

Instrucciones del Producto

Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria*

Descripción del producto y uso adecuado

El Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen® se utiliza con el Sistema de Detección Molecular Neogen® para la detección rápida y específica de *Listeria* en muestras enriquecidas de alimentos y ambientes.

Los Análisis de Detección Molecular Neogen® usan 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 su método de preferencia, o según se especifique en las regulaciones locales^(1, 2, 3).

El Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen está previsto para el uso en laboratorios por 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 de agua, farmacéuticas, cosméticas, clínicas o veterinarias. El Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen no ha sido evaluado con todos los protocolos de análisis ni con todas las cepas bacterianas 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 o muestras ambientales 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 Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen con Base de Caldo Demi Fraser y base de Caldo Fraser que contiene citrato de amonio férrico. A continuación, se proporciona una formulación típica de estos medios.

Fórmula Típica de Base de Caldo Demi Fraser	(g/L)	Fórmula Típica de Base de Caldo Fraser	(g/L)
Cloruro de sodio	20 g	Cloruro de sodio	20 g
Fosfato de sodio, dibásico, anhidro*	9,6 g	Fosfato de sodio, dibásico, anhidro*	9,6 g
Extracto de carne	5,0 g	Extracto de carne	5,0 g
Hidrolizado pancreático de caseína	5,0 g	Hidrolizado pancreático de caseína	5,0 g
Hidrolizado péptico de tejido animal	5,0 g	Hidrolizado péptico de tejido animal	5,0 g
Extracto de levadura	5,0 g	Extracto de levadura	5,0 g
Cloruro de litio	3,0 g	Cloruro de litio	3,0 g
Fosfato de potasio, monobásico	1,35 g	Fosfato de potasio, monobásico	1,35 g
Esculina	1,0 g	Esculina	1,0 g
Acriflavina HCl	0,0125 g	Acriflavina HCl	0,025 g
Ácido nalidíxico	0,01 g	Ácido nalidíxico	0,02 g
* Sustituir: Fosfato de sodio, dibásico, dihidrato	12,0 g		

Suplemento de Caldo de Fraser

(Ingredientes por vial de 10 mL. Se agrega un vial a un litro de medio basal).

Citrato de amonio férrico 0,5 g/10 mL

pH final 7,2 ± 0,2 a 25 °C

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 para el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen contiene 96 pruebas que se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Componentes del Kit para el Ensayo de Detección Molecular Neogen

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 reactivos para el Ensayo de Detección Molecular 2 para <i>Listeria</i> Neogen®	Tubos azules	96 (12 tiras de 8 tubos)	Mezcla de detección y amplificación específica liofilizada	Listo para usar
Tapas adicionales	Tapas azules	96 (12 tiras de 8 tapas)		Listo 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 ADN	Listo para usar

El Control Negativo, no provisto en el kit, es un medio de enriquecimiento estéril, p. ej., Caldo Demi Fraser. No use agua como Control Negativo.

Seguridad

El usuario debe leer, comprender y seguir la información de seguridad incluida en las instrucciones para el Sistema de Detección Molecular Neogen y el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen. Guarde las instrucciones de seguridad para consultas futuras.

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

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

⚠ ADVERTENCIA

No utilice el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen para el diagnóstico de afecciones en seres humanos ni animales.

El método de Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen puede generar *Listeria monocytogenes* en niveles suficientes para causar abortos y muertes de mujeres y personas inmunocomprometidas, si están expuestas.

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

Para reducir los riesgos relacionados 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 Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen como se indica en el empaque y en las instrucciones del producto.
- Use siempre el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen antes de su fecha de vencimiento.
- Use el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen con muestras ambientales y de alimentos que hayan sido validadas internamente o por un tercero.
- Use el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen solo con superficies, desinfectantes, protocolos y cepas de bacterias que hayan sido validadas internamente o por un tercero.



- En el caso de las muestras ambientales que contengan una solución amortiguadora neutralizante con complejo 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 del caldo neutralizante de enriquecimiento a los tubos de Solución de Lisis Neogen. Productos para la Recolección 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 relacionados con la exposición a productos químicos y riesgos biológicos:

- Se recomienda enfáticamente informar al personal femenino de laboratorio sobre el riesgo asociado al desarrollo del feto, en caso de estar embarazada, que se genera por la infección de la madre por exposición a *Listeria monocytogenes*.
- 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 incubado podrían contener patógenos en niveles suficientes para provocar un riesgo para la salud humana.
- Siempre proceda según 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 conforme a los estándares de la industria.
- 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 contaminación ambiental:

- Proceda según los estándares de la industria para el desecho de residuos contaminados.

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.
- Utilice 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 y 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 de 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 ADN.

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 dejándolos inmersos 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 esterilice 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 y la técnica de laboratorio, pueden afectar los resultados.

Al seleccionar cualquier método de prueba o producto, es responsabilidad del usuario evaluar un número suficiente de muestras con exposición microbiana 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 para varias matrices de alimentos, Neogen ha desarrollado el kit de Control de Matriz para Detección Molecular Neogen®. Cuando sea necesario, utilice el Control de Matriz (MC) para determinar si la matriz puede afectar los resultados del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen. 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, 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 COMERCIALIZACIÓN 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. Póngase en contacto con su representante de Neogen o distribuidor autorizado de Neogen para que se le responda 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 Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen a una temperatura entre 2 °C y 8 °C. 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 cerradas a una temperatura entre 2 °C y 8 °C durante 60 días como máximo.

No utilice el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen 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 utilizarlos, el medio de enriquecimiento y los tubos del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen podrían contener materiales patógenos. Una vez terminada la prueba, proceda según 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 ADN.

El usuario debe completar la capacitación de calificación del operador 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”⁽⁶⁾.

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

La Tabla 3 para conocer los protocolos de enriquecimiento según el *Official Method of Analysis*SM 2016.07 de AOAC® y el certificado n.º 111501 del *Performance Tested Method*SM de AOAC®.

La Tabla 4 para conocer los protocolos de enriquecimiento según el certificado NF Validation 3M 01/14-05/16.

Enriquecimiento de la muestra

En las Tablas 2, 3 o 4 se presenta una guía para el enriquecimiento de muestras ambientales y de alimentos. Es responsabilidad del usuario validar protocolos alternativos de muestreo o proporciones de dilución para garantizar que este método de prueba satisface los criterios del usuario.

Alimentos

1. Deje que el medio de enriquecimiento de Caldo Demi Fraser (adicionado con citrato de amonio férrico) se equilibre a la temperatura ambiente de laboratorio.
2. Combine asépticamente el medio de enriquecimiento y la muestra según las Tablas 2, 3 o 4. Para todas las muestras con alto contenido de partículas y carne, se recomienda utilizar bolsas con filtro.
3. Homogenice cuidadosamente mediante un homogeneizador peristáltico, licuadora o mezclador manual durante $2 \pm 0,2$ minutos. Incube a una temperatura de $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ según las Tablas 2, 3 o 4.
4. En cuanto a los productos lácteos crudos (consulte las Tablas 2 o 4), transfiera 0,1 mL del enriquecimiento primario a 10 mL de Caldo Fraser. Incube a una temperatura de $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ entre 20 y 24 horas.

Muestras ambientales

Los dispositivos de recolección de muestras pueden ser esponjas hidratadas con una solución neutralizante para desactivar los efectos de los desinfectantes. Neogen recomienda el uso de una esponja de celulosa sin biocidas. La solución neutralizante puede ser el caldo neutralizante Dey-Engley (D/E) o el caldo Lethen. Se recomienda desinfectar el área después de la toma de muestras.

ADVERTENCIA: Si decidiera utilizar una solución amortiguadora neutralizante (NB) que contenga el complejo aril sulfonato como solución hidratante para la esponja, deberá preparar una dilución en una proporción de 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 relacionado con un resultado falso negativo que resultará en la liberación del producto contaminado. Otra opción es transferir 10 µL de la solución amortiguadora neutralizante enriquecida a los tubos de Solución de Lisis Neogen.

El tamaño recomendado del área de muestra para verificar la presencia o ausencia del patógeno en la superficie es de no menos de 100 cm² (10 cm × 10 cm o 4 in. × 4 in.). Cuando realice el muestreo con una esponja, cubra toda el área en dos direcciones (de izquierda a derecha, luego, de arriba hacia abajo) o recolecte las muestras ambientales según el protocolo de muestreo actual o con los lineamientos de FDA BAM⁽¹⁾, USDA FSIS MLG⁽²⁾ o la norma ISO 18593⁽⁷⁾.

1. Deje que el medio de enriquecimiento de Caldo Demi Fraser (adicionado con citrato de amonio férrico) se equilibre a la temperatura ambiente de laboratorio.
2. Combine asépticamente el medio de enriquecimiento y la muestra según las Tablas 2, 3 o 4.
3. Homogenice cuidadosamente mediante un homogeneizador peristáltico, licuadora, mezclador manual o batidora durante $2 \pm 0,2$ minutos. Incube a una temperatura de $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante entre 24 y 30 horas según las Tablas 2, 3 o 4.



Tabla 2: Protocolos generales de enriquecimiento a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ con Caldo Demi Fraser^(a) y Caldo Fraser^(a), según sea necesario.

Matriz de la muestra	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento (mL)	Temperatura de enriquecimiento ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)	Tiempo de enriquecimiento (horas)
Procesados térmicamente, cocinados, carnes curadas, carnes de aves, mariscos y pescados Productos lácteos pasteurizados, procesados por calor Frutas, hortalizas y vegetales Alimentos multicomponentes	25 g	225	37	24-30
Muestras ambientales	1 esponja	100 o 225	37	24-30
	1 hisopo	10	37	24-30
Carne de res cruda, carne de aves cruda, mariscos y pescados crudos	25 g	475	37	28-32



Matriz de la muestra	Enriquecimiento primario (Caldo Demi Fraser) ^(a)				Enriquecimiento secundario (Caldo Fraser) ^(a)			Volumen de análisis de la muestra ^(b)
	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento (mL)	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Tamaño de la muestra	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	
Productos lácteos crudos	25 g	225	37	20-24	Transferencia 0,1 mL a 10 mL de Caldo Fraser	37	20-24	10 µL

(a) El Caldo Demi Fraser o el Caldo Fraser siempre deben adicionarse con el suplemento de Caldo Fraser (citrato de amonio férrico) en el enriquecimiento primario o secundario.

(b) Volumen de muestra enriquecida transferida a los tubos de Solución de Lisis Neogen. Consulte el Paso 4.6 de la sección Lisis.

Instrucciones específicas para métodos validados

AOAC® Official MethodsSM 2016.07

AOAC® Performance Tested MethodSM n.º 111501



En los programas de AOAC Research Institute OMASM y PTMSM, se determinó que el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen es un método eficaz para la detección de las especies de *Listeria*. Las matrices evaluadas en el estudio se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Protocolos de enriquecimiento en los que se utiliza Caldo Demi Fraser^(a) a 37 °C ± 1 °C según AOAC OMASM 2016.07 y el certificado AOAC PTMSM n.º 111501.

Matriz de la muestra		Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento (mL)	Tiempo de enriquecimiento (horas)
Salchicha de carne de vaca, queso fresco, helado de vainilla, queso cottage con 4% de grasa, leche entera chocolatada con 3% grasa, lechuga romana, espinaca cruda en bolsa, salmón ahumado frío		25 g	225	24-30
Pollo crudo		25 g	475	28-32
Embutidos de pavo		125 g	1125	24-30
Melón cantaloupe ^(b)		Melón entero	Volumen suficiente para que el melón flote	26-30
Muestras ambientales:	Acero inoxidable	1 esponja	225	24-30
	Concreto sellado	1 esponja	100	24-30
	Plástico ^(c)	1 hisopo	10	24-30

Todas las muestras para la validación de AOAC se homogeneizaron mediante homogeneizador peristáltico, a menos que se indique lo contrario.

(a) El Caldo Demi Fraser o el Caldo Fraser siempre deben adicionarse con el suplemento de Caldo Fraser (citrato de amonio férrico) en el enriquecimiento primario o secundario.

(b) Homogeneizar la muestra mediante mezclado manual.

(c) Homogeneizar la muestra mediante agitador eléctrico.

NF Validation por AFNOR Certification



3M 01/14- 05/16

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

Para más información acerca del final de la validez, consulte el certificado de NF VALIDATION disponible en el sitio web mencionado anteriormente.

Método certificado de NF VALIDATION en cumplimiento de la norma ISO 16140-2⁽⁸⁾ comparada con la norma ISO 11290-1⁽³⁾

Alcance de la validación: todas las muestras ambientales y de alimentos para humanos (excluidas las muestras de la producción primaria)

Preparación de la muestra: las muestras deben prepararse según las normas ISO 11290-1⁽³⁾ e ISO 6887⁽⁹⁾

Versión de Software: consulte el certificado

Tabla 4. Protocolos de enriquecimiento según el método certificado NF VALIDATION 3M 01/14-05/16 a 37 °C ± 1 °C en los que se utiliza Caldo Demi Fraser^(a) y Caldo Fraser^(a), según sea necesario.

Protocolos generales	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 ^(b)	Punto de interrupción aceptado
Todas las muestras de alimentos (excepto carnes crudas mariscos crudos y productos lácteos crudos)	25 g	225	37	24-30	20 µL	• Caldo Demi Fraser hasta 72 horas • Lisado a -20 °C • Lisado a 4 °C hasta 72 horas
Muestras ambientales	25 g, 1 hisopo o 1 toalla	225	37	24-30	20 µL	• Lisado a -20 °C
Protocolo específico 1	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 ^(b)	Punto de interrupción aceptado
Carnes y mariscos crudos	25 g	475	37	28-32	20 µL	• Caldo Demi Fraser hasta 72 horas • Lisado a -20 °C • Lisado a 4 °C hasta 72 horas



Protocolo específico 2	Enriquecimiento primario (Caldo Demi Fraser) ^(a)				Enriquecimiento secundario (Caldo Fraser) ^(a)				Punto de interrupción aceptado
	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento (mL)	Temperatura de enriquecimiento ($\pm 1^\circ\text{C}$)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Tamaño de la muestra	Temperatura de enriquecimiento ($\pm 1^\circ\text{C}$)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Volumen de análisis de la muestra ^(b)	
Productos lácteos crudos	25 g	225	37	20-24	Transfiera 0,1 mL a 10 mL de Caldo Fraser	37	20-24	10 μL	- Caldo Fraser hasta 72 horas - Lisado a -20°C

(a) El Caldo Demi Fraser o el Caldo Fraser siempre deben adicionarse con el suplemento de Caldo Fraser (citrato de amonio férrico) en el enriquecimiento primario o secundario.

(b) Volumen de muestra enriquecida transferida a los tubos de Solución de Lisis Neogen. Consulte el Paso 4.6 de la sección Lisis.

Nota: Las muestras de más de 25 g no han sido sometidas a prueba en el estudio de NF Validation.

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

- Humedezca un paño 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®.
- Enjuague la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen con agua.
- Utilice una toalla desechable para secar la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen.
- 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. Use el bloque de frío a temperatura ambiente de laboratorio (20°C y 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 la unidad calentadora seca de bloques doble. Encienda la unidad calentadora seca de bloques y ajuste la temperatura para permitir que el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen alcance y mantenga una temperatura de $100^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

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 adecuado (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 $100^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

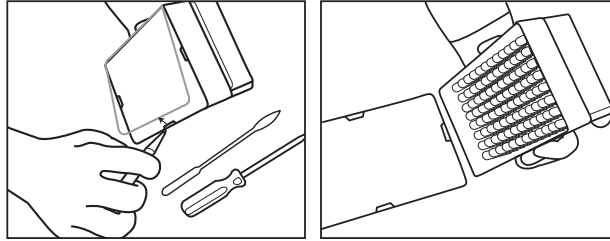
Preparación del Equipo de Detección Molecular Neogen®

- 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.
- Encienda el Equipo de Detección Molecular Neogen.
- Cree o edite un ensayo con datos para cada muestra. Para obtener detalles, consulte el Manual del Usuario del Sistema de Detección Molecular Neogen.

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.

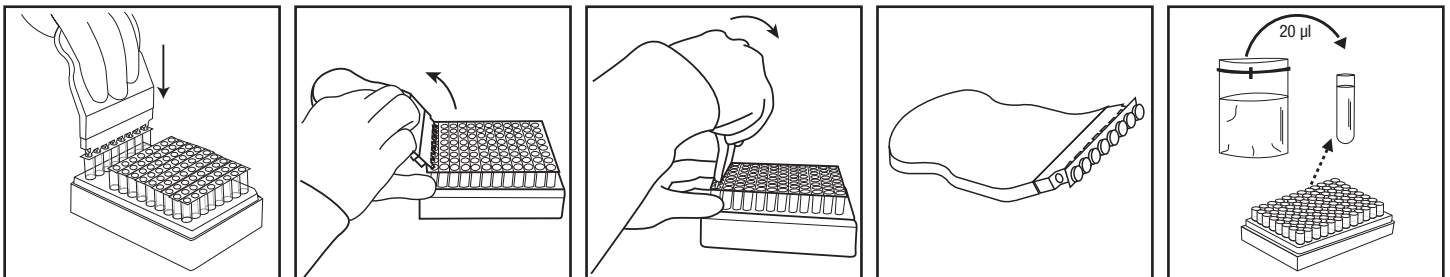
Lisis

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.



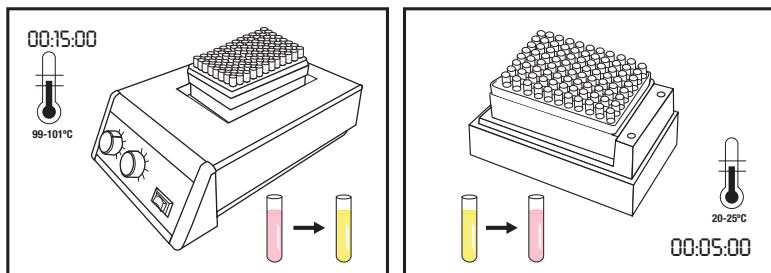
1. Permita que los tubos de Solución de Lisis Neogen se calienten colocando la gradilla a temperatura ambiente (20 °C y 25 °C) durante la noche (16-18 horas). Las alternativas para que los tubos de Solución de Lisis Neogen alcancen temperatura ambiente son colocar los tubos de Solución de Lisis Neogen 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 calentadora seca dos bloques durante 30 segundos a 100 ± 1 °C.
2. Invierta los tubos tapados para mezclarlos. Proceda con el paso siguiente dentro de 4 horas.
3. Retire el caldo de enriquecimiento de la incubadora.
4. Se requiere un tubo de Solución de Lisis Neogen para cada muestra y uno como control negativo (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 de la Solución de Lisis Neogen. Seleccione la cantidad de tubos de Solución de Lisis Neogen individuales o 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 Encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular – Lisis Neogen® para destapar una tira de tubos de Solución de Lisis Neogen, una tira por vez.
 - 4.5 Deseche la tapa del tubo de Solución de Lisis Neogen; si se conservará el lisado para repetir la prueba, coloque las tapas en un envase limpio para reutilizarlas luego de la lisis.
 - 4.5.1 Para ver cómo procesar el lisado conservado, consulte el Apéndice A.
 - 4.6 Transfiera 20 µL de la muestra en un tubo de Solución de Lisis Neogen a menos que se indique lo contrario en los protocolos de las Tablas 2, 3 o 4 (p. ej., productos lácteos crudos o si se emplean muestras ambientales con solución amortiguadora neutralizante, utilice 10 µL).



5. Repita los pasos 4.4 al 4.6 hasta que cada muestra individual se haya agregado al correspondiente tubo de Solución de Lisis Neogen de la tira.
6. Cuando se hayan transferido todas las muestras, transfiera 20 µL del NC (medio de enriquecimiento estéril, p. ej., Caldo Demi Fraser) 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 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 durante un máximo de 10 minutos. Cuando se utiliza la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen a temperatura ambiente, debe colocarse directamente sobre la mesa de laboratorio. Cuando esté fría, la solución de lisis 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. Se necesita un Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen por cada muestra y el NC.
 - 1.1 Las tiras de tubos de reactivo pueden cortarse para obtener la cantidad de tubos deseada. Seleccione la cantidad de Tubos de Reactivos del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen o tiras de 8 tubos, según sea necesario.
 - 1.2 Coloque los Tubos de Reactivos del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen en una gradilla vacía.
 - 1.3 Evite mover las perlas de reactivo del fondo de los tubos.
2. Seleccione un tubo de Control de Reactivos (RC) Neogen y colóquelo en la gradilla.
3. Para evitar la contaminación cruzada, destape un Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen por vez y utilice una punta de pipeta nueva para cada paso de transferencia.
4. Transfiera el lisado a un Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen y a un tubo de Control de Reactivos Neogen como se describe a continuación:

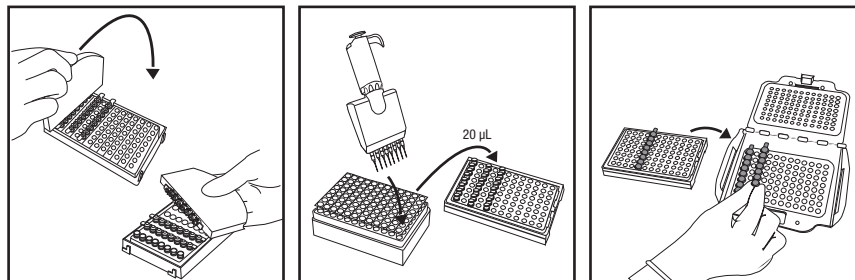
Transfiera el lisado de cada muestra a los Tubos de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen **primero**, seguido por el NC. Hidrate el tubo RC **al final**.

5. Utilice la Herramienta para Encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular – Reactivo Neogen® para destapar el Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen, una tira a la vez. Deseche la tapa.
 - 5.1 **Transfiera 20 µL del lisado de muestra de la ½ superior del líquido (evite el precipitado) en el tubo de Solución de Lisis Neogen que corresponde al Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen. Dispense en un ángulo que evite movimientos en las perlas. Mezcle pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.**
 - 5.2 Repita el paso 5.1 hasta que se haya añadido una muestra individual del lisado a un Tubo de Reactivos del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen en la tira.
 - 5.3 Cubra los Tubos de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen con las tapas adicionales provistas y utilice el lado redondeado de la Herramienta para Encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular, Reactivo Neogen para aplicar presión con un movimiento hacia adelante y hacia atrás para asegurarse de que la tapa quede bien ajustada.
 - 5.4 Repita los pasos 5.1 y 5.3, según sea necesario, para la cantidad de muestras que se deben analizar.

5.5 Cuando se hayan transferido todos los lisados de la muestra, repita los pasos 5.1 y 5.3 para transferir 20 µL de lisado NC a un Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen.

5.6 Transfiera **20 µL del lisado NC a un tubo de Control de Reactivos Neogen**. Dispense en un ángulo que evite movimientos en las perlas. Mezcle pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.

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



7. Revise y confirme la serie 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 75 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 dejándolos inmersos 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 la contaminación cruzada, nunca abra los tubos de reactivo que contengan ADN amplificado para el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen. Esto incluye un Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen, el Control de Reactivos Neogen y los Tubos de Control de Matriz para Detección Molecular Neogen. Siempre deseche los tubos contaminados dejándolos inmersos 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.

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 se codifican por 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.

Las muestras con resultados presuntamente positivos deben confirmarse según 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 al secundario (si corresponde), seguido del posterior sembrado en placa y la confirmación de aislados, mediante métodos bioquímicos y serológicos apropiados.

NOTA: Incluso una muestra negativa no arrojará una lectura de cero, ya que los reactivos de amplificación del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen tienen una lectura de unidades relativas de luz de fondo (RLU).

En el raro caso de que haya una interrupción inusual del suministro eléctrico, el algoritmo lo señalará como “Inspeccionar”. Neogen recomienda al usuario repetir el ensayo para aquellas muestras etiquetadas como Inspeccionar. Si el resultado sigue siendo Inspeccionar, continúe con la prueba de confirmación usando su método preferido o según se especifique en las reglamentaciones locales.

Tabla 5: Símbolos de los resultados para las muestras y su interpretación, según se proporcionan por el software del Sistema de Detección Molecular Neogen.

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.

Confirmación de los resultados según el Método Certificado de NF VALIDATION

En el contexto de NF VALIDATION, todas las muestras identificadas como positivas por el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen deben ser confirmadas mediante una de las siguientes pruebas:

Opción 1: Mediante la norma ISO 11290-1⁽³⁾ a partir del enriquecimiento de Caldo Demi Fraser.

Opción 2: Mediante el aislamiento en agar PALCAM o en agar cromogénico que forman parte de un método certificado NF VALIDATION para la detección del gen de *Listeria*. La presencia de colonias características es suficiente para confirmar la presencia de la especie *Listeria*.

Opción 3: Mediante uso de sondas de ácido nucleico, tal como se describe en la norma ISO 7218⁽⁵⁾, en colonias aisladas de agar selectivo (consulte las Opciones 1 o 2).

Opción 4: Mediante el empleo de cualquier otro método certificado por NF VALIDATION, cuyo principio debe ser diferente del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen. Se debe utilizar el protocolo completo descrito para este segundo método validado. Todos los pasos previos al comienzo de la confirmación deben ser comunes para ambos métodos.

En caso de que haya resultados discordantes (presuntamente positivos con el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* Neogen, no confirmados por alguno de los medios descritos anteriormente) el laboratorio debe seguir los pasos necesarios para garantizar la validez de los resultados obtenidos.

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.

Apéndice A. Interrupción por protocolo: Almacenamiento y repetición de pruebas de lisados tratados térmicamente. El almacenamiento de los lisados entre 2° C y 8° C durante 72 horas no se aplica a las muestras lácteas y ambientales.

1. Para almacenar un lisado tratado térmicamente, vuelva a tapar el tubo de lisis con una tapa limpia (consulte “Lisis”, sección 4.5)
2. Almacene entre 2 °C y 8 °C durante hasta 72 horas.
3. Prepare la muestra almacenada para amplificación invirtiéndola 2 a 3 veces para mezclar.
4. Destape los tubos.
5. 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.
6. Retire la gradilla de tubos de Solución de Lisis Neogen del bloque de calor 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 durante un máximo de 10 minutos.
7. Siga el protocolo en la sección “Amplificación” que se detalla arriba.

Referencias:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. October 31, 2017.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.11. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, ready-to-eat siluriformes (fish) and egg products, and environmental samples. January 2, 2019.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. – Part 1: Detection method.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of the food chain – Horizontal methods for surface sampling.
8. NF EN ISO 16140-2 Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
9. NF EN ISO 6887. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Explicación de los Símbolos de la Etiqueta del Producto

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.

FS00868A