

# PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kits for Food Testing: *E. coli* 0157:H7

Références catalogue 4407760, 4426714 (with Proteinase K), 4413269 (Extra Clean),  
4426715 (Extra Clean with Proteinase K)

Publication Number 4484070

Revision A



## Réf. attestation ABI 29/03 – 03/11

[Fin de validité : voir le certificat à l'adresse  
[www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org)]

METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE POUR L'AGROALIMENTAIRE  
Certifié par AFNOR Certification

Réservé aux tests d'échantillons alimentaires et environnementaux.

Information in this document is subject to change without notice.

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION AND/OR ITS AFFILIATE(S) DISCLAIM ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR NON-INFRINGEMENT. TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, IN NO EVENT SHALL LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

**Limited Use Label License: environmental testing, quality control/quality assurance testing, food and agricultural testing**

The purchase of this product conveys to the purchaser the limited, non-transferable right to use the purchased amount of the product (a) to perform internal research for the sole benefit of the purchaser; and (b) for environmental testing, quality control/quality assurance testing, food and agricultural testing, including reporting results of purchaser's activities in environmental testing, quality control/quality assurance testing, food and agricultural testing for a fee or other commercial consideration. No other right is hereby granted expressly, by implication, or by estoppel. This product is for environmental testing, quality control/ quality assurance testing, food and agricultural testing and research purposes only.

The purchase of this product does not grant the purchaser any additional rights, including (without limitation) the right to transfer or resell the product in any form or the right to use the product as a therapeutic agent or diagnostics test component. For information on obtaining additional rights, please contact [outlicensing@lifetech.com](mailto:outlicensing@lifetech.com).

Human diagnostic uses require a separate license from Roche Molecular Systems, Inc.

**TRADEMARKS:**

The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.

AOAC is a trademark and Performance Tested Methods is a service mark of AOAC International. Stomacher is a registered trademark of Seward Limited, UK. Whirl-pak is a registered trademark of Wheatherby/Nasco, Inc.

Translated from English Publication Number 4426519 Revision C.

© 2014 Life Technologies Corporation. All rights reserved.

	Informations sur le produit . . . . .	5
	Description du produit . . . . .	5
	Matériel et équipement . . . . .	5
Protocole	<b>PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kits:</b>	
	<b><i>E. coli</i> O157:H7 . . . . .</b>	<b>9</b>
	Avant de commencer . . . . .	9
	Différences générales entre les workflows PrepSEQ® Rapid Spin . . . . .	10
	Workflow du kit . . . . .	11
	Protocole . . . . .	12
	Résolution des problèmes . . . . .	18
Annexe A	<b>Informations générales . . . . .</b>	<b>19</b>
	Présentation . . . . .	19
	Certification AOAC Performance Tested Methods <sup>sm</sup> . . . . .	19
	Validation ISO 16140 . . . . .	20
Annexe B	<b>Sécurité . . . . .</b>	<b>21</b>
	Sécurité chimique . . . . .	22
	Sécurité en matière de dangers biologiques . . . . .	23
	<b>Documentation et support . . . . .</b>	<b>25</b>
	Obtention d'une FDS . . . . .	25
	Obtention de certificats d'analyse . . . . .	25
	Obtention d'assistance . . . . .	25
	Support relatif à la sécurité alimentaire . . . . .	26
	Garantie limitée . . . . .	26



---

**IMPORTANT !** Avant d'utiliser ce produit, lire les informations décrites dans l'Annexe B, « Sécurité » page 21 et s'assurer de les avoir bien comprises.

---

**AVERTISSEMENT !** *E. coli* O157:H7 est un organisme relevant du niveau de biosécurité 2 (BSL-2). Il convient d'être vigilant lors de la manipulation d'échantillons susceptibles de contenir *E. coli* O157:H7. Le personnel du laboratoire doit être correctement formé à la manipulation d'agents pathogènes avant d'être autorisé à dépister *E. coli* O157:H7 dans des échantillons. Le personnel du laboratoire doit porter les équipements de protection appropriés, notamment des lunettes de protection, un masque facial, des vêtements/blouses de laboratoire et des gants. Des précautions extrêmes doivent être prises lors de la manipulation d'objets tranchants. L'accès au laboratoire doit être restreint pendant les travaux. Les déchets doivent être éliminés conformément à la législation locale et nationale en vigueur.

---

## Description du produit

Le PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kits permet d'extraire en toute simplicité l'ADN à partir de bouillons de culture.

Pour plus d'informations générales, se reporter à l'Annexe A, page 19.

## Matériel et équipement

### Contenu du kit

Le PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kits for Food Testing contient des réactifs pour 100 préparations d'échantillons. Les conditions de conservation et les composants du kit sont décrits dans les tableaux suivants.

<b>PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit (Cat. no. 4407760)</b>		
Élément	Quantité ou volume	Conservation
Spin columns	100	Température ambiante (23 ±5 °C)
Microtubes, 1,5 ml	100	Température ambiante (23 ±5 °C)
Lysis Buffer, 1 flacon	5 ml	5 ±3 °C

**PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit with Proteinase K (Cat. no. 4426714)**

Élément	Quantité ou volume	Conservation
Spin columns	100	Température ambiante (23 ±5 °C)
Microtubes, 1,5 ml	100	Température ambiante (23 ±5 °C)
Lysis Buffer, 1 flacon	5 ml	5 ±3 °C
Proteinase K (20 mg/ml), 1 tube	1,25 ml	En-dessous de -18 °C

**PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit**

**Extra Clean (Cat. no. 4413269)**

Élément	Quantité ou volume	Conservation
Spin columns	100	Température ambiante (23 ±5 °C)
Microtubes, 1,5 ml	2 × 100	Température ambiante (23 ±5 °C)
Lysis Buffer, 1 flacon	5 ml	5 ±3 °C

**PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit**

**Extra Clean with Proteinase K (Cat. no. 4426715)**

Élément	Quantité ou volume	Conservation
Spin columns	100	Température ambiante (23 ±5 °C)
Microtubes, 1,5 ml	2 × 100	Température ambiante (23 ±5 °C)
Lysis Buffer, 1 flacon	5 ml	5 ±3 °C
Proteinase K (20 mg/ml), 1 tube	1,25 ml	En-dessous de -18 °C

**Remarque :** Des composants peuvent être expédiés séparément, selon la configuration et les conditions de conservation.

## Matériel non inclus dans le kit

Le tableau suivant indique le matériel et l'équipement nécessaires pour l'utilisation du PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kits (mais non inclus). Sauf indication contraire, bon nombre des composants indiqués sont disponibles auprès des principaux fournisseurs de matériel de laboratoire (MLS, Major Laboratory Supplier).

### Équipement, consommables et réactifs<sup>‡</sup>

Élément	Source
<b>Équipement</b>	
Microcentrifugeuse de laboratoire	Eppendorf 5415D ou équivalent
Bloc chauffant, 56 °C	MLS
Bloc chauffant, 95 °C	MLS
Portoir pour tubes de 1,5 ml	MLS
Homogénéisateur, mélangeur de laboratoire Stomacher® 400	Seward #0400/001/AJ ou équivalent
Vortex	MLS
<b>Consommables</b>	
Gants jetables	MLS
Embouts de micropipettes, résistants aux aérosols	MLS
Micropipettes : <ul style="list-style-type: none"> <li>• À piston</li> <li>• À air comprimé</li> </ul>	MLS
Sacs à filtre de type Whirl-Pak®, 25,4 cm x 38,1 cm, 2,6 kg (10 po x 15 po, 92 oz.) (sacs Stomacher® avec tamis)	Nasco #B01488WA ou équivalent
Sacs à filtre de type Whirl-Pak®, 15,2 cm x 22,8 cm, 680 g (6 po x 9 po, 24 oz.), 250/paquet (sacs Stomacher® avec tamis)	Nasco #B01348WA ou équivalent
Sacs de type Whirl-Pak®, 15,2 cm x 22,8 cm, 680 g (6 po x 9 po, 24 oz.) (sacs de type Stomacher® sans tamis)	Nasco #B01297WA ou équivalent
<b>Réactifs</b>	
Bouillon cœur-cerveille (BCC)	MLS
Eau peptonée tamponnée (ETP)	MLS
Nuclease-Free Water	Life Technologies Cat. no. AM9938

<sup>‡</sup> L'utilisation du matériel indiqué ici avec ce kit a été validée. Les résultats peuvent varier en cas d'utilisation de produits de substitution d'autres fournisseurs.



# PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kits: *E. coli* O157:H7

## Avant de commencer

Avant de procéder à l'extraction des échantillons :

- Régler la température du bloc chauffant sur 95 °C. En cas d'utilisation du traitement à la Proteinase K, régler un autre bloc chauffant sur 56 °C.

---

**Remarque :** Pour certains aliments à forte teneur en protéines, utiliser le PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit – Extra Clean with Proteinase K (Cat. no. 4426715). Se reporter au tableau page 10 pour connaître les types d'aliments nécessitant l'utilisation de la Proteinase K.

---

- Étiqueter les microtubes de 1,5 ml.
- Pour le traitement de plusieurs échantillons dans les protocoles nécessitant la Proteinase K, nous recommandons la préparation d'un mélange Proteinase K-Lysis Buffer :
  - a. Prémélanger 5 µl de Proteinase K (20 mg/ml) et 50 µl de Buffer Lysis pour chaque échantillon (utiliser un récipient de volume adapté propre pour le mélange).
  - b. Multiplier les volumes par le nombre d'échantillons plus 10 % pour le surplus.
  - c. Bien mélanger pour disperser la Proteinase K dans le Buffer Lysis.
  - d. Utiliser immédiatement ou conserver sur de la glace jusqu'au moment de l'utilisation.

## Différences générales entre les workflows PrepSEQ® Rapid Spin

Ce document présente les protocoles de trois workflows différents, dont les différences générales sont décrites dans le tableau suivant. Pour déterminer le protocole d'enrichissement à suivre pour l'échantillon en cours de traitement, déterminer la quantité de l'échantillon à prélever et choisir un workflow en fonction du milieu et du temps d'enrichissement préférés. Les workflows du kit sont décrits page 11.

Protocole	Quantité d'échantillon	Milieu	Temps d'enrichissement‡	Volume d'enrichissement requis pour la préparation de l'échantillon	Type d'échantillon/ Proteinase K requise
Workflow d'enrichissement A	25 g ou 25 ml d'aliment	Bouillon cœur-cerveille (BCC) préchauffé	6 à 8 h (8 à 10 h pour les jus)	750 µl	Produits d'origine animale <sup>§</sup> : avec Proteinase K Produits d'origine non animale : sans Proteinase K
Workflow d'enrichissement B	25 g ou 25 ml d'aliment	Eau peptonée tamponnée EPT	16 à 20 h	750 µl	Produits d'origine animale : avec Proteinase K (facultatif) <sup>#</sup> Produits d'origine non animale : sans Proteinase K
Workflow d'enrichissement C	375 g d'aliment	EPT	16 à 20 h	750 µl	Tous les aliments : avec Proteinase K

**IMPORTANT !** Le workflow d'enrichissement C (prise d'essai = 375 g d'aliment) a été inclus dans le cadre des études de validation AOAC mais pas dans les études NF VALIDATION.

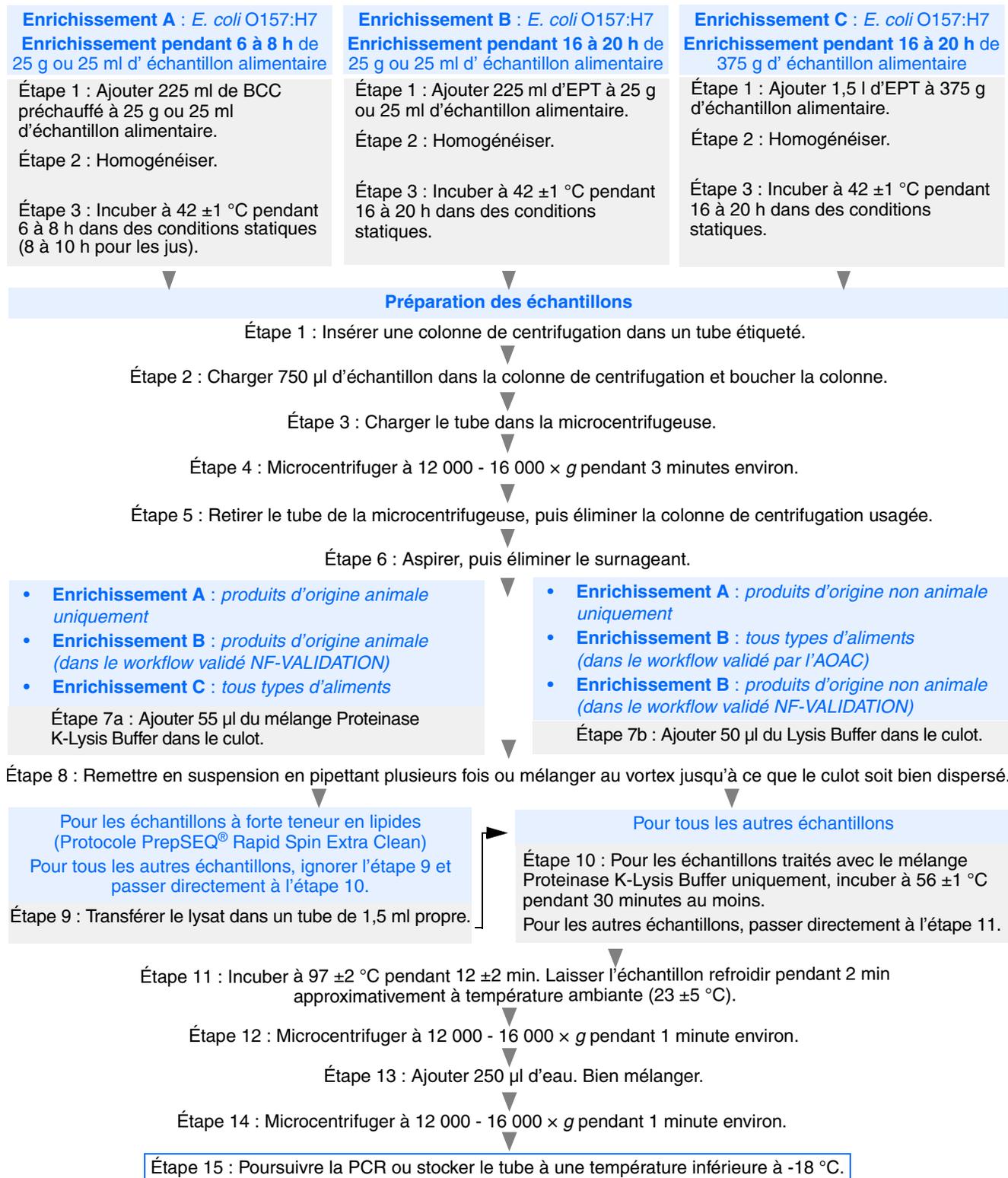
‡ Tous les enrichissements sont incubés à 42 ±1 °C.

§ Les produits d'origine animale comprennent du bœuf haché, des découpes de bœuf, du poisson et du lait.

# Pour le workflow d'enrichissement B, la Proteinase K a été employée dans le cadre des études NF VALIDATION ; elle n'a pas été utilisée dans le cadre des études de validation AOAC.

## Workflow du kit

Le workflow de préparation d'échantillons décrit ci-dessous s'applique aux procédures commençant à partir de la page 12.



## Protocole

### Enrichissement de l'échantillon alimentaire

1. Ajouter à l'échantillon alimentaire le milieu d'enrichissement approprié selon le workflow *E. coli* O157:H7 choisi parmi les options suivantes :
  - **Workflow d'enrichissement A** – Pour l'enrichissement pendant 6 à 8 heures de 25 g ou 25 ml d'aliment (enrichissement pendant 8 à 10 heures pour les jus), ajouter 225 ml de bouillon cœur-cerveille (BCC) préchauffé ( $42 \pm 1$  °C).
  - **Workflow d'enrichissement B** – Pour l'enrichissement pendant 16 à 20 heures de 25 g ou 25 ml d'aliment, ajouter 225 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT).
  - **Workflow d'enrichissement C** – Pour l'enrichissement pendant 16 à 20 heures de 375 g d'aliment, ajouter 1,5 l d'EPT.

---

**Remarque :** Pour 375 g d'échantillons alimentaires, utiliser uniquement le workflow d'enrichissement C.

---

2. Homogénéiser l'échantillon alimentaire :
  - Pour 375 g d'échantillons alimentaires (workflow de l'Enrichissement C), utiliser un sac à filtre de type Stomacher® de 25,5 cm x 38 cm (10 po × 15 po) (Nasco #B01488WA ou équivalent) et le malaxer 5 à 10 fois pour réduire les morceaux d'aliment.
  - Pour les aliments solides (tels que les ailes de poulet), utiliser un sac à filtre de type Stomacher® et mélanger à la main en malaxant le sac 5 à 10 fois.
  - Pour les types d'aliments grossiers (tels que la viande, la volaille et les fruits de mer), utiliser un sac à filtre Stomacher® de 15,2 cm x 22,8 cm (6 po × 9 po) (Nasco #B01348WA ou équivalent) et mélanger à la vitesse réglée sur **Norm** pendant 1 minute (mélangeur de laboratoire Stomacher® 400 ou équivalent).
  - Pour les types d'aliments mous (comme la mayonnaise), utiliser un sac Stomacher® standard de 15,2 cm x 22,8 cm (6 po × 9 po) (Nasco #B01297WA ou équivalent) et mélanger à la vitesse réglée sur **Norm** pendant 1 minute (mélangeur de laboratoire Stomacher® 400 ou équivalent).
  - Pour les liquides ou les aliments en poudre, utiliser un sac de type Stomacher® standard de 15,2 cm x 22,8 cm (6 po × 9 po) (Nasco #B01297WA ou équivalent) et mélanger à la main.
3. Incuber l'échantillon alimentaire à  $42 \pm 1$  °C dans des conditions statiques pendant les durées suivantes :
  - **Workflow d'enrichissement A** – 6 à 8 heures (8 à 10 heures pour les jus) pour permettre l'obtention de résultats le même jour. Pour faciliter votre emploi du temps, l'échantillon peut être enrichi en BCC pendant 16 heures au maximum.

- **Workflow d'enrichissement B** – 16 à 20 heures.
- **Workflow d'enrichissement C** – 16 à 20 heures.

---

**Remarque :** Le temps d'incubation minimum pour l'enrichissement est de 6 heures pour le workflow d'enrichissement A et de 16 heures pour les workflows d'enrichissement B et C.

---

## Préparation des échantillons

1. Insérer une colonne de centrifugation dans un tube étiqueté.
2. Charger 750 µl d'échantillon enrichi dans la colonne de centrifugation et boucher la colonne.
3. Charger le tube avec la colonne de centrifugation dans la microcentrifugeuse. Orienter la charnière du bouchon du tube vers l'intérieur du rotor (voir la figure suivante intitulée « Positionnement correct du bouchon du tube »). Sinon, la charnière du bouchon gênera la mise en place du couvercle du rotor.

---

**Remarque :** Pour éviter d'endommager le bouchon du tube pendant la centrifugation, placer le bouchon dans le sens contraire de la rotation.

---



Positionnement incorrect  
du bouchon du tube



Positionnement correct  
du bouchon du tube

4. Microcentrifuger le tube à 12 000 - 16 000 × g pendant 3 minutes environ.
5. Retirer le tube de la microcentrifugeuse, puis éliminer la colonne de centrifugation usagée.
6. Aspirer, puis éliminer le surnageant.

---

**IMPORTANT !** Retirer le surnageant de manière aussi complète que possible, y compris tous les excédents de liquide éventuels sur les côtés du tube. Éliminer les gouttelettes en cerclant l'intérieur du tube avec une micropipette et en l'enfonçant dans le surnageant en vue de son élimination par aspiration.

---

---

**IMPORTANT !** Pour les échantillons contenant une couche grasse après la centrifugation, indiquée comme une couche supérieure distincte, éliminer cette couche grasse en procédant comme suit :

*Pour les couches grasses liquides* (par exemple, dans les échantillons de lait) :

1. Utiliser une micropipette P1000 pour éliminer le gras de la surface supérieure en aspirant avec un mouvement circulaire sans perturber le culot.
2. Poursuivre le prélèvement du surnageant de la surface supérieure jusqu'à son élimination totale.
3. Mettre au rebut le surnageant dans un récipient à déchets.

**ou**

*Pour les couches grasses solides* (par exemple, dans les échantillons de préparations pour nourrissons) :

1. Utiliser une micropipette pour déloger délicatement la couche grasse sans perturber le culot.
  2. Verser le surnageant et la couche grasse en un seul mouvement rapide.
  3. Aspirer le surnageant de la surface supérieure à l'aide d'une micropipette jusqu'à ce qu'il soit éliminé en intégralité.
  4. Éliminer le surnageant dans un récipient à déchets.
- 

7. Selon l'enrichissement et le type d'aliment, ajouter le mélange Proteinase K-Lysis Buffer ou le Lysis Buffer (uniquement) en procédant de l'une des deux manières suivantes :
  - Ajouter 55 µl du mélange Proteinase K-Lysis Buffer (voir page 9) au culot pour les enrichissements et les aliments suivants :
    - **Workflow d'enrichissement A** – Pour l'enrichissement pendant 6 à 8 heures de 25 g ou 25 ml d'aliment (produits d'origine animale, tels que bœuf haché, découpes de bœuf, poisson et lait).
    - **Workflow d'enrichissement B** – Pour l'enrichissement pendant 16 à 20 heures de 25 g d'aliment d'origine animale.

---

**Remarque :** Dans le cadre de la validation NF, de la Proteinase K a été utilisée pour le bœuf (ou les échantillons d'origine animale) mais pas dans le cadre de l'étude de validation AOAC.

---

- **Workflow d'enrichissement C** – Pour l'enrichissement pendant 16 à 20 heures de 375 g d'aliment (tous types d'aliments).

---

**IMPORTANT !** Conserver le mélange Proteinase K-Lysis Buffer sur glace jusqu'au moment de son utilisation.

---

*ou*

- Ajouter 50 µl du Buffer Lysis au culot pour les enrichissements et les aliments suivants :
    - **Workflow d'enrichissement A** – Pour l'enrichissement pendant 6 à 8 heures de 25 g ou 25 ml d'aliment (enrichissement pendant 8 à 10 heures pour les jus) ; produits d'origine non animale uniquement.
    - **Workflow d'enrichissement B** – Pour l'enrichissement pendant 16 à 20 heures de 25 g ou 25 ml d'aliment (tous types d'aliments).
8. Remettre en suspension en pipettant plusieurs fois ou mélanger au vortex jusqu'à ce que le culot soit bien dispersé.
9. **Protocole Rapid Spin Extra Clean *uniquement*** – Si l'échantillon alimentaire à une forte teneur en lipides, transférer le mélange dans un tube de 1,5 ml propre (éviter le transfert simultané de graisse). Le culot doit être bien dispersé dans le Lysis Buffer avant le transfert.

---

**IMPORTANT !** Pendant le transfert, un résidu gras sera laissé sur les côtés du tube d'origine. Éviter tout contact avec cette graisse et transférer uniquement le Buffer Lysis contenant le culot remis en suspension dans un tube propre.

---

**IMPORTANT !** Nous recommandons l'exécution du protocole Rapid Spin Extra Clean pour les échantillons alimentaires à forte teneur en lipides [tels que les échantillons de préparations pour nourrissons, de lait entier, de saumon fumé (lox) et d'ailes de poulet]. Ce protocole est également recommandé avec certains échantillons alimentaires de 375 g, selon leur teneur en matières grasses.

---

**Remarque :** L'inhibition de la PCR avec le test de détection sera indiquée par des appels d'avertissement avec le logiciel RapidFinder™ Express Software ou la non détection du contrôle positif interne avec les logiciels SDS Software ou StepOne® Software. Si la matrice a une forte teneur en lipides et si l'inhibition de la PCR est fréquemment observée, nous recommandons l'application du protocole Rapid Spin Extra Clean à la matrice.

---

*ou*

Pour tous les autres échantillons, passer à l'étape 10.

10. Pour les échantillons utilisant le mélange Proteinase K-Lysis Buffer *uniquement* :  
Boucher le tube, puis incuber à  $56 \pm 1$  °C pendant au moins 30 minutes pour activer la Proteinase K. Passer à l'étape 11.

**ou**

Pour les échantillons utilisant le Lysis Buffer, passer à l'étape 11.

11. Pour tous les échantillons, incuber à  $97 \pm 2$  °C pendant  $12 \pm 2$  minutes pour lyser les échantillons, puis laisser ces derniers refroidir pendant 2 minutes approximativement à température ambiante ( $23 \pm 5$  °C).
12. Microcentrifuger le tube à  $12\,000 - 16\,000 \times g$  pendant 1 minute environ afin de réduire la condensation.
13. Ajouter 250 µl d'eau. Bien mélanger.

---

**IMPORTANT !** Utiliser de l'eau de qualité PCR-clean (Cat. no. AM9938). L'eau traitée en autoclave ne doit pas être considérée comme de l'eau de qualité PCR-clean.

---

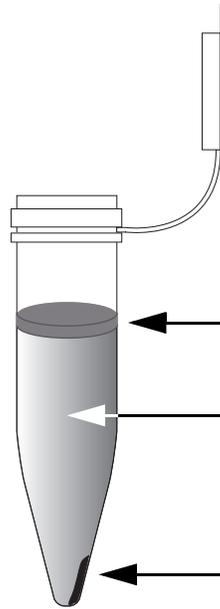
14. Microcentrifuger le tube à  $12\,000 - 16\,000 \times g$  pendant 1 minute approximativement afin de réduire toutes les matières particulaires dérivées de la colonne de centrifugation, qui peuvent interférer avec l'amplification. L'ADN microbien est en phase aqueuse.
15. Poursuivre la PCR ou stocker le tube à une température inférieure à  $-18$  °C.

---

**IMPORTANT !** Lors de l'analyse des échantillons d'ADN, suivre les conseils suivants :

- Pour la PCR, ajouter 30 µl de surnageant au dosage lyophilisé. Pour obtenir des instructions détaillées, se reporter au *MicroSEQ® E. coli O157:H7 Detection Kit User Guide* (Pub. no. 4484069).
  - Les échantillons alimentaires à forte teneur en matières grasses ou en huile peuvent former une couche supérieure contenant de la graisse et des débris sur l'échantillon d'ADN. Lors du prélèvement de l'échantillon en vue de la PCR, éviter la couche supérieure et le fond du culot en prélevant l'échantillon dans la partie centrale transparente (voir la figure suivante).
  - En cas d'inhibition de la PCR, indiquée par l'absence d'amplification de la cible et de l'IPC, diluer l'échantillon avec de l'eau. Nous recommandons l'ajout de 5 µl d'échantillon et de 25 µl d'eau au dosage lyophilisé pour surmonter l'inhibition. Voir « Résolution des problèmes », page 18 pour plus d'informations.
-

**Pour pipeter l'éluat d'aliments à forte teneur en matières grasses ou en huile :**



Dans les échantillons alimentaires à forte teneur en matières grasses ou en huile, une couche supérieure contenant de la graisse et des débris peut se former sur l'échantillon d'ADN. Éviter la couche supérieure et le fond du culot en prélevant l'échantillon destiné à la PCR dans la partie centrale transparente.

Éviter la couche supérieure contenant des matières grasses/de l'huile.

Prélever l'échantillon destiné à la PCR en dessous de la couche de matière grasses/d'huile.

Éviter les matières particulières dans la colonne.

## Résolution des problèmes

### Pour les tests d'aliments

Observation	Cause possible	Action recommandée
L'inhibition de la PCR est indiquée par l'absence de détection de réaction IPC.	Le surnageant n'a pas été complètement éliminé de l'échantillon avant l'ajout du Proteinase K-Lysis Buffer.	Ajouter 5 µl d'échantillon et 25 µl d'eau au dosage lyophilisé pour surmonter l'inhibition.
	Le filtrat de la colonne de centrifugation est dans la PCR.	Centrifuger l'échantillon pour séparer les particules du filtrat avant d'ajouter l'échantillon à la réaction PCR. Pipeter l'échantillon au niveau de la section centrale transparente, en évitant les matières particulières au fond du tube.
	L'échantillon contenait un excédent de graisse qui n'a pas été éliminé pendant l'aspiration du surnageant.	Appliquer le protocole PrepSEQ® Rapid Spin Extra Clean lors du traitement d'une matrice à forte teneur en matières grasses.
	La matrice est associée aux composants d'inhibition de la PCR.	Prélaver le culot bactérien avant la clarification de la colonne : <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Transférer 750 µl d'échantillon dans un tube de microcentrifugation propre.</li> <li>2. Centrifuger à 12 000 - 16 000 × <i>g</i> pendant environ 3 minutes.</li> <li>3. Éliminer le surnageant.</li> <li>4. Remettre en suspension le culot dans 650 µl d'eau distillée stérile.</li> <li>5. Charger la colonne et procéder à la centrifugation. Poursuivre la préparation des échantillons étape 3, page 13.</li> </ol>
Le culot bactérien est séparé du tube, ce qui complique son évitement pendant l'aspiration.	L'échantillon a été laissé sans surveillance avant l'aspiration du surnageant, ce qui a entraîné la dissipation du culot bactérien.	Répéter la centrifugation et éliminer le surnageant immédiatement après.

# Informations générales

## Présentation

Utiliser le PrepSEQ<sup>®</sup> Rapid Spin Sample Preparation Kit pour préparer les échantillons alimentaires afin de dépister *E. coli* O157:H7. Ce kit est destiné à la préparation de l'ADN à partir de la plupart des types d'aliments. La procédure du kit implique les tâches suivantes :

- l'enrichissement des échantillons alimentaires dans lesquels dépister *E. coli* O157:H7 ;
- la préparation des échantillons.

Pour la préparation d'échantillons à partir d'échantillons alimentaires enrichis, nous recommandons un volume d'échantillon de 750 µl.

Pour certains aliments à forte teneur en lipides [tels que les échantillons de préparations pour nourrissons, de lait entier, de saumon fumé et d'ailes de poulet], utiliser le PrepSEQ<sup>®</sup> Rapid Spin Sample Preparation Kit – Extra Clean (Cat. no. 4413269). Le protocole PrepSEQ<sup>®</sup> Rapid Spin Extra Clean est également recommandé avec certains échantillons alimentaires de 375 g selon la teneur en matières grasses de l'échantillon.

## Certification AOAC Performance Tested Methods<sup>sm</sup>

Le MicroSEQ<sup>®</sup> *E. coli* O157:H7 Detection Kit a obtenu la certification Performance Tested Methods<sup>sm</sup> de l'institut de recherche AOAC. La validation a été réalisée en utilisant l'USDA MLG 5.04 comme méthode de référence pour les produits à base de viande, et l'ISO 16654 comme méthode de référence pour les légumes à feuilles vertes et les jus. Le workflow validé inclut :

- Deux options du kit de préparation d'échantillons :
  - PrepSEQ<sup>®</sup> Nucleic Acid Extraction Kit
  - PrepSEQ<sup>®</sup> Rapid Spin Sample Preparation Kit
- MicroSEQ<sup>®</sup> *E. coli* O157:H7 Detection Kit
- Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Fast Real-Time PCR Instrument
- RapidFinder<sup>™</sup> Express Software

La méthode a été certifiée pour être utilisée avec les matrices suivantes :

- 25 g de bœuf haché et de découpes de bœuf
- 375 g de bœuf haché et de découpes de bœuf
- 25 g d'épinards
- 25 g de jus de pomme
- 25 g de jus d'orange

## Validation ISO 16140



**Réf. attestation ABI 29/03 – 03/11**

[Fin de validité : voir le certificat à l'adresse [www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org)]

METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE  
POUR L'AGROALIMENTAIRE

Certifié par AFNOR Certification

Le MicroSEQ® *E. coli* O157:H7 Detection Kit est certifié « NF Validation ». La norme ISO 16140 a été employée pour la validation des méthodes alternatives. Ce kit a été comparé à la méthode de référence ISO 16654 et jugé équivalent. Le workflow validé inclut :

- Deux options du kit de préparation d'échantillons :
  - PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit
  - PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit
- MicroSEQ® *E. coli* O157:H7 Detection Kit
- Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR Instrument
- RapidFinder™ Express Software

La méthode, qui utilise les workflows A et B, a été certifiée pour être utilisée avec les matrices suivantes : viande de bœuf crue et végétaux crus.

Recommandations générales :

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (voir la norme EN ISO 7218).
- Dans le cadre de la certification NF Validation, des prises d'essais supérieures à 25 grammes n'ont pas été testées.
- Il est recommandé de se reporter aux normes ISO 16654 et ISO 6887 pour la préparation de la suspension mère.

Pour plus d'informations sur la date d'expiration de la certification « NF Validation », se reporter au certificat, disponible à l'adresse : **[www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org)**

---

**AVERTISSEMENT ! SÉCURITÉ GÉNÉRALE.** Toute utilisation de ce produit non conforme avec les indications fournies dans le guide de l'utilisateur peut provoquer des blessures corporelles ou endommager l'instrument ou le dispositif. S'assurer que toute personne utilisant ce produit a pris connaissance des consignes de sécurité générale en vigueur dans les laboratoires ainsi que des informations de sécurité décrites dans le présent document.

- Avant d'utiliser un instrument ou un dispositif, lire les informations de sécurité décrites dans le guide de l'utilisateur fourni par le fabricant de l'instrument ou du dispositif en question, et veiller à bien les comprendre.
  - Avant de manipuler des produits chimiques, lire toutes les fiches de données de sécurité (FDS) qui s'appliquent, et s'assurer de bien le comprendre, et porter les équipements de protection appropriés (gants, blouses, lunettes de protection, etc.). Pour se procurer les fiches de données de sécurité, se reporter à la section « Documentation et support » du présent document.
- 



## Sécurité chimique

---

### **AVERTISSEMENT ! PRÉCAUTIONS GÉNÉRALES EN CAS DE MANIPULATION DE PRODUITS CHIMIQUES.**

Pour réduire les risques, s'assurer que le personnel du laboratoire a bien lu et applique les consignes de sécurité générale relatives à l'utilisation, au stockage et à l'élimination des produits chimiques décrites ci-dessous, et consulter les fiches de données de sécurité pertinentes pour prendre connaissance de toutes précautions et instructions spécifiques :

- Lire et comprendre les fiches de données de sécurité (FDS) fournies par le fabricant de produits chimiques avant de stocker, manipuler ou utiliser des substances dangereuses ou des produits chimiques. Pour se procurer les fiches de données de sécurité, se reporter à la section « Documentation et support » du présent document.
  - Limiter les contacts avec les produits chimiques. Porter des équipements de protection appropriés lors de la manipulation des produits chimiques (par exemple : lunettes de sûreté, gants ou vêtements de protection).
  - Limiter l'inhalation des produits chimiques. Ne pas laisser les récipients de produits chimiques ouverts. Ils ne doivent être utilisés qu'avec une ventilation adéquate (par exemple, sorbonne).
  - Vérifier régulièrement l'absence de fuite ou d'écoulement des produits chimiques. En cas de fuite ou d'écoulement d'un produit, respecter les directives de nettoyage du fabricant recommandées sur la fiche de données de sécurité.
  - Manipuler les déchets chimiques dans une sorbonne.
  - Veiller à utiliser des récipients à déchets primaire et secondaire. (Le récipient primaire contient les déchets immédiats, le récipient secondaire contient les fuites et les écoulements du récipient primaire. Les deux récipients doivent être compatibles avec les matériaux mis au rebut et conformes aux exigences locales, nationales et communautaires en matière de confinement des récipients.)
  - Une fois le récipient à déchets vidé, il doit être refermé hermétiquement avec le couvercle fourni.
  - Caractériser (par une analyse si nécessaire) les déchets générés par les applications, les réactifs et les substrats particuliers utilisés dans le laboratoire.
  - Vérifier que les déchets sont convenablement stockés, transférés, transportés et éliminés en respectant toutes les réglementations locales, nationales et/ou communautaires en vigueur.
  - **IMPORTANT !** Les matériaux représentant un danger biologique ou radioactif exigent parfois une manipulation spéciale, et des limitations peuvent s'appliquer à leur élimination.
-

## Sécurité en matière de dangers biologiques

---

**AVERTISSEMENT ! RISQUE BIOLOGIQUE.** Les échantillons biologiques tels que les tissus, les fluides corporels, les agents infectieux et le sang humain ou animal présentent un risque de transmission de maladies infectieuses. Suivre toutes les réglementations locales, nationales et/ou communautaires en vigueur. Porter des équipements de protection appropriés, notamment des lunettes de protection, un masque facial, des vêtements/blouses de laboratoire et des gants. Toutes les tâches doivent être réalisées dans des installations équipées de manière adéquate en utilisant les équipements de sécurité appropriés (par exemple, des dispositifs de confinement physique). Avant toute manipulation de matières potentiellement infectieuses, il convient de former les opérateurs conformément aux réglementations en vigueur et aux besoins de l'entreprise/institution. Lire et respecter les consignes applicables et/ou les exigences réglementaires issues des ressources suivantes :

Aux États-Unis :

- Instructions de l'U.S. Department of Health and Human Services (ministère de la Santé et des Services sociaux des États-Unis), publiées dans le document *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (Biosécurité dans les laboratoires microbiologiques et biomédicaux), disponible à l'adresse : **[www.cdc.gov/biosafety](http://www.cdc.gov/biosafety)**
- Occupational Safety and Health Standards, Bloodborne Pathogens (Normes sur la santé et la sécurité au travail, Pathogènes transmissibles par le sang) (29 CFR§1910.1030), disponible à l'adresse : **[www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_01/29cfr1910a\\_01.html](http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_01/29cfr1910a_01.html)**
- Protocoles du programme de biosécurité de l'entreprise/institution pour la manipulation et l'utilisation des matières potentiellement infectieuses.
- Des informations complémentaires relatives aux consignes de sécurité sur les risques biologiques sont disponibles à l'adresse : **[www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)**

Dans l'Union européenne :

Consulter les réglementations et la législation locales relatives à la prévention des risques biologiques et à la sécurité biologique, ainsi que les meilleures pratiques publiées dans le manuel de sécurité biologique en laboratoire (troisième édition) de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), disponible à l'adresse : **[www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/)**

---





## Obtention d'une FDS

Les fiches de données de sécurité (FDS) sont disponibles à l'adresse **[www.lifetechnologies.com/support](http://www.lifetechnologies.com/support)**.

---

**Remarque :** Pour obtenir les FDS des produits chimiques non distribués par Life Technologies, contacter le fabricant concerné.

---

## Obtention de certificats d'analyse

Le certificat d'analyse indique les informations détaillées relatives aux contrôles qualité et aux données de qualification de chaque produit. Les certificats d'analyse sont disponibles sur notre site Web. Aller à l'adresse **[www.lifetechnologies.com/support](http://www.lifetechnologies.com/support)** et rechercher le certificat d'analyse en fonction du numéro de lot de produit, qui est imprimé sur l'emballage.

## Obtention d'assistance

Pour obtenir les informations les plus récentes sur les services et le support technique dans tous les pays, aller à l'adresse :

**[www.lifetechnologies.com/support](http://www.lifetechnologies.com/support)**

Notre site Web permet d'effectuer les actions suivantes :

- Obtenir les numéros de téléphone et de télécopie du support technique et des sites commerciaux partout dans le monde
- Rechercher un sujet dans le forum aux questions (FAQ)
- Poser une question directement au support technique
- Rechercher des documents utilisateur, des FDS, des séquences et des cartes vectorielles, des notes d'application, des formules, des manuels, des certificats d'analyse, des citations et d'autres documents de support sur les produits
- Obtenir des informations sur les formations proposées à nos clients
- Télécharger des mises à jour et correctifs de logiciels

## Support relatif à la sécurité alimentaire

**Site Web** : [www.lifetechnologies.com/foodsafety](http://www.lifetechnologies.com/foodsafety)

**E-mail du support** : [foodsafety@lifetech.com](mailto:foodsafety@lifetech.com)

**Téléphone** (En Amérique du Nord) : 1-800-500-6885

**Téléphone** (Dans le reste du monde) :

Accéder à [www.lifetechnologies.com/contactus.html](http://www.lifetechnologies.com/contactus.html) et sélectionner le pays approprié dans le menu déroulant.

## Garantie limitée

Life Technologies et/ou ses filiales garantissent leurs produits comme décrit dans les Termes et conditions de vente généraux de Life Technologies, disponibles sur le site Web Life Technologies l'adresse [www.lifetechnologies.com/termsandconditions](http://www.lifetechnologies.com/termsandconditions). Pour toute question, contacter Life Technologies à l'adresse [www.lifetechnologies.com/support](http://www.lifetechnologies.com/support).



**Headquarters**

5791 Van Allen Way | Carlsbad, CA 92008 USA | Phone +1 760 603 7200 | Toll Free in USA 800 955 6288

**For support visit** [lifetechnologies.com/support](http://lifetechnologies.com/support) or email [techsupport@lifetech.com](mailto:techsupport@lifetech.com)

[lifetechnologies.com](http://lifetechnologies.com)

25 February 2014

