

Check&Trace Salmonella 2.0

Zur Verwendung mit dem Bio-Rad CFX 96 und CFX Opus 96 Real-time-PCR-Thermocycler



1 VERWENDUNGSZWECK

Bei dem Check&Trace Salmonella 2.0 Assay handelt es sich um einen qualitativen, semiautomatischen Real-time-PCR-Test zur Bestätigung und Typisierung präsumtiver *Salmonella*-Isolate aus angereicherten Kulturmedien. Mithilfe des Verfahrens kann ein vermutetes (präsumtives) *Salmonella*-Ergebnis (gemäß ISO-6579-1) als *Salmonella spp.*-positiv bestätigt oder als *Salmonella*-negativ eingestuft werden. Das Typisierungsverfahren generiert ein Serovar-Ergebnis oder einen „Genovar“-Code, der jedes getestete Bakterienisolat eindeutig definiert.

Die Tests werden nach einem einfachen Probenvorbereitungsschritt mit Bakterien aus der Kultur durchgeführt. Die Probe wird dann als Material für einen 6-Tube-Multiplex-Real-time-PCR-Assay verwendet, der auf einem Bio-Rad CFX 96- oder CFX Opus 96-System durchgeführt wird. Das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von Zielsequenzen zur Bestätigung und Typisierung wird bei jeder Multiplex-PCR bewertet, und mithilfe spezieller Software wird automatisch ein abschließendes Testergebnis generiert.

2 ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES VERFAHRENS

Salmonella zählen zu den Hauptursachen für Lebensmittelvergiftungen. Daher ist die Prüfung von Lebens- und Futtermitteln auf *Salmonella* in vielen Ländern Pflicht. Standardprotokolle zum Nachweis von *Salmonella* sind zeitaufwändig und liefern erst nach mehreren Tagen ein abschließendes positives oder negatives Testergebnis. (ISO-6579/1). Bei einem positiven Salmonellentest verlangen viele Länder für die epidemiologische und gesundheitliche Risikobewertung eine weitere Typisierung von *Salmonella*. Üblicherweise erfolgt dies mithilfe der Serotypbestimmung anhand der somatischen Lipopolysaccharid- und Flagellenproteinantigene (O bzw. H) (ISO-6579/3). Salmonellen sind jedoch antigenisch komplex, da die über 2.400 Serovare verschiedene Kombinationen der 46 O-Antigene und 85 H-Antigene aufweisen (3). Bei einem positiven *Salmonella*-Test kann die weitere vollständige Typisierung, für die viele O- und H-Antiseren erforderlich sind, demnach wiederum mehrere Tage dauern.

Die DNA-Typisierung unterscheidet sich von der Serotypbestimmung. Bei der Serotypbestimmung wird das Vorhandensein von Antigenen auf der Zelloberfläche und den Flagellen nachgewiesen. Dies basiert auf der Expression von Genen, die sich in zwei spezifischen Segmenten des *Salmonella*-Genoms befinden. Der CTS 2.0 Assay erkennt genetische Variationen an 21 Loci im gesamten *Salmonella*-Genom: Dadurch erhält man spezifische Salmonella-Genotypen, auch Genovare genannt. Die CTS 2.0 Datenbank gleicht die Genovare mit einer Datenbank aus gut charakterisierten *Salmonella*-Serovaren ab. Ein Genovar wird als Testergebnis angegeben, wenn für den im CTS 2.0 Assay erzeugten Genovar kein etablierter Serovar vorliegt.

Mit dem CTS 2.0 Assay kann die Bestätigung und Typisierung von *Salmonella* ausgehend von Bakterien aus einer XLD- oder Nähragar(NA)-Platte innerhalb von etwa 2,5 Stunden durchgeführt werden. Der Nachweis des Vorhandenseins von DNA-Zielsequenzen zur Typisierung und Bestätigung erfolgt parallel mit verschiedenen internen Kontrollen. CTS 2.0 beruht auf einem schnellen und einfachen Probenvorbereitungsprozess mit minimalen Arbeitsschritten durch den Bediener, sobald sich die Proben im Real-time-PCR-System befinden.

VERFAHRENSPRINZIP

Auf dem CTS 2.0 Analyseportal wird eine Worklist erstellt. Mithilfe der im CTS 2.0-Kit enthaltenen „Kolonie-Probennehmer“ werden Bakterienproben aus XLD- oder NA-Medium entnommen. Anschließend werden die Kolonie-Probennehmer in 1,5-ml-Röhrchen gegeben, die mit 200 µl Probenpuffer vorgefüllt sind. Die Bakterien werden in diesem Puffer resuspendiert, die Röhrchen werden verschlossen und in einen auf 98 °C vorgeheizten Heizblock überführt. Die Röhrchen werden 10 Minuten bei 98 °C inkubiert und anschließend 5 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Bei diesem Verfahren wird aus den Proben ein Basislysat erzeugt, indem die bakterielle DNA im Probenpuffer freisetzt wird. Dieses Basislysat ist ohne weitere Reinigung für die Echtzeitamplifikation mittels CTS 2.0 geeignet.

Von dem Basislysat werden 140 µl in ein frisches, mit 35 µl PCR Master Mix gefülltes Röhrchen überführt und durch 3-maliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Danach werden in jedes der 6 Röhrchen im CTS 2.0 PCR-Reagenzstreifen 25 µl der Basislysat/Master Mix-Lösung gegeben. Dieser Reagenzstreifen enthält alle PCR-Primer und Sonden für die Amplifikation der Zielsequenz und die Detektion mittels Real-time-PCR. Abschließend wird der PCR-Reagenzstreifen in das Real-time-PCR-Gerät eingesetzt und der Amplifikationsprozess gestartet.

Die amplifizierten DNA-Zielsequenzen werden mithilfe von Hydrolyse-Sonden (TaqMan®), die an einem Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (Fluorophor) und am anderen Ende mit einer Quencher-Einheit markiert sind, detektiert. Zur Detektion der verschiedenen Zielsequenzen werden mit unterschiedlichen Fluorophoren markierte Sonden verwendet. Pro Reaktionsgefäß (Röhrchen) können bis zu 5 Fluorophore verwendet werden. CTS 2.0 kann insgesamt 27 DNA-Marker (einschließlich 6 Kontrollen) in 6 parallelen Multiplex-Real-time-PCRs detektieren. Kontrollmarker ermöglichen die Prüfung auf Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von *Salmonella* und auf korrekten Ablauf der Reaktion. Nichtvorhandensein bzw. Vorhandensein eines jeden der verbleibenden 21 DNA-Marker erzeugt einen einzigartigen „genetischen Fingerabdruck“ zur Bestimmung des *Salmonella*-Typs.

Der CTS 2.0 Assay verwendet eine spezielle Software zur Ergebnisabfrage in einem 2-stufigen Prozess. Im ersten Schritt wird das Nichtvorhandensein bzw. das Vorhandensein eines jeden der 27 DNA-Marker festgestellt. Dadurch entsteht ein individuelles Muster für alle DNA-Marker, der „genetische Fingerabdruck“. In einem zweiten Schritt wird dieser „genetische Fingerabdruck“ mit einer Datenbank abgeglichen, die die genetischen Fingerabdrücke vieler *Salmonella*-Serovare enthält. Wenn eine Übereinstimmung gefunden wird, erzeugt die Software auf der Basis des CTS 2.0 Assays ein Serovar-Ergebnis. Wenn keine Übereinstimmung gefunden wird, aber die Gattung *Salmonella* bestätigt wird, wird ein Genovar-Ergebnis erzeugt.

Inhalt des Kits	Stückzahl/Menge
CTS 2.0 PCR-Reagenzstreifen <i>PCR-Streifen (mit Deckeln) mit jeweils 12 Reaktionsbehältern (Röhrchen) und 2 x 6 Sets mit zielsequenzspezifischen Primern und Fluoreszenzsonden im Trockenformat</i>	3 Beutel mit jeweils 8 PCR-Reagenzstreifen mit jeweils 12 Röhrchen
CTS 2.0 PCR Master Mix <i>PCR Master Mix mit DNA-Polymerase, dNTPs, Reaktionspuffer und Stabilisatoren</i>	2 Röhrchen mit je 1 ml
Probenpuffer	1 Fläschchen mit 12 ml
Kolonie-Probennehmer	90

3 ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE GERÄTSCHAFTEN UND MATERIALIEN

- Bio-Rad CFX 96 und CFX Opus 96 Real-time PCR-System
- Vortex-Mischer
- Heizblock für Eppendorf-Röhrchen
- Zentrifuge für Eppendorf-Röhrchen
- Zentrifuge für Mikrotiter-Platten
- Halter für Eppendorf-Röhrchen
- Eppendorf-Röhrchen
- Halter für PCR-Reagenzstreifen
- Pipetten und hydrophobe Filterspitzen für den Einmalgebrauch für 20–200 µl
- Laborkittel und puderfreie Einweghandschuhe

4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Der CTS 2.0 Assay ist nur für die Verwendung im Labor bestimmt.
- Das Kit nicht verwenden, wenn das Etikett, das die Umverpackung versiegelt, beschädigt ist.
- Reagenzien, deren Beutel bei Erhalt geöffnet oder beschädigt ist, nicht verwenden.
- Die Beutel zum Schutz der Reagenzien nach jedem Gebrauch sofort wieder verschließen. Vor dem Verschließen überschüssige Luft aus den Beuteln entfernen.
- Das Trockenmittel nicht aus den Reagenz-Beuteln herausnehmen.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn das Trockenmittel fehlt oder in den Reagenz-Beuteln beschädigt ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Folie geöffnet oder beschädigt ist.
- Reagenzien aus verschiedenen Beuteln und/oder Kits und/oder Chargen nicht mischen.
- Keine abgelaufenen Reagenzien und/oder Materialien verwenden.
- Die PCR-Reagenzstreifen vor Licht schützen, um eine Zersetzung der Fluorophore durch Photobleichung zu verhindern.
- Puderfreie Handschuhe tragen. Kappen der PCR-Reagenzstreifen nicht mit bloßen Fingern berühren (Fingerabdrücke!) und nicht beschriften.
- Für eine einwandfreie Leistung dieses Assays ist die Anwendung bewährter Labortechniken sehr wichtig. Aufgrund der hohen analytischen Empfindlichkeit dieses Tests sollte äußerste Sorgfalt darauf verwendet werden, die Reinheit aller Materialien und Reagenzien zu erhalten.
- Um eine Kontamination durch Amplikons zu vermeiden, die CTS 2.0 PCR-Reagenzstreifen nach dem Gebrauch nicht öffnen, sondern sofort entsorgen.
- Proben stets im Einklang mit den sicheren Laborverfahren für mikrobiologische Laboratorien handhaben.
- Beim Umgang mit allen Reagenzien Schutzkleidung und Einweghandschuhe tragen.
- Nach der Durchführung des Tests die Hände gründlich waschen.
- In den Bereichen, in denen mit Proben oder Kit-Reagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, trinken, kauen oder essen.
- Nicht verwendete Reagenzien und Abfälle im Einklang mit allen geltenden Vorschriften entsorgen.

5 LAGERUNG UND STABILITÄT

Die Reagenzien und Komponenten des CTS 2.0 Assays sind bei 2–8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Keine abgelaufenen Reagenzien verwenden. Die CTS 2.0 PCR-Reagenzstreifen sind in versiegelten Beuteln verpackt. Zum Schutz des Produkts vor Feuchtigkeit die Beutel nach dem Öffnen sofort wieder verschließen.

PCR-Reagenzstreifen sind nach dem Anbrechen bei 2–8 °C bis zu 30 Tage stabil, wenn der Beutel stets wieder verschlossen wird.

6 HINWEISE ZUM GEBRAUCH

Erstellen der Worklist

1. Melden Sie sich mit Ihrer E-Mail-Adresse und dem Kennwort am Check-Points CTS 2.0 Analyseportal an.
2. Öffnen Sie das Menü, indem Sie oben links auf das Symbol ☰ klicken.
3. Öffnen Sie die Registerkarte „Run Sessions“, indem Sie auf „Run Sessions“ (PCR-Sitzungen) klicken.
4. Fügen Sie eine neue PCR-Sitzung hinzu, indem Sie oben rechts auf das Symbol + klicken. Es wird automatisch ein Global Identifier erzeugt, der nicht geändert werden kann. Unter „Details“ können Sie eine benutzerdefinierte Lauf-ID erstellen.
5. Zum Hinzufügen von Proben klicken Sie auf das Pipettensymbol 🍷 und geben Sie die Probeninformationen ein. „Sample names“ (Probenamen) sind obligatorisch, es können aber auch weitere Informationen wie „Sample location“ (Probenort), „Production batch“ (Produktionscharge), „Sample origin“ (Probenherkunft), „Sampling device“ (Probenahmeverrichtung) und „Sampling date“ (Probenahmedatum) eingegeben werden.
6. Klicken Sie auf „Save + New“ (Speichern + Neu), um mit der nächsten Probe weiterzumachen und bis zur letzten Probe fortzufahren. Klicken Sie anschließend auf „Save“ (Speichern).
7. Klicken Sie alternativ auf das Symbol für den Probenimport 📄, um eine CSV- oder XLSX-Datei mit Probeninformationen hochzuladen. Das Dateiformat kann mithilfe der Export-Schaltfläche 📄 heruntergeladen werden.
8. Fahren Sie mit der Auswahl weiterer Details im Abschnitt „Details“ fort. „Real-time PCR Cycler ID“ (ID des Real-time-PCR-Thermocyclers) und „Kit lot number“ (Kitchargennummer) sind Pflichtfelder, wohingegen „Custom run identifier“ (Benutzerdefinierte Lauf-ID) und „Run session notes“ (Anmerkungen zur PCR-Sitzung) optional sind.
9. Klicken Sie auf „Save run session“ (PCR-Sitzung speichern), um alle Laufinformationen zu speichern.
10. Öffnen Sie die PCR-Sitzung erneut und klicken Sie auf „Download cfx run file“ (CFX-Laufdatei herunterladen). Dadurch wird die Laufdatei generiert, um den Real-time-PCR-Lauf im Schritt „PCR System Operation“ (PCR-Systembetrieb) zu starten.
11. Laden Sie anschließend eine Worklist zur Verwendung im Labor herunter und drucken Sie sie aus, indem Sie oben rechts auf das Symbol 🖨️ klicken.
12. Fahren Sie mit der Probenvorbereitung fort.

Probenvorbereitung

HINWEIS: Ein (1) PCR-Reagenzstreifen wird für zwei (2) Proben verwendet. Eine ungerade Probenzahl mit Proben aus einem Kontrollstamm (Referenzstamm) ergänzen.

1. Schalten Sie den Heizblock ein und stellen Sie ihn auf **98 °C**.
2. Geben Sie **200 µl** Probenpuffer in ein 1,5-ml-Röhrchen. Verwenden Sie für jede Probe ein separates Röhrchen und beschriften Sie das Röhrchen mit der Proben-ID.
3. Führen Sie einen Kolonie-Probennehmer durch eine Einzelkolonie hindurch in den Agar ein. Kurz den Boden der Platte berühren und dann den Probennehmer wieder entfernen. Den Kolonie-Probennehmer immer senkrecht halten (Abbildung 1).

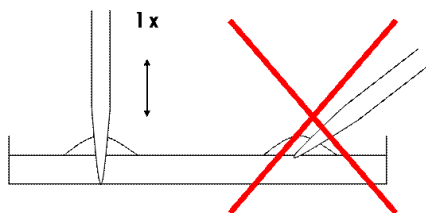


Abbildung 1: Korrekte Technik bei Verwendung

4. Geben Sie den Kolonie-Probennehmer in ein 1,5-ml-Röhrchen mit **200 µl** Probenpuffer und rollen Sie ihn mindestens 5-mal zwischen Daumen und Zeigefinger hin und her, dabei den Kolonie-Probennehmer im Puffer eingetaucht lassen.
5. Nehmen Sie den Kolonie-Probennehmer heraus und entsorgen Sie ihn.
6. Verschließen Sie das Röhrchen und vortexen Sie es kurz.
7. Setzen Sie die Röhrchen in den vorgewärmten Heizblock und inkubieren Sie **10 min bei 98 °C**.
8. Vortexen Sie die Röhrchen und lassen Sie sie mindestens 5 min auf dem Labortisch bis auf Raumtemperatur abkühlen. Wenn die Proben nicht direkt verwendet werden, kurz abzentrifugieren und die Röhrchen dann bei -20 °C aufbewahren.
9. Fahren Sie mit „Einrichtung der Real-time-PCR“ fort.

Einrichtung der Real-time-PCR

HINWEIS: Wenn die Proben aus der Aufbewahrung bei -20 °C genommen werden, lassen Sie sie 15 min bei Raumtemperatur stehen, dann vortexen und kurz zentrifugieren.

1. Geben Sie **35 µl** PCR Master Mix in ein 1,5-ml-Röhrchen. Verwenden Sie für jede Probe ein separates Röhrchen und beschriften Sie das Röhrchen mit der Proben-ID.
2. Zentrifugieren Sie die Proben aus dem vorherigen Schritt (Probenvorbereitung) kurz und geben Sie dann **140 µl** Probe zum PCR Master Mix. Durch 3-maliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mischen.
3. Nehmen Sie die erforderliche Anzahl an PCR-Reagenzstreifen aus dem Beutel. Entfernen Sie die überschüssige Luft und verschließen Sie den Beutel wieder. Beschriften Sie jeden PCR-Reagenzstreifen am Ende mit der jeweiligen Probenkennung.
4. Nehmen Sie die Deckel vorsichtig von den Strips ab und heben Sie sie auf.

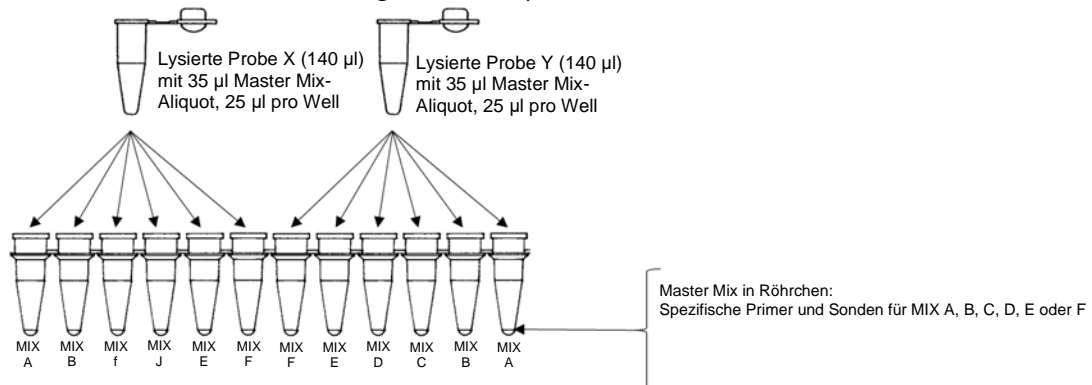


Abbildung 2 Pipettierschema für die Mischung aus Probe und Master Mix.

5. Geben Sie **25 µl** der ersten Mischung aus Probe und Master Mix in Röhrchen 1 des PCR-Reagenzstreifens (Abbildung 2). Wiederholen Sie diesen Schritt für die Röhrchen 2 bis 6.
6. Geben Sie **25 µl** der zweiten Mischung aus Probe und Master Mix in Röhrchen 7 des PCR-Reagenzstreifens. Wiederholen Sie diesen Schritt für die Röhrchen 8 bis 12 (Abbildung 2).
7. Fahren Sie auf diese Weise fort, bis Sie alle Mischungen aus Probe und Master Mix in die jeweiligen PCR-Reagenzstreifen überführt haben.
8. Setzen Sie die Deckel vorsichtig wieder auf die Streifen auf. Achten Sie darauf, die Streifen mit den Deckeln luftdicht zu verschließen, um eine Verdunstung während der PCR zu verhindern. Kurz zentrifugieren.
9. Schalten Sie das PCR-System und den Computer ein.
10. Öffnen Sie den Deckel des Real-time-PCR-Thermocyclers.
11. Setzen Sie die PCR-Reagenzstreifen anhand der erstellten Worklist (Abschnitt „Erstellung der Worklist“) in das PCR-Gerät. Gegebenenfalls können „Dummy“-PCR-Reagenzstreifen gemäß der Worklist verwendet werden, um die Streifen gleichmäßig im PCR-Heizblock zu verteilen.
12. Schließen Sie den Deckel des Real-time-PCR-Thermocyclers.
13. Fahren Sie mit „Betrieb des PCR-Systems“ fort.

Betrieb des PCR-Systems

HINWEIS: Zur Verwendung der LIMS-Datei muss ein Computer mit dem Thermocycler verbunden sein.

1. Starten Sie die Bio-Rad CFX Manager Software.
2. Klicken Sie auf „**File**“ (Datei), „**Open**“ (Öffnen) und dann auf „**Open LIMS File**“ (LIMS-Datei öffnen). Importieren Sie anschließend die CFX-Laufdatei vom Check-Points CTS 2.0 Analyseportal.
3. Klicken Sie zum Starten der PCR auf „**Start**“.
4. Speichern Sie am Ende des Laufs die Datendatei (Erweiterung .PCRD) an einem dedizierten Netzwerkspeicherort oder auf einem USB-Speichermedium.

Datenverarbeitung und Ergebnisse




1. Melden Sie sich am Check-Points CTS 2.0 Analyseportal an.
2. Öffnen Sie die im Abschnitt „Erstellung der Worklist“ generierte PCR-Sitzung.
3. Klicken Sie auf die Registerkarte „**Upload CFX Result file**“ (CFX-Ergebnisdatei hochladen) und laden Sie die PCR-Datei mit den Daten des PCR-Laufs hoch.
4. Klicken Sie auf das erscheinende Banner oder auf das Symbol , um die Datenverarbeitung zu starten.
5. Die Datenverarbeitung läuft im Hintergrund; es ist nicht erforderlich, das Fenster geöffnet zu halten. Die Verarbeitung dauert 5–10 Minuten, und die Ergebnisse werden automatisch angezeigt. Wenn keine Ergebnisse angezeigt werden, aktualisieren Sie den Browser einmal (F5) und überprüfen Sie die Registerkarte „**Messages**“ (Meldungen).
6. Berichte können durch Klicken auf die Registerkarte „**Reporting**“ (Berichte) gedruckt werden. Verwenden Sie die Kontrollkästchen zur Auswahl der Ergebnisse, die Sie drucken möchten. Mit  können Sie individuelle Berichte und mit  einen Übersichtsbericht herunterladen.
7. Tabelle 1 unten zeigt die Ergebnisse und Interpretationen, die erhalten werden können.

Tabelle 1 Interpretation der Ergebnisse des CTS-Assays

Angegebenes Assay-Ergebnis	Interpretation des Ergebnisses	Nächster Schritt
Salmonella Serovar	Salmonella-positiv und Serovar-Ergebnis	Endergebnis
Salmonella Serovar 1 oder Serovar 2	Salmonella-positives Ergebnis mit zwei möglichen Serovar-Ergebnissen	Endergebnis
Salmonella-positiv Genovar	Salmonella-positives Ergebnis mit Genovar-Code	Probe einmal mit frischem Isolat wiederholen
Salmonella-positiv, Typisierungsergebnis nicht eindeutig	Salmonella-positiv, aber kein Typisierungsergebnis	Probe einmal mit frischem Isolat wiederholen
Keine Salmonellen	Gram-negative Bakterien detektiert, aber keine Salmonellen	Endergebnis
Keine DNA erkannt	Keine gram-negative Bakterien detektiert	Probe einmal mit frischem Isolat wiederholen
Reaktion nicht OK	Reaktion fehlgeschlagen – Hemmprobe oder Reagenzfehler; keine Amplifikation der internen Kontrolle	Probe einmal mit frischem Isolat wiederholen

Wiederholung der Analyse

Unter folgenden Umständen wird empfohlen, die Reaktion einmal mit einem frischen Isolat zu wiederholen:

- Salmonella-positiv mit Genovar-Code
- Salmonella-positiv mit nicht eindeutigem Typisierungsergebnis
- Keine DNA erkannt
- Reaktion nicht OK

Ein Ergebnis „Salmonella-positiv mit Genovar-Code“ oder „Salmonella-positiv, Typisierungsergebnis nicht eindeutig“ kann erhalten werden, wenn einer (1) der 21 Typisierungsmarker ein fehlerhaftes Ergebnis ergab, sodass ein Genovar-Code generiert wurde, bei dem kein Zusammenhang mit einem bekannten Serovar aus der Datenbank CTS 2.0 besteht. Dies ist ein seltenes Ereignis für einzelne Marker, aber für die Summe der 21 Typisierungsmarker relevant. Bei Auftreten dieses speziellen Problems führt die einmalige Wiederholung der Analyse der Probe zu einem Serovar-Ergebnis, was als Endergebnis verwendet werden sollte. Es kann auch sein, dass das ursprüngliche Genovar-Ergebnis oder das nicht eindeutige Typisierungsergebnis das korrekte Ergebnis ist, und eine Wiederholung des Tests wird in diesen Fällen zum gleichen Ergebnis führen.

Auch bei „Reaktion nicht OK“ oder „Keine DNA erkannt“ wird empfohlen, die Reaktion einmal mit einem frischen Isolat zu wiederholen. Diese Ergebnisse werden häufig durch suboptimale Reaktionsbedingungen und/oder Verunreinigungen in der Probe verursacht. Die Wiederholung der Reaktion mit einem frischen Isolat führt in vielen Fällen auch beim zweiten Mal zu einem korrekten Ergebnis.

Es kann sein, dass der Check&Trace Salmonella 2.0 Assay auch nach Wiederholung des Tests keine eindeutige Bestätigung und/oder kein eindeutiges Typisierungsergebnis liefert. In solchen Fällen wird empfohlen, eine alternative Methode zu verwenden, um ein endgültiges Testergebnis zu erhalten. (1,2).

7 QUALITÄTSKONTROLLE

Qualitätskontrollverfahren ermöglichen die Überwachung der Leistung des Tests. Labore müssen die Anzahl, Art und Häufigkeit der Testkontrollmaterialien gemäß den Richtlinien oder Anforderungen aller geltenden Vorschriften oder Akkreditierungsorganisationen festlegen, um den gesamten Analyseprozess zu überwachen.

Im CTS 2.0 Assay werden zur Interpretation der Testergebnisse keine externen Positiv- und Negativkontrollen verwendet. Der CTS 2.0 Assay verfügt außerdem über insgesamt 6 interne Kontrollen zur Überwachung möglicher Reaktionsfehler. Es wird jedoch empfohlen, täglich Kontrollproben zu testen, bis eine ausreichende Prozessvalidierung erreicht ist. Eine reduzierte Häufigkeit von Kontrolltests sollte im Einklang mit den geltenden Vorschriften erfolgen.

Externe Kontrollen sollten die erwarteten Ergebnisse liefern: den Salmonella-Serovar bei einer externen Positivkontrolle und „Keine Salmonellen“ bei einer externen Negativkontrolle. Jedes andere Ergebnis für die externen Kontrollen weist auf einen Systemfehler hin.

Tabelle 2 unten enthält eine Reihe von Referenzstämmen, die als externe Positiv- oder Negativkontrollen verwendet werden können. Es können auch andere Kontrollstämmen verwendet werden, deren Testergebnisse gut dokumentiert sind.

Tabelle 2 Im Handel erhältliche Stämme zur Verwendung als externe Positiv- und Negativkontrolle

Externer Kontrollstamm	Testergebnis
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis (NCTC 12694)	Salmonella Enteritidis
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium (NCTC 10413)	Salmonella Typhimurium
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium (monophasisch); I 4,5,12:i:- (NCTC 13952)	Salmonella Typhimurium monophasisch
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	Keine Salmonellen

8 VERFAHRENSGRENZEN

- Dieses Produkt kann nur auf den Bio-Rad-Systemen CFX 96 oder CFX Opus 96 verwendet werden.
- Falsche Ergebnisse können durch unsachgemäße Gewinnung, Handhabung und Lagerung der Proben, technische Fehler, Probenverwechslung verursacht werden.
- Wenn das CTS 2.0-Ergebnis „Salmonella-positiv mit Genovar-Code“, „Salmonella-positiv, Typisierungsergebnis nicht eindeutig“, „Keine DNA erkannt“ oder „Reaktion nicht OK“ lautet, sollte der Test mit einem frischen Isolat wiederholt werden.
- Inklusivitätstests und -analysen haben ergeben, dass die folgenden *Salmonella*-Serovare erkannt werden: Abaetetuba, Agona, Alachua, Albany, Anatum, Bovismorbificans, Braenderup, Brandenburg, Bredeney, Cerro, Choleraesuis, Corvallis, Cubana, Derby, Dublin, Enteritidis, Gallinarum Gallinarum, Gallinarum Pullorum, Give, Goldcoast, Hadar, Havana, Heidelberg, Idikan, Infantis, Javiana, Kentucky, Livingstone, London, Mbandaka, Minnesota, Molade, Montevideo, Muenchen, Muenster, Newport, Ohio, Oranienburg, Orion, Ouakam, Panama, Paratyphi B (eventuell Java), Poona, Reading, Rissen, Saintpaul, Sandiego, Schwarzengrund, Senftenberg, Stanley, Tennessee, Thompson, Typhimurium, Uganda, Virchow, Worthington, Yoruba, monophasische Variante von Salmonella Typhimurium (1,4,[5],12:i:-), 4,[5],12:d:-. Andere *Salmonella*-Serovare ergeben einen Genovar-Code. Gelegentlich lautet das Ergebnis im CTS 2.0 möglicherweise „Salmonella-positiv, Serovar A oder Serovar B“.
- Mutationen oder Polymorphismen in Primer- oder Sondenbindungsregionen können die Erkennung bestimmter Sequenzvarianten (Sequenztypen) der Serovare im CTS 2.0 Assay beeinträchtigen. In solchen Fällen gibt CTS 2.0 einen Genovar-Code anstelle des Serovar-Ergebnisses an.
- CTS 2.0 ist nicht in der Lage, *Salmonella*-Spezies oder -Subspezies zu unterscheiden, d. h. die Spezies *bongori* und *enterica* und die *enterica*-Subspezies *arizonae*, *diarizonae*, *enterica*, *houtenae*, *indica* und *salamae*. In all diesen Fällen lautet das CTS 2.0-Ergebnis „Salmonella-positiv, Genovar-Code“.
- CTS 2.0 ist ein qualitativer Test, der weder quantitative Werte liefert noch die Anzahl der vorhandenen Organismen angibt.

- Die Leistung des CTS 2.0 wurde auf Nähragar und XLD-Agar geprüft. Andere Medien müssen von jedem Labor separat geprüft werden, um die angemessene Leistung bei Verwendung dieser Medien sicherzustellen.

9 LEISTUNGSMERKMALE

Allgemein

Die Validierung des CTS 2.0 Assay wurde von Microval Expert Laboratory WFC, Arkel, Niederlande unter Aufsicht des Microval Technical Committee (MVTC) durchgeführt. Für die Erstellung des Protokolls und die Erstellung des Berichts einschließlich der Akzeptanzkriterien wurde die Norm ISO-16140 Teil 6 verwendet. Als Referenzmethoden für die Bestätigung bzw. Typisierung wurden ISO-6579/1 und ISO-6579/3 herangezogen. Die Assayvalidierung bestand aus zwei Hauptteilen: 1. einer Methodenvergleichsstudie (MVS) und 2. einer Inter-Labor-Studie (ILS). Die MVS wurde mit Bakterien aus zwei Medien, Nähragar (NA) und XLD-Agar (XLD), auf zwei Real-time-PCR-Plattformen, Bio-Rad CFX 96 und Bio-Rad CFX Opus 96, durchgeführt. Die ILS wurde auf einem einzigen Medium, XLD, und unter Verwendung von entweder Bio-Rad CFX 96 oder Bio-Rad CFX Opus 96 durchgeführt, je nachdem, welches System in den verschiedenen ILS-Prüfstellen verfügbar war.

Studie zur Bestätigung der Inklusivität

Zur Bestätigung von Salmonellen wurde eine Inklusivitätsstudie gemäß ISO-16140-6 durchgeführt. Es wurden insgesamt 150 bereits charakterisierte *Salmonella*-Stämme verwendet. In Tabelle 3 unten sind die Ergebnisse für die Bestätigung von *Salmonella* aus diesen Stämmen aufgeführt.

Tabelle 3 Ergebnisse von 150 Salmonella-Stämmen zur Bestätigung von Salmonella, d. h. Ergebnis ist „Salmonella Serovar“ oder „Salmonella Genovar“ oder „Salmonella-positiv, Typisierungsergebnis nicht eindeutig“, auf zwei Medien, Nähragar (NA) und XLD-Agar und zwei PCR-Plattformen, Bio-Rad CFX 96 und Bio-Rad CFX Opus 96.

Anzahl der Stämme	qPCR-System	Medium	Übereinstimmung Inklusivität	Nichtübereinstimmung Inklusivität
150	Bio-Rad CFX 96	NA	150	0
		XLD	150	0
	Bio-Rad CFX OPUS 96	NA	150	0
		XLD	150	0

Insgesamt wurden alle 150 *Salmonella*-Stämme mit dem CTS 2.0 Assay auf beiden Systemen und mit beiden Medien als *Salmonella* bestätigt.

Studie zur Bestätigung der Exklusivität

Zur Bestätigung von Nicht-Salmonellen wurde eine Exklusivitätsstudie gemäß ISO-16140-6 durchgeführt. Es wurden insgesamt 102 bereits charakterisierte Nicht-*Salmonella*-Stämme verwendet. In Tabelle 4 unten sind die Ergebnisse für die Bestätigung von Nicht-*Salmonella* aus diesen Stämmen aufgeführt.

Tabelle 4 Ergebnisse von 102 Stämmen zur Bestätigung von Nicht-Salmonella, d. h. Ergebnis ist „Keine Salmonellen“, auf zwei Medien, Nähragar und XLD-Agar und zwei PCR-Plattformen, Bio-Rad CFX 96 und Bio-Rad CFX Opus 96. Bei ausbleibendem Wachstum auf XL können die Zahlen leicht variieren.

Anzahl der Stämme	qPCR-System	Medium	Übereinstimmung Exklusivität	Nichtübereinstimmung Exklusivität
102	Bio-Rad CFX 96	NA	102	0
		XLD	95	0
	Bio-Rad CFX OPUS 96	NA	101	0
		XLD	96	0

Insgesamt wurden alle Nicht-*Salmonella*-Stämme mit einem schlüssigen Testergebnis mit dem CTS 2.0 Assay auf beiden Systemen und mit beiden Medien als Nicht-*Salmonella* bestätigt.

Studie zur Inklusivität der Typisierung

Zur Typisierung von *Salmonella* wurde eine Inklusivitätsstudie gemäß ISO-16140-6 durchgeführt. Es wurden insgesamt 315 bereits charakterisierte *Salmonella*-Stämme aus 59 verschiedenen Serovaren verwendet. In Tabelle 5 unten sind die Ergebnisse für die Typisierung von *Salmonella* aus diesen Stämmen aufgeführt.

Tabelle 5 Ergebnisse von 315 Salmonella-Serovar-Stämmen zur Typisierung von Salmonella, d. h. Ergebnis ist „Salmonella Serovar“, auf zwei Medien, Nähragar (NA) und XLD-Agar und zwei PCR-Plattformen, Bio-Rad CFX 96 und Bio-Rad CFX Opus 96. Bei einigen Stämmen war das Ergebnis nicht eindeutig. Es ist zu beachten, dass „Salmonella-Genovar“ bei der Inklusivitätsstudie zur Typisierung als nicht eindeutiges Typisierungsergebnis betrachtet wurde.

Anzahl der Stämme	qPCR-System	Medium	Übereinstimmung Inklusivität	Nichtübereinstimmung Inklusivität
315	Bio-Rad CFX 96	NA	311	0
		XLD	300	0
	Bio-Rad CFX OPUS 96	NA	308	1
		XLD	309	1

Insgesamt stimmten die Ergebnisse von 1208 von 1210 *Salmonella*-Serovaren mit den erwarteten Testergebnissen überein. Bei zwei (2) *Salmonella*-Serovaren stimmten die Testergebnisse nicht mit den erwarteten Ergebnissen überein, ein *Salmonella-Poona*-Stamm wurde auf beiden Medien mit dem CFX Opus 96 als *Salmonella Abaetetuba* angegeben.

Studie zur Exklusivität der Typisierung

Zur Typisierung von *Salmonella* wurde eine Exklusivitätsstudie gemäß ISO-16140-6 durchgeführt. Insgesamt wurden 104 Stämme verwendet, 78 *Salmonella*-Exklusivserovare und 26 Nicht-*Salmonella*-Enterobacteriaceae. In Tabelle 6 unten sind die Testergebnisse für diese Stämme aufgeführt.

Tabelle 6 Kombinierte Testergebnisse für 78 Salmonella-Serovar-Exklusivitätsstämme und 26 Nicht-Salmonella-Enterobacteriaceae-Stämme auf zwei Medien, Nähragar (NA) und XLD-Agar und zwei PCR-Plattformen, Bio-Rad CFX 96 und Bio-Rad CFX Opus 96. Bei einigen Stämmen war das Ergebnis nicht eindeutig. Es ist zu beachten, dass Salmonella-Exklusivitätsserovare bei „Übereinstimmung Exklusivität“ ein Genovar-Ergebnis aufweisen sollten.

Anzahl der Stämme	qPCR-System	Medium	Übereinstimmung Exklusivität	Nichtübereinstimmung Exklusivität
104	Bio-Rad CFX 96	NA	103	1
		XLD	102	0
	Bio-Rad CFX OPUS 96	NA	101	2
		XLD	102	1

Insgesamt stimmten 408 von 412 Testergebnissen mit dem erwarteten Ergebnis überein, d. h. „*Salmonella* Genovar“ für *Salmonella*-Exklusivitätsserovare und „Keine *Salmonellen*“ für Nicht-*Salmonella-Enterobacteriaceae*. 4 *Salmonella*-Exklusivitätsserovare ergaben ein falsches Ergebnis, d. h. „*Salmonella* Serovar“ anstatt „*Salmonella* Genovar“. *Salmonella* Coeln auf NA wurde auf beiden PCR-Systemen als „*Salmonella* Saintpaul“ erkannt. *Salmonella* Matopeni auf beiden Medien wurde von CFX Opus 96 als „*Salmonella* Braenderup“ erkannt.

Inter-Labor-Studie

30 Bakterienstämme wurden an 15 Mitarbeiter in 13 an der Inter-Labor-Studie (ILS) teilnehmenden Prüfstellen gesendet und umfassten 16 Salmonella-Inklusivitätsserovare, 4 Salmonella Exklusivitätsserovare, einmal (1) Salmonella enterica subsp. arizonae, einmal (1) Salmonella bongori und 8-mal Nicht-Salmonella Enterobacteriaceae. 24 von 30 Testergebnissen wurden für die ILS-Bestätigungsstudie verwendet und eine weitere Reihe von 24 von 30 Testergebnissen wurde für die ILS-Typisierungsstudie verwendet, sodass ein Satz von 18 Testergebnissen sowohl für die Typisierung als auch für die Bestätigung verwendet wurde. Referenztests wurden nur für den Bestätigungsteil der Studie durchgeführt. Die Tests wurden mit XLD-Agar ausschließlich unter Verwendung der PCR-Systeme der Prüfer durchgeführt, d. h. mit 11 Bio-Rad CFX 96-Systemen und 4 Bio-Rad CFX Opus 96-Systemen.

ILS-Bestätigungsstudie

Es wurden Daten von 13 der 15 Prüfer in die ILS aufgenommen, ein Prüfer hatte die Daten nicht rechtzeitig gemeldet, der andere Prüfer war von der Gebrauchsanweisung abgewichen. In Tabelle 7 unten sind die Ergebnisse der ILS-Bestätigungsstudie dieser 13 Prüfer aufgeführt.

Tabelle 7 Testergebnisse für die ILS-Bestätigung, 16 Inklusivitätsstämme und 8 Exklusivitätsstämme, alle Nicht-Salmonella-Enterobacteriaceae.

Prüfer	Inklusivität Bestätigung		Exklusivität Bestätigung	
	Referenzmethode	CTS 2.0	Referenzmethode	CTS 2.0
1	16/16	15/16	8/8	8/8
2	16/16	16/16	8/8	8/8
3	16/16	16/16	7/8	8/8
4	16/16	16/16	8/8	8/8
5	16/16	16/16	8/8	8/8
6	16/16	16/16	8/8	8/8
7	16/16	16/16	8/8	8/8
8	16/16	15/16	7/8	8/8
9	16/16	16/16	8/8	8/8
10	16/16	16/16	8/8	8/8
11	16/16	16/16	8/8	8/8
12	16/16	16/16	8/8	8/8
13	16/16	16/16	8/8	8/8
Gesamt	208/208	206/208	102/104	104/104

Insgesamt waren 310 von 312 Testergebnissen zur Bestätigung mit dem CTS 2.0 übereinstimmend. Zwei (2) von 312 Proben ergaben kein eindeutiges Ergebnis. Es wurden keine diskordanten Testergebnisse berichtet.

ILS-Typisierungsstudie

Es wurden Daten von 13 der 15 Prüfer in die ILS aufgenommen, ein Prüfer hatte die Daten nicht rechtzeitig gemeldet, der andere Prüfer war von der Gebrauchsanweisung abgewichen. Tabelle 8 unten zeigt das Ergebnis der ILS-Typisierungsstudie für diese 13 Prüfer.

Tabelle 8 Testergebnisse für die Typisierung, 16 Inklusivitätsstämme und 8 Exklusivitätsstämme, d. h. 4 Salmonella-Exklusivitätsserovare und 4 Nicht-Salmonella-Enterobacteriaceae.

Prüfer	Inklusivität Typisierung		Exklusivität Typisierung	
	Referenzmethode	CTS 2.0	Referenzmethode	CTS 2.0
1	k. A.	15/16	k. A.	8/8
2	k. A.	16/16	k. A.	8/8
3	k. A.	16/16	k. A.	7/8
4	k. A.	16/16	k. A.	8/8
5	k. A.	14/16	k. A.	8/8
6	k. A.	16/16	k. A.	8/8
7	k. A.	16/16	k. A.	8/8
8	k. A.	14/16	k. A.	8/8
9	k. A.	16/16	k. A.	8/8
10	k. A.	16/16	k. A.	8/8
11	k. A.	16/16	k. A.	8/8
12	k. A.	16/16	k. A.	8/8
13	k. A.	16/16	k. A.	8/8
Gesamt	k. A.	203/208	k. A.	103/104

Insgesamt waren 306 von 312 Testergebnissen zur Typisierung mit dem CTS 2.0 übereinstimmend. Sechs (6) von 312 Proben ergaben kein eindeutiges Testergebnis. Es wurden keine diskordanten Testergebnisse berichtet.

Zusammenfassung des MicroVal-Zertifikats



MicroVal versichert hiermit, dass die Zertifizierungsprüfung ergab, dass Check & Trace Salmonella 2.0 (CTS 2.0) validiert wurde und sich laut Validierungsstudienbericht als mindestens gleichwertig mit der Referenzmethode erwiesen hat. Der Kurzbericht der Validierung ist auf der Website von MicroVal verfügbar: www.microval.org

Referenzmethoden: ISO-6579-1:2017 und ISO/TR 6579-3:2014.

Geltungsumfang: Bestätigung der Isolierung präsumtiver Salmonellen auf nicht-selektivem NA- und selektivem XLD-Agar und Typisierung von 59 Salmonella-Serovaren.



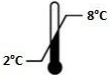



Die Validierung und Zertifizierung wurden gemäß ISO 16140-6:2019 und dem MicroVal Rules and Certification Scheme Version 9.1 durchgeführt.

Zertifikat-Nr.: 2021LR07

10 REFERENZEN

1. ISO 6579-1. Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von Salmonellen - Teil 1: Nachweis von Salmonella spp. [ISO 6579-1:2017].
2. ISO 6579-3. Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von Salmonellen - Teil 3: Leitfaden für die Serotypisierung von Salmonella spp. [ISO 6579-3:2014].
3. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. Grimont, P.A.D. und Weill, F.X. Bd. 9, 2007.
4. ISO 16140-1:2016 Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Verfahrensvalidierung - Teil 1: Terminologie.
5. ISO 16140-6:2016 Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Verfahrensvalidierung - Teil 6: Arbeitsvorschrift für die Validierung von (urheberrechtlich geschützten) Alternativverfahren für die Bestätigungs- und Typisierungsprüfung

11 SYMBOLGLOSSAR

Symbol	Bedeutung
	Hersteller
	Enthält ausreichend Material für <n> Tests
	Temperaturgrenze
	Gebrauchsanweisung beachten Bei elektronischen Gebrauchsanweisungen ist neben dem Symbol auch die URL angegeben.
	Trocken halten
	Vor Licht schützen

Check-Points B.V.
Binnenhaven 5
6709 PD Wageningen
Niederlande

info@check-points.com
www.check-points.com

