

Instrucciones del producto

Ensayo de Detección Molecular 2 Neogen® - Kit de detección de *Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium

Descripción del producto y uso previsto

El ensayo de Detección Molecular 2 Neogen® – kit de *Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium se usa con el sistema de Detección Molecular Neogen® para la detección rápida y específica de dos subtipos de *Salmonella*, *Salmonella* enterica subsp. *enterica* serotipo Enteritidis (SE) y *Salmonella* enterica subsp. *enterica* serotipo Typhimurium (incluidas las variantes monofásicas (ST), en muestras enriquecidas avícolas y avícolas-relacionadas. El kit de detección contiene dos tubos de reactivos separados, uno para detectar cepas del serotipo SE y el otro para detectar cepas del serotipo ST. El software de Detección Molecular de Neogen® informa resultados por separado para cada uno de los ensayos.

Los ensayos usan amplificación isotérmica tipo LAMP (por sus siglas en inglés) para amplificar rápidamente secuencias de ácido nucleico con alta especificidad y sensibilidad, combinados con bioluminiscencia para detectar la amplificación. Los resultados presuntamente positivos se reportan en tiempo real, mientras que los resultados negativos se revelan una vez finalizado el ensayo. Los resultados presuntamente positivos se deben confirmar mediante su método de preferencia o según lo especifiquen las regulaciones locales^(1, 2, 3).

El ensayo de Detección Molecular 2 de Neogen® – *Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium 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 o veterinarias. El ensayo de Detección Molecular 2 de Neogen® – *Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium no se ha evaluado con todos los posibles productos alimenticios, procesos o protocolos de prueba, ni con todas las cepas posibles de bacteria. **Al igual que con todos los métodos de prueba, el origen, la formulación y la calidad del medio de enriquecimiento pueden influir en los resultados.** Factores como los métodos de muestreo, los protocolos de prueba, la preparación de la muestra, la manipulación y la técnica de laboratorio también pueden influir en los resultados. Neogen recomienda la evaluación del método incluido el medio de enriquecimiento en el entorno del usuario usando un número suficiente de muestras con alimentos particulares y desafíos microbianos a fin de garantizar que el método cumple con los criterios del usuario.

Neogen ha evaluado el ensayo de Detección Molecular 2 Neogen – *Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium con Agua Peptonada Tamponada^(1,2) y Agua Peptonada Tamponada ISO⁽³⁾.

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

El ensayo de Detección Molecular 2 Neogen® – kit de prueba para *Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium contiene 48 pruebas de cada reactivo para SE y ST, descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Componentes del kit

Artículo	Identificación	Cantidad	Contenido	Comentarios
Tubos de solución de lisis (LS)	Solución rosada en tubos transparentes	96 (12 tiras de 8 tubos)	580 µL de LS por tubo	Separado y listo para usar
Tubos de reactivos para <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE)	Tubos beige	48 (2 sobres; cada uno contiene 3 tiras de 8 tubos)	Mezcla para amplificación y detección específica liofilizada	Listo para usar
Tubos de reactivos para <i>Salmonella</i> Typhimurium (ST)	Tubos grises	48 (2 sobres; cada uno contiene 3 tiras de 8 tubos)	Mezcla para amplificación y detección específica liofilizada	Listo para usar
Tapas adicionales	Tapas beige	96 (12 tiras de 8 tapas)		Listo para usar
Tapas adicionales	Tapas grises	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 provee en el kit, es un medio de enriquecimiento estéril, p. ej. BPW o BPW ISO. No use agua como control negativo.

Seguridad

El usuario debe leer, comprender y seguir toda la información de seguridad que figura en las instrucciones para el sistema de Detección Molecular de Neogen® y el ensayo de Detección Molecular 2 Neogen® – *Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium. Conserve las instrucciones de seguridad para referencias futuras.

⚠ ADVERTENCIA: Indica una situación peligrosa que, si no se evita, podría provocar la muerte o lesiones graves y/o daños a la propiedad.

⚠ PRECAUCIÓN: Indica una situación peligrosa que, si no se evita, podría provocar lesiones leves o moderadas y/o daños a la propiedad.

AVISO: Indica una situación potencialmente peligrosa que, si no se evita, podría provocar daños a la propiedad.

⚠ ADVERTENCIA

No use el ensayo de Detección Molecular 2 de Neogen® – *Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium en el diagnóstico de condiciones en seres 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⁾.

Para reducir los riesgos asociados con un resultado falso negativo que produce la liberación de producto contaminado:

- Siga el protocolo y realice las pruebas exactamente como se indique en las instrucciones del producto.
- Almacene el ensayo de Detección Molecular 2 de Neogen® – *Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium según se indica en el paquete y en las instrucciones del producto.
- Siempre use el ensayo de Detección Molecular 2 de Neogen® – *Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium por fecha de vencimiento.
- Use el ensayo de Detección Molecular 2 de Neogen – *Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium con alimentos que se hayan validado internamente o mediante un tercero.

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

- Realice pruebas de patógenos en un laboratorio debidamente equipado bajo el control de personal capacitado. Los medios de enriquecimiento incubados y los equipos o superficies que han entrado en contacto con dichos medios pueden contener patógenos en niveles suficientes para causar riesgos para la salud humana.
- Este procedimiento utiliza o detecta microorganismos patógenos y/o sus productos metabólicos. 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 la introducción 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 exceda el tiempo de calentamiento recomendado.
- Use un termómetro calibrado adecuado para verificar la temperatura del inserto del Bloque de Calentamiento para el Sistema de 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 el Sistema de 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 biología molecular con barrera de aerosol (con filtro) estéril.
- Use una punta de pipeta nueva para cada transferencia de muestra.
- Use las Buenas Prácticas de Laboratorio para transferir la muestra de enriquecimiento al tubo de lisis. Para evitar la contaminación de la pipeta, el usuario puede optar por añadir un paso de transferencia intermedio. Por ejemplo, el usuario puede transferir cada calidad para muestra enriquecida a un tubo estéril.
- Use una estación de trabajo de calidad para biología molecular con lámpara germicida cuando esté disponible. Descontamine periódicamente mesas y equipo de laboratorio (pipetas, herramientas para tapar/destapar, etc.) con una solución de cloro de uso doméstico al 1-5 % (v:v en agua) o solución para eliminación de ADN.

Para reducir los riesgos asociados con un resultado falso positivo:

- Nunca abra los tubos después de la amplificación.
 - Siempre deseche los tubos contaminados sumergiéndolos en una solución de cloro de uso doméstico al 1-5 % (v:v en agua) durante 1 hora y alejado del área de preparación del ensayo.
 - Nunca ponga en el autoclave a los tubos de reactivos después de la amplificación.
- Consulte la ficha de datos de seguridad para obtener información adicional y conocer las regulaciones locales para el desecho.

Si tiene preguntas sobre aplicaciones o procedimientos específicos, visite nuestro sitio web en www.neogen.com/foodsafety o comuníquese con su representante o distribuidor local de Neogen.

Responsabilidad del usuario

Los usuarios son responsables de familiarizarse con las instrucciones y la información del producto. Visite nuestro sitio web en www.neogen.com/foodsafety o comuníquese con su representante o distribuidor local de Neogen para obtener más información.

Al seleccionar un método de prueba, es importante reconocer que hay factores externos como los métodos de muestreo, los protocolos de prueba, la preparación de muestras, el manejo, la técnica de laboratorio y la muestra en sí que pueden influir en los resultados.

Al seleccionar cualquier método de prueba o producto, es responsabilidad del usuario evaluar una cantidad suficiente de muestras con retos microbianos y matrices adecuadas para satisfacerlo en cuanto a que el método de prueba elegido cumple con 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 (MC) para determinar si la matriz tiene la capacidad de afectar los resultados del ensayo de Detección Molecular 2 de Neogen – *Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium. 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

Almacene el ensayo de Detección Molecular 2 de Neogen® – *Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium a 2-8 °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 a 2-8 °C durante no más de 60 días. No use el ensayo de Detección Molecular 2 de Neogen® – *Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium después de su fecha de vencimiento. La fecha de vencimiento y el número de lote se indican en la etiqueta exterior de la caja. Luego de usar, el medio de enriquecimiento y los tubos del ensayo de Detección Molecular 2 de Neogen® – *Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium pueden contener potencialmente materiales patogénicos. Una vez finalizadas las pruebas, siga los estándares actuales de la industria para la eliminación de desechos contaminados. Consulte la ficha de datos de seguridad para obtener información adicional y conocer las regulaciones locales para el desecho.

Instrucciones de uso

Siga todas las instrucciones con atención. De lo contrario, los resultados obtenidos podrían llegar a ser incorrectos.

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

El usuario debería completar la capacitación de calificación de operador (OQ) del Sistema de Detección Molecular de Neogen®, según se describe en el documento “Protocolos de Calificación para la Instalación (IQ)/Calificación Operativa (OQ) para el Sistema de Detección Molecular de Neogen”⁽⁶⁾.

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

Tabla 3 para protocolos de enriquecimiento de acuerdo con el certificado N.º 122302 de AOAC® Performance TestedSM.

Enriquecimiento de muestras

En las Tablas 2 o 3, se presenta orientación para los protocolos de enriquecimiento de muestras avícolas o de muestras avícolas-relacionadas. 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.

Alimentos

1. Deje que el medio de enriquecimiento BPW o BPW ISO se equilibre con la temperatura ambiente del laboratorio. Ver Tabla 2 o 3.
2. Combine asépticamente el medio de enriquecimiento y la muestra. Para todas las muestras con alto contenido de partículas y carne, se recomienda el uso de bolsas con filtro.
3. Homogenice completamente en homogenizador peristáltico o licuadora, o bien mezcle la preparación manualmente durante 2 ± 0.2 minutos hasta que la suspensión de enriquecimiento sea homogénea.^(7,8) Para todas las muestras con alto contenido de partículas y carne, se recomienda el uso de bolsas con filtro. Incube como se indica en la tabla de protocolos correspondiente (ver Tabla 2 o 3).

Tabla 2. Protocolos de enriquecimiento general.

Matriz de muestra	Tamaño de muestra	Volumen de caldo de enriquecimiento	Temperatura de enriquecimiento	Tiempo de enriquecimiento (h)	Volumen de análisis de muestras ^(a)
Carne de ave molida cruda	325 g	1625 ml BPW	35 ± 2 °C	20 - 24	20 µL
Enjuague de carcasa de ave (400 ml de nBPW)	30 ml	30 ml BPW	35 ± 2 °C	20 - 24	20 µL
Carne de ave molida cruda	25 g	225 ml BPW ISO	41.5 ± 1 °C	18 - 24	20 µL
Carne de ave empanada cocida (nuggets de pollo)	25 g	225 ml BPW ISO	37 ± 1 °C	18 - 24	20 µL

(a) Volumen de muestra transferida a tubos de solución de lisis. Consulte el paso 5.6 de la sección Lisis.

Instrucciones específicas para métodos validados

Certificado N.º 122302 de AOAC® Performance TestedSM



En el programa del AOAC Research Institute PTMSM, el ensayo de detección molecular 2 de Neogen – kit para *Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium se descubrió que es un método eficaz para la detección de dos subtipos de *Salmonella*, *Salmonella* enterica subsp. *enterica* serotipo Enteritidis (SE) y *Salmonella* enterica subsp. *enterica* serotipo Typhimurium (incluida la variante monofásica 1,4,[5],12;i:-) (ST). En la tabla 3, se muestran las matrices que se probaron en el estudio.

Tabla 3. Protocolos de enriquecimiento de acuerdo con el certificado N.º 122302 de AOAC PTMSM.

Matriz de muestra	Tamaño de muestra	Volumen de caldo de enriquecimiento	Temperatura de enriquecimiento	Tiempo de enriquecimiento (h)	Volumen de análisis de muestras ^(a)
Carne de ave molida cruda	325 g	1625 ml BPW	35 ± 2 °C	20 - 24	20 µL
Enjuague de carcasa de ave (400 ml de nBPW)	30 ml	30 ml BPW	35 ± 2 °C	20 - 24	20 µL
Carne de ave molida cruda	25 g	225 ml BPW ISO	41.5 ± 1 °C	18 - 24	20 µL
Carne de ave empanada cocida (nuggets de pollo)	25 g	225 ml BPW ISO	37 ± 1 °C	18 - 24	20 µL

(a) Volumen de muestra transferida a tubos de solución de lisis. Consulte el paso 5.6 de la sección Lisis.

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

1. Humedezca un paño o una toalla descartable con una solución de cloro de uso doméstico al 1-5 % (v:v en agua) y enjuague la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular de Neogen.
2. Enjuague con agua la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular de Neogen.
3. Use una toalla descartable para secar la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular de Neogen.
4. Asegúrese de que la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular de Neogen esté seca antes de usarla.

Preparación del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular de Neogen®

Coloque el Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular de Neogen directamente sobre una mesa de laboratorio; no se utiliza la bandeja de Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular de Neogen. Utilice el bloque a temperatura ambiente del laboratorio (20-25 °C).

Preparación del Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular de Neogen®

Coloque el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular de Neogen en una unidad o plancha de calentamiento seco. Encienda la unidad del bloque de calentamiento seco y ajuste la temperatura para permitir que el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular de Neogen alcance y mantenga una temperatura de 100 ± 1 °C.

NOTA: Según la unidad de calentamiento, espere aproximadamente 30 minutos para que el Bloque de Calor para el Sistema de 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 Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular de Neogen esté a 100 ± 1 °C.

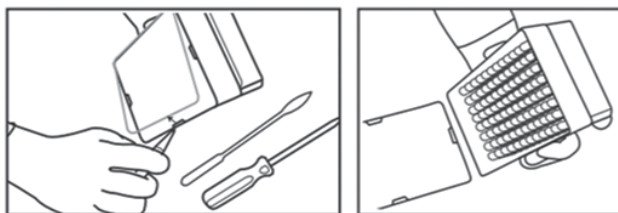
Preparación del Equipo de Detección Molecular de Neogen®

1. Inicie el software de Detección Molecular de Neogen® e inicie sesión. Comuníquese con su representante de Neogen Food Safety a fin de garantizar que tenga la versión más actualizada del software.
2. Encienda el Equipo de Detección Molecular de Neogen.
3. Cree o edite una ejecución con datos para cada muestra. Consulte el Manual del Usuario del Sistema de Detección Molecular de Neogen para obtener más detalles.
 - 3.1. Para la ejecución de los ensayos de SE y ST, seleccione el ícono de cada ensayo en el software para ejecutar los ensayos de cada muestra.
 - 3.2. Los ensayos de SE y ST también se pueden realizar por separado para cada muestra.
 - 3.3. Se configura NC para cada uno de los tubos de reactivo y se configura un RC para el kit.

NOTA: El Equipo 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 aproximadamente 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 para Solución de Lisis Neogen con un destornillador o una espátula antes de colocarla en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular de Neogen.



2. Deje que los tubos de LS se calienten colocando la gradilla a temperatura ambiente (20-25 °C) durante la noche (entre 16 y 18 horas). Las alternativas para equilibrar los tubos de LS a temperatura ambiente son poner los tubos sobre un banco de laboratorio durante al menos 2 horas, incubar los tubos de LS en una incubadora a 37 ± 1 °C durante 1 hora o 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. Retire el caldo de enriquecimiento de la incubadora.
5. Se requiere un tubo de LS para cada muestra y la muestra de control negativo (NC) (medio de enriquecimiento estéril).
 - 5.1 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.

5.2 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.

5.3 Transfiera la muestra enriquecida a los tubos LS como se describe a continuación:

Transfiera **primero** cada muestra enriquecida a un tubo individual de LS. Transfiera el NC al **final**.

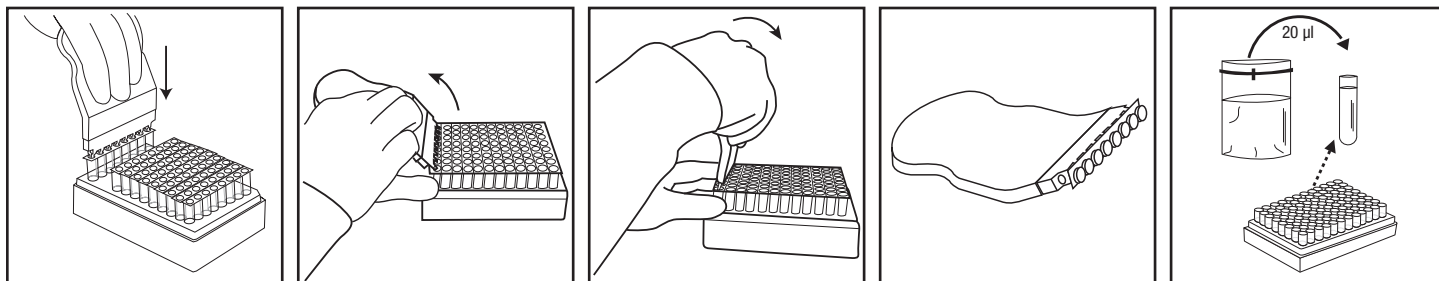
5.4 Use la herramienta de encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular de Neogen® para destapar una tira de tubo de solución de LS, una tira a la vez.

5.5 Deseche la tapa del tubo de LS. Si se retendrá el lisado para volver a realizar la prueba, coloque las tapas en un recipiente limpio para volver a aplicarlas después de la lisis.

5.5.1 Consulte el anexo A para procesamiento de lisado retenido.

5.6 Transfiera 20 µL de muestra a un tubo de LS, a menos que se indique lo contrario en la tabla de protocolos.

6. Repita el paso 5.2 hasta que cada muestra individual se haya agregado a un tubo de LS correspondiente en la tira.



7. Repita los pasos 5.1 a 5.6 según sea necesario, para la cantidad de muestras que se probarán.

8. Cuando se hayan transferido todas las muestras, transfiera 20 µL de NC (medio de enriquecimiento estéril, por ejemplo, BPW) a un tubo de LS. No use agua como NC.

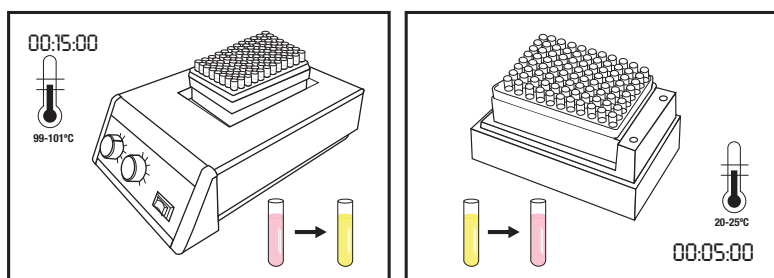
9. Verifique que la temperatura del Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular de Neogen sea de 100 ± 1 °C.

10. Coloque la gradilla destapada de tubos de LS en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular y caliente durante 15 ± 1 minutos. Durante el calentamiento, la solución de LS cambiará de rosado (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 Equipo de Detección Molecular de Neogen.

11. Retire la gradilla destapada de los tubos de LS del bloque de calentamiento y deje que se enfríe en el Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular de Neogen durante al menos 5 minutos y un máximo de 10 minutos. El Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular, 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.

12. Retire la gradilla de los tubos de LS del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular de Neogen.



Amplificación

1. Se requiere un Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular Neogen 2 – *Salmonella* Enteritidis (SE) y un Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular Neogen 2 – *Salmonella* Typhimurium (ST) para cada muestra y el NC.

1.1 Los tubos de reactivos de SE y ST se pueden ejecutar en la misma gradilla para cada muestra, o se pueden ejecutar en una gradilla separada.

1.2 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.

1.3 Coloque los tubos de SE en una gradilla vacía en una columna.

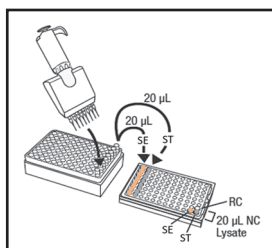
1.4 Coloque los tubos de ST en la columna derecha adyacente.

1.5 Evite tocar los pellets del reactivo de la parte inferior de los tubos.

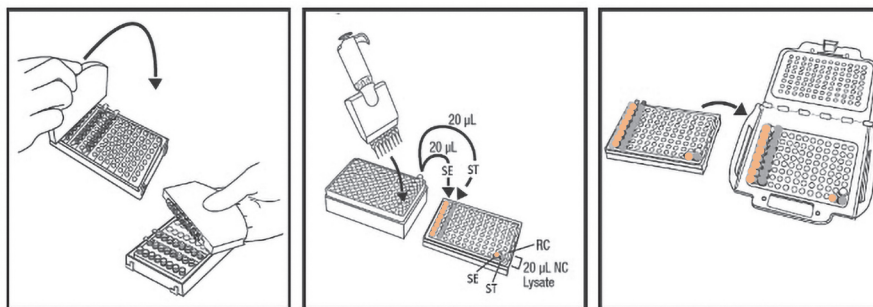
2. Seleccione un tubo de Control de Reactivo (RC) y colóquelo en la gradilla.
3. Para el lisado NC, seleccione un tubo de reactivo para SE y un tubo de reactivo para ST y colóquelos en la misma gradilla, si ambos serotipos se ejecutan juntos, o en gradillas separadas, si se ejecutan por separado.
4. 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.
5. Transfiera cada uno de los lisados a un tubo de reactivos para SE y ST como se describe a continuación.
 - 5.1 En primer lugar, transfiera cada lisado de muestra a un tubo de reactivo para SE como se describe en 5.5 y 5.6.
 - 5.2 En segundo lugar, transfiera cada una de las mismas muestras lisadas a un tubo de reactivo para ST en la columna derecha adyacente como se describe en 5.5 y 5.6.

NOTA: Use una punta de pipeta nueva para cada transferencia. No use la misma punta de pipeta para transferencia para tubos de reactivos para SE y ST desde la misma muestra de lisado.

- 5.3 Después de toda la transferencia de lisado de muestras, agregue lisado de NC a cada uno de los tubos de reactivos para SE y ST.
- 5.4 Transfiera el lisado de NC al final al tubo de control de reactivos.
- 5.5 Use la herramienta de encapuchado/desencapuchado del Sistema de Detección Molecular de Neogen® para destapar los tubos de reactivos para SE y ST, una tira de tubo de reactivo a la vez. Deseche la tapa.
- 5.6 **Transfiera 20 µL de lisado de muestra desde la ½ superior del líquido (evitar precipitado) del tubo de Solución de Lisis Neogen que corresponde al Tubo de Reactivo para SE y ST correspondiente. Distribuya en ángulo para evitar tocar los gránulos. Mezcle suavemente aspirando y expulsando el líquido con la pipeta 5 veces.**



- 5.7 Repita el paso 5.6 hasta que todos los lisados de muestra individual se hayan agregado a un tubo de reactivo para SE y ST correspondiente en la tira.
- 5.8 Cubra los tubos de reactivos con las tapas extras provistas y use el lado redondeado de la herramienta de Encapuchado/Desencapuchado para el Sistema de Detección Molecular de Neogen para aplicar presión en un movimiento hacia adelante y hacia atrás asegurándose de que la tapa se coloque bien.
- 5.9 Repita los pasos 5.6 a 5.8 según sea necesario, para conocer el número de muestras que se van a analizar para los tubos de reactivos para SE y ST.
- 5.10 Cuando se hayan transferido todos los lisados de muestra, repita de 5.6 a 5.8 para transferir 20 µL de lisado de NC a cada tubo de reactivo para SE y ST.
- 5.11 Transfiera **20 µL de lisado de NC en un tubo de RC**. Distribuya en ángulo para evitar tocar los gránulos. Mezcle suavemente aspirando y expulsando el líquido con la pipeta 5 veces.
6. Cargue los tubos tapados en una Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular de Neogen limpia y descontaminada. Cierre bien la tapa de la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular de Neogen.



7. Revise y confirme la ejecución configurada en el Software de Detección Molecular 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 para el Sistema de Detección Molecular de Neogen en el Equipo 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 Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular de Neogen del Equipo de Detección Molecular y deseche los tubos al remojar en una solución de cloro de uso doméstico al 1-5 % (v:v en agua) durante 1 hora y alejado del área de preparación del ensayo.

AVISO: Para minimizar el riesgo de falsos positivos debido a la contaminación cruzada, nunca abra los tubos de reactivos que contienen ADN amplificado. Esto incluye los Tubos de Reactivo, el Control de Reactivos Neogen y los tubos de Control de Matriz Neogen para el ensayo de Detección Molecular Neogen 2 – *Salmonella* Enteritidis (SE) y el ensayo de Detección Molecular Neogen 2 – *Salmonella* Typhimurium (ST). Siempre deseche los tubos de reactivos sellados al remojar en una solución de cloro de uso doméstico al 1-5 % (v:v en agua) durante 1 hora y alejado del área de preparación del ensayo.

Resultados e interpretación

Un algoritmo interpreta la curva de producción de luz que se obtiene de la detección de la amplificación de ácido nucleico. El software analiza automáticamente los resultados y los codifica por colores en función del resultado. Un resultado Positivo o Negativo se determina mediante el análisis de una serie de parámetros de curva únicos. Los resultados Positivos presuntos se informan en tiempo real, mientras que los resultados Negativos y de Inspección se muestran una vez que la ejecución está completa.

El Software de Detección Molecular de Neogen informa resultados por separado para cada uno de los ensayo (SE y ST).

Las muestras positivas presuntas se deben confirmar según procedimientos operativos estándar de laboratorio o con la confirmación de método de referencia adecuada, que comienza con la transferencia del caldo de enriquecimiento primario al caldo de enriquecimiento secundario, seguido del posterior enchapado y confirmación de aislados mediante métodos bioquímicos y serológicos.

NOTA: Incluso una muestra negativa no dará una lectura de cero dado que los reactivos de amplificación del sistema y el ensayo de detección molecular de Neogen 2 – *Salmonella* Enteritidis/*Salmonella* Typhimurium tienen una lectura de unidad de luz relativa (RLU) “de fondo”.

En el raro caso de que ocurra cualquier salida de luz inusual, el algoritmo etiqueta esto como “Inspeccionar”. Neogen recomienda al usuario repetir el ensayo para cualquier muestra para inspección. Si el resultado sigue siendo Inspeccionar, continúe con la prueba de confirmación usando su método de preferencia o según lo especifiquen las regulaciones locales.

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 stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. Póngase en contacto con su representante de Seguridad Alimentaria de Neogen para obtener una copia de este documento.
7. ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
8. ISO 6887-2:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products.

Explicación de los símbolos

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 EE. UU.
www.neogen.com

© Neogen Corporation 2024. Todos los derechos reservados.
Neogen es una marca registrada de Neogen Corporation.
Todas las demás marcas comerciales mencionadas son propiedad de
sus respectivas compañías.

FS00666A