添加するまで、ステップ5.6を繰り返します。
- 5.8. Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*stx/eae*) 用試薬チューブに同梱の予備キャップで蓋をし、Neogen病原菌検出キャップ/デキャップツール - 試薬用の丸い側を使用して前後に圧をかけ、キャップをしっかりと締めます。
- 5.9. Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*stx/eae*) 用の試薬チューブの検査する検体数に応じて、ステップ5.6から5.8を繰り返します。
- 5.10. すべての検体ライシ滴下際には、ステップ5.6から5.8を繰り返し、NCライシ20 µLをNeogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*stx*) 用およびNeogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*eae*) 用の各試薬チューブに滴下します。
- 5.11. NeogenリエージェントコントロールチューブにNCライシ液20 µLを滴下します。ペレットが攪拌されないよう、一定の角度で分注します。ピペット操作で5回静かに混合します。

Neogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*stx/eae*) 用の各試薬チューブにまず各検体溶解物を滴下し、次にNCを滴下します。最後にNeogen試薬コントロールチューブを水和します。

6. 清潔な、殺菌済みNeogen病原菌検出スピードローダートレイにキャップをしたチューブを装填し、蓋を閉め、掛け金を掛けます。



7. Neogen病原菌自動検出システム用ソフトウェアで設定した検査内容を確認します。
8. ソフトウェアのスタートボタンをクリックして、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病原菌自動検出システムの装置内にNeogen病原菌検出スピードローダートレイを置き、蓋を閉めてアッセイをスタートします。結果は60分ほどで判定されますが、陽性の場合にはもっと早く検出されます。
10. アッセイ終了後、Neogen病原菌検出スピードローダートレイをNeogen病原菌自動検出システムの装置から取り出し、チューブは水で1~5% (v/v) に希釈した家庭用漂白液に1時間浸漬した後、アッセイの準備作業領域から隔離して、廃棄してください。

注記:交差汚染による偽陽性の危険を最小限に抑えるため、増幅DNAの入っ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病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (*stx/eae*) 用試薬、Neogen試薬コントロール、Neogenマトリックスコントロールチューブが含まれます。汚染されたチューブは、常に、水で1~5% (v/v) に希釈した家庭用漂白液に1時間浸漬した後、アッセイの準備作業領域から隔離して、廃棄してください。

結果と解釈







アルゴリズムが核酸増幅の結果より得られた光出力曲線を解釈します。結果はソフトウェアが自動的に解析し、結果に応じて色分けされます。陽性または陰性の結果は、それぞれが持つ固有の曲線パラメータを解析することにより特定されます。結果が陽性と推定される場合はリアルタイムでレポートされますが、陰性および再検査 (検証が必要な結果) の場合は、その検査が完了した後に表示されます。

Neogen病原菌自動検出システム用のソフトウェアはアッセイごと (*stx*および*eae*) に別々の結果を表示し、両方のアッセイ結果をもとにSTEC (EHEC) 陽性または陰性の判定を行います (下図参照)。両方の標的遺伝子 (*stx1*および/または*stx2*および*eae*) が陽性になった場合、STEC (EHEC) 推定陽性と判断します。個々のアッセイにエラーもしくは再検査の表示が出た場合、最終結果もエラーになるため、再検査を行ってください。正確な最終結果を得るには、再検査が必要です (結果キーを参照してください)。必要に応じて、個々のアッセイをソフトウェアで設定することが可能です。付録Aに記載されている保存したライシスの処理ステップおよびライシスと増幅セクションに記載されている保存した増菌の処理ステップ後にアッセイを用いて、増菌後の検体ライシスおよび新鮮なライシスを再検査することが可能です。

検体の結果

	両者共に陽性、最終結果陽性
	<i>stx</i> 陽性、 <i>eae</i> 陰性、最終結果陰性
	<i>stx</i> 陽性、 <i>eae</i> 再検査、最終結果再検査、再テスト
	<i>stx</i> 陽性、 <i>eae</i> エラー、最終結果エラー、再テスト
	<i>stx</i> 陰性、 <i>eae</i> 陽性、最終結果陰性
	<i>stx</i> 陰性、 <i>eae</i> 陰性、最終結果陰性
	<i>stx</i> 陰性、 <i>eae</i> 再検査、最終結果再検査、再テスト
	<i>stx</i> 陰性、 <i>eae</i> エラー、最終結果エラー、再テスト
	<i>stx</i> 再検査、 <i>eae</i> 陽性、最終結果再検査、再テスト
	<i>stx</i> 再検査、 <i>eae</i> 陰性、最終結果再検査、再テスト
	<i>stx</i> 再検査、 <i>eae</i> 再検査、最終結果再検査、再テスト
	<i>stx</i> 再検査、 <i>eae</i> エラー、最終結果エラー、再テスト
	<i>stx</i> エラー、 <i>eae</i> 陽性、最終結果エラー、再テスト
	<i>stx</i> エラー、 <i>eae</i> 陰性、最終結果エラー、再テスト
	<i>stx</i> エラー、 <i>eae</i> 再検査、最終結果エラー、再テスト
	<i>stx</i> エラー、 <i>eae</i> エラー、最終結果エラー、再テスト

陰性コントロールキー






	両者共に有効、有効なリンク
	片方は有効、もう片方はエラー、リンクエラー、再テスト
	片方は有効、もう片方は無効、無効なリンク、再テスト
	両者共にエラー、リンクエラー、再テスト
	両者共に無効、無効なリンク、再テスト
	片方はエラー、もう片方は無効、リンクエラー、再テスト

陽性と推定される検体は、検査室の標準作業手順書、または適切な参照法^(1,2,3)に従って確認する必要があります。まず、一次前増菌ブロスを選択的プレートに移し、適切な生化学的、血清学的手法を使用して単離菌を確認してください。選択培地で培養する前に免疫磁気ビーズ法 (IMS) を実施し、MLG 5Cで指定されているマトリックスを準備する必要があります。

注: システムおよびNeogen 病原菌検出アッセイ2 - STEC遺伝子スクリーニング (stx/eae) 増幅試薬が「バックグラウンド」相対発光量 (RLU) を示すことから、陰性検体でも読取り値がゼロになりません。

異常な光出力がみられるなどの稀なケースについては、アルゴリズムがこれを「再検査してください」と表示します。Neogen社はお客様に、「再検査」検体に対して検査を再度行うことを推奨します。その結果が続けて再検査であった場合は、任意の別の方法^(1,2,3)または行政の規制によって指定されたとおりに確認検査を行ってください。

表4. ソフトウェア結果の記号と情報。

ウェルタイプ	ウェルの結果の記号	結果	判定
検体		陽性	検体の標的病原体について陽性と推定されます。
検体		陰性	検体の標的病原体について陰性と推定されます。
検体		阻害	検体基質がアッセイを阻害しました。差異検査が必要な場合があります。詳細については、トラブルシューティングセクションおよびアッセイキット製品情報を参照してください。
検体		検証が必要	標的病原体の有無が確定できませんでした。差異検査が必要な場合があります。詳細については、トラブルシューティングセクションおよびアッセイキット製品情報を参照してください。
検体		エラー	生物発光が検出されませんでした。差異検査が必要な場合があります。詳細については、トラブルシューティングセクションおよびアッセイキット製品情報を参照してください。

付録A. プロトコルの中断: 検体の保管と再検査

1. 加熱処理済みライシスを保管するには、Neogenライシスチューブに清潔なキャップを閉めます(「ライシス」セクション、4.5を参照)。
2. 前増菌した検体を保管するには、保管前に最低18時間培養してください。
3. 4~8°Cで最大72時間保管します。
4. 保管された検体を2-3回反転させて混合し、増幅用として準備します。
5. チューブのキャップを外します。
6. 混合したライシスチューブをNeogen病原菌検出ヒート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病原菌検出ヒートブロックからNeogenライシスチューブブラックを取り出し、Neogen病原菌検出チルブロックインサート内で5分間以上(最大10分間)冷却します。
8. 上記の「増幅」セクションに詳述されているプロトコルを継続します。

参考文献:

1. Microbiology Laboratory Guidebook. U. S. Department of Agriculture (USDA) Food Safety and Inspection Service (FSIS) Microbiology Laboratory guidebook 5C.00. Detection and isolation of top seven Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STECs) from meat products and carcass and environmental sponges. Feb 4, 2019.
2. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. October 2018.
3. ISO/TS 13136:2012: Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups
4. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good laboratory practice for nonclinical laboratory studies.
5. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
6. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examination.
7. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.

記号の説明

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar 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 Leshar Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00918A

分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因)

产品说明及预期用途

Neogen® 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因) 旨在与 Neogen® 分子检测系统一起使用, 用于快速、专门检测增菌后的食品 and 食品加工环境样品中的产志贺毒素大肠埃希氏菌 (STEC, 也称作“产 Verotoxins 大肠埃希氏菌”) 的志贺毒素基因 (*stx1* 和/或 *stx2* 基因) 和紧密素基因 (*eae* 基因)。STEC 一词指的是可以产生 1 型 (Stx1)、2 型 (Stx2) 志贺毒素或两者的致病性大肠埃希氏菌 (分别采用 *stx1* 和 *stx2* 基因编码)。含有 *stx1* 和/或 *stx2* 以及 *eae* (涉及附着和消除表型的紧密素基因) 致病基因的 STEC 被称作肠出血性大肠埃希氏菌 (EHEC)。筛查试剂盒包含两支独立的试剂管, 一支用于检测致病基因 *stx1* 和/或 *stx2*, 另一支用于检测 STEC (EHEC) 中的 *eae*。Neogen® 分子检测系统软件会单独报告每个检测的结果, 并使用两个检测得出的结果来鉴定样品中的 STEC (EHEC) 阳性或阴性。如推定 STEC (EHEC) 阳性, 则两个靶基因 (*stx1* 和/或 *stx2* 以及 *eae*) 都必须为阳性。*stx* 检测无法区分 *stx1* 和 *stx2*, 但可以检测是否存在 *stx1* 和/或 *stx2*。

Neogen 分子检测试剂盒采用环介导等温扩增技术来快速扩增核酸序列, 其具有特异性强、灵敏度高的特点, 并结合生物发光特性来检测扩增反应。假定阳性结果将实时报告, 阴性结果则在分析完成后显示。应使用您喜欢的方法或按照当地法规指定的方法^(1, 2, 3) 确认假定阳性结果。

Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因) 专供受过实验室技术培训的专业人员在实验室环境下使用。对于在食品或饮料以外的行业中使用此产品, Neogen 尚未有资料可证。例如, 对于将此产品用于检测制药、化妆品、临床或家畜样品, Neogen 尚未有资料可证。尚未针对所有可能的食品产品、食品加工、检测方案或针对所有可能的细菌类型评估 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因)。

正如所有检测方法一样, 增菌培养基的来源、配方和质量都可能影响结果。 取样方法、检测方案、样品制备、处理和实验室技术等因素都可能影响结果。Neogen 建议在用户环境中利用充足数量的样品以及特定的食品和微生物激发试验对包括增菌培养基在内的方法进行评估, 确保相应的方法符合用户的标准。

Neogen 已针对 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因) 与缓冲蛋白胨水 (BPW)-ISO 增菌肉汤的联合使用进行了评估。

Neogen® 分子检测仪器专用于在分析裂解步骤中经过热处理的样品, 该步骤旨在破坏样品中存在的微生物。未在分析裂解步骤中经过适当热处理的样品可能会被视为具有潜在生物危害性, 不应将其插入 Neogen 分子检测仪器。

Neogen 食品安全部的产品设计和生产已获得 ISO (国际标准化组织) 9001 认证。

Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因) 中包含 48 支 *stx* 和 *eae* 试剂检测反应管, 详细信息请见表 1。

表 1. Neogen 分子检测试剂盒构成。

项目	标识	数量	内容物	备注
Neogen® 裂解溶液 (LS)	透明管, 粉红溶液	96 (12 排, 每排 8 管)	每管 580 µL LS	已上架, 即开即用
Neogen® 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (<i>stx</i> 基因) 试剂管	橙色管	48 (2 袋; 3 排, 每排 8 管)	特定扩增和检测试剂的冻干样	即开即用
Neogen® 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (<i>eae</i> 基因) 试剂管	红色管	48 (2 袋; 3 排, 每排 8 管)	特定扩增和检测试剂的冻干样	即开即用
额外的盖	橙色盖	96 (12 排, 每排 8 个盖)		即开即用
额外的盖	红色盖	96 (12 排, 每排 8 个盖)		即开即用
Neogen® 试剂对照 (RC)	透明翻盖管	16 (2 袋, 每袋 8 管)	DNA、扩增和检测试剂的冻干对照品	即开即用

阴性对照 (NC) 采用的是无菌增菌培养基 (如 BPW-ISO), 未在检测试剂盒中提供。请勿将水用作 NC。

如需获取快速入门指南, 请访问 www.neogen.com



安全

用户应阅读、理解并遵守 Neogen 分子检测系统和 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因) 说明中提供的所有安全信息。妥善保存安全说明书, 以备日后查阅。

警告: 表示危险情况, 如果不注意避免, 可能造成死亡或严重的人身伤害和/或财产损失。

注意: 表示潜在的危险情况, 如果不注意避免, 可能导致财产损失。

警告

请勿在人类或动物的各种诊断中使用 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因)。

用户必须就当前适用的检测技术对其人员进行培训, 例如: 优良实验室规范⁽⁴⁾、ISO/IEC 17025⁽⁵⁾ 或 ISO 7218⁽⁶⁾。

为了降低与假阴性结果相关的风险, 避免释放出受污染产品, 请注意以下事项:

- 遵守操作流程并按照产品信息中提供的方法执行检测。
- 按照包装和产品信息中的指示储存 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因)。
- 始终在过期日期之前使用 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因)。
- 将 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因) 用于经内部或第三方验证的食品和环境样品。
- 仅将 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因) 用于经内部或第三方验证的表面、消毒剂、方案和菌株。
- 对于含有中和缓冲液和芳基磺酸酯复合物的环境样品, 应在检测前按 1:2 的比例进行稀释 (1 份样品对 1 份无菌增菌肉汤)。另一种选择是将 10 μ L 的中和缓冲液转移至 Neogen 裂解溶液管内。含有中和缓冲液和芳基磺酸酯复合物的 Neogen[®] 采样产品包括: RS96010NB、RS9604NB、SSL10NB、SSL10NB2G、HS10NB、HS10NB2G 和 HS2410NB2G。

为了降低与化学品和生物危害暴露相关的风险, 请注意以下事项:

- 在训练有素的工作人员的控制下, 于妥善配备的实验室中执行致病菌检测。增菌培养基以及接触过增菌培养基的设备或表面可能含有致病菌, 足以对人体健康造成风险。
- 始终遵守标准实验室安全规范, 包括在处理试剂和受污染样品时穿戴适当的防护服和护眼装置。
- 避免接触增菌培养基和扩增后试剂管的内容物。
- 根据当地/地区/国家法规标准的现行要求对经过增菌的样品进行废弃处理。
- 未在分析裂解步骤中经过适当热处理的样品可能会被视为具有潜在生物危害性, 不应将其插入 Neogen 分子检测仪器。

为了在准备分析时降低与交叉污染相关的风险, 请注意以下事项:

- 始终戴手套 (保护用户和防止引入核酸酶)。

为了降低与高温液体暴露相关的风险, 请注意以下事项:

- 不要超出建议的加热器温度设置。
- 不要超出建议的加热时间。
- 使用正确的经过校准的温度计检验 Neogen[®] 分子检测加热模块的温度 (例如, 局浸温度计或热电偶数字温度计, 而非全浸温度计)。温度计必须放置于 Neogen 分子检测加热模块中的指定位置。

注意

为了在准备分析时降低与交叉污染相关的风险, 请注意以下事项:

- 在进行试剂小球水化之前更换手套。
- 建议使用无菌的、带气溶胶屏障 (带滤芯) 的分子生物级移液吸头。
- 每次转移样品时使用新的吸头。
- 将样品从增菌培养基转移至裂解管时遵循实验室良好操作规范。为了避免移液管污染, 用户可以选择增加一个中间转移步骤。例如, 用户可以将每个经过增菌的样品转移至无菌管中。
- 使用配有杀菌灯的分子生物工作站 (如可行)。
- 使用 1-5% (与水的体积比) 家用漂白溶液或 DNA 去除溶液定期净化实验室工作台和设备 (移液管、开盖器等)。

为了降低与假阳性结果相关的风险, 请注意以下事项:

- 请勿在扩增后打开试剂管。
- 处理受污染的试管时, 应将其放在浓度为 1-5% (与水的体积比) 的家用漂白溶液中浸泡 1 小时, 且始终远离分析准备区。
- 请勿在扩增后对试剂管进行高压灭菌。

请参考“安全数据表”了解其它信息和当地的弃置法规。

如果您对于特定的应用或程序存有疑问, 请访问我们的网站 www.neogen.com, 也可与您当地的 Neogen 代表或经销商联系以获得帮助。

用户责任

用户有责任熟悉产品信息和说明。请访问我们的网站 www.neogen.com 或联系您当地的 Neogen 代表或经销商, 以了解更多信息。

选择检测方法时, 务必认识到各种外部因素(如取样方法、检测方案、样品制备、处理、实验室技术和样品本身)都可能会影响结果。

用户在选择检测方法或产品时, 应自行负责选用合适的基质和微生物激发试验对足够多的样品进行评估, 以确保所选择的检测方法达到用户的标准。

检测方法及其结果能否满足客户及供应商的要求也由用户负责。

同所有检测方法一样, 使用任何 Neogen 食品安全部产品所得到的结果并不能保证受检基质或程序的质量。

为帮助客户评估各种食品基质方法, Neogen 开发了 Neogen® 分子检测基质对照试剂盒。需要时, 可以使用 Neogen 分子检测基质对照 (MC) 来确定基质是否会影响 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因) 的结果。在采用 Neogen 方法或在检测新的或未知基质或者原材料或工艺发生变更的基质的任何验证期间, 应对若干典型的基质样品进行检测, 即通过不同来源获取的样品。

基质可定义为一种具备内源特性(如化学成分或工艺)的产品。基质间的差异是因加工或外观的不同而导致的差异, 例如原样和经过巴氏消毒处理之间的差异以及新鲜和干燥之间的差异。

有限保证/有限补救措施

除非各个产品包装的有限保证部分明确声明, 否则, NEOGEN 将不提供任何明示或默示保证, 包括但不限于适销性或特定用途适用性保证。如果证明任何 Neogen 食品安全部产品存在缺陷, Neogen 或其授权经销商可以自行决定是提供换货, 还是对产品进行退款。这是向您提供的唯一补救方案。您必须在发现产品存在任何可疑缺陷的 60 天内立即通知 Neogen, 并将该产品退还给 Neogen。如有任何疑问, 请联系 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、间接、特殊、偶然或非直接原因造成的损害, NEOGEN 概不承担任何责任, 包括但不限于利润损失。根据法律理论, Neogen 对所谓存在缺陷的产品的赔付不会超过产品的购买价格。

储存和弃置

在 2-8°C (35-47°F) 温度下储存 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因)。请勿冷冻。避光储存试剂盒。打开试剂盒后, 应检查铝箔袋是否破损。如果铝箔袋破损, 请勿使用。打开之后, 未使用的试剂管应始终储存在内部带有干燥剂的可重新密封铝箔袋中, 以保持冻干试剂的稳定性。将重新密封的铝箔袋储存在 2-8°C (35-47°F) 温度下, 但储存时间不能超过 90 天。

请勿使用过期的 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因)。过期日期和批号注明在包装箱外侧的标签上。使用之后, 增菌培养基和 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因) 试剂管可能含有致病物质。完成检测后, 应遵照当前的行业标准弃置受污染的废弃物。请参考“安全数据表”了解其它信息和当地的弃置法规。

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。

使用 1-5% (与水的体积比) 家用漂白溶液或 DNA 去除溶液定期净化实验室工作台和设备 (移液管、开盖器等)。

用户应当遵照“针对 Neogen 分子检测系统的安装合格 (IQ)/操作合格 (OQ) 方案和说明”文档⁽⁷⁾中的规定接受 Neogen 分子检测系统操作员资格验证 (OQ) 培训。

请参见“验证方法具体说明”部分, 了解特定要求:

表 3: 符合 *Performance Tested Method*SM (PTM) 证书 #071902 的增菌方案。

样品增菌

表 2 和表 3 提供了针对食品的一般增菌方案指导。

用户有责任验证备用取样方案或者稀释率, 以确保本检测方法符合用户的标准。

食品

1. 让 BPW ISO 增菌培养基平衡到 $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ 。
2. 在无菌环境下将增菌培养基和样品进行混合。对于所有肉类和微粒样品, 建议使用过滤袋。
3. 将所有基质混合并按照相应的方案表进行培养 (参见表 2 或表 3)。



环境样品

警告:如果您选择使用含芳基磷酸酯复合物的中和缓冲液作为海绵的水化溶液,则必须在检测之前按 1:2 的比例(1 份样品对 1 份无菌增菌肉汤)稀释增菌的环境样品,以降低导致受污染产品释放的假阴性结果的相关风险。另一种选择是将 10 μL 的中和缓冲培养液转移至 Neogen 裂解溶液管内。

用户有责任验证备用取样方案或者稀释率,以确保本检测方法符合用户的标准。

表 2. 通用增菌方案。

样品基质	样品大小	增菌肉汤量 (mL) (预热)	增菌温度 (± 1°C)	增菌时间 (小时)	样品分析量 (μL)
生的碎牛肉、肉块和切下的肉 ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO	41.5	10-18	20
生肉(猪肉、家禽、羔羊肉和野牛肉) ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO	41.5	10-18	20
叶菜类农产品 ^(b)	200 g	450 BPW-ISO	41.5	18-24	20
豆芽 ^(c)	25 g	225 BPW-ISO	41.5	18-24	20
生奶 ^(d)	25 g 或 25 mL	225 BPW-ISO	41.5	18-24	20

^(a) 加入预热的 BPW-ISO 后,用手揉搓牛肉(碎牛肉、肉块和切下的肉)和生肉(碎猪肉、家禽肉以及牛肉以外的肉类)样品 30-60 秒使肉块分散。

^(b) 对于叶菜类农产品,将增菌肉汤(预热的 BPW-ISO)浇在叶子上并轻轻搅动 30-60 秒。切勿揉搓叶子或使其均质化。

^(c) 对于豆芽,将增菌肉汤(预热的 BPW-ISO)浇在豆芽上(持续 30-60 秒),切勿揉搓豆芽或使其均质化。

^(d) 加入预热的 BPW-ISO 后,摇晃生奶样品 30 至 60 秒,使其混匀。

验证方法具体说明

AOAC® *Performance Tested Method*SM (PTM) 证书 #071902



AOAC 研究所 PTMSM 研究结果显示, Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因) 是一种有效的 STEC 检测方法。研究中检测的基质显示在表 3 中。

表 3. 符合 AOAC PTMSM 证书 #071902 的增菌方案。

样品基质	样品大小	增菌肉汤量 (mL)	增菌温度 (± 1°C)	增菌时间(小时)	样品分析量 (μL)
生肉块 ^(a)	375 g	1125 BPW ISO (预热)	41.5	10-18	20
生的碎牛肉 ^(a)	375 g	1125 BPW ISO (预热)	41.5	10-18	20
生的碎牛肉 ^(a)	25 g	225 BPW ISO (预热)	41.5	10-18	20
生的碎猪肉 ^(a)	375 g	1125 BPW ISO (预热)	41.5	10-18	20
生禽产品 ^(a)	375 g	1125 BPW ISO (预热)	41.5	10-18	20
鸡肉糜	25 g	225 BPW-ISO (预热)	41.5	10-24	20
菠菜 ^(b)	200 g	450 BPW ISO (预热)	41.5	18-24	20
豆芽 ^(c)	25 g	225 BPW ISO (预热)	41.5	18-24	20
干燥的大麻花、干燥的汉麻花 ⁽⁴⁾	10 g	90 BPW-ISO	41.5	28-32	20



- (a) 对于牛肉样品(碎牛肉和肉块), 将预热的 BPW-ISO 加入牛肉样品。用手揉搓 30-60 秒使肉块分散。
- (b) 对于菠菜, 将预热的 BPW-ISO 加入基质。将液体浇在叶子上并轻轻搅动 30-60 秒。切勿揉搓叶子或使其均质化。
- (c) 对于豆芽, 将增菌肉汤(预热的 BPW-ISO) 浇在豆芽上(持续 30-60 秒), 切勿揉搓豆芽或使其均质化。
- (d) 干燥的大麻花 (>0.3% THC) 和干燥的汉麻花 (≤0.3%THC)

Neogen® 分子检测快速转移托盘的准备工作

1. 将一块干布或一次性纸巾用 1-5% (与水的体积比) 家用漂白溶液浸湿, 用来擦拭 Neogen 分子检测快速转移托盘。
2. 用清水清洗 Neogen 分子检测快速转移托盘。
3. 使用一次性纸巾擦干 Neogen 分子检测快速转移托盘。
4. 使用前确保 Neogen 分子检测快速转移托盘保持干燥。

Neogen® 分子检测冷却架的准备工作

将 Neogen 分子检测冷却架直接置于实验室工作台上: 无需使用 Neogen 分子检测冷却模块托盘。在实验室环境温度 (20-25°C) 下使用模块。

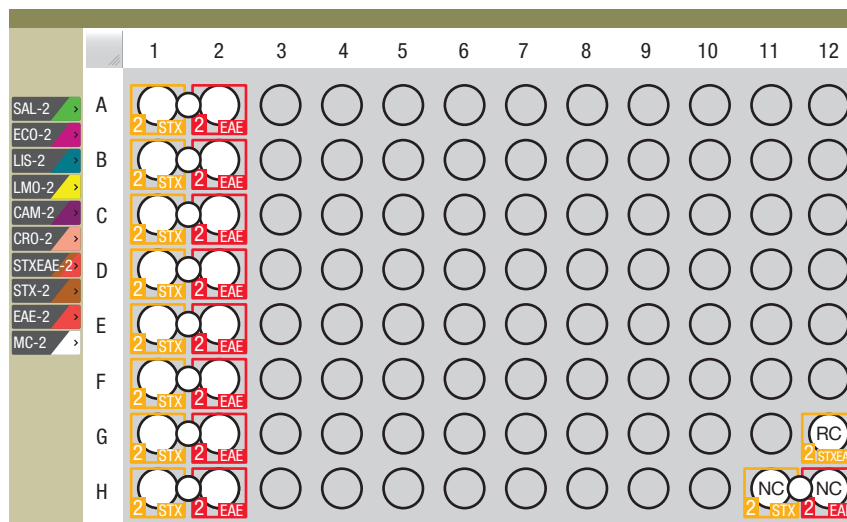
Neogen® 分子检测加热模块的准备工作

将 Neogen 分子检测加热模块放入双干燥块加热器中。开启干燥模块加热装置并设定温度, 使 Neogen 分子检测加热模块达到并保持 100 ± 1°C。

注释:根据不同的加热器, 允许 Neogen 分子检测加热模块在大约 30 分钟后达到工作温度。使用放在指定位置的、正确的、经过校准的温度计(如局浸温度计或热电偶数字温度计, 而非全浸温度计) 检验 Neogen 分子检测加热模块的温度是否达到 100 ± 1°C。

Neogen® 分子检测仪器的准备工作

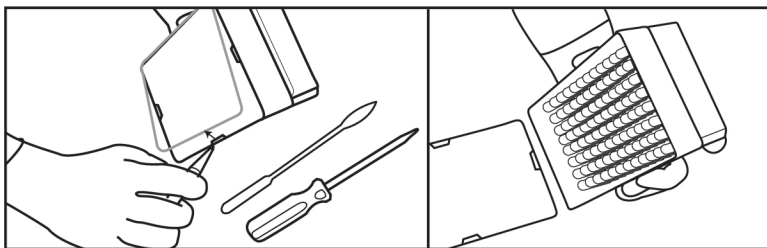
1. 启动 Neogen 分子检测系统软件并登录。请联系您的 Neogen 食品全部代表, 确保您使用的是最新版的软件。
2. 打开 Neogen 分子检测仪器。
3. 利用每个样品的数据为其创建或编辑一次运行检测。请参考“Neogen 分子检测系统用户手册”了解详细信息。
 - 3.1. 在软件中选择 STXEAE-2 图标即可选定两个相邻的孔(例如 A1、A2、B1、B2 等), 一个用于 *stx* 试剂管, 另一个用于 *eae* 试剂管, 因为每个样品要进行两种检测运行。已为每支试剂管设置了 NC, 并为试剂盒设置了一个 RC。



注释:插入带反应管的 Neogen 分子检测快速转移托盘前, Neogen 分子检测仪器必须处于就绪状态。此加热步骤大概需要 20 分钟, 由仪器状态栏中的一个“橙色”灯进行指示。当仪器准备好启动检测时, 状态栏将变为“绿色”。

裂解

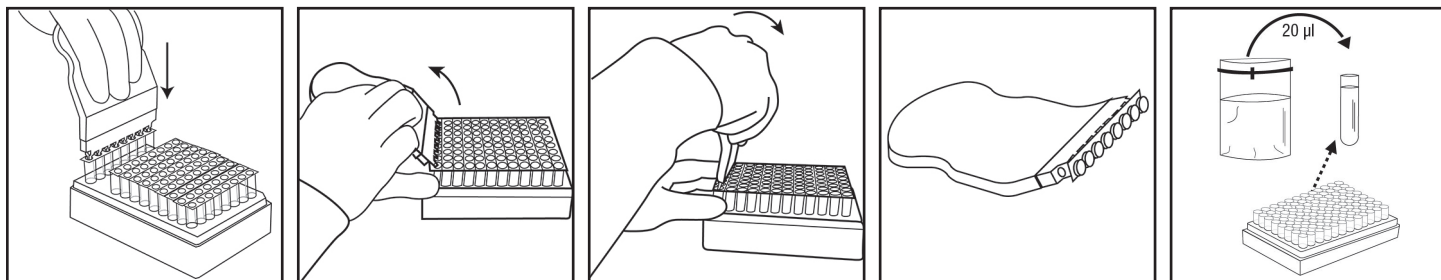
请用螺丝刀或抹刀移除 Neogen 裂解溶液管架的底部, 然后再将其置于 Neogen 分子检测加热模块中。



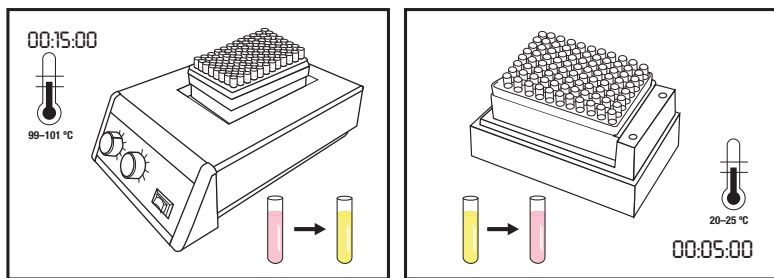
1. 将管架置于室温 (20-25°C) 环境下一整夜 (16-18 小时), 让 Neogen 裂解溶液管预热。使 Neogen 裂解溶液管平衡到室温的另一种方法是将 Neogen 裂解溶液管放在实验室工作台上至少 2 小时、在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养设备中培养 Neogen 裂解溶液管 1 小时, 或将其置于双干燥块加热器中在 100°C 下持续加热 30 秒。
2. 倒置封盖的裂解溶液管, 使其混合均匀。在倒置后 4 小时内继续执行下一步。
3. 从培养设备中取出增菌样品。
4. 每个样品和 NC (无菌增菌培养基) 都需要一支 Neogen 裂解溶液管。
 - 4.1. 可以根据所需的试管数, 对 Neogen 裂解溶液联排管进行切割。选择所需数量的试管或 8 联排管。将 Neogen 裂解溶液管放入空管架中。
 - 4.2. 为了避免交叉污染, 请一次仅打开一排 Neogen 裂解溶液管的管盖, 并且每次转移溶液时使用新的移液吸头。
 - 4.3. 按如下所述将经过增菌的样品转移到 Neogen 裂解溶液管:

首先将每个经过增菌的样品转移到单个 Neogen 裂解溶液管中。**最后**转移 NC。

- 4.4. 使用 Neogen® 分子检测开盖器 - Lysis 打开 Neogen 裂解溶液联排管的管盖, 一次仅打开一排。
- 4.5. 丢弃 Neogen 裂解溶液管的管盖 - 如果要保留裂解液以重新检测, 请将管盖放入干净的容器中, 以备裂解后重新使用。
 - 4.5.1. 如需处理保留的裂解液, 请参阅附录 A。
- 4.6. 将 $20 \mu\text{L}$ 样品转移到 Neogen 裂解溶液管内。

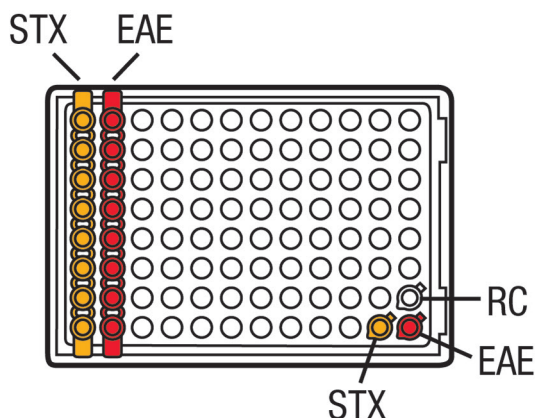


5. 根据需要对待检测的样品重复步骤 4.4 到 4.6。
6. 当转移完所有样品后, 将 $20 \mu\text{L}$ 的 NC (无菌增菌培养基, 如 BPW) 转移到一支 Neogen 裂解溶液管中。请勿将水用作 NC。
7. 检验 Neogen 分子检测加热模块的温度是否达到了 $100 \pm 1^\circ\text{C}$ 。
8. 将未加盖的 Neogen 裂解溶液管架放入 Neogen 分子检测加热模块中加热 15 ± 1 分钟。加热期间, Neogen 裂解溶液将从粉红色 (冷) 变为黄色 (热)。
 - 8.1. 未在分析裂解步骤中经过适当热处理的样品可能会被视为具有潜在生物危害性, 不应将其插入 Neogen 分子检测仪器。
9. 从 Neogen 分子检测加热模块中取出未加盖的 Neogen 裂解溶液管架, 将其放入 Neogen 分子检测冷却架中冷却至少 5 分钟, 最长 10 分钟。如果 Neogen 分子检测冷却架在环境温度下不与 Neogen® 分子检测冷却模块托盘配套使用, 则应将其直接置于实验室工作台上。冷却后, Neogen 裂解溶液将恢复为粉红色。
10. 从 Neogen 分子检测冷却架上移除 Neogen 裂解溶液管架。



扩增

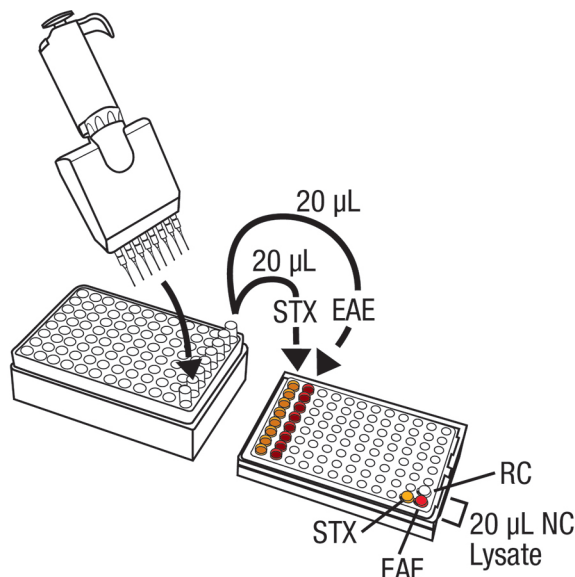
1. 每个样品和 NC 都需要一支 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因) 和一支 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*eae* 基因) 试剂管。
 - 1.1. 根据所需的试管数, 对联排管进行切割。选择所需数量的 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因) 和 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*eae* 基因) 试剂管或 8 联排管。
 - 1.2. 将 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因) 试剂管放入一列空管架中。
 - 1.3. 将 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*eae* 基因) 试剂管放在右侧相邻列中。
 - 1.4. 请勿将试剂小球搅离管底。
2. 选择一支 Neogen 试剂对照管并放入管架。
3. 对于 NC 裂解液, 选择一支 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因) 试剂管和一支 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*eae* 基因) 试剂管并放入管架中。



4. 为了避免交叉污染, 请一次仅打开一排 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 或 *eae* 基因) 试剂管的管盖, 并且每次转移溶液时使用新的移液吸头。
5. 按如下所述将相应的裂解液分别转移到 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 或 *eae* 基因) 试剂管。
 - 5.1. 首先, 按 5.5 和 5.6 所述将相应的样品裂解液转移到 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因) 试剂管。
 - 5.2. 然后, 按 5.5 和 5.6 所述将相同的样品裂解液转移到右侧相邻列中的 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*eae* 基因) 试剂管。

注释: 每次转移液体时使用新的吸头。请勿使用同一移液吸头将相同的样品裂解液转移到 *stx* 基因和 *eae* 基因试剂管。

- 5.3. 所有样品裂解液转移完毕后, 将 NC 裂解液添加到每一支 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因) 试剂管和 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*eae* 基因) 试剂管。
- 5.4. 最后将 NC 裂解液转移到试剂对照管。



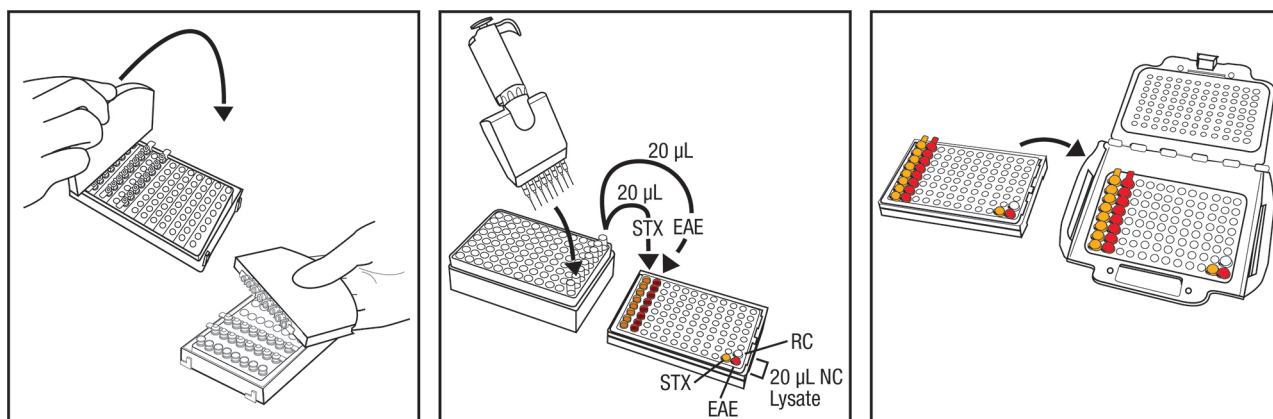
- 5.5. 使用 Neogen® 分子检测开盖器 - Reagent 打开 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 或 *eae* 基因) 试剂管的管盖, 一次仅打开一排。丢弃管盖。
- 5.6. 将 Neogen 裂解溶液管液体上部 1/2 层的 20 µL 样品裂解液(避免沉淀) 转移到对应的 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 或 *eae* 基因) 试剂管。成角度注入, 以避免搅动小球。轻轻地上下吸动 5 次, 以充分混合。

注释:每次转移液体时使用新的吸头。请勿使用同一移液吸头将相同的样品裂解液转移到 *stx* 基因和 *eae* 基因试剂管。

- 5.7. 重复步骤 5.6, 直到将所有样品裂解液添加到联排管对应的 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 或 *eae* 基因) 试剂管为止。
- 5.8. 使用额外的盖盖住 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 或 *eae* 基因) 试剂管, 并使用 Neogen 分子检测开盖器 - Reagent 较圆的一侧以前后移动的方式加压, 以确保将盖子盖紧。
- 5.9. 根据需要, 对要进行 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因) 试剂管检测的样品重复步骤 5.6 至 5.8。
- 5.10. 当所有样品裂解液转移完毕后, 重复步骤 5.6 到 5.8 以将 20 µL NC 裂解液转移到 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因) 试剂管和 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*eae* 基因) 试剂管。
- 5.11. 将 20 µL NC 裂解液转移至 Neogen 试剂对照管。成角度注入, 以避免搅动小球。轻轻地上下吸动 5 次, 以充分混合。

首先将各个样品裂解液转移到单个 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 或 *eae* 基因) 试剂管, 然后再转移 NC。最后对 Neogen 试剂对照管进行水化。

6. 将加盖的试管放入干净且经过净化处理的 Neogen 分子检测快速转移托盘中, 然后合上并锁定盖子。



7. 在 Neogen 分子检测系统软件中查看和确认配置的检测
8. 在软件中单击“启动”按钮并选择要使用的仪器。所选仪器的盖会自动打开。

- 将 Neogen 分子检测快速转移托盘放入 Neogen 分子检测仪器并合上盖子,以启动分析。结果将在 60 分钟内提供,但阳性结果可以更快检测到。
- 分析完成后,从 Neogen 分子检测仪器中取出 Neogen 分子检测快速转移托盘,通过将试管浸入 1-5% (与水的体积比) 家用漂白溶液 1 小时并使其远离分析准备区,对试管进行废弃处理。

注意:为了将因为交叉污染而导致的假阳性结果风险降至最低,请勿打开包含扩增的 DNA 的试剂管。这包括 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因) 试剂管、Neogen 试剂对照管和 Neogen 基质对照管。对密封的试剂管进行废弃处理时,应始终将其放入浓度为 1-5% (与水的体积比) 的家用漂白溶液中浸泡 1 小时,并确保其远离分析准备区。

结果和说明







软件会使用一种算法对来自核酸扩增检测的光输出曲线进行解读。软件会自动分析结果并根据不同结果用不同颜色进行标记。通过分析一系列独一无二的曲线参数可以确定阳性结果或阴性结果。“假定阳性”结果实时报告,“阴性”和“检查”结果则在检测完成后显示。

Neogen 分子检测系统软件会单独报告每个检测的结果,并使用两个检测 (*stx* 基因和 *eae* 基因) 得出的结果来鉴定样品中的 STEC (EHEC) 阳性或阴性 (见下图)。如推定 STEC (EHEC) 阳性,则两个靶基因 (*stx1* 和/或 *stx2* 以及 *eae*) 都必须为阳性。**如果任一检测显示错误或检查,则最终结果也将是错误或检查。需要再次检测以得出最终结果** (参见结果图例)。软件还允许用户根据需要设置单个检测,对于保留的裂解液,可以根据附录 A 中所述的步骤重新检测增菌物中样品裂解液或新鲜裂解液;对于保留的增菌物,可以根据“裂解”和“扩增”部分中的步骤进行重新检测。

增菌样品裂解液结果图例

	两者皆为阳性;最终结果:阳性
	<i>stx</i> 基因: 阳性; <i>eae</i> 基因: 阴性;最终结果:阴性
	<i>stx</i> 基因: 阳性; <i>eae</i> 基因: 检查;最终结果:检查; 重新检测
	<i>stx</i> 基因: 阳性; <i>eae</i> 基因: 错误;最终结果:错误; 重新检测
	<i>stx</i> 基因: 阴性; <i>eae</i> 基因: 阳性;最终结果:阴性
	<i>stx</i> 基因: 阴性; <i>eae</i> 基因: 阴性;最终结果:阴性
	<i>stx</i> 基因: 阴性; <i>eae</i> 基因: 检查;最终结果:检查; 重新检测
	<i>stx</i> 基因: 阴性; <i>eae</i> 基因: 错误;最终结果:错误; 重新检测
	<i>stx</i> 基因: 检查; <i>eae</i> 基因: 阳性;最终结果:检查; 重新检测
	<i>stx</i> 基因: 检查; <i>eae</i> 基因: 阴性;最终结果:检查; 重新检测
	<i>stx</i> 基因: 检查; <i>eae</i> 基因: 检查;最终结果:检查; 重新检测
	<i>stx</i> 基因: 检查; <i>eae</i> 基因: 错误;最终结果:错误; 重新检测
	<i>stx</i> 基因: 错误; <i>eae</i> 基因: 阳性;最终结果:错误; 重新检测
	<i>stx</i> 基因: 错误; <i>eae</i> 基因: 阴性;最终结果:错误; 重新检测
	<i>stx</i> 基因: 错误; <i>eae</i> 基因: 检查;最终结果:错误; 重新检测
	<i>stx</i> 基因: 错误; <i>eae</i> 基因: 错误;最终结果:错误; 重新检测

阴性对照图例






	两者皆有效,关联有效
	一个有效,另一个错误,关联错误,重新检测
	一个有效,另一个无效,关联无效,重新检测
	两者均为错误,关联错误,重新检测
	两者皆无效,关联无效,重新检测
	一个错误,另一个无效,关联错误,重新检测

假定阳性样品应当遵循实验室标准操作规程或正确的参考方法进行确认^(1,2,3),应首先从初步的增菌肉汤转移至选择性微孔板,然后利用正确的生化和血清方法对分离菌进行确认。对于 MLG 5C 指定的基质,应在添加到选择性培养基进行平板培养前完成免疫磁珠分离 (IMS)。

注释:因为系统和 Neogen 分子检测试剂盒 2 - 产志贺毒素大肠埃希氏菌的基因筛选 (*stx* 基因和 *eae* 基因) 扩增试剂带有“背景”相对光单位 (RLU) 读数,即使阴性样品也不会出现读数为零的情况。

在极少数情况下,当存在异常光输出时,算法会显示“检查”标记。Neogen 建议用户对所有“检查”样品重新进行分析。如果结果仍为“检查”,请使用您喜欢的方法^(1, 2, 3)或按照当地法规指定的方法进行确证试验。

表 4. 各种软件结果的符号和信息。

孔类型	孔结果符号	结果	判读
样品		阳性	样品是目标病原体的假定阳性样品。
样品		阴性	样品是目标病原体的阴性样品。
样品		抑制	样品基质对分析有抑制作用。可能需要重新检测。有关更多信息,请参阅故障排除部分和分析试剂盒产品信息。
样品		检查	不确定目标病原体是否存在。可能需要重新检测。有关更多信息,请参阅故障排除部分和分析试剂盒产品信息。
样品		错误	未检测到生物发光。可能需要重新检测。有关更多信息,请参阅故障排除部分和分析试剂盒产品信息。

附录 A. 方案中断:储存和重新检测样品

1. 如需储存热处理后的裂解液,应使用干净的盖子为 Neogen 裂解液管重新封盖(参见“裂解”部分 4.5)。
2. 如要储存增菌的样品,应在储存前至少培养 18 小时。
3. 在 4 - 8°C 温度下最多储存 72 小时。
4. 取出储存的样品以准备用于扩增,将其倒置 2-3 次进行混合。
5. 打开管盖。
6. 将混合后的裂解液管置于 Neogen 分子检测加热模块中并在 100 ± 1°C 温度下加热 5 ± 1 分钟。
7. 从 Neogen 分子检测加热模块中取出 Neogen 裂解液管架,将其放入 Neogen 分子检测冷却架中冷却最短 5 分钟,最长 10 分钟。
8. 继续执行上文详述的“扩增”部分的方案。

参考资料:

1. Microbiology Laboratory Guidebook. U. S. Department of Agriculture (USDA) Food Safety and Inspection Service (FSIS) Microbiology Laboratory guidebook 5C.00. Detection and isolation of top seven Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STECs) from meat products and carcass and environmental sponges. Feb 4, 2019.
2. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. October 2018.
3. ISO/TS 13136:2012: Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups
4. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good laboratory practice for nonclinical laboratory studies.
5. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
6. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examination.
7. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. 请联系您的 Neogen 食品安全部代表,以获取本文档的副本。

符号说明

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar 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 Leshar Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00918A

คำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์

ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx และ eae)

รายละเอียดผลิตภัณฑ์และวัตถุประสงค์การใช้งาน

Neogen® ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx และ eae) ใช้กับระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® สำหรับการตรวจหายีน (stx1 และ/หรือ stx2) และโปรตีนอินติมีน (Intimin) (eae) จากเชื้ออีโคไลที่สร้างพิษชิก้า (Shiga Toxin-Producing *E. coli*: STEC) ยังเป็นที่รู้จักกันในชื่อเชื้ออีโคไลที่สร้างสารพิษเวโรไซโตทอกซิน (“Verocytotoxin-Producing *E. coli*”) ในตัวอย่างอาหารที่ได้รับการเลี้ยงเชื้อและในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมกระบวนการแปรรูปอาหาร คำว่า STEC หมายถึงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารพิษชิก้าชนิดที่ 1 (Stx1) ชนิดที่ 2 (Stx2) หรือทั้งสองชนิด ซึ่งเข้ารหัสด้วยยีน stx1 และ stx2 ตามลำดับ STEC ประกอบด้วยยีนที่มีความรุนแรงในการก่อโรค stx1 และ/หรือ stx2 และ eae (ยีนอินติมีนมีความเกี่ยวข้องกับฟิโนไทป์ในการยึดติดและทำลาย) ซึ่งจัดเป็นกลุ่มเชื้อ Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) ชุดทดสอบคัดกรองประกอบด้วยหลอดรีเอเจนต์สองหลอดแยกกัน หลอดหนึ่งเพื่อตรวจหายีนความรุนแรงในการก่อโรค stx1 และ/หรือ stx2 และอีกหลอดหนึ่งเพื่อตรวจหายีน eae จาก STEC (EHEC) ซอฟต์แวร์ระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® รายงานผลการทดสอบแยกกันสำหรับแต่ละวิธีทดสอบ และใช้ผลการทดสอบจากทั้งสองวิธีทดสอบเพื่อสรุปว่าผลตัวอย่างเป็นบวกหรือเป็นลบสำหรับ STEC (EHEC) สำหรับผล STEC (EHEC) ที่เป็นบวกในเบื้องต้นสำหรับยีนเป้าหมายทั้งสองชนิด (stx1 และ/หรือ stx2 และ eae) ผลการทดสอบต้องเป็นบวก ชุดทดสอบ stx จะไม่แยกกว่าเป็นสารพิษชนิดใดระหว่าง stx1 และ stx2 แต่จะตรวจหาว่ามียีน stx1 และ/หรือ stx2 หรือไม่

ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ใช้การเพิ่มขยายยีนแบบลูปที่อุณหภูมิเดียว (Loop-mediated isothermal amplification) เพื่อเพิ่มขยายกรดนิวคลีอิกด้วยวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงและความไวสูงผสานกับการเรืองแสงทางชีวภาพเพื่อตรวจจับการเพิ่มขยายจำนวนผลการทดสอบเบื้องต้นที่เป็นบวกจะได้รับการรายงานในทันที ขณะที่ผลการทดสอบที่เป็นลบจะแสดงผลภายหลังจากที่การทดสอบดังกล่าวเสร็จสมบูรณ์แล้ว ผลที่สันนิษฐานว่าเป็นบวก ควรได้รับการยืนยันโดยใช้วิธีที่ท่านเห็นสมควร^(1, 2, 3) หรือตามที่ระบุไว้ในระเบียบข้อบังคับระดับท้องถิ่น

Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx และ eae) ออกแบบมาให้ใช้ในสภาพแวดล้อมห้องปฏิบัติการโดยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ผ่านการอบรมเทคนิคการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ Neogen ยังไม่ได้จัดทำเอกสารเกี่ยวกับการใช้ผลิตภัณฑ์นี้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ นอกจากอุตสาหกรรมอาหารหรือเครื่องดื่ม ตัวอย่างเช่น Neogen ยังไม่ได้ออกเอกสารเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์นี้สำหรับการทดสอบตัวอย่างยา ตัวอย่างเครื่องสำอาง ตัวอย่างทางคลินิก หรือตัวอย่างเกี่ยวกับสัตว์ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx และ eae) ยังไม่ได้รับการประเมินกับผลิตภัณฑ์อาหาร การแปรรูปอาหาร ระเบียบการทดสอบที่เป็นไปได้ทั้งหมดหรือกับสายพันธุ์แบคทีเรียที่เป็นไปได้ทั้งหมด

เช่นเดียวกับวิธีทดสอบอื่นๆ ไป แหล่งที่มา สูตร และคุณภาพของอาหารสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อสามารถส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบที่ได้ นอกจากนี้ ปัจจัยต่างๆ เช่น วิธีการสุ่มเก็บตัวอย่าง วิธีการทดสอบ การเตรียมตัวอย่าง การจัดการและเทคนิคที่ใช้ในห้องปฏิบัติการอาจส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบที่ได้ด้วยเช่นกัน Neogen ขอแนะนำให้ประเมินวิธีการทดสอบรวมทั้งอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อในสภาพแวดล้อมของผู้ใช้โดยใช้จำนวนตัวอย่างที่เพียงพอกับอาหารแต่ละชนิดและสภาวะที่มีความท้าทายกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีการดังกล่าวเป็นไปตามเกณฑ์ของผู้ใช้

Neogen ได้ประเมิน Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx และ eae) ด้วยบัฟเฟอร์เปปโตโนวอร์เตอร์ (BPW)-ISO เป็นอาหารเหลว

เครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® มีจุดมุ่งหมายในการใช้กับตัวอย่างที่ได้ผ่านกระบวนการให้ความร้อนในระหว่างขั้นตอนการไลซิสของการทดสอบ ซึ่งได้รับการออกแบบมาเพื่อทำลายเชื้อที่มีในตัวอย่าง ตัวอย่างซึ่งไม่ได้รับความร้อนอย่างเหมาะสมในระหว่างขั้นตอนการไลซิสของชุดทดสอบอาจถือว่าเป็นสารที่อาจมีอันตรายทางชีวภาพ และไม่ควรรีเสเข้าไปในเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

Neogen Food Safety ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO (องค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน) 9001 ด้านการออกแบบและการผลิต

Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx และ eae) มี stx และ eae อย่างละ 48 หลอดทดสอบตามที่อธิบายไว้ในตารางที่ 1



ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

รายการ	การคัดแยก	จำนวน	สิ่งที่บรรจุภายใน	ความคิดเห็น
หลอดสารละลายไลซีส Neogen® (LS)	สารละลายสีชมพูในหลอดใส	96 หลอด (12 แถว แถวละ 8 หลอด)	ปริมาตร LS 580 ไมโครลิตรต่อหลอด	บรรจุอยู่ในที่วางและพร้อมใช้งาน
หลอดรีเอเจนต์ Neogen® ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx)	หลอดสีส้ม	48 หลอด (2 ถัง มี 3 แถว แถวละ 8 หลอด)	ส่วนผสมสำหรับการเพิ่มขยายและการตรวจหาเชื้อโรคนั้นเฉพาะเจาะจงที่ทำไลโอฟีไลซ์แล้ว	พร้อมใช้งาน
หลอดรีเอเจนต์ Neogen® ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (eae)	หลอดสีแดง	48 หลอด (2 ถัง มี 3 แถว แถวละ 8 หลอด)	ส่วนผสมสำหรับการเพิ่มขยายและการตรวจหาเชื้อโรคนั้นเฉพาะเจาะจงที่ทำไลโอฟีไลซ์แล้ว	พร้อมใช้งาน
ฝาสารอง	ฝาสีส้ม	96 ฝา (12 แถว แถวละ 8 ฝา)		พร้อมใช้งาน
ฝาสารอง	ฝาสีแดง	96 ฝา (12 แถว แถวละ 8 ฝา)		พร้อมใช้งาน
Neogen® รีเอเจนต์คอนโทรล (RC)	หลอดใสชนิดเปิดฝาด้านบน	16 หลอด (2 ถัง ถังละ 8 หลอด)	ส่วนผสมที่ทำไลโอฟีไลซ์สำหรับควบคุม DNA การเพิ่มขยายและการตรวจหา	พร้อมใช้งาน

ชุดควบคุมผลลบหรือ Negative Control (NC) เป็นอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อที่ปลอดภัย เช่น BPW-ISO ไม่ได้รวมอยู่ในชุดอุปกรณ์ ห้ามใช้น้ำเป็น NC

โปรดดูคู่มือฉบับย่อที่ www.neogen.com

ความปลอดภัย

ผู้ใช้ควรอ่าน ทำความเข้าใจ และปฏิบัติตามข้อมูลความปลอดภัยทั้งหมดในคำแนะนำการใช้งานระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen และ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx และ eae) เก็บคำแนะนำด้านความปลอดภัยนี้ไว้สำหรับใช้อ้างอิงในอนาคต

คำเตือน: บ่งชี้ว่าเป็นสถานการณ์ที่เป็นอันตราย ซึ่งหากไม่มีการหลีกเลี่ยง อาจก่อให้เกิดการเสียชีวิตหรือการบาดเจ็บรุนแรงและ/หรือความเสียหายต่อทรัพย์สินได้

ข้อสังเกต: ระบุสถานการณ์ที่อาจเป็นอันตราย หากไม่หลีกเลี่ยง อาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อทรัพย์สิน

คำเตือน

ห้ามใช้ Neogen ชุดทดสอบ เชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx และ eae) ในการวินิจฉัยโรคในมนุษย์หรือสัตว์

ผู้ใช้งานต้องฝึกอบรมบุคลากรเกี่ยวกับเทคนิคการทดสอบที่ถูกต้องเหมาะสมในปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น หลักปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการที่ดี⁽⁴⁾, ISO/IEC 17025⁽⁵⁾, หรือ ISO 7218⁽⁶⁾

เพื่อลดความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับผลปลอม ซึ่งนำไปสู่การปล่อยผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนไปขาย ให้ปฏิบัติตามนี้:

- ปฏิบัติตามระเบียบการและดำเนินการทดสอบตามที่ระบุไว้อย่างชัดเจนในคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์
- เก็บ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx และ eae) ตามที่ระบุไว้บนบรรจุภัณฑ์และในคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์
- ใช้ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx และ eae) ก่อนวันหมดอายุเสมอ
- ใช้ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx และ eae) กับตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมและตัวอย่างอาหารที่ผ่านการตรวจสอบภายในหรือโดยบุคคลที่สามแล้วเท่านั้น
- ใช้ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx และ eae) เฉพาะกับพื้นผิว สารฆ่าเชื้อ วิธีการและสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผ่านการตรวจสอบภายในหรือโดยบุคคลที่สามแล้วเท่านั้น
- สำหรับตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมที่มีฟเฟอริสสำหรับทำให้เป็นกลางโดยมีสารประกอบเชิงซ้อนของเอริลซัลโฟเนตอยู่ด้วย ให้ทำการเจือจางด้วยอัตราส่วน 1:2 ก่อนที่จะทดสอบ (เติมตัวอย่าง 1 ส่วนลงในอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 ส่วน) อีกหนึ่งตัวเลือกคือถ่ายบัพเฟอริที่เป็นกลางที่มีการเพิ่มเชื้อปริมาณ 10 ไมโครลิตรเข้าไปยังหลอดสารละลายไลซีส Neogen ผลิตภัณฑ์ควบคุมตัวอย่างของ Neogen® ซึ่งประกอบด้วยบัพเฟอริสำหรับทำให้เป็นกลางโดยมีสารเชิงซ้อนของเอริลซัลโฟเนตมีดังนี้: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G และ HS2410NB2G

เพื่อลดความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการสัมผัสสารเคมีหรือสารอันตรายทางชีวภาพ ให้ปฏิบัติตามนี้:

- ให้ทำการทดสอบเชื้อก่อโรคในห้องปฏิบัติการที่มีอุปกรณ์อย่างเหมาะสมภายใต้การควบคุมของบุคลากรที่ได้รับการอบรม อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อที่บ่มแล้ว หรือพื้นผิวที่มีการสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อหลังเพิ่มจำนวนเชื้อที่บ่มแล้ว อาจจะมีเชื้อโรคระดับเพียงพอที่จะก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์ได้



- ปฏิบัติตามแนวปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการมาตรฐานทุกครั้งโดยรวมถึงการสวมเครื่องแต่งกายเพื่อป้องกันและอุปกรณ์ป้องกันดวงตาในขณะที่ปฏิบัติงานกับรีเอเจนต์และตัวอย่างที่มีการปนเปื้อน
- หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับอาหารหลังปัมเพิ่มจำนวนเชื้อและหลอดบรรจุรีเอเจนต์ภายหลังการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ
- กำจัดตัวอย่างหลังเพิ่มจำนวนเชื้อตามมาตรฐานระดับท้องถิ่น/ภูมิภาค/ประเทศ/ข้อบังคับในปัจจุบัน
- ตัวอย่างซึ่งไม่ได้รับความร้อนอย่างเหมาะสมในระหว่างขั้นตอนการไลซิสของชุดทดสอบอาจถือว่าเป็นสารที่อาจมีอันตรายทางชีวภาพ และไม่ควรถูกใส่เข้าไปในเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

เพื่อลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนข้ามขณะเตรียมชุดทดสอบ ให้ปฏิบัติดังนี้:

- สวมถุงมือตลอดเวลา (เพื่อปกป้องผู้ใช้งานและป้องกันการเกิดนิวคลีเอส)

เพื่อเป็นการลดความเสี่ยงอันเกิดจากการสัมผัสโดนของเหลวร้อน ให้ปฏิบัติดังนี้:

- ห้ามตั้งเครื่องทำความร้อนอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่แนะนำไว้
- ห้ามทำความร้อนเกินเวลาที่แนะนำ
- ใช้เทอร์โมมิเตอร์ที่ได้รับการสอบเทียบตามมาตรฐานและเหมาะสม เพื่อยืนยันอุณหภูมิของของฮีทลอคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen® (เช่น เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มบางส่วน หรือเทอร์โมมิเตอร์แบบดิจิทัล ที่ไม่ใช่เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มทั้งหมด) จะต้องวางเทอร์โมมิเตอร์ในบริเวณที่กำหนดไว้ของฮีทลอคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen

ข้อสังเกต

เพื่อลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนข้ามขณะเตรียมชุดทดสอบ ให้ปฏิบัติดังนี้:

- เปลี่ยนถุงมือก่อนขั้นตอนการผสมสารละลายกับเมตริเอเจนต์
- แนะนำให้ใช้ปีเปตต์ที่ระดับชีววิทยาโมเลกุลชนิดที่มีตัวกั้นละอองอากาศ (ชนิดกรองแล้ว) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- ใช้ปีเปตต์ที่ป้อนใหม่สำหรับการถ่ายตัวอย่างในแต่ละครั้ง
- ใช้แนวปฏิบัติที่ดีสำหรับห้องปฏิบัติการ เพื่อถ่ายโอนตัวอย่างจากอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อที่ปัมแล้วไปยังหลอดสายละลายไลซิส เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนในขั้นตอนการปีเปตต์ ผู้ใช้อาจเพิ่มขั้นตอนในระหว่างการถ่ายตัวอย่างสารละลาย ตัวอย่างเช่น ผู้ใช้อาจถ่ายโอนแต่ละตัวอย่างอาหารที่เพิ่มจำนวนเชื้อใส่เข้าไปในหลอดที่ฆ่าเชื้อแล้ว
- ปฏิบัติการทดสอบทางชีววิทยาโมเลกุลบนโต๊ะที่มีหลอดไฟฟ้าเชื้อหากทำได้
- ลดการปนเปื้อนบนโต๊ะปฏิบัติงานและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ (ปีเปตต์ เครื่องมือเปิดปิดฝา ฯลฯ) อย่างสม่ำเสมอด้วยน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (ผสมกับน้ำตามอัตราส่วน) หรือสารละลายกำจัดดีเอ็นเอ

เพื่อลดความเสี่ยงจากผลบวกปลอม ให้ปฏิบัติดังนี้

- ห้ามเปิดหลอดรีเอเจนต์ภายหลังการเพิ่มขยายจำนวนเชื้อ
- กำจัดหลอดทดลองที่ปนเปื้อนแล้วเสมอ โดยแช่ในน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (ผสมกับน้ำตามอัตราส่วน) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและให้อยู่ห่างจากพื้นที่จัดเตรียมชุดทดสอบทุกครั้ง
- ห้ามนั่งฆ่าเชื้อหลอดรีเอเจนต์ภายหลังการเพิ่มขยายจำนวน

ศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมในเอกสารข้อมูลความปลอดภัยและระเบียบข้อบังคับการกำจัดทิ้งในประเทศ

หากท่านมีข้อสงสัยเกี่ยวกับการใช้งานหรือกรรมวิธีที่เฉพาะเจาะจงใด ๆ โปรดเยี่ยมชมเว็บไซต์ของเราที่ www.neogen.com หรือติดต่อตัวแทนจำหน่ายหรือผู้จัดจำหน่ายของบริษัท Neogen ในท้องถิ่นของท่าน

ความรับผิดชอบของผู้ใช้

ผู้ใช้งานจะต้องทำความเข้าใจเกี่ยวกับคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์และข้อมูลเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ หากต้องการข้อมูลเพิ่มเติม สามารถเยี่ยมชมเว็บไซต์ของเราได้ที่ www.neogen.com หรือติดต่อตัวแทนหรือผู้จัดจำหน่าย Neogen ในพื้นที่ของท่าน

เมื่อเลือกวิธีทดสอบ การคำนึงถึงปัจจัยภายนอกนั้นเป็นสิ่งสำคัญ เช่น วิธีการสุ่มตัวอย่าง วิธีการทดสอบ วิธีการเตรียมตัวอย่าง การจัดการควบคุม เทคนิคของห้องปฏิบัติการรวมถึงตัวอย่างเองที่อาจส่งผลกระทบต่อผลลัพธ์ได้

ผู้ใช้งานเป็นผู้รับผิดชอบในการประเมินความเหมาะสมสำหรับการเลือกวิธีการทดสอบหรือชนิดผลิตภัณฑ์ เพื่อประเมินจำนวนเมทริกซ์ที่เหมาะสมกับความสามารถในการเหลือรอดของจุลินทรีย์ เพื่อให้ผู้ใช้แน่ใจว่าวิธีการทดสอบที่เลือกนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ของผู้ใช้เอง

นอกจากนี้ ผู้ใช้จะต้องรับผิดชอบในการเลือกวิธีการทดสอบและผลลัพธ์ที่ได้ให้เป็นไปตามข้อกำหนดของลูกค้าและของซัพพลายเออร์

เช่นเดียวกับวิธีการทดสอบอื่น ๆ ผลการทดสอบที่ได้จากการใช้ผลิตภัณฑ์ Neogen Food Safety ใดก็ตาม ไม่ได้รับประกันถึงคุณภาพของเมทริกซ์หรือขั้นตอนที่ใช้ทดสอบ

Neogen ได้พัฒนาชุดน้ำยาควบคุมเพื่อทดสอบผลของส่วนประกอบในตัวอย่างแต่ละประเภท โดยวิธี Neogen® เพื่อช่วยให้ลูกค้าประเมินวิธีการสำหรับเมทริกซ์ต่างๆ ของอาหารได้ เมื่อจำเป็น ให้ใช้ Neogen ชุดน้ำยาควบคุมเพื่อทดสอบผลของส่วนประกอบในตัวอย่างแต่ละประเภท(MC) เพื่อทดสอบว่าเมทริกซ์นั้นสามารถส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx และ eae) ทดสอบตัวอย่างหลายๆ ที่ถือว่าเป็นตัวแทนของเมทริกซ์นั้นๆ เช่น ตัวอย่างที่ได้จากแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกัน ตัวอย่างในระหว่างการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบก่อนนำวิธีของ Neogen มาใช้ หรือเมื่อทำการทดสอบเมทริกซ์ใหม่หรือที่ไม่เคยทำหรือเมทริกซ์ที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบหรือการแปรรูป



สามารถให้คำจำกัดความของเมทริกซ์ได้ว่า เป็นชนิดของผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติที่มาจากแตกต่างกัน เช่น องค์ประกอบหลักและกระบวนการแปรรูปที่ต่างกัน ความแตกต่างระหว่างเมทริกซ์ต่าง ๆ อาจจะเป็นเพียงผลที่เกิดจากความแตกต่างในกระบวนการแปรรูปหรือสภาพลักษณะของเมทริกซ์ เช่น ดิบกับผ่านการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ สดกับแห้ง ฯลฯ

เงื่อนไขการรับประกัน/การชดเชยแบบจำกัด

NEOGEN ปฏิเสธการรับประกันทั้งหมดทั้งอย่างชัดแจ้งและโดยนัย รวมถึงแต่ไม่จำกัดเพียงการรับประกันใดๆ ถึงความสามารถในการจำหน่ายหรือความเหมาะสมสำหรับการใช้งานโดยเฉพาะ เว้นแต่จะได้อธิบายไว้อย่างชัดแจ้งในส่วนการรับประกันแบบจำกัดว่าด้วยบรรจุภัณฑ์ของผลิตภัณฑ์แต่ละชิ้น หากผลิตภัณฑ์ Neogen Food Safety ใดๆ มีตำหนิบกพร่อง บริษัท Neogen หรือผู้จำหน่ายที่ได้รับอนุญาตของบริษัทจะใช้ดุลยพินิจของตนในการพิจารณาเปลี่ยนแทนผลิตภัณฑ์หรือคืนเงินค่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าว อันนี้คือการชดเชยพิเศษ หากสงสัยว่ามีข้อบกพร่องหรือความเสียหายกับสินค้า ท่านต้องแจ้ง Neogen ภายใน 60 วันหลังจากที่พบ และทำการคืนสินค้าที่เสียหายให้ทาง Neogen โปรดโทรติดต่อแผนกบริการลูกค้า (1-800-328-1671 ในสหรัฐอเมริกา) หรือตัวแทน Neogen Food Safety เพื่อขอสิทธิ์ส่งคืนผลิตภัณฑ์ โปรดติดต่อตัวแทน Neogen ของคุณหรือผู้จำหน่าย Neogen ที่ได้รับอนุญาตหากมีคำถามเพิ่มเติม

ขอบเขตความรับผิดชอบของ Neogen

NEOGEN จะไม่รับผิดชอบต่อการสูญเสียหรือความเสียหายใดๆ ทั้งโดยตรง โดยอ้อม ความเสียหายจำเพาะ ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการผิดพลาดหรือที่เป็นผลสืบเนื่อง รวมถึงแต่ไม่จำกัดเพียงการสูญเสียผลกำไร ความรับผิดชอบของทาง Neogen ในทางกฎหมายจะต้องไม่เกินราคาของผลิตภัณฑ์ที่เสียหายหรือบกพร่องไม่ว่ากรณีใดๆ ก็ตาม

การเก็บรักษาและการกำจัด

เก็บ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx และ eae) ที่อุณหภูมิ 2-8°C (35-47°F) ห้ามแช่แข็ง เก็บชุดอุปกรณ์ให้พ้นแสงในระหว่างการเก็บรักษา หลังจากเปิดชุดอุปกรณ์แล้ว ให้ตรวจสอบว่าถุงฟอยล์ไม่ชำรุดเสียหาย หากถุงฟอยล์ชำรุดเสียหาย ห้ามใช้ผลิตภัณฑ์นั้น หลังจากเปิดแล้ว ควรเก็บรักษาหลอดรีเอเจนต์ที่ยังไม่ได้ใช้ไว้ในถุงที่ซีลปิดซ้ำได้โดยมีสารดูดความชื้นใส่อยู่ภายใน เพื่อให้รีเอเจนต์ที่ทำไลโอไฟล์แล้วอยู่ในสภาวะคงตัว เก็บถุงที่ซีลปิดกลับแล้วไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C (35-47°F) เป็นเวลาไม่เกิน 90 วัน

ห้ามใช้ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx และ eae) หลังวันหมดอายุ วันหมดอายุและหมายเลขล็อตจะแสดงไว้บนฉลากด้านนอกของกล่อง หลังใช้งาน อาหารเพิ่มจำนวนเชื้อและหลอดของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx และ eae) อาจมีสารจากเชื้อก่อโรคเกิดโรครออยู่ เมื่อการทดสอบเสร็จสมบูรณ์แล้ว ให้ปฏิบัติตามมาตรฐานอุตสาหกรรมในปัจจุบันสำหรับการกำจัดและทิ้งขยะปนเปื้อน ศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมในเอกสารข้อมูลความปลอดภัยและระเบียบข้อบังคับการกำจัดทิ้งในประเทศ

คำแนะนำการใช้งาน

ปฏิบัติตามคำแนะนำทั้งหมดอย่างละเอียดรอบคอบ หากไม่ปฏิบัติตามเช่นนั้น อาจให้ผลที่ไม่ถูกต้องแม่นยำได้

ลดการปนเปื้อนบนโต๊ะปฏิบัติการและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ (ปิเปตต์ เครื่องมือเปิด/ปิดฝา ฯลฯ) อย่างสม่ำเสมอด้วยน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (ผสมกับน้ำตามอัตราส่วน) หรือสารละลายกำจัดดีเอ็นเอ

ผู้ใช้ควรผ่านการฝึกอบรมคุณสมบัติสำหรับผู้ปฏิบัติงาน (OQ) ระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ตามที่ระบุในเอกสาร “แนวทางและระเบียบการด้านคุณสมบัติการติดตั้ง (IQ) / คุณสมบัติการปฏิบัติการ (OQ) สำหรับระบบการทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen”⁽⁷⁾

ดูในส่วน “คำแนะนำเฉพาะสำหรับวิธีที่ผ่านการตรวจสอบแล้ว” สำหรับข้อกำหนดเฉพาะ:

ตารางที่ 3 สำหรับระเบียบวิธีการเพิ่มจำนวนเชื้อตาม Performance Tested MethodSM (PTM) Certificate หมายเลข 071902

การเพิ่มจำนวนเชื้อในตัวอย่าง

ตารางที่ 2 และ 3 แสดงคำแนะนำสำหรับระเบียบวิธีทั่วไปในการเพิ่มจำนวนเชื้อสำหรับอาหาร

ผู้ใช้มีหน้าที่รับผิดชอบในการพิสูจน์ยืนยันระเบียบการสุ่มตัวอย่างหรืออัตราส่วนการเจือจางแบบอื่นเพื่อให้มั่นใจว่าวิธีการทดสอบนี้สอดคล้องกับเกณฑ์ของผู้ใช้งานเอง

อาหาร

1. ให้อาหารเพิ่มจำนวนเชื้อ BPW ISO ปรับสมดุลให้ได้ระดับอุณหภูมิ 41.5 ± 1°C
2. ผสมอาหารเพื่อเลี้ยงเพิ่มจำนวนเชื้อกับตัวอย่างอาหารเข้าด้วยกันโดยใช้วิธีการแบบปลอดเชื้อ สำหรับตัวอย่างประเภทเนื้อสัตว์และตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นอนุภาคขนาดเล็กทั้งหมด แนะนำให้ใช้ถุงที่มีตัวกรอง
3. ผสมรวมสารทั้งหมดและปั่นไว้ตามที่กำหนดไว้ในวิธีการเหมาะสม (ดูตาราง 2 หรือ 3)

ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม

คำเตือน: หากคุณเลือกที่จะใช้บัฟเฟอร์สำหรับทำให้เป็นกลาง (NB) ซึ่งประกอบด้วยสารเชิงซ้อนของเอริลซิลโฟเนตเป็นสารละลายเพื่อทำให้ฟองน้ำชุ่มชื้น ต้องทำการเจือจางตัวอย่างหลังเพิ่มจำนวนเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:2 (ตัวอย่าง 1 ส่วนในอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 ส่วน) ก่อนการทดสอบเพื่อที่จะลดความเสี่ยงอันเกี่ยวข้องกับผลลบปลอมซึ่งนำไปสู่การปล่อยผลิตภัณฑ์ที่ปนเปื้อนออกสู่ภายนอกได้ อีกหนึ่งตัวเลือกคือถ่ายบัฟเฟอร์ที่เป็นกลางที่มีการเพิ่มเชื้อปริมาณ 10 ไมโครลิตรเข้าไปยังหลอดสารละลายไลซิส Neogen

ผู้ใช้มีหน้าที่รับผิดชอบในการพิสูจน์ยืนยันระเบียบการสุ่มตัวอย่างหรืออัตราส่วนการเจือจางแบบอื่นเพื่อให้มั่นใจว่าวิธีการทดสอบนี้สอดคล้องกับเกณฑ์ของผู้ใช้งานเอง



ตารางที่ 2 ระเบียบการของอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อทั่วไป

เมทริกซ์ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเหลว เลี้ยงเชื้อ (มล.) (อุ่นไว้ก่อนแล้ว)	อุณหภูมิในการ เพิ่มจำนวนเชื้อ ($\pm 1^{\circ}\text{C}$)	เวลาการ เพิ่มจำนวน เชื้อ (ชั่วโมง)	ปริมาตรการ วิเคราะห์ตัวอย่าง (ไมโครลิตร)
เนื้อวัวดิบสด ชั๊นและตัดแต่ง ⁽ⁿ⁾	375 ก.	1125 BPW-ISO	41.5	10-18	20
เนื้อสัตว์ดิบ (หมู, สัตว์ปีก, แกะ, วัวป่า) ⁽ⁿ⁾	375 ก.	1125 BPW-ISO	41.5	10-18	20
พืชผัก ^(u)	200 ก.	450 BPW-ISO	41.5	18-24	20
ถั่วงอก ^(c)	25 ก.	225 BPW-ISO	41.5	18-24	20
นมดิบ ^(v)	25 ก. หรือ 25 มล.	225 BPW-ISO	41.5	18-24	20

⁽ⁿ⁾ นวดตัวอย่างเนื้อวัว (เนื้อวัวสด ชั๊นและตัดแต่ง) และเนื้อสัตว์ดิบ (เนื้อหมู สัตว์ปีกและเนื้อสัตว์ที่ไม่ใช่เนื้อวัวที่บดแล้ว) ด้วยมือเป็นเวลา 30-60 วินาทีเพื่อกระจายและทำให้ก้อนเนื้อแตกจากกันหลังจากการเติม BPW-ISO ที่อุ่นไว้ก่อนแล้ว

^(u) สำหรับพืชผัก ให้รินล้างด้วยอาหารเหลว (BPW-ISO ที่อุ่นไว้แล้ว) ไปตามใบแล้วเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30-60 วินาที ห้ามนวดหรือทำใบผักให้เป็นเนื้อเดียวกัน

^(c) สำหรับถั่วงอก ให้รินล้างด้วยอาหารเหลว (BPW-ISO ที่อุ่นไว้แล้ว) 30-60 วินาที และห้ามนวดหรือทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน

^(v) ทำตัวอย่างนมดิบให้เป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 30 ถึง 60 วินาทีหลังจากการเติม BPW-ISO ที่อุ่นไว้ก่อนแล้ว

คำแนะนำเฉพาะสำหรับวิธีที่ผ่านการตรวจสอบแล้ว

AOAC® Performance Tested MethodSM (PTM) Certificate หมายเลข 071902



จากการศึกษา PTMSM ของสถาบันวิจัย AOAC, Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – STEC Gene Screen (*stx* และ *eae*) พบว่าเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจหา STEC เมทริกซ์ที่ได้รับการทดสอบในการศึกษาดังกล่าวแสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเชื้อตามเอกสาร AOAC PTMSM หมายเลข 071902

เมทริกซ์ตัวอย่าง	ขนาด ตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเหลว เลี้ยงเชื้อ (มล.)	อุณหภูมิในการเพิ่ม จำนวนเชื้อ ($\pm 1^{\circ}\text{C}$)	เวลาการเพิ่ม จำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)	ปริมาตรการ วิเคราะห์ตัวอย่าง (ไมโครลิตร)
เนื้อวัวดิบตัดแต่ง ⁽ⁿ⁾	375 ก.	1125 BPW-ISO (อุ่นไว้ก่อนแล้ว)	41.5	10-18	20
เนื้อวัวดิบสด ⁽ⁿ⁾	375 ก.	1125 BPW-ISO (อุ่นไว้ก่อนแล้ว)	41.5	10-18	20
เนื้อวัวดิบสด ⁽ⁿ⁾	25 ก.	225 BPW-ISO (อุ่นไว้ก่อนแล้ว)	41.5	10-18	20
เนื้อหมูดิบสด ⁽ⁿ⁾	375 ก.	1125 BPW-ISO (อุ่นไว้ก่อนแล้ว)	41.5	10-18	20
ชิ้นส่วนสัตว์ปีกดิบ ⁽ⁿ⁾	375 ก.	1125 BPW-ISO (อุ่นไว้ก่อนแล้ว)	41.5	10-18	20
ไก่ที่แยกส่วนด้วย เครื่อง	25 กรัม	BPW-ISO (อุ่นล่วงหน้า) 225 กรัม	41.5	10-24	20
ผักโขม ^(u)	200 ก.	450 BPW-ISO (อุ่นไว้ก่อนแล้ว)	41.5	18-24	20
ถั่วงอก ^(c)	25 ก.	225 BPW-ISO (อุ่นไว้ก่อนแล้ว)	41.5	18-24	20
ดอกกัญชาแห้ง ดอกกัญชงแห้ง ⁽⁴⁾	10 กรัม	BPW-ISO 90 กรัม	41.5	28-32	20

⁽ⁿ⁾ สำหรับตัวอย่างเนื้อวัว (เนื้อสดและตัดแต่ง) เติม BPW-ISO ที่อุ่นไว้ก่อนแล้วลงในตัวอย่างเนื้อ นวดด้วยมือเป็นเวลา 30-60 วินาทีเพื่อเพื่อกระจายและทำให้ก้อนเนื้อแตกจากกัน

- (๓) สำหรับผักโขม เต็ม BPW-ISO ที่อุ่นไว้ก่อนแล้วลงไปนึ่งในเมทริกซ์ รินล้างด้วยของเหลวไปตามใบแล้วเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30-60 วินาที ห้ามนวดหรือทำใบผักให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- (๔) สำหรับถั่ววง ให้นำรินล้างด้วยอาหารเหลว (BPW-ISO ที่อุ่นไว้แล้ว) 30-60 วินาที และห้ามนวดหรือทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- (๕) ดอกกัญชาแห้ง (THC >0.3%) และดอกกัญชงแห้ง (THC ≤0.3%)

การเตรียมภาตใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen®

1. ซุปผ้าหรือกระดาษเช็ดมือแบบใช้แล้วทิ้งในน้ำยาฟอกขาว 1-5% (ผสมกับน้ำตามอัตราส่วน) และเช็ดภาตใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen
2. ใช้น้ำล้างภาตใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen นี้
3. ใช้กระดาษเช็ดมือแบบใช้แล้วทิ้งเช็ดภาตใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ให้แห้ง
4. ตรวจสอบให้แน่ใจว่าภาตใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen แห้งสนิทก่อนใช้งาน

การเตรียมซิลบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen®

วางซิลบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen บนโต๊ะปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการโดยตรง: ไม่ต้องใช้ภาตวางซิลบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen ใช้ซิลบล็อคที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (20-25°C)

การเตรียมฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen®

วางฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen ในเครื่องทำความร้อนบล็อกคู่แบบแห้ง เปิดเครื่องทำความร้อนบล็อกแบบแห้งและตั้งอุณหภูมิเพื่อให้ฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen มีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึง 100 ± 1°C

หมายเหตุ: ให้ฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen มีอุณหภูมิตามที่กำหนดโดยทั่วไปประมาณ 30 นาที ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการทำงานของเครื่องทำความร้อน ใช้เทอร์โมมิเตอร์ที่ได้รับการสอบเทียบอย่างเหมาะสม (เช่น เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มบางส่วน เทอร์โมมิเตอร์แบบดิจิตอล ที่ไม่ใช่เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มทั้งหมด) วางไว้ในบริเวณที่กำหนด ตรวจสอบให้อุณหภูมิของฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen อยู่ที่ 100 ± 1°C

การเตรียมเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen®

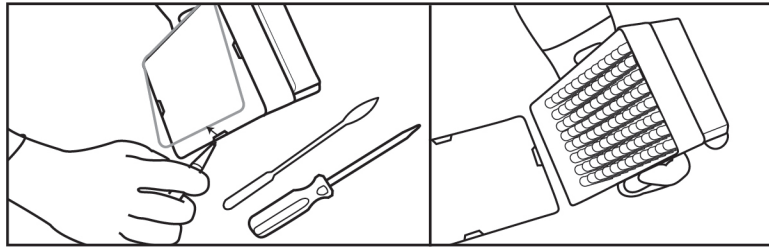
1. เริ่มต้นการใช้งานซอฟต์แวร์ระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen แล้วลงชื่อเข้าสู่ระบบ ติดต่อตัวแทนของ Neogen Food Safety ของคุณเพื่อให้แน่ใจว่าคุณมีซอฟต์แวร์เวอร์ชันที่อัปเดตล่าสุด
2. เปิดเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen
3. สร้างหรือแก้ไขชุดการทดสอบที่มีข้อมูลสำหรับแต่ละตัวอย่าง ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในคู่มือการใช้งานระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen
 - 3.1. การเลือกไอคอน STXEAE-2 ที่ซอฟต์แวร์ ให้เลือกสองหลุมทดสอบที่อยู่ติดกัน (เช่น A1, A2, B1, B2 เป็นต้น) หนึ่งหลุมสำหรับหลอดรีเอเจนต์ stx และอีกหลุมสำหรับ eae เพราะแต่ละตัวอย่างทดสอบด้วยสองวิธี ตั้งค่า NC สำหรับแต่ละหลอดรีเอเจนต์และตั้งค่า RC หนึ่งค่าสำหรับชุดทดสอบ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SAL-2	A	2 STX 2 EAE										
ECO-2	B	2 STX 2 EAE										
LIS-2	C	2 STX 2 EAE										
LMO-2	D	2 STX 2 EAE										
CAM-2	E	2 STX 2 EAE										
CRO-2	F	2 STX 2 EAE										
STXEAE-2	G	2 STX 2 EAE									RC	
STX-2	H	2 STX 2 EAE									NC	NC
EAE-2											2 STX 2 EAE	
MC-2												

หมายเหตุ: ต้องรอให้เครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen มีสถานะพร้อมใช้ ก่อนที่จะใส่ภาตใส่หลอดทดสอบเข้าเครื่องทดสอบเชื้อระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ขั้นตอนของการทำความร้อนนี้ใช้เวลาประมาณ 20 นาทีและบ่งชี้ด้วยไฟสีส้มบนแถบบอกสถานะของเครื่อง เมื่อเครื่องมือพร้อมที่จะเริ่มการทำงาน แถบบอกสถานะดังกล่าวจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว

การไลซิส

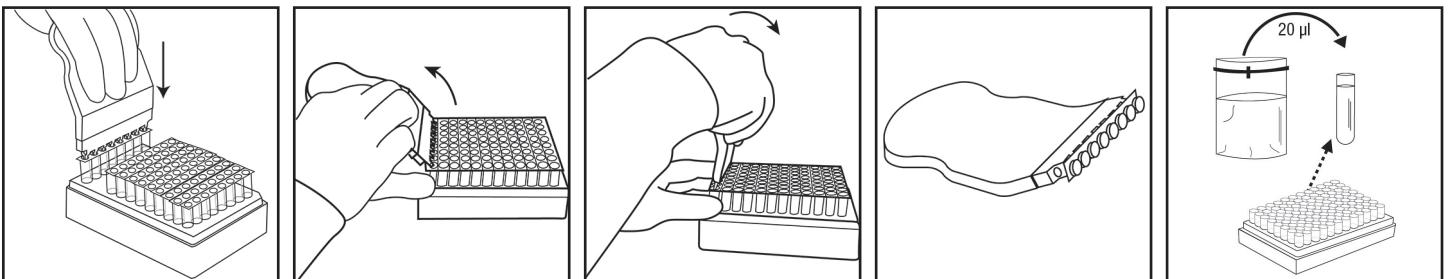
ใช้ไขควงไขหรือไม้พายถอดด้านล่างของที่วางสารละลายไลซิส Neogen ออก ก่อนวางลงบนฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen



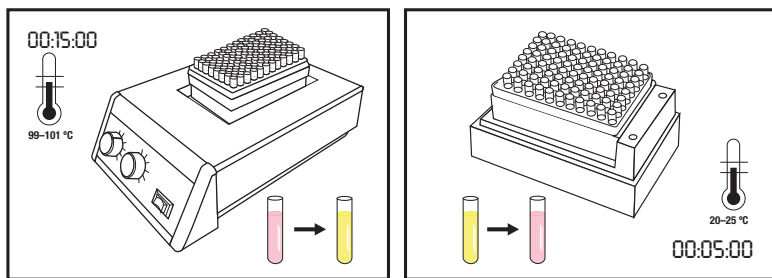
1. รอให้หลอดสารละลายไลซีส Neogen อุณหภูมิขึ้นโดยนำออกมาวางที่อุณหภูมิห้อง (20-25°C) ซ้ำมคืน (16-18 ชั่วโมง) ทางเลือกอื่น ๆ นอกเหนือจากการวางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ไว้บนโต๊ะของห้องปฏิบัติการอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ให้นำหลอดสารละลายไลซีส Neogen ไปต้มในที่ตุ้มน้ำที่อุณหภูมิ $37 \pm 1^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือวางหลอดสารละลายไลซีสบนเครื่องทำความร้อนแบบแห้งเป็นเวลา 30 วินาทีที่อุณหภูมิ 100°C
2. พลิกหลอดสารละลายไลซีสที่ปิดฝาอยู่ เพื่อผสมให้เข้ากัน ดำเนินการต่อในขั้นถัดไปภายใน 4 ชั่วโมง หลังจากพลิกหลอดแล้ว
3. นำตัวอย่างอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อออกจากตุ้มเชื้อ
4. ใช้หลอดสารละลายไลซีส Neogen หนึ่งหลอดต่อตัวอย่างและต่อ NC (อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อ)
 - 4.1. สามารถตัดแถวของหลอดสารละลายไลซีส Neogen ออกเพื่อให้มีจำนวนหลอดตามที่ต้องการได้ เลือกจำนวนหลอดหรือทั้งแถวคือ 8 หลอดต่อแถวตามต้องการ วางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ลงในที่วางที่วางอยู่
 - 4.2. เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนข้าม ให้เปิดฝาของหลอดสารละลายไลซีส Neogen ทั้งแถวในครั้งเดียว และใช้ปิเปตต์ที่ป้อนใหม่สำหรับถ่ายตัวอย่างในแต่ละขั้นตอน
 - 4.3. ถ่ายตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนเชื้อแล้วไปยังหลอดสารละลายไลซีส Neogen ตามคำอธิบายด้านล่างนี้:

ถ่ายตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนเชื้อแต่ละตัวอย่างลงไปหลอดสารละลายไลซีส Neogen แต่ละหลอด เป็นอันดับแรก ถ่าย NC เป็นอันดับสุดท้าย

- 4.4. ใช้อุปกรณ์เปิด/ปิดฝาหลอดสารละลายไลซีสโดยวิธี Neogen® ในการเปิดฝาหลอดสารละลายไลซีส Neogen ที่ละแถว
- 4.5. ทั้งฝาหลอดสารละลายไลซีส Neogen – หากจะเก็บไลเซตเอาไว้เพื่อทดสอบซ้ำ ให้วางฝาในภาชนะที่สะอาดเพื่อนำกลับมาใช้ซ้ำ
 - 4.5.1. หากต้องการข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับการดำเนินการเก็บไลเซต โปรดดูภาคผนวก A
- 4.6. ถ่ายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรลงในหลอดสารละลายไลซีส Neogen

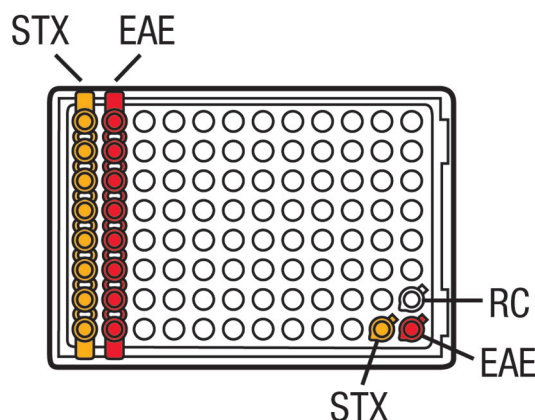


5. ทำซ้ำขั้นตอน 4.4 ถึง 4.6 ตามความจำเป็นสำหรับจำนวนตัวอย่างที่จะทดสอบ
6. เมื่อถ่ายตัวอย่างทั้งหมดเสร็จแล้ว ให้ถ่าย NC (อาหารเพิ่มจำนวนเชื้อ ที่ปลอดเชื้อ เช่น BPW) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดสารละลายไลซีส Neogen ห้ามใช้น้ำเป็น NC
7. ตรวจสอบว่าอุณหภูมิของ ของฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen อยู่ที่ $100 \pm 1^\circ\text{C}$
8. วางที่วางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ที่ไม่มีฝาปิด ลงในฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen และเพิ่มความร้อนเป็นเวลา 15 ± 1 นาที ระหว่างการทำให้ร้อน สารละลายในหลอดทดสอบไลซีส Neogen จะเปลี่ยนจากสีชมพู (เย็น) เป็นเหลือง (ร้อน)
 - 8.1. ตัวอย่างซึ่งไม่ได้รับความร้อนอย่างเหมาะสมในระหว่างขั้นตอนการไลซีสของชุดทดสอบอาจถือว่าเป็นสารที่อาจมีอันตรายทางชีวภาพ และไม่ควรใส่เข้าไปในเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen
9. นำภาควางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ที่ไม่มีฝาปิด ออกจากฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen และปล่อยให้เย็นลงในซิลบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen อย่างน้อย 5 นาที แต่ไม่เกิน 10 นาที ควรวางซิลบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ที่จะใช้งานที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่มีภาควางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ที่เย็นลงแล้ว สารละลายไลซีส Neogen ก็จะเปลี่ยนกลับเป็นสีชมพู
10. นำเอาภาควางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ออกจาก ซิลบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen



การเพิ่มขยาย

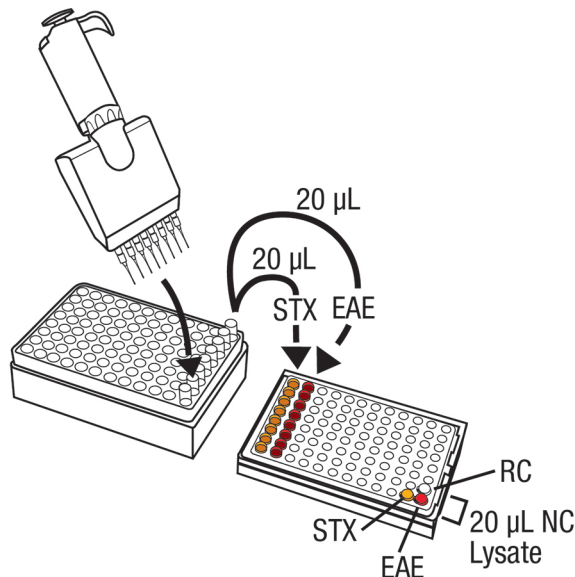
1. ต้องใช้หลอดรีเอเจนต์ของ Neogen ชุดทดสอบระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*stx*) หนึ่งหลอดและ Neogen ชุดทดสอบระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*eae*) สำหรับแต่ละตัวอย่างและ NC
 - 1.1. สามารถตัดแถวของหลอดออก เพื่อให้มีจำนวนหลอดตามที่ต้องการได้ เลือกจำนวนหลอดรีเอเจนต์ของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*stx*) และ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*eae*) แต่ละหลอด หรือแถวที่มี 8 หลอด ตามต้องการ
 - 1.2. วางหลอด Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*stx*) ลงในที่วางหลอดที่วางหนึ่งคอลัมน์
 - 1.3. วางหลอด Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*eae*) ลงในคอลัมน์ที่อยู่ติดกันด้านขวา
 - 1.4. หลีกเสี่ยงการรบกวนเมตรีเอเจนต์ที่กั้นหลอด
2. เลือกหลอด Neogen รีเอเจนต์คอนโทรลหนึ่งหลอดแล้ววางลงในภาตวาง
3. สำหรับไลเซท NC ให้เลือกหลอดรีเอเจนต์ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*stx*) หนึ่งหลอดและ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*eae*) หนึ่งหลอดและวางไว้ในที่วางหลอด



4. เพื่อหลีกเสี่ยงการปนเปื้อนข้าม ให้เปิดฝาของหลอดรีเอเจนต์ของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*stx* หรือ *eae*) ทั้งแถวในครั้งเดียว และใช้ปิเปตต์ที่ป้อนใหม่สำหรับถ่ายตัวอย่างในแต่ละขั้นตอน
5. ถ่ายแต่ละไลเซทไปยังหลอดรีเอเจนต์ของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*stx* หรือ *eae*) ตามคำอธิบายด้านล่าง
 - 5.1. ขั้นแรก ถ่ายไลเซทแต่ละตัวอย่างไปยังหลอดรีเอเจนต์ของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*stx*) ตามคำอธิบายด้านล่างไว้ใน 5.5 และ 5.6
 - 5.2. ขั้นที่สอง ถ่ายไลเซทแต่ละตัวอย่างไปยังหลอดรีเอเจนต์ของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*eae*) ในคอลัมน์ด้านขวาที่อยู่ติดกันตามคำอธิบายด้านล่างไว้ใน 5.5 และ 5.6

หมายเหตุ: ใช้ปิเปตต์ที่ป้อนใหม่สำหรับการถ่ายตัวอย่างในแต่ละครั้ง ห้ามใช้ปิเปตต์ที่ป้อนเดียวกันในการถ่ายตัวอย่างไลเซทเดียวกันไปยังหลอดรีเอเจนต์ *stx* และ *eae*

- 5.3. หลังการถ่ายโอนตัวอย่างไลเซททั้งหมด ให้เติมไลเซท NC ลงไปในแต่ละหลอดรีเอเจนต์ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*stx*) และ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*eae*)
- 5.4. ถ่ายโอนไลเซท NC ลงในรีเอเจนต์คอนโทรลเป็นขั้นสุดท้าย



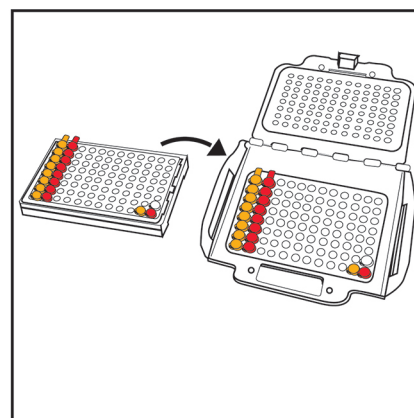
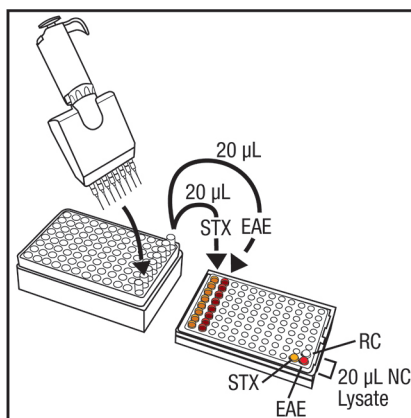
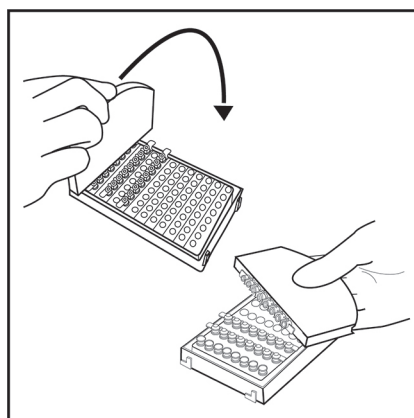
- 5.5. ใช้เครื่องมือเปิด/ปิดฝาเอนเจเนตของชุดทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® ในการเปิดหลอดรีเอนเจเนตของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*stx* หรือ *eae*) ทีละแถว ทั้งฝาปิด
- 5.6. ถ่ายไลเซตของตัวอย่างปริมาณ 20 ไมโครลิตร จากด้านบน ½ ของของเหลว (หลีกเลี่ยงตะกอน) ในหลอดสารละลายไลซิส Neogen เข้าไปในหลอดรีเอนเจเนตของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*stx* หรือ *eae*) ที่ตรงกัน ปล่อยสารละลายด้านข้างหลอด เพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนเมตริเอนเจเนตที่กั้นหลอด ผสมโดยใช้ปิเปต ดูดขึ้นและลงเบาๆ 5 ครั้ง

หมายเหตุ: ใช้ปิเปตต์ที่ป้อนใหม่สำหรับการถ่ายตัวอย่างในแต่ละครั้ง ห้ามใช้ปิเปตต์ที่ป้อนเดียวกันในการถ่ายตัวอย่างไลเซตเดียวกันไปยังหลอดรีเอนเจเนต *stx* และ *eae*

- 5.7. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 5.6 จนกว่าจะเติมแต่ละไลเซตตัวอย่างลงไปหลอดรีเอนเจเนตของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*stx* หรือ *eae*) ในแถวนั้น
- 5.8. ปิดหลอดรีเอนเจเนตของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*stx* หรือ *eae*) ด้วยฝาก็อีกอันที่ให้มา และใช้ด้านมนของเครื่องมือเปิด/ปิดฝาหลอดทดสอบ โดยวิธี Neogen กดเข้าไปเข้ามาเพื่อให้แน่ใจว่าฝาปิดสนิท
- 5.9. ทำซ้ำขั้นตอน 5.6 ถึง 5.8 ตามความจำเป็นสำหรับจำนวนตัวอย่างที่จะทดสอบสำหรับหลอดรีเอนเจเนต Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*stx* และ *eae*) ทั้งสองหลอด
- 5.10. เมื่อถ่ายไลเซตตัวอย่างทั้งหมดแล้ว ให้ทำซ้ำขั้นตอนที่ 5.6 ถึง 5.8 เพื่อถ่ายไลเซต NC ปริมาณ 20 ไมโครลิตร เข้าไปในแต่ละหลอดรีเอนเจเนตของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*stx*) และ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*eae*)
- 5.11. ถ่ายไลเซต NC ปริมาณ 20 ไมโครลิตร เข้าไปในหลอด Neogen รีเอนเจเนตคอนโทรล ปล่อยสารละลายด้านข้างหลอด เพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนเมตริเอนเจเนตที่กั้นหลอด ผสมโดยใช้ปิเปต ดูดขึ้นและลงเบาๆ 5 ครั้ง

ถ่ายไลเซตของตัวอย่างไปยังหลอดรีเอนเจเนตของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (*stx* หรือ *eae*) แต่ละชุดก่อนแล้วจึงถ่าย NC เติมสารละลายลงในหลอด Neogen รีเอนเจเนตคอนโทรลเป็นลำดับสุดท้าย

6. บรรจุหลอดที่ปิดฝาแล้วลงในภาตใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ที่สะอาดและจัดการปนเปื้อนแล้ว จากนั้นปิดและล็อกฝาภาต



7. พิจารณาทบทวนและยืนยันการดำเนินการที่กำหนดค่าไว้ในซอฟต์แวร์ระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen
8. คลิปุ่ม Start ในซอฟต์แวร์ แล้วเลือกเครื่องมือที่จะใช้ทดสอบ ฝาปิดของอุปกรณ์ที่เลือกจะเปิดโดยอัตโนมัติ
9. ใส่ภาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ในเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen แล้วปิดฝาเพื่อเริ่มต้นการทดสอบ ระบบจะให้ผลการทดสอบภายในเวลา 60 นาที แม้ว่าผลที่เป็นบวกอาจจะตรวจจับได้เร็วกว่านั้นก็ตาม
10. หลังจากการทดสอบเสร็จสมบูรณ์แล้ว ให้นำภาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ออกจากเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen แล้วกำจัดหลอดเหล่านั้นทิ้งโดยแช่ในน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (ในน้ำที่มีปริมาตรเท่ากัน) นาน 1 ชั่วโมง และปฏิบัติให้ห่างจากพื้นที่จัดเตรียมชุดทดสอบ

ข้อสังเกต: เพื่อลดความเสี่ยงในการได้ผลบวกปลอมอันเนื่องมาจากการปนเปื้อนข้าม ห้ามเปิดหลอดรีเอเจนต์ซึ่งบรรจุ DNA ที่เพิ่มขยายแล้ว ซึ่งรวมถึงหลอดรีเอเจนต์ของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx และ eae) หลอด Neogen รีเอเจนต์คอนโทรลและหลอดเมทริกซ์คอนโทรล Neogen กำจัดทิ้งหลอดรีเอเจนต์ที่ปิดฝาแล้วทุกครั้งโดยล้างในสารซักฟอกในครัวเรือน ความเข้มข้น 1-5% (ต่อปริมาตรน้ำ) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และห่างจากบริเวณเตรียมการทดสอบ

ผลการทดสอบและการแปลความหมาย

อัลกอริทึมจะแปลความหมายเส้นโค้งของแสงที่ส่งออกมาอันเป็นผลมาจากการตรวจพบการเพิ่มขยายของกรดนิวคลีอิก ซอฟต์แวร์จะวิเคราะห์ผลการทดสอบนี้โดยอัตโนมัติและจะมีการเข้ารหัสสีตามผลที่ได้ดังกล่าว ผลการทดสอบที่ให้ค่าเป็นบวกหรือลบจะพิจารณาตัดสินโดยการวิเคราะห์พารามิเตอร์ของเส้นโค้งที่มีลักษณะเฉพาะตัวจำนวนหนึ่ง ผลการทดสอบเบื้องต้นที่เป็นบวกจะมีการรายงานในทันทีขณะที่ผลที่เป็นลบและผลที่น่าสงสัยจะแสดงผลภายหลังการทดสอบเสร็จสมบูรณ์แล้ว

ซอฟต์แวร์ระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® รายงานผลการทดสอบแยกกันสำหรับแต่ละวิธีทดสอบ (stx และ eae) และใช้ผลการทดสอบจากทั้งสองวิธีทดสอบเพื่อสรุปว่าผลตัวอย่างเป็นบวกหรือเป็นลบสำหรับ STEC (EHEC) (ดูรูปภาพด้านล่าง) สำหรับผล STEC (EHEC) ที่เป็นบวกในเบื้องต้นสำหรับยืนยันเป้าหมายทั้งสองชนิด (stx1 และ/หรือ stx2 และ eae) ผลการทดสอบต้องเป็นบวก หากวิธีทดสอบใดแสดงผลการทดสอบผิดพลาดหรือผลการที่นาสงสัย ผลการทดสอบในขั้นสุดท้ายจะเป็นผลการทดสอบผิดพลาดหรือผลที่นาสงสัย จำเป็นต้องมีการทดสอบซ้ำเพื่อให้ได้ผลการทดสอบในขั้นสุดท้ายที่ถูกต้อง (ดูคู่มืออ่านผล) ซอฟต์แวร์ยังอนุญาตให้ตั้งค่าในแต่ละวิธีทดสอบได้ หากจำเป็น และตัวอย่างหรือไลเซตใหม่จากการเพิ่มจำนวนเชื้อสามารถทดสอบซ้ำด้วยขั้นตอนในอันดับถัดไปของวิธีทดสอบดังที่แสดงไว้ในภาคผนวก A สำหรับไลเซตที่เก็บไว้ และส่วนขั้นตอนภายใต้การไลซิสและการเพิ่มขยายจำนวนสำหรับการเพิ่มจำนวนเชื้อที่เก็บไว้

คู่มืออ่านผลตัวอย่างไลเซตที่เพิ่มจำนวนเชื้อ

	เป็นบวกทั้งคู่, ผลลัพธ์สุดท้ายเป็นบวก
	stx เป็นบวก, eae เป็นลบ, ผลลัพธ์สุดท้ายเป็นลบ
	stx เป็นบวก, ตรวจสอบ eae, ตรวจสอบผลลัพธ์สุดท้าย, ทดสอบใหม่
	stx เป็นบวก, eae ผิดพลาด, ผลลัพธ์สุดท้ายผิดพลาด, ทดสอบใหม่
	stx เป็นลบ, eae เป็นบวก, ผลลัพธ์สุดท้ายเป็นลบ
	stx เป็นลบ, eae เป็นลบ, ผลลัพธ์สุดท้ายเป็นลบ
	stx เป็นลบ, ตรวจสอบ eae, ตรวจสอบผลลัพธ์สุดท้าย, ทดสอบใหม่
	stx เป็นลบ, eae ผิดพลาด, ผลลัพธ์สุดท้ายผิดพลาด, ทดสอบใหม่
	ตรวจสอบ stx, eae เป็นบวก, ตรวจสอบผลลัพธ์สุดท้าย, ทดสอบใหม่
	ตรวจสอบ stx, eae เป็นลบ, ตรวจสอบผลลัพธ์สุดท้าย, ทดสอบใหม่
	ตรวจสอบ stx, ตรวจสอบ eae, ตรวจสอบผลลัพธ์สุดท้าย, ทดสอบใหม่
	ตรวจสอบ stx, eae ผิดพลาด, ผลลัพธ์สุดท้ายผิดพลาด, ทดสอบใหม่
	stx ผิดพลาด, eae เป็นบวก, ผลลัพธ์สุดท้ายผิดพลาด, ทดสอบใหม่
	stx ผิดพลาด, eae เป็นลบ, ผลลัพธ์สุดท้ายผิดพลาด, ทดสอบใหม่
	stx ผิดพลาด, ตรวจสอบ eae, ผลลัพธ์สุดท้ายผิดพลาด, ทดสอบใหม่
	stx ผิดพลาด, eae ผิดพลาด, ผลลัพธ์สุดท้ายผิดพลาด, ทดสอบใหม่

คู่มือผลควบคุมผลลบ

	ไม่ถูกต้องทั้งสองจุด, ลिंग์ถูกต้อง
	ถูกต้องหนึ่งจุด, จุดอื่นผิดพลาด, ลिंग์ผิดพลาด, ทดสอบใหม่
	ถูกต้องหนึ่งจุด, จุดอื่นไม่ถูกต้อง, ลिंग์ไม่ถูกต้อง, ทดสอบใหม่
	ผิดพลาดทั้งสองจุด, ลिंग์ผิดพลาด, ทดสอบใหม่
	ไม่ถูกต้องทั้งสองจุด, ลिंग์ไม่ถูกต้อง, ทดสอบใหม่
	ผิดพลาดหนึ่งจุด, จุดอื่นไม่ถูกต้อง, ลिंग์ผิดพลาด, ทดสอบใหม่

ตัวอย่างที่สันนิษฐานว่าเป็นบวกควรได้รับการยืนยันตามขั้นตอนการปฏิบัติการตามมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ หรือโดยปฏิบัติตามการยืนยันวิธีการอ้างอิงที่เหมาะสม^(1, 2, 3) เริ่มต้นด้วยการถ่ายภาพอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อปฐมภูมิไปยังเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำเพาะ การยืนยันการแยกเชื้อโดยใช้วิธีการทางชีวเคมีและเซรุ่มวิทยาที่เหมาะสม สำหรับเมทริกซ์ที่กำหนดโดย MLG 5C, เทคนิค Immunomagnetic Separation (IMS) ควรดำเนินการก่อนการนำตัวอย่างไปเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำเพาะ

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบค่าแสงที่อ่านได้ก็ไม่ได้มีค่าเป็นศูนย์ เนื่องจากระบบและรีเอเจนต์ในการเพิ่มขยายสำหรับ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - STEC Gene Screen (stx และ eae) จะมี "ค่าพื้นหลัง" ในหน่วย Relative Light Unit (RLU)

ในบางครั้งอาจพบว่าแสงที่ได้จากปฏิกิริยานั้นมีลักษณะผิดปกติ อัลกอริธึมดังกล่าวจะระบุถึงความออกมาว่าเป็นผลที่น่าสงสัย บริษัท Neogen แนะนำให้ผู้ใช้ทำการทดสอบซ้ำสำหรับตัวอย่างที่ให้ผลที่น่าสงสัย หากผลการทดสอบยังคงเป็นที่น่าสงสัย ให้ทำการทดสอบเพื่อยืนยัน โดยใช้วิธีการตามที่ต้องการ^(1, 2, 3) หรือตามที่ระบุโดยหน่วยงานกฏระเบียบในประเทศ

ตารางที่ 4 สัญลักษณ์และข้อมูลสำหรับผลการทดสอบจากซอฟต์แวร์

ประเภทของผลทดสอบ	สัญลักษณ์ผลการตรวจที่ได้จากผลทดสอบ	ผลการตรวจ	การแปลผลการตรวจวิเคราะห์
ตัวอย่าง		บวก	ตัวอย่างนี้ในเบื้องต้นให้ผลเป็นบวกสำหรับเชื้อก่อโรคเป้าหมาย
ตัวอย่าง		ลบ	ตัวอย่างนี้ให้ผลเป็นลบสำหรับเชื้อก่อโรคเป้าหมาย
ตัวอย่าง		ถูกยับยั้ง	เมทริกซ์ตัวอย่างนี้มีลักษณะยับยั้งต่อการตรวจวิเคราะห์ อาจจำเป็นต้องทำการทดสอบซ้ำ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดดูในส่วนหัวข้อการแก้ไขปัญหาและคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์ของชุดทดสอบ
ตัวอย่าง		ตรวจสอบ	มีความคลุมเครือไม่แน่ชัดเกี่ยวกับการมีอยู่หรือไม่มีอยู่ของเชื้อก่อโรคเป้าหมาย อาจจำเป็นต้องทำการทดสอบซ้ำ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดดูในส่วนหัวข้อการแก้ไขปัญหาและคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์ของชุดทดสอบ
ตัวอย่าง		ข้อผิดพลาด	ไม่ตรวจพบการเรืองแสงทางชีวภาพ อาจจำเป็นต้องทำการทดสอบซ้ำ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดดูในส่วนหัวข้อการแก้ไขปัญหาและคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์ของชุดทดสอบ

ภาคผนวก A การหยุดการทดสอบชั่วคราว: การจัดเก็บตัวอย่างและการทดสอบซ้ำ

1. หากต้องการเก็บไลเซตที่ผ่านความร้อนมาแล้ว ให้ปิดฝาหลอดสารละลายไลซิส Neogen ด้วยฝาที่สะอาด (ดูไลซิสส่วนที่ 4.5)
2. หากต้องการจัดเก็บตัวอย่างที่ได้เพิ่มจำนวนเชื้อแล้ว ให้บ่มเชื้อไว้เป็นเวลาอย่างน้อย 18 ชั่วโมงก่อนการจัดเก็บ
3. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ถึง 8°C ไม่เกิน 72 ชั่วโมง
4. เตรียมตัวอย่างที่เก็บไว้ โดยพลิกหลอดสารละลายไลซิสไปมา 2-3 ครั้งเพื่อผสมตัวอย่างให้เข้ากัน
5. เปิดฝาลอด
6. ใส่หลอดไลเซตที่ผสมตัวอย่างเข้ากันแล้วลงในซีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen และให้ความร้อนที่ 100 ± 1°C เป็นเวลา 5 ± 1 นาที
7. นำที่วางหลอดสารละลายไลซิส Neogen ออกจากซีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen และปล่อยให้เย็นลงในซีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen อย่างน้อย 5 นาทีแต่ไม่เกิน 10 นาที
8. ดำเนินการทดสอบขั้นต่อไปในส่วนการเพิ่มขยายจำนวนตามรายละเอียดข้างต้น



เอกสารอ้างอิง:

1. Microbiology Laboratory Guidebook. U. S. Department of Agriculture (USDA) Food Safety and Inspection Service (FSIS) Microbiology Laboratory guidebook 5C.00. Detection and isolation of top seven Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STECs) from meat products and carcass and environmental sponges. Feb 4, 2019.
2. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. October 2018.
3. ISO/TS 13136:2012: Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups
4. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good laboratory practice for nonclinical laboratory studies.
5. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
6. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
7. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. โปรดติดต่อตัวแทนของ Neogen Food Safety เพื่อรับเอกสารนี้

คำอธิบายสัญลักษณ์

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar 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 Leshar Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00918A

제품 설명서

Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC)

제품 설명 및 용도

Neogen® Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성대장균 (EHEC) 은 증균된 식품과 식품 공정 환경 시료에 포함된 시가 독소 생성 대장균(STEC, ‘베로독소 생성 대장균’이라고도 함)에서 시가 독소 유전자(*stx1* 및 *stx2*)와 병원성 유전자(*eae*)를 빠르고 특이적으로 검출하기 위해 Neogen® Molecular Detection System과 함께 사용됩니다. STEC는 *stx1* 및 *stx2* 유전자로 각각 부호화된 시가 독소 유형 1(*Stx1*), 유형 2(*Stx2*) 또는 두 유형 모두를 생성할 수 있는 병원성 대장균을 지칭합니다. *stx1* 및/또는 *stx2*와 *eae*(표현형에 붙고 떨어지는 데 관여하는 병원성 유전자)에 대한 독성 유전자를 포함하는 STEC는 장출혈성 대장균(EHEC)으로 지정됩니다. 검사 키트에는 STEC(EHEC)에서 독소 유전자 *stx1* 및/또는 *stx2*를 검출하는 시약 튜브와 *eae*를 검출하는 시약 튜브가 포함되어 있습니다. Neogen® Molecular Detection System 소프트웨어는 각 시험에 대한 결과를 분리 보고하고 두 시험의 결과를 사용하여 시료가 STEC(EHEC)에 대해 양성인지 혹은 음성인지 판단합니다. EHEC에 대해 양성으로 추정되는 경우, 두 유전자 대상(*stx1* 및/또는 *stx2* 및 *eae*) 모두 양성이어야 합니다. *stx* 시험은 *stx1*과 *stx2*를 구별하지 않으며 *stx1* 및/또는 *stx2*의 존재만 감지합니다.

Neogen Molecular Detection Assay 키트는 고리 매개 등온 증폭 방식으로 증폭 감지를 위한 생체발광이 결합되어, 높은 특이성과 민감도를 가진 핵산 염기 서열을 빠르게 증폭시킵니다. 추정 양성 결과는 실시간으로 보고되는 반면, 음성 결과는 시험이 완료된 후 표시됩니다. 추정 양성 결과는 원하는 방법^(1,2,3)을 사용하거나 현지 규정에 지정된 대로 확인되어야 합니다.

Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC)은 실험 기법에 대해 적절한 교육을 받은 전문가들이 실험실 환경에서 사용하도록 고안되었습니다. Neogen은 식품이나 음료가 아닌 다른 산업에서의 이 제품 사용을 문서화하지 않았습니다. 즉, Neogen은 약품, 화장품, 임상 또는 수의학 시료 시험에 대해서는 이 제품을 문서화하지 않았습니다. Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC)은 가능한 모든 식품 완제품, 식품 공정, 시험 프로토콜 또는 가능한 모든 박테리아 종에 평가되지는 않았습니다.

모든 시험 방법처럼 증균 배지의 원료, 제조법 및 특성은 결과에 영향을 미칠 수 있습니다. 시료 추출 방법, 검사 계획서, 시료 준비, 조작 및 실험 기법 또한 결과에 영향을 미칠 수 있습니다. Neogen은 충분한 수의 특정 식품과 미생물 유발 시험을 이용하여 사용자의 환경에서 사용자의 기준을 충족하는지 확인하기 위해 증균 배지를 포함한 해당 방법의 평가를 권장합니다.

Neogen은 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC)은 펩톤완충수(BPW)-ISO를 증균액으로 사용하여 평가했습니다.

Neogen® Molecular Detection 장비는 시료에 있는 유기체를 파괴하기 위한 Lysis 단계 중에 열처리를 거친 시료와 함께 사용하기 위한 것입니다. Lysis 단계 동안 적절하게 열처리가 되지 않은 시료는 잠재적인 생물학적 위험으로 간주되므로 Neogen Molecular Detection 장비에 절대로 삽입하지 마십시오.

Neogen Food Safety는 설계 및 제조에 관한 ISO(International Organization for Standardization) 9001 인증을 받았습니다.

Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) 시험 키트에는 표 1에 설명된 바와 같이 각 *stx* 및 *eae* 시약에 대한 48회 시험분이 포함되어 있습니다.

표 1. Neogen Molecular Detection Assay 키트 구성요소.

항목	ID	수량	목적	설명
Neogen® Lysis Solution(LS)	투명한 튜브의 분홍색 용액	96개(8개들이 튜브 12개 스트립)	튜브당 580µL의 LS	랙에 꽂혀 있고 바로 사용 가능함
Neogen® Molecular Detection Assay 2 - 시가독소 생성 대장균 (STEC)(<i>stx</i>) Reagent 튜브	주황색 튜브	48개(8개들이 튜브 3개 스트립이 들어있는 파우치 2개)	동결 건조된 특정 증폭 및 검출 혼합물	바로 사용 가능함
Neogen® Molecular Detection Assay 2 - 시가독소 생성 대장균 (STEC)(<i>eae</i>) Reagent 튜브	적색 튜브	48개(8개들이 튜브 3개 스트립이 들어있는 파우치 2개)	동결 건조된 특정 증폭 및 검출 혼합물	바로 사용 가능함
예비 캡	주황색 캡	96개(8개들이 캡 12개 스트립)		바로 사용 가능함
예비 캡	적색 캡	96개(8개들이 캡 12개 스트립)		바로 사용 가능함
Neogen® Reagent 컨트롤(RC)	투명 플립톱 튜브	16개(8개들이 개별 튜브 2개 파우치)	동결 건조된 컨트롤 DNA, 증폭 및 검출 혼합물	바로 사용 가능함

키트에 제공되지 않은 음성(NC) 대조군은 멸균 증균 배지(예: BPW-ISO)입니다. 물을 NC로 사용하지 마십시오.
빠른 시작 안내서는 www.neogen.com에서 확인할 수 있습니다.

안전

사용자는 Neogen Molecular Detection System 및 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) 과 관련된 지침의 안전 정보 일체를 숙지하고 따라야 합니다. 나중에 참조할 수 있도록 안전 지침을 보관하십시오.

- ⚠ **경고:** 피하지 못할 경우 사망이나 심각한 부상 및/또는 재산상의 손해를 초래할 수 있는 위험 상황을 의미합니다.
- ⚠ **주의:** 피하지 못할 경우 재산상의 피해를 초래할 수 있는 잠재적으로 위험한 상황을 의미합니다.

▲ 경고

인간 또는 동물의 상태를 진단하는 데 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) 을 사용해서는 안 됩니다.

사용자는 반드시 적절한 최신 시험 기법의 적용에 있어 담당 직원의 교육을 실시해야 합니다. 예: 우수 실험실 기준⁽⁴⁾, ISO/IEC 17025⁽⁵⁾, 또는 ISO 7218⁽⁶⁾.

오염된 제품의 출고를 초래하는 위음성 결과와 관련된 위험을 줄이려면:

- 계획서를 준수하고 제품 설명서에 명시된 대로 정확하게 시험을 수행하십시오.
- Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) 을 보관할 때는 포장 및 제품 설명서에 명시된 바를 따릅니다.
- Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) 은 유효 기간까지만 사용해야 합니다.
- Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) 은 내부 또는 제3자가 검증한 식품 및 환경 시료와 함께 사용하십시오.
- Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) 에는 내부적으로 또는 제3자가 검증한 표면, 살균제, 프로토콜 및 박테리아 종만 사용하십시오.
- 아릴설포네이트 화합물이 포함된 Neutralizing Buffer를 함유하는 환경 시료의 경우 시험하기 전에 1:2로 희석하십시오(시료 1을 동량의 멸균 증균액 1에 넣음). Neutralizing Buffer 증균액 10μL를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮기는 방법도 있습니다. 아릴설포네이트 화합물과 함께 Neutralizing Buffer를 함유하는 Neogen® 시료 채취 제품: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G 및 HS2410NB2G.

화학물질 및 생물학적 유해 물질 노출 관련 위험을 줄이려면:

- 교육을 받은 사람의 통제하에 적절하게 준비된 실험실에서 식중독균 시험을 수행하십시오. 배양된 증균 배지 및 장비 또는 배양된 증균 배지에 접촉한 표면에는 인체 건강에 위험을 초래할 수 있을 정도의 식중독균이 들어있을 수 있습니다.
- 시약 및 오염된 시료를 다룰 때는 적절한 보호복과 보안경 착용을 비롯하여 항상 표준 실험실 안전 방침을 준수하십시오.
- 증폭 후 증균 배지 및 Reagent 튜브의 내용물과 접촉하지 않도록 하십시오.
- 증균 시료는 현행 지역/국가/규제 표준에 따라 폐기하십시오.
- Lysis 단계 동안 적절하게 열처리가 되지 않은 시료는 잠재적인 생물학적 위험으로 간주되므로 Neogen Molecular Detection 장비에 절대로 삽입하지 마십시오.

시험을 준비하는 동안 교차 오염과 관련된 위험을 줄이려면:

- (사용자를 보호하고 뉴클레아제의 침투를 막기 위해) 항상 장갑을 착용해야 합니다.

뜨거운 액체에 노출된 경우 가능한 위험을 줄이려면:

- 권장 가열 온도를 초과하지 마십시오.
- 권장 가열 시간을 초과하지 마십시오.
- 적절하게 교정된 온도계를 사용하여 Neogen® 분자 검출 히팅 블록 인서트 온도를 확인하십시오(예: 부분 침지 온도계 또는 디지털 열전대 온도계. 전체 침지 온도계는 안됨). 온도계는 반드시 Neogen Molecular Detection 히팅 블록 인서트의 지정된 장소에 놓아야 합니다.

주의

시험을 준비하는 동안 교차 오염과 관련된 위험을 줄이려면:

- Reagent 펠릿 수화 전에 장갑을 교체하십시오.
- 미세입자를 차단하는 (필터 사용) 멸균된 분자 생물학 등급의 피펫 팁을 이용하는 것이 좋습니다.
- 각 시료 이동 시 새 피펫 팁을 사용하십시오.
- 우수 실험실 관리기준을 적용하여 증균된 시료를 Lysis 튜브로 옮기십시오. 피펫 오염을 방지하려면 중간 분주 단계를 추가해야 할 수도 있습니다. 예를 들어 사용자는 증균된 각 시료를 멸균 튜브로 옮길 수 있습니다.
- 해당되는 경우 살균 램프가 있는 분자생물학 워크스테이션을 사용하십시오.
- 주기적으로 1~5%(v:v 물) 가정용 표백제 또는 DNA 제거 용액으로 실험실 벤치와 장비(피펫, 캡/디캡 도구 등)의 오염을 제거하십시오.

위양성 결과가 발생할 위험을 줄이려면:

- 증폭 후에는 절대 Reagent 튜브를 열지 마십시오.
- 오염된 튜브는 항상 1~5%(v:v 물)의 가정용 표백제에 1시간 동안 담가두었다가 키트 준비 구역과 멀리 떨어진 위치에 폐기합니다.
- 증폭 후 Reagent 튜브는 절대 오토클레이브하지 마십시오.

폐기에 대한 추가 정보 및 현지 규정은 안전보건자료(SDS)를 참조하십시오.

구체적인 용도나 절차에 대하여 궁금한 점이 있으면 당사 웹사이트(www.neogen.com)를 방문하거나 현지 Neogen 또는 판매업체로 문의하십시오.

사용자의 책임

사용자는 제품 설명서와 정보를 숙지할 책임이 있습니다. 보다 자세한 정보는 당사의 웹사이트 www.neogen.com를 참고하거나 현지 Neogen이나 영업 대리점으로 문의하십시오.

시험 방법을 선택할 때, 시료 추출 방법, 시험 프로토콜, 시료 준비, 취급, 실험 기법, 시료 자체와 같은 외적 요인들이 결과에 영향을 미칠 수 있음을 인식하는 것이 중요합니다.

시험 방법이나 제품을 선택할 때 선택된 시험 방법이 사용자의 기준을 충족할 수 있도록 적합한 매트릭스와 미생물 유발 시험을 사용하여 충분한 수의 시료를 평가하는 것은 사용자의 책임입니다.

또한 사용자는 모든 시험 방법 및 결과가 고객 및 공급자의 요구사항을 충족하는지 판단할 책임이 있습니다.

다른 시험 방법과 마찬가지로 Neogen Food Safety 제품을 사용하여 얻은 결과가 시험된 매트릭스나 프로세스의 품질을 보장하는 것은 아닙니다.

Neogen에서는 다양한 식품 매트릭스 방법 평가에 도움을 드리기 위해 Neogen® Molecular Detection Matrix Control 키트를 개발했습니다. 필요한 경우 Neogen Molecular Detection Matrix Control(MC)을 이용하여 매트릭스가 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC)의 결과에 영향을 미칠 수 있는지 확인할 수 있습니다. 매트릭스를 대표하는 여러 시료를 시험하십시오(예: Neogen 시험법을 적용하거나 신규 혹은 미지의 매트릭스 또는 원료나 공정의 변화가 있었던 매트릭스들을 검사하는 유효성 검증기간 동안 다양한 곳에서 채취한 시료).

매트릭스는 조성과 가공과 같은 내재적 특징을 포함한 제품의 종류로 정의할 수 있습니다. 매트릭스 간의 차이점은 매트릭스의 처리 방법 또는 모양(예: 비살균 vs. 저온 살균, 생제품 vs. 건조제품 등)이 미치는 영향처럼 간단합니다.

보증의 한계/제한적 구제

개별 제품 포장의 제한적 보증 부분에 명시된 경우를 제외하고, NEOGEN은 상품성 또는 특정 용도 적합성에 대한 보증을 포함한 어떤 명시적이거나 암묵적인 보증도 거부합니다. Neogen Food Safety 제품에 결함이 있을 경우, Neogen이나 그의 공식 판매업체는 자체 판단에 따라 제품을 교체하거나 구매 금액을 환불해 드립니다. 다음은 귀하의 유일한 구제 방법입니다. 제품에서 의심되는 결함이 발견되면 발견일로부터 60일 이내에 Neogen으로 즉시 통지하고, 제품을 Neogen으로 반품해야 합니다. 추가 질문이 있으면 Neogen 담당자 또는 Neogen 공인 대리점에 문의하십시오.

Neogen 책임의 제한

NEOGEN은 수익의 상실을 포함하여 어떤 직접적인, 간접적인, 특별한, 부수적인, 결과적인 손해나 손실에 대해서도 책임지지 않습니다. 법 이론에 따른 Neogen의 책임은 어떤 경우에도 결함이 있다고 주장된 제품의 구매 대금을 초과하지 않습니다.

보관 및 폐기

Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) 은 2~8°C(35~47°F)에서 보관하십시오. 동결시키지 마십시오. 보관 중 키트가 빛을 받지 않도록 하십시오. 키트를 열어 보고 호일 파우치가 손상되지 않았는지 확인합니다. 파우치가 손상된 경우 사용하지 마십시오. 개봉 후, 사용하지 않은 Reagent 튜브는 항상 다시 밀봉 가능한 파우치에 건조제와 함께 넣어 보관하여 건조 동결된 시약의 안정성을 유지해야 합니다. 다시 밀봉한 제품은 최대 90일 동안 2~8°C(35~47°F)에서 보관하십시오.

유효 기간이 지난 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) 은 사용하지 마십시오. 유효기한과 품목 번호는 상자의 외부 라벨에 기입되어 있습니다. 사용하고 난 증균 배지와 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) 튜브에는 잠재적으로 병원성 물질이 들어 있을 수 있습니다. 시험이 완료되면 현재 업계 표준에 따라 오염 폐기물을 폐기하십시오. 폐기에 대한 추가 정보 및 현지 규정은 안전보건자료(SDS)를 참조하십시오.

사용 지침

모든 지침을 주의 깊게 준수하십시오. 그렇지 않으면 부정확한 결과가 나올 수 있습니다.

주기적으로 1~5%(v:v 물)의 가정용 표백제 또는 DNA 제거 용액으로 실험실 벤치와 장비(피펫, 캡/디캡 도구 등)의 오염을 제거하십시오.

사용자는 “설치 적격성 평가(IQ)/작동 적격성 평가(OQ) 프로토콜 및 Neogen Molecular Detection System 지침” 문서⁽⁷⁾에 명시된 대로 Neogen Molecular Detection System 작업자 적격성 평가(OQ) 교육을 완료해야 합니다.

특정 요건에 관해서는 “검증 방법 관련 상세 설명” 섹션을 참조하십시오:

표 3. *Performance Tested Method*SM (PTM) 인증서 #071902에 따른 증균 프로토콜.

시료 증균

표 2와 3은 식품 증균 프로토콜에 대한 안내입니다.

다른 시료 추출 프로토콜 또는 희석 비율을 검증하여 이 시험 방법이 사용자의 기준을 충족하도록 하는 것은 사용자의 책임입니다.

식품

1. BPW ISO 증균 배지를 41.5±1°C로 평형시킵니다.
2. 증균 배지와 시료를 무균 방식으로 결합합니다. 모든 육류 및 입자가 매우 미세한 시료에 대해서는 필터 백을 사용하는 것이 좋습니다.
3. 모든 매트릭스를 혼합하고 적절한 프로토콜 표(표 2 또는 3 참조)의 설명에 따라 배양합니다.

환경 시료

경고: 스폰지용 수화 용액으로 아릴설포네이트 화합물을 함유하는 Neutralizing Buffer를 사용하기로 선택하는 경우, 오염된 제품 출고를 초래하는 위음성 결과와 관련된 위험을 줄이려면 시험 전에 증균된 환경 시료를 1: 2로 희석해야 합니다(시료 1을 동량의 멸균 증균 배지 1에 넣음). Neutralizing Buffer 증균액 10µL를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮기는 방법도 있습니다.

다른 시료 추출 프로토콜 또는 희석 비율을 검증하여 이 시험 방법이 사용자의 기준을 충족하도록 하는 것은 사용자의 책임입니다.

표 2. 일반 증균 프로토콜.

시료 매트릭스	시료량	증균 배양액량(mL) (미리 가열)	증균 온도 (±1°C)	증균 시간(hr)	시료 분석량(µL)
생소고기 분쇄육, 조각 및 세절육 ^(a)	375g	1125 BPW-ISO	41.5	10~18	20
날고기(돼지고기, 가금류, 양고기, 사슴 고기) ^(a)	375g	1125 BPW-ISO	41.5	10~18	20
잎채소 ^(b)	200g	450 BPW-ISO	41.5	18~24	20
새싹채소 ^(c)	25g	225 BPW-ISO	41.5	18~24	20
생 유제품 ^(d)	25g 또는 25mL	225 BPW-ISO	41.5	18~24	20

- ^(a) 소고기(소고기 분쇄육, 조각 및 세절육)와 날고기(돼지고기 분쇄육, 가금류 및 소고기가 아닌 고기) 시료 - 미리 가열한 BPW-ISO를 넣은 후 30~60초 동안 손으로 마사지하여 멍친 부분을 풀어주고 분리합니다.
- ^(b) 잎채소 - 잎을 증균액(미리 가열된 BPW-ISO)으로 헹구고 30~60초 동안 부드럽게 젖습니다. 잎을 마사지하거나 균질화하지 마십시오.
- ^(c) 새싹채소 - 30~60초 동안 증균액(미리 가열된 BPW-ISO)으로 새싹채소를 헹구고 마사지하거나 균질화하지 마십시오.
- ^(d) 생 유제품 시료 - 미리 가열한 BPW-ISO를 넣은 후 30~60초 동안 균질화하십시오.

검증 방법 관련 상세 설명

AOAC® *Performance Tested Method*SM(PTM) 인증서 #071902



AOAC Research Institute PTMSM 연구에서, Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) 은 EHEC 검출에 효과적인 방법이라는 점이 밝혀졌습니다. 이 연구에서 실험된 매트릭스는 표 3에 나와 있습니다.

표 3. AOAC PTMSM 인증서 #071902에 따른 증균 프로토콜.

시료 매트릭스	시료량	증균 배양액량(mL)	증균 온도(±1°C)	증균 시간(hr)	시료 분석량(μL)
생소고기 세절육 ^(a)	375g	1125 BPW-ISO(미리 가열)	41.5	10~18	20
생소고기 분쇄육 ^(a)	375g	1125 BPW-ISO(미리 가열)	41.5	10~18	20
생소고기 분쇄육 ^(a)	25g	225 BPW-ISO(미리 가열)	41.5	10~18	20
생돼지고기 분쇄육 ^(a)	375g	1125 BPW-ISO(미리 가열)	41.5	10~18	20
생 가금류 조각 ^(a)	375g	1125 BPW-ISO(미리 가열)	41.5	10~18	20
기계적으로 분리된 닭고기	25g	225 BPW-ISO(미리 가열)	41.5	10-24	20
시금치 ^(b)	200g	450 BPW-ISO(미리 가열)	41.5	18~24	20
새싹채소 ^(c)	25g	225 BPW-ISO(미리 가열)	41.5	18~24	20
말린 대마초 꽃, 말린 대마 꽃 ^(d)	10g	90 BPW-ISO	41.5	28-32	20

(a) 소고기 시료(소고기 간 것과 다듬은 것) - 소고기 시료에 미리 가열한 BPW-ISO를 넣습니다. 30~60초 동안 손으로 마사지하여 뭉친 부분을 풀어주고 분리합니다.

(b) 시금치 - 매트릭스에 미리 가열한 BPW-ISO를 넣습니다. 잎을 용액으로 행구고 30~60초 동안 부드럽게 젖습니다. 잎을 마사지하거나 균질화하지 마십시오.

(c) 새싹채소 - 30~60초 동안 증균액(미리 가열된 BPW-ISO)으로 새싹채소를 행구고 마사지하거나 균질화하지 마십시오.

(d) 말린 대마초 꽃(>0.3% THC), 말린 대마 꽃(≤0.3%THC)

Neogen[®] Molecular Detection 스피드 로더 트레이 준비

1. 1~5%(v:v 물) 가정용 표백 용액을 천 또는 1회용 타월에 적셔 Neogen Molecular Detection 스피드 로더 트레이를 닦습니다.
2. 물로 Neogen Molecular Detection 스피드 로더 트레이를 헹굽니다.
3. 1회용 타월을 사용하여 Neogen Molecular Detection 스피드 로더 트레이를 닦아서 말립니다.
4. 사용하기 전에 Neogen Molecular Detection 스피드 로더 트레이가 마른 상태인지 확인하십시오.

Neogen[®] Molecular Detection 냉각 블록 인서트 준비

Neogen 분자 검출 냉각 블록 인서트를 바로 실험실 벤치에 놓아야 합니다. Neogen Molecular Detection 냉각 블록 트레이를 사용하지 않습니다. 실험실 실온(20~25°C)에서 블록을 사용합니다.

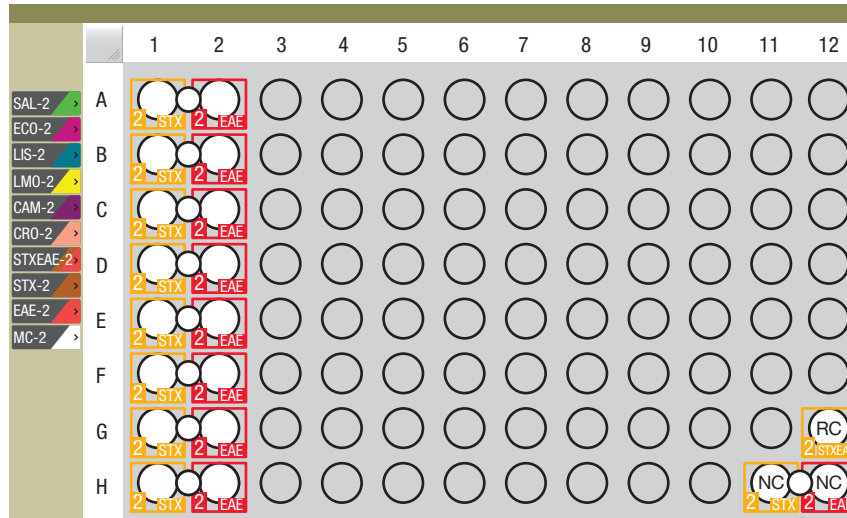
Neogen[®] Molecular Detection 히팅 블록 인서트 준비

건조 이중 블록 히터 장치에 Neogen Molecular Detection 히팅 블록 인서트를 놓습니다. 건조 블록 히터 장치를 켜고 Neogen Molecular Detection 히팅 블록 인서트가 100±1°C를 유지할 수 있도록 합니다.

참고: 히터 장치에 따라, Neogen Molecular Detection 히팅 블록 인서트가 온도에 도달하는 데 약 30분이 걸릴 수 있습니다. 적절한 교정된 온도계(예: 부분 침지 온도계 또는 디지털 열전대 온도계. 전체 침지 온도계는 아님)를 지정된 위치에 놓아 Neogen Molecular Detection 히팅 블록 인서트의 온도가 100±1°C인지 확인합니다.

Neogen[®] Molecular Detection 장비 준비

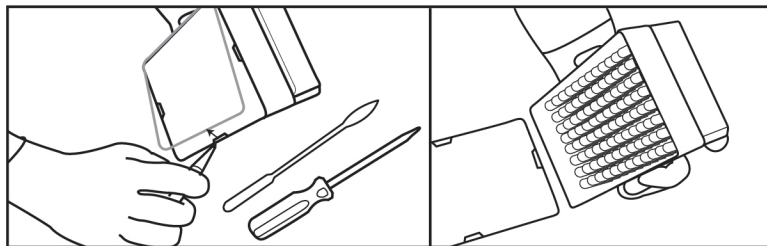
1. Neogen Molecular Detection System 소프트웨어를 실행하고 로그인합니다. Neogen Food Safety 담당자에게 문의하여 이 소프트웨어가 최신 버전인지 확인하십시오.
2. Neogen Molecular Detection 장비를 켵니다.
3. 각 시료에 대한 데이터를 포함하는 실행을 만들거나 편집합니다. 자세한 내용은 Neogen Molecular Detection System 사용 설명서를 참조하십시오.
 - 3.1. 각 시료에 총 두 시험이 진행되므로 소프트웨어에서 STXEAE-2 아이콘을 선택하면 인접 웰(예: A1, A2, B1, B2 등) 두 개가 *stx*에 한 개, *eae* 시약 튜브에 한 개 선택됩니다. NC는 각 시약 튜브에 대해 설정되며 RC 한 개는 키트에 대해 설정됩니다.



참고: 반응 튜브를 포함한 Neogen Molecular Detection 스피드 로더 트레이를 삽입하기 전에 Neogen Molecular Detection 장비가 준비 상태에 도달해야 합니다. 이 가열 단계는 약 20분이 걸리며 완료되면 기기의 상태 표시줄에 주황색 등이 켜집니다. 기기가 실행할 준비가 되면 상태 표시줄이 녹색으로 바뀝니다.

Lysis

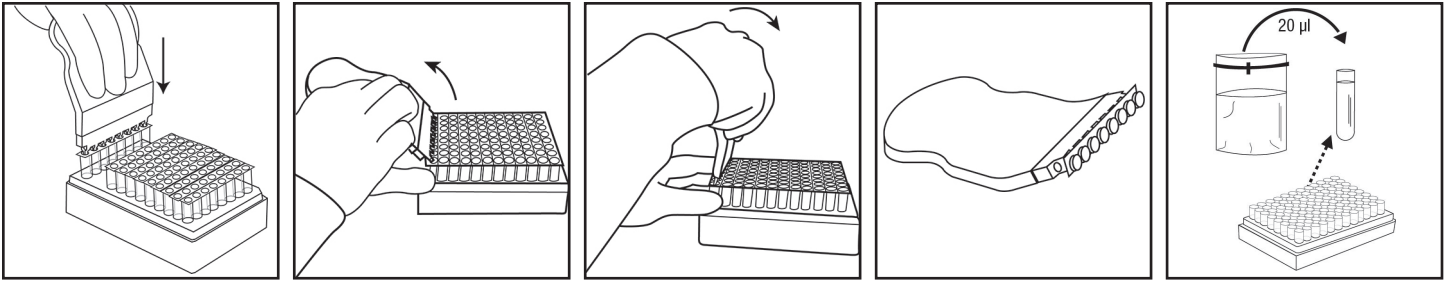
Neogen Molecular Detection 히팅 블록 인서트에 부착하기 전에 스크루드라이버나 스패툴라로 Neogen Lysis Solution 랙의 하단을 제거합니다.



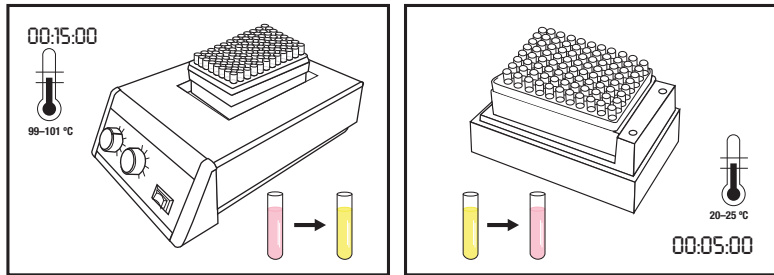
1. 랙을 주변 온도(20~25°C)에서 하룻밤 동안(16~18시간) 두어 Neogen Lysis Solution 튜브를 온도 평형시킵니다. Neogen Lysis Solution 튜브를 주변 온도로 평형시키는 또 다른 방법은 최소 2시간 동안 실험실 벤치에 Neogen Lysis Solution 튜브를 두거나, 37±1°C 배양기에 1시간 동안 Neogen Lysis Solution 튜브를 배양하거나 100°C의 히팅 블록에 30초간 두는 것입니다.
2. 캡을 씌운 튜브를 뒤집어 섞습니다. 뒤집은 다음 4시간 이내에 다음 단계를 진행하십시오.
3. 배양기에서 증균된 시료를 꺼냅니다.
4. 각 시료와 NC(평균 증균 배지)에 Neogen Lysis Solution 튜브 1개가 필요합니다.
 - 4.1. Neogen Lysis Solution 튜브 스트립을 원하는 튜브 수로 자를 수 있습니다. 필요한 튜브 또는 8개들이 튜브 스트립 수를 선택합니다. Neogen Lysis Solution 튜브를 빈 랙에 놓습니다.
 - 4.2. 교차 오염을 방지하기 위해 한 번에 하나씩 Neogen Lysis Solution 튜브 스트립의 캡을 벗기고 각 분주 단계에 새 피펫 팁을 사용합니다.
 - 4.3. 아래 설명된 대로, 증균된 시료를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮깁니다.

각 증균된 시료를 개별 Neogen Lysis Solution 튜브로 **먼저** 옮깁니다. NC를 **마지막**으로 옮깁니다.

- 4.4. Neogen® Molecular Detection Lysis Cap/Decap Tool을 사용하여 한 번에 스트립 하나씩, Neogen Lysis Solution 튜브 스트립 1개의 캡을 벗깁니다.
- 4.5. Neogen Lysis Solution 튜브 캡 폐기 - 재시험을 위해 Lysate을 그대로 둘 경우 캡을 깨끗한 용기에 두어 Lysis 후 다시 사용할 수 있도록 합니다.
 - 4.5.1. 보존된 Lysate 처리에 대해서는 부록 A를 참조하십시오.
- 4.6. 시료 20µL를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮깁니다.

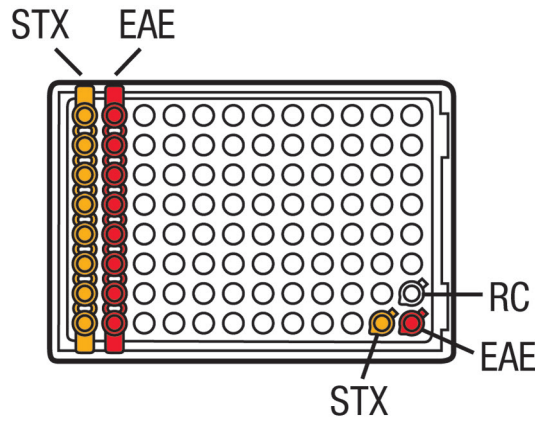


5. 시험할 시료 수에 대해, 필요한 만큼 4.4~4.6단계를 반복합니다.
6. 모든 시료를 옮겼을 때 NC(멸균 증균 배지, 예: BPW) 20µL를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮깁니다. 물을 NC로 사용하지 마십시오.
7. Neogen Molecular Detection 히팅 블록 인서트의 온도가 100±1°C인지 확인합니다.
8. 덮개를 씌우지 않은 Neogen Lysis Solution 튜브의 랙을 Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트에 놓고 15±1분 동안 가열합니다. 가열 중 Neogen Lysis Solution 용액은 분홍색(차가움)에서 노란색(뜨거움)으로 바뀝니다.
 - 8.1. Lysis 단계 동안 적절하게 열처리가 되지 않은 시료는 잠재적인 생물학적 위험으로 간주되므로 Neogen Molecular Detection 장비에 절대로 삽입하지 마십시오.
9. 덮개를 씌우지 않은 Neogen Lysis Solution 튜브의 랙을 Neogen Molecular Detection 히팅 블록에서 제거하고 Neogen Molecular Detection 냉각 블록 인서트에 최소 5분, 최대 10분 냉각시킵니다. Neogen Molecular Detection 냉각 블록 인서트는 Neogen® Molecular Detection 냉각 블록 트레이 없이 상온에서 바로 실험실 벤치에 놓아야 합니다. 식었으면 Neogen Lysis Solution이 분홍색으로 다시 바뀝니다.
10. Neogen Lysis Solution 튜브의 랙을 Neogen Molecular Detection 냉각 블록 인서트에서 제거합니다.



중요

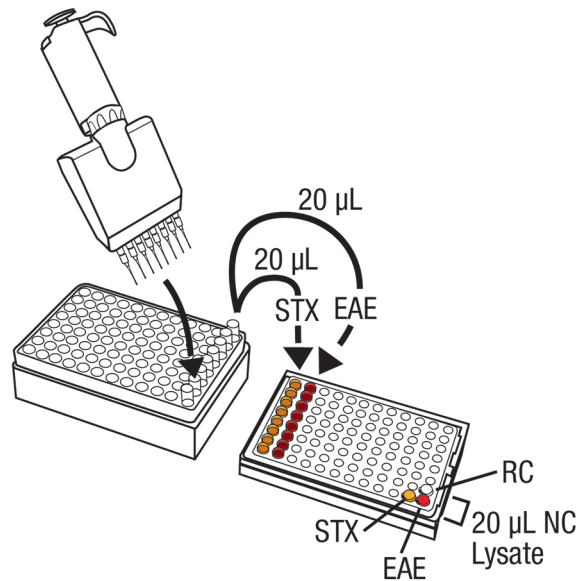
1. 각 시료와 NC를 위해 1개의 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 시가독소 생성 대장균 (STEC)(*stx*)과 1개의 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 시가독소 생성 대장균 (STEC)(*eae*) Reagent 튜브가 필요합니다.
 - 1.1. 튜브 스트립을 원하는 튜브 개수로 자를 수 있습니다. 개별 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 시가독소 생성 대장균 (STEC)(*stx*)과 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 시가독소 생성 대장균 (STEC)(*eae*) Reagent 튜브 또는 필요한 8개들이 튜브 스트립 수를 선택합니다.
 - 1.2. Neogen Molecular Detection Assay 2 - 시가독소 생성 대장균 (STEC)(*stx*) 튜브를 비어 있는 랙에 한 줄로 놓습니다.
 - 1.3. Neogen Molecular Detection Assay 2 - 시가독소 생성 대장균 (STEC)(*eae*) 튜브를 비어 있는 랙에 인접한 오른쪽 줄에 놓습니다.
 - 1.4. 튜브 맨 아래 시약 알갱이를 휘젓지 마십시오.
2. 하나의 Neogen Reagent 컨트롤 튜브를 선택하고 랙에 놓습니다.
3. NC lysate의 경우, Neogen Molecular Detection Assay 2 - 시가독소 생성 대장균 (STEC)(*stx*) Reagent 튜브 1개와 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 시가독소 생성 대장균 (STEC)(*eae*) Reagent 튜브 1개를 선택하여 랙에 놓습니다.



4. 교차 오염을 방지하기 위해 한 번에 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) Reagent 튜브 스트립 1개의 캡을 벗기고 각 분주 단계마다 새 피펫 팁을 사용합니다.
5. 아래 설명된 대로 각 lysate를 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) Reagent 튜브로 옮깁니다.
 - 5.1. 먼저 5.5와 5.6에 설명된 대로 시료 lysate 각각을 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 시가독소 생성 대장균 (STEC)(*stx*) Reagent 튜브로 옮깁니다.
 - 5.2. 그 다음 5.5와 5.6에 설명된 대로 동일한 시료 lysate 각각을 가까운 오른쪽 줄의 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 시가독소 생성 대장균 (STEC)(*eae*) Reagent 튜브로 옮깁니다.

참고: 각 이동 시 새 피펫 팁을 사용하십시오. 동일한 lysate 시료에서 *stx* 및 *eae* 시약 튜브로 옮길 때 같은 피펫 팁을 사용하지 마십시오.

- 5.3. 모든 시료 lysate를 옮긴 후 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 시가독소 생성 대장균 (STEC)(*stx*) Reagent 튜브와 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 시가독소 생성 대장균 (STEC)(*eae*) Reagent 튜브 각각에 NC lysate를 넣으십시오.
- 5.4. 마지막으로 NC lysate를 Reagent 컨트롤 튜브로 옮기십시오.



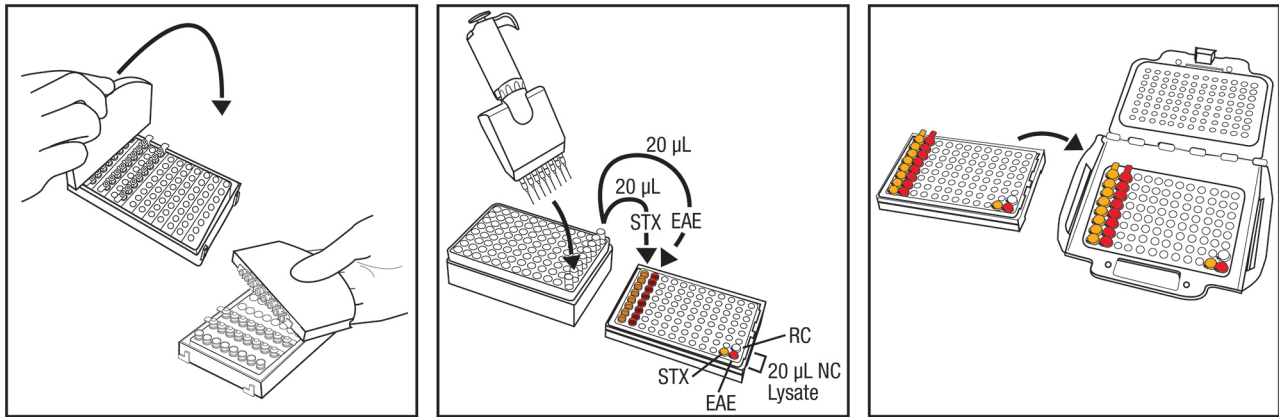
- 5.5. Neogen® Molecular Detection Reagent Cap/Decap Tool를 사용하여 한 번에 스트립 하나씩 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) Reagent 튜브의 캡을 벗깁니다. 캡을 버리십시오.
- 5.6. Neogen Lysis Solution 튜브에서 용액의 상부 1/2에서 시료 Lysate 20µL를 침전되지 않도록 하여 해당 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) Reagent 튜브로 옮깁니다. 알갱이가 휘저어져 섞이지 않도록 기울여 붓습니다. 위아래로 가볍게 5번을 피펫팅하여 섞습니다.

참고: 각 이동 시 새 피펫 팁을 사용하십시오. 동일한 lysate 시료에서 *stx* 및 *eae* 시약 튜브로 옮길 때 같은 피펫 팁을 사용하지 마십시오.

- 5.7. 개별 시료 Lysate이 스트립의 해당 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) Reagent 튜브를 덮고, Neogen 분자 검출 Reagent Cap/Decap Tool의 둥근 면을 사용하여 앞뒤로 압력을 가하여 캡이 단단히 닫혀 있는지 확인하십시오.
- 5.8. 제공된 여분의 마개로 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) Reagent 튜브를 덮고, Neogen 분자 검출 Reagent Cap/Decap Tool의 둥근 면을 사용하여 앞뒤로 압력을 가하여 캡이 단단히 닫혀 있는지 확인하십시오.
- 5.9. Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) 시약 튜브에 대하여 시험할 시료 수에 대해, 필요한 만큼 5.6~5.8 단계를 반복합니다.
- 5.10. 모든 시료 Lysate을 옮긴 후 5.6~5.8 단계를 반복하여 NC Lysate 20µL를 각각의 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 시가독소 생성 대장균 (STEC)(*stx*) 및 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 시가독소 생성 대장균 (STEC)(*eae*) Reagent 튜브로 옮깁니다.
- 5.11. **NC lysate 20µL를 Neogen Reagent 컨트롤 튜브로 옮깁니다.** 알갱이가 휘저어져 섞이지 않도록 기울여 붓습니다. 위아래로 가볍게 5번을 피펫팅하여 섞습니다.

각 시료 용해물을 개별 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) Reagent 튜브 로 먼저 옮긴 뒤 NC를 옮기십시오. 마지막으로 Neogen Reagent 컨트롤 튜브를 수화합니다.

6. 캡이 씌워진 튜브를 깨끗하고 오염되지 않은 Neogen Molecular Detection 스피드 로더 트레이에 내려놓은 다음 뚜껑을 닫고 잠급니다.



7. Neogen Molecular Detection System 소프트웨어에서 구성된 실행을 검토하고 확인합니다.
8. 소프트웨어에서 시작 버튼을 클릭하고 사용할 기기를 선택합니다. 선택한 기기의 뚜껑이 자동으로 열립니다.
9. Neogen Molecular Detection 스피드 로더 트레이를 Neogen Molecular Detection 장비에 놓고 뚜껑을 닫으면 시험이 시작됩니다. 결과는 60분 이내에 제공되지만 양성 여부는 더 일찍 검출할 수 있습니다.
10. 시험이 완료되었으면 Neogen Molecular Detection 장비에서 Neogen Molecular Detection 스피드 로더 트레이를 꺼내고 1~5%(v:v 물)의 가정용 표백 용액에 1시간 동안 담갔다 분석 준비 영역에서 떨어진 곳에 폐기하십시오.

주의: 교차 오염으로 인한 위양성의 위험을 최소화하려면 증폭된 DNA를 함유한 Reagent 튜브를 절대 열지 마십시오. 여기에는 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) Reagent, Neogen Reagent 컨트롤 및 Neogen Matrix 컨트롤 튜브가 포함됩니다. 밀봉된 Reagent 튜브는 1~5%(v:v 물)의 가정용 표백제에 1시간 동안 담가 두었다가 키트 준비 구역과 멀리 떨어진 위치에 폐기합니다.

결과 및 해석







알고리즘은 핵산 증폭을 탐지할 때 생성되는 빛 출력 곡선을 해석합니다. 결과는 소프트웨어에 의해 자동으로 분석되고 결과에 기반하여 색상으로 구분됩니다. 양성 또는 음성 결과는 다양한 고유 곡선 매개변수의 분석으로 판별됩니다. 추정 양성 결과는 실시간으로 보고되는 반면, 음성 결과는 실행이 완료된 후 표시됩니다.

Neogen 분자 검출 시스템 소프트웨어는 각 시험(*stx* 및 *eae*)에 대한 결과를 분리 보고하고 두 시험의 결과를 사용하여 시료가 STEC(EHEC)(아래 그림 참조)에 대해 양성인지 혹은 음성인지 판단합니다. STEC(EHEC)에 대해 양성으로 추정되는 경우, 두 유전자 대상(*stx1* 및/또는 *stx2* 및 *eae*) 모두 양성이어야 합니다. **개별 시험에서 오류나 검사가 표시된다면 최종 결과가 오류 또는 검사로 나타납니다. 최종 결과를 적절하게 가져오려면 재시험이 필요합니다(결과 키 참조).** 소프트웨어는 필요한 경우 개별 시험의 설정도 허용하며 부록 A에 설명된 단계와 보존된 증균의 Lysis 및 증폭 섹션에 설명된 단계를 따라 보존된 lysate에 대해 시료 lysate 또는 증균의 새 lysate를 다시 시험할 수 있습니다.

증균된 시료 lysate 결과 키

	양쪽 모두 양성, 최종 결과 양성
	stx 양성, eae 음성, 최종 결과 음성
	stx 양성, eae 계속 검사, 최종 결과 계속 검사, 재시험
	stx 양성, eae 오류, 최종 결과 오류, 재시험
	stx 음성, eae 양성, 최종 결과 음성
	stx 음성, eae 음성, 최종 결과 음성
	stx 음성, eae 계속 검사, 최종 결과 계속 검사, 재시험
	stx 음성, eae 오류, 최종 결과 오류, 재시험
	stx 계속 검사, eae 양성, 최종 결과 계속 검사, 재시험
	stx 계속 검사, eae 음성, 최종 결과 계속 검사, 재시험
	stx 계속 검사, eae 계속 검사, 최종 결과 계속 검사, 재시험
	stx 계속 검사, eae 오류, 최종 결과 오류, 재시험
	stx 오류, eae 양성, 최종 결과 오류, 재시험
	stx 오류, eae 음성, 최종 결과 오류, 재시험
	stx 오류, eae 계속 검사, 최종 결과 오류, 재시험
	stx 오류, eae 오류, 최종 결과 오류, 재시험

음성 컨트롤 키






	양쪽 모두 유효, 링크 유효
	한쪽 유효, 다른 쪽 오류, 링크 오류, 재시험
	한쪽 유효, 다른 쪽 무효, 링크 무효, 재시험
	양쪽 오류, 링크 오류, 재시험
	양쪽 무효, 링크 무효, 재시험
	한쪽 오류, 다른 쪽 무효, 링크 오류, 재시험

양성으로 추정되는 시료는 1차 증균 배양액 증균에서 선택적 플레이트로 이전하는 것에서 시작하여 적절한 생화학적 및 혈청학적 방법으로 분리균 확인을 실시하는 등 실험실 표준 운영 절차 또는 적절한 참고 방법 확인^(1,2,3)을 통해 확인해야 합니다. MLG 5C에서 명시된 매트릭스의 경우, 선택적 배지에 플레이트를 놓기 전에 면역 자기 분리(IMS)를 수행해야 합니다.

참고: 시스템과 Neogen Molecular Detection Assay 2 - 장출혈성 대장균 (EHEC) 증폭 시약은 “배경” RLU를 가지므로 음성 시료도 0을 기록값으로 제공하지 않습니다.

이례적인 빛 출력이 나타나는 경우, 알고리즘은 이를 검사(Inspect)로 분류합니다. Neogen은 모든 검사 시료에 대해 분석을 반복하는 것을 권장합니다. 결과가 계속 검사인 경우, 기본 설정한 방법^(1,2,3)을 사용하거나 현지 규정에 따라 확정 시험을 진행하십시오.

표 4. 여러 소프트웨어 결과에 대한 기호 및 정보.

웰 유형	웰 결과 기호	결과	해석
시료		양성	시료는 대상 식중독균에 대해 양성으로 추정됩니다.
시료		음성	시료는 대상 식중독균에 대해 음성입니다.
시료		억제	시료 매트릭스는 시험에 대해 억제되었습니다. 재시험이 필요할 수 있습니다. 자세한 내용은 문제 해결 섹션과 시험 키트 제품 설명서를 참조하십시오.
시료		검사	대상 식중독균의 존재 여부를 확인할 수 없습니다. 재시험이 필요할 수 있습니다. 자세한 내용은 문제 해결 섹션과 시험 키트 제품 설명서를 참조하십시오.
시료		오류	감지된 생체발광이 없습니다. 재시험이 필요할 수 있습니다. 자세한 내용은 문제 해결 섹션과 시험 키트 제품 설명서를 참조하십시오.

부록 A. 시험 계획서 중단: 시료의 보관 및 재시험

1. 열처리된 Lysate를 보관하려면 깨끗한 캡으로 Neogen Lysis Solution 튜브를 다시 씌웁니다(Lysis 섹션, 4.5 참조).
2. 증균된 시료를 보관하려면 최소한 보관 18시간 전에 배양합니다.
3. 4~8°C에서 최대 72시간 동안 보관합니다.
4. 2~3번 뒤집어서 혼합하여 보관된 시료를 증폭하도록 준비합니다.
5. 튜브의 캡을 벗깁니다.
6. Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트에 혼합된 Lysate 튜브를 놓고 100±1°C에서 5±1분간 가열합니다.
7. Neogen Lysis Solution 튜브의 랙을 Neogen 분자 검출 히팅 블록에서 제거하고 Neogen 분자 검출 냉각 블록 인서트에 최소 5분, 최대 10분 냉각시킵니다.
8. 위에서 상세히 설명한 증폭 섹션의 프로토콜을 계속합니다.

참고자료:

1. Microbiology Laboratory Guidebook. U. S. Department of Agriculture (USDA) Food Safety and Inspection Service (FSIS) Microbiology Laboratory guidebook 5C.00. Detection and isolation of top seven Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STECs) from meat products and carcass and environmental sponges. Feb 4, 2019.
2. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. October 2018.
3. ISO/TS 13136:2012: Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups
4. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good laboratory practice for nonclinical laboratory studies.
5. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
6. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examination.
7. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. 본 문서의 사본을 얻으려면 Neogen Food Safety 담당자에게 문의하십시오.

기호 설명

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar 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 Leshar Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00918A