

Instrucciones del Producto

Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*)

Descripción del producto y uso previsto

El Neogen® Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) se usa con el Sistema de Detección Molecular Neogen® para la detección rápida y específica de los genes de la toxina Shiga (*stx1* y *stx2*) de *E. coli* productora de la toxina Shiga (STEC, también conocida como “*E. coli* productora de verocitotoxina”) en muestras ambientales de procesos de alimentos y alimentos enriquecidos. El término STEC se refiere a los patotipos de *E. coli* capaces de producir la toxina Shiga tipo 1 (*Stx1*), tipo 2 (*Stx2*) o ambas, codificados por los genes *stx1* y *stx2*, respectivamente. El kit contiene reactivos solo para la detección de genes de la toxina Shiga y ningún otro factor de virulencia de STEC. Además, el ensayo no distingue entre *stx1* y *stx2*, pero detecta la presencia de *stx1* y/o *stx2*.

El Neogen Sistema de Detección Molecular usa 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 el método que se prefiera^(1, 2, 3) o según lo especifiquen las regulaciones locales.

El Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) está previsto para el uso en laboratorios con 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 clínicas, veterinarias, cosméticas o farmacéuticas. El Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) no ha sido evaluado con todos los productos alimenticios ni todos los procesos alimenticios, tampoco con todos los protocolos de evaluación ni con todas las cepas de bacterias 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 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 Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) con agua peptonada tamponada (BPW)-ISO como caldo de enriquecimiento.

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 del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) contiene 96 pruebas, que se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Componentes del kit del Neogen Sistema de Detección Molecular.

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 reactivo del Neogen® Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (stx)	Tubos naranjas	96 (4 bolsas con 3 tiras de 8 tubos)	Mezcla de detección y amplificación específica liofilizada	Listos para usar
Tapas adicionales	Tapas naranjas	96 (12 tiras de 8 tapas)		Listos 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 DNA	Listos para usar

El Control Negativo (NC), no provisto en el kit, es un medio de enriquecimiento estéril, por ejemplo, BPW-ISO. No use agua como un NC.

Puede encontrar una guía de inicio rápido en www.neogen.com

Seguridad

El usuario debe leer, comprender y seguir toda la información de seguridad que se encuentra en las instrucciones del Sistema de Detección Molecular Neogen y el Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (stx). Guarde las instrucciones de seguridad para consultas futuras.

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

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

⚠ ADVERTENCIA

No utilice el Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (stx) para el diagnóstico de afecciones en seres humanos o animales.

El usuario debe capacitar a su personal en lo que respecta a las técnicas de prueba adecuadas, por ejemplo, Buenas prácticas de laboratorio⁽⁴⁾, ISO/IEC 17025⁽⁵⁾ o ISO 7218⁽⁶⁾.

Para reducir los riesgos asociados 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 Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (stx) como se indica en el embalaje y en las instrucciones del producto.
- Siempre utilice el Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (stx) antes de su fecha de vencimiento.
- Utilice el Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (stx) con muestras ambientales y de alimentos que hayan sido validadas internamente o por un tercero.
- Utilice el Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (stx) solo con cepas bacterianas, superficies, desinfectantes y protocolos que hayan sido validados internamente o por un tercero.
- En el caso de muestras ambientales que contengan una solución amortiguadora neutralizante con un complejo de 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 de la solución amortiguadora neutralizante enriquecida a los tubos de Solución de Lisis Neogen. Productos para la manipulación 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 asociados con la exposición a productos químicos y riesgos biológicos:**

- 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 podrían contener patógenos en niveles suficientes para provocar un riesgo para la salud humana.
- Siempre proceda de acuerdo con 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 de acuerdo con las normas regulatorias locales/regionales/nacionales actuales.
- 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 exposición a líquidos calientes:

- No exceda la temperatura recomendada al configurar el calentador.
- No exceda el tiempo de calentamiento recomendado.
- Use 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, 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 para 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 DNA.

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 sumergiéndolos 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 ponga 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, la técnica de laboratorio y la muestra en sí pueden afectar los resultados.

Al seleccionar cualquier método de prueba o producto, es responsabilidad del usuario evaluar un número suficiente de muestras con retos microbianos 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 de varias matrices, Neogen ha desarrollado el kit de Control de Matriz para Detección Molecular Neogen®. Cuando sea necesario, utilice el Control de Matriz (MC) para Detección Molecular Neogen para determinar si la matriz tiene la capacidad de influir en los resultados del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*). 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 o 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 COMERCIABILIDAD 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. Deberá notificar inmediatamente a Neogen en un lapso de sesenta días a partir del descubrimiento de cualquier sospecha de defecto en un producto y devolver dicho producto a Neogen. Póngase en contacto con su representante de Neogen o distribuidor autorizado de Neogen si tuviera 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 Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) a 2 °C-8 °C (35 °F-47 °F). 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 reselladas a 2 °C-8 °C (35 °F-47 °F) durante no más de 90 días.

No utilice el Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) 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 del uso, el medio de enriquecimiento y los tubos del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) podrían contener materiales patógenos. Una vez terminada la prueba, proceda de acuerdo con 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 DNA.

El usuario debe completar la capacitación de calificación del operador (OQ) 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"⁽⁷⁾.

Consulte la sección "Instrucciones específicas para métodos validados" para obtener requisitos específicos: Tabla 3 para los protocolos de enriquecimiento según el *Performance Tested Method*SM (PTM) N.º de certificado 071903.

Enriquecimiento de la muestra

En las Tablas 2 y 3 se presenta una guía para los protocolos de enriquecimiento generales para alimentos.

Es responsabilidad del usuario validar protocolos de muestreo o proporciones de dilución alternativos para garantizar que este método de prueba satisface los criterios del usuario.

Alimentos

1. Permita que el medio de enriquecimiento de BPW ISO se equilibre a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
2. Combine el medio de enriquecimiento y la muestra de forma aséptica. Para todas las muestras con alto contenido de partículas y carne, se recomienda utilizar bolsas con filtro.
3. Mezcle todas las matrices e incúbelas como se resume en el protocolo correspondiente (consulte la Tabla 2 o la Tabla 3).

Muestras ambientales

ADVERTENCIA: Si decidiera usar una solución amortiguadora neutralizante que contenga el complejo aril sulfonato como solución hidratante para la esponja, deberá preparar una dilución 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 asociados con un resultado falso negativo que provoque la liberación del producto contaminado. Otra opción es transferir 10 μL de la muestra de la solución amortiguadora neutralizante enriquecida a los tubos de Solución de Lisis Neogen.

Es responsabilidad del usuario validar protocolos de muestreo o proporciones de dilución alternativos para garantizar que este método de prueba satisface los criterios del usuario.

Tabla 2. Protocolos Generales de Enriquecimiento.

Matriz de la muestra	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento (mL) (precalentado)	Temperatura de enriquecimiento ($\pm 1^{\circ}\text{C}$)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Volumen de análisis de la muestra (μL)
Carne de res molida cruda, trozos y recortes ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO	41,5	10-18	20
Carne cruda (cerdo, carne de ave, cordero, bisonte) ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO	41,5	10-18	20
vegetales ^(b)	200 g	450 BPW-ISO	41,5	18-24	20
germinados ^(c)	25 g	225 BPW-ISO	41,5	18-24	20
productos lácteos crudos ^(d)	25 g o 25 mL	225 BPW-ISO	41,5	18-24	20

^(a) Masajee con las manos las muestras de carne de res (carne de res molida, trozos y recortes) y de carne cruda (cerdo molido, carne de ave y carne que no sea de res) entre 30 y 60 segundos para dispersar y desintegrar los grupos después de agregar BPW-ISO precalentada.

^(b) En el caso de los vegetales, enjuague el caldo de enriquecimiento (BPW-ISO precalentada) sobre las hojas y agite suavemente entre 30 y 60 segundos. No masajee ni homogeneice las hojas.

^(c) En el caso de los germinados, enjuague el caldo de enriquecimiento (BPW-ISO precalentada) sobre los germinados entre 30 y 60 segundos sin masajear ni homogeneizar.

^(d) Homogeneice las muestras de productos lácteos crudos entre 30 y 60 segundos después de agregar BPW-ISO precalentada.

Instrucciones específicas para métodos validados
AOAC® Performance Tested MethodSM (PTM) N.º de certificado 071903



En los estudios de AOAC Research Institute PTMSM, se halló que el Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) es un método efectivo para la detección de STEC. Las matrices evaluadas en el estudio se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Protocolos de enriquecimiento según AOAC PTMSM N.º de certificado 071903.

Matriz de la muestra	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 (µL)
Recorte de carne de res cruda ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (precalentada)	41,5	10-18	20
Carne de res molida cruda ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (precalentada)	41,5	10-18	20
Carne de res molida cruda ^(a)	25 g	225 BPW-ISO (precalentada)	41,5	10-18	20
Carne de cerdo molida cruda ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (precalentada)	41,5	10-18	20
Piezas crudas de carne de ave ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (precalentada)	41,5	10-18	20
Pollo dividido mecánicamente	25 g	225 BPW-ISO (precalentado)	41,5	10-24	20
Espinacas ^(b)	200 g	450 BPW-ISO (precalentada)	41,5	18-24	20
germinados ^(c)	25 g	225 BPW-ISO (precalentada)	41,5	18-24	20
Flor de cannabis seca, planta de cannabis seca ^(d)	10 g	90 BPW-ISO	41,5	28-32	20

^(a) En el caso de la carne de res molida cruda, los recortes de carne de res cruda, el cerdo molido crudo y las piezas crudas de carne de ave, agregue BPW-ISO precalentada a las muestras. Masajee con las manos entre 30 y 60 segundos para dispersar y desintegrar los grumos.

^(b) En el caso de las espinacas, agregue BPW-ISO precalentada a la matriz. Enjuague el líquido sobre las hojas y agite suavemente entre 30 y 60 segundos. No masajee ni homogeneice las hojas.

^(c) En el caso de los germinados, enjuague el caldo de enriquecimiento (BPW-ISO precalentada) sobre los germinados entre 30 y 60 segundos sin masajear ni homogeneizar.

^(d) Flor de cannabis seca (>0.3 % THC) y planta de cannabis seca (≤0.3 % THC)

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

1. Humedezca un paño o una toalla desechable 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.
2. Enjuague la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen con agua.

3. Utilice una toalla desechable para secar la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen.
4. 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: No se usa la Bandeja para el Bloque de Frío del Sistema de Detección Molecular Neogen. Use el bloque a temperatura ambiente del laboratorio (20 °C-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 una unidad o plancha de calentamiento seca. Encienda la unidad de calentamiento de bloques seca 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 °C ± 1 °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 apropiado (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 °C ± 1 °C.

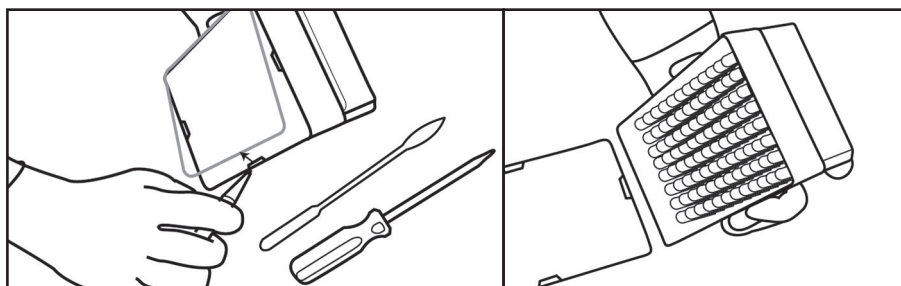
Preparación del Equipo de Detección Molecular Neogen®

1. 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.
2. Encienda el Equipo de Detección Molecular Neogen.
3. 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 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-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 de calentamiento de dos bloques seca durante 30 segundos a 100 °C.
2. Invierta los tubos tapados para mezclarlos. Proceda con el paso siguiente dentro de las 4 horas después de la inversión.
3. Retire la muestra enriquecida de la incubadora.
4. Se requiere un tubo de Solución de Lisis Neogen para cada muestra y la muestra 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. Seleccione la cantidad de tubos o de 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:

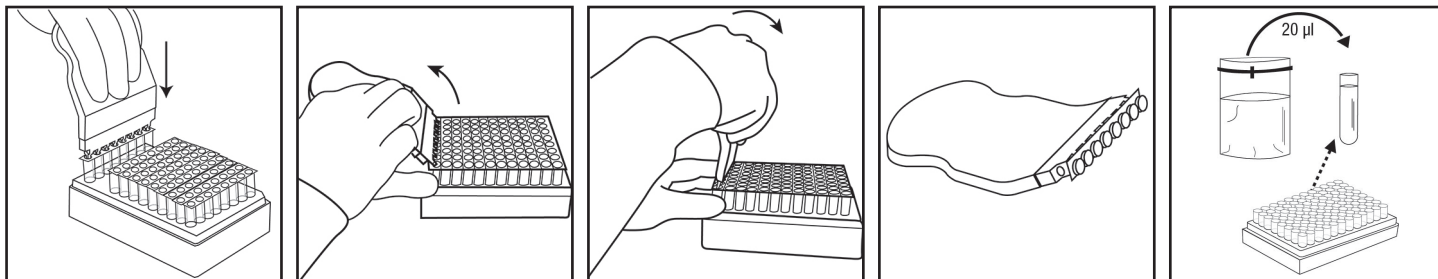
Transfiera cada muestra enriquecida a un tubo de Solución de Lisis Neogen individual **primero**. Transfiera el NC **al final**.

4.4. Utilice la Herramienta para tapar/destapar del Sistema de Detección Molecular – Lisis Neogen® para destapar una tira de tubo de Solución de Lisis Neogen, una tira a la vez.

4.5. Deseche la tapa del tubo de Solución de Lisis Neogen; si se conservará el lisado para una repetición de prueba, coloque las tapas en un envase limpio para su reutilización luego de la lisis.

4.5.1. Para procesar el lisado conservado, consulte el Apéndice A.

4.6. Transfiera 20 µL de muestra a un tubo de Solución de Lisis Neogen.



5. Repita los pasos 4.4 a 4.6 según sea necesario para la cantidad de muestras que se deben analizar.

6. Cuando se hayan transferido todas las muestras, transfiera 20 µL del NC (medio de enriquecimiento estéril, p. ej., BPW) a un tubo de Solución de Lisis Neogen. No use agua como un NC.

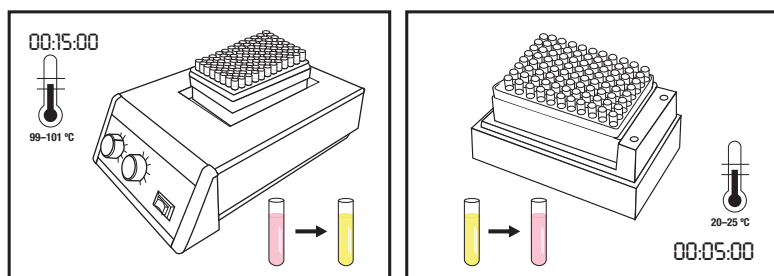
7. Verifique que la temperatura del Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen sea de 100 °C ± 1 °C.

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 para la Detección Molecular Neogen 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 por un máximo de 10 minutos. Cuando se usa la Inserción del Bloque de Frío del Sistema de Detección Molecular Neogen a temperatura ambiente sin la Bandeja para el Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen®, debe colocarse directamente sobre la mesa de laboratorio. Cuando esté frío, la Solución de Lisis Neogen se 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.

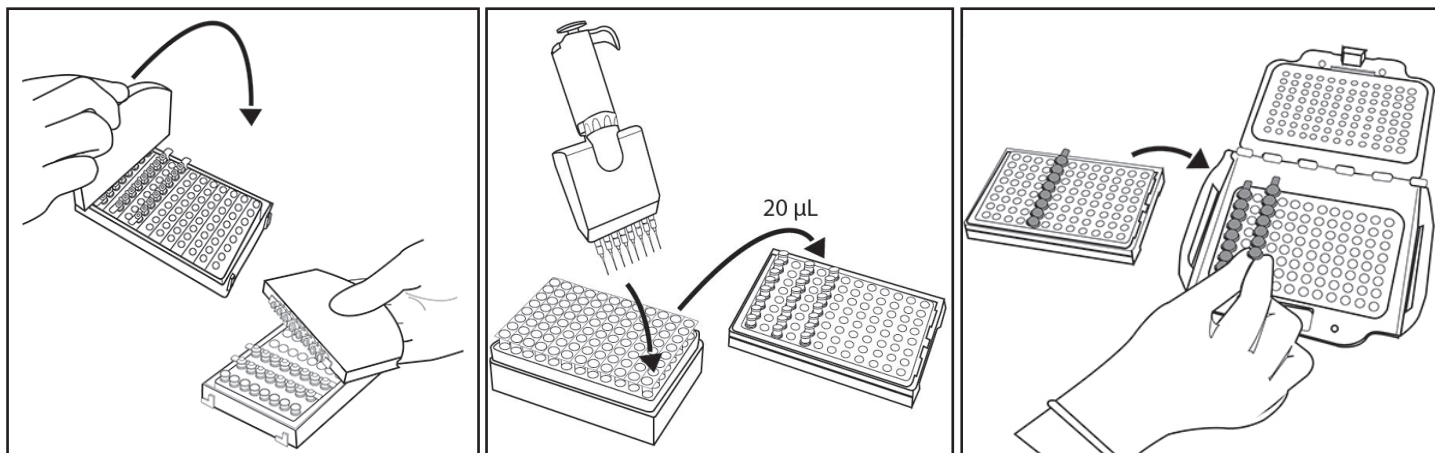


Amplificación

1. Se requiere un tubo de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) para cada muestra y el NC.
 - 1.1. Las tiras de tubos pueden cortarse para obtener la cantidad deseada de tubos. Seleccione la cantidad de tubos de reactivo individuales del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) o las tiras de 8 tubos que sean necesarias.
 - 1.2. Coloque los tubos en una gradilla vacía.
 - 1.3. Evite mover las perlas de reactivo en el fondo de los tubos.
2. Seleccione un tubo de Control de Reactivos Neogen y colóquelo en la gradilla.
3. Para evitar la contaminación cruzada, destape una tira de tubos de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) por vez y utilice una nueva punta de pipeta para cada paso de transferencia.
4. Transfiera cada uno de los lisados a un tubo de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) y a un tubo de Control de Reactivos Neogen como se describe a continuación:

Primero, transfiera cada lisado de muestra a un tubo de reactivo individual del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) y luego el NC. Hidrate el Tubo de Control de Reactivos Neogen **al final**.

5. Utilice la Herramienta para tapar/destapar del Sistema de Detección Molecular – Reactivo Neogen® para destapar los tubos de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*), una tira por 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 al tubo de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) correspondiente. Aplique en un ángulo que permita evitar que se muevan los gránulos. Mezcle pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.**
 - 5.2. Repita el paso 5.1 hasta que se haya agregado el lisado de muestra individual a un tubo de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) correspondiente en la tira.
 - 5.3. Cubra los tubos de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) con las tapas adicionales provistas y utilice el lado redondeado de la Herramienta para tapar/destapar del Neogen Sistema de Detección Molecular – Reactivo 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 a 5.3 según sea necesario para la cantidad de muestras que se deben analizar.
 - 5.5. Cuando se hayan transferido todos los lisados de muestra, repita los pasos 5.1 a 5.3 para transferir 20 µL de lisado NC a un tubo de reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*).
 - 5.6. **Transfiera 20 µL del lisado NC a un tubo de Control de Reactivos Neogen.** Aplique en un ángulo que permita evitar que se muevan los gránulos. 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 trabe la tapa de la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen.



7. Revise y confirme la corrida 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 60 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 sumergiéndolos 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 contaminación cruzada, nunca abra tubos de reactivo que contengan DNA amplificado. Esto incluye los tubos de Control de Matriz Neogen, el Control de Reactivos Neogen y el reactivo del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*). Siempre deseche los tubos de reactivo sellados sumergiéndolos en una solución de cloro de uso doméstico al 1 % a 5 % (v:v en agua) durante 1 hora y lejos del área en que se prepara el análisis.

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 los expresa en 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 presuntamente positivas deben confirmarse de acuerdo con 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 a las placas selectivas y la confirmación de aislados usando los métodos serológicos y bioquímicos apropiados. En el caso de las matrices especificadas por el MLG 5C, la separación inmunomagnética (IMS) debe hacerse antes de preparar las placas en un medio selectivo.

NOTA: Incluso una muestra negativa no arrojará una lectura de cero, ya que los reactivos de amplificación del Neogen Sistema de Detección Molecular 2 - Ensayo de Detección Genética de STEC (*stx*) y el sistema tienen una lectura de unidades relativas de luz de fondo (RLU).

En el raro caso de que se emita una señal de luz inusual, el algoritmo lo indicará como “Inspeccionar”. Neogen recomienda al usuario repetir el ensayo para aquellas muestras etiquetadas como Inspeccionar. Si el resultado sigue siendo Inspeccionar, proceda con la prueba de confirmación usando su método preferido^(1, 2) o según se especifique en las regulaciones locales.

Tabla 4. Símbolos e información para diversos resultados del software.

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.



Apéndice A. Interrupción por protocolo: Almacenamiento y repetición de pruebas de lisados tratados con calor

1. Para almacenar un lisado tratado con calor, vuelva a tapar el tubo de Solución de Lisis Neogen con una tapa limpia (consulte la sección 4.5 **Lisis**).
2. Para almacenar una muestra enriquecida, incube durante 18 horas como mínimo antes de almacenar.
3. Almacene entre 4 °C y 8 °C por hasta 72 horas.
4. Prepare una muestra almacenada para amplificación invirtiéndola 2 a 3 veces para mezclar.
5. Destape los tubos.
6. 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.
7. Retire la gradilla descubierta de tubos de Solución de Lisis Neogen del Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen 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 por un máximo de 10 minutos.
8. Siga el protocolo en la sección **Amplificación** que se detalla arriba.

Referencias:

1. Microbiology Laboratory Guidebook. U. S. Department of Agriculture (USDA) Food Safety and Inspection Service (FSIS) Microbiology Laboratory guidebook 5C.00. Detection and isolation of top seven Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STECs) from meat products and carcass and environmental sponges. Feb 4, 2019.
2. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. October 2018.
3. ISO/TS 13136:2012: Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups
4. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good laboratory practice for nonclinical laboratory studies.
5. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
6. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examination.
7. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. Contacte a su representante de Neogen Food Safety para obtener una copia de este documento.

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 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.

FS00917A

Instruções do produto

Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*)

Descrição e uso recomendado do produto

O Neogen® Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) é utilizado com o Neogen® Sistema de Detecção Molecular para detecção rápida e específica dos genes de toxina de shiga (*stx1* e *stx2*) da *E. coli* produtora de toxina de shiga (STEC, também conhecida como “*E. coli* produtora de verocitotoxina”) em alimentos enriquecidos e amostras ambientais de processos de alimentos. O termo STEC refere-se aos patótipos de *E. coli* capazes de produzir a toxina de shiga do tipo 1 (*Stx1*), tipo 2 (*Stx2*), ou ambos, codificada pelos genes *stx1* e *stx2*, respectivamente. O kit contém reagentes somente para a detecção dos genes de toxina de shiga, e não de outros fatores de virulência das STEC. Além disso, o ensaio não diferencia *stx1* de *stx2*, mas detecta a presença de *stx1* e/ou *stx2*.

O Neogen Ensaio de Detecção Molecular utiliza amplificação isotérmica mediada por alça para amplificar rapidamente sequências de ácidos nucleicos com alta especificidade e sensibilidade, combinadas com bioluminescência para detectar a amplificação. Os resultados positivos presuntivos são relatados em tempo real enquanto os resultados negativos são exibidos após a conclusão do ensaio. Os resultados positivos presuntivos devem ser confirmados por meio de seu método de preferência^(1, 2, 3) ou conforme especificado pelos regulamentos locais.

O Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) destina-se ao uso em ambiente laboratorial por profissionais treinados em técnicas laboratoriais. A Neogen não documentou o uso deste produto em outros setores que não o de alimentos e bebidas. Por exemplo, a Neogen não documentou este produto para testar amostras farmacêuticas, de cosméticos, clínicas ou veterinárias. O Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) não foi avaliado com todos os possíveis produtos e/ou processos alimentícios e protocolos de teste, tampouco com todas as estirpes de bactérias possíveis.

Assim como em todos os métodos de teste, a fonte, a formulação e a qualidade do meio de enriquecimento podem influenciar os resultados. Fatores como métodos de amostragem, protocolos de teste, preparação de amostras, manuseio e técnica de laboratório também podem influenciar os resultados. A Neogen recomenda a avaliação do método, incluindo meio de enriquecimento no ambiente do usuário, usando um número suficiente de amostras com alimentos específicos e desafios microbianos para garantir que o método atenda aos critérios do usuário.

A Neogen avaliou o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) com água peptonada tamponada (BPW ISO) como caldo de enriquecimento.

O Neogen® Equipamento de Detecção Molecular destina-se ao uso com amostras que passaram por tratamento térmico durante a etapa de lise do ensaio, projetado para destruir organismos presentes na amostra. Amostras que não foram tratadas com aquecimento de forma adequada durante a etapa de lise do ensaio podem ser consideradas um risco biológico potencial e NÃO devem ser inseridas no Neogen Equipamento de Detecção Molecular.

A Neogen Food Safety é certificada pela Organização Internacional de Normalização (ISO) 9001 para projeto e fabricação.

O kit de testes do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) contém 96 testes, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes do kit Neogen Ensaio para Detecção Molecular.

Item	Identificação	Quantidade	Conteúdo	Comentários
Neogen® Solução de Lise (LS)	Solução rosa em tubos transparentes	96 (12 tiras de 8 tubos)	580 µL de LS por tubo	Armazenados no rack e prontos para o uso
Tubos de reagentes do Neogen® Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (<i>stx</i>)	Tubos laranjas	96 (4 embalagens com 3 tiras de 8 tubos)	Mistura de detecção e amplificação específica liofilizada	Pronto para uso

Tampas adicionais	Tampas laranjas	96 (12 tiras de 8 tampas)		Pronto para uso
Neogen® Controle de Reagentes (RC)	Tubos transparentes com tampa articulada	16 (2 embalagens de 8 tubos individuais)	Mistura de DNA de controle, amplificação e detecção liofilizada	Pronto para uso

O Controle Negativo (NC), não fornecido no kit, é um meio de enriquecimento estéril, por exemplo, BPW ISO. Não use água como um NC.

Um guia de início rápido está disponível em www.neogen.com

Segurança

O usuário deve ler, entender e seguir todas as informações de segurança contidas nas instruções do Neogen Sistema de Detecção Molecular e do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*). Guarde as instruções sobre segurança para consulta posterior.

⚠️ADVERTÊNCIA: indica uma situação de perigo que, se não evitada, pode resultar em morte ou ferimentos graves e/ou danos materiais.

AVISO: indica uma situação potencialmente perigosa que, se não evitada, pode resultar em danos materiais.

⚠️ ADVERTÊNCIA

Não use o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) no diagnóstico de problemas de saúde em humanos ou animais.

O usuário deve treinar sua equipe com técnicas de testes atuais apropriadas: por exemplo, Boas Práticas de Laboratório⁽⁴⁾, ISO/IEC 17025⁽⁵⁾ ou ISO 7218⁽⁶⁾.

Para reduzir os riscos associados a um resultado falso-negativo levando à liberação do produto contaminado:

- Siga o protocolo e realize os testes exatamente conforme especificado nas instruções do produto.
- Armazene o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) conforme indicado na embalagem e nas instruções do produto.
- Utilize sempre o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) antes do vencimento.
- Utilize o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) para amostras alimentares e ambientais que tenham sido validadas internamente ou por um terceiro.
- Utilize o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) somente com superfícies, desinfetantes, protocolos e estirpes de bactérias que tenham sido validados internamente ou por um terceiro.
- Para uma amostra ambiental que contém um tampão neutralizante com complexo de sulfonato de arila, faça uma diluição de 1:2 antes de testar (1 parte da amostra em 1 parte do caldo de enriquecimento estéril). Outra opção é transferir 10 µL do enriquecimento do tampão neutralizante para os tubos de Neogen Solução de Lise. Produtos Neogen® Sample Handling que incluem tampão neutralizante com complexo de sulfonato de arila: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G e HS2410NB2G.

Para reduzir os riscos de exposição a produtos químicos e agentes biológicos nocivos:

- Execute testes de agentes patogênicos em um laboratório adequadamente equipado, sob o controle de pessoal bem treinado. O meio de enriquecimento incubado e equipamentos ou superfícies que tenham entrado em contato com o meio de enriquecimento incubado podem conter patógenos em níveis suficientes para apresentar riscos à saúde humana.
- Sempre adote as práticas de segurança padrão em laboratórios, como usar trajes de proteção adequados e óculos de proteção ao manipular reagentes e amostras contaminadas.
- Evite o contato com o conteúdo do meio de enriquecimento e dos tubos de reagentes após a amplificação.
- Descarte amostras enriquecidas de acordo com os regulamentos padrão locais/regionais/nacionais vigentes da indústria.
- Amostras que não foram tratadas com aquecimento de forma adequada durante a etapa de lise do ensaio podem ser consideradas um risco biológico potencial e NÃO devem ser inseridas no Neogen Equipamento de Detecção Molecular.

Para reduzir os riscos de contaminação cruzada ao preparar o ensaio:

- Sempre use luvas (para proteger o usuário e evitar a introdução de nucleases).

Para reduzir os riscos de exposição a líquidos quentes:

- Não exceda a temperatura recomendada ao ajustar o aquecedor.
- Não exceda o tempo de aquecimento recomendado.
- Utilize um termômetro calibrado adequado para verificar a temperatura do Neogen® Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular (por exemplo, um termômetro de imersão parcial ou termômetro termopar digital, e não um termômetro de imersão total). O termômetro deve ser colocado no local indicado do Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular.

AVISO

Para reduzir os riscos de contaminação cruzada ao preparar o ensaio:

- Troque de luvas antes da hidratação do pellet dos reagentes.
- Recomenda-se o uso de ponteiros de pipeta estéreis, com barreira aerossol (filtros) e nível de biologia molecular.
- Utilize uma nova ponteira de pipeta para cada transferência de amostra.
- Utilize Boas Práticas Laboratoriais para transferir a amostra do meio de enriquecimento para o tubo de lise. Para evitar a contaminação da pipeta, o usuário pode decidir adicionar uma etapa de transferência intermediária. Por exemplo, o usuário pode transferir cada amostra enriquecida para um tubo estéril.
- Utilize uma estação de trabalho de biologia molecular contendo lâmpada germicida sempre que possível.
- Periodicamente, descontamine as bancadas e os equipamentos do laboratório (pipetas, ferramentas de tampar/ destampar etc.) com uma solução de 1–5% (v:v em água) de água sanitária ou solução de remoção de DNA.

Para reduzir os riscos de um resultado falso-positivo:

- Nunca abra tubos de reagentes após a amplificação.
- Sempre descarte os tubos contaminados mergulhando-os em uma solução de água sanitária de 1–5% (v:v em água) por 1 hora, longe da área de preparação de ensaio.
- Nunca submeta os tubos de reagentes a autoclave após a amplificação.

Consulte a Planilha de Dados de Segurança para obter informações adicionais e informações sobre os regulamentos locais para descarte.

Em caso de dúvidas sobre aplicações ou procedimentos específicos, acesse nosso site www.neogen.com ou entre em contato com o seu representante ou distribuidor local Neogen.

Responsabilidade do usuário

Os usuários são responsáveis por se familiarizar com as informações e instruções do produto. Visite nosso site www.neogen.com ou entre em contato com o representante ou distribuidor Neogen local para obter mais informações.

Ao selecionar um método de teste, é importante considerar que fatores externos, como métodos de amostragem, protocolos de teste, preparo de amostras, manipulação, a técnica de laboratório utilizada e a própria amostra, podem influenciar nos resultados.

É de responsabilidade do usuário, ao selecionar qualquer método de teste ou produto, avaliar um número suficiente de amostras com as matrizes e testes microbiológicos que permitam assegurar que o método escolhido atenda aos critérios por ele estabelecidos.

Também é de responsabilidade do usuário determinar se o método de teste e os resultados atendem às exigências de seus clientes e fornecedores.

Como em qualquer outro método de teste, os resultados obtidos com qualquer produto da Neogen Food Safety não constituem garantia de qualidade das matrizes ou processos com eles testados.

Para ajudar os clientes a avaliar o método para diversas matrizes de alimentos, a Neogen desenvolveu o kit Neogen® Controle de Matriz para Detecção Molecular. Quando necessário, utilize o Neogen Controle de Matriz para Detecção Molecular (MC) para determinar se a matriz tem a capacidade de influenciar nos resultados do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (stx). Teste diversas amostras representativas da matriz, isto é, amostras obtidas a partir de diferentes origens, durante qualquer período de validação quando adotar o método da Neogen, quando testar matrizes novas ou desconhecidas ou matrizes que tiverem passado por mudanças de processo ou matéria-prima.

Uma matriz pode ser definida como um tipo de produto com propriedades intrínsecas, tais como composição e processamento. As diferenças entre matrizes podem ser tão simples quanto os efeitos causados pelas diferenças em seu processamento ou apresentação, por exemplo, cru vs. pasteurizado, fresco vs. desidratado etc.

Limitação de garantias/recurso limitado

SALVO CONFORME DECLARADO EXPRESSAMENTE EM UMA SEÇÃO DE GARANTIA DE EMPACOTAMENTO DE PRODUTO INDIVIDUAL, A NEOGEN REJEITA TODAS AS GARANTIAS EXPRESSAS E IMPLÍCITAS, INCLUINDO, ENTRE OUTRAS, QUAISQUER GARANTIAS DE COMERCIALIZAÇÃO OU ADEQUAÇÃO PARA UM DETERMINADO USO. Se ficar provado que qualquer produto da Neogen Food Safety se encontra defeituoso, a Neogen ou seu distribuidor autorizado procederá à respectiva substituição ou, se assim o decidir, restituirá o dinheiro da compra do produto. Estes são os seus únicos termos de recurso. A Neogen deverá ser prontamente notificada em até sessenta dias após a descoberta de qualquer defeito suspeito no produto, o qual deverá ser devolvido à Neogen. Entre em contato com o representante da Neogen ou distribuidor autorizado da Neogen para qualquer dúvida adicional.

Limitações de responsabilidade da Neogen

A NEOGEN NÃO SE RESPONSABILIZARÁ POR QUAISQUER DANOS, SEJAM DIRETOS, INDIRETOS, ESPECIAIS, ACIDENTAIS OU SUBSEQUENTES, INCLUINDO, ENTRE OUTROS, PERDA DE LUCROS. Em nenhuma circunstância nem ao abrigo seja de qualquer teoria jurídica, a responsabilidade da Neogen deverá exceder o preço de compra dos produtos supostamente defeituosos.

Armazenamento e descarte

Armazene o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) a 2–8 °C (35–47 °F). Não congele. Mantenha o kit longe de luz durante o armazenamento. Após abrir o kit, verifique se a embalagem de alumínio não está danificada. Se a embalagem estiver danificada, não utilize. Após a abertura, os tubos de reagentes não utilizados devem sempre ser armazenados na embalagem resselável, juntamente com o dessecante para manter a estabilidade dos reagentes liofilizados. Armazene as embalagens resseláveis a 2–8 °C (35–47 °F) por, no máximo, 90 dias.

Não utilize o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) depois do vencimento. A data de validade e o número do lote estão anotados no rótulo externo da caixa. Após o uso, o meio de enriquecimento e os tubos Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) podem conter materiais patogênicos. Quando o teste for concluído, siga os regulamentos padrão vigentes da indústria para descarte de resíduos contaminados. Consulte a Planilha de Dados de Segurança para obter informações adicionais e informações sobre os regulamentos locais para descarte.

Instruções de uso

Siga todas as instruções com atenção. Caso contrário, pode haver resultados imprecisos.

Periodicamente, descontamine as bancadas e os equipamentos do laboratório (pipetas, ferramentas de tampar/destampar etc.) com uma solução de 1–5% (v:v em água) de água sanitária ou solução de remoção de DNA.

O usuário deve concluir o treinamento de qualificação do operador (QO) do Sistema de Detecção Molecular Neogen, conforme descrito no documento “Protocolos e Instruções de Qualificação de Instalação (QI)/Qualificação Operacional (QO) para o Neogen Sistema de Detecção Molecular”⁽⁷⁾.

Consulte a seção “Instruções Específicas para Métodos Comprovados” para obter os requisitos específicos: Tabela 3 para protocolos de enriquecimento conforme o *Performance Tested Method*SM (PTM) Certificado nº 071903.

Enriquecimento de amostra

As Tabelas 2 e 3 oferecem orientação para protocolos gerais de enriquecimento de alimentos.

É responsabilidade do usuário validar os protocolos de amostragem alternativos ou taxas de diluição para garantir que este método de teste atenda aos critérios do usuário.

Alimentos

1. Permita que o meio de enriquecimento BPW ISO mantenha o equilíbrio a 41,5 ± 1 °C.
2. Combine, de forma asséptica, o meio de enriquecimento e a amostra. Para carnes e amostras altamente particuladas, recomenda-se o uso de sacos de amostra com filtro.
3. Homogeneíze todas as matrizes e incube-as, conforme destacado no protocolo apropriado (vide Tabela 2 ou 3).

Amostras ambientais

ADVERTÊNCIA: caso escolha utilizar tampão neutralizador que contém complexos de sulfonato de arila como a solução hidratante para a esponja, será necessário que você execute uma diluição de 1:2 (1 parte da amostra em 1 parte do caldo de enriquecimento estéril) da amostra ambiental enriquecida antes de testar para reduzir os riscos de um resultado falso-negativo que levaria à liberação de produtos contaminados. Outra opção é transferir 10 µL do enriquecimento do tampão neutralizante para os tubos de Neogen Solução de Lise.

É responsabilidade do usuário validar os protocolos de amostragem alternativos ou taxas de diluição para garantir que este método de teste atenda aos critérios do usuário.

Tabela 2. Protocolos gerais de enriquecimento.

Matriz de amostra	Tamanho da amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento (mL) (pré-aquecido)	Temperatura de enriquecimento (± 1 °C)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Volume da Análise da Amostra (µL)
Carne moída crua, em pedaços e iscas ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO	41,5	10-18	20
Carnes cruas (suína, aves, ovina, bisão) ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO	41,5	10-18	20
Folhas frescas ^(b)	200 g	450 BPW-ISO	41,5	18-24	20
Brotos ^(c)	25 g	225 BPW-ISO	41,5	18-24	20
Laticínios crus ^(d)	25 g ou 25 mL	225 BPW-ISO	41,5	18-24	20

^(a) Massageie com as mãos as amostras de carne bovina (carne moída, em pedaços e tiras) e carne crua (carne de porco moída, ave e carne não bovina) por 30–60 segundos para dispersar e quebrar os aglomerados após a adição de BPW-ISO pré-aquecido.

^(b) Para as folhas frescas, enxágue as folhas com caldo de enriquecimento (BPW-ISO pré-aquecido) e agite-as por 30–60 segundos. Não massageie ou homogeneíze as folhas.

^(c) Para os brotos, enxágue-as com caldo de enriquecimento (BPW-ISO pré-aquecido) por 30–60 segundos e não as massageie ou homogeneíze.

^(d) Homogeneíze as amostras de laticínios crus por 30 a 60 segundos após adicionar BPW-ISO.

Instruções específicas para métodos comprovados

Certificado AOAC® *Performance Tested Method*SM (PTM) n° 071903



Nos programas PTM do Instituto de Pesquisa AOACSM, o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (stx) foi constatado como um método eficiente para a detecção de STEC. As matrizes testadas no estudo são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Protocolos de enriquecimento segundo o Certificado AOAC PTMSM n° 071903.

Matriz de amostra	Tamanho da amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento (mL)	Temperatura de enriquecimento ($\pm 1^\circ\text{C}$)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Volume da Análise da Amostra (μL)
Carne bovina moída ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (pré-aquecido)	41,5	10-18	20
Carne moída crua ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (pré-aquecido)	41,5	10-18	20
Carne moída crua ^(a)	25 g	225 BPW-ISO (pré-aquecido)	41,5	10-18	20
Carne de porco moída crua ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (pré-aquecido)	41,5	10-18	20
Partes cruas de aves ^(a)	375 g	1125 BPW-ISO (pré-aquecido)	41,5	10-18	20
Frango separado mecanicamente	25 g	225 BPW-ISO (pré-aquecido)	41,5	10-24	20
Espinafre ^(b)	200 g	450 BPW-ISO (pré-aquecido)	41,5	18-24	20
Brotos ^(c)	25 g	225 BPW-ISO (pré-aquecido)	41,5	18-24	20
Flor de cannabis seca, flor de cânhamo seca ^(d)	10 g	90 BPW-ISO	41,5	28-32	20

- ^(a) Para carne bovina moída, isca de carne bovina crua, carne de porco moída crua e partes cruas de aves, adicione BPW-ISO pré-aquecido às amostras. Massageie-as com as mãos por 30–60 segundos para dispersar e quebrar os aglomerados.
- ^(b) Para espinafre, adicione BPW-ISO pré-aquecido à matriz. Enxágue as folhas com líquido e agite-as cuidadosamente por 30–60 segundos. Não massageie ou homogeneíze as folhas.
- ^(c) Para os brotos, enxágue-as com caldo de enriquecimento (BPW-ISO pré-aquecido) por 30–60 segundos e não as massageie ou homogeneíze.
- ^(d) Flor de cannabis seca ($>0,3\%$ THC) e flor de cânhamo seca ($<0,3\%$ THC)

Preparo da Neogen® Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular

1. Umedeça um pano em uma solução de 1–5% (v:v em água) de água sanitária e limpe a Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular.
2. Enxágue a Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular com água.
3. Utilize uma toalha descartável para secar a Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular.
4. Certifique-se de que a Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular esteja seca antes de utilizá-la.

Preparação do Neogen® Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular

Coloque o Neogen Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular diretamente sobre a bancada do laboratório: a Neogen Bandeja de Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular não é utilizada. Utilize o bloco à temperatura ambiente do laboratório (20–25 °C).

Preparo do Neogen® Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular

Coloque o Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular em uma unidade de aquecimento com bloco seco duplo. Ligue a unidade de aquecimento de bloco a seco e defina a temperatura para permitir que o Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular alcance e mantenha a temperatura de $100 \pm 1^\circ\text{C}$.

NOTA: dependendo da unidade de aquecimento, aguarde aproximadamente 30 minutos até que o Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular alcance a temperatura. Utilizando um termômetro calibrado adequado (por exemplo, um termômetro de imersão parcial ou um termômetro digital de termopares, não um termômetro de imersão total) colocado no local indicado, verifique se o Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular está a $100 \pm 1^\circ\text{C}$.

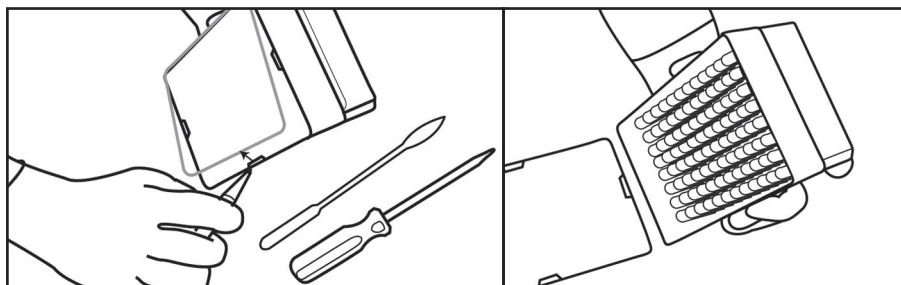
Preparo do Neogen® Equipamento de Detecção Molecular

1. Inicie o Software Neogen® Sistema de Detecção Molecular e faça log in. Entre em contato com o representante Neogen Food Safety para garantir que você possui a versão mais atualizada do software.
2. Ligue o Neogen Equipamento de Detecção Molecular.
3. Crie ou edite uma execução com dados para cada amostra. Consulte o Manual do Usuário do Neogen Sistema de Detecção Molecular para obter mais detalhes.

NOTA: o Neogen Equipamento de Detecção Molecular deve estar pronto para o uso antes de inserir a Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular com os tubos de reação. Esta etapa de aquecimento leva aproximadamente 20 minutos e é indicada por uma luz LARANJA na barra de status do instrumento. Quando o equipamento estiver pronto para iniciar uma execução, a barra de status ficará VERDE.

Lise

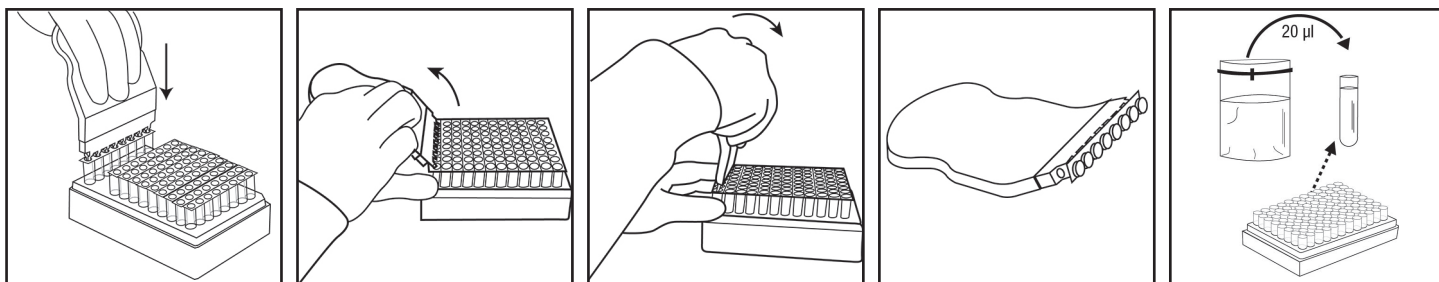
Remova o fundo do Neogen Rack de Solução de Lise com uma chave de fenda antes de inserir no Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular.



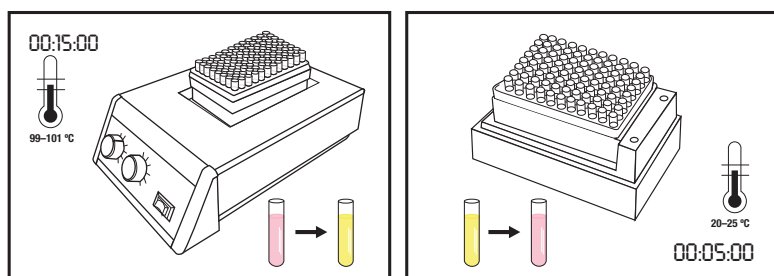
1. Deixe que os tubos de Neogen Solução de Lise cheguem à temperatura ambiente (20–25 °C), deixando os racks fora de refrigeração de um dia para o outro (16–18 horas). A alternativa para equilibrar os tubos Neogen Solução de Lise à temperatura ambiente é posicioná-los na bancada do laboratório durante pelo menos 2 horas, incubá-los em uma incubadora de 37 ± 1 °C por 1 hora ou colocá-los em um aquecedor com bloco seco duplo por 30 segundos a 100 °C.
2. Inverta os tubos com tampa para misturar. Prossiga para a próxima etapa em até 4 horas após a inversão.
3. Remova o caldo de enriquecimento da incubadora.
4. Um tubo de Neogen Solução de Lise é necessário para cada amostra e amostra do NC (meio de enriquecimento esterilizado).
 - 4.1. As tiras de tubos de Neogen Solução de Lise podem ser cortadas para obter o número desejado de tubos. Selecione o número de tubos ou tiras de 8 tubos necessários. Coloque os tubos de Neogen Solução de Lise em um rack vazio.
 - 4.2. Para evitar contaminação cruzada, destampe uma tira de tubo de Neogen Solução de Lise de cada vez e utilize uma nova ponteira de pipeta para cada etapa da transferência.
 - 4.3. Transfira a amostra enriquecida para os tubos de Neogen Solução de Lise, conforme descrito abaixo:

Primeiro, transfira cada amostra enriquecida para um tubo Neogen Solução de Lise individual. **Por último**, transfira o NC.

- 4.4. Use a Neogen® Ferramenta de Tampar/Destampar para Detecção Molecular - Lise para destampar uma tira de tubos de Neogen Solução de Lise — uma tira de cada vez.
- 4.5. Descarte a tampa do tubo de Neogen Solução de Lise; se o lisado for mantido para novo teste, coloque as tampas em um recipiente limpo para reutilização após a lise.
 - 4.5.1. Para processar o lisado mantido, consulte o Apêndice A.
- 4.6. Transfira 20 µL de amostra para o tubo de Neogen Solução de Lise.



5. Repita as etapas 4.4 a 4.6, conforme necessário, para o número de amostras a serem testadas.
6. Quando todas as amostras tiverem sido transferidas, transfira 20 µL de NC (meio de enriquecimento estéril, por exemplo, BPW) para um tubo Neogen Solução de Lise. Não use água como um NC.
7. Verifique se a temperatura do Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular está a 100 ± 1 °C.
8. Coloque o rack descoberto de tubos Neogen Solução de Lise no Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular e aqueça por 15 ± 1 minutos. Durante o aquecimento, a Neogen Solução de Lise mudará da cor rosa (frio) para amarelo (quente).
- 8.1. Amostras que não foram tratadas com aquecimento de forma adequada durante a etapa de lise do ensaio podem ser consideradas um risco biológico potencial e **NÃO** devem ser inseridas no Neogen Equipamento de Detecção Molecular.
9. Retire o rack descoberto de tubos de Neogen Solução de Lise do Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular e deixe esfriar no Neogen Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular por pelo menos 5 minutos e no máximo 10 minutos. O Neogen Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular, usado em temperatura ambiente sem a Neogen® Bandeja de Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular, deve ser colocado diretamente sobre a bancada do laboratório. Quando resfriada, a Neogen Solução de Lise voltará à cor rosa.
10. Retire o rack de tubos Neogen Solução de Lise do Neogen Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular.

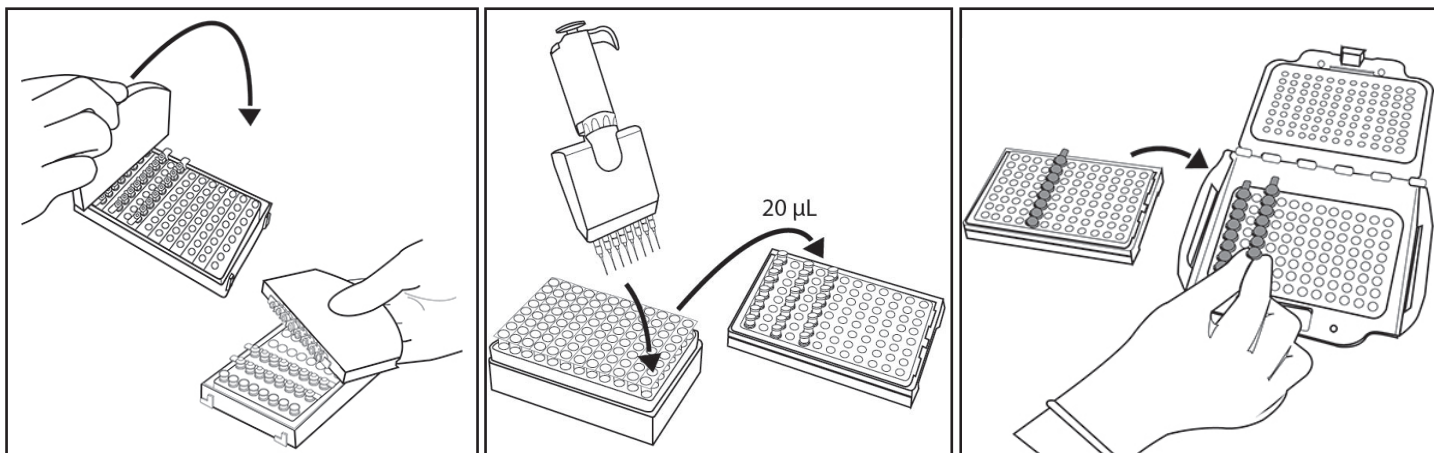


Amplificação

1. Um tubo de reagente de Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) é necessário para cada amostra e para o NC.
 - 1.1. As tiras de tubos podem ser cortadas para obter o número de tubos desejado. Selecione o número de tubos de reagentes individuais ou de tiras de 8 tubos individuais necessárias para o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*).
 - 1.2. Coloque os tubos em um rack vazio.
 - 1.3. Evite agitar os pellets dos reagentes da parte inferior dos tubos.
2. Selecione um tubo Neogen Controle de Reagentes e coloque-o no rack.
3. Para evitar contaminação cruzada, destampe uma tira do tubo de reagente de Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) de cada vez e utilize uma nova ponteira de pipeta para cada etapa da transferência.
4. Transfira cada um dos lisados para um tubo de reagente Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) e para um tubo de Neogen Controle de Reagentes, conforme descrito abaixo:

Transfira cada amostra de lisado para os tubos de reagentes individuais de Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) **primeiro** e, em seguida, para o NC. **Por último**, hidrate o tubo Neogen Controle de Reagentes.

5. Use a Neogen® Ferramenta de Tampar/Destampar para Detecção Molecular - Reagente para destampar os tubos do reagente do Ensaio para Detecção Molecular de Listeria 2 da Neogen - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) — uma tira de cada vez. Descarte a tampa.
- 5.1. **Transfira 20 µL de amostra de lisado da ½ superior do líquido (evite o precipitado) no tubo de Neogen Solução de Lise para o tubo de reagente do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) correspondente. Dispense em um ângulo que evite a agitação dos pellets. Misture pipetando gentilmente 5 vezes.**
- 5.2. Repita a etapa 5.1 até que a amostra de lisado individual tenha sido adicionada a um tubo de reagente para o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) correspondente na tira.
- 5.3. Cubra os tubos de reagentes do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) com a tampa adicional fornecida e utilize o lado arredondado da Neogen Ferramenta de Tampar/Destampar para Detecção Molecular - Reagente para apertar com um movimento de vaivém, garantindo que a tampa fique bem apertada.
- 5.4. Repita as etapas 5.1 a 5.3 para o número de amostras a serem testadas, conforme necessário.
- 5.5. Quando todas as amostras de lisado tiverem sido transferidas, repita as etapas de 5.1 a 5.3 para transferir 20 µL de lisado NC para um tubo de reagente do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*).
- 5.6. Transfira **20 µL de lisado NC** para um tubo de **Neogen Controle de Reagentes**. Dispense em um ângulo que evite a agitação dos pellets. Misture pipetando gentilmente 5 vezes.
6. Carregue os tubos tampados em uma Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular limpa e descontaminada. Feche e trave a tampa da Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular.



7. Analise e confirme a execução configurada no Software do Neogen Sistema de Detecção Molecular.
8. Clique no botão Iniciar do software e selecione o instrumento a utilizar. A tampa do instrumento selecionado abre automaticamente.
9. Posicione a Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular no Neogen Equipamento de Detecção Molecular e feche a tampa para iniciar o ensaio. Os resultados são fornecidos em 60 minutos, embora os positivos possam ser detectados ainda mais cedo.
10. Depois que o ensaio estiver concluído, remova a Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular do Neogen Equipamento de Detecção Molecular e descarte os tubos mergulhando-os em uma solução de 1–5% (v:v em água) de água sanitária por 1 hora, fora da área de preparação do ensaio.

AVISO: para minimizar o risco de falso-positivos por contaminação cruzada, nunca abra tubos de reagentes que contenham DNA amplificado. Isto inclui o reagente para Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*), o Neogen Controle de Reagentes e os tubos de Neogen Controle de Matriz. Sempre descarte os tubos de reagentes selados mergulhando-os em uma solução de 1–5% (v:v em água) de água sanitária por 1 hora, fora da área de preparação do ensaio.

Resultados e Interpretação

Um algoritmo interpreta a curva de saída de luz que resulta da detecção da amplificação do ácido nucleico. Os resultados são analisados automaticamente pelo software e são codificados em cores de acordo com o resultado. Um resultado é determinado positivo ou negativo pela análise de diversos parâmetros exclusivos das curvas. Resultados positivos presuntivos são relatados em tempo real, enquanto resultados negativos e resultados de inspeção serão exibidos após a conclusão da execução.

Amostras positivas presuntivas devem ser confirmadas conforme os procedimentos operacionais padrão de laboratórios, ou seguindo o método de confirmação de referência apropriado^(1, 2, 3), começando com a transferência do caldo de enriquecimento primário para as placas seletivas e a confirmação de isolados por meio de métodos bioquímicos, microscópicos e sorológicos apropriados. Para matrizes especificadas pelo MLG 5C, a separação imunomagnética deve ser feita antes do plaqueamento no meio selecionado.

NOTA: até mesmo uma amostra negativa não resultará em leitura zero, uma vez que o sistema e os reagentes de amplificação do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - Teste de Detecção Genética de STEC (*stx*) têm uma leitura de Unidades Relativas de Luz (URL) em “plano de fundo”.

Em casos raros de saída de luz fora do comum, o algoritmo rotula o caso como Inspeccionar. A Neogen recomenda que o usuário repita o ensaio para qualquer amostra Inspeccionar. Se o resultado continuar a ser “Inspeccionar”, prossiga com o teste de confirmação utilizando o método de sua preferência^(1, 2) ou conforme especificado pelos regulamentos locais.

Tabela 4. Símbolos e informações para diversos resultados de software.

Tipo de poço	Símbolo de resultado do poço	Resultado	Interpretação
Amostra		Positivo	A amostra é positiva presuntiva para o patógeno alvo.
Amostra		Negativo	A amostra é negativa presuntiva para o patógeno alvo.
Amostra		Inibido	A matriz da amostra foi inibitória para o ensaio. Pode ser necessário um novo teste. Consulte a seção de resolução de problemas e o kit de Instruções do Produto do ensaio para obter mais informações.
Amostra		Inspeccionar	A presença ou ausência do patógeno alvo foi indeterminada. Pode ser necessário um novo teste. Consulte a seção de resolução de problemas e o kit de Instruções do Produto do ensaio para obter mais informações.
Amostra		Erro	Não foi detectada bioluminescência. Pode ser necessário um novo teste. Consulte a seção de resolução de problemas e o kit de Instruções do Produto do ensaio para obter mais informações.

Apêndice A. Interrupção de protocolo: armazenamento e reteste de lisados tratados termicamente

1. Para armazenar um lisado tratado termicamente, tampe novamente o tubo de Neogen Solução de Lise com uma tampa limpa (consulte a seção **Lise**, 4.5)
2. Para armazenar uma amostra enriquecida, incube-a por no mínimo 18 horas antes do armazenamento.
3. Armazene entre 4 e 8 °C por até 72 horas.
4. Prepare uma amostra armazenada para amplificação invertendo de 2 a 3 vezes para misturar.
5. Destampe os tubos.
6. Coloque os tubos de lisado misturados no Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular e aqueça a 100 ± 1 °C por 5 ± 1 minuto.
7. Retire o rack de tubos Neogen Solução de Lise do Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular e deixe esfriar no Neogen Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular por pelo menos 5 minutos e no máximo 10 minutos.
8. Continue o protocolo na seção **Amplificação** detalhada acima.

Referências:

1. Microbiology Laboratory Guidebook. U. S. Department of Agriculture (USDA) Food Safety and Inspection Service (FSIS) Microbiology Laboratory guidebook 5C.00. Detection and isolation of top seven Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STECs) from meat products and carcass and environmental sponges. Feb 4, 2019.
2. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. October 2018.
3. ISO/TS 13136:2012: Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups
4. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good laboratory practice for nonclinical laboratory studies.
5. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
6. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
7. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. Contate seu representante da Neogen Food Safety para obter uma cópia deste documento.

Explicação dos 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 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.

FS00917A