



Simultaneous Multiplex Real Time PCR (SIMUL-qPCR)

Top 7 STEC (*E. coli* O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121, O145)

Inserto del kit acorde al flujo de trabajo AOAC PTM

USO PREVISTO Y APLICACIONES

El ensayo SIMUL-qPCR puede ser utilizado por productores de alimentos y laboratorios asociados para la detección rápida y confiable de las Top 7 *E. coli* productoras de toxina Shiga en carne de res, carne molida de res y hojas de muestreo de poliolefina. Todos los ensayos del sistema SIMUL-qPCR están diseñados para tener el mismo tiempo de ejecución, lo que permite la identificación simultánea de todos los ensayos SIMUL-qPCR. Además, cada ensayo utiliza la técnica "Multiplex" lo que permite la amplificación de múltiples objetivos durante la misma corrida. El ensayo SIMUL-qPCR Top 7 STEC incorpora un enfoque "Multiplex" para identificar *E. coli* O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121, O145, toxina Shiga y genes intimin.

El ensayo "Simultaneous Multiplex Real Time PCR (SIMUL-qPCR) Top 7 STEC ha sido validado por AOACTM Research Institute Performance Test MethodsTM para carne de res, carne molida de res y hojas de muestreo. El método USDA FSIS MLG fue usado como método de comparación. El ensayo SIMUL-qPCR Top 7 STEC demostró ser equivalente al método de referencia. El límite de detección del presente ensayo es 10,000 UFC/mL post-enriquecimiento.

INFORMACION DEL PRODUCTO

SKU	DESCRIPCION	UDM / CANTIDAD
SMRT-T7-096	SIMUL-qPCR Top7 STEC Assay Collection	1 KIT 96 Tests/Kit

COMPONENTES DEL KIT

SKU	DESCRIPCION	DETECTA
SMRT-ECH7-096	SIMUL-qPCR <i>E. coli</i> O157:H7 Kit	<i>E. coli</i> O157:H7
SMRT-STXEAE-096	SIMUL-qPCR Shiga Toxin (stx) and Intimin (eae) Gene STEC Kit	Shiga toxin gene Intimin gene
SMRT-O26O103-096	SIMUL-qPCR <i>E. coli</i> O26 and <i>E. coli</i> O103 STEC Kit	O26, O103
SMRT-O111O145-096	SIMUL-qPCR <i>E. coli</i> O111 and <i>E. coli</i> O145 STEC Kit	O111, O145
SMRT-O45O121-096	SIMUL-qPCR <i>E. coli</i> O45 and <i>E. coli</i> O121 STEC Kit	O45, O121

FUNDAMENTO

El caldo de recuperación y enriquecimiento para *E. coli* Enterohemorrágica (EREB) es un medio selectivo, específicamente optimizado para recuperación y enriquecimiento en un solo paso de *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) en muestras carne de res, carne molida de res y hojas de muestreo. El medio también puede utilizarse para la recuperación y enriquecimiento de *Salmonella* como un método único junto con EHEC en muestras de carne de res.

Durante la amplificación por PCR, los "primers" directos e inversos se hibridan con secuencias de ADN genómico de EHEC. Se incluye una sonda fluorogénica en la misma mezcla de reacción que consiste en una sonda de ADN marcada con un indicador en la posición 5' y una molécula de inhibición en la posición 3'. Durante la amplificación por PCR, la sonda es cortada y tanto el indicador como la molécula de inhibición son separadas emitiendo fluorescencia. El aumento en la fluorescencia puede ser detectado en un instrumento para PCR tiempo real. La colección está compuesta por 5 tubos para PCR únicos con múltiples objetivos para STEC los cuales son analizados de manera simultánea pero pueden procesarse de forma individual. La tabla a continuación especifica los objetivos y sus correspondientes canales de fluorescencia.

NOMBRE DEL KIT	FAM TM	CAL Fluor® Orange 560	CAL Fluor® Red 610
SIMUL-qPCR <i>E. coli</i> O157:H7 Kit	<i>E. coli</i> O157:H7	No Target	IAC
SIMUL-qPCR Shiga Toxin (stx) and Intimin (eae) Gene STEC Kit	Intimin (eae) gene	Shiga toxin (stx) gene	IAC
SIMUL-qPCR <i>E. coli</i> O26 and <i>E. coli</i> O103 STEC Kit	<i>E. coli</i> O103	<i>E. coli</i> O26	IAC
SIMUL-qPCR <i>E. coli</i> O111 and <i>E. coli</i> O145 STEC Kit	<i>E. coli</i> O145	<i>E. coli</i> O111	IAC
SIMUL-qPCR <i>E. coli</i> O45 and <i>E. coli</i> O121 STEC Kit	<i>E. coli</i> O45	<i>E. coli</i> O121	IAC

MATERIALES ADICIONALES REQUERIDOS

Otros materiales necesarios No proporcionados incluyen:

PARA TODAS LAS MUESTRAS

- AFD EHEC Caldo de Recuperación y Enriquecimiento (EREB)
- Sistema PCR tiempo-real MyGo Pro y software MyGo Pro v3.4
- Autoclave
- Agua Destilada / desionizada
- Bolsas estériles tipo Stomacher
- Stomacher
- Incubadora: a 42 ± 1°C
- Incubadora: a 45 ± 1°C
- Mini-centrífuga (opcional)
- Bloques térmicos con insertos
- Vortex
- Termómetros calibrados
- Herramienta de Apertura / Cierre de tubos PCR (opcional)
- Mini-centrífuga (opcional)
- Pipeta Monocanal ajustable
- Pipeta Multi-canal ajustable
- Tubos para centrifuga de 1.5 ml o equivalente grado PCR para lisis
- Rack para tubos de microcentrifuga
- Guantes sin polvo
- Equipo de laboratorio de rutina
- Control Positivo y Negativo (Opcional)

PRECAUCIONES

Este producto es solo para uso diagnóstico in vitro. No ingerir, inhalar ni permitir que entren en contacto con la piel. Observe las precauciones de riesgo biológico aprobadas y las técnicas asépticas. Se deben ejercer procedimientos de nivel 2 de bioseguridad (BMBL, <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/bmbl.pdf> o sitio actual). Se debe tener mucho cuidado al manipular muestras de prueba y caldos de enriquecimiento. Todos los caldos de enriquecimiento, platos y otros artículos pueden contener varios patógenos, ya sea que contengan o no especies de *E. coli*. Este kit debe ser utilizado únicamente por personal de laboratorio debidamente capacitado y calificado en un entorno de laboratorio. Todas las muestras de laboratorio deben considerarse infecciosas y manejarse adecuadamente.

PROCEDIMIENTO

Preparación del Medio – Método con Autoclave

1. Use un recipiente limpio para cada litro de preparación de medio.
2. Agite el recipiente con medio antes de cada uso.
3. Pese 37.8 g de medio dentro del recipiente limpio y agregue 1 litro de agua destilada / desionizada.
4. Revuelva constantemente y caliente la solución hasta que el polvo se disuelva. El rango de pH aceptable es 7.2 ± 0.2.
5. Esterilice los recipientes con el medio preparado en autoclave a 121°C por 15 min.
6. Enfríe los recipientes a temperatura ambiente. El medio es estable a temperatura ambiente o puede almacenarse a 2–8°C por hasta 45 días. Mantenga alejado de la luz.

Preparación del Medio – Método sin Autoclave

1. Agite los recipientes con medio antes de cada uso.
2. Pese 37.8 g de medio dentro del recipiente limpio y agregue 1 litro de agua estéril destilada / desionizada.
3. Revuelva constantemente y caliente la solución hasta que el polvo se disuelva. El rango de pH aceptable es 7.2 ± 0.2.
4. Enfríe el medio preparado a la temperatura adecuada (45 ± 1°C) y use inmediatamente.

Preparación del Medio – Medio Listo para Usar

1. Coloque en una bolsa estéril agua tipo 2 (grado laboratorio ASTM D1193) pre-calentada (45 ± 1°C) con el volumen adecuado acorde al tamaño del pouch del medio.
2. Golpee con el dedo en la parte de arriba de la línea de corte del pouch para eliminar el medio en esa zona. Abra el pouch en la línea de pre-corte y vacíe el contenido en la bolsa con agua.
3. Agite manualmente o con medios mecánicos (Stomacher) hasta que el polvo se disuelva.
4. Use dentro de tres a cuatro horas manteniendo la temperatura a (45 ± 1°C).

PREPARACION DE MUESTRAS DE ALIMENTOS

1. Muestree asépticamente el producto y colóquelo en una bolsa estéril.
2. Cuando esté listo para la prueba, pre-caliente el medio a (45 ± 1°C).
3. Agregue el medio EREB pre-calentado a las muestras. Consulte la tabla de enriquecimiento de muestras para conocer los volúmenes aceptables de medio.
4. Mezcle manualmente, masajee cada muestra dentro de la bolsa sellada por aproximadamente 1 minuto cada muestra.
5. Incube la muestra. Consulte la table de enriquecimiento de muestras para conocer las condiciones de enriquecimiento.



p 972 213 6032 | appliedfooddiagnostics.com

387 Hazle Street, Nuremberg, PA 18241

PREPARACION HOJAS DE MUESTREO

1. Cuando esté listo para la prueba, pre-caliente el medio EREB a $45 \pm 1^\circ\text{C}$.
2. Agregue el medio EREB pre-calentado a las muestras. Consulte la tabla de enriquecimiento de muestras para conocer los volúmenes aceptables de medio.
3. Mezcle manualmente, masajee cada muestra dentro de la bolsa sella da por aproximadamente 1 minuto cada muestra.
4. Incube la muestra. Consulte la table de enriquecimiento de muestras para conocer las condiciones de enriquecimiento.

EREB ENRIQUECIMIENTO DE MUESTRAS SIMPLS AFD SIMUL-qPCR TOP 7 STEC PROTOCOL		
Incubación: $42 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10-18 horas		
MATRIZ	TAMAÑO DE MUESTRA/UNIDAD	VOLUMEN DE MEDIO
Carne Molida	/375 g	1 L \pm 50 mL
Muestra de Escisión de Carne Cruda N60	/375 g	1 L \pm 50 mL
Hoja de Muestreo de poliolefina	/sheet	200 mL \pm 15 mL

PREPARACION DEL ENSAYO

1. Al final de la fase de enriquecimiento, proceda con el protocolo de lisis para muestras simples.
2. La configuración del qPCR y el ingreso de datos deben completarse antes de transferir las muestras.
3. Preparación del equipo:
 - Encienda los bloques de calentamiento a $95 \pm 3^\circ\text{C}$ verificado con un termómetro calibrado.
 - Encienda el instrumento qPCR y cree el archivo de ejecución desde la plantilla SIMUL-qPCR. La plantilla SIMUL-qPCR contiene el ciclo requerido.
4. Después de tomar la alícuota requerida para la lisis regrese el (los) enriquecimiento (s) a la incubadora.

CONFIGURACION DEL INSTRUMENTO qPCR

1. La plantilla AFD contiene todos los ajustes del instrumento qPCR necesarios para realizar el análisis. No cambie ninguna configuración en las pestañas "Experiment", "Run Profile", o "Data".
2. En la pestaña "Samples", complete los campos de muestras de acuerdo con la ubicación del tubo al que corresponda.
3. Incluya el número del lote del kit en el campo "Notes".
4. Incluya el número de lote en el campo de "Notes".
5. Agregue los objetivos a cada muestra.
6. Después de colocar los lisados haga clic en "Start Run".

PROTOCOLO DE LISIS DE MUESTRAS ENRIQUECIDAS

Posterior a la incubación, siga los siguientes pasos para el lisado de las muestras:

1. Etiquete un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL o un tubo de plástico grado PCR por muestra.
2. Pipetee asépticamente 400 μL de buffer de lisis en cada tubo. Regrese el buffer de lisis a refrigeración ($2-8^\circ\text{C}$).
3. Pipetee 5 μL de la muestra enriquecida en cada tubo preparado. Tape los tubos y agite en vortex.
4. Caliente los tubos cerrados durante 10 minutos a $95 \pm 3^\circ\text{C}$ en el bloque de calentamiento.
5. Retire los tubos cerrados del bloque de calentamiento.
6. Deje que los tubos se enfrien durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Proceda directamente con el ensayo de listeria SIMUL-qPCR o mantenga el lisado en el refrigerador ($2-8^\circ\text{C}$) hasta 48 horas antes de proceder al ensayo SIMUL-qPCR.

Nota: Es crítico cumplir con los lineamientos de pipeteo para qPCR (i.e. Pipetear con acción suave y deliberada; sujete la pipeta verticalmente en todo momento. Sumerja la punta de la pipeta solo ligeramente para evitar cubrir el exterior de la punta con un exceso de líquido que puede transferirse inadvertidamente durante la dispensación. Pipetee el volumen inicial directamente en el fondo del recipiente receptor mientras levanta la pipeta lentamente hacia arriba para no introducir burbujas en la solución dispensada. Agregue volúmenes adicionales al volumen inicial utilizando la misma técnica.)

CONFIGURACION DEL ENSAYO SIMUL-qPCR

1. Seleccione el ensayo (s) seleccionado para cada tubo de PCR. Los ensayos se pueden correr individual o simultáneamente.
2. Organice las tiras de tubos de PCR de acuerdo con su archivo de ejecución.
3. Con precaución, retire las tapas de la tira de tubos.
4. Pipetee 20 μL de lisado en los tubos de las tiras para PCR, asegurese que el pellet esté hidratado. Los pellets para PCR deben hidratarse y re-sellarse dentro de 10 minutos después de la apertura de las tapas de los tubos para PCR.
5. Coloque las tapas en cada tubo y presione hacia abajo para sellar cada tapa.
6. Asegurese de que cada tapa esté bien asegurada antes de ejecutar la prueba.
7. Si hay burbujas de aire, mueva cuidadosamente los tubos de reacción hasta que no queden burbujas de aire.
8. Girar brevemente los tubos de reacción en una minicentrífuga.
9. Coloque los tubos en el instrument qPCR e inicie el ensayo.

RESULTADOS DEL ENSAYO SIMUL-qPCR

Una vez que se complete el ensayo SIMUL-qPCR, el software analiza los datos automáticamente. El software analiza cualquier dato de amplificación de ADN y mostrará un valor Cq para cualquier muestra que se amplifique. Un valor Cq que tenga una curva sigmoidal típica o el inicio de la curva se considera positivo para el objetivo. Cuando no se obtiene un valor Cq, el resultado es negativo para el objetivo siempre que haya un valor Cq presente en el canal CAL Fluor® Red 610 para el IAC (Control Interno de Aplicación).

Todas las muestras positivas deben ser confirmadas por los métodos FDA BAM <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071418.htm> o USDA FSIS MLG <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/MLG-8.pdf?MOD=AJPERES>.

Nota: Algunos resultados positivos pueden ser difíciles de confirmar culturalmente debido a los bajos niveles de células objetivo de *E. coli*, altos niveles de flora de fondo o una combinación de estos factores. Póngase en contacto con el soporte técnico para obtener información adicional.

ALMACENAMIENTO Y VENCIMIENTO DEL PRODUCTO

Almacene el kit sellado a $2 - 8^\circ\text{C}$. Una vez abierto, proteja los componentes del kit de la humedad y la luz manteniendo los recipientes bien cerrados después de cada uso. Vuelva a sellar los tubos qPCR en una bolsa de aluminio con cierre hermético. La fecha de caducidad se indica en el paquete.

DESCARTE

Deseche todos los materiales utilizados y el medio de enriquecimiento en autoclave o de acuerdo con las prácticas aprobadas. Asegúrese de que todos los desechos de riesgo biológico se eliminen de acuerdo con las reglamentaciones locales, municipales, provinciales, estatales y / o federales.

INFORMACION TECNICA

Si tiene alguna pregunta o problemas de experiencia con este kit, comuníquese con nuestro personal de soporte por correo electrónico. (support@appliedfooddiagnostics.com). Para más información relacionada con Applied Food Diagnostics, Inc., por favor visite nuestra página web (www.appliedfooddiagnostics.com).

CONTROL DE CALIDAD

Todos los productos fabricados por Applied Food Diagnostics, Inc. se encuentran incluidos dentro del programa de aseguramiento de calidad desde el momento en que las materias primas llegan a la fábrica hasta la comercialización del producto final. Cada lote de producto final se somete a un control de calidad y solo se comercializa si cumple con los criterios de aceptación. Se archiva la documentación relativa a la producción y verificación de cada lote. Un certificado de análisis de control de calidad y las hojas de datos de seguridad están disponibles en la página web www.appliedfooddiagnostics.com.

TERMINOS Y CONDICIONES

Applied Food Diagnostics, Inc. no hace representaciones y garantías con respecto a sus productos que no sean los establecidos en este documento. Todos los productos entregados a continuación por Applied Food Diagnostics, Inc., sus afiliados, o cualquier otra persona en su nombre, serán fabricados al momento de la entrega para cumplir con las especificaciones de Applied Food Diagnostics, Inc. y todas las leyes aplicables. Todos los demás términos, condiciones y garantías, incluida cualquier garantía de comerciabilidad, calidad, idoneidad o idoneidad para un propósito particular o previsto, implícito en la ley o estatuto común (garantías implícitas) están expresamente excluidos.

RENUNCIA DE RESPONSABILIDAD

Este kit y sus características de rendimiento fueron desarrollados por Applied Food Diagnostics, Inc., para uso en laboratorio. Cualquier desviación de este protocolo no está autorizada por Applied Food Diagnostics, Inc.

LICENCIA DE ETIQUETA DE USO LIMITADO

Este producto está cubierto por al menos uno o más claims de solicitudes de patentes de EE. UU., que tienen licencia de Applied Food Diagnostics, Inc. Este producto se vende estrictamente para uso del comprador, y el comprador no está autorizado para transferir este producto, o cualquier material que use este producto, a cualquier tercero.

* Todas las marcas registradas son propiedad de sus respectivos dueños.

