

Instrucciones del producto

Kit Neogen de Ensayo de Detección Molecular 2Q - Quantificación de *Salmonella*

Descripción del producto y uso previsto

El kit de ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* de Neogen® (MDA2QSAL96) se emplea en conjunto con los medios de cultivo deshidratados para enriquecimiento rápido en pruebas cuantitativas (QRED500) de Neogen®, así como con el sistema de detección molecular para cuantificación rápida de *Salmonella* de Neogen®, en soluciones de enjuague enriquecidos de caparazón de pollo y en muestras de carne molida de aves de corral cruda. El kit de ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* de Neogen® y una aplicación modelo a la que se accede a través del software del sistema de detección molecular de Neogen®. El resultado obtenido en el software del sistema de detección molecular de Neogen® se utiliza para evaluar la cantidad de *Salmonella* en soluciones de enjuague enriquecidos de caparazón de pollo y matrices de carne molida de aves de corral cruda.

Los ensayos usan amplificación isotérmica mediada por bucle para amplificar rápidamente secuencias de ácido nucleico con especificidad y sensibilidad altas, combinados con bioluminiscencia para detectar la amplificación. Los presuntos resultados positivos se informan en tiempo real. Una vez finalizado el ensayo, aquellos resultados que se encuentren por debajo del límite de detección se muestran como negativos. Los resultados positivos presuntos se deberían confirmar mediante su método de preferencia o según lo especifiquen las regulaciones locales^(1, 2, 3).

El ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* está diseñado para que lo utilicen profesionales capacitados en técnicas de laboratorio en un entorno de laboratorio. Neogen no ha documentado el uso de este producto en otras industrias que no sean de alimentos o bebidas. Por ejemplo, Neogen no ha documentado este producto para analizar muestras farmacéuticas, cosméticas, clínicas ni veterinarias. El ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* de Neogen no se ha evaluado con todos los productos alimenticios, procesos alimentarios y protocolos de prueba posibles ni con todas las cepas posibles de bacterias. Al igual que con todos los métodos de prueba, la fuente, la formulación y la calidad del medio de enriquecimiento pueden ejercer cierta influencia en los resultados. Algunos factores, por ejemplo, los métodos de muestreo, los protocolos de prueba, la preparación de la muestra, la manipulación y la técnica de laboratorio, pueden además ejercer cierta influencia en los resultados. Neogen recomienda la evaluación del método incluido el medio de enriquecimiento en el entorno del usuario. Para ello, se recomienda el uso de un número suficiente de muestras con alimentos y desafíos microbianos particulares, a fin de garantizar que el método cumpla con los criterios del usuario.

Neogen ha evaluado el ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* con agua con peptona tamponada (Buffered Peptone Water, BPW) de Neogen®, agua con peptona tamponada neutralizante (Neutralizing Buffered Peptone Water, nBPW) de Neogen® y con los medios de cultivo deshidratados para enriquecimiento rápido en pruebas cuantitativas (QRED500) de Neogen.

El instrumento de detección molecular de Neogen está previsto para su uso con muestras que se han sometido a tratamiento de calor durante el paso de lisis del ensayo, que está diseñado para destruir organismos presentes en la muestra.

Las muestras que no se hayan tratado con calor de forma adecuada durante el paso de lisis del ensayo podrían considerarse un riesgo biológico potencial y NO deberían introducirse en el instrumento de detección molecular de Neogen.

Neogen Food Safety cuenta con certificación ISO 9001 de la Organización Internacional de Normalización (International Organization for Standardization, ISO) para diseño y fabricación.

El kit de prueba del ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* de Neogen incluye 96 pruebas, que se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Componentes del kit

Artículo	Identificación	Cantidad	Contenido	Comentarios
Tubos de solución de lisis (LS)	Solución rosa en tubos transparentes	96 (12 tiras de 8 tubos)	580 µl de LS por tubo	Separado y listo para usar
Prueba cuantitativa para la detección de <i>Salmonella</i>	Tubos de color verde	96 (12 tiras de 8 tubos)	Mezcla para amplificación y detección específica liofilizada	Listo para usar
Tubos de reactivos	Tubos de color verde	96 (12 tiras de 8 tubos)		Listo para usar
Tapas adicionales	Tapas de color verde	96 (12 tiras de 8 tapas)		Listo para usar
Control de reactivos (RC)	Tubos transparentes con tapa abatible	16 (2 sobres de 8 tubos individuales)	ADN de control liofilizado, mezcla para amplificación y detección	Listo para usar

El control negativo, que no se proporciona en el kit, es un medio estéril de enriquecimiento, p. ej., nBPW o QRED500. No use agua como control negativo.

Seguridad

El usuario debe leer, comprender y seguir toda la información de seguridad que aparecen en las instrucciones para el sistema de detección molecular de Neogen y el ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* de Neogen. Guarde estas instrucciones de seguridad para consultas futuras.

ADVERTENCIA:	Indica una situación peligrosa que, si no se evita, podría provocar la muerte o lesiones graves o daños a la propiedad.
PRECAUCIÓN:	Indica una situación peligrosa que, si no se evita, podría provocar lesiones leves o moderadas o daños a la propiedad.
AVISO:	Indica una situación potencialmente peligrosa que, si no se evita, podría provocar daños a la propiedad.

ADVERTENCIA

En el protocolo correspondiente al ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella*, NO se incluyen puntos de interrupción. Una vez que la muestra se encuentre enriquecida, se debe analizar por completo (consulte los protocolos disponibles en la tabla 2).

No utilice el ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* de Neogen para fines de diagnóstico de afecciones en humanos o animales.

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

A fin de reducir los riesgos relacionados con un resultado por debajo del límite de cuantificación (LC) que produce la liberación de producto contaminado, siga estas recomendaciones:

- No interprete los resultados por debajo del LC del ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* de Neogen como un resultado negativo para *Salmonella*. Los resultados por debajo del LC no indican la ausencia absoluta de *Salmonella*; indica únicamente que el nivel de *Salmonella*, si se detecta alguno, se encuentra por debajo del LC para este método.
- Siga el protocolo y realice las pruebas exactamente como se indique en las instrucciones del producto.
- Use siempre una micropipeta calibrada.
- Use el ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* de Neogen con alimentos que se hayan validado internamente o mediante un tercero.
- Almacene el ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* de Neogen según se indica en el paquete y en las instrucciones del producto.

- Siempre use el ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* de Neogen antes de la fecha de vencimiento.
- No use los enriquecimientos de muestra que se describen en estas instrucciones del producto del ensayo de detección molecular 2 de Neogen®, ensayo de detección **CUALITATIVA** de *Salmonella* (MDA2SAL96). Los enriquecimientos incluidos en estas instrucciones del producto se desarrollaron específicamente para este ensayo **CUANTITATIVO**.

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

- Realice pruebas de patógenos en un laboratorio debidamente equipado y bajo el control de personal capacitado. Los medios de enriquecimiento incubados y los equipos o superficies que han entrado en contacto con esos medios pueden contener patógenos en niveles suficientes para causar riesgos para la salud humana.
- En este procedimiento, se usan o detectan microorganismos patógenos o sus productos metabólicos relacionados que se encuentren por debajo de un determinado nivel. Se debe tener cuidado para evitar la ingestión o inhalación de aerosoles potencialmente infecciosos o el contacto con la piel. Siempre siga las prácticas de laboratorio estándar, incluido el uso de ropa de protección y protección ocular adecuadas mientras manipula reactivos y muestras contaminadas.
- Evite el contacto con el contenido de los medios de enriquecimiento y los tubos de reactivos después de la amplificación.
- Deseche las muestras enriquecidas de acuerdo con los estándares actuales de la industria.
- Las muestras que no se hayan tratado con calor de forma adecuada durante el paso de lisis del ensayo podrían considerarse un riesgo biológico potencial y NO deberían introducirse en el instrumento de detección molecular de Neogen.
- Para reducir los riesgos asociados con la contaminación cruzada mientras prepara el ensayo:
- Siempre use guantes (para proteger al usuario y evitar el ingreso de nucleasas).

Para reducir los riesgos asociados con la contaminación ambiental:

Siga los estándares actuales de la industria para la eliminación de desechos contaminados.

PRECAUCIÓN

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

- No supere el ajuste de temperatura recomendado en el calentador.
- No supere el tiempo de calentamiento recomendado.

Use un termómetro calibrado adecuado para verificar la temperatura del inserto del bloque de calentamiento para detección molecular de Neogen® (p. ej., un termómetro de inmersión parcial o termómetro termocupla digital, no un termómetro de inmersión total). El termómetro se debe colocar en la ubicación designada en el inserto del bloque de calentamiento para la detección molecular de Neogen.

AVISO

Para reducir los riesgos asociados con la contaminación cruzada mientras prepara el ensayo:

- Cámbiese los guantes antes de la hidratación de los gránulos de reactivos.
- Se recomienda el uso de puntas de pipeta de grado biológico molecular con barrera de aerosol (filtrada) estéril.
- Use una punta de pipeta nueva para cada transferencia de muestra.
- Durante los pasos del proceso de centrifugación, así como para transferir la muestra de enriquecimiento al tubo de lisis, siga las prácticas óptimas de laboratorio. Para evitar la contaminación del pipeteador, el usuario puede optar por añadir un paso de transferencia intermedio. Por ejemplo, el usuario puede transferir cada muestra enriquecida en un tubo estéril.
- Use una estación de trabajo de biología molecular con lámpara germicida cuando esté disponible. Descontamine periódicamente mesas y equipo de laboratorio (pipetas, herramientas de encapuchado/desencapuchado, etc.) con una solución de cloro de uso doméstico del 1 y el 5 % (v:v en agua) o una solución de extracción de ADN.

Para reducir los riesgos asociados con un resultado falso positivo:

- Nunca abra tubos después de la amplificación.
- Siempre deseche los tubos contaminados remojándolos en una solución de cloro de uso doméstico entre el 1 % y el 5 % (v:v en agua) durante una hora y alejado del área de preparación del ensayo.
- Nunca ponga autoclave a los tubos de reactivos después de la amplificación.
- Use siempre una micropipeta calibrada.

Consulte la ficha de datos de seguridad para obtener información adicional y conocer las regulaciones locales para el desecho.

Si tiene alguna duda acerca de aplicaciones o procedimientos específicos, visite nuestro sitio web neogen.com, o bien póngase en contacto con el representante o distribuidor autorizado de Neogen más cercano.

Responsabilidad del usuario

Los usuarios son responsables de conocer al detalle las instrucciones y la información del producto. Visite nuestro sitio web neogen.com, o bien póngase en contacto con el representante o distribuidor autorizado de Neogen más cercano, a fin de obtener más información.

Al seleccionar un método de prueba, es importante reconocer que hay factores externos, por ejemplo, los métodos de muestreo, los protocolos de prueba, la preparación de muestras, la manipulación, la técnica de laboratorio y la muestra en sí, que pueden ejercer cierta influencia en los resultados.

A la hora de seleccionar cualquier metodología de prueba o producto, es responsabilidad del usuario evaluar una cantidad suficiente de muestras con las matrices y las pruebas de exposición a microbios adecuadas para asegurarse de que la metodología de prueba elegido cumple sus criterios.

También es responsabilidad del usuario determinar que los métodos y resultados de las pruebas 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 la calidad de las matrices o procesos probados.

Para ayudar a los clientes a evaluar el método de diversas matrices alimentarias, Neogen ha desarrollado el kit de control de matriz para la detección molecular de Neogen®. Cuando sea necesario, use el control de matriz (CM) para determinar si la matriz tiene la capacidad de afectar los resultados del ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* de Neogen. Pruebe varias muestras, representativas de la matriz, es decir, muestras obtenidas de distinto origen, durante cualquier periodo de validación cuando adopte el método de Neogen o cuando pruebe matrices nuevas o desconocidas que se hayan sometido a cambios de materia prima o proceso.

Se puede definir a una matriz como un tipo de producto con propiedades intrínsecas, tales como composición y proceso. Las diferencias entre matrices pueden ser tan simples como los efectos ocasionados por diferencias en su procesamiento o presentación. Por ejemplo, crudo frente a pasteurizado, fresco frente a seco, etc.

Limitación de garantías / Recurso limitado

A EXCEPCIÓN DE LO ESTABLECIDO EXPRESAMENTE EN UNA SECCIÓN DE GARANTÍA LIMITADA DE EMPAQUE DE PRODUCTO INDIVIDUAL, NEOGEN RENUNCIA A TODAS LAS GARANTÍAS EXPRESAS E IMPLÍCITAS, QUE INCLUYE, ENTRE OTRAS, CUALQUIER GARANTÍA DE COMERCIALIZACIÓN O APTITUD PARA UN USO EN PARTICULAR. Si algún producto de Neogen Food Safety es defectuoso, Neogen o su distribuidor autorizado, a su elección, reemplazará o reembolsará el precio de compra del producto. Estos son sus remedios exclusivos. Debe notificar de inmediato a Neogen dentro de los sesenta días posteriores al descubrimiento de cualquier defecto sospechoso en un producto y devolverlo a Neogen. Póngase en contacto con su representante de Neogen Food Safety o distribuidor autorizado de Neogen si tuviera cualquier otra pregunta.

Limitación de responsabilidad de Neogen

NEOGEN NO SE HACE RESPONSABLE DE LA PÉRDIDA O LOS DAÑOS DE NINGÚN TIPO, YA SEA DAÑO DIRECTO, INDIRECTO, ESPECIAL, INCIDENTAL O CONSECUENTE, QUE INCLUYE, ENTRE OTRAS, LA PÉRDIDA DE BENEFICIOS. En ningún caso la responsabilidad de Neogen bajo cualquier teoría legal excederá el precio de compra del producto presuntamente defectuoso.

Almacenamiento y desecho

Guarde los componentes del kit correspondiente al ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* de Neogen a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C. No se debe congelar. Mantenga el kit alejado de la luz durante el almacenamiento. Después de abrir el kit, compruebe que la bolsa de aluminio no esté dañada. Si está dañada, no la use. Después de abrirlos, los tubos de reactivos no utilizados siempre deben almacenarse en la bolsa resellable con el desecante en su interior para mantener la estabilidad de los reactivos liofilizados. Almacene las bolsas reselladas entre 2 y 8 °C durante no más de 60 días. No use el ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* de Neogen si se encuentra vencido. La fecha de vencimiento y el número de lote se indican en la etiqueta exterior de la caja. Después de su uso, el medio de enriquecimiento y los tubos del ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* de Neogen pueden contener materiales potencialmente patógenos. Una vez finalizadas las pruebas, siga los reglamentos locales para la eliminación de desechos contaminados. Para obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad de los materiales.

Instrucciones de uso

Siga todas las instrucciones con atención. De lo contrario, puede dar lugar a resultados inexactos.

Descontamine periódicamente mesas y equipo de laboratorio (pipetas, herramientas de encapuchado/desencapuchado, etc.) con una solución de cloro de uso doméstico del 1 y el 5 % (v:v en agua) o una solución de extracción de ADN.

El usuario debe completar la capacitación de calificación de operador (CO) del sistema de detección molecular de Neogen, según se describe en el documento “Protocolos e instrucciones de calificación de instalación (CI)/calificación operativa (CO) para el sistema de detección molecular de Neogen” ⁽⁶⁾.

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

Cuantificación de *Salmonella* en carne molida de aves de corral (pollo/pavo) cruda

1. Pese 325 g de carne molida de pollo o pavo cruda y colóquela en una bolsa estéril.
2. Añada 400 ml de agua con peptona tamponada (BPW).
3. Homogenice la preparación por completo; para ello, ejecute una agitación excéntrica a 180 rpm durante 1 minuto.
4. Transfiera 30 ml del homogeneizado de carne molida de pollo o pavo cruda a una bolsa de muestra.
5. Añada 30 ml de los medios de cultivo deshidratados para enriquecimiento rápido en pruebas cuantitativas (QRED500) de Neogen (consulte la Ficha de especificaciones técnicas para medios de cultivo deshidratados para enriquecimiento rápido en pruebas cuantitativas) ⁽⁷⁾. Este sistema de medios debe estar precalentado a 42 °C. En este punto, la solución se conoce como la “muestra”.
6. Incube la muestra de acuerdo con las condiciones de enriquecimiento que se detallan en la tabla 2.
7. Después del paso de enriquecimiento, retire la muestra de la incubadora y mezcle bien.
8. Inmediatamente después de mezclar, separe 1,5 ml de la muestra en un tubo de microcentrífuga de 2 ml con fondo cónico.
9. Centrifugue en una minicentrífuga a 7000 x g durante 5 minutos para sedimentar el material particulado.
10. Deseche con cuidado el sobrenadante, a fin de no alterar el material sedimentado. Con suavidad y cuidado, invierta el tubo y golpee con el dedo la toalla de papel para eliminar cualquier resto de sobrenadante.
11. Vuelva a suspender el material sedimentado en 300 µl de QRED500.
12. Ejecute una agitación excéntrica hasta que el material sedimentado se vuelva a suspender en el QRED500.
13. Con el ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* de Neogen, analice 50 µl de la muestra de material sedimentado resuspendido (a partir de 12).

Cuantificación de *Salmonella* en soluciones de enjuague enriquecidos de caparazón de pollo

1. Coloque un caparazón de pollo en una bolsa estéril de enjuague para aves de corral.
2. Añada 400 ml de agua de peptona tamponada neutralizante (nBPW) o agua de peptona tamponada (BPW) de Neogen a través de la pieza en canal de pollo (consulte la tabla 2).

3. Mezcle el contenido durante 1 minuto para enjuagar el caparazón.
4. Transfiera 30 ml de la solución de enjuague a una bolsa de muestra.
5. Añada 30 ml de los medios de cultivo deshidratados para enriquecimiento rápido en pruebas cuantitativas (QRED500) de Neogen (consulte la Ficha de especificaciones técnicas para medios de cultivo deshidratados para enriquecimiento rápido en pruebas cuantitativas)(6). Este sistema de medios debe estar precalentado a 42 °C. En este punto, la solución se conoce como la *muestra*.
6. Incube la muestra de acuerdo con las condiciones de enriquecimiento que se detallan en la tabla 2.
7. Después del paso de enriquecimiento, retire la muestra de la incubadora y mezcle bien.
8. Inmediatamente después de mezclar, separe 1,5 ml de la muestra en un tubo de microcentrífuga de 2 ml con fondo cónico.
9. Centrifugue en una minicentrífuga a 5000 x g durante 5 minutos para sedimentar el material particulado.
10. Deseche con cuidado el sobrenadante, a fin de no alterar el material sedimentado. Con suavidad y cuidado, invierta el tubo y golpee con el dedo la toalla de papel para eliminar cualquier resto de sobrenadante.
11. Vuelva a suspender el material sedimentado en 100 µl (microlitros) de QRED500.
12. Ejecute una agitación excéntrica hasta que el material sedimentado se vuelva a suspender en el QRED500.
13. Con el ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* de Neogen, analice 50 µl de la muestra de material sedimentado resuspendido (a partir de 12).

En la tabla 2, se ofrece orientación para los protocolos generales de enriquecimiento aplicables a soluciones de enjuague enriquecidos de caparazón de pollo y en muestras de carne molida de aves de corral cruda. Es responsabilidad del usuario validar protocolos alternativos de muestreo o índices de dilución a fin de garantizar que este método de prueba cumple con sus criterios.

Tabla 2. Protocolos generales de enriquecimiento.

Matriz de muestra	Tamaño de muestra	Homogeneización (primer paso)	Enriquecimiento	Temp. de enriquecimiento	Tiempo de enriquecimiento	Resuspensión del material particulado	Volumen de análisis de muestras ^(a)
Carne molida de pollo cruda	325 g	400 ml BPW	30 ml de homogeneizado + 30 ml de QRED	42 °C, ±1 °C	6 horas	300 µL	50 µL
Carne molida de pavo cruda	325 g	400 ml BPW	30 ml de homogeneizado + 30 ml de QRED	42 °C, ±1 °C	5 horas	300 µL	50 µL
Solución de enjuague de caparazón de pollo	30 ml	400 ml nBPW	30 ml de la solución de enjuague nBPW + 30 ml de QRED	42 °C, ±1 °C	6 horas	100 µL	50 µL
Solución de enjuague de caparazón de pollo	30 ml	400 ml BPW	30 ml de la solución de enjuague + 30 ml de QRED	42 °C, ±1 °C	5 horas	100 µL	50 µL

(a) Volumen de muestra transferida a tubos de solución de lisis. Consulte el paso 4.5 de la sección Lisis.

Preparación de la bandeja de carga rápida para la detección molecular de Neogen®

1. Humedezca un paño o una toalla descartable con una solución de cloro de uso doméstico del 1 % al 5 % (v:v en agua) y enjuague la bandeja de carga rápida para la detección molecular de Neogen.
2. Enjuague con agua la bandeja de carga rápida para la detección molecular de Neogen.
3. Use una toalla descartable para secar la bandeja de carga rápida para la detección molecular de Neogen.
4. Asegúrese de que la bandeja de carga rápida para la detección molecular de Neogen esté seca antes de usarla.

Preparación del inserto del bloque de enfriamiento para la detección molecular de Neogen®

Coloque el inserto del bloque de enfriamiento para la detección molecular de Neogen directamente sobre una mesa de laboratorio. Utilice el bloque a temperatura ambiente del laboratorio (entre 20 °C y 25 °C).

Preparación del inserto del bloque de calentamiento para la detección molecular de Neogen®

Coloque el inserto del bloque de calentamiento para la detección molecular de Neogen en una unidad doble de bloque de calentamiento seco. Encienda la unidad del bloque de calentamiento seco y ajuste la temperatura para permitir que el inserto del bloque de calentamiento para la detección molecular de Neogen alcance y mantenga una temperatura de 100 ±1 °C.

NOTA: Según la unidad de calentamiento, espere unos 30 minutos para que el inserto del bloque de calentamiento para detección molecular de Neogen alcance la temperatura. Con un termómetro calibrado adecuado (p. ej., un termómetro de inmersión parcial o termómetro termocupla digital, no un termómetro de inmersión total) colocado en la ubicación designada, verifique que el inserto del bloque de calentamiento para detección molecular de Neogen esté a 100 ±1 °C.

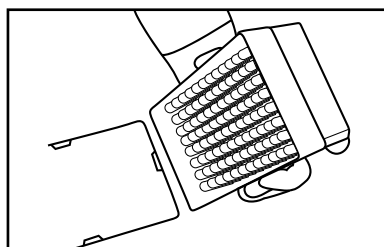
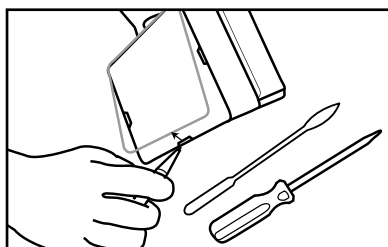
Preparación del instrumento de detección molecular de Neogen

1. Inicie el software de detección molecular de Neogen e inicie sesión. Póngase en contacto con el representante de Neogen Food Safety más cercano, a fin de garantizar que tenga la versión más actualizada del software. La última versión incluye el ensayo cuantitativo.
2. Encienda el instrumento de detección molecular de Neogen.
3. Cree o edite una ejecución con datos para cada muestra. Para obtener más información detallada, consulte el Manual del usuario del sistema de detección molecular de Neogen y el Boletín técnico del software MDA2QSAL96.

NOTA: El instrumento de detección molecular de Neogen debe alcanzar y mantener una temperatura de 60 °C antes de insertar la bandeja de carga rápida para detección molecular de Neogen con tubos de reacción. Este paso de calentamiento dura cerca de 20 minutos y se indica con una luz NARANJA en la barra de estado del instrumento. Cuando el instrumento esté listo para iniciar una ejecución, la barra de estado será VERDE.

Lisis

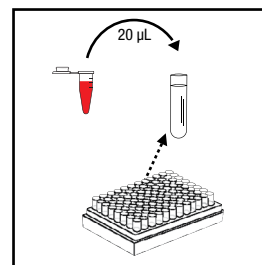
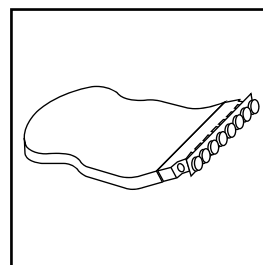
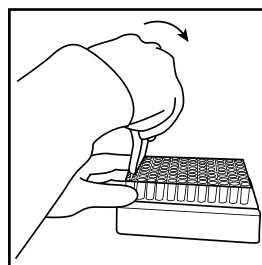
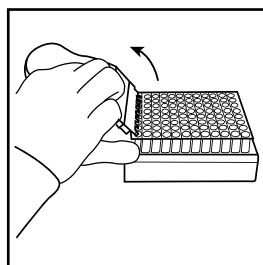
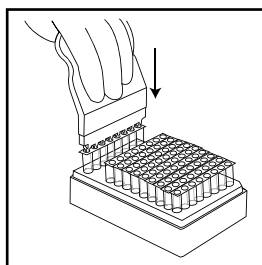
1. Retire la parte inferior de la gradilla de solución de lisis (Lysis Solution, LS) de Neogen con un destornillador o una espátula antes de colocarla en el inserto de bloque de calor de detección molecular de Neogen.



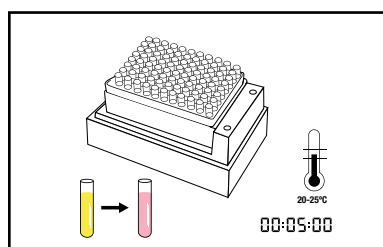
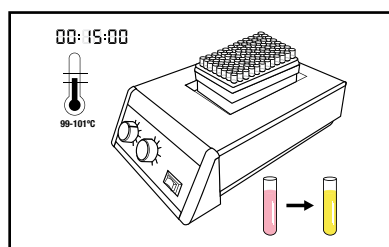
2. Deje que los tubos de la LS de Neogen se calienten. Para ello, colóquelos en una rejilla a temperatura ambiente (entre 20 °C y 25 °C) durante la noche (entre 16 y 18 horas). Las alternativas para equilibrar los tubos de LS a temperatura ambiente consisten en poner los tubos sobre un banco de laboratorio durante al menos 2 horas, incubar los tubos de LS en una incubadora a 37 °C, ± 1 °C, durante 1 hora, o bien colocarlos en un bloque de calentamiento seco doble durante 30 segundos a 100 °C.
3. Invierta los tubos tapados para mezclar. Continúe con el siguiente paso dentro de las 4 horas.
4. Se requiere un tubo de LS para cada muestra y la muestra de control negativo (NC) (medio de enriquecimiento estéril).
 - 4.1 Las tiras de tubo de LS se pueden cortar según la cantidad de tubos deseada. Seleccione la cantidad de tubos individuales de LS o tiras de 8 tubos necesarios. Coloque los tubos de LS en una rejilla vacía.
 - 4.2 Use la herramienta de encapuchado o desencapuchado de detección molecular de Neogen® para destapar una tira de tubo de solución de LS, una tira a la vez.
 - 4.3 Para evitar la contaminación cruzada, destape una tira de tubos de LS a la vez y use una nueva punta de pipeta para cada paso de transferencia.
 - 4.4 Deseche la tapa del tubo de LS.
 - 4.5 Transfiera 50 μ l de la muestra de material particulado resuspendido a un tubo de LS.

En primer lugar, transfiera 50 μ l de cada muestra material particulado resuspendido a un tubo de LS. Transfiera el NC al final.

5. Repita los pasos 2 a 5 hasta que cada muestra individual se haya agregado a un tubo de LS correspondiente en la tira.



6. Repita los pasos 1 a 5 según sea necesario, para la cantidad de muestras que se probarán.
7. Cuando se hayan transferido todas las muestras, transfiera 50 μ l de NC (medio estéril QRED500) a un tubo de LS. No use agua como NC.
8. Verifique que la temperatura del inserto de bloque de calentamiento para detección molecular de Neogen sea de 100 ± 1 °C.
9. Coloque la gradilla destapada de tubos de LS en el inserto del bloque de calentamiento para detección molecular y caliente durante 15 ± 1 minutos. Durante el calentamiento, la solución de LS cambiará de rosa (frío) a amarillo (caliente). Las muestras que no se hayan tratado con calor de forma adecuada durante el paso de lisis del ensayo podrían considerarse un riesgo biológico potencial y NO deberían introducirse en el instrumento de detección molecular de Neogen.
10. Retire la gradilla destapada de los tubos de LS del bloque de calentamiento y deje que se enfríe en el inserto del bloque de enfriamiento para detección molecular de Neogen durante al menos 5 minutos y un máximo de 10 minutos. El inserto del bloque de enfriamiento molecular Neogen, utilizado a temperatura ambiente sin la bandeja de bloque de enfriamiento para detección molecular, debe colocarse directamente sobre la mesa del laboratorio. Cuando se enfríe, la solución de lisis volverá a tener un color rosado.
11. Retire la gradilla de los tubos de LS del inserto de bloque de enfriamiento para detección molecular de Neogen.

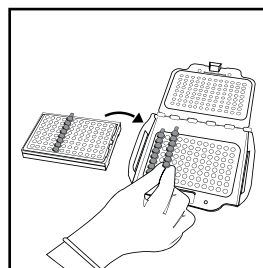
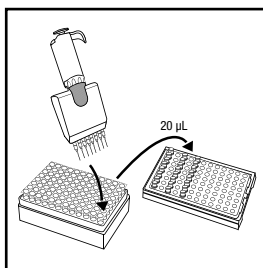
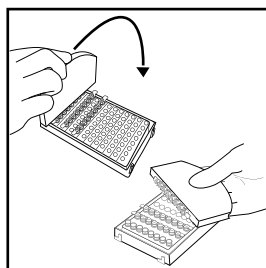


Amplificación

1. Se debe usar un ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* para cada muestra y el NC.
 - 1.1 Las tiras de tubo de reactivos se pueden cortar según la cantidad de tubos deseada. Seleccione la cantidad de tubos individuales de reactivos o tiras de 8 tubos necesarios.
 - 1.2 Coloque los tubos de reactivos en una rejilla vacía.
 - 1.3 Evite tocar los pellets del reactivo de la parte inferior de los tubos.
2. Seleccione un tubo de control de reactivo (RC) y colóquelo en la gradilla.
3. Para evitar la contaminación cruzada, destape una tira de tubos de reactivos a la vez y use una nueva punta de pipeta para cada paso de transferencia.
4. Transfiera cada uno de los lisados, como se describe a continuación:

En primer lugar, transfiera 20 µl de cada muestra de lisado a tubos de reactivos individuales, seguido del NC. Hidrate el tubo de RC al final del proceso.

5. Use la herramienta de encapuchado/desencapuchado para reactivos de detección molecular de Neogen para destapar el tubo de reactivos del ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella*, una tira de tubo a la vez. Deseche la tapa.
 - 5.1 Transfiera 20 µl de lisado de muestra desde la mitad superior del líquido (evitar precipitado) en el tubo de solución de lisis Neogen en el tubo de reactivos pertinente. Distribuya en ángulo para evitar tocar los pellets. Mezcle suavemente aspirando y expulsando el líquido con la pipeta 5 veces.
 - 5.2 Repita el paso 5.1 hasta que todas las muestras individuales de lisados se hayan agregado a un tubo de reactivos pertinente del ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* en la tira.
 - 5.3 Cubra los tubos de reactivos del ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* con las tapas extras provistas y use el lado redondeado de la herramienta de encapuchado/desencapuchado para reactivos de detección molecular a fin de aplicar presión en un movimiento hacia adelante y hacia atrás, asegurándose de que la tapa se coloque bien.
 - 5.4 Repita los pasos 5.1 a 5.3 según sea necesario, para la cantidad de muestras que se probarán.
 - 5.5 Cuando se hayan transferido todas las muestras de lisados, ejecute una agitación excéntrica en los tubos de reactivos tapados durante 2 segundos para mezclarlos; a continuación, centrifugue los tubos durante 10 segundos en una minicentrífuga, a fin de asegurarse de que todo el líquido se encuentre esté en el fondo del tubo.
 - 5.6 Transfiera 20 µl del lisado de NC a un tubo de reactivo pertinente del ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella* de Neogen y, a continuación, otros 20 µl de lisado de NC a un tubo de RC. Distribuya en ángulo para evitar tocar los pellets. Mezcle suavemente aspirando y expulsando el líquido con la pipeta 5 veces.
6. Cargue los tubos tapados en una bandeja de carga rápida de detección molecular de Neogen limpia y descontaminada. Cierre bien la tapa de la bandeja de carga rápida para la detección molecular de Neogen.



7. Revise y confirme la ejecución configurada en el software de detección molecular para ensayos cuantitativos de Neogen.
8. Haga clic en el botón Inicio del software y seleccione el instrumento que desea utilizar. La tapa del instrumento seleccionado se abrirá automáticamente.
9. Coloque la bandeja de carga rápida de detección molecular de Neogen en el instrumento de detección molecular de Neogen y cierre la tapa para iniciar el ensayo. Los resultados se proporcionan en 60 minutos, aunque los positivos pueden detectarse antes.

10. Una vez que el ensayo esté completo, quite la bandeja de carga rápida de detección molecular de Neogen del instrumento de detección molecular y deseche los tubos al remojar en una solución de cloro de uso doméstico del 1 y el 5 % (v:v en agua) durante 1 hora y alejado del área de preparación del ensayo.

AVISO: Para reducir al mínimo el riesgo de falsos positivos debido a la contaminación cruzada, nunca abra los tubos de reactivos que contienen ADN amplificado. Esto incluye el tubo de reactivos y los tubos de control de matrices Neogen para control de reactivos del ensayo de detección molecular 2Q cuantitativo para la detección de *Salmonella*. Siempre deseche los tubos de reactivos sellados al remojar en una solución de cloro de uso doméstico del 1 y el 5 % (v:v en agua) durante 1 hora y alejado del área de preparación del ensayo.

Resultados e interpretación

Los resultados se determinan mediante el análisis de una serie de parámetros de curva únicos mediante el uso del software.

Referencias:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Capítulo 5: *Salmonella*, versión de septiembre de 2023.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 4.14. Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, Carcass, and Environmental Sponges. Fecha de vigencia: 5 de junio de 2023.
3. ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuff – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. Neogen Quantitative Rapid Enrichment Dehydrated Media (QRED500) Technical Specification Sheet.

Explicación de los símbolos

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 EE. UU.

neogen.com

Neogen Europe Ltd.

The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Escocia, Reino Unido

Neogen Ireland, Ltd.

Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Irlanda

