










-  (EN) **Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes***
-  (FR) **Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* version 2**
-  (DE) **Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis**
-  (IT) **Analisi molecolare di seconda generazione per il rilevamento di *Listeria monocytogenes***
-  (ES) **Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes***
-  (NL) **Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes***
-  (SV) **Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes***
-  (DA) **Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes***
-  (NO) **Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes***
-  (FI) **Molekyläärinen testisetti 2 - *Listeria monocytogenes***
-  (PT) **Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2**
-  (EL) **Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes***
-  (PL) **Molekularny test do wykrywania 2 — *Listeria monocytogenes***
-  (RU) **Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes***
-  (TR) **Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2**
-  (JA) **病原菌検出アッセイ2 - リステリア・モノサイトゲネス用**
-  (ZH) **单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - 单核细胞增生李斯特菌**
-  (ZH) **分子检测套组 2 - 单增李斯特菌**
-  (TH) **ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - ลิสทีเรีย โมโนไซโตเจเนส**
-  (KO) **Molecular Detection Assay 2 - 리스테리아 모노사이토제네스**
-  (ID) **Deteksi Molekuler untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2**

2

Product Instructions

Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes*

Product Description and Intended Use

Neogen® Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* is used with the Neogen® Molecular Detection System for the rapid and specific detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food and environmental samples. The Neogen Molecular Detection Assays use loop-mediated isothermal amplification to rapidly amplify nucleic acid sequences with high specificity and sensitivity, combined with bioluminescence to detect the amplification. Presumptive positive results are reported in real-time while negative results are displayed after the assay is completed. Presumptive positive results should be confirmed using your preferred method or as specified by local regulations ^(1, 2, 3).

The Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* is intended for use in a laboratory environment by professionals trained in laboratory techniques. Neogen has not documented the use of this product in industries other than food or beverage. For example, Neogen has not documented this product for testing water, pharmaceutical, cosmetic, clinical or veterinary samples. The Neogen Molecular Detection Assay - 2 *Listeria monocytogenes* has not been evaluated with all possible testing protocols or with all possible strains of bacteria.

As with all test methods, the source, formulation and quality of enrichment medium can influence the results. Factors such as sampling methods, testing protocols, sample preparation, handling, and laboratory technique may also influence results. Neogen recommends evaluation of the method including enrichment medium, in the user’s environment using a sufficient number of samples with particular foods and microbial challenges to ensure that the method meets the user’s criteria.

Neogen has evaluated the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* with Demi-Fraser Broth containing Ferric Ammonium Citrate and Fraser Broth containing Ferric Ammonium Citrate as needed. A typical formulation of this medium follows below.

Demi-Fraser Broth Base Typical Formula	(g/L)	Fraser Broth Base Typical Formula	(g/L)
Sodium Chloride	20 g	Sodium Chloride	20 g
Sodium Phosphate, dibasic, anhydrous*	9.6 g	Sodium Phosphate, dibasic, anhydrous*	9.6 g
Beef Extract	5.0 g	Beef Extract	5.0 g
Pancreatic Digest of Casein	5.0 g	Pancreatic Digest of Casein	5.0 g
Peptic Digest of Animal Tissue	5.0 g	Peptic Digest of Animal Tissue	5.0 g
Yeast Extract	5.0 g	Yeast Extract	5.0 g
Lithium Chloride	3.0 g	Lithium Chloride	3.0 g
Potassium Phosphate, monobasic	1.35 g	Potassium Phosphate, monobasic	1.35 g
Esculin	1.0 g	Esculin	1.0 g
Acriflavin HCl	0.0125 g	Acriflavin HCl	0.025 g
Nalidixic Acid	0.01 g	Nalidixic Acid	0.02 g

* Substitute: Sodium Phosphate, dibasic, dihydrate 12.0 g

Fraser Broth Supplement

(Ingredients per 10 mL vial. One vial is added to one liter of basal medium.)

Ferric Ammonium Citrate 0.5g/10mL

Final pH 7.2 ± 0.2 at 25°C

The Neogen® Molecular Detection Instrument is intended for use with samples that have undergone heat treatment during the assay lysis step, which is designed to destroy organisms present in the sample. Samples that have not been properly heat treated during the assay lysis step may be considered a potential biohazard and should NOT be inserted into the Neogen Molecular Detection Instrument.

Neogen Food Safety is certified to ISO (International Organization for Standardization) 9001 for design and manufacturing.

The Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* test kit contains 96 tests, described in Table 1.

Table 1. Neogen Molecular Detection Assay Kit Components

Item	Identification	Quantity	Contents	Comments
Neogen® Lysis Solution (LS)	Pink solution in clear tubes	96 (12 strips of 8 tubes)	580 µL of LS per tube	Racked and ready to use
Neogen® Molecular Detection Assay 2 - <i>Listeria monocytogenes</i> Reagent Tubes	Yellow tubes	96 (12 strips of 8 tubes)	Lyophilized specific amplification and detection mix	Ready to use
Extra caps	Yellow caps	96 (12 strips of 8 caps)		Ready to use
Neogen® Reagent Control (RC)	Clear flip-top tubes	16 (2 pouches of 8 individual tubes)	Lyophilized control DNA, amplification and detection mix	Ready to use

The Negative Control, not provided in the kit, is sterile enrichment medium, e.g., Demi-Fraser Broth. Do not use water as a Negative Control.

Safety

The user should read, understand and follow all safety information in the instructions for the Neogen Molecular Detection System and the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes*. Retain the safety instructions for future reference.

⚠ WARNING: Indicates a hazardous situation, which, if not avoided, could result in death or serious injury and/or property damage.

NOTICE: Indicates a potentially hazardous situation which, if not avoided, could result in property damage.

⚠ WARNING

Do not use the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* in the diagnosis of conditions in humans or animals.

The Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* method may generate *Listeria monocytogenes* to levels sufficient to cause stillbirths and fatalities in pregnant women and the immunocompromised, if exposed.

The user must train its personnel in current proper testing techniques: for example, Good Laboratory Practices, ISO/IEC 17025⁽⁴⁾, or ISO 7218⁽⁵⁾.

To reduce the risks associated with a false-negative result leading to the release of contaminated product:

- Follow the protocol and perform the tests exactly as stated in the product instructions.
- Store the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* as indicated on the package and in the product instructions.
- Always use the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* by the expiration date.
- Use the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* for food and environmental samples that have been validated internally or by a third party.
- Use the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* only for surfaces, sanitizers, protocols and bacterial strains that have been validated internally or by a third party.
- For an environmental sample containing Neutralizing Buffer with aryl sulfonate complex, perform a 1:2 dilution before testing (1 part sample into 1 part sterile enrichment broth). Another option is to transfer 10 µL of the NB enrichment into the Neogen Lysis Solution tubes. Neogen® Sample Collection products which include Neutralizing Buffer with aryl sulfonate complex: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G and HS2410NB2G.

To reduce the risks associated with exposure to chemicals and biohazards:

- It is strongly recommended that female laboratory staff be informed of the risk to a developing fetus resulting from infection of the mother through exposure to *Listeria monocytogenes*.
- Perform pathogen testing in a properly equipped laboratory under the control of trained personnel. Incubated enrichment media and equipment or surfaces that have come into contact with incubated enrichment media may contain pathogens at levels sufficient to cause risk to human health.
- Always follow standard laboratory safety practices, including wearing appropriate protective apparel and eye protection while handling reagents and contaminated samples.
- Avoid contact with the contents of the enrichment media and reagent tubes after amplification.
- Dispose of enriched samples according to current industry standards.
- Samples that have not been properly heat treated during the assay lysis step may be considered a potential biohazard and should NOT be inserted into the Neogen Molecular Detection Instrument.

To reduce the risks associated with cross-contamination while preparing the assay:

- Always wear gloves (to protect the user and prevent introduction of nucleases).

To reduce the risks associated with environmental contamination:

- Follow current industry standards for disposal of contaminated waste.

To reduce the risks associated with exposure to hot liquids:

- Do not exceed the recommended temperature setting on heater.
- Do not exceed the recommended heating time.
- Use an appropriate, calibrated thermometer to verify the Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert temperature (e.g., a partial immersion thermometer or digital thermocouple thermometer, not a total immersion thermometer.) The thermometer must be placed in the designated location in the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert.

NOTICE

To reduce the risks associated with cross-contamination while preparing the assay:

- Change gloves prior to reagent pellet hydration.
- Use of sterile, aerosol barrier (filtered), molecular biology grade pipette tips is recommended.
- Use a new pipette tip for each sample transfer.
- Use Good Laboratory Practices to transfer the sample from the enrichment to the lysis tube. To avoid pipettor contamination, the user may choose to add an intermediate transfer step. For example, the user can transfer each enriched sample into a sterile tube.
- Use a molecular biology workstation containing germicidal lamp where available. Periodically decontaminate laboratory benches and equipment (pipettes, cap/decap tools, etc.) with a 1- 5% (v:v in water) household bleach solution or DNA removal solution.

To reduce the risks associated with a false-positive result:

- Never open reagent tubes post amplification.
- Always dispose of the contaminated tubes by soaking in a 1-5% (v:v in water) household bleach solution or equivalent solution for 1 hour and away from the assay preparation area.
- Never autoclave reagent tubes post amplification.

Consult the Safety Data Sheet for additional information and local regulations for disposal.

If you have questions about specific applications or procedures, please visit our website at www.neogen.com or contact your local Neogen representative or distributor.

User Responsibility

Users are responsible for familiarizing themselves with product instructions and information. Visit our website at www.neogen.com, or contact your local Neogen representative or distributor for more information.

When selecting a test method, it is important to recognize that external factors such as sampling methods, testing protocols, sample preparation, handling, and laboratory technique may influence results.

It is the user’s responsibility in selecting any test method or product to evaluate a sufficient number of samples with the appropriate matrices and microbial challenges to satisfy the user that the chosen test method meets the user’s criteria.

It is also the user’s responsibility to determine that any test methods and results meet its customers’ and suppliers’ requirements.

As with any test method, results obtained from use of any Neogen Food Safety product do not constitute a guarantee of the quality of the matrices or processes tested.

To help customers evaluate the method for various food matrices, Neogen has developed the Neogen® Molecular Detection Matrix Control kit. When needed, use the Matrix Control (MC) to determine if the matrix has the ability to impact the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* results. Test several samples representative of the matrix, i.e., samples obtained from different origin, during any validation period when adopting the Neogen method or when testing new or unknown matrices or matrices that have undergone raw material or process changes.

A matrix can be defined as a type of product with intrinsic properties such as composition and process. Differences between matrices may be as simple as the effects caused by differences in their processing or presentation for example, raw vs. pasteurized; fresh vs. dried, etc.

Limitation of Warranties / Limited Remedy

EXCEPT AS EXPRESSLY STATED IN A LIMITED WARRANTY SECTION OF INDIVIDUAL PRODUCT PACKAGING, NEOGEN DISCLAIMS ALL EXPRESS AND IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, ANY WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR USE. If any Neogen Food Safety Product is defective, Neogen or its authorized distributor will, at its option, replace or refund the purchase price of the product. These are your exclusive remedies. Please contact your Neogen representative or authorized Neogen distributor for any further questions.

Limitation of Neogen Liability

NEOGEN WILL NOT BE LIABLE FOR ANY LOSS OR DAMAGES, WHETHER DIRECT, INDIRECT, SPECIAL, INCIDENTAL OR CONSEQUENTIAL DAMAGES, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO LOST PROFITS. In no event shall Neogen's liability under any legal theory exceed the purchase price of the product alleged to be defective.

Storage and Disposal

Store the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* at 2-8°C. Do not freeze. Keep kit away from light during storage. After opening the kit, check that the foil pouch is undamaged. If the pouch is damaged, do not use. After opening, unused reagent tubes should always be stored in the re-sealable pouch with the desiccant inside to maintain stability of the lyophilized reagents. Store resealed pouches at 2-8°C for no longer than 60 days.

Do not use Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* past the expiration date. Expiration date and lot number are noted on the outside label of the box. After use, the enrichment medium and the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* tubes can potentially contain pathogenic materials. When testing is complete, follow current industry standards for the disposal of contaminated waste. Consult the Safety Data Sheet for additional information and local regulations for disposal.

Instructions for Use

Follow all instructions carefully. Failure to do so may lead to inaccurate results.

Periodically decontaminate laboratory benches and equipment (pipettes, cap/decap tools, etc.) with a 1-5% (v:v in water) household bleach solution or DNA removal solution.

The user should complete the Neogen Molecular Detection System operator qualification (OQ) training, as described in the "Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System" document⁽⁶⁾.

See Section "Specific Instructions for validated methods" for specific requirements:

Table 3 for enrichment protocols according to AOAC® *Official Method of Analysis*SM **2016.08** and AOAC® *Performance Tested Method*SM Certificate #081501.

Table 4 for enrichment protocols according to NF Validation certificate **3M 01/15-09/16**.

Sample Enrichment

Tables 2, 3 or 4 present guidance for the enrichment of food and environmental samples. It is the user's responsibility to validate alternate sampling protocols or dilution ratios to ensure this test method meets the user's criteria.

Foods

1. Allow the Demi-Fraser Broth enrichment medium (includes ferric ammonium citrate) to equilibrate to ambient laboratory temperature.
2. Aseptically combine the enrichment medium and sample according to Tables 2, 3 or 4. For all meat and highly particulate samples, the use of filter bags is recommended.
3. Homogenize thoroughly by blending, stomaching, or hand mixing for 2 ± 0.2 minutes. Incubate at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ according to Tables 2, 3 or 4.
4. For raw dairy products (see Tables 2, 3 or 4), transfer 0.1 mL of the primary enrichment into 10 mL of Fraser Broth. Incubate at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 20-24 hours.

Environmental samples

Sample collection devices can be a sponge hydrated with a neutralizing solution to inactivate the effects of the sanitizers. Neogen recommends the use of a biocide-free cellulose sponge. Neutralizing solution can be Dey-Engley (D/E) Neutralizing Broth or Lethen Broth. It is recommended to sanitize the area after sampling.

WARNING: Should you select to use Neutralizing Buffer (NB) that contains aryl sulfonate complex as the hydrating solution for the sponge, it is required to perform a 1:2 dilution (1 part sample into 1 part sterile enrichment broth) of the enriched environmental sample before testing in order to reduce the risks associated with a false-negative result leading to the release of contaminated product. Another option is to transfer 10 μL of the neutralizing buffer enrichment into the Neogen Lysis Solution tubes.

The recommended size of the sampling area to verify the presence or absence of the pathogen on the surface is at least 100 cm² (10 cm x 10 cm or 4" x 4"). When sampling with a sponge, cover the entire area going in two directions (left to right then up and down) or collect environmental samples following your current sampling protocol or according to the FDA BAM⁽¹⁾, USDA FSIS MLG⁽²⁾ or ISO 18593⁽⁷⁾ guidelines.

1. Allow the Demi-Fraser Broth enrichment medium (includes ferric ammonium citrate) to equilibrate to ambient laboratory temperature.

2. Aseptically combine the enrichment medium and sample according to Tables 2, 3 or 4.
3. Homogenize thoroughly by blending, stomaching, or hand mixing for 2 ± 0.2 minutes. Incubate at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24-30 hours according to Tables 2, 3, or 4.

Table 2: General enrichment protocols at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ using Demi-Fraser Broth and Fraser Broth as needed.

Sample Matrix	Sample Size	Enrichment Broth Volume (mL)	Enrichment Time (hours)				
Heat-processed, cooked, cured meats, poultry, seafood and fish	25 g	225	24-30				
Heat-processed / pasteurized dairy products							
Produce and vegetables							
Multi-component foods							
Environmental samples ^(a)	1 sponge	100 or 225	24-30				
	1 swab	10	24-30				
Raw meat, poultry, seafood, fish	25 g	475	28-32				
Sample Matrix	Primary Enrichment (Demi-Fraser Broth) ^(a)			Secondary Enrichment (Fraser Broth) ^(a)			Sample Analysis Volume ^(b)
	Sample Size	Enrichment Broth Volume (mL)	Enrichment Time (hours)	Sample Size	Enrichment Temperature ($^\circ\text{C}$)	Enrichment Time (hours)	
Raw dairy products	25 g	225	20-24	Transfer 0.1 mL into 10 mL Fraser Broth	37 ± 1	20-24	10 μL

(a) Demi-Fraser and Fraser Broth should always be supplemented with Fraser Broth supplement (ferric ammonium citrate) during primary or secondary enrichment.

(b) Volume of sample transferred to the Neogen Lysis Solution tubes. Refer to Step 4.6 of Lysis section.

Specific Instructions for Validated Methods
AOAC® Official Method of AnalysisSM 2016.08
AOAC® Performance Tested MethodSM #081501



In AOAC Research Institute OMASM and PTMSM programs, the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* was found to be an effective method for the detection of *Listeria monocytogenes*. The matrices tested in the study are shown in Table 3.

Table 3. Enrichment protocols using Demi-Fraser Broth^(a) at 37 ± 1 °C according to AOAC OMASM 2016.08 and PTMSM Certificate #081501.

Sample Matrix		Sample Size	Enrichment Broth Volume (mL)	Enrichment Time (hours)
Beef hot dogs, queso fresco, vanilla ice cream, 4% milk fat cottage cheese, 3% chocolate whole milk, romaine lettuce, bagged raw spinach, cold smoked salmon		25 g	225	24-30
Raw chicken		25 g	475	28-32
Deli turkey		125 g	1125	24-30
Cantaloupe ^(b)		Whole melon	Enough volume to allow melon to float	26-30
Environmental samples:	Stainless steel	1 sponge	225	24-30
	Sealed concrete	1 sponge	100	24-30
	Plastic ^(c)	1 swab	10	24-30

All samples for the AOAC validation were homogenized by stomaching unless otherwise noted.

- (a) Demi-Fraser and Fraser Broth should always be supplemented with Fraser Broth supplement (ferric ammonium citrate) during primary or secondary enrichment.
- (b) Homogenize sample by hand mixing.
- (c) Homogenize sample by vortexing.

NF VALIDATION by AFNOR Certification



3M 01/15-09/16

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

For more information about end of validity, please refer to NF VALIDATION certificate available on the website mentioned above.

NF VALIDATION certified method in compliance with ISO 16140-2⁽⁶⁾ in comparison to ISO 11290⁽³⁾

Scope of the validation: All human food and environmental samples (excluding primary production samples)

Sample preparation: Samples should be prepared according to EN ISO 11290-1⁽³⁾ and EN ISO 6887⁽⁶⁾

Software version: See certificate

Table 4: Enrichment protocols according to NF VALIDATION certified method 3M 01/15-09/16 at 37 ± 1°C using Demi-Fraser Broth and Fraser Broth as needed.

General Protocol	Sample Size	Enrichment Broth Volume (mL)	Enrichment Temperature (±1°C)	Enrichment Time (hours)	Sample Analysis Volume ^(a)	Accepted Interruption Point
All food samples (excepted raw meats, raw seafood, and raw dairy products)	25 g	225	37	24-30	20 µL	<ul style="list-style-type: none"> • Demi-Fraser Broth up to 72 hours • Lysate at -20°C • Lysate at 4°C up to 72 hours
Environmental samples	25 g, 1 swab, or 1 wipe					



Specific Protocol	Primary Enrichment (Demi-Fraser Broth) ^(b)				Secondary Enrichment (Fraser Broth) ^(b)				Accepted Interruption Point
	Sample Size	Enrichment Broth Volume (mL)	Enrichment Temperature (±1°C)	Enrichment Time (hours)	Sample Size	Enrichment Temperature (±1°C)	Enrichment Time (hours)	Sample Analysis Volume ^(c)	
Raw meats, raw seafood, and raw dairy products	25 g	225	37	20-24	Transfer 0.1 mL into 10 mL Fraser Broth	37	20-24	10 µL	<ul style="list-style-type: none"> • Fraser Broth up to 72 hours • Lysate at -20°C • Lysate at 4°C up to 72 hours

- (a) Volume of sample transferred to the Neogen Lysis Solution tubes. Refer to Step 4.6 of Lysis section.
- (b) Demi-Fraser and Fraser Broth should always be supplemented with Fraser Broth supplement (ferric ammonium citrate) during primary or secondary enrichment.
- (c) Volume of sample transferred to the Neogen Lysis Solution tubes. Refer to Step 4.6 of Lysis section.

NOTE: Samples larger than 25 g have not been tested in the NF validation study.

Preparation of the Neogen® Molecular Detection Speed Loader Tray

1. Wet a cloth with a 1-5% (v:v in water) household bleach solution or equivalent solution and wipe the Neogen® Molecular Detection Speed Loader Tray.
2. Rinse the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray with water.
3. Use a disposable towel to wipe the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray dry.
4. Ensure the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray is dry before use.

Preparation of the Neogen® Molecular Detection Chill Block Insert

Place the Neogen® Molecular Detection Chill Block directly on the laboratory bench; Use the chill block at ambient laboratory temperature (20-25°C).

Preparation of the Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert

Place the Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert in a dry double block heater unit. Turn on the dry block heater unit and set the temperature to allow the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert to reach and maintain a temperature of 100 ± 1°C.

NOTE: Depending on the heater unit, allow approximately 30 minutes for the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert to reach temperature. Using an appropriate, calibrated thermometer (e.g., a partial immersion thermometer or digital thermocouple thermometer, **not** a total immersion thermometer) placed in the designated location, verify that the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert is at 100 ± 1°C.

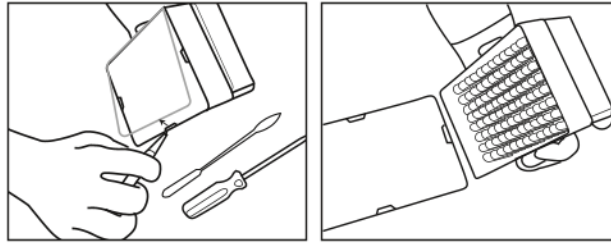
Preparation of the Neogen® Molecular Detection Instrument

1. Launch the Neogen® Molecular Detection System Software and log in. Contact your Neogen Food Safety representative to ensure you have the most updated version of the software.
2. Turn on the Neogen Molecular Detection Instrument.
3. Create or edit a run with data for each sample. Refer to the Neogen Molecular Detection System User Manual for details.

NOTE: The Neogen Molecular Detection Instrument must reach Ready State before inserting the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray with reaction tubes. This heating step takes approximately 20 minutes and is indicated by an ORANGE light on the instrument’s status bar. When the instrument is ready to start a run, the status bar will turn GREEN.

Lysis

Remove the bottom of Neogen Lysis Solution Rack with a screwdriver or spatula before placing in in the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert.



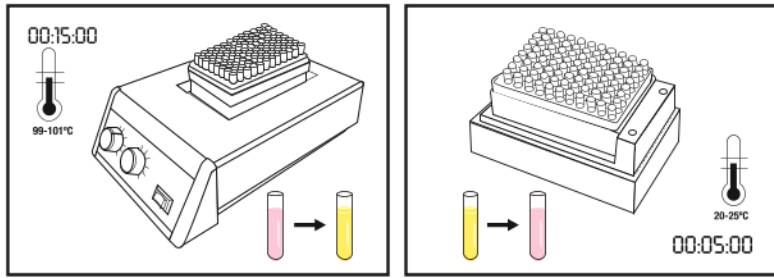
1. Allow the lysis solution (Neogen Lysis Solution) tubes to warm up by setting the rack at room temperature (20-25°C) overnight (16-18 hours). Alternatives to equilibrate the Neogen Lysis Solution tubes to room temperature are to set the Neogen Lysis Solution tubes on the laboratory bench for at least 2 hours, incubate the Neogen Lysis Solution tubes in a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ incubator for 1 hour or place them in a dry double block heater for 30 seconds at 100°C .
2. Invert the capped tubes to mix. Proceed to next step within 4 hrs.
3. Remove the enrichment broth from the incubator.
4. One Neogen Lysis Solution tube is required for each sample and the Negative Control (NC) sample (sterile enrichment medium).
 - 4.1 Neogen Lysis Solution tube strips can be cut to desired Neogen Lysis Solution tube number. Select the number of individual Neogen Lysis Solution tubes or 8-tube strips needed. Place the Neogen Lysis Solution tubes in an empty rack.
 - 4.2 To avoid cross-contamination, decap one Neogen Lysis Solution tubes strip at a time and use a new pipette tip for each transfer step.
 - 4.3 Transfer enriched samples to Neogen Lysis Solution Tubes as described below:

Transfer each enriched sample into an individual Neogen Lysis Solution tube **first**. Transfer the NC **last**.

- 4.4 Use the Neogen® Molecular Detection Cap/Decap Tool-Lysis to decap one Neogen Lysis Solution tube strip – one strip at a time.
- 4.5 Discard the Neogen Lysis Solution tube cap – if lysate will be retained for retest, place the caps into a clean container for re-application after lysis.
 - 4.5.1 For processing of retained lysate, see Appendix A.
- 4.6 Transfer 20 μL of sample into a Neogen Lysis Solution tube unless otherwise indicated in Protocols from Tables 2, 3, or 4 (e.g., raw dairy products or when using environmental samples with neutralizing buffer use 10 μL).



5. Repeat step 4.4 to 4.6 until each individual sample has been added to a corresponding Neogen Lysis Solution tube in the strip.
6. When all samples have been transferred, transfer 20 μL of NC (sterile enrichment medium, e.g., Demi-Fraser Broth) into a Neogen Lysis Solution tube. Do not use water as a NC.
7. Verify that the temperature of the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert is at $100 \pm 1^\circ\text{C}$.
8. Place the uncovered rack of Neogen Lysis Solution tubes in the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert and heat for 15 ± 1 minutes. During heating, the Neogen Lysis Solution will change from pink (cool) to yellow (hot).
 - 8.1 Samples that have not been properly heat treated during the assay lysis step may be considered a potential biohazard and should NOT be inserted into the Neogen Molecular Detection Instrument.
9. Remove the uncovered rack of Neogen Lysis Solution tubes from the heating block and allow to cool in the Neogen Molecular Detection Chill Block Insert at least 5 minutes and a maximum of 10 minutes. The Neogen Molecular Detection Chill Block Insert used at ambient temperature should sit directly on the laboratory bench. When cool, the lysis solution will revert to a pink color.
10. Remove the rack of Neogen Lysis Solution tubes from the Neogen Molecular Detection Chill Block Insert.

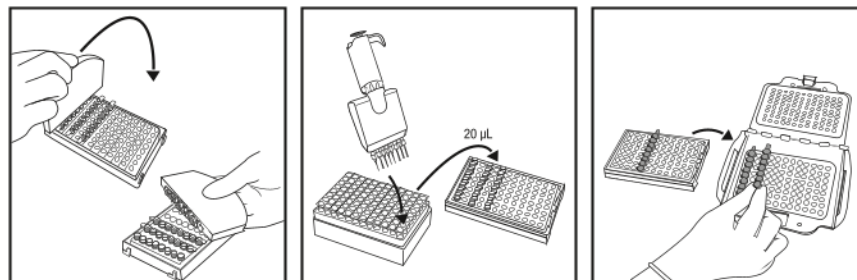


Amplification

1. One Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* Reagent Tube is required for each sample and the NC.
 - 1.1 Reagent tube strips can be cut to desired tube number. Select the number of individual Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* Reagent Tubes or 8-tube strips needed.
 - 1.2 Place Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* Reagent Tubes in an empty rack.
 - 1.3 Avoid disturbing the reagent pellets from the bottom of the tubes.
2. Select 1 Neogen Reagent Control tube and place in rack.
3. To avoid cross-contamination, decap one Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* Reagent Tube strip at a time and use a new pipette tip for each transfer step.
4. Transfer lysate to Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* Reagent Tubes and Neogen Reagent Control tube as described below:

Transfer each sample lysate into individual Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* Reagent Tubes **first** followed by the NC. Hydrate the Neogen Reagent Control tube **last**.

5. Use the Neogen® Molecular Detection Cap/Decap Tool-Reagent to decap the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* Reagent Tubes –one Reagent tube strip at a time. Discard cap.
 - 5.1 **Transfer 20 µL of Sample lysate from the upper ½ of the liquid (avoid precipitate) in the Neogen Lysis Solution tube into corresponding Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* Reagent Tube. Dispense at an angle to avoid disturbing the pellets. Mix by gently pipetting up and down 5 times.**
 - 5.2 Repeat step 5.1 until individual Sample lysate has been added to a corresponding Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* Reagent Tube in the strip.
 - 5.3 Cover the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* Reagent Tubes with the provided extra caps and use the rounded side of the Neogen Molecular Detection Cap/Decap Tool-Reagent to apply pressure in a back and forth motion ensuring that the cap is tightly applied.
 - 5.4 Repeat step 5.1 to 5.3 as needed, for the number of samples to be tested.
 - 5.5 When all sample lysates have been transferred, repeat steps 5.1 to transfer 20 µL of NC lysate into a Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* Reagent Tube.
 - 5.6 Transfer **20 µL of NC lysate into a Neogen Reagent Control tube**. Dispense at an angle to avoid disturbing the pellets. Mix by gently pipetting up and down 5 times.
6. Load capped tubes into a clean and decontaminated Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray. Close and latch the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray lid.



7. Review and confirm the configured run in the Neogen Molecular Detection System Software.
8. Click the Start button in the software and select instrument for use. The selected instrument’s lid automatically opens.
9. Place the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray into the Neogen Molecular Detection Instrument and close the lid to start the assay. Results are provided within 75 minutes, although positives may be detected sooner.

10. After the assay is complete, remove the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray from the Neogen Molecular Detection Instrument and dispose of the tubes by soaking in a 1-5% (v:v in water) household bleach solution or equivalent solution for 1 hour and away from the assay preparation area.

NOTICE: To minimize the risk of false positives due to cross-contamination, never open reagent tubes containing amplified DNA. This includes Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* Reagent Tubes, Neogen Reagent Control and Matrix Control tubes. Always dispose of sealed reagent tubes by soaking in a 1-5% (v:v in water) household bleach solution or equivalent solution for 1 hour and away from the assay preparation area.

Results and Interpretation






An algorithm interprets the light output curve resulting from the detection of the nucleic acid amplification. Results are analyzed automatically by the software and are color-coded based on the result. A Positive or Negative result is determined by analysis of a number of unique curve parameters. Presumptive positive results are reported in real-time while Negative and Inspect results will be displayed after the run is completed.

Presumptive positive samples should be confirmed as per the laboratory standard operating procedures or by following the appropriate reference method confirmation^(1,2,3), beginning with transfer from the primary enrichment to secondary enrichment broth (if applicable), followed by subsequent plating and confirmation of isolates using appropriate biochemical and serological methods.

NOTE: Even a negative sample will not give a zero reading as the system and Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* amplification reagents have a “background” relative light unit (RLU) reading.

In the rare event of any unusual light output, the algorithm labels this as “Inspect.” Neogen recommends the user to repeat the assay for any Inspect samples. If the result continues to be Inspect, proceed to confirmation test using your preferred method or as specified by local regulations.

Table 5: Result symbols for samples and interpretation as provided by the Neogen Molecular Detection System Software.

Well Type	Well Result Symbol	Result	Interpretation
Sample		Positive	The sample is presumptive positive for the target pathogen.
Sample		Negative	The sample is negative for the target pathogen.
Sample		Inhibited	The sample matrix was inhibitory to the assay. A re-test may be required. Refer to the troubleshooting section and the assay kit Product Instructions for more information.
Sample		Inspect	The presence or absence of the target pathogen was indeterminate. A re-test may be required. Refer to the troubleshooting section and the assay kit Product Instructions for more information.
Sample		Error	No bioluminescence was detected. A re-test may be required. Refer to the troubleshooting section and the assay kit Product Instructions for more information.

Confirmation of Results According to the NF VALIDATION Certified Method

Option 1: Using the ISO 11290⁽³⁾ standard starting from Demi-Fraser enrichment

Option 2: By isolation on PALCAM agar or on chromogenic agar (O&A) forming part of a NF VALIDATION certified method for detection of the *Listeria monocytogenes*. The presence of characteristic colonies is sufficient to confirm the presence of *Listeria monocytogenes*.

Option 3: Using nucleic acid probes as described in EN ISO 7218⁽⁵⁾ standard, performed on isolated colonies, from selective agar (see Options 1 or 2).

Option 4: Using any other method certified NF VALIDATION, the principle of which must be different from Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes*. The complete protocol described for this second validated method must be used. All steps prior to the start of confirmation must be common to both methods.

In the event of discordant results (presumptive positive with the alternative method, non-confirmed by one of the means described above) the laboratory must follow the necessary steps to ensure the validity of the result obtained.

In the event of discordant results (presumptive positive with the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes*, non-confirmed by one of the means described above, the laboratory must follow the necessary steps to ensure the validity of the results obtained.

If you have questions about specific applications or procedures, please visit our website at www.neogen.com or contact your local Neogen representative or distributor.

Appendix A. Protocol Interruption: Storage and re-testing of heat-treated lysates.

1. To store a heat-treated lysate, re-cap the lysis tube with a clean cap (see “Lysis”, 4.5)
2. Store at 4 to 8°C for up to 72 hours.
3. Prepare a stored sample for amplification by inverting 2-3 times to mix.
4. Decap the tubes.
5. Place the mixed lysate tubes on Neogen Molecular Detection Heat Block Insert and heat at $100 \pm 1^\circ\text{C}$ for 5 ± 1 minutes.
6. Remove the rack of Neogen Lysis Solution tubes from the heating block and allow to cool in the Neogen Molecular Detection Chill Block Insert at least 5 minutes and a maximum of 10 minutes.
7. Continue the protocol at the ‘Amplification’ section detailed above.

References:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Explanation of Product Label Symbols

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.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.
FS00867B

Instructions relatives au produit

Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* version 2

Description et utilisation du produit

Le kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen® version 2 est utilisé avec le système de détection moléculaire Neogen® pour la détection rapide et spécifique après enrichissement des *Listeria monocytogenes* dans des aliments enrichis et des échantillons environnementaux. Les kits de détection moléculaire Neogen utilisent la technique LAMP (amplification isotherme médiée par des boucles) afin d'amplifier rapidement les séquences d'acide nucléique de façon extrêmement spécifique et sensible, associée à la bioluminescence pour détecter l'amplification. Les résultats présumés positifs sont visibles en temps réel tandis que les résultats négatifs sont affichés à la fin de l'essai. Les résultats présumés positifs doivent être confirmés par la méthode de votre choix ou en utilisant une méthode conforme aux réglementations locales^(1,2,3).

Le Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 est destiné à être utilisé au sein de laboratoires, par des professionnels formés aux techniques s'y rapportant. Neogen n'a pas étudié l'utilisation de ce produit dans des secteurs autres que l'alimentaire et les boissons. Par exemple, Neogen n'a pas étudié ce produit dans le cadre de tests sur des échantillons d'eau, pharmaceutiques, cosmétiques, cliniques ou vétérinaires. Le Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 n'a pas été évalué en utilisant tous protocoles de test ou toutes les souches bactériennes possibles.

Comme avec toutes les méthodes de test, la source, la formulation et la qualité du milieu d'enrichissement peuvent influencer les résultats. Des facteurs tels que les méthodes d'échantillonnage, les protocoles de test, la préparation des échantillons, la manipulation et les techniques de laboratoires peuvent également influencer les résultats. Neogen recommande d'évaluer la méthode, notamment le milieu d'enrichissement, dans l'environnement de l'utilisateur à l'aide d'un nombre d'échantillons suffisant et avec des charges microbiennes déterminées pour répondre aux critères de l'utilisateur.

Neogen a évalué le Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 avec du bouillon demi-Fraser contenant du citrate d'ammonium ferrique et du bouillon Fraser contenant du citrate d'ammonium ferrique en fonction des besoins. La formulation typique de ce milieu est indiquée ci-dessous.

Formule typique de la base du bouillon demi-Fraser	(g/L)	Formule typique de la base du bouillon Fraser	(g/L)
Chlorure de sodium	20 g	Chlorure de sodium	20 g
Phosphate de sodium dibasique anhydre*	9,6 g	Phosphate de sodium dibasique anhydre*	9,6 g
Extrait de bœuf	5,0 g	Extrait de bœuf	5,0 g
Digestat pancréatique de caséine	5,0 g	Digestat pancréatique de caséine	5,0 g
Digestat peptique de tissu animal	5,0 g	Digestat peptique de tissu animal	5,0 g
Extrait de levure	5,0 g	Extrait de levure	5,0 g
Chlorure de lithium	3,0 g	Chlorure de lithium	3,0 g
Phosphate de potassium, monobasique	1,35 g	Phosphate de potassium, monobasique	1,35 g
Esculine	1,0 g	Esculine	1,0 g
Hydrochlorure d'acriflavine	0,0125 g	Hydrochlorure d'acriflavine	0,025 g
Acide nalidixique	0,01 g	Acide nalidixique	0,02 g

* Substitut : Phosphate de sodium, dibasique, dihydrate 12,0 g

Complément de bouillon Fraser

(Ingrédients par flacon de 10 mL. Ajout d'un flacon par litre de milieu basal.)

Citrate d'ammonium ferrique 0,5 g/10 mL

pH final 7,2 ± 0,2 à 25 °C

L'instrument de détection moléculaire Neogen® est conçu pour être utilisé avec des échantillons traités thermiquement pendant l'étape de lyse, procédé qui détruit les organismes présents dans l'échantillon. Les échantillons qui n'ont pas été soumis à un traitement thermique adéquat pendant l'étape de lyse peuvent être considérés comme potentiellement dangereux et ne doivent PAS être insérés dans l'instrument de détection moléculaire Neogen.

Neogen Sécurité Alimentaire respecte la norme ISO (International Organization for Standardization) 9001 en matière de conception et de fabrication.

Le Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 contient 96 tests, décrits dans le tableau 1.

Tableau 1. Composants du Kit de détection moléculaire Neogen

Élément	Identification	Quantité	Contenu	Commentaires
Solution de lyse (LS) Neogen®	Solution rose en tubes transparents	96 (12 barrettes de 8 tubes)	580 µL de LS par tube	Placé sur portoir et prêt à l'emploi
Tubes de réactif du kit de détection moléculaire <i>Listeria monocytogenes</i> Neogen® version 2	Tubes jaunes	96 (12 barrettes de 8 tubes)	Mélange spécifique lyophilisé pour l'amplification et la détection	Prêts à l'emploi
Bouchons supplémentaires	Bouchons jaunes	96 (12 barrettes de 8 bouchons)		Prêts à l'emploi
Contrôle de réactif Neogen® (RC)	Tubes « Flip-Top » transparents	16 (2 poches de 8 tubes individuels)	ADN témoin lyophilisé, mélange pour l'amplification et la détection	Prêts à l'emploi

Le témoin négatif, non fourni dans le kit, est un milieu d'enrichissement stérile, par exemple du bouillon demi-Fraser. Ne pas utiliser d'eau comme témoin négatif.

Sécurité

L'utilisateur doit lire, comprendre et suivre toutes les informations de sécurité mentionnées dans les instructions relatives au système de détection moléculaire Neogen et au Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2. Conserver ces consignes de sécurité pour référence ultérieure.

⚠ AVERTISSEMENT : indique une situation dangereuse qui, si elle n'est pas évitée, pourrait entraîner un décès, des blessures graves et/ou des dommages matériels.

AVIS : indique une situation potentiellement dangereuse qui, si elle n'est pas évitée, pourrait entraîner des dommages matériels.

⚠ AVERTISSEMENT

Ne pas utiliser le Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 pour diagnostiquer des pathologies chez les humains ou les animaux.

La méthode du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 peut générer des niveaux de *Listeria monocytogenes* suffisants pour causer une mortalité in utéro chez les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées, en cas d'exposition.

L'utilisateur doit former son personnel aux techniques d'analyse actuelles appropriées, par exemple : les bonnes pratiques de laboratoire, la norme ISO/CEI 17025⁽⁴⁾ ou la norme ISO 7218⁽⁵⁾.

Afin de réduire les risques associés aux faux négatifs, qui peuvent entraîner la diffusion de produits contaminés :

- Se conformer au protocole et effectuer les tests en suivant exactement les instructions relatives au produit.
- Conserver le Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 conformément aux indications sur l'emballage et aux instructions relatives au produit.
- Toujours utiliser le Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 avant la date de péremption.
- Utiliser le Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 pour des aliments et des échantillons environnementaux ayant été validés en interne ou par une tierce partie.
- N'utiliser le Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 pour des surfaces, des désinfectants, des protocoles et des souches bactériennes validés en interne ou par une tierce partie.
- En cas d'échantillon environnemental contenant un tampon neutralisant avec un composé d'aryle sulfonate, diluer l'échantillon dans un bouillon d'enrichissement stérile 1:2 avant l'analyse (1 volume d'échantillon pour 1 volume de bouillon). Une autre option consiste à transférer 10 µL de l'enrichissement du tampon neutralisant dans les tubes de solution de lyse Neogen. Produits pour le recueil des échantillons Neogen® comprenant un tampon neutralisant contenant un complexe d'aryle sulfonate : RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G et HS2410NB2G.

Afin de réduire les risques associés à l'exposition aux produits chimiques et aux dangers biologiques :

- Le personnel féminin du laboratoire doit être informé des risques sur le fœtus en développement dus à l'infection de la mère suite à une exposition à *Listeria monocytogenes*.
- Effectuer les analyses bactériologiques dans un laboratoire correctement équipé et sous la supervision de professionnels qualifiés. Les milieux et les équipements d'enrichissement incubés ou les surfaces ayant été en contact avec des milieux d'enrichissement incubés peuvent contenir des agents pathogènes à des niveaux suffisamment élevés pour entraîner des risques pour la santé humaine.
- Toujours respecter les consignes de sécurité courantes du laboratoire, porter des tenues et lunettes de protection adaptées lors de la manipulation de réactifs et d'échantillons contaminés.
- Éviter tout contact avec le contenu du milieu d'enrichissement et les tubes de réactifs après l'amplification.
- Éliminer les échantillons enrichis conformément aux normes du secteur actuelles.
- Les échantillons qui n'ont pas été soumis à un traitement thermique adéquat pendant l'étape de lyse peuvent être considérés comme potentiellement dangereux et ne doivent PAS être insérés dans l'instrument de détection moléculaire Neogen.

Afin de réduire les risques associés à la contamination croisée lors de la préparation de l'analyse :

- Toujours porter des gants (afin de protéger l'utilisateur et de prévenir l'introduction de nucléases).

Pour réduire les risques associés à la contamination environnementale :

- Respecter les normes en vigueur concernant l'élimination des déchets contaminés.

Afin de réduire les risques associés à l'exposition à des liquides très chauds :

- Ne pas dépasser le paramètre de température recommandé sur le dispositif de chauffe.
- Ne pas dépasser le temps de chauffe recommandé.
- Utiliser un thermomètre étalonné adapté pour vérifier la température du support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen® (p. ex. thermomètre à immersion partielle ou thermomètre à thermocouple numérique et non un thermomètre à immersion totale). Le thermomètre doit être placé à l'endroit indiqué du support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen.

AVIS**Afin de réduire les risques associés à la contamination croisée lors de la préparation de l'analyse :**

- Changer de gants avant l'hydratation des pastilles réactives.
- Utiliser de préférence des pipettes de qualité conforme à la biologie moléculaire, stériles et munies d'embouts à filtre.
- Utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque transfert d'échantillon.
- Utiliser les bonnes pratiques de laboratoire pour transférer l'échantillon de l'enrichissement vers le tube de lyse. Pour éviter toute contamination des pipettes, l'utilisateur peut choisir d'ajouter une étape de transfert intermédiaire. Par exemple, l'utilisateur peut transférer chaque échantillon enrichi dans un tube stérile.
- Utiliser un poste de travail de biologie moléculaire disposant si possible d'une lampe germicide. Décontaminer régulièrement les plans de travail et le matériel du laboratoire (pipettes, outils d'ouverture/de fermeture, etc.) avec une solution d'eau de Javel à 1 et 5 % (v:v dans de l'eau) ou avec une solution pour l'élimination de l'ADN.

Afin de réduire les risques associés à un résultat faux positif :

- Ne jamais ouvrir les tubes de réactif après amplification.
- Toujours éliminer les tubes contaminés en les faisant tremper dans une solution d'eau de Javel concentrée à 1 et 5 % (v:v dans l'eau) ou une solution équivalente pendant 1 heure. Effectuer cette procédure à distance de la zone de préparation de l'analyse.
- Ne jamais stériliser à l'autoclave les tubes de réactifs après amplification.

Consulter la fiche de données de sécurité pour obtenir des informations supplémentaires et connaître la réglementation locale relative à la mise au rebut.

Pour toute question concernant des applications ou procédures spécifiques, consulter notre site Internet à l'adresse www.neogen.com ou contacter votre représentant ou distributeur Neogen local.

Responsabilité de l'utilisateur

Il incombe aux utilisateurs de prendre connaissance des instructions et des informations relatives au produit.

Consulter notre site Web www.neogen.com ou contacter votre représentant ou distributeur Neogen local pour obtenir de plus amples informations.

Lors du choix d'une méthode de test, il est important d'admettre que des facteurs externes comme les méthodes d'échantillonnage, les protocoles d'analyse, la préparation des échantillons, la manipulation et les techniques de laboratoire peuvent influencer les résultats.

Il incombe à l'utilisateur de sélectionner une méthode ou un produit d'analyse adapté pour évaluer un nombre suffisant d'échantillons avec les matrices et les souches microbiennes appropriées, afin de garantir que la méthode d'analyse est conforme à ses critères.

Il incombe également à l'utilisateur de déterminer si une méthode d'analyse et ses résultats répondent aux exigences de ses clients ou fournisseurs.

Comme pour toute méthode d'analyse, les résultats obtenus avec un produit Neogen Sécurité Alimentaire ne constituent pas une garantie de la qualité des matrices ou des processus testés.

Dans le but d'aider les clients à évaluer la méthode pour différentes matrices alimentaires, Neogen a élaboré le kit de contrôle de matrice pour système de détection moléculaire Neogen®. Lorsque cela est nécessaire, utilisez le contrôle de matrice (MC) pour déterminer si la matrice peut avoir un impact sur les résultats du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2. Tester plusieurs échantillons représentatifs de la matrice, c.-à-d. des échantillons d'origines différentes, au cours de toute période de validation lors de l'adoption de la méthode Neogen ou dans le cadre d'analyses de matrices nouvelles, inconnues ou ayant subi des modifications de matières premières ou de processus.

Une matrice peut être définie comme un type de produit présentant des propriétés intrinsèques, telles que la composition et le processus. Les différences entre les matrices peuvent être aussi simples que les effets causés par leurs différences de traitement ou de présentation, par exemple, cru/pasteurisé, frais/sec, etc.

Limitations de garanties/Limites de recours

SAUF SI EXPRESSÉMENT ÉTABLI DANS LA SECTION DE GARANTIE LIMITÉE D'UN EMBALLAGE DE PRODUIT INDIVIDUEL, NEOGEN RENONCE À TOUTE GARANTIE EXPLICITE ET IMPLICITE, Y COMPRIS, MAIS SANS S'Y LIMITER, TOUTE GARANTIE DE COMMERCIALISATION OU D'ADAPTATION POUR UN USAGE SPÉCIFIQUE. En cas de défaut de tout produit Neogen Sécurité Alimentaire, Neogen ou son distributeur agréé s'engage, à son entière discrétion, au remplacement ou au remboursement du prix d'achat du produit. Il s'agit de vos recours exclusifs. Merci de contacter votre représentant Neogen ou votre distributeur Neogen agréé pour toute autre question.

Limitation de responsabilité de Neogen

NEOGEN NE SERA PAS TENUE RESPONSABLE DES PERTES OU DES DOMMAGES ÉVENTUELS, QU'ILS SOIENT DIRECTS, INDIRECTS, SPÉCIFIQUES, ACCIDENTELS OU CONSÉCUTIFS, Y COMPRIS, MAIS SANS S'Y LIMITER, LES PERTES DE PROFITS. En aucun cas et en aucune manière, la responsabilité de Neogen ne sera engagée au-delà du prix d'achat du produit prétendu défectueux.

Stockage et mise au rebut

Conserver le Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler. Conserver à l'abri de la lumière. Une fois le kit ouvert, vérifier que le sachet en aluminium est intact. Si ce sachet est endommagé, ne pas utiliser le kit. Après ouverture, les tubes de réactif non utilisés doivent toujours être conservés dans le sachet refermable, en laissant l'agent déshydratant à l'intérieur afin de maintenir la stabilité des réactifs lyophilisés. Conserver les poches refermées à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ne pas conserver plus de 60 jours.

Ne pas utiliser le Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 après la date de péremption. La date de péremption et le numéro de lot sont inscrits sur l'étiquette extérieure de la boîte. Après utilisation, il est possible que les tubes de milieu d'enrichissement et du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 contiennent des éléments pathogènes. Lorsque l'analyse est terminée, suivre les normes actuelles du secteur pour l'élimination des déchets contaminés. Consulter la fiche de données de sécurité pour obtenir des informations supplémentaires et connaître la réglementation locale relative à la mise au rebut.

Instructions d'utilisation

Suivre attentivement toutes les instructions. Dans le cas contraire, les résultats obtenus risquent d'être inexacts.

Décontaminer régulièrement les plans de travail et le matériel du laboratoire (pipettes, outils d'ouverture/de fermeture, etc.) avec une solution de 1 et 5 % d'eau de Javel (v:v dans de l'eau) ou avec une solution pour l'élimination de l'ADN.

L'utilisateur doit suivre la formation de qualification de l'opérateur (OQ) du système de détection moléculaire Neogen, comme décrit dans le document intitulé « Protocoles et instructions relatifs à la qualification d'installation (IQ)/qualification opérationnelle (OQ) pour le système de détection moléculaire Neogen »⁽⁶⁾.

Se référer à la section « Instructions spécifiques pour méthodes validées » pour connaître les exigences spécifiques :

Voir le tableau 3 pour les protocoles d'enrichissement selon l'AOAC® *Official Method of Analysis*SM 2016.08 et l'AOAC® *Performance Tested Method*SM Certificat n° 081501.

Voir le tableau 4 pour les protocoles d'enrichissement selon la méthode de certification NF Validation 3M 01/15-09/16.

Enrichissement de l'échantillon

Les tableaux 2, 3 et 4 fournissent des indications pour l'enrichissement des échantillons d'aliments et environnementaux. Il incombe à l'utilisateur de valider des protocoles d'échantillonnage ou des proportions de dilution différent(e)s pour garantir que cette méthode d'analyse est conforme à ses critères.

Aliments

1. Laisser le milieu d'enrichissement bouillon demi-Fraser (contenant du citrate ferrique d'ammonium) s'équilibrer à la température ambiante du laboratoire.
2. Mélanger de manière aseptique le milieu d'enrichissement et l'échantillon conformément au tableau 2, 3 ou 4. Pour tous les échantillons de viande et à forte teneur en particules, il est recommandé d'utiliser des sacs avec filtre.
3. Homogénéiser soigneusement par homogénéisation mécanique, homogénéisation péristaltique ou mélange manuel pendant $2 \pm 0,2$ minutes. Incuber à 37 ± 1 °C conformément aux tableaux 2, 3 ou 4.
4. Pour les produits laitiers crus (voir les tableaux 2, 3 ou 4), transférer 0,1 mL de l'enrichissement primaire dans 10 mL de bouillon Fraser. Incuber à 37 ± 1 °C pendant 20 à 24 heures.

Échantillons environnementaux

Le dispositif de prélèvement d'échantillons peut être une éponge hydratée avec une solution neutralisante pour désactiver les effets des désinfectants. Neogen recommande d'utiliser une éponge en cellulose sans biocide. La solution neutralisante peut être un bouillon neutralisant Dey-Engley (D/E) ou un bouillon Letheen. Il est recommandé de désinfecter la zone après l'échantillonnage.

AVERTISSEMENT : si vous choisissez d'utiliser un tampon neutralisant (NB) contenant un complexe d'aryle sulfonate comme solution hydratante pour l'éponge, il sera nécessaire d'effectuer une dilution de 1:2 (1 volume d'échantillon pour 1 volume de bouillon d'enrichissement stérile) avant l'analyse, afin de réduire les risques associés aux résultats faux négatifs pouvant conduire à la libération de produit contaminé. Une autre option consiste à transférer 10 µL de l'enrichissement du tampon neutralisant dans les tubes de solution de lyse Neogen.

La taille minimale recommandée pour la zone d'échantillonnage destinée à vérifier l'absence ou la présence du pathogène à la surface est de 100 cm² (10 cm x 10 cm ou 4 po x 4 po). Lors de l'échantillonnage avec une éponge, couvrez toutes la zone dans les deux directions (de gauche à droite puis de haut en bas) ou prélevez des échantillons environnementaux en suivant votre protocole d'échantillonnage actuel ou selon les directives de la FDA BAM⁽¹⁾, USDA FSIS MLG⁽²⁾ ou ISO 18593⁽⁷⁾.

1. Laisser le milieu d'enrichissement bouillon demi-Fraser (contenant du citrate ferrique d'ammonium) s'équilibrer à la température ambiante du laboratoire.
2. Mélanger de manière aseptique le milieu d'enrichissement et l'échantillon conformément au tableau 2, 3 ou 4.
3. Homogénéiser soigneusement par homogénéisation mécanique, homogénéisation péristaltique ou mélange manuel pendant $2 \pm 0,2$ minutes. Incuber à 37 ± 1 °C pendant 24 à 30 heures, conformément aux tableaux 2, 3 ou 4.

Tableau 2 : Protocoles d'enrichissement généraux. À 37 ± 1 °C utilisant du bouillon demi-Fraser ou Fraser selon les besoins.

Matrice de l'échantillon	Taille de l'échantillon	Volume du bouillon d'enrichissement (mL)	Durée d'enrichissement (h)				
Viandes, volaille et poisson transformés par la chaleur, cuits ou séchés	25 g	225	24-30				
Produits laitiers transformés par la chaleur ou pasteurisés							
Fruits et légumes							
Aliments multi-composants							
Échantillons environnementaux ^(a)	1 éponge	100 ou 225	24-30				
	1 tampon	10	24-30				
Viande, volaille, fruits de mer, poissons crus	25 g	475	28-32				
Matrice de l'échantillon	Enrichissement primaire (bouillon demi-Fraser) ^(a)			Enrichissement secondaire (bouillon Fraser) ^(a)			Volume d'échantillon d'analyse ^(b)
	Taille de l'échantillon	Volume du bouillon d'enrichissement (mL)	Durée d'enrichissement (h)	Taille de l'échantillon	Température d'enrichissement (°C)	Durée d'enrichissement (h)	
Produits laitiers crus	25 g	225	20-24	Transférez 0,1 mL dans 10 mL de bouillon Fraser	37 ± 1	20-24	10 µL

(a) Les bouillons Fraser et demi-Fraser doivent toujours être supplémentés avec un supplément de bouillon Fraser (avec citrate ferrique d'ammonium) pendant l'enrichissement primaire ou secondaire.

(b) Volume d'échantillon transféré dans les tubes de solution de lyse Neogen. Consulter l'étape 4.6 de la section Lyse.

Instructions spécifiques pour méthodes validées
Official Method of AnalysisSM de l'AOAC® 2016.08
AOAC® Performance Tested MethodSM #081501



Dans les programmes OMASM et PTMSM de l'Institut de recherche de l'AOAC, il a été démontré que le Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 était une méthode efficace de détection de *Listeria monocytogenes*. Les matrices testées au cours de l'étude sont répertoriées dans le tableau 3.

Tableau 3. Protocoles d'enrichissement utilisant du bouillon demi-Fraser Broth^(a) à 37 ± 1 °C conformément à l'AOAC OMASM 2016.08 et au certificat PTMSM n° 081501.

Matrice de l'échantillon		Taille de l'échantillon	Volume du bouillon d'enrichissement (mL)	Durée d'enrichissement (h)
Hot dogs de bœuf, fromage frais, glace à la vanille, fromage blanc au lait à 4 % de matières grasses, lait entier au chocolat 3 %, laitue romaine, épinards crus en sachet, saumon fumé froid		25 g	225	24-30
Poulet cru		25 g	475	28-32
Dinde préparée		125 g	1125	24-30
Melon ^(b)		Melon entier	Assez de volume pour permettre au melon de flotter	26-30
Échantillons environnementaux :	Acier inoxydable	1 éponge	225	24-30
	Béton verni	1 éponge	100	24-30
	Plastique ^(c)	1 tampon	10	24-30

Tous les échantillons pour la validation AOAC ont été homogénéisés par homogénéisation mécanique sauf indication contraire.

- Les bouillons Fraser et demi-Fraser doivent toujours être supplémentés avec un supplément de bouillon Fraser (avec citrate ferrique d'ammonium) pendant l'enrichissement primaire et secondaire.
- Homogénéiser l'échantillon en mélangeant à la main.
- Homogénéiser l'échantillon au vortex.

Méthode certifiée par AFNOR Certification



3M 01/15-09/16

MÉTHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE POUR L'AGROALIMENTAIRE

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

Pour plus d'information sur l'expiration de la validité, se reporter au certificat NF VALIDATION disponible sur le site Internet cité ci-dessus.

Méthode de certification NF VALIDATION, conformément à la norme ISO 16140-2⁽⁶⁾ par rapport à la norme ISO 11290⁽³⁾ Portée de la validation : tous aliments pour l'alimentation humaine et échantillons environnementaux (à l'exception des échantillons de production primaires)

Préparation de l'échantillon : les échantillons doivent être préparés conformément aux normes EN ISO 11290-1⁽³⁾ et EN ISO 6887⁽⁸⁾

Version logicielle : voir le certificat

Tableau 4 : Protocoles d'enrichissement conformes à la méthode de certification NF VALIDATION certifiée 3M 01/15-09/16 à 37 ± 1 °C utilisant du bouillon demi-Fraser et Fraser selon les besoins.

Protocole général	Taille de l'échantillon	Volume du bouillon d'enrichissement (mL)	Température d'enrichissement (± 1 °C)	Durée d'enrichissement (h)	Volume d'échantillon d'analyse ^(a)	Point d'interruption accepté
Tout type d'échantillon alimentaire (sauf viandes crues, fruits de mer crus et produits laitiers crus)	25 g	225	37	24-30	20 µL	<ul style="list-style-type: none"> • Bouillon demi-Fraser jusqu'à 72 heures • Lysat à -20 °C • Lysat à 4 °C jusqu'à 72 heures
Échantillons environnementaux	25 g, 1 écouvillon ou 1 lingette					

Protocole spécifique	Enrichissement primaire (bouillon demi-Fraser) ^(b)				Enrichissement secondaire (bouillon Fraser) ^(b)				Point d'interruption accepté
	Taille de l'échantillon	Volume du bouillon d'enrichissement (mL)	Température d'enrichissement (± 1 °C)	Durée d'enrichissement (h)	Taille de l'échantillon	Température d'enrichissement (± 1 °C)	Durée d'enrichissement (h)	Volume d'échantillon d'analyse ^(c)	
Viandes crues, fruits de mer crus et produits laitiers crus	25 g	225	37	20-24	Transférer 0,1 mL dans 10 mL de bouillon Fraser	37	20-24	10 µL	<ul style="list-style-type: none"> • Bouillon Fraser jusqu'à 72 heures • Lysat à -20 °C • Lysat à 4 °C jusqu'à 72 heures

(a) Volume d'échantillon transféré dans les tubes de solution de lyse Neogen. Consulter l'étape 4.6 de la section Lyse.

(b) Les bouillons Fraser et demi-Fraser doivent toujours être supplémentés avec un supplément de bouillon Fraser (avec citrate ferrique d'ammonium) pendant l'enrichissement primaire et secondaire.

(c) Volume d'échantillon transféré dans les tubes de solution de lyse Neogen. Consulter l'étape 4.6 de la section Lyse.

REMARQUE : Les échantillons supérieurs à 25 g n'ont pas été testés dans le cadre de l'étude NF Validation.

Préparation du plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen®

1. Humidifier un chiffon à l'aide d'une solution de 1 et 5 % d'eau de Javel (v:v dans de l'eau) ou une solution équivalente et nettoyer le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen®.
2. Rincer le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen à l'eau.
3. Utiliser un chiffon jetable pour sécher le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen.
4. S'assurer que le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen est sec avant toute utilisation.

Préparation du support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen®

Plateau de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen® directement sur la paillasse de laboratoire, utiliser le bloc refroidissant à la température ambiante du laboratoire (20 à 25 °C).

Préparation du support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen®

Placer le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen® dans une unité de traitement thermique à sec double bloc. Allumer l'unité de traitement thermique à sec et régler la température afin que le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen atteigne et conserve une température de 100 ± 1 °C.

REMARQUE : selon l'unité de traitement thermique utilisée, le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen atteint la température souhaitée en 30 minutes environ. Utiliser un thermomètre étalonné adapté (p. ex., un thermomètre à immersion partielle ou un thermomètre à thermocouple numérique, et **non** un thermomètre à immersion totale) placé à l'endroit indiqué du support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen afin de vérifier que sa température est de 100 ± 1 °C.

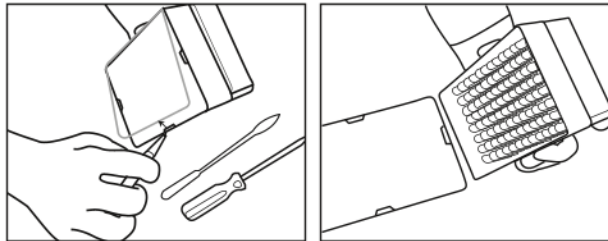
Préparation de l'instrument de détection moléculaire Neogen®

1. Lancer le logiciel du Système de détection moléculaire Neogen® et ouvrir une session. Contacter votre représentant Neogen Sécurité Alimentaire pour vous assurer d'avoir la version la plus récente du logiciel.
2. Mettre l'instrument de détection moléculaire Neogen sous tension.
3. Créer ou modifier une analyse en saisissant les données pour chaque échantillon. Pour plus de précisions, consulter le manuel d'utilisation du système de détection moléculaire Neogen.

REMARQUE : l'instrument de détection moléculaire Neogen doit être prêt avant l'insertion du plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen, dans lequel sont placés les tubes de réactif. Cette étape de chauffage prend environ 20 minutes ; pendant ce processus, un voyant lumineux ORANGE s'allume sur la barre d'état de l'instrument. Lorsque l'instrument est prêt pour l'analyse, la barre d'état passe au VERT.

Lyse

Retirer le portoir pour tubes de solution de lyse Neogen avec un tournevis ou une spatule avant de le placer dans le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen.

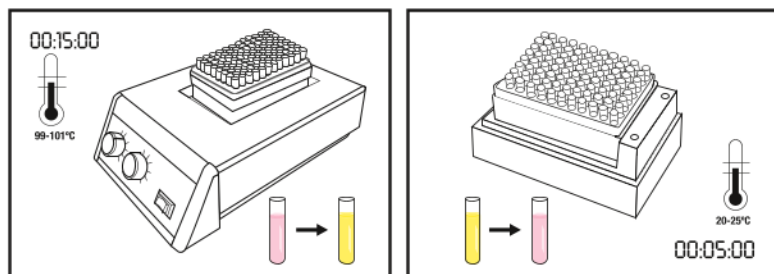


1. Laisser les tubes de solution de lyse Neogen se réchauffer en plaçant le support à température ambiante (20 et 25 °C) pendant une nuit (16 à 18 heures). Il est également possible d'amener les tubes de solution de lyse Neogen à température ambiante en les plaçant sur le plan de travail du laboratoire pendant au moins 2 heures, en incubant les tubes de solution de lyse Neogen dans un incubateur à 37 ± 1 °C pendant 1 heure ou en les plaçant dans une unité de traitement thermique à sec double bloc pendant 30 secondes à 100 °C.
2. Retourner les tubes recouverts d'un bouchon pour les mélanger. Passer à l'étape suivante dans un délai de 4 heures.
3. Retirer le bouillon d'enrichissement de l'incubateur.
4. Un tube de solution de lyse Neogen est nécessaire pour chaque échantillon et pour le témoin négatif (NC) (milieu d'enrichissement stérile).
 - 4.1 Les barrettes de tubes de solution de lyse Neogen peuvent être coupées de manière à obtenir le nombre de tubes de solution de lyse Neogen souhaité. Sélectionner le nombre de tubes de solution de lyse Neogen ou de barrettes de 8 tubes nécessaire. Placer les tubes de solution de lyse Neogen dans un portoir vide.
 - 4.2 Pour éviter toute contamination croisée, ouvrir une barrette de tubes de solution de lyse Neogen à la fois et utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque étape de transfert.
 - 4.3 Transférer les échantillons enrichis dans les tubes de solution de lyse Neogen comme indiqué ci-dessous :

Transférer tout **d'abord** chaque échantillon enrichi dans des tubes de solution de lyse Neogen individuels.
Transférer le NC en **dernier**.
 - 4.4 Ouvrir les barrettes de tubes de solution de lyse Neogen une à une à l'aide de l'outil d'ouverture/fermeture pour système de détection moléculaire Neogen® - Lyse.
 - 4.5 Jeter le bouchon du tube de solution de lyse Neogen. Si le lysat doit être soumis à un nouveau test, placer les bouchons dans un récipient propre pour réapplication après la lyse.
 - 4.5.1 Pour le traitement du lysat conservé, voir l'annexe A.
 - 4.6 Transférer 20 µL d'échantillon dans un tube de solution de lyse Neogen, sauf indication contraire dans le tableau du 2, 3 ou 4 (exemple : utiliser 10 µl avec les produits laitiers crus ou les échantillons environnementaux avec tampon neutralisant).



5. Répéter les étapes 4.4 et 4.6 jusqu'à ce que chaque échantillon individuel soit ajouté à un tube de solution de lyse Neogen correspondant sur la barrette.
6. Une fois tous les échantillons transférés, transférer **20 µL de NC** (milieu d'enrichissement stérile, p. ex. bouillon demi-Fraser) dans un tube de solution de lyse Neogen. Ne pas utiliser d'eau comme NC.
7. Vérifier que la température du support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen est de 100 ± 1 °C.
8. Placer le portoir non couvert de tubes de solution de lyse Neogen dans le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen et chauffer pendant 15 ± 1 minutes. Lors du chauffage, la solution de lyse Neogen passera de rose (froide) à jaune (chaude).
 - 8.1 Les échantillons qui n'ont pas été soumis à un traitement thermique adéquat pendant l'étape de lyse peuvent être considérés comme potentiellement dangereux et ne doivent PAS être insérés dans l'Instrument de détection moléculaire Neogen.
9. Retirer le portoir non couvert de tubes de solution de lyse Neogen du bloc chauffant et laisser refroidir dans le support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen pendant une durée comprise entre 5 et 10 minutes. Le support de bloc refroidissant Neogen utilisé à température ambiante doit être posé directement sur le plan de travail du laboratoire. Une fois froide, la solution de lyse retrouvera une couleur rose.
10. Retirer le couvercle des tubes de solution de lyse Neogen du support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen.



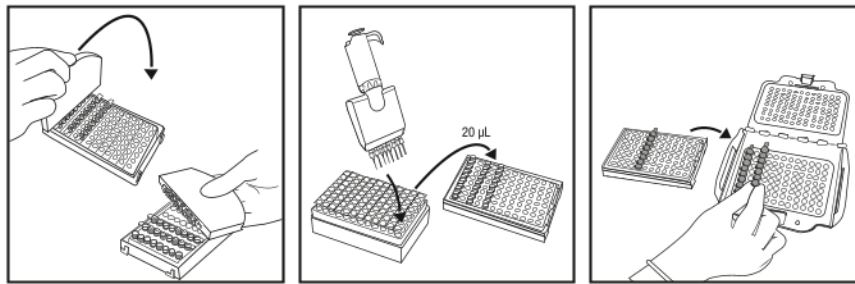
Amplification

1. Il est nécessaire d'utiliser un tube de réactif du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 pour chaque échantillon et pour le NC.
 - 1.1 Les barrettes de tubes de réactifs peuvent être coupées de manière à obtenir le nombre de tubes souhaité. Sélectionner le nombre nécessaire de tubes de réactif du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 ou de barrettes de 8 tubes.
 - 1.2 Placer les tubes de réactifs du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 dans un portoir vide.
 - 1.3 Éviter d'agiter les pastilles réactives se trouvant au fond des tubes.
2. Sélectionner 1 tube de contrôle de réactif Neogen et le placer dans le portoir.
3. Afin d'éviter toute contamination croisée, ouvrir une barrette de tubes de réactif Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 à la fois et utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque étape de transfert.
4. Transférer le lysat dans des tubes de réactif du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 et dans un tube de contrôle de réactif Neogen comme décrit ci-dessous :

Transférer **d'abord** chaque lysat d'échantillon dans un tube de réactif du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 puis faites de même avec le NC. Hydrater le tube de contrôle de réactif Neogen en **dernier**.

5. Utiliser l'outil d'ouverture/fermeture pour système de détection moléculaire Neogen® - Réactif pour ouvrir les tubes de réactif du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 un à un. Jeter le bouchon.

- 5.1 Transférer 20 µL de lysat d'échantillon prélevé au niveau de la moitié (½) supérieure du liquide (éviter le précipité) dans le tube de solution de lyse Neogen du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 correspondant. Incliner la pipette pour ne pas toucher les pastilles. Mélanger en effectuant 5 cycles d'aspiration/de refoulement avec la pipette.
 - 5.2 Répéter l'étape 5.1 jusqu'à ce que chaque lysat d'échantillon individuel ait été ajouté au tube de réactif du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 correspondant dans la barrette.
 - 5.3 Placer le capuchon supplémentaire prévu à cet effet sur les tubes de réactif du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2, puis prendre le bord arrondi de l'outil d'ouverture/fermeture pour système de détection moléculaire Neogen - Réactif et appuyer dans un mouvement de va-et-vient afin de s'assurer que le capuchon est fermement insérée sur le tube.
 - 5.4 Répéter les étapes 5.1 à 5.3 pour tous les échantillons à analyser.
 - 5.5 Lorsque tous les lysats d'échantillons ont été transférés, répéter les étapes 5.1 afin de transférer 20 µL de lysat de NC dans un tube de réactif du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2.
 - 5.6 Transférer 20 µL de lysat de NC dans un tube de contrôle de réactif Neogen. Incliner la pipette pour ne pas toucher les pastilles. Mélanger en effectuant 5 cycles d'aspiration/de refoulement avec la pipette.
6. Charger les tubes recouverts d'un bouchon dans un plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen propre et décontaminé. Fermer et verrouiller le couvercle du plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen.



7. Examiner et confirmer l'analyse configurée sur le logiciel du système de détection moléculaire Neogen.
8. Cliquer sur l'icône « Démarrer » du logiciel et sélectionner l'instrument à utiliser. Le couvercle de l'appareil sélectionné s'ouvre automatiquement.
9. Placer le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen dans l'instrument de détection moléculaire Neogen et fermer le couvercle pour lancer l'essai. Les résultats sont obtenus en 75 minutes ; toutefois, les résultats positifs peuvent être détectés plus tôt.
10. Une fois l'analyse terminée, retirer le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen de l'instrument de détection moléculaire Neogen et tremper les tubes dans une solution d'eau de Javel à 1-5 % (v:v dans de l'eau) ou une solution équivalente pendant 1 heure, et ce, à l'écart de la zone de préparation des analyses.

AVIS : pour réduire le risque de résultats faux positifs dus à une contamination croisée, ne jamais ouvrir les tubes de réactif contenant de l'ADN amplifié. Ceci comprend les tubes de réactif du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2, les tubes de contrôle de réactif Neogen et les tubes de contrôle de matrice. Toujours éliminer les tubes de réactif fermés en les faisant tremper dans une solution d'eau de Javel concentrée à 1 et 5 % (v:v dans l'eau) ou une solution équivalente pendant 1 heure. Effectuer cette procédure à distance de la zone de préparation de l'analyse.

Résultats et interprétation






Un algorithme interprète la courbe de résultats provenant de la détection de l'amplification de l'acide nucléique par bioluminescence. Les résultats sont automatiquement analysés par le logiciel et sont codés par couleur en fonction du résultat. Un résultat positif ou négatif est déterminé par l'analyse d'un nombre de paramètres des courbes individuelles. Les résultats présumés positifs sont rapportés en temps réel, tandis que les résultats négatifs ou à vérifier sont affichés à la fin de l'analyse.

Les résultats présumés positifs doivent être confirmés selon les procédures standard des laboratoires ou en suivant la confirmation de la méthode de référence appropriée^(1,2,3), en commençant par effectuer un transfert du bouillon d'enrichissement primaire vers le ou les bouillons d'enrichissement secondaires (si applicable), puis en effectuant la mise en culture et la confirmation des isolats à l'aide des méthodes biochimiques et sérologiques appropriées.

REMARQUE : même un échantillon négatif ne donnera pas de résultat égal à zéro, car le système et les réactifs d'amplification du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 effectuent une lecture d'unité relative de lumière (RLU) « de base ».

Dans le cas peu probable d'un résultat lumineux inhabituel, l'algorithme considérera l'échantillon comme « À vérifier ». Neogen recommande à l'utilisateur de recommencer l'essai pour tout échantillon considéré comme « À vérifier ». Si le résultat continue à être « À vérifier », passer au test de confirmation en utilisant la méthode de votre choix ou en utilisant une méthode conforme aux réglementations locales.

Tableau 5 : Symboles des résultats des échantillons et interprétation fournis par le logiciel du Système de détection moléculaire Neogen.

Type de puits	Symbole du résultat du puits	Résultat	Interprétation
Échantillon		Positif	L'échantillon est présumé positif pour le pathogène cible.
Échantillon		Négatif	L'échantillon est négatif pour le pathogène cible.
Échantillon		Inhibé	La matrice de l'échantillon est inhibitrice pour le test. Un second test peut être nécessaire. Consulter la section de dépannage et les instructions relatives au produit du kit de détection pour obtenir plus de renseignements.
Échantillon		À vérifier	La présence ou l'absence du pathogène cible est indéterminée. Un second test peut être nécessaire. Consulter la section de dépannage et les instructions relatives au produit du kit de détection pour obtenir plus de renseignements.
Échantillon		Erreur	Aucune bioluminescence n'a été détectée. Un second test peut être nécessaire. Consulter la section de dépannage et les instructions relatives au produit du kit de détection pour obtenir plus de renseignements.

Confirmation des résultats selon la méthode de certification NF VALIDATION

Option 1 : utilisation de la norme ISO 11290⁽³⁾ en commençant par l'enrichissement demi-Fraser.

Option 2 : par isolement sur une gélose PALCAM ou une gélose chromogène (O&A) certifiée dans le cadre d'une méthode NF VALIDATION pour la détection de *Listeria monocytogenes*. La présence de colonies caractéristiques est suffisante pour confirmer la présence de *Listeria monocytogenes*.

Option 3 : utilisation de sondes nucléiques tel que décrit dans la norme EN ISO 7218⁽⁵⁾, à partir de colonies isolées provenant de gélose sélective (voir option 1 ou 2).

Option 4 : utilisation de n'importe quelle autre méthode certifiée NF VALIDATION, dont le principe doit être différent du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2. Il convient d'utiliser l'intégralité du protocole décrit pour cette seconde méthode de validation. Toutes les étapes précédant le début de la confirmation doivent être communes aux deux méthodes.

En cas de résultats contradictoires (positif présumé avec l'autre méthode, non confirmé par l'un des moyens décrits ci-dessus), le laboratoire doit suivre les procédures nécessaires pour garantir la validité du résultat obtenu.

En cas de résultats contradictoires (positif présumé avec le Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2, non confirmé par l'un des moyens décrits ci-dessus), le laboratoire doit suivre les procédures nécessaires pour garantir la validité des résultats obtenus.

Pour toute question concernant des applications ou procédures spécifiques, consulter notre site Internet à l'adresse www.neogen.com ou contacter votre représentant ou distributeur Neogen local.

Annexe A. Interruption du protocole : stockage et nouveau test des lysats soumis à un traitement thermique.

1. Pour conserver un lysat soumis à un traitement thermique, refermer le tube de lyse avec un bouchon propre (voir « Lyse », 4.5).
2. Stocker à une température comprise entre 4 et 8 °C jusqu'à 72 heures.
3. Préparer un échantillon conservé pour amplification en retournant 2 à 3 fois pour mélanger.
4. Ouvrir les tubes.
5. Placer les tubes pour lysats mélangés dans le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen et chauffer à 100 ± 1 °C pendant 5 ± 1 minutes.
6. Retirer le portoir de tubes de solution de lyse Neogen du bloc chauffant et laisser refroidir dans le support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen pendant une durée comprise entre 5 et 10 minutes.
7. Poursuivre le protocole à la section « Amplification » détaillée ci-dessus.

Références :

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Explication des symboles des échantillons

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.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.
FS00867B

Gebrauchsanweisungen

Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis

Produktbeschreibung und Verwendungszweck

Der Neogen® Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis wird in Verbindung mit dem Neogen® Molekularen Detektionssystem für den schnellen und spezifischen Nachweis von *Listeria monocytogenes* in angereicherten Proben aus Lebensmitteln und deren Umgebungen verwendet. Die Neogen Molekularen Detektionsnachweise verwenden die mittels einer „Loop“ initiierte isotherme Amplifikation, um in Kombination mit der Biolumineszenz die Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen mit hoher Spezifität, Sensitivität und Geschwindigkeit zu detektieren. Die vorläufig positiven Ergebnisse werden in Echtzeit erstellt, während negative Ergebnisse erst nach Abschluss des Tests dargestellt werden. Die vorläufig positiven Ergebnisse müssen mithilfe eines Testverfahrens Ihrer Wahl oder gemäß den jeweils geltenden Richtlinien bestätigt werden^(1,2,3).

Der Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis ist für den Gebrauch in Laboren bestimmt und muss von Fachpersonal angewendet werden, das in Laborverfahren geschult wurde. Neogen verfügt über keine Daten zur Anwendung dieses Produkts in anderen Industrien als der Lebensmittel- und Getränkeindustrie. Zum Beispiel verfügt Neogen über keine Daten zur Verwendung dieses Produkts mit Wasser-, Pharmazeutika-, Kosmetika- oder klinischen und tiermedizinischen Proben. Der Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis wurde nicht für alle möglichen Testprotokolle oder für alle möglicherweise vorkommenden Bakterienstämme evaluiert.

Wie bei allen Testverfahren können die Ergebnisse durch die Quelle, Zusammensetzung und Qualität des Anreicherungsmediums beeinflusst werden. Faktoren wie Probennahme, Testprotokolle, Probenaufbereitung, Handhabung und Labortechnik können die Ergebnisse beeinflussen. Neogen empfiehlt die Beurteilung der Methode einschließlich Anreicherungsmedium in der Umgebung des Benutzers mit einer ausreichenden Anzahl an Proben mit bestimmten Lebensmitteln und mikrobiellen Pathogenen, um sicherzustellen, dass die Methode den Anforderungen des Benutzers entspricht.

Neogen hat den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis je nach Bedarf mit Demi Fraser Basis Bouillon mit Eisen-Ammonium-Citrat und Fraser Basis Bouillon mit Eisen-Ammonium-Citrat evaluiert. Nachfolgend ist eine typische Formulierung dieses Mediums angegeben.

Typische Formulierung einer Demi Fraser Basis Bouillon	(g/l)	Typische Formulierung einer Fraser Basis Bouillon	(g/l)
Natriumchlorid	20 g	Natriumchlorid	20 g
Natriumphosphat, zweibasisch, wasserfrei*	9,6 g	Natriumphosphat, zweibasisch, wasserfrei*	9,6 g
Rindfleisch-Extrakt	5,0 g	Rindfleisch-Extrakt	5,0 g
Pankreatisch verdautes Casein	5,0 g	Pankreatisch verdautes Casein	5,0 g
Peptisch verdautes tierisches Gewebe	5,0 g	Peptisch verdautes tierisches Gewebe	5,0 g
Hefeextrakt	5,0 g	Hefeextrakt	5,0 g
Lithiumchlorid	3,0 g	Lithiumchlorid	3,0 g
Kaliumphosphat, einbasisch	1,35 g	Kaliumphosphat, einbasisch	1,35 g
Aesculin	1,0 g	Aesculin	1,0 g
Acriflavin-HCl	0,0125 g	Acriflavin-HCl	0,025 g
Nalidixinsäure	0,01 g	Nalidixinsäure	0,02 g

* Ersatz: Natriumphosphat, zweibasisch, Dihydrat 12,0 g

Fraser Basis Bouillon-Ergänzung

(Zutaten pro 10-ml-Fläschchen. Ein Fläschchen wird zu einem Liter Basismedium hinzugefügt.)

Eisen-Ammonium-Citrat 0,5 g/10 ml

Finaler pH-Wert 7,2 ± 0,2 bei 25 °C

Das Neogen® Molekulare Detektion – Gerät ist für die Verwendung mit Proben bestimmt, die während der Nachweis-Lyse wärmebehandelt wurden, wodurch die in der Probe vorhandenen Organismen zerstört werden sollen. Proben, die während der Lyse nicht ordnungsgemäß wärmebehandelt wurden, stellen möglicherweise ein biologisches Risiko dar und sollten NICHT in das Neogen Molekulare Detektion – Gerät eingesetzt werden.

Neogen Food Safety hat für die Bereiche Entwicklung und Fertigung die Zertifizierung ISO 9001 der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erhalten.

Das Testkit für den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis enthält 96 Tests, die in Tabelle 1 beschrieben sind.

Tabelle 1. Komponenten des Neogen Molekularen Detektions Assays

Artikel	Kennzeichnung	Stückzahl	Inhalt	Kommentare
Neogen® Lyselösung (LS)	Rosafarbene Lösung in transparenten Gefäßen	96 (12 Streifen mit je 8 Gefäßen)	580 µl LS pro Gefäß	Abgefüllt und gebrauchsfertig
Reagenzgefäße für den Neogen® Molekulare Detektion 2 – <i>Listeria monocytogenes</i> Nachweis	Gelbe Gefäße	96 (12 Streifen mit je 8 Gefäßen)	Lyophilisierte spezifische Amplifikations- und Detektionsmischung	Gebrauchsfertig
Zusätzliche Kappen	Gelbe Kappen	96 (12 Streifen mit je 8 Kappen)		Gebrauchsfertig
Neogen® Reagenzkontrolle (RC)	Durchsichtige Gefäße	16 (2 Beutel mit 8 einzelnen Gefäßen)	Lyophilisierte Kontroll-DNS, Amplifikations- und Detektionsmatrix	Gebrauchsfertig

Die Negativkontrolle (nicht im Kit enthalten) ist ein steriles Anreicherungsmedium, z. B. Demi Fraser Bouillon. Als Negativkontrolle kein Wasser verwenden.

Sicherheit

Der Anwender muss sämtliche in der Gebrauchsanleitung des Neogen Molekularen Detektionssystems und des Neogen Molekularen Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis aufgeführten Sicherheitshinweise gelesen und verstanden haben. Bewahren Sie diese Sicherheitshinweise auf, um später auf sie zurückgreifen zu können.

⚠ WARNUNG: Bezeichnet eine Gefahrensituation, die – wenn sie nicht vermieden wird – zum Tode oder zu schweren Verletzungen und/oder Sachschäden führen kann.

HINWEIS: Bezeichnet eine potenzielle Gefahrensituation, die – wenn sie nicht vermieden wird – zu Sachschäden führen kann.

⚠ WARNUNG

Den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis nicht zur Diagnose von Erkrankungen bei Menschen oder Tieren einsetzen.

Die bei der Methode mit dem Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis entstehenden Mengen an *Listeria monocytogenes* können ausreichen, um bei schwangeren Frauen und immungeschwächten Menschen Totgeburten und Todesfälle zu verursachen, wenn sie diesen ausgesetzt werden.

Der Anwender muss sein Personal in den entsprechenden Testmethoden unterweisen: z. B. laut den Grundsätzen der guten Laborpraxis, ISO/IEC 17025⁽⁴⁾ oder ISO 7218⁽⁵⁾.

Maßnahmen zur Reduzierung der mit einem falsch negativen Ergebnis verbundenen Risiken, die zur Freigabe eines kontaminierten Produkts führen können:

- Befolgen Sie das Protokoll und führen Sie die Tests genau wie in der Gebrauchsanweisung angegeben durch.
- Lagern Sie den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis wie auf der Packung und in den Gebrauchsanweisungen beschrieben.
- Verwenden Sie den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis stets vor Ablauf des Verfalldatums.
- Verwenden Sie den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis für Lebensmittel- und Umgebungsproben, die intern oder durch Dritte validiert wurden.
- Verwenden Sie den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis nur für Oberflächen, Desinfektionsmittel, Protokolle und Bakterienstämme, die intern oder durch Dritte validiert wurden.
- Wenn Sie eine Umgebungsprobe haben, die einen Neutralisationspuffer mit einem Acrylsulfonat-Komplex enthält, dann müssen Sie vor dem Testen der Probe eine 1:2 Verdünnung (1 Teil Probe in 1 Teil steriler Anreicherungsbouillon) vornehmen. Ebenso können Sie 10 µl Anreicherungsmedium mit Neutralisationspuffer (NB) in die Neogen Lysegefäße übertragen. Neogen® Produkte zur Probennahme, die Neutralisationspuffer mit Acrylsulfonat-Komplex enthalten: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G und HS2410NB2G.

Zur Verminderung der Risiken, die mit der Exposition gegenüber Chemikalien und biogefährlichen Stoffen verbunden sind:

- Es wird dringend empfohlen, das weibliche Laborpersonal über das Risiko für einen sich entwickelnden Fötus zu informieren, das sich aus einer Infektion der Mutter durch Kontakt mit *Listeria monocytogenes* ergibt.
- Führen Sie die Testverfahren mit Pathogenen in einem entsprechend ausgerüsteten Labor und unter der Aufsicht von geschultem Fachpersonal durch. Inkubierte Anreicherungsmedien und Arbeitsgeräte oder Oberflächen, die in Kontakt mit inkubierten Anreicherungsmedien gekommen sind, können so stark mit Krankheitserregern belastet sein, dass ein Risiko für die menschliche Gesundheit besteht.
- Befolgen Sie stets die üblichen Labor-Sicherheitsmaßnahmen und tragen Sie bei der Handhabung von Reagenzien und kontaminierten Proben angemessene Schutzkleidung und geeigneten Augenschutz.
- Vermeiden Sie nach der Amplifikation den Kontakt mit dem Anreicherungsmedium und den Reagenzgefäßen.
- Die angereicherten Proben sind gemäß Branchenstandards zu entsorgen.
- Proben, die während der Lyse nicht ordnungsgemäß wärmebehandelt wurden, stellen möglicherweise ein biologisches Risiko dar und sollten NICHT in das Neogen Molekulare Detektion – Gerät eingesetzt werden.

Zur Verminderung von Kreuzkontaminationsrisiken bei der Vorbereitung des Tests:

- Tragen Sie stets Handschuhe (sowohl zum Schutz des Anwenders als auch, um ein Einbringen von Nukleasen zu vermeiden).

Zur Verringerung der Risiken, die mit Umweltkontamination verbunden sind:

Bei der Entsorgung sind die aktuellen Industrienormen zur Entsorgung von kontaminiertem Abfall zu beachten.

Zur Verminderung der Risiken, die mit der Exposition gegenüber heißen Flüssigkeiten verbunden sind:

- Achten Sie darauf, die empfohlene Temperatur des Heizgeräts nicht zu überschreiten.
- Achten Sie darauf, die empfohlene Anwärmdauer nicht zu überschreiten.
- Verwenden Sie ein geeignetes, kalibriertes Thermometer, um sicherzustellen, dass der Neogen® Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz die richtige Temperatur aufweist (z. B. ein Thermometer zum partiellen Eintauchen oder ein Digitalthermometer, kein Tauchthermometer). Das Thermometer muss an der vorgesehenen Stelle des Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatzes platziert werden.

HINWEIS

Zur Verminderung von Kreuzkontaminationsrisiken bei der Vorbereitung des Tests:

- Wechseln Sie vor Hydratation der Reagenzpellets die Handschuhe.
- Es wird empfohlen, sterile, hochreine Pipettenspitzen mit Aerosolschutz (Filter) zu verwenden.
- Verwenden Sie für jede Probenübertragung eine neue Pipettenspitze.
- Wenden Sie die Grundsätze der Guten Laborpraxis bei der Übertragung der angereicherten Probe auf das Lysegefäß an. Um eine Kontamination der Pipette zu vermeiden, sollte der Anwender bei der Übertragung einen Zwischenschritt durchführen. Beispielsweise kann der Anwender jede angereicherte Probe auf ein steriles Gefäß übertragen.
- Sofern möglich, arbeiten Sie an einer molekularbiologischen Arbeitsstation mit Germizidlampe. Desinfizieren Sie die Laborbänke und Arbeitsgeräte (Pipetten, Cap/Decap-Werkzeuge usw.) regelmäßig mit einer 1–5%igen Haushaltsbleichmittellösung (v:v in Wasser) oder DNS-Entfernungslösung.

Zur Verminderung der Risiken, die mit einem falsch positiven Ergebnis verbunden sind:

- Öffnen Sie die Reagenzgefäße niemals nach der Amplifikation.
- Kontaminierte Gefäße immer aus dem Nachweis-Vorbereitungsbereich entfernen und für 1 Stunde in einer 1–5%igen (v:v in Wasser) Haushaltsbleichmittellösung oder einer gleichwertigen Lösung einweichen und dann entsorgen.
- Autoklavieren Sie die Reagenzgefäße niemals nach der Amplifikation.

Weitere Informationen sowie die jeweils vor Ort geltenden Richtlinien zur Entsorgung entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt.

Sollten Sie Fragen zu bestimmten Anwendungen oder Verfahren haben, besuchen Sie unsere Website unter www.neogen.com oder wenden Sie sich an den lokalen Neogen-Verkaufsvertreter oder Händler.

Verantwortung des Anwenders

Anwender müssen sich auf eigene Verantwortung mit den Gebrauchsanweisungen und Informationen des Produkts vertraut machen. Für weitere Informationen besuchen Sie unsere Website unter www.neogen.com oder wenden Sie sich an Ihren lokalen Neogen Verkaufsvertreter oder Händler.

Bei der Auswahl einer Testmethode ist zu beachten, dass externe Faktoren wie Probenentnahmemethoden, Testprotokolle, Probenaufbereitung, Handhabung und Labortechnik die Ergebnisse beeinflussen können.

Es liegt in der Verantwortung des Anwenders bei der Auswahl einer Testmethode oder eines Produkts, diese mit einer ausreichenden Anzahl von Proben und Kontrollen zu evaluieren, um sicherzustellen, dass die gewählte Testmethode seinen Anforderungen entspricht.

Der Anwender trägt ebenfalls die Verantwortung dafür, dass die angewendeten Testmethoden und Ergebnisse den Anforderungen seiner Kunden und Lieferanten entsprechen.

Wie bei allen Testmethoden, stellen die mit Neogen Lebensmittelsicherheitsprodukten erhaltenen Ergebnisse keine Garantie für die Qualität der untersuchten Matrices oder Prozesse dar.

Als Unterstützung von Kunden bei der Validierung der Methode für verschiedene Lebensmittel-Matrices hat Neogen das Set Neogen® Molekulare Detektion Matrixkontrolle entwickelt. Verwenden Sie bei Bedarf die Matrixkontrolle (MC), um zu bestimmen, ob die Matrix in der Lage ist, die Ergebnisse der Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis zu beeinträchtigen. Testen Sie mehrere für die Matrix repräsentative Proben, d. h. Proben unterschiedlicher Herkunft, während einer Validierungsphase, wenn die Neogen Methode zum Einsatz kommt oder beim Testen neuer oder unbekannter Matrices oder Matrices, die Rohmaterial- oder Verfahrensänderungen durchlaufen haben.

Eine Matrix kann als eine Produktart mit spezifischen Eigenschaften, z. B. in Bezug auf ihre Zusammensetzung und Verarbeitung, definiert werden. Unterschiede zwischen Matrices können so einfach sein wie die Auswirkungen, die von Unterschieden bei deren Verarbeitung oder deren Präsentation (z. B. roh im Vergleich zu pasteurisiert; frisch im Vergleich zu getrocknet usw.) verursacht werden.

Haftungsbeschränkungen/Beschränkte Rechtsmittel

AUSSER ES WIRD AUSDRÜCKLICH ANDERS IM ABSCHNITT DER HAFTUNGSBESCHRÄNKUNGEN DER VERPACKUNG DES JEWEILIGEN PRODUKTS ANGEGEBEN, LEHNT NEOGEN ALLE AUSDRÜCKLICHEN UND STILLSCHWEIGENDEN GARANTIE, EINSCHLIESSLICH, JEDOCH NICHT BESCHRÄNKT AUF, DIE GEWÄHRLEISTUNG DER MARKTGÄNGIGKEIT ODER DER EIGNUNG FÜR EINEN BESTIMMTEN ZWECK AB. Sollte sich ein Produkt von Neogen Food Safety als defekt herausstellen, wird es von Neogen oder einem autorisierten Vertragshändler nach eigenem Ermessen ersetzt oder der Kaufpreis zurückerstattet. Gewährleistungsansprüche bestehen nicht. Bei weiteren Fragen wenden Sie sich bitte an Ihren Neogen-Vertreter oder autorisierten Neogen-Händler.

Haftungsbeschränkungen von Neogen

NEOGEN HAFTET NICHT FÜR VERLUSTE ODER SCHÄDEN, GANZ GLEICH OB MITTELBARE, UNMITTELBARE, SPEZIELLE, NEBEN- ODER FOLGESCHÄDEN EINSCHLIESSLICH, ABER NICHT BESCHRÄNKT AUF ENTGANGENEN GEWINN. In keinem Fall übersteigt die Haftung von Neogen den Kaufpreis des angeblich defekten Produkts.

Lagerung und Entsorgung

Lagern Sie den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis bei 2–8 °C. Nicht einfrieren. Kit lichtgeschützt lagern. Vergewissern Sie sich nach dem Öffnen des Sets, dass der Folienbeutel unbeschädigt ist. Verwenden Sie das Set keinesfalls bei beschädigtem Beutel. Nach dem Öffnen sollten nicht verwendete Reagenzgefäße gemeinsam mit dem Trockenmittel stets im wiederverschließbaren Beutel verwahrt werden, um die Stabilität der lyophilisierten Reagenzien sicherzustellen. Wieder verschlossene Beutel können maximal 60 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden.

Verwenden Sie den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis nicht nach Ablauf des Verfalldatums. Das Verfalldatum und die Chargennummer sind auf dem äußeren Etikett der Packung angegeben. Nach dem Gebrauch können das Anreicherungsmedium und die Gefäße des Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweises pathogene Stoffe enthalten. Beachten Sie nach Abschluss der Testverfahren die gültigen Branchennormen für die Entsorgung von kontaminierten Abfällen. Weitere Informationen sowie die jeweils vor Ort geltenden Richtlinien zur Entsorgung entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt.

Gebrauchsanweisung

Befolgen Sie alle Anweisungen genau. Andernfalls werden möglicherweise ungenaue Ergebnisse erzielt.

Desinfizieren Sie die Laborbänke und Arbeitsgeräte (Pipetten, Cap/Decap-Werkzeuge usw.) regelmäßig mit einer 1–5%igen Haushaltsbleichmittellösung (v:v in Wasser) oder DNS-Entfernungslösung.

Der Anwender sollte die Funktionsqualifizierung (Operational Qualification, OQ) für das Neogen Molekulare Detektionssystem absolvieren wie im Dokument „Protokolle und Anweisungen für Installationsqualifizierung (IQ)/ Funktionsqualifizierung (OQ) für das Neogen Molekulare Detektionssystem“ beschrieben⁽⁶⁾.

Spezifische Anweisungen finden Sie im Abschnitt „Spezielle Anweisungen für validierte Verfahren“:

Für Anreicherungsprotokolle gemäß AOAC® *Official Method of Analysis*SM **2016.08** und AOAC® *Performance Tested Method*SM Zertifikat Nr. **081501** in Tabelle 3.

Für Anreicherungsprotokolle gemäß NF Validation-Zertifikat **3M 01/15-09/16** in Tabelle 4.

Probenanreicherung

Tabelle 2, 3 oder 4 enthalten Richtlinien zur Anreicherung für Lebensmittel- und Umgebungsproben. Der Anwender ist selbst für die Validierung von alternativen Probennahmeprotokollen oder Verdünnungsverhältnissen verantwortlich, durch die sichergestellt werden muss, dass dieses Testverfahren den Anforderungen entspricht.

Lebensmittel

1. Lassen Sie das Demi Fraser Basis Bouillon-Anreicherungsmedium (enthält Eisen-Ammonium-Citrat) auf die Raumtemperatur des Labors aufwärmen.
2. Mischen Sie Anreicherungsmedium und Probe aseptisch gemäß den Tabellen 2, 3 oder 4. Bei der Handhabung von Fleisch- und partikelreichen Proben wird die Verwendung von Filterbeuteln empfohlen.

3. Homogenisieren Sie gründlich durch Verschneiden, Vermischung oder mischen von Hand für 2 ± 0,2 Minuten. Inkubieren Sie bei 37 ± 1 °C gemäß der entsprechenden Zeit aus Tabelle 2, 3 oder 4.
4. Geben Sie bei Rohmilchprodukten (siehe Tabellen 2, 3 oder 4) 0,1 ml der Erstanreicherung in 10 ml der Fraser Bouillon. Inkubieren Sie 37 ± 1 °C für 20–24 Stunden.

Umgebungsproben

Ein Instrument zur Probennahme kann ein Schwamm sein, der mit einer neutralisierenden Lösung hydriert ist, um die Wirkung von Desinfektionsmitteln zu deaktivieren. Neogen empfiehlt die Verwendung eines Biozid-freien Zellosoeschwamms. Bei der Neutralisierungslösung kann es sich um eine Dey-Engley (D/E)-Neutralisierungs- oder Lethen-Bouillon handeln. Der Bereich muss nach der Probenahme desinfiziert werden.

WARNUNG: Sollten Sie einen Neutralisationspuffer (NB) mit Acrylsulfonat-Komplex als Hydrierlösung für den Schwamm verwenden, müssen Sie vor dem Testen eine 1:2-Verdünnung (1 Teil Probe in 1 Teil steriler Anreicherungsbouillon) der angereicherten Umgebungsprobe vornehmen, um die mit einem falsch negativen Ergebnis verbundenen Risiken, die zur Freigabe eines kontaminierten Produkts führen können, zu verringern. Ebenso können Sie 10 µL Anreicherungsmedium mit Neutralisationspuffer in die Neogen Lysegefäße übertragen.

Die empfohlene Größe des Probenbereichs, mit dem die Anwesenheit oder Abwesenheit des Pathogens auf der Oberfläche überprüft werden soll, liegt bei mindestens 100 cm² (10 cm x 10 cm oder 4" x 4"). Decken Sie bei der Probennahme mit einem Schwamm den gesamten Bereich in zwei Richtungen (links nach rechts oder oben nach unten) ab oder sammeln Sie Umgebungsproben gemäß Ihrem aktuellen Probennahmeprotokoll oder gemäß den Richtlinien der FDA BAM⁽¹⁾, USDA FSIS MLG⁽²⁾ oder ISO 18593⁽⁷⁾.

1. Lassen Sie das Demi Fraser Basis Bouillon-Anreicherungsmedium (enthält Eisen-Ammonium-Citrat) auf die Raumtemperatur des Labors aufwärmen.
2. Mischen Sie Anreicherungsmedium und Probe aseptisch gemäß den Tabellen 2, 3 oder 4.
3. Homogenisieren Sie gründlich durch Verschneiden, Vermischung oder mischen von Hand für 2 ± 0,2 Minuten. Inkubieren Sie bei 37 ± 1 °C für 24–30 Stunden gemäß der entsprechenden Zeit aus Tabelle 2, 3 oder 4.

Tabelle 2: Allgemeine Anreicherungsprotokolle bei 37 ± 1 °C unter Verwendung der Demi Fraser Basis Bouillon und Fraser Basis Bouillon, je nach Bedarf.

Probenmatrix	Probengröße	Anreicherungsbouillonvolumen (ml)	Anreicherungszeit (Stunden)
Wärmebehandeltes, gekochtes, gepökeltes Fleisch, Geflügel, Meeresfrüchte und Fisch	25 g	225	24–30
Wärmebehandelte/pasteurisierte Milchprodukte			
Erzeugnisse und Gemüse			
Lebensmittel aus mehreren Zutaten			
Umgebungsproben ^(a)	1 Schwamm	100 oder 225	24–30
	1 Tupfer	10	24–30
Rohes Fleisch, Geflügel, Meeresfrüchte, Fisch	25 g	475	28–32

Probenmatrix	Erstanreicherung (Demi Fraser Bouillon) ^(a)			Zweitanreicherung (Fraser Bouillon) ^(a)			Probenanalysevolumen ^(b)
	Probengröße	Anreicherungsbouillongvolumen (ml)	Anreicherungszeit (Stunden)	Probengröße	Anreicherungstemperatur (°C)	Anreicherungszeit (Stunden)	
Rohmilchprodukte	25 g	225	20–24	0,1 ml in 10 ml Fraser Bouillon geben	37 ± 1	20–24	10 µl

- (a) Die Demi Fraser Bouillon und die Fraser Bouillon sollten bei der Erstanreicherung oder Zweitanreicherung immer mit Fraser Bouillon-Ergänzung (Eisen-Ammonium-Citrat) ergänzt werden.
- (b) Volumen der Probe, das in Neogen Lysegefäße übertragen wird. Siehe Schritt 4.6 im Abschnitt Lyse.

Spezifische Anweisungen für validierte Verfahren
AOAC® Official Method of AnalysisSM 2016.08
AOAC® Performance Tested MethodSM #081501



In den OMASM- und PTMSM-Programmen des AOAC Research Institute erwies sich der Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis als wirksame Methode zur Detektion von *Listeria monocytogenes*. Die in der Studie getesteten Matrices sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3. Anreicherungsprotokolle mit Verwendung der Demi Fraser Bouillon^(a) bei 37 ± 1 °C gemäß AOAC OMASM 2016.08 und PTMSM Zertifikat Nr. 081501.

Probenmatrix		Probengröße	Anreicherungsbouillongvolumen (ml)	Anreicherungszeit (Stunden)
Rindfleisch-Hotdogs, Frischkäse, Vanilleeis, Hüttenkäse mit 4 % Milchfett, Schokolade mit 3 % Vollmilch, Römersalat, roher Spinat im Beutel, kalt geräucherter Lachs		25 g	225	24–30
Rohes Geflügelfleisch		25 g	475	28–32
Feinkost-Putenfleisch		125 g	1125	24–30
Cantaloupe ^(b)		Ganze Melone	Soviel Volumen, dass die Melone schwimmen kann	26–30
Umgebungsproben:	Edelstahl	1 Schwamm	225	24–30
	Versiegelter Beton	1 Schwamm	100	24–30
	Kunststoff ^(c)	1 Tupfer	10	24–30

Sämtliche Proben für die AOAC-Validierung wurden, sofern nicht anders angegeben, mittels Mixer homogenisiert.

- (a) Die Demi Fraser Bouillon und die Fraser Bouillon sollten bei der Erstanreicherung oder Zweitanreicherung immer mit Fraser Bouillon-Ergänzung (Eisen-Ammonium-Citrat) ergänzt werden.
- (b) Probe durch Mischen per Hand homogenisieren.
- (c) Probe mit dem Vortexmischer homogenisieren.



3M 01/15-09/16

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

Für weitere Informationen zum Ablauf der Validierung siehe NF VALIDATION-Zertifikat unter der oben genannten Website.

NF VALIDATION zertifizierte Methode in Übereinstimmung mit der ISO 16140-2⁽⁶⁾ im Vergleich zur ISO 11290⁽³⁾

Einsatzgebiet der Validierung: Proben von allen für den Menschen vorgesehenen Lebensmitteln und deren Umgebung (außer Proben aus der Primärproduktion)

Probenaufbereitung: Die Proben müssen gemäß EN ISO 11290-1⁽³⁾ und EN ISO 6887⁽⁸⁾ vorbereitet werden

Softwareversion: Siehe Zertifikat

Tabelle 4: Anreicherungsprotokolle gemäß NF VALIDATION-zertifizierter Methode 3M 01/15-09/16 bei 37 ± 1 °C unter Verwendung einer Demi Fraser Bouillon und Fraser Bouillon, je nach Bedarf.

Allgemeines Protokoll	Probengröße	Anreicherungsbouillonvolumen (ml)	Anreicherungstemperatur (± 1 °C)	Anreicherungszeit (Stunden)	Probenanalysevolumen ^(a)	Akzeptierte Unterbrechungspunkte
Alle Lebensmittelproben (außer rohes Fleisch, rohe Meeresfrüchte und Rohmilchprodukte)	25 g	225	37	24–30	20 µl	<ul style="list-style-type: none"> • Demi Fraser Bouillon bis zu 72 Stunden • Lysat bei –20 °C • Lysat bei 4 °C bis zu 72 Stunden
Umgebungsproben	25 g, 1 Tupfer oder 1 Tuch					

Spezifisches Protokoll	Erstanreicherung (Demi Fraser Bouillon) ^(b)				Zweitanreicherung (Fraser Bouillon) ^(b)				Akzeptierte Unterbrechungspunkte
	Probengröße	Anreicherungsbouillonvolumen (ml)	Anreicherungstemperatur (± 1 °C)	Anreicherungszeit (Stunden)	Probengröße	Anreicherungstemperatur (± 1 °C)	Anreicherungszeit (Stunden)	Probenanalysevolumen ^(c)	
Rohes Fleisch, rohe Meeresfrüchte und Rohmilchprodukte	25 g	225	37	20–24	0,1 ml in 10 ml Fraser Bouillon geben	37	20–24	10 µl	<ul style="list-style-type: none"> • Fraser Bouillon bis zu 72 Stunden • Lysat bei –20 °C • Lysat bei 4 °C bis zu 72 Stunden

(a) Volumen der Probe, das in Neogen Lysegefäße übertragen wird. Siehe Schritt 4.6 im Abschnitt Lyse.

(b) Die Demi Fraser Bouillon und die Fraser Bouillon sollten bei der Erstanreicherung oder Zweitanreicherung immer mit Fraser Bouillon-Ergänzung (Eisen-Ammonium-Citrat) ergänzt werden.

(c) Volumen der Probe, das in Neogen Lysegefäße übertragen wird. Siehe Schritt 4.6 im Abschnitt Lyse.

HINWEIS: Proben von mehr als 25 g wurden in der NF Validation-Studie nicht getestet.

Vorbereitung der Neogen® Molekulare Detektion – Beladehilfe

1. Befeuchten Sie ein Tuch mit einer 1–5%igen Haushaltsbleichmittellösung (v:v in Wasser) oder einer gleichwertigen Lösung und wischen Sie die Neogen® Molekulare Detektion – Beladehilfe ab.
2. Spülen Sie die Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe mit Wasser ab.

3. Trocknen Sie die Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe mit einem Einmalhandtuch.
4. Vergewissern Sie sich, dass die Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe vor dem Gebrauch trocken ist.

Vorbereitung des Neogen® Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatzes

Platzieren Sie den Neogen® Molekulare Detektion – Kühlblock direkt auf der Laborbank; verwenden Sie den Kühlblock bei Laborraumtemperatur (20–25 °C).

Vorbereitung des Neogen® Molekulare Detektion – Heizblockeinsatzes

Legen Sie den Neogen® Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz in ein Trocken-Doppelblock-Heizgerät. Schalten Sie das Trockenblock-Heizgerät ein und stellen Sie die Temperatur für den Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz auf 100 ± 1 °C ein.

HINWEIS: Warten Sie je nach Heizgerät etwa 30 Minuten, bis der Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz die geeignete Temperatur erreicht hat. Stellen Sie mit einem kalibrierten Thermometer (z. B. ein Thermometer zum partiellen Eintauchen oder ein Digitalthermometer, **kein** Tauchthermometer) an der vorgesehenen Messposition fest, ob der Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz die erforderliche Temperatur von 100 ± 1 °C erreicht hat.

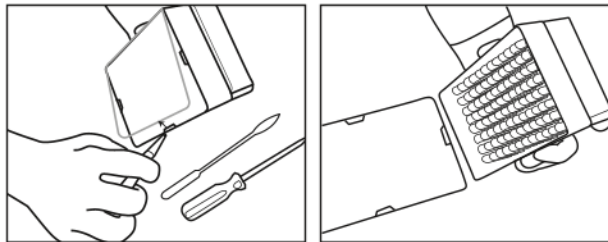
Vorbereitung des Neogen® Molekulare Detektion – Geräts

1. Starten Sie die Neogen® Molekulares Detektionssystem – Software und loggen Sie sich ein. Setzen Sie sich mit Ihrem Vertreter von Neogen Food Safety in Verbindung, um sicherzustellen, dass Sie über die aktuellste Softwareversion verfügen.
2. Schalten Sie das Neogen Molekulare Detektion – Gerät ein.
3. Erstellen oder bearbeiten Sie für jede Probe einen Testdurchlauf. Weitere Details entnehmen Sie bitte dem Benutzerhandbuch zum Neogen Molekularen Detektionssystem.

HINWEIS: Das Neogen Molekulare Detektion – Gerät muss bereit sein, bevor die Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe mit den Reaktionsgefäßen eingesetzt werden kann. Dieses Erwärmungsverfahren nimmt etwa 20 Minuten in Anspruch und wird durch eine ORANGEFARBENE Leuchte auf der Statusleiste des Geräts angezeigt. Sobald das Gerät einsatzbereit ist, wechselt die Leuchte der Statusleiste auf GRÜN.

Lyse

Entfernen Sie die Unterseite des Neogen Lyseträgers mit einem Schraubendreher oder Spatel, bevor Sie ihn im Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz platzieren.



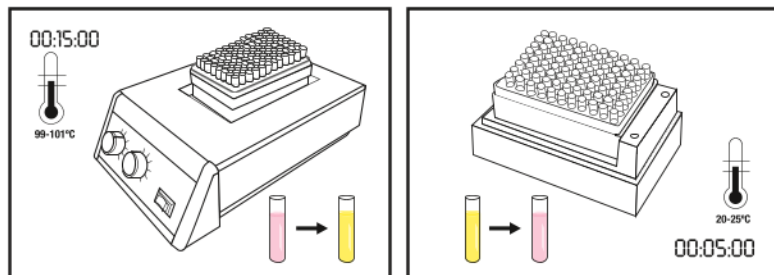
1. Lassen Sie die Lyselösung (Neogen Lyselösung) im Gefäß über Nacht (16–18 Stunden) bei Raumtemperatur (20–25 °C) aufwärmen. Um die Neogen Lysegefäße auf Raumtemperatur zu erwärmen, können Sie die Neogen Lysegefäße auch für mindestens 2 Stunden auf die Laborbank stellen, für 1 Stunde bei 37 ± 1 °C inkubieren oder sie für 30 Sekunden bei 100 °C in ein Trocken-Doppelblock-Heizgerät setzen.
2. Mischen Sie die mit Kappen verschlossenen Gefäße. Fahren Sie innerhalb von 4 Stunden mit dem nächsten Schritt fort.
3. Nehmen Sie die Anreicherungsbouillon aus dem Inkubator.
4. Für jede Probe und die Negativkontrolle (NC) (steriles Anreicherungsmedium) wird jeweils ein Gefäß mit Neogen Lyselösung benötigt.
 - 4.1 Die Neogen Lyselösung-Gefäßstreifen können auf die gewünschte Neogen Lyselösung-Anzahl an Gefäßen zurechtgeschnitten werden. Wählen Sie die Anzahl der erforderlichen Neogen Lysegefäße oder 8er Gefäßstreifen aus. Setzen Sie die Neogen Lysegefäße in einen leeren Gefäßträger.
 - 4.2 Um eine Kreuzkontamination zu vermeiden, öffnen Sie jeweils nur einen Neogen Lysegefäßstreifen und verwenden Sie bei jeder einzelnen Übertragung eine neue Pipette.
 - 4.3 Übertragen Sie die angereicherten Proben wie unten beschrieben auf die Neogen Lysegefäße:

Übertragen Sie **zuerst** die angereicherten Proben jeweils einzeln in ein Neogen Lysegefäß. Übertragen Sie die NC **zuletzt**.

- 4.4 Öffnen Sie jeden Neogen Streifen mit Lysegefäßen einzeln mit dem Neogen® Molekulare Detektion – Cap/Decap-Werkzeug – Lyse.
- 4.5 Entsorgen Sie die Kappen der Neogen Lysegefäße – wenn noch Lysat für weitere Tests übrig bleibt, bewahren Sie die Kappen in einem sauberen Container auf, um sie nach der Lyse wieder aufzusetzen.
- 4.5.1 Informationen zur Verarbeitung von nicht verwendetem Lysat finden Sie in Anhang A.
- 4.6 Übertragen Sie 20 µl Probe in ein Neogen- Lysegefäß, sofern in der Protokolltabelle 2, 3 oder 4 nicht anders angegeben (z. B. bei Rohmilchprodukten oder wenn Sie Umgebungsproben mit Neutralisierungspuffer verwenden, sind 10 µl zu verwenden).



5. Wiederholen Sie Schritt 4.4 bis 4.6, bis jede einzelne Probe in ein zugeordnetes Neogen Lysegefäße im Streifen gegeben wurde.
6. Sobald Sie alle Proben übertragen haben, übertragen Sie 20 µl der NC (steriles Anreicherungsmedium, z. B., Demi Fraser Bouillon) in ein Neogen Lysegefäß. Als NC kein Wasser verwenden.
7. Stellen Sie fest, ob der Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz die erforderliche Temperatur von $100 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ erreicht hat.
8. Stellen Sie den Träger ohne Deckel mit Neogen Lysegefäßen in den Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz und erwärmen Sie ihn 15 ± 1 Minuten lang. Dabei ändert sich die Farbe der Neogen Lyselösung von rosafarben (kalt) zu gelb (heiß).
- 8.1 Proben, die während der Lyse nicht ordnungsgemäß wärmebehandelt wurden, stellen möglicherweise ein biologisches Risiko dar und sollten NICHT in das Neogen Molekulare Detektions – Gerät eingesetzt werden.
9. Nehmen Sie den Träger ohne Deckel mit den Neogen Lysegefäßen aus dem Heizblockeinsatz. Lassen Sie ihn maximal 5 bis 10 Minuten lang im Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz abkühlen. Der Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz wird bei Raumtemperatur verwendet und sollte direkt auf die Laborbank gesetzt werden. Wenn die Lyselösung abgekühlt ist, nimmt sie wieder eine rosa Farbe an.
10. Nehmen Sie den Träger mit den Neogen Lysegefäßen aus dem Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz.



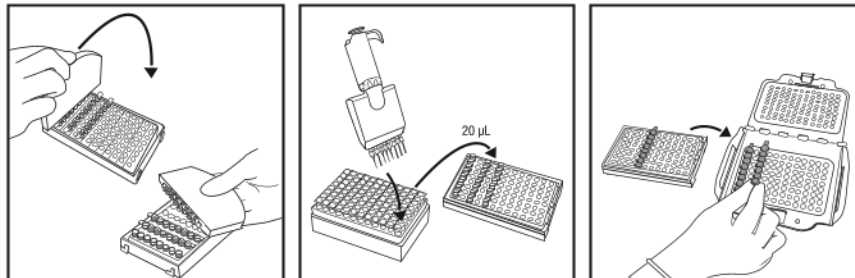
Amplifikation

1. Für jede Probe und ihre NC ist ein Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis-Reagenzgefäß erforderlich.
- 1.1 Die Gefäßstreifen können auf die gewünschte Anzahl der Reagenzgefäße zurechtgeschnitten werden. Wählen Sie die Anzahl der erforderlichen Reagenzgefäße für den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis oder den 8er Gefäßstreifen.
- 1.2 Stellen Sie die Reagenzgefäße für Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis in einen leeren Gefäßträger.
- 1.3 Vermeiden Sie es, die Reagenzkügelchen im unteren Teil der Gefäße aufzurühren.
2. Wählen Sie 1 Gefäß mit Neogen Reagenzkontrolle und stellen Sie es in den Gefäßträger.
3. Um eine Kreuzkontamination zu vermeiden, öffnen Sie jeweils nur einen Reagenzgefäßstreifen des Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis und verwenden Sie bei jedem Übertragungsschritt eine neue Pipettenspitze.

4. Übertragen Sie wie nachfolgend beschrieben die einzelnen Lysate in ein Reagenzgefäß für den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis und in ein Gefäß mit Neogen Reagenzkontrolle:

Übertragen Sie jedes Probenlysat **zuerst** in ein eigenes Reagenzgefäß für den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis, gefolgt von der NC. Hydrieren Sie das Gefäß mit Neogen Reagenzkontrolle **als letztes**.

5. Öffnen Sie die Reagenzgefäße für den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis mit dem Neogen® Molekulare Detektion – Cap/Decap-Werkzeug – Reagenz, und zwar immer nur einen Reagenzgefäßstreifen auf einmal. Werfen Sie die Kappe weg.
- 5.1 **Übertragen Sie 20 µl des Probenlysats aus der oberen Hälfte der Flüssigkeit (Ablagerungen vermeiden) im Neogen Lysegefäß in das entsprechende Reagenzgefäß für den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis. Pipettieren Sie schräg in die Gefäße, um ein Aufrühren der Kügelchen zu vermeiden. Mischen Sie anschließend den Gefäßinhalt, indem Sie ihn 5 Mal auf und ab pipettieren.**
- 5.2 Wiederholen Sie Schritt 5.1, bis Sie jedes einzelne Probenlysat einem entsprechenden Reagenzgefäß für die Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis im Streifen hinzugefügt haben.
- 5.3 Verschließen Sie die Reagenzgefäße für den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis mit den mitgelieferten zusätzlichen Kappen und üben Sie mit der abgerundeten Seite des Neogen Molekulare Detektion – Cap/Decap-Werkzeugs – Reagenz in einer Vorwärts- und Rückwärtsbewegung Druck aus, um sicherzustellen, dass die Kappe fest sitzt.
- 5.4 Wiederholen Sie bei Bedarf die Schritte 5.1 bis 5.3 bei allen zu prüfenden Proben.
- 5.5 Sobald Sie alle Probenlysate übertragen haben, wiederholen Sie Schritt 5.1, um 20 µl des NC-Lysats in ein Reagenzgefäß für den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis zu übertragen.
- 5.6 Übertragen Sie **20 µl des NC-Lysats in ein Gefäß mit Neogen Reagenzkontrolle**. Pipettieren Sie schräg in die Gefäße, um ein Aufrühren der Kügelchen zu vermeiden. Mischen Sie anschließend den Gefäßinhalt, indem Sie ihn 5 Mal auf und ab pipettieren.
6. Beladen Sie eine saubere und dekontaminierte Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe mit den mit Kappen verschlossenen Gefäßen. Schließen und verriegeln Sie die Klappe der Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe.



7. Überprüfen und bestätigen Sie die Konfiguration des Durchlaufs in der Neogen Molekulare Detektion – Software.
8. Klicken Sie auf die Schaltfläche „Start“ in der Software und wählen Sie anschließend das zu verwendende Gerät aus. Die Klappe des gewählten Geräts öffnet sich automatisch.
9. Setzen Sie die Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe in das Neogen Molekulare Detektion – Gerät und schließen Sie die Klappe, um mit dem Test zu beginnen. Die Ergebnisse sind innerhalb von 75 Minuten verfügbar, obgleich positive Ergebnisse möglicherweise schneller erfasst werden.
10. Nehmen Sie nach Abschluss des Tests die Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe aus dem Neogen Molekulare Detektion – Gerät und entsorgen Sie die Gefäße, indem Sie sie 1 Stunde lang in ausreichender Entfernung vom Vorbereitungsbereich in einer 1–5%igen Haushaltsbleichmittellösung (v:v in Wasser) oder einer gleichwertigen Lösung einweichen.

HINWEIS: Um das Risiko eines falsch positiven Ergebnisses infolge einer Kreuzkontamination zu minimieren, öffnen Sie niemals Reagenzgefäße, die amplifizierte DNS enthalten. Dies betrifft Reagenzgefäße für den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis sowie Gefäße mit Neogen Reagenzkontrolle und Matrixkontrolle. Entsorgen Sie die verschlossenen Reagenzgefäße, indem Sie sie 1 Stunde lang in ausreichender Entfernung vom Vorbereitungsbereich in einer 1–5%igen Haushaltsbleichmittellösung (v:v in Wasser) oder einer gleichwertigen Lösung einweichen.

Interpretation der Ergebnisse






Die durch die Detektion der Nukleinsäureamplifikation entstehende Lichtkurve wird anhand eines Algorithmus ausgewertet. Die Ergebnisse werden automatisch von der Software analysiert und je nach Ergebnis farbcodiert. Ein positives oder negatives Ergebnis wird durch die Analyse einer bestimmten Anzahl an eindeutigen Kurvenparametern bestimmt. Die vorläufigen positiven Ergebnisse werden in Echtzeit erstellt, während negative und zu überprüfende Ergebnisse erst nach Abschluss des Testdurchlaufs dargestellt werden.

Vorläufig positive Ergebnisse sollten anhand der Standardarbeitsanweisung für Laboratorien oder durch das anschließende Referenzverfahren^(1,2,3) bestätigt werden, beginnend mit der Übertragung aus der Erstanreicherung in die Zweitanreicherungsbouillon (sofern zutreffend), gefolgt von anschließendem Ausplattieren und Bestätigen von Isolaten mittels geeigneter biochemischer und serologischer Verfahren.

HINWEIS: Selbst ein negatives Ergebnis führt nicht zu einem Ergebnis von null, da das System und die Amplifikationsreagenzien des Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweises einen „Hintergrund“ aufweisen, der in relativem Verhältnis zur Lichteinheit (RLU) steht.

Falls es in seltenen Fällen zu einer ungewöhnlichen Lichtleistung kommt, wird diese vom Algorithmus als „Zu überprüfen“ gekennzeichnet. Neogen empfiehlt, den Nachweis der so gekennzeichneten Proben zu wiederholen. Falls das Ergebnis weiterhin als „Zu überprüfen“ gekennzeichnet bleibt, bestätigen Sie das Ergebnis anhand Ihres bevorzugten Testverfahrens oder gemäß den jeweils geltenden Richtlinien.

Tabelle 5: Ergebnissymbole für Proben und deren Interpretation in der Neogen Molekulares Detektionssystem-Software.

Vertiefungstyp	Vertiefungsergebnissymbol	Ergebnis	Interpretation
Probe		Positiv	Die Probe wird vorläufig positiv für das Zielpathogen betrachtet.
Probe		Negativ	Die Probe wird negativ für das Zielpathogen betrachtet.
Probe		Inhibiert	Die Probenmatrix hat den Nachweis gehemmt. Ein neuer Test ist erforderlich. Weitere Informationen finden Sie im Problemlösungsabschnitt und der Gebrauchsanweisung des Testkits.
Probe		Zu überprüfen	Das Vorhandensein oder Fehlen des Zielpathogens war nicht ermittelbar. Ein neuer Test ist erforderlich. Weitere Informationen finden Sie im Problemlösungsabschnitt und der Gebrauchsanweisung des Testkits.
Probe		Fehler	Keine Biolumineszenz festgestellt. Ein neuer Test ist erforderlich. Weitere Informationen finden Sie im Problemlösungsabschnitt und der Gebrauchsanweisung des Testkits.

Bestätigung der Ergebnisse anhand der zertifizierten NF VALIDATION-Methode

Option 1: Nach ISO 11290⁽³⁾ standardmäßig mit Demi Fraser-Anreicherung.

Option 2: Durch Isolation auf PALCAM-Agar oder auf chromogenem Agar (O&A) als Bestandteil einer zertifizierten NF VALIDATION-Methode zur Detektion von *Listeria monocytogenes*. Das Vorhandensein charakteristischer Kolonien ist ausreichend für den Nachweis von *Listeria monocytogenes*.

Option 3: Verwenden Sie die in der Norm EN ISO 7218⁽⁵⁾ beschriebenen Nukleinsäure-Sonden, die an isolierten Kolonien von selektivem Agar angewendet werden (siehe Optionen 1 oder 2).

Option 4: Beim Verwenden einer anderen zertifizierten NF VALIDATION-Methode muss sich das grundsätzliche Verfahren von dem Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis unterscheiden. Das gesamte für diese zweite gesicherte Methode beschriebene Protokoll muss befolgt werden. Vor dem Beginn der Bestätigung müssen alle Schritte für beide Methoden allgemein bekannt sein.

Bei abweichenden Ergebnissen (mutmaßlich positiven beim der alternativen Methode, unbestätigten Ergebnissen eines der zuvor genannten Verfahren) muss das Labor die erforderlichen Maßnahmen befolgen, um die Richtigkeit der erhaltenden Ergebnisse sicherzustellen.

Bei abweichenden Ergebnissen (vermutlich positiv mit dem Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis, nicht bestätigt durch eines der oben beschriebenen Verfahren) muss das Labor die erforderlichen Maßnahmen befolgen, um die Richtigkeit der erhaltenen Ergebnisse sicherzustellen.

Sollten Sie Fragen zu bestimmten Anwendungen oder Verfahren haben, besuchen Sie unsere Website unter www.neogen.com oder wenden Sie sich an den lokalen Neogen-Verkaufsvertreter oder Händler.

Anhang A. Protokoll-Unterbrechungen: Lagerung und erneutes Testen von wärmebehandelten Lysaten.

1. Um ein wärmebehandeltes Lysat zu lagern, setzen Sie eine neue, saubere Kappe auf das Lysegefäß (siehe „Lyse“, Abschnitt 4.5).
2. Lagern Sie das Lysat bis zu 72 Stunden bei 4 bis 8 °C.
3. Bereiten Sie eine gelagerte Probe zur Amplifikation vor, indem Sie sie zum Mischen 2–3 Mal umdrehen.
4. Öffnen Sie die Gefäße.

5. Setzen Sie die gemischten Lysatgefäße in den Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz und erwärmen Sie sie 5 ± 1 Minuten lang bei 100 ± 1 °C.
6. Nehmen Sie den Träger mit den Neogen Lysegefäßen aus dem Heizblockeinsatz und lassen Sie ihn maximal 5 bis 10 Minuten lang im Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz abkühlen.
7. Setzen Sie das Protokoll ab dem oben beschriebenen Abschnitt „Amplifikation“ fort.

Literaturnachweise:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Erklärung der Produktbeschriftungs-Symbole

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.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.
FS00867B

Istruzioni sul prodotto

Analisi molecolare di seconda generazione per il rilevamento di *Listeria monocytogenes*

Descrizione del prodotto e uso previsto

L'Analisi molecolare Neogen® di seconda generazione per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* è utilizzata con il Sistema per l'analisi molecolare Neogen® per il rilevamento rapido e specifico di *Listeria monocytogenes* in campioni di alimenti e ambientali arricchiti. Le analisi molecolari Neogen per il rilevamento dei microrganismi patogeni utilizzano l'amplificazione isotermica mediata da loop per amplificare rapidamente le sequenze di acidi nucleici a elevata specificità e sensibilità, combinata con la bioluminescenza per rilevare l'amplificazione. I risultati presunti positivi sono riportati in tempo reale, mentre quelli negativi si visualizzano al completamento dell'analisi. I risultati presunti positivi vanno confermati utilizzando il proprio metodo convenzionale o secondo quanto specificato dalle normative locali^(1,2,3).

L'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* è destinata all'uso in un ambiente di laboratorio da parte di professionisti formati in tecniche di laboratorio. Neogen non ha documentato l'utilizzo del presente prodotto in settori diversi da quello alimentare e delle bevande. Ad esempio, Neogen non ha documentato il presente prodotto per l'analisi su campioni di acqua, di tipo farmaceutico, cosmetico, clinico o veterinario. L'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* non è stata valutata con tutti i possibili protocolli di test o ceppi di batteri.

Come tutti i metodi analitici, i risultati possono essere influenzati dall'origine, dalla formulazione e dalla qualità del terreno di arricchimento. Anche fattori quali i metodi di campionamento, i protocolli di analisi, la preparazione del campione, la manipolazione e le tecniche di laboratorio possono influenzare i risultati. Neogen consiglia la valutazione del metodo, compreso il terreno di arricchimento, nell'ambiente dell'utente, utilizzando un numero sufficiente di campioni che presentano particolari caratteristiche alimentari e microbiche, per assicurare che il metodo soddisfi i criteri dell'utente.

Neogen ha valutato l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* con brodo Demi Fraser contenente citrato ferrico di ammonio e brodo Fraser contenente citrato ferrico di ammonio secondo necessità. Di seguito è riportata una tipica formulazione di questo terreno.

Formula tipica della base per brodo Demi- Fraser	(g/l)	Formula tipica della base per brodo Fraser	(g/l)
Cloruro di sodio	20 g	Cloruro di sodio	20 g
Fosfato di sodio, bibasico, anidro*	9,6 g	Fosfato di sodio, bibasico, anidro*	9,6 g
Estratto di carne bovina	5,0 g	Estratto di carne bovina	5,0 g
Digerito pancreatico della caseina	5,0 g	Digerito pancreatico della caseina	5,0 g
Digerito peptico di tessuto animale	5,0 g	Digerito peptico di tessuto animale	5,0 g
Estratto di lievito	5,0 g	Estratto di lievito	5,0 g
Cloruro di litio	3,0 g	Cloruro di litio	3,0 g
Fosfato di potassio, monobasico	1,35 g	Fosfato di potassio, monobasico	1,35 g
Esculina	1,0 g	Esculina	1,0 g
Acriflavina HCl	0,0125 g	Acriflavina HCl	0,025 g
Acido nalidixico	0,01 g	Acido nalidixico	0,02 g

*Sostituito: fosfato di sodio, bibasico, biidrato 12,0 g

Supplemento per brodo Fraser

(Ingredienti per fiala da 10 ml. Viene aggiunta una fiala a un litro di terreno basale.)

Citrato ferrico di ammonio 0,5 g/10 ml

pH finale 7,2 ± 0,2 a 25 °C

Lo Strumento per l'analisi molecolare Neogen® è destinato all'uso su campioni sottoposti a trattamento termico durante la fase di lisi dell'analisi, atto ad annientare gli organismi presenti nel campione. I campioni non correttamente trattati termicamente durante la fase di lisi dell'analisi possono essere considerati un potenziale rischio biologico e NON devono essere inseriti nello Strumento per l'analisi molecolare Neogen.

Neogen Food Safety è certificata ISO (International Organization for Standardization) 9001 per la progettazione e la produzione.

Il kit di prova per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* è composto da 96 test, descritti nella Tabella 1.

Tabella 1. Componenti del kit di analisi molecolare Neogen

Articolo	Identificazione	Quantità	Contenuto	Commenti
Soluzione di lisi (LS) Neogen®	Soluzione rosa in provette trasparenti	96 (12 strisce da 8 provette)	580 µl di LS per provetta	In rastrelliera e pronte all'uso
Provette di reagente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen® per il rilevamento di <i>Listeria monocytogenes</i>	Provette gialle	96 (12 strisce da 8 provette)	Miscela di rilevamento e amplificazione specifica liofilizzata	Pronte all'uso
Tappi supplementari	Tappi gialli	96 (12 strisce da 8 tappi)		Pronte all'uso
Controllo reagente Neogen® (RC)	Provette trasparenti con apertura a scatto	16 (2 buste da 8 provette singole)	Miscela di rilevamento e amplificazione DNA di controllo liofilizzato	Pronte all'uso

Il controllo negativo, non fornito nel kit, è terreno di arricchimento sterile, p. es. Brodo Demi Fraser. Non utilizzare l'acqua come controllo negativo.

Sicurezza

L'utente è tenuto a leggere, comprendere e seguire tutte le informazioni per la sicurezza contenute nelle istruzioni del Sistema per l'analisi molecolare Neogen e dell'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes*. Conservare le istruzioni di sicurezza per poterle consultare in futuro.

⚠ AVVERTENZA: indica una situazione pericolosa che, se non evitata, potrebbe provocare la morte o lesioni gravi e/o danni materiali.

AVVISO: indica una situazione potenzialmente pericolosa che, se non evitata, potrebbe provocare danni materiali.

⚠ AVVERTENZA

Non utilizzare l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* per la diagnosi delle condizioni di soggetti umani o animali.

Il metodo dell'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* può generare *Listeria monocytogenes* a livelli tali da provocare nati morti e decessi nelle donne in gravidanza e in soggetti immunocompromessi, se esposti.

L'utente deve addestrare il proprio personale all'esecuzione corretta delle tecniche di prova: ad esempio, buone prassi di laboratorio, ISO/IEC 17025⁽⁴⁾, o ISO 7218⁽⁵⁾.

Per ridurre i rischi associati a risultati falsi negativi che comportano l'emissione di un prodotto contaminato:

- Attenersi al protocollo ed eseguire i test esattamente come descritto nelle Istruzioni sul prodotto.
- Conservare l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* come indicato sulla confezione e nelle istruzioni sul prodotto.
- Utilizzare sempre l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* entro la data di scadenza.
- Utilizzare l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* per campioni ambientali e alimentari che sono stati validati internamente o da terzi.
- Utilizzare l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* solo per superfici, disinfettanti, protocolli e ceppi di batteri che sono stati validati internamente o da terzi.
- Per un campione ambientale contenente un tampone neutralizzante con il complesso di aril solfonato, eseguire una diluizione in rapporto 1:2 prima di eseguire il test (1 parte di campione in 1 parte di brodo di arricchimento sterile). Un'altra opzione consiste nel trasferire 10 µl di arricchimento del tampone neutralizzante all'interno delle provette per Soluzione di lisi Neogen. Prodotti per la raccolta dei campioni di Neogen® che includono Tampone neutralizzante con complesso aril solfonato: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G e HS2410NB2G.

Per ridurre i rischi associati all'esposizione a sostanze chimiche e a pericoli biologici:

- Si raccomanda vivamente che il personale di laboratorio femminile sia informato del rischio per un feto in via di sviluppo derivante dall'infezione della madre dovuta all'esposizione a *Listeria monocytogenes*.

- Eseguire un test per patogeni in un laboratorio adeguatamente equipaggiato, sotto la supervisione di personale esperto. Il terreno di arricchimento incubato e le attrezzature o le superfici che sono venute in contatto con il terreno di arricchimento incubato potrebbero contenere patogeni a livelli sufficienti da comportare rischi per la salute umana.
- Durante la manipolazione di reagenti e campioni contaminati, seguire sempre le pratiche standard di sicurezza di laboratorio, compreso l'utilizzo di abbigliamento protettivo e protezioni appropriate per gli occhi.
- Evitare il contatto con il contenuto delle provette di reagente e del terreno di arricchimento dopo l'amplificazione.
- Smaltire i campioni arricchiti in conformità degli standard di settore vigenti.
- I campioni trattati termicamente in modo non corretto durante la fase di lisi dell'analisi possono essere considerati un potenziale rischio biologico e NON devono essere inseriti nello Strumento per l'analisi molecolare Neogen.

Per ridurre i rischi associati alla contaminazione crociata durante la preparazione dell'analisi:

- Indossare sempre i guanti (per proteggere l'utente e prevenire l'introduzione di nucleasi).

Per ridurre i rischi associati a contaminazione ambientale:

- Attenersi agli standard di settore vigenti per lo smaltimento di rifiuti contaminati.

Per ridurre i rischi associati all'esposizione a liquidi caldi:

- Non superare l'impostazione di temperatura raccomandata sul riscaldatore.
- Non superare il tempo di riscaldamento raccomandato.
- Utilizzare un termometro calibrato e appropriato per verificare la temperatura dell'Insero del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen® (p. es., un termometro a immersione parziale o con termocoppia digitale, non un termometro a immersione totale). Il termometro deve essere collocato nella posizione indicata nell'Insero del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen.

AVVISO**Per ridurre i rischi associati alla contaminazione crociata durante la preparazione dell'analisi:**

- Cambiare i guanti prima di idratare le pastiglie di reagente.
- Si consiglia di utilizzare puntali di pipetta di grado biologico molecolare sterili con barriera contro gli aerosol (filtrate).
- Utilizzare un nuovo puntale di pipetta per ciascun trasferimento di campione.
- Adottare buone prassi di laboratorio per trasferire il campione dall'arricchimento alla provetta di lisi. Per evitare la contaminazione della pipettatrice, l'utente può scegliere di aggiungere una fase di trasferimento intermedia. Ad esempio, l'utente può trasferire ciascun campione arricchito in una provetta sterile.
- Utilizzare una stazione di lavoro di biologia molecolare contenente una lampada germicida, laddove disponibile. Decontaminare periodicamente i banchi e l'attrezzatura di laboratorio (pipette, strumenti per chiudere/aprire i tappi, ecc.) con una soluzione di candeggina per uso domestico all'1-5% (diluita in acqua v:v) o una soluzione per la rimozione del DNA.

Per ridurre i rischi associati a un risultato falso positivo:

- Non aprire mai le provette di reagente dopo l'amplificazione.
- Gettare sempre le provette contaminate immergendole in una soluzione di candeggina per uso domestico all'1-5% (diluita in acqua v:v) o in una soluzione equivalente per 1 ora lontano dall'area di preparazione dell'analisi.
- Non sterilizzare mai in autoclave le provette di reagente dopo l'amplificazione.

Per ulteriori informazioni, consultare la Scheda di sicurezza dei materiali e le normative locali per lo smaltimento.

Per qualsiasi domanda su applicazioni o procedure specifiche, visitare il nostro sito web all'indirizzo www.neogen.com, oppure contattare il distributore o il rappresentante Neogen di zona.

Responsabilità dell'utente

Gli utenti sono tenuti a leggere e apprendere le istruzioni e le informazioni sul prodotto. Visitare il nostro sito web all'indirizzo www.neogen.com, oppure contattare il distributore locale o rappresentante Neogen per ulteriori informazioni.

Nella scelta di un metodo di test, è importante considerare che fattori esterni quali i metodi di campionamento, i protocolli di test, la preparazione del campione, la manipolazione e le tecniche di laboratorio possono influenzare i risultati.

È responsabilità dell'utente, nel selezionare un qualsiasi metodo di analisi o prodotto, valutare un numero sufficiente di campioni con le matrici appropriate e con particolari caratteristiche microbiche per soddisfare i criteri relativi alla metodologia di analisi scelta dall'utente.

L'utente ha inoltre la responsabilità di accertarsi che tutti i metodi di analisi utilizzati e i risultati ottenuti soddisfino i requisiti dei propri clienti e fornitori.

Come per qualsiasi metodo di analisi, i risultati ottenuti grazie al prodotto di Neogen Food Safety non costituiscono una garanzia della qualità delle matrici o dei processi sottoposti a prova.

Per aiutare i clienti nella valutazione del metodo per le varie matrici alimentari, Neogen ha elaborato il kit di Controllo della matrice di rilevamento molecolare Neogen®. Quando necessario, utilizzare il Controllo della matrice (MC) per determinare se questa sia in grado di influenzare i risultati dell'Analisi molecolare Neogen di seconda generazione per il rilevamento di *Listeria monocytogenes*. Durante il periodo di valutazione - in caso di adozione di un metodo Neogen - o durante l'esecuzione di test su matrici nuove o sconosciute o su matrici che hanno subito modifiche nelle materie prime o nella lavorazione, analizzare numerosi campioni rappresentativi della matrice, cioè campioni di diversa origine.

Si definisce matrice un tipo di prodotto con proprietà intrinseche quali la composizione e la lavorazione. Le differenze fra le matrici possono essere semplici come gli effetti causati dalle differenze nella loro lavorazione o presentazione, ad esempio: crude o pastorizzate, fresche o secche, ecc.

Limitazione di garanzia/Rimedio limitato

SALVO NEI CASI ESPRESSAMENTE INDICATI IN UNA SEZIONE DI GARANZIA LIMITATA DELLA CONFEZIONE DEL SINGOLO PRODOTTO, NEOGEN NON RICONOSCE ALCUNA GARANZIA ESPLICITA O IMPLICITA, INCLUSE, MA SENZA LIMITAZIONI, LE EVENTUALI GARANZIE DI COMMERCIALIZZABILITÀ O DI IDONEITÀ A UNO SCOPO PARTICOLARE. Qualora un prodotto della Neogen Food Safety sia difettoso, Neogen o il suo distributore autorizzato provvederanno, a loro discrezione, alla sostituzione o al rimborso del prezzo d'acquisto del prodotto. Questi sono gli unici rimedi a disposizione del cliente. Per ulteriori domande, contattare il rappresentante Neogen o il distributore autorizzato Neogen.

Limitazione di responsabilità da parte di Neogen

NEOGEN NON SARÀ RESPONSABILE DI PERDITE O DANNI, DIRETTI, INDIRETTI, SPECIALI, INCIDENTALI O EMERGENTI, INCLUSA, MA NON IN VIA STRETTAMENTE LIMITATIVA, LA PERDITA DI PROFITTO. In nessun caso la responsabilità legale di Neogen andrà oltre il prezzo d'acquisto del prodotto presunto difettoso.

Conservazione e smaltimento

Conservare l'Analisi molecolare Neogen di seconda generazione per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* a 2-8 °C. Non congelare. Conservare il kit lontano da fonti luminose. Dopo aver aperto il kit, verificare che la busta d'alluminio non risulti danneggiata. Qualora la busta d'alluminio fosse danneggiata, non utilizzare i prodotti contenuti all'interno. Dopo l'apertura, le provette di reagente inutilizzate dovranno essere sempre conservate in una busta richiudibile con essiccante all'interno per mantenere la stabilità dei reagenti liofilizzati. Conservare le buste richiudibili a 2-8 °C per un periodo non superiore a 60 giorni.

Non utilizzare l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* oltre la data di scadenza. La data di scadenza e il numero di lotto sono riportati sull'etichetta esterna della scatola. Dopo l'utilizzo, il terreno di arricchimento e le provette per l'analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* possono potenzialmente contenere materiali patogeni. Una volta completato il test, attenersi agli standard di settore vigenti in materia di smaltimento di rifiuti contaminati. Per ulteriori informazioni, consultare la Scheda di sicurezza dei materiali e le normative locali per lo smaltimento.

Istruzioni per l'uso

Seguire attentamente tutte le istruzioni. In caso contrario, si rischia di ottenere risultati non precisi.

Decontaminare periodicamente i banchi e l'attrezzatura di laboratorio (pipette, strumenti per chiudere/aprire i tappi, ecc.) con una soluzione di candeggina per uso domestico all'1-5% (diluita in acqua v:v) o una soluzione per la rimozione del DNA.

L'utente è tenuto a completare la formazione di qualifica operatore (OQ) per il Sistema per l'analisi molecolare Neogen, come descritta nel documento "Protocolli di qualifica per l'installazione (IQ)/qualifica operativa (OQ) e istruzioni del Sistema per l'analisi molecolare Neogen"⁽⁶⁾.

Per i requisiti specifici, consultare la sezione "Istruzioni specifiche per metodi validati":

Tabella 3 per i protocolli di arricchimento secondo AOAC® *Official Method of Analysis*SM 2016.08 e AOAC® *Performance Tested Method*SM, Certificato n. 081501.

Tabella 4 per i protocolli di arricchimento secondo il certificato NF Validation 3M 01/15-09/16.

Arricchimento del campione

Nelle Tabelle 2, 3 o 4 sono riportate le indicazioni per l'arricchimento di campioni ambientali e alimentari. È responsabilità dell'utente convalidare protocolli di campionamento o rapporti di diluizione alternativi, per assicurare che il presente metodo di test soddisfi i propri criteri.

Alimenti

1. Lasciare che il terreno di arricchimento Brodo Demi Fraser (comprende citrato ferrico di ammonio) venga equilibrato alla temperatura ambiente del laboratorio.
2. Unire asetticamente il terreno di arricchimento al campione in base alle tabelle 2, 3 o 4. Per tutti i campioni di carne e a elevato numero di particelle, si consiglia l'utilizzo di sacchetti con filtro.
3. Omogeneizzare con cura, miscelando con miscelatore o agitatore o a mano per $2 \pm 0,2$ minuti. Incubare a 37 ± 1 °C in base alle tabelle 2, 3 o 4.
4. Per i prodotti lattiero-caseari crudi (vedi tabelle 2, 3 o 4), trasferire 0,1 ml del brodo di arricchimento primario in 10 ml di brodo Fraser. Incubare a 37 ± 1 °C per 20-24 ore.

Campioni ambientali

I dispositivi di prelievo dei campioni possono essere spugne idratate con soluzione neutralizzante per disattivare gli effetti dei disinfettanti. Neogen raccomanda l'utilizzo di spugne di cellulosa senza biocidi. La soluzione neutralizzante può essere il brodo neutralizzante Dey-Engley (D/E) o il brodo Lethen. Si raccomanda di disinfettare l'area dopo il campionamento.

AVVERTENZA: se si sceglie di usare un tampone neutralizzante (NB) che contiene complesso aril solfonato come soluzione idratante per la spugna, è necessario eseguire una diluizione in rapporto 1:2 (1 parte di campione in 1 parte di brodo di arricchimento sterile) del campione ambientale arricchito prima di eseguire il test, al fine di ridurre i rischi associati a risultati falsi negativi che comportino l'emissione di un prodotto contaminato. Un'altra opzione consiste nel trasferire 10 µl di arricchimento del tampone neutralizzante all'interno delle provette per Soluzione di lisi Neogen.

L'estensione raccomandata dell'area di campionamento per verificare la presenza o l'assenza del patogeno sulla superficie è di almeno 100 cm² (10 cm x 10 cm o 4" x 4"). Quando si effettua il campionamento con una spugna, coprire l'intera area in due direzioni (da sinistra a destra, quindi su e giù), oppure raccogliere campioni ambientali attenendosi al protocollo di campionamento vigente o secondo le linee guida FDA BAM⁽¹⁾, USDA FSIS MLG⁽²⁾ o ISO 18593⁽⁷⁾.

1. Lasciare che il terreno di arricchimento Brodo Demi Fraser (comprende citrato ferrico di ammonio) venga equilibrato alla temperatura ambiente del laboratorio.
2. Unire asetticamente il terreno di arricchimento al campione in base alle tabelle 2, 3 o 4.
3. Omogeneizzare con cura, miscelando con miscelatore o agitatore o a mano per 2 ± 0,2 minuti. Incubare a 37 ± 1 °C per 24-30 ore in base alle tabelle 2, 3 o 4.

Tabella 2: protocolli di arricchimento generici a 37 ± 1 °C con utilizzo di brodo Demi Fraser e brodo Fraser secondo necessità.

Matrice campione	Dimensione campione	Volume brodo di arricchimento (ml)	Tempo di arricchimento (ore)	Arricchimento primario (brodo Demi Fraser) ^(a)			Arricchimento secondario (Brodo Fraser) ^(a)			Volume dell'analisi del campione ^(b)
				Dimensione campione	Volume brodo di arricchimento (ml)	Tempo di arricchimento (ore)	Dimensione campione	Temperatura di arricchimento (°C)	Tempo di arricchimento (ore)	
Carni, pollame, frutti di mare e pesce sottoposti a trattamento termico, cotti, affumicati Prodotti lattiero-caseari sottoposti a trattamento termico/pastorizzati Verdure e ortaggi Alimenti multicomponente	25 g	225	24-30							
				1 spugna	100 o 225	24-30				
				1 tampone	10	24-30				
Campioni ambientali ^(a)										
Carne cruda, pollame, frutti di mare, pesce	25 g	475	28-32							
Prodotti lattiero-caseari crudi	25 g	225	20-24				Trasferire 0,1 ml in 10 ml di brodo Fraser	37 ± 1	20-24	10 µl

(a) Il brodo Demi- Fraser e il brodo Fraser devono essere sempre integrati con il supplemento per brodo Fraser (citrato ferrico di ammonio) durante l'arricchimento primario o secondario.

(b) Volume di campione trasferito alle provette per Soluzione di lisi Neogen. Fare riferimento al punto 4.6 della sezione Lisi.

Istruzioni specifiche per metodi validati
AOAC® Official Method of AnalysisSM 2016.08
AOAC® Performance Tested MethodSM #081501



Nei programmi OMASM e PTMSM dell'Istituto di ricerca AOAC, l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* è risultata essere un metodo efficace per il rilevamento di *Listeria monocytogenes*. Le matrici testate nello studio sono riportate nella Tabella 3.

Tabella 3. Protocolli di arricchimento che usano brodo Demi Fraser^(a) a 37 ± 1 °C secondo AOAC OMASM 2016.08 e PTMSM, Certificato n. 081501.

Matrice campione		Dimensione campione	Volume brodo di arricchimento (ml)	Tempo di arricchimento (ore)
Hot dog di manzo, formaggio fresco, gelato alla vaniglia, formaggio fresco in fiocchi al latte 4%, latte intero al cioccolato 3%, lattuga romana, spinaci crudi in busta, salmone affumicato a freddo		25 g	225	24-30
Pollo crudo		25 g	475	28-32
Affettato di tacchino		125 g	1125	24-30
Cantalupo ^(b)		Melone intero	Volume sufficiente per consentire al melone di galleggiare	26-30
Campioni ambientali:	Acciaio inossidabile	1 spugna	225	24-30
	Calcestruzzo sigillato	1 spugna	100	24-30
	Plastica ^(c)	1 tampone	10	24-30

Tutti i campioni per la validazione AOAC sono stati omogeneizzati mediante agitatore, se non diversamente specificato.

- (a) Il brodo Demi-Fraser e il brodo Fraser devono essere sempre integrati con il supplemento per brodo Fraser (citrato ferrico di ammonio) durante l'arricchimento primario o secondario.
- (b) Omogeneizzare il campione miscelando a mano.
- (c) Omogeneizzare il campione agitando al Vortex.

NF VALIDATION concessa dalla AFNOR Certification



3M 01/15-09/16

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

Per maggiori informazioni sulla scadenza, consultare il certificato NF VALIDATION, disponibile sul sito web menzionato in precedenza.

Metodo certificato NF VALIDATION in conformità di ISO 16140-2⁽⁶⁾ rispetto a ISO 11290⁽³⁾

Ambito della validazione: tutti i campioni di alimenti per l'uomo e ambientali (esclusi i campioni di produzione primaria)

Preparazione del campione: i campioni devono essere preparati secondo EN ISO 11290-1⁽³⁾ ed EN ISO 6887⁽⁸⁾

Versione del software: vedere il certificato

Tabella 4: protocolli di arricchimento secondo il metodo certificato NF VALIDATION 3M 01/15-09/16 a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ che usano brodo Demi Fraser e brodo Fraser secondo necessità.

Protocollo generico	Dimensione campione	Volume brodo di arricchimento (ml)	Temperatura di arricchimento ($\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$)	Tempo di arricchimento (ore)	Volume dell'analisi del campione ^(a)	Punto di interruzione accettato
Tutti i campioni alimentari (eccetto carni crude, frutti di mare crudi e prodotti lattiero-caseari crudi)	25 g	225	37	24-30	20 μl	<ul style="list-style-type: none"> • Brodo Demi Fraser fino a 72 ore • Lisato a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ • Lisato a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ fino a 72 ore
Campioni ambientali	25 g, 1 tampone o 1 salvietta					

Protocollo specifico	Arricchimento primario (brodo Demi Fraser) ^(b)				Arricchimento secondario (brodo Fraser) ^(b)				Punto di interruzione accettato
	Dimensione campione	Volume brodo di arricchimento (ml)	Temperatura di arricchimento ($\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$)	Tempo di arricchimento (ore)	Dimensione campione	Temperatura di arricchimento ($\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$)	Tempo di arricchimento (ore)	Volume dell'analisi del campione ^(c)	
Carni crude, frutti di mare crudi e prodotti lattiero-caseari crudi	25 g	225	37	20-24	Trasferire 0,1 ml in 10 ml di brodo Fraser	37	20-24	10 μl	<ul style="list-style-type: none"> • Brodo Fraser fino a 72 ore • Lisato a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ • Lisato a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ fino a 72 ore

- (a) Volume di campione trasferito alle provette per Soluzione di lisi Neogen. Fare riferimento al punto 4.6 della sezione Lisi.
- (b) Il brodo Demi-Fraser e il brodo Fraser devono essere sempre integrati con il supplemento per brodo Fraser (citrato ferrico di ammonio) durante l'arricchimento primario o secondario.
- (c) Volume di campione trasferito alle provette per soluzione di lisi Neogen. Fare riferimento al punto 4.6 della sezione Lisi.

NOTA: i campioni superiori ai 25 g non sono stati testati nello studio NF Validation.

Preparazione del Vassoio per caricamento rapido per il sistema di rilevamento molecolare Neogen®

1. Inumidire un panno con una soluzione di candeggina per uso domestico all'1-5% (diluita in acqua v:v) o una soluzione equivalente e pulire il Vassoio per caricamento rapido per il sistema di rilevamento molecolare Neogen®.
2. Sciacquare con acqua il Vassoio per caricamento rapido per il sistema di rilevamento molecolare Neogen.
3. Utilizzare un panno usa e getta per asciugare il Vassoio per caricamento rapido per il sistema di rilevamento molecolare Neogen.
4. Assicurarsi che il Vassoio per caricamento rapido per il sistema di rilevamento molecolare Neogen sia asciutto prima dell'uso.

Preparazione del Blocco di raffreddamento estraibile per il sistema di rilevamento molecolare Neogen®

Posizionare il Blocco di raffreddamento estraibile per il sistema di rilevamento molecolare Neogen® direttamente sul banco del laboratorio; utilizzare il pozzetto di raffreddamento alla temperatura ambiente del laboratorio ($20-25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Preparazione dell'Inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen®

Posizionare l'Inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen® in un'unità riscaldante a secco con doppio blocco. Accendere l'unità riscaldante a secco con blocco e impostare la temperatura per consentire all'Inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen di raggiungere e mantenere una temperatura di $100 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

NOTA: a seconda dell'unità riscaldante, attendere circa 30 minuti affinché l'Inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen raggiunga la temperatura. Utilizzando un termometro adeguatamente calibrato (p. es., un termometro a immersione parziale o un termometro digitale con termocoppia, **non** un termometro a immersione totale) inserito nella posizione designata, verificare che l'Inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen sia a $100 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

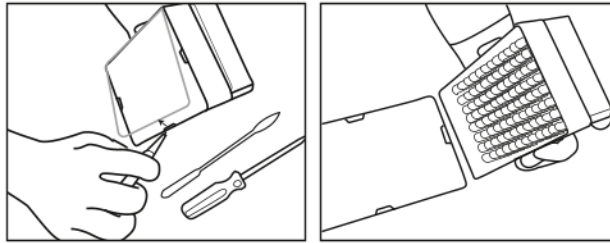
Preparazione dello Strumento per l'analisi molecolare Neogen®

1. Avviare il software del Sistema per l'analisi molecolare Neogen® ed eseguire l'accesso. Contattare il proprio rappresentante Neogen Food Safety per verificare che la versione del software in uso sia quella più aggiornata.
2. Accendere lo Strumento per l'analisi molecolare Neogen.
3. Creare o modificare un'esecuzione con i dati per ciascun campione. Fare riferimento al Manuale per l'utente del Sistema per l'analisi molecolare Neogen per i dettagli.

NOTA: lo Strumento per l'analisi molecolare Neogen deve raggiungere lo stato Pronto prima di inserire il Vassoio per caricamento rapido per il sistema di rilevamento molecolare Neogen con provette di reazione. Tale fase di riscaldamento dura 20 minuti circa ed è indicata da una spia ARANCIONE sulla barra di stato dello strumento. Quando lo strumento è pronto per avviare l'analisi, la barra di stato diventa VERDE.

Lisi

Rimuovere la parte inferiore della rastrelliera per la soluzione di lisi Neogen con un cacciavite o con una spatola prima di posizionarla nell'Inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen.

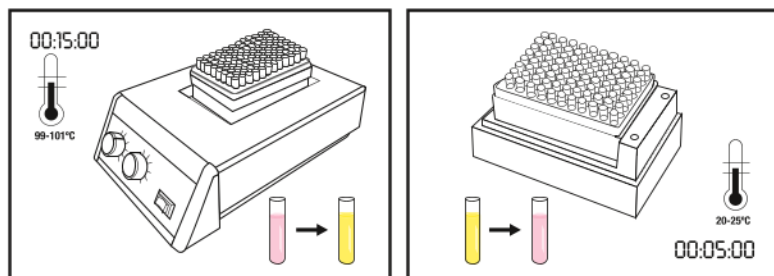


1. Far riscaldare le provette per la soluzione di lisi (Soluzione di lisi Neogen) lasciando la rastrelliera a temperatura ambiente (20-25 °C) per una notte (16-18 ore). Le alternative per equilibrare i tubi per Soluzione di lisi Neogen a temperatura ambiente sono: posizionare i tubi per soluzione di lisi Neogen sul banco di laboratorio per almeno 2 ore; incubare i tubi per soluzione di lisi Neogen in un incubatore a 37 ± 1 °C per 1 ora oppure posizionarli in un'unità riscaldante a secco con doppio blocco per 30 secondi a 100 °C.
2. Capovolgere le provette provviste di tappo per miscelare. Procedere con la fase successiva entro 4 ore.
3. Rimuovere il brodo di arricchimento dall'incubatore.
4. È necessaria una provetta per Soluzione di lisi Neogen per ciascun campione e per il campione Controllo Negativo (NC) (terreno di arricchimento sterile).
 - 4.1 Le strisce di provette per Soluzione di lisi Neogen possono essere tagliate nel numero di provette per Soluzione di lisi Neogen desiderato. Selezionare il numero necessario di provette per Soluzione di lisi Neogen singole o di strisce da 8 provette. Posizionare le provette per Soluzione di lisi Neogen in una rastrelliera vuota.
 - 4.2 Al fine di evitare la contaminazione crociata, stappare una striscia di provette per Soluzione di lisi Neogen alla volta e utilizzare un nuovo puntale per pipetta per ciascuna fase di trasferimento.
 - 4.3 Trasferire i campioni arricchiti nelle provette per Soluzione di lisi Neogen come descritto di seguito:

Trasferire **innanzitutto** ciascun campione arricchito in una singola provetta per Soluzione di lisi Neogen.
Trasferire l'NC per **ultimo**.
 - 4.4 Utilizzare lo Strumento per chiudere/aprire i tappi dei pozzetti di lisi per il rilevamento molecolare Neogen® per aprire il tappo di una striscia di provette per Soluzione di lisi Neogen, una striscia alla volta.
 - 4.5 Gettare il tappo della provetta per Soluzione di lisi Neogen; se il lisato viene conservato per effettuare nuovamente il test, posizionare i tappi in un contenitore pulito per consentirne nuovamente l'applicazione dopo la lisi.
 - 4.5.1 Per l'elaborazione del lisato conservato, consultare l'Appendice A.
 - 4.6 Trasferire 20 µl di campione in una provetta con Soluzione di lisi Neogen se non diversamente specificato nei protocolli delle tabelle 2, 3 o 4 (p. es., prodotti lattiero-caseari crudi o quando si utilizzano campioni ambientali con tampone neutralizzante, utilizzare 10 µl).



5. Ripetere i punti da 4.4 a 4.6 finché ciascun singolo campione non è stato aggiunto alla provetta di Soluzione di lisi Neogen corrispondente nella striscia.
6. Quando tutti i campioni sono stati trasferiti, trasferire 20 µl di NC (terreno di arricchimento sterile, p. es., brodo Demi Fraser) in una provetta per Soluzione di lisi Neogen. Non utilizzare l'acqua come NC.
7. Verificare che la temperatura dell'Inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen sia a 100 ± 1 °C.
8. Posizionare la rastrelliera portaprovette per Soluzione di lisi Neogen, scoperta, nell'Inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen e riscaldare per 15 ± 1 minuti. Durante il riscaldamento, la Soluzione di lisi Neogen virerà dal rosa (freddo) al giallo (caldo).
 - 8.1 I campioni non trattati termicamente in modo corretto durante la fase di lisi dell'analisi possono essere considerati un potenziale rischio biologico e NON devono essere inseriti nello Strumento per l'analisi molecolare Neogen.
9. Rimuovere la rastrelliera portaprovette della Soluzione di lisi Neogen scoperta dal pozzetto di riscaldamento e lasciarla raffreddare nel Blocco di raffreddamento estraibile per il sistema di rilevamento molecolare Neogen per almeno 5 minuti e per un massimo di 10 minuti. Il Supporto per il pozzetto di raffreddamento per il sistema di rilevamento molecolare Neogen, utilizzato a temperatura ambiente, deve essere posto direttamente sul banco del laboratorio. Quando è fredda, la soluzione di lisi torna a essere di colore rosa.
10. Rimuovere la rastrelliera portaprovette per Soluzione di lisi Neogen dal Blocco di raffreddamento estraibile per il sistema di rilevamento molecolare Neogen.

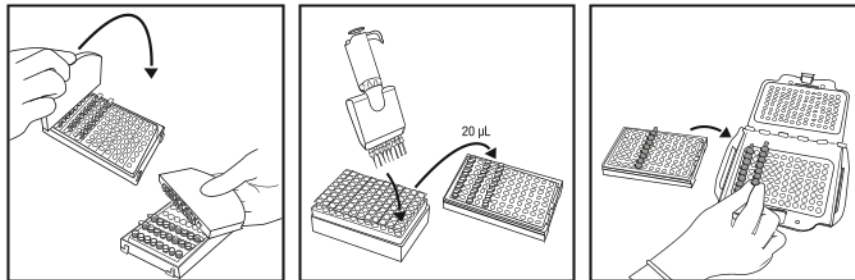


Amplificazione

1. È richiesta una provetta di reagente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* per ciascun campione e per l'NC.
 - 1.1 Le strisce delle provette di reagente possono essere tagliate nel numero di provette desiderato. Selezionare il numero necessario di singole provette di reagente o di strisce da 8 provette per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes*.
 - 1.2 Posizionare le provette di reagente per l'Analisi molecolare Neogen di seconda generazione per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* in una rastrelliera vuota.
 - 1.3 Evitare di spostare le pastiglie di reagente poste sul fondo delle provette.
2. Selezionare una provetta di Controllo reagente Neogen e posizionarla nella rastrelliera.
3. Al fine di evitare la contaminazione crociata, rimuovere i tappi da una striscia di provette di reagente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* alla volta e utilizzare un nuovo puntale per pipetta per ciascuna fase di trasferimento.
4. Trasferire il lisato in provette di reagente per l'Analisi molecolare Neogen di seconda generazione per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* e in una provetta di Controllo reagente Neogen come indicato di seguito:

Trasferire **innanzitutto** ciascun lisato campione in singole provette di reagente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes*, quindi trasferire l'NC. Idratare la provetta di Controllo reagente Neogen **per ultima**.

5. Utilizzare lo Strumento per chiudere/aprire i tappi dei pozzetti contenenti il reagente per il rilevamento molecolare Neogen® per rimuovere i tappi dalle provette di reagente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes*; una striscia di provette di reagente per volta. Gettare il tappo.
 - 5.1 **Trasferire 20 µl di lisato campione dalla metà superiore del liquido (evitare il deposito) della provetta per Soluzione di lisi Neogen nella provetta di reagente corrispondente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes*. Erogare con un'inclinazione per evitare lo spostamento delle pastiglie. Miscelare pipettando delicatamente su e giù per 5 volte.**
 - 5.2 Ripetere il punto 5.1 finché ciascun lisato campione non è stato aggiunto alla provetta di reagente corrispondente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* nella striscia.
 - 5.3 Chiudere le provette di reagente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* con i tappi supplementari forniti e utilizzare il lato arrotondato dello Strumento per chiudere/aprire i tappi dei pozzetti contenenti il reagente per il rilevamento molecolare Neogen al fine di applicare pressione con un movimento in avanti e all'indietro, accertandosi di stringere bene il tappo.
 - 5.4 Ripetere i punti da 5.1 a 5.3 secondo necessità, per il numero di campioni da testare.
 - 5.5 Quando tutti i lisati sono stati trasferiti, ripetere il punto 5.1 per trasferire 20 µl di lisato NC in una provetta di reagente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes*.
 - 5.6 **Trasferire 20 µl di lisato NC in una provetta di Controllo reagente Neogen.** Erogare con un'inclinazione per evitare lo spostamento delle pastiglie. Miscelare pipettando delicatamente su e giù per 5 volte.
6. Caricare le provette provviste di tappo su un Vassoio per caricamento rapido per il sistema di rilevamento molecolare Neogen pulito e decontaminato. Chiudere saldamente il coperchio del Vassoio per caricamento rapido per il sistema di rilevamento molecolare Neogen.



7. Controllare e confermare l'esecuzione configurata sul software del Sistema per l'analisi molecolare Neogen.
8. Fare clic sul pulsante Start nel software e selezionare lo strumento da utilizzare. Il coperchio dello strumento selezionato si apre automaticamente.
9. Posizionare il Vassoio per caricamento rapido per il sistema di rilevamento molecolare Neogen nello Strumento per l'analisi molecolare Neogen e chiudere il coperchio per avviare l'analisi. I risultati sono forniti entro 75 minuti, sebbene quelli positivi possano essere rilevati prima.
10. Una volta completata l'analisi, rimuovere il Vassoio per caricamento rapido per il sistema di rilevamento molecolare Neogen dallo Strumento per l'analisi molecolare Neogen e smaltire le provette immergendole in una soluzione di candeggina per uso domestico 1-5% (diluita con acqua v:v) per 1 ora e lontano dall'area di preparazione dell'analisi.

AVVISO: per ridurre al minimo il rischio di falsi positivi dovuti alla contaminazione crociata, non aprire mai le provette di reagente contenenti DNA amplificato. Queste includono le provette di reagente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes*, le provette di Controllo reagente Neogen e le provette di Controllo della matrice Neogen. Gettare sempre le provette di reagente sigillate immergendole in una soluzione di candeggina per uso domestico all'1-5% (diluita in acqua v:v) o in una soluzione equivalente per 1 ora lontano dall'area di preparazione dell'analisi.

Risultati e interpretazione






Un algoritmo interpreta la curva di emissione luminosa risultante dal rilevamento dell'amplificazione degli acidi nucleici. I risultati sono analizzati automaticamente dal software e codificati mediante un colore in base all'esito. Un risultato positivo o negativo è determinato dall'analisi di un numero di parametri unici della curva. I risultati presunti positivi sono riportati in tempo reale, mentre i risultati Negativi e Da esaminare sono visualizzati al completamento dell'analisi.

I campioni presunti positivi vanno confermati in base alle procedure operative standard del laboratorio o seguendo il metodo di conferma appropriato^(1, 2, 3), iniziando dal trasferimento dal brodo di arricchimento primario al brodo di arricchimento secondario (se pertinente), seguito dalla piastratura e dalla conferma degli isolati utilizzando metodi biochimici e sierologici adeguati.

NOTA: anche un campione negativo non fornirà una lettura zero, poiché il sistema e i reagenti di amplificazione dell'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* riportano un valore di "background" dell'unità di luce relativa (RLU).

Nel raro caso di emissione luminosa insolita, l'algoritmo la classifica come "Da esaminare". Neogen consiglia all'utente di ripetere l'analisi per qualsiasi campione da esaminare. Se il risultato continua a essere Da esaminare, procedere con il test di conferma utilizzando il proprio metodo di elezione o come specificato dalle normative locali.

Tabella 5: simboli dei risultati per i campioni e interpretazione forniti dal software del Sistema per l'analisi molecolare Neogen.

Tipo di pozzetto	Simbolo del risultato del pozzetto	Risultato	Interpretazione
Campione		Positivo	Il campione è presunto positivo per il patogeno bersaglio.
Campione		Negativo	Il campione è negativo per il patogeno bersaglio.
Campione		Inibito	La matrice del campione è stata inibitoria dell'analisi. Può essere richiesta una ripetizione del test. Per maggiori informazioni, fare riferimento alla sezione relativa alla risoluzione dei problemi e alle Istruzioni sul prodotto del kit di analisi.
Campione		Da esaminare	La presenza o l'assenza del patogeno bersaglio è stata indeterminata. Può essere richiesta una ripetizione del test. Per maggiori informazioni, fare riferimento alla sezione relativa alla risoluzione dei problemi e alle Istruzioni sul prodotto del kit di analisi.
Campione		Errore	Non è stata rilevata alcuna bioluminescenza. Può essere richiesta una ripetizione del test. Per maggiori informazioni, fare riferimento alla sezione relativa alla risoluzione dei problemi e alle Istruzioni sul prodotto del kit di analisi.

Conferma dei risultati secondo il metodo certificato NF VALIDATION

Opzione 1: utilizzo dello standard ISO 11290⁽³⁾ a partire dall'arricchimento in Demi Fraser.

Opzione 2: mediante isolamento su PALCAM agar o su agar cromogeno (O&A) facente parte di un metodo certificato NF VALIDATION per il rilevamento del *Listeria monocytogenes*. La presenza di colonie caratteristiche è sufficiente per confermare la presenza di *Listeria monocytogenes*.

Opzione 3: utilizzo di sonde di acido nucleico come descritto nello standard EN ISO 7218⁽⁵⁾, con esecuzione su colonie isolate, da agar selettivo (vedere opzione 1 o 2).

Opzione 4: utilizzo di un altro metodo certificato NF VALIDATION, il cui principio deve essere differente da quello dell'Analisi molecolare Neogen di seconda generazione per il rilevamento di *Listeria monocytogenes*. Deve essere utilizzato il protocollo completo descritto per questo secondo metodo validato. Tutti i passaggi precedenti all'inizio della conferma devono essere comuni a entrambi i metodi.

Nel caso di risultati discordanti (presunto positivo con il metodo alternativo, non confermato da uno dei mezzi suindicati), il laboratorio deve agire di conseguenza per garantire la validità dei risultati ottenuti.

Nel caso di risultati discordanti (presunto positivo con l'Analisi molecolare Neogen di seconda generazione per il rilevamento di *Listeria monocytogenes*, non confermato da uno dei mezzi suindicati), il laboratorio deve agire di conseguenza per garantire la validità dei risultati ottenuti.

Per qualsiasi domanda su applicazioni o procedure specifiche, visitare il nostro sito web all'indirizzo www.neogen.com, oppure contattare il distributore o il rappresentante Neogen di zona.

Appendice A. Interruzione del protocollo: Conservazione e ripetizione del test dei lisati termotrattati.

1. Per conservare un lisato termotrattato, richiudere la provetta di lisi con un tappo pulito (vedere la sezione "Lisi", 4.5).
2. Conservare a 4-8 °C fino a 72 ore.
3. Preparare il campione conservato per l'amplificazione capovolgendolo 2-3 volte per miscelarlo.
4. Togliere il tappo alle provette.
5. Posizionare le provette di lisato miscelato sull'inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen e riscaldare a 100 ± 1 °C per 5 ± 1 minuti.

6. Rimuovere la rastrelliera portaprovette per Soluzione di lisi Neogen dal pozzetto di riscaldamento e lasciarla raffreddare nel Blocco di raffreddamento estraibile per il sistema di rilevamento molecolare Neogen per almeno 5 minuti e per un massimo di 10 minuti.
7. Proseguire con il protocollo descritto nella sezione “Amplificazione” di cui sopra.

Bibliografia:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Legenda dei simboli delle etichette dei prodotti

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.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.
FS00867B

Instrucciones del Producto

Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes*

Descripción del producto y uso adecuado

El Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen® se utiliza con el Sistema de Detección Molecular Neogen® para la detección rápida y específica y de *Listeria monocytogenes* en muestras enriquecidas de alimentos y ambientes. Los Análisis de Detección Molecular Neogen usan amplificación isotérmica mediada por asas para amplificar rápidamente las secuencias de ácidos nucleicos con alta especificidad y sensibilidad, combinadas con bioluminiscencia para detectar la amplificación. Los resultados presuntamente positivos se reportan en tiempo real, mientras que los resultados negativos se revelan una vez terminado el ensayo. Los resultados presuntamente positivos se deben confirmar con su método de preferencia, o según se especifique en las regulaciones locales^(1, 2, 3).

El Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen está previsto para el uso en laboratorios por profesionales capacitados en el empleo de técnicas de laboratorio. Neogen no documentó el uso de este producto en otras industrias que no sean la alimentaria o la de bebidas. Por ejemplo, Neogen no documentó este producto para el análisis de muestras de agua, farmacéuticas, cosméticas, clínicas o veterinarias. El Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen no ha sido evaluado con todos los protocolos de análisis ni con todas las cepas bacterianas posibles.

Como con todos los métodos de prueba, el origen, la formulación y la calidad del medio de enriquecimiento pueden influir sobre los resultados. Factores tales como los métodos de muestreo, los protocolos de análisis, la preparación de la muestra, la manipulación y la técnica de laboratorio también pueden afectar los resultados. Neogen recomienda la evaluación del método lo que incluye el medio de enriquecimiento usando un número suficiente de muestras en alimentos representativos y con exposición a ciertas cepas o bacterias desafiantes para garantizar que el método satisface los criterios del usuario en su propio entorno.

Neogen ha evaluado el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen con Base de Caldo Demi Fraser que contiene citrato de amonio férrico y base de Caldo Fraser que contiene citrato de amonio férrico según sea necesario. A continuación, se proporciona una formulación típica de este medio.

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

* Sustituir: fosfato de sodio, dibásico, dihidrato 12,0 g

Suplemento de Caldo de Fraser

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

Citrato de amonio férrico 0,5 g/10 mL

pH final 7,2 ± 0,2 a 25 °C

El Equipo de Detección Molecular Neogen® está previsto para ser utilizado con muestras que hayan sido tratadas con calor durante el paso de lisis del ensayo, que se diseñó para destruir los microorganismos presentes en la muestra. Las muestras que no se hayan tratado debidamente con calor durante el paso de lisis del ensayo pueden considerarse un posible riesgo biológico y NO deben introducirse en el Equipo de Detección Molecular Neogen.

Neogen Food Safety cuenta con certificación de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO) 9001 de diseño y fabricación.

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

Tabla 1. Componentes del kit para el Análisis de Detección Molecular Neogen

Artículo	Identificación	Cantidad	Contenido	Comentarios
Solución de Lisis (LS) Neogen®	Solución rosada en tubos transparentes	96 (12 tiras de 8 tubos)	580 µL de LS por tubo	En gradilla y lista para usar
Tubos de reactivos para el Ensayo de Detección Molecular 2 para <i>Listeria monocytogenes</i> Neogen®	Tubos amarillos	96 (12 tiras de 8 tubos)	Mezcla de detección y amplificación específica liofilizada	Listo para usar
Tapas adicionales	Tapas amarillas	96 (12 tiras de 8 tapas)		Listo para usar
Control de Reactivos Neogen® (RC)	Tubos transparentes con tapa de bisagra	16 (2 bolsas de 8 tubos individuales)	Mezcla de detección y amplificación de control liofilizado de DNA	Listo para usar

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

Seguridad

El usuario debe leer, comprender y seguir la información de seguridad incluida en las instrucciones para el Sistema de Detección Molecular Neogen y el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen. 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 Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen para el diagnóstico de afecciones en seres humanos ni animales.

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

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

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 Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen como se indica en el empaque y en las instrucciones del producto.
- Utilice siempre el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen antes de su fecha de vencimiento.
- Utilice el Análisis de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen con muestras de alimentos y ambientales que hayan sido validadas internamente o por un tercero.
- Utilice el Análisis de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen solo con superficies, desinfectantes, protocolos y cepas bacterianas que hayan sido validadas internamente o por un tercero.
- En el caso de muestras ambientales que contengan una solución de caldo neutralizante con complejo aril sulfonato, prepare una dilución en una proporción de 1:2 (1 parte de muestra en 1 parte de caldo de enriquecimiento estéril) antes de realizar la prueba. Otra opción es transferir 10 µL de la muestra del caldo neutralizante de enriquecimiento a los tubos de Solución de Lisis Neogen. Productos para la Recolección de Muestras Neogen® que incluyen una Solución de Caldo 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:

- Se recomienda enfáticamente informar al personal femenino de laboratorio sobre el riesgo, en caso de estar embarazada, que se genera por la infección de la madre por exposición a *Listeria monocytogenes*.
- Realice las pruebas de patógenos en un laboratorio debidamente equipado, bajo la supervisión de personal capacitado. El medio de enriquecimiento incubado y el equipo o las superficies que hayan entrado en contacto con el medio de enriquecimiento podrían contener patógenos en niveles suficientes para provocar un riesgo para la salud humana.
- Siempre proceda según las prácticas estándar de seguridad del laboratorio. Eso incluye usar la ropa de protección adecuada y protección para los ojos al manipular reactivos y muestras contaminadas.



- Evite el contacto con el contenido del medio de enriquecimiento y de los tubos de reactivos después de la amplificación.
- Deseche las muestras enriquecidas conforme a los estándares de la industria.
- Las muestras que no se hayan tratado debidamente con calor durante el paso de lisis del ensayo pueden considerarse un posible riesgo biológico y NO deben introducirse en el Equipo de Detección Molecular Neogen.

Para reducir los riesgos relacionados con contaminación cruzada mientras se prepara el ensayo:

- Use siempre guantes (para proteger al usuario y evitar que se introduzcan nucleasas).

Para reducir los riesgos relacionados con la contaminación ambiental:

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

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

- No exceda la temperatura recomendada al configurar el calentador.
- No exceda el tiempo de calentamiento recomendado.
- Utilice un termómetro calibrado adecuado para verificar la temperatura del Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen® (p. ej., un termómetro de inmersión parcial o un termómetro digital termopar, y no un termómetro de inmersión total). El termómetro debe colocarse en la ubicación designada en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen.

ATENCIÓN

Para reducir los riesgos relacionados con contaminación cruzada mientras se prepara el ensayo:

- Cámbiense 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 ADN.

Para reducir los riesgos relacionados con un resultado falso positivo:

- Nunca abra los tubos de reactivos después de la amplificación.
- Siempre deseche los tubos contaminados dejándolos inmersos en una solución de cloro de uso doméstico del 1% al 5% (v:v en agua) durante 1 hora y lejos del área en que se prepara el ensayo.
- Nunca esterilice en autoclave los tubos de reactivos después de la amplificación.

Consulte la Hoja de Datos de Seguridad para obtener más información y conocer las normativas locales para el desecho de materiales.

Si tiene preguntas acerca de los procedimientos o las aplicaciones específicas, visite nuestro sitio web en www.neogen.com o comuníquese con su representante o distribuidor local de Neogen.

Responsabilidad del usuario

Los usuarios son responsables de familiarizarse con las instrucciones e información del producto. Visite nuestro sitio web en www.neogen.com o póngase en contacto con su representante o distribuidor local de Neogen para obtener más información.

Al seleccionar un método de prueba, es importante reconocer que factores externos, tales como los métodos de muestreo, los protocolos de prueba, la preparación de la muestra, la manipulación y la técnica de laboratorio, pueden afectar los resultados.

Al seleccionar cualquier método de prueba o producto, es responsabilidad del usuario evaluar un número suficiente de muestras con retos microbianos y matrices apropiadas para satisfacer al usuario en cuanto a que el método de prueba cumple con los criterios del usuario.

Además, es responsabilidad del usuario determinar que cualquier método de prueba y sus resultados cumplen con los requisitos de sus clientes y proveedores.

Como sucede con cualquier método de prueba, los resultados obtenidos del uso de cualquier producto de Neogen Food Safety no constituyen una garantía de calidad de las matrices ni de los procesos analizados.

Para ayudar a los clientes a evaluar el método para varias matrices, Neogen ha desarrollado el kit de Control de Matriz para Detección Molecular Neogen®. Cuando sea necesario, utilice el Control de Matriz (MC) para determinar si la matriz puede afectar los resultados del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen. Analice varias muestras representativas de la matriz, es decir, las muestras obtenidas de diferente origen, durante cualquier periodo de validación al adoptar el método de Neogen, al analizar matrices nuevas o desconocidas, o matrices que hayan sido sometidas a cambios en el proceso o la materia prima.

Una matriz se puede definir como un tipo de producto con propiedades intrínsecas, tales como composición y proceso. Las diferencias entre las matrices pueden ser tan simples como los efectos causados por las diferencias en su procesamiento o presentación, por ejemplo, productos crudos versus pasteurizados; alimentos frescos versus secos, etc.

Limitación de garantía/Recurso limitado

SALVO LO EXPRESAMENTE ESTIPULADO EN UNA SECCIÓN DE GARANTÍA LIMITADA O EN EL EMBALAJE DE UN PRODUCTO ESPECÍFICO, NEOGEN RENUNCIA A TODAS LAS GARANTÍAS EXPRESAS Y TÁCITAS INCLUIDA, ENTRE OTRAS, CUALQUIER GARANTÍA DE 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. Póngase en contacto con su representante de Neogen o distribuidor autorizado de Neogen para que se le responda cualquier otra pregunta.

Limitación de responsabilidad de Neogen

NEOGEN NO SERÁ RESPONSABLE DE NINGUNA PÉRDIDA O DAÑO, YA SEA DIRECTO, INDIRECTO, ESPECIAL, DAÑOS ACCIDENTALES O CONSECUENCIAS, INCLUIDOS ENTRE OTROS, LA PÉRDIDA DE BENEFICIOS. En ningún caso la responsabilidad de Neogen conforme a ninguna teoría legal excederá el precio de compra del producto supuestamente defectuoso.

Almacenamiento y desecho

Almacene el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen a una temperatura entre 2 °C y 8 °C. No lo congele. Durante el almacenamiento, mantenga el kit fuera del alcance de la luz. Después de abrir el kit, verifique que la bolsa de aluminio no esté dañada. Si la bolsa está dañada, no use el producto. Después de abrir el embalaje, los tubos de reactivo no utilizados se deberán guardar siempre en la bolsa resellable junto con el desecante para conservar la estabilidad de los reactivos liofilizados. Almacene las bolsas cerradas a una temperatura entre 2 °C y 8 °C durante 60 días como máximo.

No utilice el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen después de su fecha de vencimiento. La fecha de vencimiento y el número de lote están impresos en la etiqueta externa de la caja. Después de utilizarlos, el medio de enriquecimiento y los tubos del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen podrían contener materiales patógenos. Una vez terminada la prueba, proceda según los estándares actuales de la industria para el desecho de residuos contaminados. Consulte la Hoja de Datos de Seguridad para obtener más información y conocer las normativas locales para el desecho de materiales.

Instrucciones de uso

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

Descontamine periódicamente las mesas y el equipo de laboratorio (pipetas, herramientas para tapar/destapar, etc.) con una solución de cloro de uso doméstico del 1% al 5% (v:v en agua) o en una solución para eliminación de 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"⁽⁶⁾.

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

La Tabla 3 para los protocolos de enriquecimiento según el *Official Method of Analysis*SM 2016.08 de AOAC® y el certificado n.º 081501 del *Performance Tested Method*SM de AOAC®.

La Tabla 4 para los protocolos de enriquecimiento según el certificado NF Validation 3M 01/15-09/16.

Enriquecimiento de la muestra

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

Alimentos

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

Muestras ambientales

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

ADVERTENCIA: Si decidiera utilizar una solución de caldo neutralizante (NB) 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 resultará en la liberación del producto contaminado. Otra opción es transferir 10 µL de la solución de caldo neutralizante enriquecida a los tubos de Solución de Lisis Neogen.

El tamaño recomendado del área de muestra para verificar la presencia o ausencia del patógeno en la superficie es de 100 cm² (10 cm x 10 cm o 4 in. x 4 in.). Cuando realice el muestreo con una esponja, cubra toda el área en dos direcciones (de izquierda a derecha, luego, de arriba hacia abajo) o recolecte las muestras ambientales según el protocolo de muestreo actual o con los lineamientos de FDA BAM⁽¹⁾, USDA FSIS MLG⁽²⁾ o la norma ISO 18593⁽⁷⁾.

1. Deje el medio de enriquecimiento de Caldo Demi Fraser (adicionado con citrato de amonio férrico) equilibrar a la temperatura ambiente de laboratorio.
2. Combine asépticamente el medio de enriquecimiento y la muestra según las Tablas 2, 3 o 4.
3. Homogenice cuidadosamente mediante un homogeneizador peristáltico, licuadora, o mezclado manual por 2 ± 0,2 minutos. Incube a una temperatura de 37 °C ± 1 °C de 24 a 30 horas según las Tablas 2, 3 o 4.

Tabla 2: Protocolos generales de enriquecimiento a 37 °C ± 1 °C con Caldo Demi Fraser y Caldo Fraser, según sea necesario.

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



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

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

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

Instrucciones específicas para métodos validados

AOAC® Official Method of AnalysisSM 2016.08

AOAC® Performance Tested MethodSM n.º 081501



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

Tabla 3. Protocolos de enriquecimiento en los que se utiliza Caldo Demi Fraser^(a) a 37 °C ± 1 °C según AOAC OMASM 2016.08 y el certificado PTMSM n.º 081501.

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

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

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

(b) Homogeneizar la muestra mediante mezclado manual.

(c) Homogeneizar la muestra mediante agitador eléctrico.



3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

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

Método certificado de NF VALIDATION en cumplimiento de la norma ISO 16140-2⁽⁶⁾, en comparación con la norma ISO 11290⁽³⁾ Alcance de la validación: todas las muestras ambientales y de alimentos para humanos (excluidas las muestras de la producción primaria)

Preparación de la muestra: las muestras deben prepararse según las normas EN ISO 11290-1⁽³⁾ y EN ISO 6887⁽⁸⁾

Versión de software: consulte el certificado

Tabla 4: Protocolos de enriquecimiento según el método certificado NF VALIDATION 3M 01/15-09/16 a 37 °C ± 1 °C en los que se utiliza Caldo Demi Fraser y Caldo Fraser, según sea necesario.

Protocolos generales	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento (mL)	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Volumen de análisis de la muestra ^(a)	Punto de interrupción aceptado
Todas las muestras de alimentos (excepto carnes crudas, mariscos crudos y productos lácteos crudos)	25 g	225	37	24-30	20 µL	<ul style="list-style-type: none"> • Caldo Demi Fraser hasta 72 horas • Lisado a -20 °C • Lisado a 4 °C hasta 72 horas
Muestras ambientales	25 g, 1 hisopo o 1 toalla					

Protocolo específico	Enriquecimiento primario (Caldo Demi Fraser) ^(b)				Enriquecimiento secundario (Caldo Fraser) ^(b)				Punto de interrupción aceptado
	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento (mL)	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Tamaño de la muestra	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Volumen de análisis de la muestra ^(c)	
Carnes crudas, mariscos crudos y productos lácteos crudos	25 g	225	37	20-24	Transfiera 0,1 mL a 10 mL de Caldo Fraser	37	20-24	10 µL	<ul style="list-style-type: none"> • Caldo Fraser hasta 72 horas • Lisado a -20 °C • Lisado a 4 °C hasta 72 horas

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

(b) El Caldo Demi Fraser o el Caldo Fraser siempre deben adicionarse con el suplemento de Caldo Fraser (citrate férrico amoniacal) en el enriquecimiento primario o secundario.

(c) Volumen de muestra transferido a los tubos de Solución de Lisis Neogen. Consulte el Paso 4.6 de la sección Lisis.

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

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

1. Humedezca un paño con una solución de cloro de uso doméstico del 1% al 5% (v:v en agua) y limpie la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen®.
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 Bandeja para el Bloque de Frío del Sistema de Detección Molecular Neogen® directamente sobre la mesa de laboratorio. Utilice el Bloque de Enfriamiento a temperatura ambiente de 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 la unidad calentadora seca de bloques doble. Encienda la unidad calentadora seca de bloques y ajuste la temperatura para permitir que el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen alcance y mantenga una temperatura de 100 °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 adecuado (p. ej., un termómetro de inmersión parcial o un termómetro digital termopar, **no** un termómetro de inmersión total) colocado en la ubicación designada, verifique que el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen se encuentre a 100 °C ± 1 °C.

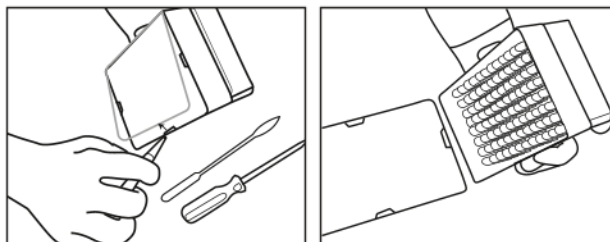
Preparación del Equipo de Detección Molecular Neogen®

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 o una espátula antes de colocarla en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen.



1. Deje que los tubos de solución de lisis (Solución de Lisis Neogen) se calienten colocando la gradilla a temperatura ambiente (20 °C y 25 °C) durante toda la noche (16 a 18 horas). Las alternativas para que los tubos de Solución de Lisis Neogen alcancen temperatura ambiente son colocar los tubos de Solución de Lisis Neogen sobre la mesa de laboratorio durante por lo menos 2 horas, incubar los tubos de Solución de Lisis Neogen en una incubadora a 37 °C ± 1 °C durante 1 hora o colocarlos en una unidad calentadora seca dos bloques durante 30 segundos a 100 °C.
2. Invierta los tubos tapados para mezclarlos. Continúe con el paso siguiente dentro de las siguientes 4 horas.
3. Retire el caldo de enriquecimiento de la incubadora.
4. Se requiere un tubo de Solución de Lisis Neogen para cada muestra y uno como control negativo (NC) (medio de enriquecimiento estéril).
 - 4.1 Las tiras de tubos de Solución de Lisis Neogen pueden cortarse para obtener la cantidad deseada de tubos de la Solución de Lisis Neogen. Seleccione la cantidad de tubos de Solución de Lisis Neogen individuales o tiras de 8 tubos necesarias. Coloque los tubos de Solución de Lisis Neogen en una gradilla vacía.
 - 4.2 Para evitar la contaminación cruzada, destape una tira de tubos de Solución de Lisis Neogen por vez y use una nueva punta de pipeta para cada paso de transferencia.

4.3 Transfiera la muestra enriquecida a los tubos de Solución de Lisis Neogen como se describe a continuación:

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

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

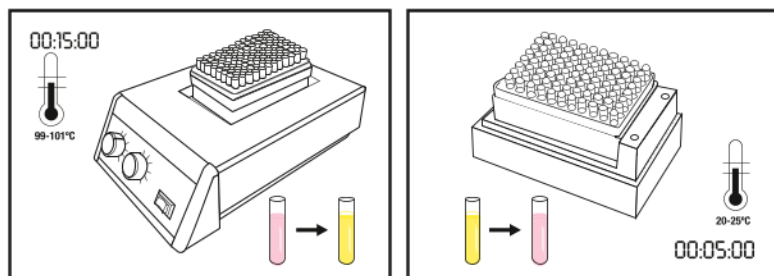
4.5 Deseche la tapa del tubo de Solución de Lisis Neogen; si se conservará el lisado para repetir la prueba, coloque las tapas en un envase limpio para reutilizarlas luego de la lisis.

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

4.6 Transfiera 20 µL de la muestra en un tubo de Solución de Lisis Neogen a menos que se indique lo contrario en los protocolos de las Tablas 2, 3 o 4 (p. ej., productos lácteos crudos o si se emplean muestras ambientales con solución de caldo neutralizante, utilice 10 µL).



5. Repita los pasos 4.4 al 4.6 hasta que cada muestra individual se haya agregado al correspondiente tubo de Solución de Lisis Neogen de la tira.
6. Cuando se hayan transferido todas las muestras, transfiera 20 µL del NC (medio de enriquecimiento estéril, p. ej., Caldo Demi Fraser) a un tubo de Solución de Lisis Neogen. No use agua como un NC.
7. Verifique que la temperatura del Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen sea de 100 °C ± 1 °C.
8. Coloque la gradilla sin cubrir de tubos de Solución de Lisis Neogen en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen y caliente durante 15 ± 1 minutos. Durante el calentamiento, la Solución de Lisis Neogen cambiará de rosado (frío) a amarillo (caliente).
 - 8.1 Las muestras que no se hayan tratado debidamente con calor durante el paso de lisis del ensayo pueden considerarse un posible riesgo biológico y NO deben introducirse en el Equipo de Detección Molecular Neogen.
9. Retire la gradilla descubierta de tubos de Solución de Lisis Neogen del bloque de calor y deje que se enfríe en la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen al menos durante 5 minutos y por un máximo de 10 minutos. Cuando se utiliza el Bloque de Frío Molecular Neogen a temperatura ambiente, debe colocarse directamente sobre la mesa de laboratorio. Cuando esté fría, la solución de lisis revertirá a un color rosado.
10. Retire la gradilla de tubos de Solución de Lisis Neogen de la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen.



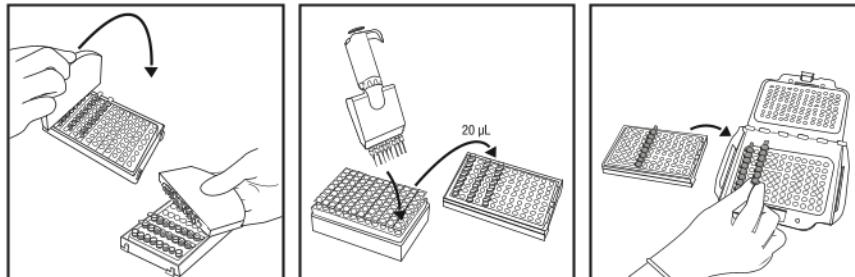
Amplificación

1. Se necesita un Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen por cada muestra y uno para el NC.
 - 1.1 Las tiras de tubos de reactivo pueden cortarse para obtener la cantidad de tubos deseada. Seleccione la cantidad de Tubos de Reactivos del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen o tiras de 8 tubos, según sea necesario.
 - 1.2 Coloque los Tubos de Reactivos del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen en una gradilla vacía.
 - 1.3 Evite mover las perlas de reactivo del fondo de los tubos.

2. Seleccione 1 tubo de Control de Reactivos Neogen y colóquelo en la gradilla.
3. Para evitar la contaminación cruzada, destape un Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen a la vez y utilice una nueva punta de pipeta para cada paso de transferencia.
4. Transfiera el lisado a un Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen y a un tubo de Control de Reactivos Neogen como se describe a continuación:

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

5. Utilice la Herramienta para Encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular – Reactivo Neogen® para destapar el Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen, una tira a la vez. Deseche la tapa.
 - 5.1 **Transfiera 20 µL del lisado de muestra de la ½ superior del líquido (evite el precipitado) en el tubo de Solución de Lisis Neogen al Tubo de Reactivo correspondiente del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen. Dispense en un ángulo que evite movimientos en las perlas. Mezcle pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.**
 - 5.2 Repita el paso 5.1 hasta que se haya agregado una muestra individual del lisado a un Tubo de Reactivo correspondiente del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen en la tira.
 - 5.3 Cubra los Tubos de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen con las tapas adicionales provistas y utilice el lado redondeado de la Herramienta para Encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular – Reactivo Neogen para aplicar presión con un movimiento hacia adelante y hacia atrás para asegurarse de que la tapa quede bien ajustada.
 - 5.4 Repita los pasos 5.1 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 la muestra, repita el paso 5.1 para transferir 20 µL de lisado NC a un Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen.
 - 5.6 **Transfiera 20 µL del lisado NC a un tubo de Control de Reactivos Neogen.** Dispense en un ángulo que evite movimientos en las perlas. Mezcle pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.
6. Cargue los tubos tapados en una Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen limpia y descontaminada. Cierre y 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 75 minutos, aunque los positivos pueden detectarse antes.
10. Después de completar el ensayo, retire la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen del Equipo de Detección Molecular Neogen y deseche los tubos dejándolos inmersos en una solución de cloro de uso doméstico del 1% al 5% (v:v en agua) durante 1 hora y lejos del área en que se prepara el ensayo.

ATENCIÓN: Para minimizar el riesgo de falsos positivos a causa de contaminación cruzada, nunca abra tubos de reactivo que contengan DNA amplificado. Esto incluye un Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen, el Control de Reactivos Neogen y los Tubos de Control de Matriz. Siempre deseche los tubos contaminados dejándolos inmersos en una solución de cloro de uso doméstico del 1% al 5% (v:v en agua) durante 1 hora y lejos del área en que se prepara el ensayo.

Resultados e interpretación

Un algoritmo interpreta la curva de producción de luz que se obtiene de la detección de ácido nucleico amplificado. El software analiza automáticamente los resultados y se codifican por color según el resultado. Los resultados Positivo o Negativo se determinan mediante el análisis de una cantidad de parámetros característicos de la curva. Los resultados






presuntivos positivos se informan en tiempo real, mientras que los resultados Negativo e Inspeccionar se muestran una vez terminado el análisis.

Las muestras con resultados presuntivos positivos deben confirmarse según los procedimientos operativos estándar del laboratorio o mediante la confirmación del método de referencia apropiado^(1,2,3), comenzando con la transferencia del caldo de enriquecimiento primario al secundario (si corresponde), seguido del posterior sembrado en placa y la confirmación de aislados, mediante métodos bioquímicos y serológicos apropiados.

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

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

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

Tipo de pozo	Símbolo del resultado del pozo	Resultado	Interpretación
Muestra		Positiva	La muestra es presuntamente positiva para el patógeno objetivo.
Muestra		Negativa	La muestra es negativa para el patógeno objetivo.
Muestra		Inhibida	La matriz de la muestra fue inhibidora para el ensayo. Es posible que se requiera una repetición de la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de solución de problemas y las instrucciones del producto del kit de ensayo.
Muestra		Inspeccionar	No se pudo determinar la presencia o ausencia del patógeno objetivo. Es posible que se requiera una repetición de la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de solución de problemas y las instrucciones del producto del kit de ensayo.
Muestra		Error	No se detectó bioluminiscencia. Es posible que se requiera una repetición de la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de solución de problemas y las instrucciones del producto del kit de ensayo.

Confirmación de los resultados según el Método Certificado de NF VALIDATION

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

Opción 2: mediante el aislamiento en agar PALCAM o en agar cromogénico (O&A) que forman parte de un método certificado NF VALIDATION para la detección de *Listeria monocytogenes*. La presencia de colonias características es suficiente para confirmar la presencia de *Listeria monocytogenes*.

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

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

En caso de resultados discordantes (presuntamente positivos con el método alternativo, no confirmados por alguno de los medios descritos anteriormente), el laboratorio debe seguir los pasos necesarios para garantizar la validez del resultado obtenido.

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

Si tiene preguntas acerca de los procedimientos o las aplicaciones específicas, visite nuestro sitio web en www.neogen.com o comuníquese con su representante o distribuidor local de Neogen.

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

1. Para almacenar un lisado tratado térmicamente, vuelva a tapar el tubo de lisis con una tapa limpia (consulte “Lisis”, sección 4.5).
2. Almacene entre 4 °C y 8 °C por hasta 72 horas.
3. Prepare la muestra almacenada para amplificación invirtiéndola 2 a 3 veces para mezclar.
4. Destape los tubos.
5. Coloque los tubos de lisado mezclados en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen y caliéntelos a 100 °C ± 1 °C durante 5 ± 1 minutos.
6. Retire la gradilla de tubos de Solución de Lisis Neogen del bloque de calor y deje que se enfríe en la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen al menos durante 5 minutos y por un máximo de 10 minutos.
7. Siga el protocolo en la sección “Amplificación” que se detalla arriba.

Referencias:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Explicación de los Símbolos de la Etiqueta del Producto

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.

The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.

Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland



Neogen Corporation

620 Leshar Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.
FS00867B

Productinstructies

Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes*

Productbeschrijving en beoogd gebruik

De Neogen® Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* wordt samen met het Neogen® Moleculaire Detectiesysteem gebruikt voor een snelle en specifieke detectie van *Listeria monocytogenes* in verrijkte voedsel- en voedingsmonsters. De Neogen Moleculaire detectie assays maken gebruik van lusgebonden isothermische amplificatie voor de snelle amplificatie van nucleïnezuurschakels met een hoge specificiteit en gevoeligheid, in combinatie met bioluminescentie om de amplificatie te detecteren. Vermoedelijk positieve resultaten worden onmiddellijk gerapporteerd, terwijl negatieve resultaten pas worden weergegeven nadat de analyse voltooid is. Vermoedelijk positieve resultaten moeten door middel van een door u gewenste methode of conform de lokale wet- en regelgeving^(1, 2, 3) worden bevestigd.

De Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* is bestemd voor gebruik in een laboratoriumomgeving door professionals die zijn geschoold in laboratoriumtechnieken. Neogen heeft het gebruik van dit product niet gedocumenteerd in andere sectoren dan de voedings- of drankensector. Neogen heeft dit product bijvoorbeeld niet gedocumenteerd voor het testen van water-, farmaceutische, cosmetische, klinische of veterinaire monsters. De Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* is niet geëvalueerd met alle mogelijke testprotocollen of alle mogelijke bacteriestammen.

Zoals bij alle testmethoden, kunnen de bron, de formulering en de kwaliteit van het verrijkmingsmedium de resultaten beïnvloeden. Factoren als bemonsteringsmethoden, testprotocollen, monstervoorbereiding, hantering en laboratoriumtechniek kunnen tevens de resultaten beïnvloeden. Neogen beveelt evaluatie van de methode aan, met inbegrip van het verrijkmingsmedium, in de omgeving van de gebruiker aan de hand van een voldoende aantal monsters met specifieke voedingsmiddelen en microbiële uitdagingen om ervoor te zorgen dat de methode aan de criteria van de gebruiker voldoet.

Neogen heeft de Neogen Moleculair detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* aan de hand van Demi Fraser bouillon met ijzerammoniumcitraat en Fraser bouillon met ijzerammoniumcitraat zoals vereist geëvalueerd. Hieronder wordt een gebruikelijke samenstelling van dit medium gegeven.

Gebbruikelijke samenstelling Demi Fraser bouillon (basis)	(g/l)	Gebbruikelijke samenstelling Fraser bouillon (basis)	(g/l)
Natriumchloride	20 g	Natriumchloride	20 g
Natriumfosfaat, dibasisch, watervrij*	9,6 g	Natriumfosfaat, dibasisch, watervrij*	9,6 g
Rundvleesextract	5,0 g	Rundvleesextract	5,0 g
Pancreatisch verteringsproduct van caseïne	5,0 g	Pancreatisch verteringsproduct van caseïne	5,0 g
Peptisch verteringsproduct van dierlijk weefsel	5,0 g	Peptisch verteringsproduct van dierlijk weefsel	5,0 g
Gistextract	5,0 g	Gistextract	5,0 g
Lithiumchloride	3,0 g	Lithiumchloride	3,0 g
Kaliumfosfaat	1,35 g	Kaliumfosfaat	1,35 g
Aesculine	1,0 g	Aesculine	1,0 g
Acriflavine HCl	0,0125 g	Acriflavine HCl	0,025 g
Nalidixinezuur	0,01 g	Nalidixinezuur	0,02 g

* Vervangende stof: Natriumfosfaat, dibasisch, dihydraat 12,0 g

Fraser bouillon-supplement

(Ingrediënten per buisje van 10 ml. Per liter basismedium wordt één buisje toegevoegd.)

Ijzerammoniumcitraat 0,5 g/10 ml

Definitieve pH-waarde 7,2 ± 0,2 bij 25 °C

Het Neogen® Moleculair Detectieinstrument is bedoeld voor gebruik bij monsters die tijdens de lyseanalysestap een warmtebehandeling hebben ondergaan, die ontwikkeld is om de in het monster aanwezige organismen te vernietigen. Monsters die tijdens de lyseanalysestap niet de juiste warmtebehandeling hebben ondergaan, kunnen als een potentieel biologisch gevaar worden beschouwd en mogen NIET in het Neogen Moleculaire Detectieinstrument worden geplaatst.

Neogen Food Safety is ISO (Internationale Organisatie voor Standaardisatie) 9001-gecertificeerd voor het ontwerp en de productie.

De Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes*-testset bevat 96 tests, vermeld in tabel 1.

Tabel 1. Onderdelen Neogen Moleculaire detectie assay-set

Artikel	Identificatie	Hoeveelheid	Inhoud	Opmerkingen
Neogen® Lyse-oplossing (LS)	Roze oplossing in doorzichtige buisjes	96 (12 stroken van 8 buisjes)	580 µl LS per buisje	In rek en klaar voor gebruik
Neogen® Moleculaire detectie assay 2 <i>Listeria monocytogenes</i> -reagensbuisjes	Gele buisjes	96 (12 stroken van 8 buisjes)	Gevriesdroogde specifieke amplificatie- en detectiemix	Klaar voor gebruik
Extra doppen	Gele doppen	96 (12 stroken van 8 doppen)		Klaar voor gebruik
Neogen® Reagenscontrole (RC)	Doorzichtige buisjes met kliksluiting	16 (2 zakjes met 8 individuele buisjes)	Gevriesdroogd controle-DNA, amplificatie- en detectiemix	Klaar voor gebruik

De negatieve controle, die niet in de set is meegeleverd, is een steriel verrijkmingsmedium, zoals Demi Fraser bouillon. Gebruik geen water als negatieve controle.

Veiligheid

De gebruiker moet alle veiligheidsinformatie in de instructies van het Neogen Moleculaire Detectiesysteem en de Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* lezen, begrijpen en in acht nemen. Bewaar de veiligheidsinstructies om deze later te kunnen raadplegen.

⚠ WAARSCHUWING: Geeft een gevaarlijke situatie aan die, indien deze niet wordt vermeden, de dood, ernstig letsel en/of materiële schade tot gevolg kan hebben.

KENNISGEVING: Geeft een mogelijk gevaarlijke situatie aan die, indien deze niet wordt vermeden, materiële schade tot gevolg kan hebben.

⚠ WAARSCHUWING

Gebruik de Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* niet voor het diagnosticeren van aandoeningen bij mensen of dieren.

Met de Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes*-methode kan mogelijk een hoeveelheid *Listeria monocytogenes* worden geproduceerd die indien zwangere vrouwen hieraan worden blootgesteld doodgeboorten en miskramen tot gevolg kan hebben.

De gebruiker moet zijn personeel scholen in de huidige en juiste testtechnieken, zoals goede laboratoriumpraktijken (GLP), ISO/IEC 17025⁽⁴⁾, of ISO 7218⁽⁵⁾.

Op de volgende wijze kunt u de risico's beperken van een vals negatief resultaat dat tot vrijgave van een besmet product leidt:

- Volg het protocol en voer de tests exact uit zoals aangegeven in de productinstructies.
- Bewaar de Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* volgens de instructies op de verpakking en in de productinstructies.
- Gebruik de Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* altijd voordat de vervaldatum verstreken is.
- Gebruik de Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* voor voedsel- en voedingsmonsters die intern of door een derde partij zijn gevalideerd.
- Gebruik de Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* alleen voor oppervlakken, reinigingsmiddelen, protocollen en bacteriestammen die intern of door een derde partij zijn gevalideerd.
- Voor een omgevingsmonster dat een neutraliserende bufferoplossing bevat met een arylsulfonaatcomplex, verdunt u 1:2 voorafgaand aan het testen (1 deel monster op 1 deel steriele verrijkmingsbouillon). Ook kan 10 µl van de neutraliserende bufferverrijking naar de buisjes met Neogen Lyse-oplossing worden overgebracht. Neogen® producten voor monsterverzameling, waaronder een neutraliserende buffer met arylsulfonaatcomplex: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G en HS2410NB2G.

Op de volgende wijze kunt u de risico's van blootstelling aan biologische en chemische gevaren beperken:

- Het wordt ten zeerste aanbevolen om vrouwelijke laboranten op de hoogte te stellen van het risico dat blootstelling aan *Listeria monocytogenes* voor een foetus in de ontwikkelingsfase kan vormen als gevolg van een infectie van de moeder.
- Voer de pathogentests uit in een goed uitgerust laboratorium onder het toezicht van opgeleid personeel. Geïncubeerde verrijkmingsmedia en -apparatuur of oppervlakken die met geïncubeerde verrijkmingsmedia in contact zijn gekomen, bevatten mogelijk voldoende pathogenen om een gevaar voor de menselijke gezondheid te vormen.
- Volg bij de hantering van reagentia en besmette monsters altijd de standaard veiligheidsvoorschriften voor laboratoria op, met inbegrip van het dragen van toepasselijke beschermende kleding en oogbescherming.
- Vermijd contact met de inhoud van de verrijkmingsmedia en reagensbuisjes na amplificatie.



- Voer verrijkte monsters af conform de in de branche geldende normen.
- Monsters die tijdens de lyseanalysestap niet de correcte warmtebehandeling hebben ondergaan, kunnen als een potentieel biologisch gevaar worden beschouwd en mogen NIET in het Neogen Moleculaire Detectieinstrument worden geplaatst.

Op de volgende wijze kunt u tijdens de voorbereiding van de test het risico op kruisbesmetting beperken:

- Draag altijd handschoenen (om de gebruiker te beschermen en de introductie van nucleases te voorkomen).

Op de volgende wijze kunt de risico's van milieuverontreiniging beperken:

- Volg de van kracht zijnde industriestandaarden betreffende de afvoer van besmet afval.

Op de volgende wijze kunt u de risico's van blootstelling aan hete vloeistoffen beperken:

- Overschrijd de aanbevolen temperatuurinstelling op de verw warmer niet.
- Overschrijd de aanbevolen verwarmingstijd niet.
- Gebruik een geschikte, gekalibreerde thermometer om de temperatuur van het Neogen® Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk te controleren (zoals een gedeeltelijk ondergedompelde thermometer of digitale thermokoppelthermometer, geen volledig ondergedompelde thermometer). De thermometer moet op de aangewezen locatie in het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk worden geplaatst.

KENNISGEVING

Op de volgende wijze kunt u tijdens de voorbereiding van de test het risico op kruisbesmetting beperken:

- Verwissel uw handschoenen alvorens reagenspellets te hydrateren.
- Het gebruik van steriele pipettips geschikt voor moleculaire biologie met spuitbusbarrière (gefilterd) wordt aanbevolen.
- Gebruik een nieuwe pipettip bij elke monsteroverdracht.
- Maak gebruik van goede laboratoriumpraktijken (GLP) bij de monsteroverdracht van de verrijking naar het lysebuisje. Ter voorkoming van pipetbesmetting kan de gebruiker ervoor kiezen een extra overdrachtsstap toe te voegen. De gebruiker kan bijvoorbeeld elk verrijkt monster naar een steriel buisje overbrengen.
- Gebruik waar mogelijk een moleculair biologiewerkstation met een kiemdodende lamp. Ontsmet regelmatig laboratoriumtafels en apparatuur (pipetten, Cap/Decap gereedschap, enz.) met een bleekwateroplossing van 1-5% (volumeconcentratie in water) of DNA-verwijderingsoplossing.

Op de volgende wijze kunt u het risico op fout-positieve resultaten beperken:

- U dient reagensbuisjes nooit na amplificatie te openen.
- Voer de verontreinigde buisjes altijd af door ze gedurende 1 uur onder te dompelen in een huishoudbleekmiddeloplossing van 1-5% (volumeconcentratie in water) of een vergelijkbare oplossing, uit de buurt van de testbereidingsruimte.
- U dient reagensbuisjes nooit na amplificatie te autoclaveren.

Raadpleeg het veiligheidsinformatieblad voor aanvullende informatie en lokale wet- en regelgeving inzake afvalverwerking.

Als u vragen hebt over specifieke toepassingen of procedures, kunt u onze website www.neogen.com bezoeken of contact opnemen met uw plaatselijke vertegenwoordiger of distributeur van Neogen.

Verantwoordelijkheid van de gebruiker

Gebruikers worden geacht zich vertrouwd te maken met de productinstructies en -informatie. Bezoek onze website www.neogen.com of neem contact op met uw plaatselijke Neogen-vertegenwoordiger of -distributeur voor meer informatie.

Bij het kiezen van een testmethode is het belangrijk om te erkennen dat externe factoren zoals bemonsteringsmethoden, testprotocollen, monstervoorbereiding en -behandeling en laboratoriumtechniek invloed op de resultaten kunnen hebben.

De gebruiker is verantwoordelijk voor de selectie van een testmethode of product waarbij een voldoende aantal monsters met gepaste matrices en microbiële uitdagingen wordt onderzocht, zodat de gekozen testmethode aan de criteria van de gebruiker voldoet.

Het is ook de verantwoordelijkheid van de gebruiker om te bepalen of testmethoden en resultaten aan de vereisten van klanten en leveranciers voldoen.

Zoals bij elke testmethode vormen de verkregen resultaten van het gebruik van een Neogen Food Safety-product geen garantie voor de kwaliteit van de geteste matrices of processen.

Om klanten te helpen bij het evalueren van de methode voor verschillende matrices heeft Neogen de Neogen® Moleculaire Detectie Matrix-controleset ontwikkeld. Gebruik indien nodig de Matrix controle (MC) om te bepalen of de matrix de resultaten van het Neogen Moleculair detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* kan beïnvloeden. Test meerdere monsters die representatief zijn voor de matrix, zoals monsters met een verschillende oorsprong, tijdens een willekeurige validatieperiode bij het aannemen van de Neogen-methode of bij het testen van nieuwe of onbekende matrices of matrices die grondstof- of procesveranderingen hebben ondergaan.

Een matrix kan worden gedefinieerd als een soort product met intrinsieke eigenschappen, zoals samenstelling en proces. Verschillen tussen de matrices hangen af van hun verwerking of presentatie, bijvoorbeeld rauw ten opzichte van gepasteuriseerd; vers ten opzichte van gedroogd enzovoort.

Beperkte garantie / beperkt verhaal

BEHALVE WAAR UITDRUKKELIJK VERMELD IN EEN SECTIE MET BETREKKING TOT DE BEPERKTE GARANTIE VAN EEN AFZONDERLIJKE PRODUCTVERPAKKING, WIJST NEOGEN ALLE UITDRUKKELIJKE EN IMPLICIETE GARANTIES AF, MET INBEGRIJ VAN, MAAR NIET BEPERKT TOT, ELKE GARANTIE MET BETREKKING TOT DE VERHANDELBAARHEID EN DE GESCHIKTHEID VOOR EEN BEPAALD DOEL. Als een Neogen Food Safety-product gebrekkig is, zal Neogen of zijn gevolmachtigde distributeur naar eigen keuze het product vervangen of de aankoop prijs van het product terugbetalen. Dit is het enige rechtsmiddel waarover u beschikt. Neem contact op met uw Neogen-vertegenwoordiger of erkende Neogen-distributeur voor verdere vragen.

Beperking van Neogen aansprakelijkheid

NEOGEN IS NIET AANSPRAKELIJK VOOR ENIG(E) VERLIES OF SCHADE, ONGEACHT OF HET GAAT OM DIRECTE, INDIRECTE, SPECIALE, INCIDENTELE OF GEVOLGSCHADE, MET INBEGRIJ VAN, MAAR NIET BEPERKT TOT WINSTDERVING. In geen geval zal de wettelijke aansprakelijkheid van Neogen onder om het even welke juridische theorie de aankoop prijs van het vermeend gebrekkige product overschrijden.

Opslag en afvalverwerking

Sla de Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* op tussen 2-8 °C. Niet invriezen. Bewaar de set tijdens opslag uit het licht. Controleer na het openen van de set of het foliezakje niet beschadigd is. Gebruik het product niet als het zakje beschadigd is. Na opening moeten de ongebruikte reagensbuisjes altijd worden bewaard in de hersluitbare zak met droogmiddel om de stabiliteit van de gevriesdroogde reagentia te behouden. Bewaar opnieuw verzegelde zakjes tussen 2-8 °C en niet langer dan 60 dagen.

Gebruik de Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* niet nadat de vervaldatum verstreken is. De vervaldatum en het batchnummer zijn terug te vinden op het etiket aan de buitenzijde van de doos. Na gebruik kunnen het verrijkingsmedium en de buisjes van de Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* mogelijk pathogeen materiaal bevatten. Zodra de tests zijn afgerond, dient u de van kracht zijnde industriestandaarden betreffende de afvoer van besmet afval op te volgen. Raadpleeg het veiligheidsinformatieblad voor aanvullende informatie en lokale wet- en regelgeving inzake afvalverwerking.

Gebruiksaanwijzingen

Volg alle instructies zorgvuldig op. Wanneer dit niet gebeurt, kan dit onnauwkeurige resultaten tot gevolg hebben.

Ontsmet regelmatig laboratoriumtafels en apparatuur (pipetten, Cap/Decap gereedschap, enz.) met een bleekwateroplossing van 1-5% (volumeconcentratie in water) of DNA-verwijderingsoplossing.

De gebruiker dient de kwalificatietraining voor de bediener van het Neogen Moleculair Detectiesysteem te voltooien, zoals beschreven in het document 'Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System'⁽⁶⁾.

Raadpleeg voor de gedetailleerde eisen het gedeelte 'Specifieke instructies voor gevalideerde methoden':

Tabel 3 voor verrijgingsprotocollen conform AOAC® *Official Method of Analysis*SM **2016.08** en AOAC® *Performance Tested Method*SM, certificaatnr. **081501**.

Tabel 4 voor verrijgingsprotocollen conform het NF Validation-certificaat **3M 01/15-09/16**.

Monsterverrijking

Tabel 2, 3 of 4 biedt advies voor de verrijking van voedings- en omgevingsmonsters. Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om alternatieve bemonsteringsprotocollen of verdunningsverhoudingen te valideren om ervoor te zorgen dat deze testmethode aan de criteria van de gebruiker voldoet.

Voedingsmiddelen

1. Laat het verrijkingsmedium, de Demi Fraser bouillon, (met inbegrip van ijzerammoniumcitraat) tot de omgevingstemperatuur van het laboratorium opwarmen.
2. Voeg het monster op steriele wijze aan het verrijkingsmedium toe en neem monsters volgens de aanwijzingen in tabel 2, 3 of 4. Voor alle vlees- en hoge-partikelmonsters is het gebruik van filterzakken aanbevolen.
3. Homogeniseer gedurende $2 \pm 0,2$ minuten zorgvuldig met een blender of Stomacher, of mix met de hand. Incubeer op 37 ± 1 °C zoals vermeld in tabel 2, 3 of 4.
4. Breng bij rauwe melkproducten (zie tabel 2, 3 of 4) 0,1 ml van de primaire verrijking over naar 10 ml Fraser bouillon. Incubeer gedurende 20-24 uur bij een temperatuur van 37 ± 1 °C.

Omgevingsmonsters

Voor het verzamelen van een monster kan een spons met neutraliserende oplossing worden gehydrateerd om het effect van de reinigingsmiddelen te inactiveren. Neogen raadt het gebruik van een biocodevrije cellulosespons aan. Als neutraliserende oplossing kan Dey-Engley (D/E) neutraliserende bouillon of letheenbouillon worden gebruikt. Het wordt aanbevolen om na gebruik de ruimte te reinigen.

WAARSCHUWING: Mocht u gebruik maken van een neutraliserende buffer (NB) die arylsulfonaatcomplex bevat als hydraterende oplossing voor de spons, verdunt u het verrijkte omgevingsmonster 1:2 voorafgaand aan het testen (1 deel monster op 1 deel steriele verrijkingbouillon) om de risico's te beperken van een fout-negatief resultaat dat tot vrijgave van een besmet product leidt. Ook kan 10 µL van de neutraliserende bufferverrijking naar de buisjes met Neogen Lyse-oplossing worden overgebracht.

Het wordt aanbevolen een monstergebied van ten minste 100 cm² (10 cm x 10 cm of 4 in x 4 in) aan te houden om de aan- of afwezigheid van een pathogeen op het oppervlak te verifiëren. Als u aan de hand van een spons een monster neemt, dient u het volledige gebied in twee richtingen met de spons af te nemen (van links naar rechts en vervolgens van boven naar beneden) of omgevingsmonsters te nemen in overeenstemming met uw huidige bemonsteringsprotocollen of de FDA richtlijnen BAM⁽¹⁾, USDA FSIS MLG⁽²⁾, of ISO 18593⁽⁷⁾-richtlijnen.

1. Laat het verrijkingsmedium, de Demi Fraser bouillon, (met inbegrip van ijzerammoniumcitraat) tot de omgevingstemperatuur van het laboratorium opwarmen.
2. Voeg het monster op steriele wijze aan het verrijkingsmedium toe en neem monsters volgens de aanwijzingen in tabel 2, 3 of 4.
3. Homogeniseer gedurende 2 ± 0,2 minuten zorgvuldig met een blender of Stomacher, of mix met de hand. Incubeer gedurende 24-30 uur op 37 ± 1 °C zoals vermeld in tabel 2, 3 of 4.

Tabel 2: Algemene verrijkingsprotocollen bij 37 ± 1 °C die gebruikmaken van Demi Fraser bouillon en Fraser bouillon, indien nodig.

Monstermatrix	Monster-grootte	Volume verrijking-bouillon (ml)	Verrijkingstijd (uur)
Verhit(te), gekookt(e) of gezouten vlees, gevogelte, zeevruchten en vis	25 g	225	24-30
Verhitte/ gepasteuriseerde melkproducten			
Verse producten en groenten			
Samengestelde voedingsmiddelen			
Omgevings-monsters ^(a)	1 spons	100 of 225	24-30
	1 staafje	10	24-30
Rauw(e) vlees, gevogelte, zeevruchten, vis	25 g	475	28-32

Monstermatrix	Primaire verrijking (Demi Fraser bouillon) ^(a)			Secundaire verrijking (Fraser bouillon) ^(a)			Volume mon- sterana- lyse ^(b)
	Monster- grootte	Volume verrijking- bouillon (ml)	Verrijkingstijd (uur)	Monster- grootte	Verrijking- temperatuur (°C)	Verrijking- tijd (uur)	
Rauwe melkproducten	25 g	225	20-24	Breng 0,1 ml over naar 10 ml Fraser bouillon	37 ± 1	20-24	10 µl

(a) Demi Fraser en Fraser bouillon dienen tijdens de primaire of secundaire verrijking te worden aangevuld met een Fraser bouillon-supplement (ijzerammoniumcitraat).

(b) Volume van het monster dat naar de buisjes met Neogen Lyse-oplossing wordt overgebracht. Raadpleeg stap 4.6 'Lyse'.

Specifieke instructies voor gevalideerde methoden

AOAC® Official Method of AnalysisSM 2016.08

AOAC® Performance Tested MethodSM nr. 081501



Uit de OMASM- en PTMSM-programma's van het AOAC Research Institute blijkt dat de Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* een effectieve methode is om *Listeria monocytogenes* op te sporen. De in de studie geteste matrices die worden getoond in Tabel 3.

Tabel 3. Verrijkingprotocollen waarbij wordt gebruikgemaakt van Demi Fraser bouillon^(a) bij 37 ± 1 °C, conform AOAC OMASM 2016.08 en PTMSM, certificaatnr. 081501.

Monstermatrix		Monstergrootte	Volume verrijkingbouillon (ml)	Verrijkingstijd (uur)
Rundvleeshotdogs, queso fresco (verse kaas), vanille-ijs, cottage cheese met 4% melkvet, chocolademelk met 3% vet, bindsla, rauwe spinazie, koud gerookte zalm		25 g	225	24-30
Rauwe kip		25 g	475	28-32
Kalkoenvleeswaren		125 g	1125	24-30
Cantaloupe ^(b)		Hele meloen	Voldoende volume om de meloen te laten drijven	26-30
Omgevingsmonsters:	Roestvrij staal	1 spons	225	24-30
	Afgedicht beton	1 spons	100	24-30
	Kunststof ^(c)	1 staafje	10	24-30

Alle monsters voor de AOAC-validatie werden aan de hand van een Stomacher gehomogeniseerd, tenzij anders aangegeven.

- (a) Demi Fraser en Fraser bouillon dienen tijdens de primaire of secundaire verrijking te worden aangevuld met een Fraser bouillon-supplement (ijzerammoniumcitraat).
- (b) Homogeniseer het monster door met de hand te mixen.
- (c) Homogeniseer het monster in de vortexmixer.

NF VALIDATION door AFNOR Certification



3M 01/15-09/16

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

Voor meer informatie over het einde van de geldigheid kunt u het NF VALIDATION-certificaat op de hierboven vermelde website raadplegen.

Door NF VALIDATION gecertificeerde methode conform ISO 16140-2⁽⁶⁾ vergeleken met ISO 11290⁽³⁾

Toepassingsgebied van de validatie: Alle monsters van voedingsproducten voor menselijke consumptie en omgevingsmonsters (met uitzondering van primaire productiemonsters)

Monstervoorbereiding: Monsters moeten worden voorbereid conform EN ISO 11290-1⁽³⁾ en EN ISO 6887⁽⁸⁾

Softwareversie: Zie certificaat

Tabel 4: Verrijgingsprotocollen conform de door NF VALIDATION gecertificeerde methode 3M 01/15-09/16 bij 37 ± 1 °C waarbij wordt gebruikgemaakt van Demi Fraser bouillon en Fraser bouillon.

Algemeen protocol	Monstergrootte	Volume verrijkingsbouillon (ml)	Verrijkingstemperatuur (± 1 °C)	Verrijkingstijd (uur)	Volume monsteranalyse ^(a)	Geaccepteerd onderbrekingspunt
Alle voedselmonsters (met uitzondering van monsters van rauw vlees, rauwe zeevruchten en rauwe melkproducten)	25 g	225	37	24-30	20 µl	<ul style="list-style-type: none"> • Demi Fraser bouillon maximaal 72 uur • Lysaat bij -20 °C • Lysaat bij 4 °C maximaal 72 uur
Omgevingsmonsters	25 g, 1 staafje, of 1 doekje					

Specifiek protocol	Primaire verrijking (Demi Fraser bouillon) ^(b)				Secundaire verrijking (Fraser bouillon) ^(b)				Geaccepteerd onderbrekingspunt
	Monstergrootte	Volume verrijkingsbouillon (ml)	Verrijkingstemperatuur (± 1 °C)	Verrijkingstijd (uur)	Monstergrootte	Verrijkingstemperatuur (± 1 °C)	Verrijkingstijd (uur)	Volume monsteranalyse ^(c)	
Rauw vlees, rauwe zeevruchten en rauwe melkproducten	25 g	225	37	20-24	Breng 0,1 ml over naar 10 ml Fraser bouillon	37	20-24	10 µl	<ul style="list-style-type: none"> • Fraser bouillon maximaal 72 uur • Lysaat bij -20 °C • Lysaat bij 4 °C maximaal 72 uur

- Volume van het naar de buisjes met Neogen Lyse-oplossing overgebrachte monster. Raadpleeg stap 4.6 'Lyse'.
- Demi Fraser en Fraser bouillon dienen tijdens de primaire of secundaire verrijking te worden aangevuld met een Fraser bouillon-supplement (ijzerammoniumcitraat).
- Volume van het naar de buisjes met Neogen Lyse-oplossing overgebrachte monster. Raadpleeg stap 4.6 'Lyse'.

OPMERKING: Monsters groter dan 25 g zijn niet getest in de NF validation-studie.

Vorbereitung van de Neogen® Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray

- Maak een doek vochtig met een bleekmiddeloplossing van 1-5% (volumeconcentratie in water) of een vergelijkbare oplossing en reinig de Neogen® Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray.
- Spoel de Neogen Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray met water.
- Veeg de Neogen Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray met een wegwerpdoekje droog.
- Zorg ervoor dat de Neogen Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray droog is voor gebruik.

Vorbereitung van het Neogen® Moleculaire Detectie - Koelblokinzetstuk

Plaats het Neogen® Moleculaire Detectie - Koelblok rechtstreeks op de laboratoriumtafel. Gebruik het koelblok op de omgevingstemperatuur van het laboratorium (20-25 °C).

Vorbereitung van het Neogen® Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk

Plaats het Neogen® Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk in een droge dubbelblokverhitter. Schakel de droge blokverwarmer in en stel de temperatuur zo in dat het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk 100 ± 1 °C kan bereiken en aanhouden.

OPMERKING: Afhankelijk van de verhitter laat u het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk ongeveer 30 minuten op temperatuur komen. Gebruik een geschikte, gekalibreerde, op de aangewezen locatie geplaatste thermometer (zoals een gedeeltelijk ondergedompelde thermometer of digitale thermokoppelthermometer, **geen** volledig ondergedompelde thermometer) om te controleren of het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk zich op 100 ± 1 °C bevindt.

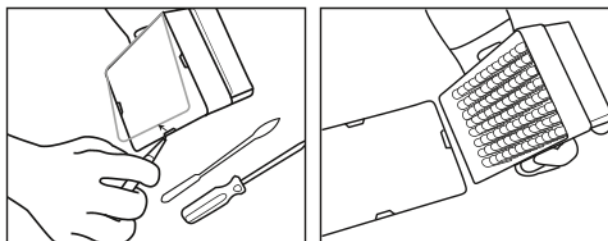
Vorbereitung van het Neogen® Moleculair Detectieinstrument

- Start de Neogen® Moleculair Detectieysteem-software en meld u aan. Neem contact op met uw vertegenwoordiger voor Neogen Food Safety om ervoor te zorgen dat u de nieuwste versie van de software hebt.
- Zet het Neogen Moleculaire Detectieinstrument aan.
- Maak of bewerk een run met de gegevens van elk monster. Raadpleeg de handleiding van het Neogen Moleculair Detectiesysteem voor meer informatie.

OPMERKING: Het Neogen Moleculaire Detectieinstrument moet de status Klaar bereiken voordat u de Neogen Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray met reagensbuisjes invoert. Deze verwarmingsstap duurt ongeveer 20 minuten en wordt met een ORANJE lampje op de statusbalk van het instrument aangeduid. Wanneer het instrument klaar is voor een run, wordt de statusbalk GROEN.

Lyse

Verwijder de bodem van het rek met Neogen Lyse-oplossing met een schroevendraaier of spatel voordat u het in het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk plaatst.



- Laat de buisjes met lyseoplossing (Neogen Lyse-oplossing) opwarmen door het rek een nacht lang gedurende 16-18 uur op kamertemperatuur (20-25 °C) te plaatsen. U kunt de buisjes met Neogen Lyse-oplossing eveneens op kamertemperatuur brengen door de buisjes ten minste 2 uur lang op de laboratoriumtafel te plaatsen, de buisjes 1 uur lang op een temperatuur van 37 ± 1 °C in een incubator te incuberen of ze 30 seconden lang op een temperatuur van 100 °C in een droge dubbelblokverhitter te plaatsen.
- Keer de buisjes met dop om om ze te mengen. Ga binnen 4 uur verder met de volgende stap.
- Haal de verrijkingsbouillon uit de incubator.

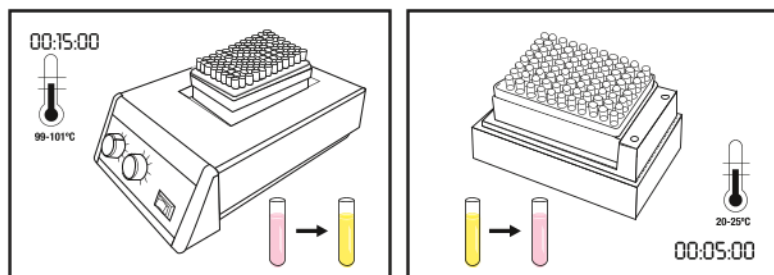
4. Er is een buisje met Neogen Lyse-oplossing vereist voor elk monster, evenals het negatieve controle-monster (NC; steriel verrijkmingsmedium).
- 4.1 Stroken met buisjes met Neogen Lyse-oplossing kunnen worden afgesneden tot het gewenste aantal buisjes met Neogen Lyse-oplossing. Selecteer het benodigde aantal individuele buisjes met Neogen Lyse-oplossing of stroken met 8 buisjes. Plaats de buisjes met Neogen Lyse-oplossing in een leeg rek.
- 4.2 Haal de stroken van de buisjes met Neogen Lyse-oplossing één voor één uit de verpakking en gebruik een nieuwe pipettip voor elke overdrachtsstap om zo kruisbesmetting te voorkomen.
- 4.3 Breng de verrijkte monsters over naar de buisjes met Neogen Lyse-oplossing zoals hieronder wordt beschreven:

Breng **eerst** elk verrijkt monster over naar een individueel buisje met Neogen Lyse-oplossing. Breng de NC als **laatste** over.

- 4.4 Gebruik de lyse van het Neogen® Moleculaire Detectie Cap/Decap gereedschap - Lyse om één voor één een strook van een buisje met Neogen Lyse-oplossing open te maken.
- 4.5 Gooi de dop van het buisje met Neogen Lyse-oplossing weg – als er lysaat voor een hertest wordt bewaard, dienen de doppen in een schone bak te worden geplaatst om deze na de lyse opnieuw aan te brengen.
 - 4.5.1 Zie Appendix A voor de verwerking van bewaard lysaat.
- 4.6 Breng 20 µl van het monster over in een buisje met Neogen Lyse-oplossing, tenzij in de protocoltabellen 2, 3 en 4 anders wordt aangegeven (bij monsters van rauwe melkproducten of omgevingsmonsters met een neutraliserende buffer moet bijvoorbeeld 10 µl worden gebruikt).



5. Herhaal stap 4.4 tot 4.6 totdat elk individueel monster aan het bijhorende buisje met Neogen Lyse-oplossing in de strook toegevoegd is.
6. Wanneer alle monsters overgebracht zijn, brengt u 20 µl NC (steriel verrijkmingsmedium, zoals, Demi Fraser bouillon) over naar een buisje met Neogen Lyse-oplossing. Gebruik geen water als NC.
7. Controleer of de temperatuur van het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk zich op 100 ± 1 °C bevindt.
8. Plaats het onbedekte rek met buisjes met Neogen Lyse-oplossing in het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk en verwarm gedurende 15 ± 1 minuten. Tijdens de verwarming verandert de Neogen Lyse-oplossing van roze (koel) naar geel (heet).
 - 8.1 Monsters die tijdens de lyseanalysestap niet de juiste warmtebehandeling hebben ondergaan, kunnen als een potentieel biologisch gevaar worden beschouwd en mogen NIET in het Neogen Moleculaire Detectieinstrument worden geplaatst.
9. Haal het onbedekte rek met buisjes met Neogen Lyse-oplossing uit het verwarmingsblok en laat het minimaal 5 minuten en maximaal 10 minuten afkoelen in het Neogen Moleculaire Detectie - Koelblokinzetstuk. Het Neogen Moleculaire Detectie - Koelblokinzetstuk wordt op omgevingstemperatuur gebruikt en moet rechtstreeks op de laboratoriumtafel geplaatst zijn. Zodra de lyse-oplossing koel is, krijgt deze een roze kleur.
10. Haal het rek met buisjes met Neogen Lyse-oplossing uit het Neogen Moleculaire Detectie - Koelblokinzetstuk.

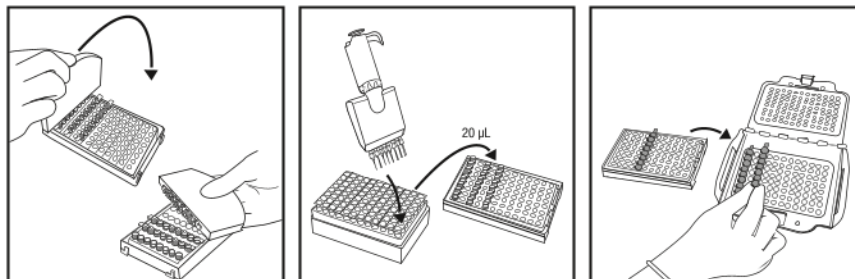


Amplificatie

1. Er is één Neogen Moleculair detectie assay 2 *Listeria monocytogenes*-reagensbuisje vereist voor ieder monster en de NC.
 - 1.1 Reagensbuisstrookjes kunnen tot op het gewenste aantal buisjes worden afgesneden. Selecteer het aantal vereiste individuele Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* -reagensbuisjes of 8-buisstroken.
 - 1.2 Plaats de Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* -reagensbuisjes in een leeg rek.
 - 1.3 Zorg ervoor dat het reagens op de bodem van de buisjes niet wordt verstoord.
2. Selecteer 1 buisje voor Neogen Reagenscontrole en plaats dit in het rek.
3. Open de stroken van de Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* -reagensbuisjes een voor een en gebruik een nieuwe pipettip voor elke overdrachtsstap om zo kruisbesmetting te voorkomen.
4. Breng alle lysaten over naar Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes*-reagensbuisjes en een buisje voor Neogen Reagenscontrole zoals hieronder beschreven:

Breng als **eerste** elk lysaatmonster over naar individuele Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes*-reagensbuisjes, gevolgd door de NC. Hydrateer het buisje voor Neogen Reagenscontrole als **laatste**.

5. Gebruik het Neogen® Moleculaire Detectie Cap/Decap gereedschap - Reagens om de reagensbuisstroken van de Neogen Moleculair detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* een voor een open te maken. Gooi de dop weg.
 - 5.1 **Breng 20 µl van het lysaatmonster uit de bovenste laag van de vloeistof (voorkom bezinksel) in het buisje met Neogen lyse-oplossing over naar het bijbehorende Neogen Moleculair detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* -reagensbuisje. Laat het mengsel in een hoek uitlopen om de pellets niet te verstoren. Meng het mengsel door voorzichtig 5 keer op en neer te pipetteren.**
 - 5.2 Herhaal stap 5.1 totdat elk afzonderlijk monsterlysaat aan het bijbehorende Neogen Moleculair detectie assay 2 *Listeria monocytogenes* -reagensbuisje in de strook is toegevoegd.
 - 5.3 Bedek de Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes*-reagensbuisjes met de bijgeleverde extra doppen en gebruik de afgeronde zijde van het Neogen Moleculaire Detectie Cap/Decap gereedschap - Reagens om in een voor- en achterwaartse beweging druk uit te oefenen om ervoor te zorgen dat de dop goed vastzit.
 - 5.4 Herhaal stap 5.1 tot 5.3, indien nodig, voor alle monsters die moeten worden getest.
 - 5.5 Zodra alle monsterlysaten zijn overgebracht, herhaalt u stap 5.1 om 20 µl NC-lysaat naar een Neogen Moleculair detectie assay 2 *Listeria monocytogenes*-reagensbuisje over te brengen.
 - 5.6 **Breng 20 µl NC-lysaat over naar een buisje voor Neogen Reagenscontrole.** Laat het mengsel in een hoek uitlopen om de pellets niet te verstoren. Meng het mengsel door voorzichtig 5 keer op en neer te pipetteren.
6. Plaats de buisjes met dop in een schone en ontsmette Neogen Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray. Sluit en vergrendel het deksel van de Neogen Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray.



7. Controleer en bevestig de geconfigureerde run en start de Neogen Moleculaire Detectiesysteem-software.
8. Klik op de startknop van de software en selecteer het te gebruiken instrument. Het deksel van het geselecteerde instrument wordt automatisch geopend.
9. Plaats de Neogen Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray in het Neogen Moleculaire Detectieinstrument en sluit het deksel om de analyse te beginnen. De resultaten zijn binnen 75 minuten beschikbaar, maar positieve resultaten kunnen sneller worden gedetecteerd.
10. Nadat de test is afgerond, haalt u de Neogen Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray uit het Neogen Moleculaire Detectieinstrument en verwijdert u de buisjes door ze eerst gedurende 1 uur in een bleekmiddeloplossing van 1-5% (volumeconcentratie in water) of een vergelijkbare oplossing te dompelen, uit de buurt van de testbereidingsruimte.

KENNISGEVING: Om het risico op fout-positieve resultaten door kruisbesmetting te beperken, mag u nooit reagensbuisjes met geamplificeerd DNA openen. Dit geldt voor Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes*-reagensbuisjes, buisjes voor Neogen Reagenscontrole en Matrix-controlebuisjes. Voer de verzegelde reagensbuisjes altijd af door ze gedurende 1 uur onder te dompelen in een huishoudbleekmiddeloplossing van 1-5% (volumeconcentratie in water) of een vergelijkbare oplossing, uit de buurt van de testbereidingsruimte.

Resultaten en interpretatie

Een algoritme interpreteert de lichtuitvoercurve die het resultaat is van de nucleïnezuuramplificatie. De software analyseert de resultaten automatisch en deze worden op basis van het resultaat met een kleurencode aangegeven. Een positief of negatief resultaat wordt bepaald door de analyse van een aantal unieke curveparameters. Vermoedelijk positieve resultaten worden onmiddellijk gerapporteerd, terwijl de negatieve- en inspectieresultaten pas na de afronding van de analyse worden weergegeven.

Vermoedelijk positieve monsters moeten worden bevestigd aan de hand van de standaard werkmethode van het laboratorium of door de gepaste methode voor bevestiging te volgen^(1, 2, 3), te beginnen met de overdracht van de primaire naar de secundaire verrijkingbouillon (indien van toepassing), gevolgd door een lagenkweek en verificatie van isolaten met gebruik van toepasselijke biochemische en serologische methoden.

OPMERKING: Zelfs een negatief monster heeft geen nulmeting tot gevolg, want het systeem en de Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes*-amplificatiereagentia geven een relatieve lichteendheid (RLU) achtergrondlezing.

In het onwaarschijnlijke geval van ongebruikelijke lichtuitvoer definieert het algoritme dit als 'Inspecteren.' Neogen beveelt de gebruiker aan om de test voor de te inspecteren monsters opnieuw uit te voeren. Als het resultaat nog steeds 'Inspecteren' is, voert u een bevestigingstest uit aan de hand van uw voorkeursmethode of volgens de lokale wet- en regelgeving.

Tabel 5: Symbolen die de resultaten en interpretatie van monsters aangeven, zoals deze door de software van het Neogen Moleculair Detectiesysteem worden verstrekt.

Type well	Symbol well-resultaat	Resultaat	Interpretatie
Monster		Positief	Het monster van het doelpathogeen is vermoedelijk positief.
Monster		Negatief	Het monster van het doelpathogeen is negatief.
Monster		Geremd	De monstermatrix heeft een remmend effect op de assay. Er dient mogelijk een hertest te worden uitgevoerd. Raadpleeg het gedeelte 'Problemen oplossen' en de bij de assay-set meegeleverde productinstructies voor meer informatie.
Monster		Inspecteren	De aan- of afwezigheid van een doelpathogeen kon niet worden vastgesteld. Er dient mogelijk een hertest te worden uitgevoerd. Raadpleeg het gedeelte 'Problemen oplossen' en de bij de assay-set meegeleverde productinstructies voor meer informatie.
Monster		Fout	Er is geen bioluminescentie gedetecteerd. Er dient mogelijk een hertest te worden uitgevoerd. Raadpleeg het gedeelte 'Problemen oplossen' en de bij de assay-set meegeleverde productinstructies voor meer informatie.

Verificatie van resultaten conform de met NF VALIDATION gecertificeerde methode

Optie 1: Pas de ISO-norm 11290⁽³⁾ toe en begin met de Demi Fraser-verrijking

Optie 2: Isolatie op PALCAM-agar of chromogeen agar, (O&A) onderdeel van een door NF VALIDATION gecertificeerde methode voor de detectie van *Listeria monocytogenes*. De aanwezigheid van karakteristieke kolonies is voldoende om de aanwezigheid van *Listeria monocytogenes* vast te stellen.

Optie 3: Maak gebruik van nucleïnezuursondes zoals beschreven in EN ISO-norm 7218⁽⁵⁾, uitgevoerd op geïsoleerde kolonies vanaf een selectief agar (zie optie 1 of 2).

Optie 4: Maak gebruik van een andere met NF VALIDATION gecertificeerde methode, waarvan het principe moet verschillen van de Neogen Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes*. Het volledige protocol van deze tweede gevalideerde methode moet nauwkeurig worden gevolgd. Alle stappen voorafgaand aan de bevestiging moeten voor beide procedures hetzelfde zijn.

In geval van tegenstrijdige resultaten (vermoedelijk positief met de alternatieve methode, niet geverifieerd met een van de hierboven beschreven methoden), moet het laboratorium de noodzakelijke stappen nemen om de validiteit van het verkregen resultaat te garanderen.



In geval van tegenstrijdige resultaten (vermoedelijk positief met de Neogen Moleculair detectie assay 2 *Listeria monocytogenes*, niet geverifieerd met een van de hierboven beschreven methoden) moet het laboratorium de noodzakelijke stappen nemen om de validiteit van de verkregen resultaten te garanderen.

Als u vragen hebt over specifieke toepassingen of procedures, kunt u onze website www.neogen.com bezoeken of contact opnemen met uw plaatselijke vertegenwoordiger of distributeur van Neogen.

Appendix A. Protocolonderbreking: Warmtebehandelde lysaten opslaan en hertesten.

1. U kunt een warmtebehandeld lysaat opslaan door opnieuw een schone dop op het buisje met lyse-oplossing te plaatsen (zie hoofdstuk 4.5, 'Lyse').
2. Sla maximaal 72 uur op bij een temperatuur van 4 tot 8 °C.
3. Bereid een opgeslagen monster voor op de amplificatie door het 2-3 keer om te keren om het te mengen.
4. Verwijder de doppen van de buisjes.
5. Plaats de gemengde lysaatbuisjes op het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk en verwarm gedurende 5 ± 1 minuten op een temperatuur van 100 ± 1 °C.
6. Haal het rek met buisjes met Neogen Lyse-oplossing uit het verwarmingsblok en laat het minimaal 5 minuten en maximaal 10 minuten afkoelen in het Neogen Moleculaire Detectie - Koelblokinzetstuk.
7. Ga verder met het protocol in het hierboven beschreven gedeelte 'Amplificatie'.

Referenties:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Uitleg over de symbolen op productlabels

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.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.
FS00867B

Produktinformation

Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes*

Produktbeskrivning och avsedd användning

Neogen® Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* används med Neogen® Molekylärt Detektionssystem för snabb och specifik detektion av *Listeria monocytogenes* i prover från anrikade livsmedel och livsmedelsbearbetningsmiljöer. Neogen Molekylära Detektionsanalyser använder LAMP-teknik (Loop-Mediated Isothermal Amplification) för att snabbt amplifiera nukleinsyrasekvenser med hög specificitet och sensitivitet kombinerat med bioluminiscens för att detektera ampliferingen. Presumtivt positiva resultat rapporteras i realtid medan negativa resultat visas när analysen har slutförts. Presumtivt positiva resultat bör bekräftas med hjälp av egen vald metod eller som specificeras av lokala föreskrifter^(1, 2, 3).

Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* är avsedd att användas i laboratoriemiljö av yrkespersoner som är utbildade i laboratorietekniker. Neogen har inte dokumenterat användningen av denna produkt inom andra industrier än livsmedels- och dryckesindustrin. Till exempel har Neogen inte dokumenterat denna produkt för testning av vatten-, läkemedels-, kosmetiska, kliniska eller veterinärprover. Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* har inte utvärderats med alla möjliga testprotokoll eller med alla möjliga bakteriestammar.

Precis som för alla testmetoder kan källan, beredningen av och kvaliteten på anrikningsmediet påverka resultaten.

Faktorer som provtagningsmetoder, testprotokoll, provpreparering, hantering och laboratorieteknik kan också påverka resultaten. Neogen rekommenderar att metoden, inklusive anrikningsmediet, utvärderas i användarens miljö med tillräckligt många prover av särskilda livsmedel och mikrobiella utmaningar för att säkerställa att metoden uppfyller användarens kriterier.

Neogen har utvärderat Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* med Demi-Fraser-buljong innehållande ferriammoniumcitrat och Fraser-buljong som innehåller ferriammoniumcitrat efter behov. En typisk formulering av detta medium följer nedan.

Demi-Fraser buljongbas typisk sammansättning	(g/l)	Fraser-buljong typisk sammansättning	(g/l)
Natriumklorid	20 g	Natriumklorid	20 g
Natriumfosfat, dibasiskt, vattenfritt*	9,6 g	Natriumfosfat, dibasiskt, vattenfritt*	9,6 g
Oxköttsextrakt	5,0 g	Oxköttsextrakt	5,0 g
Pankreasmassa av kasein	5,0 g	Pankreasmassa av kasein	5,0 g
Peptisk matsmältning av djurvävnad	5,0 g	Peptisk matsmältning av djurvävnad	5,0 g
Jästextrakt	5,0 g	Jästextrakt	5,0 g
Litiumklorid	3,0 g	Litiumklorid	3,0 g
Kaliumfosfat, monobasiskt	1,35 g	Kaliumfosfat, monobasiskt	1,35 g
Eskulin	1,0 g	Eskulin	1,0 g
Acriflavin HCl	0,0125 g	Acriflavin HCl	0,025 g
Nalidixinsyra	0,01 g	Nalidixinsyra	0,02 g

* Ersättning: Natriumfosfat, dibasiskt, dihydrat 12,0 g

Fraser buljongersättning

(Ingredienser per 10 ml injektionsflaska. En injektionsflaska tillsätts till 1 liter basalt medium.)

Ferriammoniumcitrat 0,5 g/10 ml

Slutligt pH-värde 7,2 ± 0,2 vid 25°C

Neogen® Molekylärt Detektionsinstrument är avsett att användas med prover som har värmebehandlats under analysens lyseringssteg, vilket är utformat för att förstöra organismer i provet. Prover som inte har värmebehandlats korrekt under analysens lyseringssteg bör betraktas som en potentiell biologisk fara och ska INTE föras in i Neogen Molekylärt Detektionsinstrument.

Neogen Food Safety är certifierat enligt den internationella standardiseringsorganisationen (ISO) 9001 avseende konstruktion och tillverkning.

Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* testsats innehåller 96 tester, som beskrivs i tabell 1.

Tabell 1. Komponenter i Neogen Molecular Detection testsats

Artikel	Identifikation	Antal	Innehåll	Kommentarer
Neogen® Lyseringslösning (LS)	Rosa lösning i genomskinliga rör	96 (12 remsor om 8 rör)	580 µl LS per rör	I ställ och klara att användas
Neogen® Molecular Detection Assay 2 – <i>Listeria monocytogenes</i> Reagensrör	Gula rör	96 (12 remsor om 8 rör)	Specifik frystorkad amplifierings- och detektionsblandning	Klara att användas
Extra lock	Gula lock	96 (12 remsor om 8 lock)		Klara att användas
Neogen® Reagenskontroll (RC)	Genomskinliga rör med knäpplock	16 (2 påsar om 8 enskilda rör)	Frystorkad kontroll-DNA, amplifierings- och detektionsblandning	Klara att användas

Den negativa kontrollen, som inte tillhandahålls i satsen, är ett sterilt anrikningsmedium, t.ex. Demi-Fraser-buljong. Använd inte vatten som negativ kontroll.

Säkerhet

Användaren ska läsa, förstå och följa all säkerhetsinformation i anvisningarna till Neogen Molekylärt Detektionssystem och Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes*. Behåll säkerhetsanvisningarna för framtida bruk.

⚠ WARNING: Indikerar en farlig situation som, om den inte undviks, kan resultera i dödsfall eller allvarliga personskador och/eller materiella skador.

OBSERVERA: Indikerar en potentiellt farlig situation som, om den inte undviks, kan resultera i materiella skador.

⚠ WARNING

Använd inte Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* för diagnostisering av tillstånd hos människor eller djur.

Metoden Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* metoden kan generera *Listeria monocytogenes* till nivåer som är tillräckliga för att orsaka dödfödda barn och dödsfall hos gravida kvinnor med reducerats immunförsvar, om de utsätts för bakterien.

Användaren måste utbilda sin personal i aktuella korrekta testmetoder: exempelvis Good Laboratory Practices, ISO/IEC 17025⁽⁴⁾ eller ISO 7218⁽⁵⁾.

För att minska riskerna som förknippas med ett falskt negativt resultat som leder till utgivning av kontaminerad produkt:

- Följ protokollet och utför testerna exakt så som anges i produktinformationen.
- Förvara Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* enligt föreskrifterna på dess förpackning och i dess produktinformation.
- Använd alltid Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* före utgångsdatumet.
- Använd Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* för livsmedels- och miljöprover som har validerats internt eller av en tredje part.
- Använd endast Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* på ytor, desinficeringsmedel, protokoll och bakteriestammar som har validerats internt eller av tredje part.
- För miljöprov innehållande neutraliseringsbuffert med arylsulfonatkomplex, späd till 1:2 innan testet utförs (1 del prov till 1 del steril anrikningsbuljong). Ett annat alternativ är att föra över 10 µl av neutraliserande buffertanrikning i Neogen Lyseringslösningarna Neogen® Sample Collection products som inkluderar neutraliseringsbuffert med arylsulfonatkomplex: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G och HS2410NB2G.

För att minska riskerna som förknippas med exponering för kemikalier och biologiska smittorisker:

- Det rekommenderas starkt att kvinnlig laborariepersonal informeras om risken för fosterskador till följd av infektion hos modern genom exponering för *Listeria monocytogenes*.
- Utför tester av patogener i ett välutrustat laboratorium under överinseende av utbildad personal. Inkuberat anrikningsmedium och utrustning eller ytor som har haft kontakt med inkuberat anrikningsmedium kan innehålla patogener vid nivåer som är tillräckliga för att utgöra en hälsorisk för människor.
- Följ alltid praxis för standardiserad laboratoriesäkerhet, inklusive användning av lämpliga skyddskläder och skyddsglasögon vid hantering av reagenser och kontaminerade prover.
- Undvik kontakt med innehållet i anrikningsmediet och reagensrören efter amplifiering.
- Kassera de anrikade proverna enligt gällande branschstandarder.
- Prover som inte har värmebehandlats korrekt under analysens lyseringssteg bör betraktas som en potentiell biologisk fara och ska INTE föras in i Neogen Molekylärt Detektionsinstrument.

För att minska riskerna för korskontaminering vid analysförberedelserna:

- Bär alltid handskar (för att skydda användaren och förhindra införsel av nukleaser).

För att minska riskerna som är förbundna med miljöföroreningar:

- Följ gällande branschstandarder för kassering av förorenat avfall.

För att minska riskerna som förknippas med exponering för heta vätskor:

- Överskrid inte rekommenderad temperaturinställning på uppvärmningsanordningen.
- Överskrid inte den rekommenderade uppvärmningstiden.
- Använd en lämplig, kalibrerad termometer (t.ex. en termometer för delvis nedsänkning eller en digital värmeelementtermometer, inte en termometer för fullständig nedsänkning) för att kontrollera temperaturen i Neogen® Molekylär Detektionsnsats för värmeblock. Termometern måste placeras på anvisad plats i Neogen Molekylär Detektion, Insats för värmeblock.

OBSERVERA

För att minska riskerna för korskontaminering vid analysförberedelserna:

- Byt handskar innan reagens-pelletarna väts.
- Användning av sterila pipettspetsar med aerosolbarriär (filtrerade) för molekylärbiologiskt bruk rekommenderas.
- Använd en ny pipettspets för varje provöverföring.
- Följ god laboratoriepraxis vid överföringen av provet från anrikningsröret till lyseringsröret. För att undvika kontaminering av pipetten kan användaren välja att lägga till ett mellanliggande överföringssteg. Exempelvis kan användaren föra över varje anrikat prov till ett sterilt rör.
- Använd en arbetsstation avsedd för molekylärbiologi med bakteriedödande lampa om sådan finns tillgänglig. Dekontaminera laboriebänkar och utrustning (pipetter, verktyg för att fästa och ta av lock o.s.v.) regelbundet med en 1–5 % (volym i vatten) blekmedelslösning eller DNA-borttagningslösning.

För att minska riskerna som förknippas med ett falskt positivt resultat:

- Öppna aldrig reagensrör efter amplifieringen.
- Kasta alltid de förorenade rören genom att blötlägga i en 1–5 % (volym i vatten) hushållsblekmedel eller motsvarande lösning i 1 timme på avstånd från analysberedningsområdet.
- Autoklavera aldrig reagensrör efter amplifieringen.

Se säkerhetsdatabladet för ytterligare information och lokala föreskrifter för kassering.

Om du har frågor om specifika tillämpningar eller procedurer kan du besöka vår hemsida på www.neogen.com eller kontakta din lokala representant eller återförsäljare för Neogen.

Användaransvar

Det åligger användarna att bekanta sig med produktinstruktioner och produktinformation. Besök vår hemsida på adressen www.neogen.com eller kontakta din lokala Neogen-representant eller -leverantör för mer information.

Vid val av testmetod är det viktigt att känna till att externa faktorer som provtagningsmetod, testprotokoll, provpreparering, hantering och laborieteknik kan påverka resultat.

Det åligger användaren att vid val av testmetoder utvärdera tillräckligt många prover med lämpliga matriser och utmaningar, för att övertyga användaren att den valda metoden uppfyller kraven.

Det åligger också användaren att fastställa att en testmetod och dess resultat uppfyller kraven från dennes kunder och leverantörer.

Liksom med alla testmetoder utgör inte resultat som erhållits från användning av någon produkt från Neogen Livsmedelshygien en garanti för kvaliteten hos de matriser eller processer som testats.

För att hjälpa kunder att utvärdera metoden för olika livsmedelsmatriser har Neogen utvecklat satsen Neogen® Molekylär Detektion Matris Kontroll. Vid behov kan Matriskontroll (MC) användas för att avgöra om matrisen förmår påverka resultaten hos Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* resultat. Testa flera prover som är representativa för matrisen, dvs. prover som inhämtats från olika källor, vid varje valideringstillfälle när Neogen-metoden används eller när nya eller okända matriser eller matriser som har genomgått råmaterial- eller bearbetningsändringar testas.

En matris kan definieras som en typ av produkt med särskilda egenskaper, såsom sammansättning eller bearbetning. Skillnaderna mellan matriser kan orsakas av något så enkelt som effekter av skillnader i bearbetning eller utformning, till exempel rå kontra pastöriserad, färsk kontra torkad, osv.

Garantibegränsningar/begränsad ersättning

MED UNDANTAG AV VAD SOM UTTRYCKLIGEN ANGES I AVSNITT OM GARANTIBEGRÄNSNING FÖR INDIVIDUELLA FÖRPACKNINGAR, FRÅNSÄGER SIG NEOGEN ALLA UTTRYCKLIGA OCH UNDERFÖRSTÅDDA GARANTIER, INKLUSIVE, MEN INTE BEGRÄNSAT TILL, ALLA GARANTIER BETRÄFFANDE SÄLJBARHET ELLER LÄMPLIGHET FÖR ETT VISST ÄNDAMÅL. Om någon produkt från Neogen Livsmedelshygien är defekt kommer Neogen eller dess auktoriserade leverantör att efter eget gottfinnande ersätta produkten eller återbetala produktens inköpspris. Detta är den enda ersättning som ges. Kontakta din Neogen-representant eller en godkänd Neogen-distributör om du har fler frågor.



Begränsning av Neogen:s ansvar

NEOGEN KOMMER INTE ATT PÅTA SIG NÅGOT ANSVAR FÖR FÖRLUST ELLER SKADOR, VARE SIG DIREKTA, INDIREKTA, SÄRSKILDA, TILLFÄLLIGA ELLER EFTERFÖLJANDE SKADOR, INKLUSIVE, MEN INTE BEGRÄNSADE TILL, FÖRLORADE VINSTER. Under inga omständigheter ska Neogen:s ansvar i något som helst lagrum överskrida inköpspriset för den påstått defekta produkten.

Förvaring och kassering

Förvara Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* vid 2–8°C. Får inte frysas. Förvara satsen på en mörk plats. Kontrollera att foliepåsen är oskadad när satsen har öppnats. Använd inte om påsen är skadad. Efter att påsen har öppnats ska oanvända reagensrör alltid förvaras i den återförslutningsbara påsen med torkmedlet inuti för att bevara de frystorkade reagensernas stabilitet. Förvara återförslutna påsar vid 2–8°C i högst 60 dagar.

Använd inte Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* efter utgångsdatumet. Utgångsdatum och partinumner anges på etiketten på lådans utsida. Efter användning kan anrikningsmedlet och rören till Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* eventuellt innehålla patogena material. Följ gällande branschstandarder för kassering av kontaminerat avfall när testen har genomförts. Se säkerhetsdatabladet för ytterligare information och lokala föreskrifter för kassering.

Bruksanvisning

Följ alla anvisningar noggrant. Underlåtenhet att göra detta kan leda till felaktiga resultat.

Laboratoriebänkar och utrustning (pipetter, verktyg för att fästa och ta av lock o.s.v.) regelbundet med en 1–5 % (volym i vatten) blekmedelslösning eller DNA-borttagningslösning.

Användaren måste genomgå utbildningen i driftkvalifikation (OQ) för Neogen Molekylärt Detektionssystem, enligt beskrivningen i dokumentet "Protokoll för installationskvalifikation (IQ)/driftkvalifikation (OQ) och anvisningar för Neogen Molekylärt Detektionssystem"⁽⁶⁾.

Se avsnittet "Specifika anvisningar för validerade metoder" för särskilda krav:

Tabell 3 för anrikningsprotokoll enligt AOAC® *Official Method of Analysis*SM 2016.08 och AOAC® *Performance Tested Method*SM Certifikat 081501.

Tabell 4 för anrikningsprotokoll enligt NF Validation-certifikatet 3M 01/15-09/16.

Provanrikning

I tabell 2, 3 eller 4 visas en vägledning till anrikning av livsmedels- och miljöprover. Användaren ansvarar för att validera alternativa provtagningsprotokoll eller spädningförhållanden för att säkerställa att testmetoden uppfyller användarens kriterier.

Livsmedel

1. Låt anrikningsmediet för Demi-Fraser-buljong (inklusive järnammoniumcitrat) balanseras till omgivande temperatur i laboratoriet.
2. Kombinera anrikningsmediet och provet aseptiskt enligt tabellerna 2, 3 eller 4. För prover med kött och som innehåller en stor mängd partiklar rekommenderas att filterpåsar används.
3. Homogenisera noggrant genom att mixa, använda stomacher eller blanda manuellt i $2 \pm 0,2$ minuter. Inkubera vid $37 \pm 1^\circ\text{C}$ enligt tabell 2, 3 eller 4.
4. För råa mejeriprodukter (se tabell 2, 3 eller 4), för över 0,1 ml av den primära anrikningen till 10 ml Fraser-buljong. Inkubera vid $37 \pm 1^\circ\text{C}$ i 20-24 timmar.

Miljöprover

Provinsamlingsenheter kan vara en svamp som hydraterats med en neutraliserande lösning för att inaktivera effekterna hos desinficeringsmedlen. Neogen rekommenderar att man använder en biocidfri cellulosa-svamp. Neutraliseringslösningen kan vara Dey-Engley (D/E) neutraliseringsbuljong eller Lethen-buljong. Det är rekommenderat att man sanerar området efter provtagning.

WARNING: Om du väljer att använda neutraliseringsbuffert (NB) som innehåller arylsulfonatkomplex som hydrererande lösning för svampen måste man ha en 1:2-spädning (1 del prov i 1 del steril anrikningsbuljong) för anrikningsmiljöprovet innan det testas för att minska riskerna som förknippas med ett falskt negativt resultat som leder till utsläpp av kontaminerad produkt. Ett annat alternativ är att överföra 10 µl neutraliserande buffertanrikning till Neogen Lyseringslösningrören.

Den rekommenderade storleken på provtagningsområdet för att verifiera förekomsten eller frånvaron av patogener på ytan är minst 100 cm² (10 cm x 10 cm eller 4" x 4"). När du provtar med en svamp, svabba över hela området i två riktningar (vänster till höger och sedan upp och ner) eller samla miljöprover enligt ditt nuvarande provtagningsprotokoll eller enligt riktlinjerna i FDA BAM⁽¹⁾, USDA FSIS MLG⁽²⁾ eller ISO 18593⁽⁷⁾.



1. Låt anrikningsmediet för Demi-Fraser-buljong (inklusive järnammmoniumcitrat) balanseras enligt laboratoriets omgivande temperatur.
2. Kombinera anrikningsmediet och provet aseptiskt enligt tabellerna 2, 3 eller 4.
3. Homogenisera noggrant genom att mixa, använda stomachereller blanda manuellt i $2 \pm 0,2$ minuter. Inkubera vid $37 \pm 1^\circ\text{C}$ i 24–30 timmar enligt tabell 2, 3 eller 4.

Tabell 2: Allmänna anrikningsprotokoll vid $37 \pm 1^\circ\text{C}$ med användning av Demi-Fraser-buljong och Fraser-buljong efter behov.

Provmatris	Provstorlek	Anriknings-buljongvolym (ml)	Anrikningstid (h)				
Värmebehandlat, kokt, marinerat kött, fågel, skaldjur och fisk	25 g	225	24–30				
Värmebehandlade/pastöriserade mejeriprodukter							
Produkter och grönsaker							
Flerkomponentslivsmedel							
Miljöprover ^(a)	1 svamp	100 eller 225	24–30				
	1 svabb	10	24–30				
Rått kött, fågel, skaldjur, fisk	25 g	475	28–32				
Provmatris	Primäranrikning (Demi-Fraser-buljong) ^(a)			Sekundär anrikning (Fraser-buljong) ^(a)			Volym provanalys ^(b)
	Provstorlek	Anriknings-buljongvolym (ml)	Anrikningstid (h)	Provstorlek	Anrikningstemperatur (°C)	Anrikningstid (h)	
Råa mejeriprodukter	25 g	225	20–24	Överför 0,1 ml till 10 ml Fraser-buljong	37 ± 1	20–24	10 µl

(a) Demi-Fraser och Fraser-buljong bör alltid kompletteras med Fraser-buljongtillskott (ferriammmoniumcitrat) under den primära eller sekundära anrikningen.

(b) Provvolymer överförd till Neogen Lyseringslösningrören. Se steg 4.6 i avsnittet om lysering.

Specifika anvisningar för validerade metoder
AOAC® Official Method of AnalysisSM 2016.08
AOAC® Performance Tested MethodSM #081501



I AOAC Research Institute OMASM och PTMSM studier, fann man att Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* är en effektiv metod för att upptäcka *Listeria monocytogenes*. Matriserna som testades i studien visas i tabell 3.



Tabell 3. Anrikningsprotokoll med Demi-Fraser-buljong^(a) vid 37 ± 1°C enligt AOAC OMASM 2016.08 och PTMSM Certifikat nr. 081501.

Provmatris		Provstorlek	Anrikningsbuljongvolym (ml)	Anrikningstid (h)
Nötköttkorvar, färskost, vaniljglass, cottage cheese med 4 % fetthalt, choklad med standardmjölk med 3 % fetthalt, romansallat, rå spenat i påse, kallrökt lax		25 g	225	24–30
Rå kyckling		25 g	475	28–32
Delikatesskalkon		125 g	1125	24–30
Cantaloupe-melon ^(b)		Hel melon	Tillräcklig volym för att låta melonen flyta	26–30
Miljöprover:	Rostfritt stål	1 svamp	225	24–30
	Förseglad betong	1 svamp	100	24–30
	Plast ^(c)	1 svabb	10	24–30

Alla prover för AOAC-valideringen homogeniserades med stomacher om inte annat anges.

- (a) Demi-Fraser och Fraser-buljong bör alltid kompletteras med Fraser-buljongtillskott (ferriammoniumcitrat) under den primära eller sekundära anrikningen.
- (b) Homogenisera provet med manuell blandning.
- (c) Homogenisera provet genom att vortexa det.

NF VALIDATION av AFNOR Certification



3M 01/15-09/16

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

För ytterligare information om valideringslut, läs NF VALIDATION-certifikatet som finns tillgängligt på ovan angivna webbsida.

NF VALIDATION-certifierad metod i enlighet med ISO 16140-2⁽⁶⁾ jämfört med ISO 11290⁽³⁾

Valideringsomfång: Alla livsmedels- och miljöprover (exklusive prover för primärproduktion)

Provberedning: Prover bör beredas enligt EN ISO 11290-1⁽³⁾ och EN ISO 6887⁽⁸⁾

Programversion: Se certifikat

Tabell 4: Anrikningsprotokoll som utförs enligt NF VALIDATION certifierad metod 3M 01/15-09/16 vid 37 ± 1°C med användning av Demi-Fraser-buljong och Fraser-buljong efter behov.

Allmänt protokoll	Provstorlek	Anrikningsbuljongvolym (ml)	Anrikningstemperatur (± 1°C)	Anrikningstid (h)	Volym provanalys ^(a)	Accepterad avbrottpunkt
Alla matprover (utom rått kött, råa skaldjur och råa mejeriprodukter)	25 g	225	37	24–30	20 µl	<ul style="list-style-type: none"> • Demi-Fraser Buljong upp till 72 timmar • Lysat vid -20°C • Lysera vid 4°C upp till 72 timmar
Miljöprover	25 g, 1 svabb eller 1 torkduk					



Specifikt protokoll	Primäranrikning (Demi-Fraser-buljong) ^(b)				Sekundär anrikning (Fraser-buljong) ^(b)				Accepterad avbrottpunkt
	Provstorlek	Anrikningbuljongvolym (ml)	Anrikningstemperatur (± 1°C)	Anrikningstid (h)	Provstorlek	Anrikningstemperatur (± 1°C)	Anrikningstid (h)	Volym provanalys ^(c)	
Rått kött, råa skaldjur och råa mejeriprodukter	25 g	225	37	20–24	Överför 0,1 ml till 10 ml Fraser-buljong	37	20–24	10 µl	<ul style="list-style-type: none"> • Fraser Buljong upp till 72 timmar • Lysat vid -20°C • Lysera vid 4°C upp till 72 timmar

(a) Provvolum överförd till Neogen Lyseringslösning. Se steg 4.6 i avsnittet om lysering.

(b) Demi-Fraser och Fraser-buljong bör alltid kompletteras med Fraser-buljongtillskott (ferriammoniumcitrat) under den primära eller sekundära anrikningen.

(c) Provvolum överförd till Neogen Lyseringslösning. Se steg 4.6 i avsnittet om lysering.

ANMÄRKNING: Prover större än 25 g har inte testats i NF VALIDATION-studien.

Förberedelse av Neogen® Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda

1. Vät en trasa med en 1–5 % (volym i vatten) hushållsblekmedel eller motsvarande lösning och torka av Neogen® Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda.
2. Skölj Neogen Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda med vatten.
3. Torka av Neogen Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda med en pappershandduk.
4. Säkerställ att Neogen Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda är torr innan den används.

Förberedning av Neogen® Molekylär Detektion, Insats för kylblock

Placera Neogen® Molecular Detection Kylblock direkt på laboratoriebänken. Använd kylblock med omgivande temperatur i laboratoriet (20–25°C).

Förberedelse av Neogen® Molekylär Detektion, Insats för värmeblock

Lägg Neogen® Molekylär Detektion, Insats för värmeblock i en torr dubbelblocksvärmare. Aktivera den torra blocksvärmaren och ställ in temperaturen så att Neogen Molekylär Detektion, Insats för värmeblock tillåts uppnå och bibehålla en temperatur på 100 ± 1°C.

ANMÄRKNING: Beroende på värmaren tar det cirka 30 minuter för Neogen Molekylär Detektion, Insats för värmeblock att uppnå rätt temperatur. Använd en lämplig, kalibrerad termometer (t.ex. en termometer för delvis nedsänkning eller en digital värmeelementtermometer, **inte** en termometer för fullständig nedsänkning) placerad på den avsedda platsen och kontrollera att Neogen Molekylär Detektion insats för värmeblock har en temperatur på 100 ± 1°C.

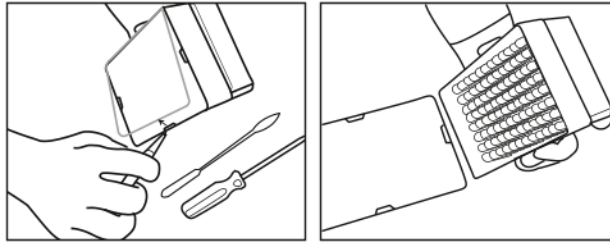
Beredning av Neogen® Molekylärt Detektionsinstrument

1. Starta Neogen® Molekylär Detektionssystem-programvara och logga in. Kontakta din Neogen-representant för livsmedelssäkerhet för att säkerställa att du har den senaste versionen av programvaran.
2. Aktivera Neogen Molekylärt Detektionsinstrument.
3. Skapa eller redigera en datakörning för varje prov. Se användarhandboken till Neogen Molekylärt Detektionssystem för detaljerad information.

ANMÄRKNING: Neogen Molekylärt Detektionsinstrument måste försättas i redotillstånd innan Neogen® Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda med reagensrör förs in. Detta uppvärmningssteg tar cirka 20 minuter och indikeras av en ORANGE lampa i instrumentets statusfält. När instrumentet är redo att starta en körning blir statusfältet GRÖNT.

Lysering

Avlägsna nedre delen av Neogen Provrörsställ för lyseringslösning med en skruvmejsel eller spatel innan du placerar det i Neogen Molekylär Detektion, Insats för värmeblock.



1. Låt rören med lyseringslösningen (Neogen Lyseringslösning) värmas upp genom att placera stället i rumstemperatur (20–25°C) över natten (16–18 timmar). Alternativa metoder för att värma Neogen Lyseringslösningsrören till rumstemperatur är att ställa Neogen Lyseringslösningsrören på laboratoriebänken i minst 2 timmar, inkubera Neogen Lyseringslösningsrören vid $37 \pm 1^\circ\text{C}$ i 1 timme eller placera dem i en torr dubbelblockvärmare i 30 sekunder vid 100°C .
2. Invertera de lockförsedda rören för att blanda. Fortsätt till nästa steg inom 4 tim.
3. Ta ut anrikningsbuljongen från inkubatorn.
4. Ett Neogen Lyseringslösningrör krävs för varje prov samt det negativa kontrollprovet (NC) (sterilt anrikningsmedium).
 - 4.1 Remsor med Neogen Lyseringslösningrör kan klippas för önskat antal Neogen Lyseringslösningrör. Välj det antal individuella Neogen Lyseringslösningrör eller remсор om 8 rör som behövs. Placera Neogen Lyseringslösningrören i ett tomt ställ.
 - 4.2 Undvik korskontaminering genom att öppna ett lock på en remсор med Neogen Lyseringslösningrör i taget och använd en ny pipettspets vid varje överföringssteg.
 - 4.3 För över det anrikade provet till Neogen Lyseringslösningrören enligt beskrivningen nedan:

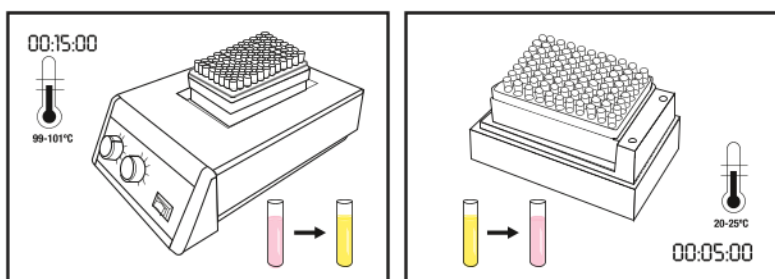
För över varje anrikat prov till ett enskilt Neogen Lyseringslösningrör **först**. Överför NC **sist**.

- 4.4 Använd Neogen® Molekylär Detektion, Cap/Decap Redskap – Lysering för att öppna en remсор med Neogen Lyseringslösningrör – en remсор i taget.
- 4.5 Kassera locket till Neogen Lyseringslösningröret – om lysatet ska behållas för omprov ska locken placeras i en ren behållare för återanvändning efter lysering.
 - 4.5.1 Se bilaga A för information om behandling av förvarat lysat.
- 4.6 Överför 20 µl prov till ett Neogen Lyseringslösningrör såvida inte annat anges i protokollen i tabell 2, 3 och 4 (t ex. råa mejeriprodukter eller då man använder miljöprover med neutraliseringsbuffer på 10 µl).



5. Upprepa steg 4.4 till 4.6 tills varje enskilt prov har tillsatts i ett motsvarande Neogen Lyseringslösningrör i remсорn.
6. När alla prover har överförts ska 20 µl NC (sterilt anrikningsmedium, t.ex. buffrad Demi-Fraser-buljong) överföras till ett Neogen Lyseringslösningrör. Använd inte vatten som NC.
7. Kontrollera att temperaturen på Neogen Molekylär Detektion insats för värmeblock är $100 \pm 1^\circ\text{C}$.
8. Placera det oövertäckta stället med Neogen Lyseringslösningrör i Neogen Molekylär Detektioninsats för värmeblock och värm i 15 ± 1 minuter. Under uppvärmningen kommer Neogen Lyseringslösningen att ändra färg från rosa (kall) till gul (varm).
 - 8.1 Prover som inte har värmebehandlats korrekt under analysens lyseringssteg bör betraktas som en potentiell biologisk fara och ska INTE föras in i Neogen Molekylärt Detektionsinstrument.
9. Ta ut det oövertäckta stället med Neogen Lyseringslösningrör från värmeblocket och låt det svalna i Neogen Molekylär Detektion -insats för kylblock under minst 5 minuter men högst 10 minuter. Neogen Molekylär insats för kylblock som används vid omgivningstemperatur ska placeras direkt på laboratoriebänken. När lyseringslösningen svalnar återgår dess färg till rosa.

10. Ta ut stället med Neogen Lyseringslösningrör från Neogen Molekylär Detektion insats för kylblock.

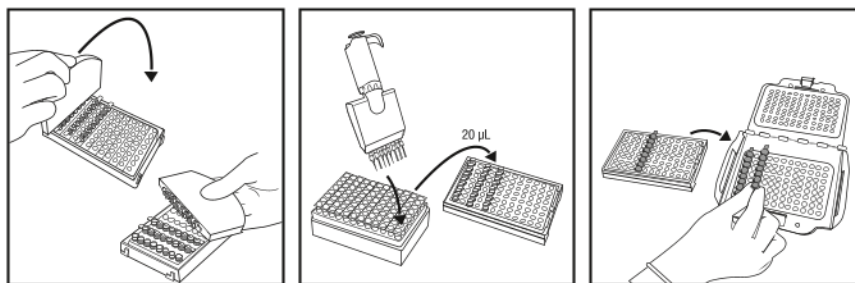


Amplifiering

1. Ett Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* reagensrör krävs för varje prov samt för NC-provet.
 - 1.1 Reagensrörens remsor kan klippas till önskat antal rör. Välj antalet enskilda Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* reagensrör eller remsor om 8 rör som behövs.
 - 1.2 Placera Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* Reagensrör i ett tomt ställ.
 - 1.3 Undvik att röra upp reagens-pelletarna från provrörens botten.
2. Välj ett rör för Neogen Reagenskontroll och placera det i stället.
3. Undvik korskontaminering genom att öppna ett lock på en remsa med Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* reagensrör i taget och använd en ny pipettspets vid varje överföringssteg.
4. För över lysat till ett Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* reagensrör och ett rör för Neogen Reagenskontroll enligt beskrivningen nedan:

Överför varje provlysats till enskilda Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* reagensrör **först**, följt av NC. Hydrera rör för Neogen Reagenskontroll **sist**.

5. Använd Neogen® Molekylär Detektion, Cap/Decap Redskap – Reagens för att öppna Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* reagensrör - en rörremsa i taget. Kassera locket.
 - 5.1 För över **20 µl** av provlysats från den övre ½ av vätskan (undvik utfällning) i Neogen Lyseringslösningröret till motsvarande Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* reagensrör. Dispensera i en vinkel för att undvika att pelletsarna rörs upp. Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger.
 - 5.2 Upprepa steg 5.1 tills enskilda provlysats har lagts till i ett motsvarande Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* reagensrör i remsan.
 - 5.3 Täck Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* reagensrör med medföljande extralock och använd den rundade sidan av Neogen Molekylär Detektion Cap/Decap Redskap - Reagens och pressa fram och tillbaka för att stänga locket ordentligt.
 - 5.4 Upprepa efter behov steg 5.1 till 5.3 för det antal prover som ska testas.
 - 5.5 När alla provlysats har överförts upprepar du steg 5.1 för att föra över 20 µl NC-lysats i ett Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* reagensrör.
 - 5.6 För över **20 µl** av **NC-lysats** i ett rör för **Neogen Reagenskontroll**. Dispensera i en vinkel för att undvika att pelletsarna rörs upp. Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger.
6. Ladda de förslutna provrören i en ren och dekontaminerad Neogen Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda. Stäng och lås locket på Neogen Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda.



7. Granska och bekräfta den konfigurerade körningen i programvaran för Neogen Molekylär Detektionssystem.
8. Klicka på startknappen i programmet och välj vilket instrument som ska användas. Det valda instrumentets lock öppnas automatiskt.

9. Placera Neogen Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda i Neogen Molekylärt Detektionsinstrument och stäng locket för att starta analysen. Resultaten ges inom 75 minuter, men positiva resultat kan detekteras tidigare.
10. Ta ut Neogen Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda från Neogen Molekylärt Detektionsinstrument när analysen har slutförts och kassera rören genom att blötlägga dem i en 1–5 % (volym i vatten) blekmedelslösning för hushållsanvändning i 1 timme på avstånd från analysberedningsområdet.

OBSERVERA: För att minimera risken för falskt positiva resultat på grund av korskontaminering ska reagensprovror med amplifierad DNA aldrig öppnas. Detta inkluderar rör för Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* reagens, Neogen Reagenskontroll och matriskontroll. Kassera alltid förslutna reagensrör genom att blötlägga dem i en 1–5 % (volym i vatten) blekmedelslösning eller motsvarande i 1 timme på avstånd från analysberedningsområdet.

Resultat och tolkning






En algoritm tolkar ljusutstrålningskurvan som genereras genom detektion av nukleinsyraamplifiering. Resultaten analyseras automatiskt av programmet och färgkodas baserat på resultatet. Ett positivt eller negativt resultat fastställs genom analys av ett antal unika kurvparametrar. Presumtivt positiva resultat rapporteras i realtid medan resultat som är negativa och sådana som är märkta Inspektera visas när körningen har slutförts.

Presumtivt positiva resultat bör konfirmeras enligt laboratoriets standardrutiner eller genom referensmetod^(1,2,3), börjar med överföring från den primära anrikningen till den sekundära anrikningsbuljongen (om tillämpligt), följt av utspridning och bekräftelse av isolat med användning av lämpliga biokemiska och serologiska metoder.

ANMÄRKNING: Ett negativt prov ger inte ett noll-resultat vid avläsning eftersom systemet och Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes* förstärkningsreagens ger en "bakgrund" relativ ljusenhet (RLU) vid avläsning.

Skulle ovanlig ljusutstrålning förekomma, vilket är sällsynt, märker algoritmen detta med "Inspektera". Neogen rekommenderar att användaren upprepar analysen av prover som resulterar i Inspektera. Om resultatet fortsätter att vara Inspektera ska du gå vidare till testbekräftelse med den metod du föredrar eller så som anges i lokala föreskrifter.

Tabell 5: Resultatsymboler för prover och tolkning som tillhandahålls av Neogen Molekylärt Detektionssystem-programvaran.

Brunnstyp	Brunnresultatsymbol	Resultat	Tolkning
Prov		Positiv	Provet är antagligen positivt för målpatogenen.
Prov		Negativ	Provet är negativt för målpatogenen.
Prov		Spärrad	Provmatrisen hämmade analysen. Ett omtest kan behövas. Se avsnittet felsökning och produktinstruktioner för analyspaketet för mer information.
Prov		Inspektera	Närvaron eller frånvaron av målpatogenen var obestämd. Ett omtest kan behövas. Se avsnittet felsökning och produktinstruktioner för analyspaketet för mer information.
Prov		Fel	Ingen bioluminescens detekterades. Ett omtest kan behövas. Se avsnittet felsökning och produktinstruktioner för analyspaketet för mer information.

Bekräftelse av resultat enligt NF VALIDATION-certifierad metod

Alternativ 1: Använda ISO 11290⁽³⁾-standarden från Demi-Fraser-anrikningen.

Alternativ 2: Genom isolering på PALCAM-agar (O&A) eller på kromogen agar som ingår i en NF VALIDATION-certifierad metod för detektion av *Listeria monocytogenes*. Förekomsten av karakteristiska kolonier är tillräcklig för att bekräfta förekomsten av *Listeria monocytogenes*.

Alternativ 3: Använda nukleinsyrasonder som beskrivs i EN ISO 7218⁽⁵⁾ standarden och som utförs på isolerade kolonier, från selektiv agar (se alternativ 1 eller 2).

Alternativ 4: Använd någon annan certifierad NF VALIDATION-metod, vars princip måste vara annorlunda än den som används i Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes*. Hela protokollet för denna andra validerade metod måste användas. Alla steg före starten av bekräftelsen måste vara gemensamma för båda metoderna.

I fall av icke överensstämmande resultat (presumtivt positiva med den alternativa metoden, ej bekräftade med någon av de beskrivna metoderna ovan) måste laboratoriet följa de obligatoriska stegen för att säkerställa validiteten för de erhållna resultaten.

I fall av icke överensstämmande resultat (presumtivt positiva med Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes*, som inte bekräftas med någon av de ovan beskrivna metoderna) måste laboratoriet följa de obligatoriska stegen för att säkerställa validiteten för de erhållna resultaten.

Om du har frågor om specifika tillämpningar eller procedurer kan du besöka vår hemsida på www.neogen.com eller kontakta din lokala representant eller återförsäljare för Neogen.

Bilaga A. Protokollavbrott: Förvaring och omprovning av värmebehandlade lysater.

1. För att lagra ett värmebehandlat lysat, täck lyseringsröret igen med ett rent lock (se "Lysering", 4.5).
2. Förvara vid 4 till 8°C i upp till 72 timmar.
3. Förbered ett förvarat prov för amplifiering genom att vända det upp och ned 2–3 gånger så att det blandas.
4. Avlägsna locken från rören.
5. Placera de blandade lysatrören i Neogen Molekylär Detektion, Insats för värmeblock och värm vid 100 ± 1°C i 5 ± 1 minuter.
6. Ta bort stället med Neogen Lyseringslösningrör från värmeblocket, och låt det svalna i Neogen Molekylär Detektion, insats för kylblock i minst 5 minuter och högst 10 minuter.
7. Fortsätt enligt protokollet i avsnittet "Amplifiering" som beskrivs ovan.

Referenser:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Förklaring av produktetikettsymbolerna

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.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.
FS00867B

Produktvejledning

Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*

Produktbeskrivelse og tilsigtet brug

Neogen® Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* bruges sammen med Neogen® Molekylær Detektions System til hurtig og præcis detektion af *Listeria monocytogenes* i opfremrede fødevarerprøver og miljøprøver. Neogen Molekylær Detektions Analyser bruger loop-medieret, isotermisk amplifikation til hurtigt at forstærke nukleinsyresekvenser med høj specificitet og følsomhed kombineret med bioluminescens for at afsløre amplifikationen. Formodede positive resultater bliver rapporteret i realtid, mens negative resultater bliver vist, når analysen er gennemført. Formodede positive resultater bør verificeres ved hjælp af din foretrukne metode eller som angivet i de lokale vedtægter^(1, 2, 3).

Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* er beregnet til brug i laboratorieomgivelser af professionelle, der er uddannet i laboratorieteknikker. Neogen har ikke dokumenteret brugen af dette produkt i andre brancher end føde- og drikkevarer. For eksempel har Neogen ikke dokumenteret dette produkt til test af vandprøver, medicinalvarerprøver, kosmetikprøver, kliniske prøver eller veterinære prøver. Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* er ikke blevet evalueret med alle mulige testprotokoller eller med alle mulige bakteriestammer.

Som for alle testmetoder kan kilden, sammensætningen og kvaliteten af opfremningsmediet påvirke resultatet.

Faktorer såsom prøvetagningsmetoder, testprotokoller, prøveforberedelse, håndtering samt laboratorieteknik kan ligeledes påvirke resultaterne. Neogen anbefaler evaluering af metoden inklusive opfremningsmediet i brugerens omgivelser ved hjælp af et tilstrækkeligt antal prøver med specifikke fødevarer og mikrobielle udfordringer for at sikre, at metoden opfylder brugerens kriterium.

Neogen har evalueret Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* med Demi Fraser Bouillon med ferriammoniumcitrat og Fraser Bouillon med ferriammoniumcitrat efter behov. En typisk sammensætning af dette medie er angivet nedenfor.

Typisk sammensætning af Demi Fraser Basis Bouillon	(g/l)	Typisk sammensætning af Fraser Basis Bouillon	(g/l)
Natriumklorid	20 g	Natriumklorid	20 g
Natriumfosfat, dibasisk, vandfri*	9,6 g	Natriumfosfat, dibasisk, vandfri*	9,6 g
Oksekødsekstrakt	5,0 g	Oksekødsekstrakt	5,0 g
Pankreatisk fordøjelse af casein	5,0 g	Pankreatisk fordøjelse af casein	5,0 g
Peptisk fordøjelse af animalsk væv	5,0 g	Peptisk fordøjelse af animalsk væv	5,0 g
Gærekstrakt	5,0 g	Gærekstrakt	5,0 g
Lithiumklorid	3,0 g	Lithiumklorid	3,0 g
Kaliumfosfat, monobasisk	1,35 g	Kaliumfosfat, monobasisk	1,35 g
Esculin	1,0 g	Esculin	1,0 g
Acriflavin HCl	0,0125 g	Acriflavin HCl	0,025 g
Nalidixinsyre	0,01 g	Nalidixinsyre	0,02 g

* Erstatning: Natriumfosfat, dibasisk, dihydrat 12,0 g

Suppleret med Fraser Bouillon

(Ingredienser pr. 10 ml glas. Ét glas tilsættes til én liter basismedie).

Ferriammoniumcitrat 0,5 g/10 ml

Slut-pH 7,2 ± 0,2 ved 25°C

Neogen® Molekylær Detektions Instrument er beregnet til brug sammen med prøver, der har gennemgået varmebehandling under analysens lysinbehandlingstrin, der er designet til at destruere organismer, der optræder i prøven. Prøver, som ikke er blevet korrekt varmebehandlet under analysens lysinbehandlingstrin, kan udgøre en væsentlig miljörisiko og bør IKKE sættes ind i Neogen Molekylær Detektions Instrument.

Neogen Food Safety er ISO 9001-certificeret (International Organisation for Standardisering) med hensyn til design og produktion.

Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* testkittet indeholder 96 tests, beskrevet i tabel 1.

Tabel 1. Neogen Molekylær Detektions Analyse-kittets komponenter

Artikel	Identifikation	Kvantitet	Indholdsfortegnelse	Kommentarer
Neogen® Lysinopløsning (LS)	Lyserød opløsning i klare reagensglas	96 (12 strimler med 8 reagensglas)	580 µl LS pr. reagensglas	På holder og klar til brug
Neogen® Molekylær Detektions Analyse 2 - <i>Listeria monocytogenes</i> reagensglas	Gule reagensglas	96 (12 strimler med 8 reagensglas)	Frysetørret, specifik amplifikations- og detektionsblanding	Klar til brug
Ekstra hætter	Gule hætter	96 (12 strimler med 8 hætter)		Klar til brug
Neogen® Reagens Kontrol (RC)	Klare reagensglas med flip-top	16 (2 poser med 8 individuelle reagensglas)	Frysetørret kontrol-DNA, amplifikations- og detektionsblanding	Klar til brug

Den negative kontrol, som ikke medfølger i kittet, er et sterilt opformeringsmedie, f.eks. Demi Fraser Bouillon. Brug ikke vand som en negativ kontrol.

Sikkerhed

Brugeren skal læse, være indforstået med og følge alle sikkerhedsoplysninger i vejledningen til Neogen Molekylær Detektions System og Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*. Gem sikkerhedsvejledningen til fremtidig reference.

△ ADVARSEL: Indikerer en farlig situation, som kan resultere i dødsfald eller alvorlig personskade og/eller skade på ejendele, hvis den ikke undgås.

BEMÆRK: Indikerer en potentielt farlig situation, som udgør en risiko for beskadigelse af ejendom, hvis den ikke undgås.

△ ADVARSEL

Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* må ikke anvendes til diagnosticering af sygdomme på mennesker eller dyr.

Metoden med Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* kan generere *Listeria monocytogenes* på niveauer, der er tilstrækkelige til at medføre dødfødsel og dødsfald hos gravide kvinder og personer med nedsat immunforsvar, hvis de eksponeres.

Brugeren skal uddanne sit personale i aktuelle korrekte prøveteknikker: for eksempel god laboratoriepraksis, ISO/IEC 17025⁽⁴⁾ eller ISO 7218⁽⁵⁾.

For at reducere risiciene forbundet med et falsk-negativt resultat, der fører til frigørelse af kontaminerede produkter:

- Følg protokollen, og udfør tests præcist som angivet i produktvejledningen.
- Opbevar Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* som angivet på pakken og i produktvejledningen.
- Anvend altid Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* inden udløbsdatoen.
- Anvend Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* til fødevarer- og miljøprøver, der er blevet godkendt internt eller af en tredjepart.
- Anvend udelukkende Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* med overflader, desinfektionsmidler, protokoller og bakteriestammer, der er blevet evalueret internt eller af en tredjepart.
- For at lave en miljøprøve, der indeholder neutraliserende buffer med arylsulfonatkompleks, foretages fortynding 1:2 inden testning (1 del prøve til 1 del steril opformeringsbouillon). En anden mulighed er at overføre 10 µl af NB-opformeringsmediet til Neogen LS-reagensglassene. Neogen®-prøveindsamlingsprodukter, som inkluderer neutraliserende buffer med arylsulfonatkompleks: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G og HS2410NB2G.

For at reducere risiciene forbundet med eksponering med kemikalier og biologiske farer:

- Det anbefales kraftigt, at kvindeligt laboratoriepersonale informeres om risikoen for fosterets udvikling som følge af infektion hos moderen ved eksponering med *Listeria monocytogenes*.
- Foretag patogentestning i et korrekt udstyret laboratorium under uddannet personales kontrol. Inkuberet opformeringsmedie og udstyr eller overflader, der har været i kontakt med inkuberet opformeringsmedie, kan indeholde patogenniveauer, der er tilstrækkelige til at udgøre en risiko for menneskelig sundhed.
- Følg altid sikkerhedspraksis for et standardlaboratorium, inklusive brug af passende beskyttelsesudstyr og beskyttelsesbriller under håndtering af reagenser og kontaminerede prøver.
- Undgå kontakt med indholdet af opformeringsmediet og reagensglas efter amplifikationen.
- Bortskaf opformede prøver i overensstemmelse med gældende branchestandarder.
- Prøver, som ikke er blevet korrekt varmebehandlet under analysens lysinbehandlingstrin, kan udgøre en væsentlig

miljørisiko og bør IKKE sættes ind i Neogen Molekylær Detektions Instrument.

Overhold følgende forholdsregler for at reducere risiciene i forbindelse med krydskontaminering under klargøring af analysen:

- Brug altid handsker (for at beskytte brugeren og undgå introduktion af nukleaser).

For at reducere risici forbundet med miljøkontaminering:

- Følg de gældende branchestandarder for bortskaffelse af kontamineret affald.

For at reducere risici forbundet med eksponering med varme væsker:

- Overskrid ikke den anbefalede temperaturindstilling på varmeelementet.
- Overskrid ikke den anbefalede opvarmningstid.
- Brug et passende, kalibreret termometer til at verificere temperaturen for Neogen® Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg (f.eks. et termometer til delvis nedsækning eller et digitalt termoelementtermometer, ikke et termometer til hel nedsækning). Termometeret skal anbringes på det dertil indrettede sted i Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg.

BEMÆRK

Overhold følgende forholdsregler for at reducere risiciene i forbindelse med krydskontaminering under klargøring af analysen:

- Skift handsker før reagenskuglehydrering.
- Der anbefales brug af sterile, aerosol-barriere (filtrerede), molekylærbiologiske pipettespidser.
- Brug en ny pipettespid til hver prøveoverførsel.
- Anvend god laboratoriepraksis til overførsel af prøven fra opformeringsglasset til lysinreagensglasset. For at undgå kontaminering af pipetterne kan brugeren vælge at tilføje et mellemliggende overførselstrin. For eksempel kan brugeren overføre hver enkel opformeret prøve til et sterilt reagensglas.
- Anvend om muligt en molekylærbiologisk arbejdsstation, der inkluderer en bakteriedræbende lampe. Dekontaminer med jævne mellemrum laboratoriets arbejdsborde og udstyr (pipetter, luknings-/åbningsredskaber osv.) med en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsklorinopløsning eller DNA-rensopløsning.

For at reducere risiciene i forbindelse med et falsk-positivt resultat:

- Reagensglas må aldrig åbnes efter amplifikation.
- Før bortskaffelse af de kontaminede reagensglas skal de altid iblødlægges i en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsklorinopløsning eller en tilsvarende opløsning i 1 time og holdes væk fra området for analyseforberedelse.
- Reagensglas må aldrig autoklavere efter amplifikation.

Se sikkerhedsdatabladet for yderligere oplysninger og lokale vedtægter for bortskaffelse.

Hvis du har spørgsmål til specifikke anvendelser eller procedurer, bedes du besøge vores websted på www.neogen.com eller kontakte din lokale Neogen-repræsentant eller -distributør.

Brugerens ansvar

Brugeren er ansvarlig for at gøre sig bekendt med produktvejledninger og -oplysninger. Besøg vores hjemmeside på www.neogen.com, eller kontakt din lokale Neogen-repræsentant eller -distributør for at få yderligere oplysninger.

Når der vælges en testmetode, er det vigtigt, at man er klar over, at eksterne faktorer såsom prøveudtagningsmetoder, testprotokoller, prøveforberedelse, håndtering samt laboratorteknikker kan påvirke resultaterne.

Det er brugerens eget ansvar at vælge en testmetode eller et produkt, som evaluerer et tilstrækkeligt antal prøver med de passende matricer og mikrobielle udfordringer for derved at sikre brugeren, at den valgte testmetode lever op til brugerens krav.

Det er også brugerens eget ansvar at kontrollere, at alle testmetoder og resultater lever op til kundernes og leverandørernes krav.

Som med alle andre testmetoder gælder det, at de resultater, der opnås med dette Neogen Food Safety-produkt, ikke giver garanti for kvaliteten af de testede matricer og processer.

For at hjælpe kunder med at evaluere metoden til flere forskellige fødevarer matricer har Neogen udviklet Neogen® Molekylær Detektions Matrix Kontrol-kit. Efter behov kan Matrix Kontrol (MC) anvendes til at afgøre, om matricen har evnen til at påvirke resultaterne af Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*. Test flere forskellige repræsentative prøver fra matricen, dvs. prøver hentet fra forskellige kilder, fra enhver valideringsperiode under anvendelse af Neogen-metoden eller under testning af nye eller ukendte matricer eller matricer, der har gennemgået ændringer i råmaterialet eller i processen.

En matrice kan defineres som en produkttype med iboende egenskaber såsom sammensætning og proces. Forskelle mellem matricer kan være så simple som effekterne forårsaget af forskelle i deres bearbejdning eller præsentation, f.eks. rå vs. pasteuriseret, frisk vs. tørret osv.

Begrænsning af garantier/begrænset retsmiddel

BORTSET FRA HVAD DER ER UDTRYKKELIGT ANFØRT I DEN BEGRÆNSEDE GARANTI PÅ DEN INDIVIDUELLE PRODUKTEMBALLAGE, FRASIGER NEOGEN SIG ALLE UDTRYKKELIGE OG UNDERFORSTÅEDE GARANTIER, HERUNDER, MEN IKKE BEGRÆNSET TIL, ENHVER SALGBARHEDSGARANTI ELLER EGNETHED TIL EN BESTEMT ANVENDELSE. Hvis et Neogen Food Safety-produkt er behæftet med fejl eller mangler, vil Neogen eller en af dennes autoriserede distributører efter dennes eget skøn erstatte produktet eller refundere købsprisen. Dette er det eneste til rådighed værende retsmiddel. Kontakt venligst din Neogen-repræsentant eller autoriserede Neogen-distributør for yderligere spørgsmål.

Begrænsning af Neogen's ansvar

NEOGEN KAN IKKE HOLDES ANSVARLIG FOR NOGEN TAB ELLER SKADER, UANSET OM DET DREJER SIG OM DIREKTE, INDIREKTE, SÆRSKILT DOKUMENTEREDE, HÆNDELIGE SKADER ELLER FØLGESKADER, HERUNDER, MEN IKKE BEGRÆNSET TIL MISTET FORTJENESTE. Under ingen omstændigheder skal Neogen's erstatningsansvar kunne overstige købsprisen for det produkt, der efter sigende er behæftet med fejl.

Opbevaring og bortskaffelse

Opbevar Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* ved 2-8°C. Undlad frysning. Opbevar kittet på et mørkt sted. Efter åbning skal det kontrolleres, at folieposen er intakt. Hvis posen er beskadiget, må produktet ikke anvendes. Efter åbning bør ubenyttede reagensglas altid opbevares i den genlykkelige pose med tørremidlet indeni for at opretholde de frysetørrede reagensers stabilitet. Opbevar de forseglede poser ved temperaturer mellem 2-8°C i højst 60 dage.

Anvend ikke Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* efter udløbsdatoen. Udløbsdato og varepartinummer findes på æskens udvendige mærkat. Efter brug kan det berigede medie og reagensglas med Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* muligvis indeholde sygdomsfremkaldende materialer. Når testning er fuldført, bedes du følge de gældende branchestandarder for bortskaffelse af kontamineret affald. Se sikkerhedsdatabladet for yderligere oplysninger og lokale vedtægter for bortskaffelse.

Brugsanvisning

Følg omhyggeligt alle vejledninger. Hvis dette ikke overholdes, kan det medføre unøjagtige resultater.

Dekontaminer med jævne mellemrum laboratoriets arbejdsborde og udstyr (pipetter, luknings-/åbningsredskaber osv.) med en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsklorinopløsning eller DNA-reneopløsning.

Brugeren skal fuldføre undervisningen til Neogen Molekylær Detektions System brugerqualifikation (OQ) som beskrevet i dokumentet "Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System"⁽⁶⁾.

Se afsnittet "Specifikke instruktioner for validerede metoder" for specifikke krav:

Tabel 3 for opformeringsprotokoller ifølge AOAC® *Official Method of Analysis*SM 2016.08 og AOAC® *Performance Tested Method*SM Certificate #081501.

Tabel 4 for opformeringsprotokoller ifølge NF Validation-certifikat 3M 01/15-09/16.

Prøveopformering

Tabel 2, 3 og 4 viser retningslinjer for opformering af fødevarer- og miljøprøver. Det er brugerens ansvar at evaluere alternative prøveprotokoller eller blandingsforhold for at sikre, at denne testmetode imødekommer brugerens kriterier.

Fødevarer

1. Lad Demi Fraser Bouillon opformeringsmedie (med ferriammoniumcitrat) stabilisere til laboratorietemperatur.
2. Kombiner opformeringsmediet og prøven aseptisk iht. tabel 2, 3 eller 4. Til alle kødprøver og højpartikelprøver anbefales brug af filterposer.
3. Homogeniser grundigt ved blendning, centrifugering eller håndmikning i $2 \pm 0,2$ minutter. Inkuber ved $37 \pm 1^\circ\text{C}$ iht. tabel 2, 3 eller 4.
4. For rå mejeriprodukter (se tabel 2, 3 eller 4) overføres 0,1 ml af den primære opformering til 10 ml Fraser Bouillon. Inkuber ved $37 \pm 1^\circ\text{C}$ i 20-24 timer.

Miljøprøver

Prøveindsamlingsanordningen kan være en svamp fugtet med en neutraliserende opløsning til inaktivering af desinfektionsmidlerne. Neogen anbefaler brug af en biocidfri cellulose-svamp. Den neutraliserende opløsning kan være Dey-Engley (D/E) neutraliserende bouillon eller Lethen bouillon. Det anbefales at desinficere området efter prøvetagning.

ADVARSEL: Hvis I vælger at bruge neutraliserende buffer (NB) med arylsulfonatkompleks til hydreringsopløsningen til svampen, skal der foretages fortynding 1:2 (1 del prøve i 1 del steril opformeringsbouillon) af den opformede miljøprøve inden testning for at reducere risiciene forbundet med et falsk-negativt resultat, der fører til frigørelse af kontaminerede produkter. En anden mulighed er at overføre 10 µL af den neutraliserende opformeringsbuffer til Neogen LS-reagensglassene.

Den anbefalede størrelse på prøvetagningsområdet til bekræftelse af forekomst eller fravær af patogenet på overfladen er mindst 100 cm² (10 cm x 10 cm eller 4 x 4 tommer). Ved prøvetagning med en svamp skal hele området dækkes ved at bevæge den i to retninger (venstre mod højre og derefter op og ned) for at tage miljøprøver ifølge den gældende prøvetagningsprotokol eller iht. retningslinjerne i FDA BAM⁽¹⁾, USDA FSIS MLG⁽²⁾ eller ISO 18593⁽⁷⁾.

1. Lad Demi Fraser Bouillon opformeringsmedie (med ferriammoniumcitrat) stabilisere til laboratorietemperatur.
2. Kombiner opformeringsmediet og prøven aseptisk iht. tabel 2, 3 eller 4.
3. Homogeniser grundigt ved blendning, centrifugering eller håndmiksning i 2 ± 0,2 minutter. Inkuber ved 37 ± 1°C i 24-30 timer iht. tabel 2, 3 eller 4.

Tablet 2: Generelle opformeringsprotokoller ved 37 ± 1°C ved brug af Demi Fraser Bouillon og Fraser Bouillon efter behov.

Prøvematrice	Prøvestørrelse	Opformeringsbouillonens volumen (ml)	Opformeringsringtid (timer)	Primær opformering (Demi Fraser Bouillon) ^(a)			Prøveanalysevolumen ^(b)
				Prøvestørrelse	Opformeringsbouillonens volumen (ml)	Opformeringsringtid (timer)	
Varmebehandlet, tilberedt, konserveret kød, fjerkræ, skaldyr og fisk Varmebehandlede/pasteuriserede mælkeprodukter Landbrugsprodukter og grøntsager Fødevarer med flere komponenter	25 g	225	24-30				
Miljøprøver ^(a)	1 svamp	100 eller 225	24-30				
	1 podepind	10	24-30				
Råt kød, fjerkræ, skaldyr, fisk	25 g	475	28-32				
Prøvematrice	Primær opformering (Demi Fraser Bouillon) ^(a)			Sekundær opformering (Fraser Bouillon) ^(a)			Prøveanalysevolumen ^(b)
	Prøvestørrelse	Opformeringsbouillonens volumen (ml)	Opformeringsringtid (timer)	Prøvestørrelse	Opformeringsringstemperatur (°C)	Opformeringsringtid (timer)	
Rå mælkeprodukter	25 g	225	20-24	Overfør 0,1 ml til 10 ml Fraser Bouillon	37 ± 1	20-24	10 µl

(a) Demi Fraser og Fraser Bouillon skal altid suppleres med Fraser Bouillon (ferriammoniumcitrat) under primær eller sekundær opformering.

(b) Prøvevolumen overført til Neogen LS-reagensglassene. Se trin 4.6 i afsnittet Lysinbehandling.

Specifikke instruktioner for validerede metoder
AOAC® Official Method of AnalysisSM 2016.08
AOAC® Performance Tested MethodSM #081501



I OMASM- og PTMSM-programmer udført af AOAC Research Institute har Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* vist sig at være en effektiv metode til detektion af *Listeria monocytogenes*. Matricerne, der er testet i denne undersøgelse, er vist i Tabel 3.

Tabel 3. Opformeringsprotokoller med Demi Fraser Bouillon^(a) ved 37 ± 1°C iht. AOAC OMASM 2016.08 og PTMSM-certifikat nr. 081501.

Prøvematrice		Prøvestørrelse	Opformeringsbouillonens volumen (ml)	Opformeringstid (timer)
Hotdogs med oksekød, queso fresco, vanilleis, hytteost med 4 % mælkefedt, sødmælkskakaomælk 3 %, romainesalat, rå spinat i pose, koldrøget laks		25 g	225	24-30
Rå kylling		25 g	475	28-32
Kalkunpålæg		125 g	1125	24-30
Cantaloupemelon ^(b)		Hel melon	Tilstrækkelig volumen til at melonen kan flyde	26-30
Miljøprøver:	Rustfrit stål	1 svamp	225	24-30
	Forseglet beton	1 svamp	100	24-30
	Plast ^(c)	1 podedind	10	24-30

Alle prøver til AOAC-valideringen blev homogeniseret med centrifugering, medmindre andet er angivet.

- (a) Demi Fraser og Fraser Bouillon skal altid suppleres med Fraser Bouillon (ferriammoniumcitrat) under primær eller sekundær opformering.
- (b) Homogeniser prøven ved håndmixning.
- (c) Homogeniser prøven i en vortex-blander.

NF VALIDATION med AFNOR Certification



3M 01/15-09/16

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

For yderligere oplysninger om validering henvises der til NF VALIDATION-certifikatet, der er tilgængeligt på det ovenfor nævnte websted.

NF VALIDATION-certificeret metode i overensstemmelse med ISO 16140-2⁽⁶⁾ i sammenligning med ISO 11290⁽³⁾

Valideringsområdet: Alle prøver af humane fødevarer samt miljøprøver (med undtagelse af prøver fra primær produktion)

Prøveforberedelse: Prøver bør forberedes i henhold til EN ISO 11290-1⁽³⁾ og EN ISO 6887⁽⁸⁾

Softwareversion: Se certifikat

Tabel 4: Opformeringsprotokoller iht. NF VALIDATION-certificeret metode 3M 01/15-09/16 ved $37 \pm 1^\circ\text{C}$ med Demi Fraser Bouillon og Fraser Bouillon efter behov.

Generel protokol	Prøvestørrelse	Opformeringsbouillonens volumen (ml)	Opformeringsstemperatur ($\pm 1^\circ\text{C}$)	Opformerings-tid (timer)	Prøveanalysevolumen ^(a)	Accepteret afbrydelsepunkt
Alle fødevarerprøver (undtagen råt kød, rå skaldyr og rå mælkeprodukter)	25 g	225	37	24-30	20 μl	<ul style="list-style-type: none"> • Demi Fraser Bouillon op til 72 timer • Lyser ved -20°C • Lyser ved 4°C i op til 72 timer
Miljøprøver	25 g, 1 podepind eller 1 serviet					

Specifik protokol	Primær opformering (Demi Fraser Bouillon) ^(b)				Sekundær opformering (Fraser Bouillon) ^(b)				Accepteret afbrydelsepunkt
	Prøvestørrelse	Opformeringsbouillonens volumen (ml)	Opformeringsstemperatur ($\pm 1^\circ\text{C}$)	Opformerings-tid (timer)	Prøvestørrelse	Opformeringsstemperatur ($\pm 1^\circ\text{C}$)	Opformerings-tid (timer)	Prøveanalysevolumen ^(c)	
Råt kød, rå skaldyr og rå mælkeprodukter	25 g	225	37	20-24	Overfør 0,1 ml til 10 ml Fraser Bouillon	37	20-24	10 μl	<ul style="list-style-type: none"> • Fraser Bouillon op til 72 timer • Lyser ved -20°C • Lyser ved 4°C i op til 72 timer

(a) Prøvevolumen overført til Neogen LS-reagensglassene. Se trin 4.6 i afsnittet Lysinbehandling.

(b) Demi Fraser og Fraser Bouillon skal altid suppleres med Fraser Bouillon (ferriammoniumcitrat) under primær eller sekundær opformering.

(c) Prøvevolumen overført til Neogen LS-reagensglassene. Se trin 4.6 i afsnittet Lysinbehandling.

BEMÆRK: Prøver større end 25 g er ikke testet i NF validation-undersøgelsen.

Forberedelse af Neogen® Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning

1. Fugt en klud med en 1-5 % (v: v i vand) husholdningsklorinopløsning eller en tilsvarende opløsning, og aftør Neogen® Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning.
2. Skyl Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning med vand.
3. Brug et engangshåndklæde til at aftørre Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning.
4. Sørg for, at Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning er tør inden brug.

Forberedelse af Neogen® Molekylær Detektions Køleblok Indlæg

Anbring Neogen® Molekylær Detektions Køleblok direkte på laboratoriebordet. Brug køleblokken ved laboratorietemperatur ($20-25^\circ\text{C}$).

Forberedelse af Neogen® Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg

Anbring Neogen® Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg på en tør dobbelt varmeenhed. Tænd for den tørre varmeenhed, og indstil temperaturen, så Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg kan nå og opretholde en temperatur på $100 \pm 1^\circ\text{C}$.

BEMÆRK: Afhængigt af varmeenheden skal man påregne ca. 30 minutter, før Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg opnår temperaturen. Ved hjælp af et passende, kalibreret termometer (f.eks. et termometer til delvis nedsenkning eller et digitalt termoelementtermometer, men **ikke** et termometer til fuld nedsenkning) anbragt på det dertil indrettede sted skal det verificeres, at Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg er på $100 \pm 1^\circ\text{C}$.

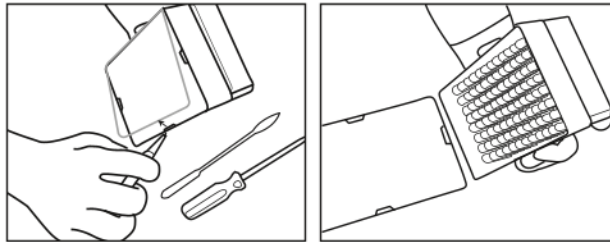
Forberedelse af Neogen® Molekylær Detektions Instrument

1. Start softwaren til Neogen® Molekylær Detektions System, og log på. Kontakt din Neogen Food Safety-repræsentant for at sikre, at du har den mest opdaterede version af softwaren.
2. Tænd for Neogen Molekylær Detektions Instrument.
3. Opret, eller rediger en kørsel med data for hver prøve. Se brugsanvisningen til Neogen Molekylær Detektions System for flere oplysninger.

BEMÆRK: Neogen Molekylær Detektions Instrument skal opnå Klar-tilstanden inden der indsættes reagensglas i Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning. Dette opvarmningstrin varer ca. 20 minutter og bliver angivet med et ORANGE lys på instrumentets statussøjle. Når instrumentet er klar til en kørsel, lyser statussøjlen GRØNT.

Lysinbehandling

Fjern bunden af holderen til Neogen Lysinbehandlingsopløsning med en skruetrækker eller en spatel, før den placeres i Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg.



1. Lad LS-reagensglassene (Neogen Lysinbehandlingsopløsning) varme op ved at indstille holderen til stuetemperatur (20-25°C) natten over (16-18 timer). Alternativer til at stabilisere Neogen LS-reagensglassene til stuetemperatur er at sætte Neogen LS-reagensglassene på arbejdsbordet i mindst 2 timer, inkubere Neogen LS-reagensglassene i en inkubator ved 37 ± 1°C i 1 time eller stille dem i en tør, dobbelt varmeblok i 30 sekunder ved 100°C.
2. Vend de lukkede reagensglas på hovedet for at blande. Gå til næste trin inden for 4 timer.
3. Fjern opformeringsboullonen fra inkubatoren.
4. Et Neogen LS-reagensglas er påkrævet til hver prøve og til den negative kontrolprøve (NC) (sterilt opformeringsmedie).
 - 4.1 Neogen LS-reagensglasstrimler kan skæres til det ønskede antal reagensglas til Neogen Lysinbehandlingsopløsning. Vælg antallet af individuelle Neogen LS-reagensglas eller -strimler med 8 reagensglas efter behov. Sæt Neogen LS-reagensglas i en tom holder.
 - 4.2 Åbn én Neogen LS-reagensglasstrimmel ad gangen for at undgå krydskontaminering, og brug en ny pipette til hvert overførselstrin.
 - 4.3 Overfør opformerede prøver til Neogen LS-reagensglas som beskrevet nedenfor:

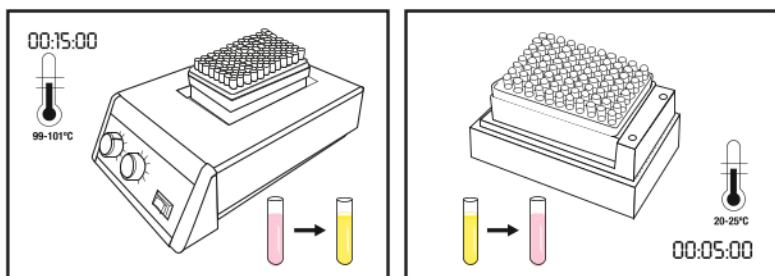
Overfør hver opformeret prøve til et individuelt Neogen LS-reagensglas **først**. Overfør NC **til sidst**.

- 4.4 Brug Neogen® Molekylær Detektions Værktøj til Cap/Decap (lukning/åbning) – Lysin-behandling til at åbne én Neogen LS-reagensglasstrimmel ad gangen.
- 4.5 Smid Neogen LS-reagensglassets låg væk – hvis lysat skal gemmes til gentestning, så placer lågene i en ren beholder til genpåsætning efter lysinbehandlingen.
 - 4.5.1 Ved behandling af gemt af lysat, se bilag A.
- 4.6 Overfør 20 µl prøve til et Neogen LS-reagensglas, medmindre andet er angivet i protokollerne fra tabel 2, 3 eller 4 (ved f.eks. rå mælkeprodukter eller ved brug af miljøprøver med neutraliserende buffer anvendes 10 µl).



5. Gentag trin 4.4 til 4.6, indtil hver enkelt prøve er blevet tilføjet til et tilsvarende Neogen LS-reagensglas i strimlen.
6. Når alle prøver er blevet overført, skal der overføres 20 µl of NC (sterilt opformeringsmedie, f.eks. Demi Fraser Bouillon) til et Neogen LS-reagensglas. Brug ikke vand som en NC.

7. Kontroller, at Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg har en temperatur på $100 \pm 1^\circ\text{C}$.
8. Anbring den utildækkede holder med Neogen Lysinbehandlingsreagensglas i Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg, og opvarm i 15 ± 1 minutter. I løbet af opvarmningen vil Neogen Lysinopløsningen skifte farve fra lyserød (kølig) til gul (varm).
 - 8.1 Prøver, som ikke er blevet korrekt varmebehandlet under analysens lysinbehandlingstrin, kan udgøre en væsentlig miljørisiko og bør IKKE sættes ind i Neogen Molekylær Detektions Instrument.
9. Fjern den utildækkede holder med Neogen Lysinbehandlingsreagensglas fra varmeblokken, og lad den køle i Neogen Molekylær Detektions Køleblok Indlæg i mindst 5 minutter og i højst 10 minutter. Neogen Molekylær Køleblok Indlæg brugt ved stuetemperatur bør stå direkte på laboratoriebordet. Når det er koldt, skifter lysinopløsningen farve tilbage til lyserød.
10. Fjern holderen med Neogen Lysinbehandlingsreagensglas fra Neogen Molekylær Detektions Køleblok Indlæg.

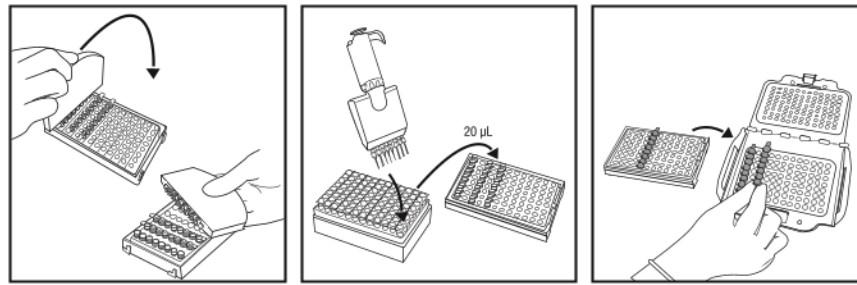


Amplifikation

1. Et Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* -reagensglas er påkrævet til hver prøve og NC.
 - 1.1 Reagensglasstrimler kan skæres til det ønskede antal reagensglas. Vælg antallet af individuelle Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* -reagensglas eller strimler med 8 reagensglas efter behov.
 - 1.2 Placer Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglas i en tom bakke.
 - 1.3 Undgå at forstyrre reagenskuglerne på bunden af reagensglassene.
2. Vælg ét Neogen Reagens Kontrol-reagensglas, og anbring det i holderen.
3. For at undgå krydskontaminering åbnes én Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglasstrimmel ad gangen, og der bruges en ny pipettespids til hvert overførselstrin.
4. Overfør lysat til Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglas og et Neogen Reagens Kontrol-reagensglas som beskrevet nedenfor:

Overfør hver prøvelysat til individuelle Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglas **først**, efterfulgt af NC. Hydrer Neogen Reagens Kontrol-reagensglasset **sidst**.

5. Brug Neogen® Molekylær Detektions Værktøj til Cap/Decap (lukning/åbning) - Reagens til at åbne Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglas - én reagensglasstrimmel ad gangen. Bortskaf hættten.
 - 5.1 **Overfør 20 µl prøvelysat fra den øverste halvdel af væsken (undgå præcipitat) i Neogen lysinbehandlingsreagens-glasset til et tilsvarende Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglas. Doser med en skrå hældning for at undgå at forstyrre kuglerne. Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned 5 gange.**
 - 5.2 Gentag trin 5.1, til individuelt prøvelysat er blevet tilføjet til et tilsvarende Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglas i strimlen.
 - 5.3 Dæk Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglassene med de medfølgende ekstra hætter, og brug den runde side af Neogen Molekylær Detektions Værktøj til Cap/Decap (lukning/åbning) - Reagens til at påføre tryk i en frem- og tilbagegående retning, og sørg for, at låget sidder fast.
 - 5.4 Gentag trin 5.1 til 5.3 efter behov for det antal prøver, der skal testes.
 - 5.5 Når alle prøvelysater er blevet overført, gentages trin 5.1 for at overføre 20 µl NC-lysat til et Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglas.
 - 5.6 **Overfør 20 µl NC-lysat til et Neogen Reagens Kontrol-reagensglas.** Doser med en skrå hældning for at undgå at forstyrre kuglerne. Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned 5 gange.
6. Sæt reagensglassene med låg påsat i en ren og dekontamineret Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning. Luk og lås låget til Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning.



7. Gennemgå og bekræft den konfigurerede kørsel i softwaren Neogen Molekylær Detektions System.
8. Klik på startknappen i softwaren, og vælg det instrument, du vil bruge. Det valgte instruments låg åbnes automatisk.
9. Anbring Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning i Neogen Molekylær Detektions Instrument, og luk låget for at påbegynde analysen. Resultaterne fremkommer inden for 75 minutter, skønt positive resultater kan fremkomme hurtigere.
10. Når analysen er færdig, fjernes Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning fra Neogen Molekylær Detektions Instrument, reagensglassene bortskaffes ved at lade dem ligge i blød i en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsklorinopløsning eller en tilsvarende opløsning i 1 time og på god afstand af analyseklargørelsesområdet.

BEMÆRK: For at minimere risikoen for falsk-positiver pga. krydskontaminering må reagensglas, der indeholder forstærket DNA, aldrig åbnes. Dette omfatter Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglas samt Neogen Reagens Kontrol- og Matrix Kontrol-reagensglas. De forseglede reagensglas skal altid bortskaffes ved at iblødlægge dem i en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsklorinopløsning eller en tilsvarende opløsning i 1 time og på god afstand af analyseklargørelsesområdet.

Resultater og aflæsning






En algoritme fortolker lyseffektkurven, der er et resultat af detektion af nukleinsyreampifikation. Resultaterne bliver automatisk analyseret af softwaren og bliver farvekodet baseret på resultatet. Et positivt eller negativt resultat bliver fastslået ved at analysere et antal unikke kurveparametre. Formodede positive resultater bliver rapporteret i realtid, mens negative resultater og inspektionsresultater bliver vist, efter kørslen er gennemført.

Formodede positive prøver skal bekræftes ifølge sikkerhedspraksis for et standardlaboratorium eller ved at følge den relevante referencemetodebekræftelse^(1, 2, 3), der begynder med overførsel fra den primære opformeringsbouillon til den sekundære opformeringsbouillon (hvis relevant) efterfulgt af udpladning og bekræftelse af isolater ved hjælp af passende biokemiske og serologiske metoder.

BEMÆRK: Selv en negativ prøve vil ikke give en nulaflysning, idet systemet og Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* amplifikationsreagenser har en "baggrundsmæssig" relativ lysenhed (RLU)-læsning.

I sjældne tilfælde af en usædvanlig lyseffekt vil algoritmemærkerne kategorisere dette som Inspektion. Neogen anbefaler brugeren at gentage analysen for alle inspektionsprøver. Hvis resultatet fortsat markeres til Inspektion, skal du fortsætte til bekræftelsestest ved brug af din foretrukne metode eller som specificeret i lokale forskrifter.

Table 5: Resultatsymboler for prøver og aflæsning, der vises af Neogen Molekylær Detektions System-softwaren.

Brøndtype	Symbol for brøndresultat	Resultat	Aflæsning
Prøve		Positiv	Prøven er formodet positiv for målpatogenet.
Prøve		Negativ	Prøven er negativ for målpatogenet.
Prøve		Hæmmet	Prøvematrixen var hæmmende for analysen. En ny test kan være nødvendig. Se afsnittet om fejlfinding og produktvejledningen til analysesættet for at få flere oplysninger.
Prøve		Inspicer	Forekomst eller fravær af patogenet kunne ikke fastslås. En ny test kan være nødvendig. Se afsnittet om fejlfinding og produktvejledningen til analysesættet for at få flere oplysninger.
Prøve		Fejl	Der blev ikke registreret bioluminescens. En ny test kan være nødvendig. Se afsnittet om fejlfinding og produktvejledningen til analysesættet for at få flere oplysninger.

Bekræftelse af resultater ifølge NF VALIDATION-certificeret metode

Mulighed 1: Brug af ISO 11290⁽³⁾-standarden fra opformeringen med Demi Fraser Bouillon.

Mulighed 2: Ved isolering på PALCAM-agar eller (O&A) på kromogen agar, som udgør en del af den NF VALIDATION-certificerede metode til detektion af *Listeria monocytogenes*. Forekomsten af karakteristiske kolonier er tilstrækkelig til at bekræfte forekomst af *Listeria monocytogenes*.

Mulighed 3: Brug af nukleinsyreprober som beskrevet i EN ISO 7218⁽⁵⁾-standarden udført på isolerede kolonier fra selektiv agar (se mulighed 1 eller 2).

Mulighed 4: Brug af en anden NF VALIDATION-certificeret metode med et andet princip end Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*. Den komplette protokol, der er beskrevet for denne anden validerede metode, skal anvendes. Alle trin før bekræftelsen startes skal være fælles for begge metoder.

I tilfælde af uoverensstemmende resultater (formodede positive med den alternative metode, som ikke er bekræftet med en af metoderne beskrevet ovenfor), skal laboratoriet anvende den nødvendige procedure for at sikre valideringen af det opnåede resultat.

I tilfælde af uoverensstemmende resultater (formodede positive med Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*, som ikke er bekræftet med en af metoderne beskrevet ovenfor), skal laboratoriet anvende den nødvendige procedure for at sikre valideringen af de opnåede resultater.

Hvis du har spørgsmål til specifikke anvendelser eller procedurer, bedes du besøge vores websted på www.neogen.com eller kontakte din lokale Neogen-repræsentant eller -distributør.

Bilag A. Protokolafbrydelse: Opbevaring og gentestning af varmebehandlede lysater.

1. Til opbevaring af varmebehandlet lysat påsættes en ren hætte på lysisreagensglasset (se afsnit 4.5 "Lysinbehandling").
2. Opbevar ved 4-8°C i op til 72 timer.
3. Forbered en opbevaret prøve til amplifikation ved at vende den på hovedet 2-3 gange for at blande.
4. Tag lågene af reagensglassene.
5. Placer de blandede lysatreagensglas på Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg, og varm op til 100 ± 1°C i 5 ± 1 minutter.
6. Fjern holderen med Neogen Lysinbehandlingsreagensglas fra varmeblokken, og lad den køle i Neogen Molekylær Detektions Køleblok Indlæg i mindst 5 minutter og i højst 10 minutter.
7. Fortsæt protokollen i afsnittet "Amplifikation" som angivet ovenfor.

Litteraturhenvisninger:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Beskrivelser af symboler til produktmærkning

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.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.
FS00867B

Produktveiledning

Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*

Produktbeskrivelse og tiltenkt bruk

Neogen® Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* brukes sammen med Neogen® System for molekylær deteksjon for rask og spesifikk deteksjon av *Listeria monocytogenes* i oppformerte mat- og miljøprøver. Neogen Molekylære deteksjonstester bruker sløyfe-mediert isotermisk amplifikasjon for hurtig amplifikasjon av nukleinsyreskvenser med høy spesifisitet og sensitivitet, kombinert med bioluminescens for å registrere amplifikasjonen. Antatte positive testresultater rapporteres i sanntid, mens negative resultater vises etter at testen er fullført. Antatte positive resultater skal bekreftes ved hjelp av din foretrukne metode eller som spesifisert av lokale forskrifter^(1, 2, 3).

Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* er ment for bruk i et laboratoriemiljø av fagpersoner med opplæring i laboratorieteknikker. Neogen har ikke godkjent dette produktet for bruk i andre industrier enn mat og drikke. Neogen har for eksempel ikke godkjent dette produktet for testing av vann, farmasøytiske, kosmetiske og kliniske prøver eller veterinærprøver. Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* er ikke evaluert med alle mulige testprotokoller eller med alle mulige bakteriestammer.

Som for alle testmetoder kan kilden, formuleringen og kvaliteten til anrikningsmediet påvirke resultatene. Faktorer som prøveinnsamlingsmetoder, testprotokoller, prøveforberedelse, håndtering og laboratorieteknikk kan også påvirke resultatet. Neogen anbefaler å evaluere metoden, inkludert anrikningsmediet, i brukerens miljø ved bruk av et tilstrekkelig antall prøver ved spesielle matutfordringer og mikrobielle utfordringer for å sikre at metoden oppfyller brukerens kriterier.

Neogen har evaluert Neogen molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* med Fraser 1/2 buljong som inneholder jernammoniumsitratt, og Fraser buljong som inneholder jernammoniumsitratt etter behov. En typisk formel for dette mediet følger nedenfor.

Typisk formel for Fraser 1/2 buljong base	(g/L)	Typisk formel for Fraser buljong base	(g/L)
Natriumklorid	20 g	Natriumklorid	20 g
Natriumfosfat, dibasisk, vannfritt*	9,6 g	Natriumfosfat, dibasisk, vannfritt*	9,6 g
Storfekjøtt ekstrakt	5,0 g	Storfekjøtt ekstrakt	5,0 g
Pankreatisk sammendrag av kasein	5,0 g	Pankreatisk sammendrag av kasein	5,0 g
Peptisk sammendrag av dyrevev	5,0 g	Peptisk sammendrag av dyrevev	5,0 g
Gjærekstrakt	5,0 g	Gjærekstrakt	5,0 g
Litiumklorid	3,0 g	Litiumklorid	3,0 g
Kaliumfosfat, monobasisk	1,35 g	Kaliumfosfat, monobasisk	1,35 g
Eskulin	1,0 g	Eskulin	1,0 g
Akriflavin HCl	0,0125 g	Akriflavin HCl	0,025 g
Nalidixinsyre	0,01 g	Nalidixinsyre	0,02 g

* Erstatning: Natriumfosfat, dibasisk, dihydrat 12,0 g

Fraser buljong-supplement

(Ingredienser per 10 mL flaske. En flaske tilsettes en liter basalt medium.)

Jernammoniumsitratt 0,5 g/10 mL

Endelig pH 7,2 ± 0,2 ved 25 °C

Neogen® Instrument for molekylær deteksjon er ment for bruk med prøver som har gjennomgått varmebehandling i testens lyseringstrinn, som er konstruert for å ødelegge organismer som finnes i prøven. Prøver som ikke har blitt ordentlig varmebehandlet under testlyseringstrinnet, kan vurderes som en potensiell biologisk fare og skal IKKE settes inn i Neogen Instrument for molekylær deteksjon.

Neogen Food Safety er ISO (International Organization for Standardization) 9001-sertifisert for utforming og produksjon.

Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* inneholder 96 tester, beskrevet i tabell 1.

Tabell 1. Komponenter i Neogen Molekylær deteksjonskit

Artikkel	Beskrivelse	Mengde	Innhold	Kommentarer
Neogen® Lyseringsoppløsning (LS)	Rosa oppløsning i gjennomsiktige rør	96 (12 rekker med 8 rør)	580 µL LS per rør	Plassert i stativ og klar til bruk
Reagensrør for Neogen® Molekylær deteksjonstest 2 for <i>Listeria monocytogenes</i>	Gule rør	96 (12 rekker med 8 rør)	Lyofilisert spesifikk amplifikasjon og deteksjonsblanding	Klar til bruk
Ekstra lokk	Gule lokk	96 (12 rekker med 8 lokk hver)		Klar til bruk
Neogen® Reagenskontroll (RC)	Gjennomsiktige rør med vippelekk	16 (2 poser med 8 individuelle rør hver)	Lyofilisert kontroll-DNA, amplifikasjon og deteksjonsblanding	Klar til bruk

Den negative kontrollen, som ikke medfølger i kittet, er et sterilt anrikningsmedium, for eksempel Fraser 1/2 buljong. Ikke bruk vann som negativ kontroll.

Sikkerhet

Brukeren må lese, forstå og følge all sikkerhetsinformasjon i instruksjonene for Neogen System for molekylær deteksjon og Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*. Behold sikkerhetsveiledningen for fremtidig referanse.

⚠ ADVARSEL: Indikerer en farlig situasjon som, om den ikke unngås, kan resultere i død eller alvorlig personskade og/eller materielle skader.

MERKNAD: Indikerer en potensielt farlig situasjon som, om den ikke unngås, kan føre til materielle skader.

⚠ ADVARSEL

Ikke bruk Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* i diagnostisering av tilstander hos mennesker eller dyr.

Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*-metoden kan generere *Listeria monocytogenes* til nivåer som er tilstrekkelig til å forårsake dødfødsler og dødsfall hos gravide kvinner, og de som har dårlig immunforsvar, hvis de eksponeres.

Brukeren må gi opplæring i korrekte testteknikker til sitt personell: for eksempel Good Laboratory Practices, ISO/IEC 17025⁽⁴⁾ eller ISO 7218⁽⁵⁾.

For å redusere risikoene forbundet med et falskt negativt resultat som kan føre til utslipp av kontaminert produkt:

- Følg protokollen og utfør testene akkurat slik de beskrives i produktveiledning.
- Oppbevar Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* slik som beskrevet på pakning og i produktveiledning.
- Bruk alltid Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* før utløpsdatoen.
- Bruk Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* for mat- og miljøprøver som er godkjent internt eller av en tredjepart.
- Bruk kun Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* til overflater, desinfeksjonsmidler, protokoller og bakteriestammer som har blitt validert internt eller av en tredjepart.
- For en miljøprøve som inneholder nøytraliserende buffer med arylsulfonat-kompleks, skal du utføre en 1:2 fortykning før testing (1 del prøve i 1 del steril anrikningsbuljong). Et annet alternativ er å overføre 10 µL av NB-anrikningen inn i Neogen lyseringsoppløsningsrørene. Prøvetakingsprodukter fra Neogen® som inkluderer nøytraliserende buffer med arylsulfonatkompleks: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G og HS2410NB2G.

For å redusere risikoene forbundet med eksponering for kjemikalier og biologiske farer:

- Det anbefales sterkt at kvinnelig laboratoriepersonell blir informert om risikoen for et foster i utvikling som resultat av infeksjon hos moren gjennom eksponering for *Listeria monocytogenes*.
- Utfør patogentesting i et laboratorium som er korrekt utstyrt, under oppsyn av fagopplært personell. Inkubert anrikningsmedium og utstyr eller overflater som har vært i kontakt med inkubert anrikningsmedium, kan inneholde patogener på et nivå som kan innebære helsefare for mennesker.
- Følg alltid standard praksis for laboratoriesikkerhet, inkludert bruk av egnet personlig verneutstyr og øyevern ved håndtering av reagensrør og kontaminerte prøver.
- Unngå kontakt med innholdet i anrikningsmediet og reagensrør etter amplifikasjon.
- Kast anrikede prøver i henhold til gjeldende industristandarder.
- Prøver som ikke har blitt ordentlig varmebehandlet under testlyseringstrinnet, kan vurderes som en potensiell biologisk fare og skal IKKE settes inn i Neogen Instrument for molekylær deteksjon.

**For å redusere risikoene forbundet med krysskontaminering ved klargjøring av test:**

- Bruk alltid hansker (for å beskytte brukeren og forhindre innføring av nukleaser).

For å redusere risikoen forbundet med miljøforurensning:

- Følg gjeldende industristandarder for avhending av kontaminert avfall.

For å redusere risiko forbundet med eksponering for varme væsker:

- Ikke overstig den anbefalte temperaturinnstillingen på varmeblokken.
- Ikke overstig den anbefalte oppvarmingstiden.
- Bruk et passende, kalibrert termometer til å kontrollere temperaturen på Neogen® Varmeblokkinnsett for molekylær deteksjon (f.eks. delvis nedsenket termometer eller digitalt termoelement-termometer, ikke et helt nedsenket termometer). Termometeret må plasseres på det angitte stedet på Neogen Varmeblokkinnsett for molekylær deteksjon.

MERKNAD**For å redusere risikoene forbundet med krysskontaminering ved klargjøring av test:**

- Skift hansker før hydrering av reagens-pellet.
- Det anbefales å bruke pipettespisser med sterile, spraybaserte barrierer (filtrerte), av molekylærbiologi-karakter.
- Bruk en ny pipettespiss for hver prøveoverføring.
- Bruk god laboratoriepraksis til å overføre prøven fra anrikningen til lyseringsrøret. For å unngå kontaminering av pipetter kan brukeren velge å legge til et mellomtrinn under overføring. Brukeren kan for eksempel overføre hver anriket prøve til et sterilt rør.
- Dersom tilgjengelig, bør brukeren bruke en arbeidsstasjon for molekylær biologi som har en bakteriedrepende lampe. Utfør periodisk dekontaminering av benker og utstyr (pipetter, verktøy for lukking/åpning, osv.) i laboratoriet med en 1-5 % (volumandel i vann) oppløsning av husholdningsblekemiddel eller oppløsning for fjerning av DNA.

For å redusere risikoene forbundet med falskt positivt resultat:

- Åpne aldri reagensrørene etter amplifikasjon.
- Kast alltid de kontaminerte rørene ved å bløtlegge dem i en 1-5 % (volumandel i vann) oppløsning av eller tilsvarende i 1 time og borte fra testens forberedelsesområde.
- Autoklaver aldri rørene etter amplifikasjon.

Se HMS-databladet for ytterligere informasjon og lokale forskrifter for avhending.

Hvis du har spørsmål om spesifikke bruksområder eller prosedyrer, kan du besøke vårt nettsted på www.neogen.com eller ta kontakt med en lokal Neogen-representant eller -forhandler.

Brukeransvar

Brukere er ansvarlige for å sette seg inn i produktveiledningen og informasjon om produktet. Besøk nettsiden vår, www.neogen.com, eller kontakt din lokale Neogen-representant eller -distributør for mer informasjon.

Ved valg av testmetode er det viktig å ta hensyn til at eksterne faktorer som metoder for stikkprøver, testprotokoller, preparering av prøver, håndtering og laboratorteknikk kan påvirke resultatene.

Ved valg av testmetode er det brukerens ansvar å vurdere et tilstrekkelig antall prøver med passende matriks og mikrobielle utfordringer for å tilfredsstille brukeren om at den valgte prøvemethoden oppfyller brukerens kriterier.

Det er også brukerens ansvar å fastslå at alle prøvemethoder og resultater tilfredsstiller kundens og leverandørens krav.

Som med alle testmetoder utgjør ikke resultatene som oppnås ved bruk av noe Neogen Food Safety-produkt, noen garanti om kvaliteten av matriksene eller prosessene som testes.

For å hjelpe kunder med å evaluere metoden for forskjellige matmatriks, har Neogen utviklet Neogen® Matrisekontrollsett for molekylær deteksjon. Bruk matrikskontroll (MC) ved behov for å avgjøre om matrikset har evne til å påvirke resultatene for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*. Test flere prøver som representerer matrikset, dvs. prøver innhentet fra forskjellige opphav, i løpet av en hvilken som helst valideringsperiode når Neogen-metoden brukes, ved testing av nye eller ukjente matriks, eller matriks som har gjennomgått endringer i råvaremateriale eller prosess.

Et matriks kan defineres som en produkttype med indre egenskaper, slik som sammensetning og prosess.

Forskjeller mellom matriks kan være så enkle som effekter som skyldes forskjeller i prosessering eller presentasjon, for eksempel rå i forhold til pasteurisert, fersk i forhold til tørket osv.

Begrensning av garantier / begrensede rettigheter

MED MINDRE DET ER UTTRYKKELIG SKREVET I EN BEGRENSET GARANTI PÅ EN PRODUKTPAKNING, FRASKRIVER NEOGEN SEG ALLE DIREKTE OG INDIREKTE GARANTIER, INKLUDERT MEN IKKE BEGRENSET TIL, ENHVER GARANTI OM SALGBARHET ELLER ANVENDELSE TIL ET BESTEMT FORMÅL. Hvis noe Neogen Food Safety-produkt er defekt, vil Neogen eller dets autoriserte distributør erstatte eller refundere produktets kjøpesum etter eget skjønn. Dette er dine ubetingede rettigheter. Kontakt Neogen-representanten din eller den autoriserte Neogen-distributøren hvis du har flere spørsmål.

Begrensning av Neogens ansvar

NEOGEN VIL IKKE VÆRE ANSVARLIG FOR NOE TAP ELLER SKADE, DIREKTE ELLER INDIREKTE, SPESIELL, TILFELDIG ELLER FØLGESKADE, INKLUDERT, MEN IKKE BEGRENSET TIL, TAPT FORTJENESTE. Ikke under noen omstendighet skal Neogens ansvar, under noen juridisk teori, overstige kjøpesummen for et produkt som antas å være defekt.

Oppbevaring og avhending

Oppbevar Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* ved 2-8 °C. Må ikke fryses. Hold kitet borte fra lys under oppbevaring. Etter at kitet er åpnet, skal folieposen undersøkes for skader. Må ikke brukes dersom posen er skadet. Etter åpning skal ubrukte reagensrør alltid oppbevares i den gjenlukkbare posen med tørkemiddelet inni, for å opprettholde stabiliteten til de lyofiliserte reagensene. Ikke oppbevar reforseglede poser ved 2-8 °C i mer enn 60 dager.

Ikke bruk Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* etter utløpsdatoen. Utløpsdato og partinummer er angitt på etiketten på utsiden av esken. Etter bruk kan rørene med anrikningsmediet og Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* inneholde potensielt patogen materiale. Når testingen er fullført, følger brukeren gjeldende industristandarder for avhending av kontaminert avfall. Se HMS-databladet for ytterligere informasjon og lokale forskrifter for avhending.

Bruksanvisning

Følg alle instruksjonene nøye. Dersom dette ikke blir gjort, kan det føre til unøyaktige resultater.

Utfør periodisk dekontaminering av benker og utstyr (pipetter, verktøy for lukking/åpning, osv.) i laboratoriet med en 1-5 % (volumandel i vann) oppløsning av husholdningsblekemiddel eller oppløsning for fjerning av DNA.

Brukeren må fullføre opplæringen for operatører av Neogen System for molekylær deteksjon (OQ), som beskrevet i dokumentet «Installasjonskvalifikasjon (IQ) / Driftskvalifikasjon (OQ) Protokoller og instruksjoner for Neogen System for molekylær deteksjon»⁽⁶⁾.

Se avsnittet «Spesifikke veiledninger for validerte metoder» for spesifikke krav:

Tabell 3 over anrikningsprotokoller i henhold til AOAC® *Official Method of Analysis*SM 2016.08 og AOAC® *Performance Tested Method*SM sertifikat #081501.

Tabell 4 for anrikningsprotokoller i henhold til NF Validation-sertifikat 3M 01/15-09/16.

Prøveanrikning

Tabell 2, 3 eller 4 viser veiledning for anrikning for mat- og miljøprøver. Det er brukerens ansvar å validere alternative prøveprotokoller eller fortynningsforhold for å sikre at testmetoden møter brukerens krav.

Mat

1. La anrikningsmediet Fraser 1/2 buljong (inneholder jernammoniumsitratt) stabiliseres til laboratoriets romtemperatur.
2. Kombiner anrikningsmediet og prøven aseptisk i henhold til tabell 2, 3 eller 4. For alt kjøtt og svært oppdelte prøver anbefales det å bruke filterposer.
3. Homogeniser grundig ved å blande, knuse eller blande for hånd i $2 \pm 0,2$ minutter. Inkuber ved 37 ± 1 °C i henhold til tabell 2, 3 eller 4.
4. For rå meieriprodukter (se tabell 2, 3 eller 4), overføres 0,1 mL av den primære anrikningen inn i 10 mL av Fraser buljong. Inkuber ved 37 ± 1 °C i 20-24 timer.

Miljøprøver

Prøvetakingsutstyr kan være en svamp fuktet med en nøytraliserende løsning for å motvirke effektene av desinfeksjonsmidlene. Neogen anbefaler å bruke en giftfri cellulosesvamp. Nøytraliseringsløsningen kan være Dey-Engley (D/E) nøytraliserende buljong eller letheen-buljong. Det anbefales å desinfisere området etter prøvetakingen.

ADVARSEL: Hvis man velger å bruke nøytraliserende buffer (NB) som inneholder arylsulfonatkompleks, må man blande ut den berikete miljøprøven i forholdet 1:2 (1 part prøve til 1 del steril anrikningsbuljong) før testing, for å kunne redusere risikoer forbundet med falskt negativt resultat som fører til at det kontaminerte produktet slippes ut. Et annet alternativ er å overføre 10 µL av den nøytraliserende buffer-anrikningen inn i Neogen lyseringsoppløsningsrørene.

Den anbefalte størrelsen på prøvetakingsområdet for å kontrollere nærværet eller fraværet av patogenet på overflaten, er minst 100 cm² (10 cm x 10 cm or 4" x 4"). Ved prøvetaking med en svamp må hele området dekkes, ved bevegelse i to retninger (fra venstre mot høyre og deretter ovenfra og ned) eller ved innsamling av miljøprøver i samsvar med gjeldende prøvetakingsprotokoll eller i henhold til retningslinjene fra FDA BAM⁽¹⁾, USDA FSIS MLG⁽²⁾ eller ISO 18593⁽⁷⁾.

1. La anrikningsmediet Fraser 1/2 buljong (inneholder jernammoniumsitratt) stabiliseres til laboratoriets romtemperatur.
2. Kombiner anrikningsmediet og prøven aseptisk i henhold til tabell 2, 3 eller 4.
3. Homogeniser grundig ved å blande, knuse eller blande for hånd i $2 \pm 0,2$ minutter. Inkuber ved 37 ± 1 °C i 24-30 timer i henhold til tabell 2, 3 eller 4.

Tabell 2: Generelle anrikningsprotokoller ved 37 ± 1 °C ved bruk av Fraser 1/2 buljong og Fraser buljong etter behov.

Prøvematriks	Prøvestørrelse	Anrikningsbuljong volum (mL)	Anrikningstid (timer)				
Varmebehandlet, tilberedt, røkt kjøtt, fjærfe, skalldyr og fisk Varmebehandlede / pasteuriserte meieriprodukter Jordbruksprodukter og grønnsaker Matvarer med flere komponenter	25 g	225	24-30				
Miljøprøver ^(a)	1 svamp	100 eller 225	24-30				
	1 svaber	10	24-30				
Rått kjøtt, fjærfe, skalldyr, fisk	25 g	475	28-32				
Prøvematriks	Primær anrikning (Fraser 1/2 buljong) ^(a)			Sekundær anrikning (Fraser buljong) ^(a)			Prøveanalysevolum ^(b)
	Prøvestørrelse	Anrikningsbuljong volum (mL)	Anrikningstid (timer)	Prøvestørrelse	Anrikningstemperatur (°C)	Anrikningstid (timer)	
Rå meieriprodukter	25 g	225	20-24	Overfør 0,1 mL i 10 mL Fraser buljong	37 ± 1	20-24	10 µL

(a) Fraser 1/2 buljong og Fraser buljong må alltid suppleres med Fraser-buljongsupplement (jernammoniumsitratt) under primær eller sekundær anrikning.

(b) Volum av prøve overført til Neogen lyseringsoppløsningsrørene. Se trinn 4.6 i lyseringsdel.

Spesifikke veiledninger for validerte metoder
AOAC® Official Method of AnalysisSM 2016.08
AOAC® Performance Tested MethodSM #081501



I AOAC Research Institute OMASM- og PTMSM-programmene ble Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* funnet å være en effektiv metode for å påvise *Listeria monocytogenes*. Matriksene som ble testet i studien, er vist i tabell 3.

Tabell 3. Anrikningsprotokoller som brukte Fraser 1/2 buljong^(a) ved 37 ± 1 °C i henhold til AOAC OMASM 2016.08 og PTMSM-sertifikatet #081501.

Prøvematriks		Prøvestørrelse	Anrikningsbuljong volum (mL)	Anrikningstid (timer)
Grillpølse av storfekjøtt, queso fresco, vaniljekrem, 4 % cottage cheese med melkefett, 3 % sjokolademelk av helmelk, romanosalat, rå spinat i pose, kaldrøkt laks		25 g	225	24-30
Rå kylling		25 g	475	28-32
Delikatessekalkun		125 g	1125	24-30
Kantalupp ^(b)		Hel melon	Nok volum til at melonen flyter	26-30
Miljøprøver:	Rustfritt stål	1 svamp	225	24-30
	Forseglet betong	1 svamp	100	24-30
	Plast ^(c)	1 svaber	10	24-30

Alle prøvene til AOAC-validering ble homogenisert ved knusing hvis ikke annet er oppgitt.

- Fraser 1/2 buljong og Fraser buljong må alltid suppleres med Fraser- buljongsupplement (jernammoniumsitratt) under primær eller sekundær anrikning.
- Homogeniser prøven ved blanding for hånd.
- Homogeniser prøven ved virvelbevegelse.

NF VALIDATION av AFNOR Certification



3M 01/15-09/16

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

For mer informasjon om utløp av validitet, henvises det til NF VALIDATION-sertifikat tilgjengelig på nettstedet nevnt over.

NF VALIDATION sertifisert metode i samsvar med ISO 16140-2⁽⁶⁾ sammenlignet med ISO 11290⁽³⁾

Omfang av godkjenningen: Alle prøver av human mat og alle miljøprøver (unntatt prøver fra primær produksjon)

Prøvepreparering: Prøver skal klargjøres i henhold til EN ISO 11290-1⁽³⁾ og EN ISO 6887⁽⁸⁾

Programvareversjon: Se sertifikat

Tabell 4: Anrikningsprotokoller i henhold til NF VALIDATION sertifisert metode 3M 01/15-09/16 ved 37 ± 1 °C ved bruk av Fraser 1/2 buljong og Fraser buljong ved behov.

Generell protokoll	Prøvestørrelse	Anrikningsbuljong volum (mL)	Anrikningstemperatur (±1 °C)	Anrikningstid (timer)	Prøveanalysevolum ^(a)	Akseptert avbrytelsepunkt
Alle prøver av human mat (unntatt rått kjøtt, rå skalldyr og rå meieriprodukter)	25 g	225	37	24-30	20 µL	<ul style="list-style-type: none"> • Fraser 1/2 buljong inntil 72 timer • Lysat ved -20 °C • Lysat ved 4 °C inntil 72 timer
Miljøprøver	25 g, 1 svaber, eller 1 klut					

Spesifikk protokoll	Primær anrikning (Fraser 1/2 buljong) ^(b)				Sekundær anrikning (Fraser buljong) ^(b)				Akseptert avbrytelsespunkt
	Prøvestørrelse	Anrikningsbuljong volum (mL)	Anrikningstemperatur (±1 °C)	Anrikningstid (timer)	Prøvestørrelse	Anrikningstemperatur (±1 °C)	Anrikningstid (timer)	Volum prøveanalyse ^(c)	
Rått kjøtt, rå skall- dyr og rå meieriprodukter	25 g	225	37	20-24	Overfør 0,1 mL i 10 mL Fraser buljong	37	20-24	10 µL	<ul style="list-style-type: none"> • Fraser buljong inntil 72 timer • Lysat ved -20 °C • Lysat ved 4 °C inntil 72 timer

(a) Volum av prøve overført til Neogen lyseringsoppløsningsrørene. Se trinn 4.6 i lyseringsdel.

(b) Fraser 1/2 og Fraser buljong må alltid suppleres med Fraser buljongsupplement (jernammoniumsitratt) under primær eller sekundær anrikning.

(c) Volum av prøve overført til Neogen lyseringsoppløsningsrørene. Se trinn 4.6 i lyseringsdel.

MERK: Prøver som er større enn 25 g er ikke blitt testet i NF validation-studien.

Klargjøring av Neogen® Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon

1. Væt en klut med 1-5 % (volumandel i vann) husholdningsblekemiddel eller tilsvarende oppløsning, og tørk av Neogen® Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon.
2. Skyll Neogen Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon med vann.
3. Bruk en engangsklut til å tørke Neogen Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon.
4. Sørg for at Neogen Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon er tørt før bruk.

Klargjøring av Neogen® Kjøleblokkinnsett for molekylær deteksjon

Plasser Neogen® Kjøleblokkinnsett for molekylær deteksjon rett på laboratoriebenken; bruk kjøleblokken ved laboratoriets romtemperatur (20-25 °C).

Klargjøring av Neogen® Varmeblokkinnsett for molekylær deteksjon

Plasser Neogen® Varmeblokkinnsett for molekylær deteksjon i en tørr, dobbelblokkvarmeenhet. Slå på den tørre blokkvarmeenheten og still inn temperaturen slik at Neogen Varmeblokkinnsett for molekylær deteksjon når og opprettholder en temperatur på 100 ± 1 °C.

MERK: Avhengig av varmeenheten, skal Neogen Varmeblokkinnsett for molekylær deteksjon bruke omtrent 30 minutter på å nå temperaturen. Bruk et passende, kalibrert termometer (f.eks. et delvis nedsenket termometer eller et digitalt termoelement-termometer, ikke et helt nedsenket termometer) plassert på angitt sted og kontroller at Neogen Varmeblokkinnsett for molekylær deteksjon er ved 100 ± 1 °C.

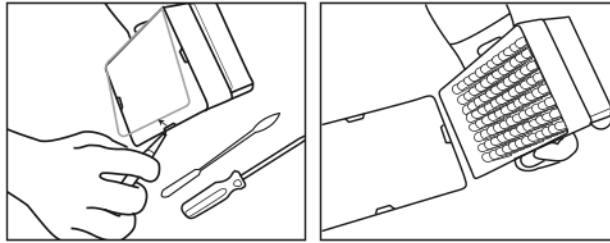
Klargjøring av Neogen® Instrument for molekylær deteksjon

1. Start programvaren for Neogen® System for molekylær deteksjon og logg inn. Kontakt Neogen Food Safety-representanten for å få bekreftet at du har den nyeste versjonen av programvaren.
2. Slå på Neogen Instrument for molekylær deteksjon.
3. Opprett eller endre en gjennomkjøring med data for hver prøve. Se brukermanualen for Neogen System for molekylær deteksjon for mer informasjon.

MERK: Neogen Instrument for molekylær deteksjon må nå klar tilstand før innsetting av Neogen Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon med reagensrør. Dette varmetrinnet tar omtrent 20 minutter og indikeres av et ORANSJE lys på instrumentets statuslinje. Når instrumentet er klart for å starte en gjennomkjøring, vil statuslinjen lyse GRØNT.

Lysering

Fjern bunnen av stativet med Neogen lyseringsoppløsningsrør med en skrutrekker eller spatel før du plasserer den i Neogen Varmeblokkinnsett for molekylær deteksjon.



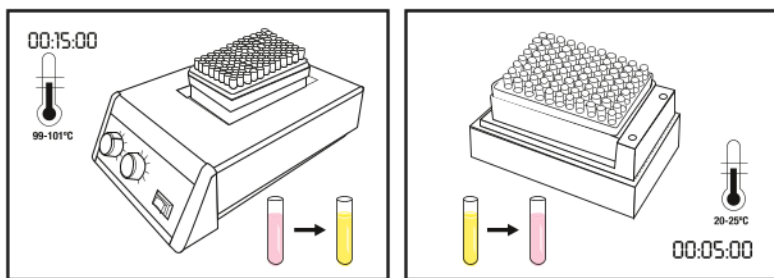
1. La lyseringsoppløsningsrørene (Neogen lyseringsoppløsning) varmes opp ved å sette stativet i romtemperatur (20-25 °C) over natten (16-18 timer). Alternativer til å stabilisere Neogen lyseringsoppløsningsrørene til romtemperatur er å sette Neogen lyseringsoppløsningsrørene på laboratoriebenken i minst 2 timer, inkubere Neogen lyseringsoppløsningsrørene i en inkubator ved 37 ± 1 °C i 1 time, eller plassere dem i en tørr dobbelblokkvarmeeinheit i 30 sekunder ved 100 °C.
2. Vend rørene med hetten på for å blande. Fortsett til neste trinn innen 4 timer.
3. Fjern anrikningsbuljongen fra inkubatoren.
4. Ett Neogen lyseringsoppløsningsrør kreves for hver prøve og Negativ kontroll (NC)-prøve (sterilt anrikningsmedium).
 - 4.1 Rekker med Neogen lyseringsoppløsningsrør kan klippes til ønsket antall Neogen lyseringsoppløsningsrør. Velg nødvendig antall enkeltstående Neogen lyseringsoppløsningsrør eller rekker med 8 rør. Plasser Neogen lyseringsoppløsningsrørene i et tomt stativ.
 - 4.2 For å unngå krysskontaminering skal kun én rekke med Neogen lyseringsoppløsningsrør åpnes om gangen og en ny pipettespiss brukes for hvert overføringstrinn.
 - 4.3 Overfør anrikede prøver til Neogen lyseringsoppløsningsrørene som beskrevet under:

Overfør hver anriket prøve til enkeltstående Neogen lyseringsoppløsningsrør **først**. Overfør NC-prøven til **sist**.

- 4.4 Bruk Neogen® Verktøy for lukking/åpning av lyseringsrør for molekylær deteksjon for å åpne én rekke med Neogen lyseringsoppløsningsrør – én rekke om gangen.
- 4.5 Kast lokket på Neogen lyseringsoppløsningsrøret - dersom lysatet skal oppbevares for ny test, plasseres lokkene i en ren beholder for å sette dem på igjen etter lysing.
 - 4.5.1 Se vedlegg A for prosessering av tilbakeholdt lysat.
- 4.6 Overfør 20 µL av prøven inn i et Neogen lyseringsoppløsningsrør hvis ikke annet er oppgitt i protokollene fra tabell 2, 3 eller 4 (bruk f.eks. 10 µL for rå meieriprodukter eller ved bruk av miljøprøver med nøytraliserende buffer).



5. Gjenta trinn 4.4 til 4.6 til alle individuelle prøver er lagt til et korresponderende Neogen lyseringsoppløsningsrør i rekken.
6. Når alle prøvene er overført, overføres **20 µL av NC** (sterilt anrikningsmedium, f.eks. Fraser 1/2 buljong) i et Neogen lyseringsoppløsningsrør. Ikke bruk vann som NC.
7. Verifiser at Neogen Varmebløkkinnsetts for molekylær deteksjon har en temperatur på 100 ± 1 °C.
8. Plasser det utildekkede stativet med Neogen lyseringsoppløsningsrør i Neogen Varmebløkkinnsetts for molekylær deteksjon og varm opp i 15 ± 1 minutter. Under oppvarmingen vil Neogen lyseringsoppløsningen endre farge fra rosa (kald) til gul (varm).
 - 8.1 Prøver som ikke har blitt tilstrekkelig varmebehandlet under testlysingstrinnet, kan vurderes som en potensiell biologisk fare og skal IKKE settes inn i Neogen Instrument for molekylær deteksjon.
9. Fjern det utildekkede stativet med Neogen lyseringsoppløsningsrør fra varmeblokken og la det avkjøles i Neogen Kjøleblokkinnsetts for molekylær deteksjon i minst 5 minutter og maksimum 10 minutter. Når Neogen Molekylær kjøleblokkinnsetts brukes ved romtemperatur, skal det plasseres direkte på laboratoriebenken. Når den er avkjølt, vil lyseringsoppløsningen endre farge tilbake til rosa.
10. Fjern stativet med Neogen lyseringsoppløsningsrør fra Neogen Kjøleblokkinnsetts for molekylær deteksjon.

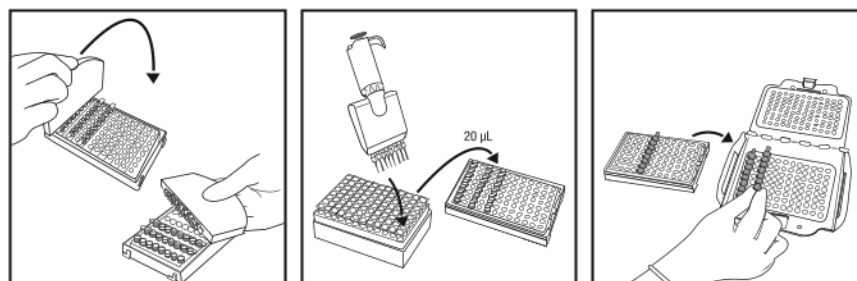


Amplifikasjon

1. Det kreves ett reagensrør for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* for hver prøve og for NC.
 - 1.1 Rekker med rør kan klippes til ønsket antall rør. Velg det nødvendige antallet enkeltstående reagensrør eller rekker med 8 rør for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*.
 - 1.2 Plasser reagensrørene for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* i et tomt stativ.
 - 1.3 Unngå å forstyrre reagenspelletene i bunnen av rørene.
2. Velg 1 Neogen Reagenskontroll-rør og plasser det i stativet.
3. For å unngå krysskontaminering, ta av lokket på én rørrække for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* om gangen, og bruk ny pipette ved hver prøveoverføring.
4. Overfør lysat til reagensrør og Neogen reagenskontroll-rør for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* som beskrevet nedenfor:

Overfør hvert prøvelysat til individuelle Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* -reagensrør **først** etterfulgt av NC. Hydrer Neogen Reagenskontroll-røret til **sist**.

5. Bruk Neogen® Verktøy for lukking/åpning av reagensrør for molekylær deteksjon for å åpne én rekke med reagensrør for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* - én rørrække om gangen. Kast lokket.
 - 5.1 **Overfør 20 µL av prøvelysatet fra den øverste halvdelen av væsken (unngå presipitat) i Neogen lyseringsoppløsningsrøret inn i det korresponderende reagensrøret for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*. Hold i vinkel under overføring for å unngå å forstyrre pelletene. Bland ved å bevege pipetten forsiktig opp og ned 5 ganger.**
 - 5.2 Gjenta trinn 5.1 til individuelt prøvelysat har blitt lagt til i et korresponderende reagensrør for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* i rekken.
 - 5.3 Dekk til reagensrørene for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* med de medfølgende ekstra lokkene, og bruk den avrundede siden av Neogen Verktøy for lukking/åpning av reagensrør for molekylær deteksjon til å presse i en fram-og-tilbake-bevegelse slik at lokket festes godt.
 - 5.4 Gjenta trinn 5.1 til 5.3 som nødvendig, for antall prøver som skal testes.
 - 5.5 Når alt prøvelysatet er overført, gjentas trinn 5.1 for å overføre 20 µL med NC-lysat inn i et reagensrør for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*.
 - 5.6 Overfør **20 µL NC-lysat** inn i et **Neogen Reagenskontroll-rør**. Hold i vinkel under overføring for å unngå å forstyrre pelletene. Bland ved å bevege pipetten forsiktig opp og ned 5 ganger.
6. Sett lukkede rør over i et rent og dekontaminert Neogen Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon. Lukk og lås lokket til Neogen Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon.



7. Se igjennom og bekreft den konfigurerte gjennomkjøringen i programvaren for Neogen System for molekylær deteksjon.
8. Klikk på startknappen i programvaren og velg instrumentet som skal brukes. Det valgte instrumentets lokk åpnes automatisk.

9. Plasser Neogen Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon inn i Neogen Instrument for molekylær deteksjon og lukk lokket for å starte testen. Resultatene er klare innen 75 minutter, mens positive resultat kan bli oppdaget raskere.
10. Etter at testen er fullført, fjern Neogen Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon fra Neogen Instrument for molekylær deteksjon og kvitt deg med rørene ved å senke dem i en 1-5 % (volumandel i vann) husholdningsblekemiddel eller tilsvarende oppløsning i 1 time og borte fra testens forberedelsesområde.

MERKNAD: For å minimere risikoen for falske positive resultater på grunn av krysskontaminering skal aldri reagensrør som inneholder amplifisert DNA, åpnes. Dette inkluderer Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* reagensrør, Neogen Reagenskontroll-rør og matrikskontrollrør. Kast alltid de forseglede reagensrørene ved å bløtlegge dem i en 1-5 % (volumandel i vann) oppløsning av husholdningsblekemiddel eller tilsvarende oppløsning i 1 time og borte fra testens forberedelsesområde.

Resultater og tolkning






En algoritme tolker lyseffektskurven som er resultatet av deteksjonen av nukleinsyre-amplifikasjon. Resultatene analyseres automatisk av programvaren og er fargekodet basert på resultatet. Et positivt eller negativt resultat fastslås av analysen av flere unike kurveparametere. Antatt positive resultater rapporteres i sann tid, mens negative og «Inspect» (inspiser)-resultater vil vises etter at gjennomkjøringen er fullført.

Antatte positive prøver må bekreftes i henhold til laboratoriets standard operasjonsprosedyrer eller ved å følge den aktuelle referansemetoden for bekreftelse^(1,2,3), som begynner med overføring fra den primære anriknings- til sekundær anrikningsbuljong (hvis relevant), etterfulgt av påfølgende inkulering og bekreftelse av isolater ved hjelp av egnede biokjemiske og serologiske metoder.

MERK: Ikke engang en negativ prøve vil gi et null-resultat ettersom systemet og amplifikasjonsreagensene til Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* har en «bakgrunns»-, relativ lysenhet (RLU).

I et sjeldent tilfelle av eventuelle uvanlige lyseffekter, merker algoritmen dette som «Inspect». Neogen anbefaler brukeren å gjenta testen for alle «Inspect»-prøver. Dersom resultatet fortsatt er «Inspect», fortsett til bekreftelsestesten og bruk din foretrukne metode eller som oppgitt av lokale forskrifter.

Tabell 5: Resultatsymboler for prøver og tolkning som angitt av programvaren for Neogen System for molekylær deteksjon.

Brønntypee	Symbol for brønnresultat	Resultat	Tolkning
Prøve		Positiv	Prøven er antatt positiv for målpatogenet.
Prøve		Negativ	Prøven er antatt negativ for målpatogenet.
Prøve		Hemmet	Prøvematriksen var hemmet til testen. Det kan bli nødvendig med en ny test. Se feilsøkingsdelen og produktveiledningen for analysesettet for mer informasjon.
Prøve		Inspiser	Nærvær eller fravær av målpatogenet var ubestemmelig. Det kan bli nødvendig med en ny test. Se feilsøkingsdelen og produktveiledningen for analysesettet for mer informasjon.
Prøve		Feil	Ingen bioluminescens ble detektert. Det kan bli nødvendig med en ny test. Se feilsøkingsdelen og produktveiledningen for analysesettet for mer informasjon.

Bekreftelse av resultatene i henhold til sertifiseringsmetoden NF VALIDATION

Alternativ 1: Bruke ISO 11290⁽³⁾-standarden som starter fra Fraser 1/2 anrikningen.

Alternativ 2: Ved isolasjon på PALCAM agar (O&A) eller på kromogent agar, som inngår i en NF VALIDATION-sertifisert metode for deteksjon av *Listeria monocytogenes*. Nærværet av karakteristiske kolonier er tilstrekkelig til å bekrefte nærværet av *Listeria monocytogenes*.

Alternativ 3: Bruk av nukleinsyre-prober som beskrevet i EN ISO 7218⁽⁵⁾-standarden, utført på isolerte kolonier fra selektivt agar (se alternativ 1 eller 2).

Alternativ 4: Ved bruk av enhver annen sertifisert metode NF VALIDATION må det være et annet prinsipp enn Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*. Hele protokollen som er beskrevet for denne andre validerte metoden må brukes. Alle trinnene før start av bekreftelse må være felles for begge metodene.

I tilfelle forskjellige resultater (antatt positiv med den alternative metoden, ikke bekreftet av én av metodene beskrevet ovenfor) må laboratoriet følge de nødvendige trinnene for å sikre validitet til resultatene som er oppnådd.

I tilfelle forskjellige resultater (antatt positiv med Neogen molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*, ikke bekreftet av én av metodene beskrevet ovenfor) må laboratoriet følge de nødvendige trinnene for å sikre validitet til resultatene som er oppnådd.

Hvis du har spørsmål om spesifikke bruksområder eller prosedyrer, kan du besøke vårt nettsted på www.neogen.com eller ta kontakt med en lokal Neogen-representant eller -forhandler.

Vedlegg A. Avbrytelse av protokoll: Oppbevaring og ny testing av varmebehandlede lysater.

1. For å oppbevare et varmebehandlet lysat, sett lokket på lyseringsrøret igjen, bruk et rent lokk (se "Lysering", 4.5).
2. Oppbevar ved 4 til 8 °C i opptil 72 timer.
3. Bland en oppbevart prøve ved å vende den 2-3 ganger for å forberede den på amplifikasjon.
4. Åpne rørene.
5. Plasser de blandede lysatrørene på Neogen Varmeblokkinnsett for molekylær deteksjon og varm ved 100 ± 1 °C i 5 ± 1 minutter.
6. Fjern stativet med Neogen lyseringsoppløsningsrør fra varmeklokken og la det avkjøles i Neogen Kjøleblokkinnsett for molekylær deteksjon i minst 5 minutter og maksimum 10 minutter.
7. Se delen 'Amplifikasjon' beskrevet ovenfor for å fortsette protokollen.

Referanser:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Forklaring på produktetikettsymboler

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.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.
FS00867B

Tuoteseloste

Molekyläärinen testisetti 2 - *Listeria monocytogenes*

Tuotteen kuvaus ja käyttötarkoitus

Neogen® Molekyläärinen testisetti 2 - *Listeria monocytogenes* on tarkoitettu käytettäväksi yhdessä Neogen® Molekyläärisen testijärjestelmän kanssa *Listeria monocytogenesin* nopeaan ja täsmälliseen tunnistamiseen rikastetuista elintarvike- ja rehunäytteistä. Neogen Molekylääriset testisetit perustuvat nukleiinihapposekvenssien nopeaan, täsmälliseen ja herkkään silmukavälitteiseen isotermiseen monistamismenetelmään ja käyttävät monistuksen havaitsemiseen bioluminesenssia. Oletetut positiiviset tulokset ilmoitetaan reaaliaikaisesti, kun taas negatiiviset tulokset näytetään testin valmistumisen jälkeen. Oletetut positiiviset tulokset on vahvistettava käyttämällä itse parhaaksi katsottua tai paikallisten määräysten mukaista menetelmää^(1, 2, 3).

Neogen Molekyläärinen testisetti 2 - *Listeria monocytogenes* on tarkoitettu laboratoriotekniikoihin koulutettujen ammattilaisten käytettäväksi laboratorioympäristössä. Neogen ei ole osoittanut tuotetta käytettäväksi muilla kuin elintarvike- ja juomateollisuuden aloilla. Neogen ei esimerkiksi ole osoittanut tuotetta vesi-, lääke- tai kosmetiikanäytteiden testaamiseen eikä kliinisten tai eläinlääketieteellisten näytteiden testaamiseen. Neogen Molekylääristä testisettiä 2 - *Listeria monocytogenes* ei ole arvioitu kaikkien mahdollisten testauskäytäntöjen eikä kaikkien mahdollisten bakteerikantojen suhteen.

Kuten kaikkien testausmenetelmien tapauksessa, rikastusalustan lähde, koostumus ja laatu voivat vaikuttaa tuloksiin.

Esimerkiksi näytteenottomenetelmät, testausprotokollat, näytteiden valmistus, käsittely ja laboratoriotekniikka saattavat myös vaikuttaa tuloksiin. Neogen suosittelee menetelmän sekä rikastusalustan arviointia käyttäjän ympäristössä käyttäen riittävän suurta näytemäärää ja tiettyjä elintarvikenäytteitä ja mikrobisäilytöjä sen varmistamiseksi, että menetelmät vastaavat käyttäjän vaatimuksia.

Neogen on arvioinut Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* käyttäen ferriammoniumsitraattia sisältävää Demi Fraser -lientä ja ferriammoniumsitraattia sisältävää Fraser-lientä tarpeen mukaan. Tämän alustan tyyppillinen koostumus on kuvattu seuraavassa.

Demi Fraser Elatusainejauheen tyyppillinen kaava	(g/l)	Fraser Elatusainejauheen tyyppillinen kaava	(g/l)
Natriumkloridi	20 g	Natriumkloridi	20 g
Dinatriumfosfaatti, vedetön*	9,6 g	Dinatriumfosfaatti, vedetön*	9,6 g
Naudanlihauute	5,0 g	Naudanlihauute	5,0 g
Kaseiinin pankreaattinen digesti	5,0 g	Kaseiinin pankreaattinen digesti	5,0 g
Eläinkudoksen peptinen digesti	5,0 g	Eläinkudoksen peptinen digesti	5,0 g
Hiivauute	5,0 g	Hiivauute	5,0 g
Litiumkloridi	3,0 g	Litiumkloridi	3,0 g
Monokaliumfosfaatti	1,35 g	Monokaliumfosfaatti	1,35 g
Eskuliini	1,0 g	Eskuliini	1,0 g
Akriflaviinihydrokloridi	0,0125 g	Akriflaviinihydrokloridi	0,025 g
Nalidiksiinihappo	0,01 g	Nalidiksiinihappo	0,02 g

* Korvike: Dinatriumfosfaattidihydraatti 12,0 g

Fraser-liemen rikastussupplementti

(Valmistusaineet 10 ml:n ampulliin. Yksi ampulli lisätään litraan peruselatusainetta.)

Ferriammoniumsitraatti 0,5 g / 10 ml

Lopullinen pH 7,2 ± 0,2 lämpötilassa 25 °C

Neogen® Molekyläärinen testi-instrumentti on tarkoitettu käytettäväksi sellaisten näytteiden kanssa, jotka on lämpökäsitelty testin lyysivaiheen aikana näytteessä olevien organismien tuhoamiseksi. Jos näytteitä ei ole asianmukaisesti lämpökäsitelty testin lyysivaiheen aikana, ne saattavat muodostaa biologisen vaaratekijän, jolloin niitä EI saa asettaa Neogen Molekylääriseen testi-instrumenttiin.

Neogen Food Safety -osaston suunnittelu- ja valmistusmenetelmät on ISO (International Organization for Standardization) 9001 -sertifioitu.

Neogen Molekyläärinen testisetti 2 - *Listeria monocytogenes* sisältää 96 testiä, jotka on kuvattu taulukossa 1.



Taulukko 1. Neogen Molekyläärisen testisetin osat

Nimike	Tunnusmerkki	Määrä	Sisältö	Kommentit
Neogen® Lyysiliuos (LS)	Vaaleanpunainen liuos läpinäkyvissä putkissa	96 (12 kpl 8 putken liuskoja)	580 µl lyysiliuosta/putki	Telineessä ja käyttövalmis
Neogen® Molekyläärisen testisetin 2 - <i>Listeria monocytogenes</i> -reagenssiputket	Keltaiset putket	96 (12 kpl 8 putken liuskoja)	Lyofilisoitu spesifi monistus- ja tunnistusyhdistelmä	Käyttövalmis
Lisäsuojukset	Keltaiset suojukset	96 (12 kpl 8 suojuksen liuskoja)		Käyttövalmis
Neogen® Reagenssin valvonta (RC)	Läpinäkyvät flip-top-putket	16 (2 pussia, joissa kummassakin 8 yksittäistä putkea)	Lyofilisoitu kontrolli-DNA, monistus- ja tunnistusyhdistelmä	Käyttövalmis

Negatiivinen kontrolli, jota ei toimiteta paketin mukana, on steriili rikastusalusta, esim. Demi Fraser -liemi. Älä käytä vettä negatiivisena kontrollina.

Turvallisuus

Käyttäjän on luettava ja ymmärrettävä kaikki Neogen Molekylääristä testijärjestelmää ja Neogen Molekylääristä testisettiä 2 - *Listeria monocytogenes* koskevat turvallisuusohjeet ja noudatettava niitä. Säilytä turvallisuusohjeet myöhempää käyttöä varten.

⚠ **VAROITUS:** Osoittaa vaarallisen tilanteen, joka saattaa johtaa kuolemaan tai vakavaan loukkaantumiseen ja/tai omaisuusvahinkoon, jos tilannetta ei vältetä.

HUOMAUTUS: Osoittaa mahdollisesti vaarallisen tilanteen, joka saattaa johtaa aineelliseen vahinkoon, jos tilannetta ei vältetä.

⚠ VAROITUS

Älä käytä Neogen Molekylääristä testisettiä 2 - *Listeria monocytogenes* ihmisten tai eläinten diagnosointiin.

Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* menetelmä saattaa tuottaa siinä määrin *Listeria monocytogenes*ä, että se riittää aiheuttamaan raskaana oleville naisille sikiökuolleisuutta ja immuunipuutteisille kuolemantapauksia altistumisen yhteydessä.

Käyttäjän on järjestettävä henkilökunnalleen koulutusta asianmukaisista testausmenetelmistä, joita ovat esimerkiksi: hyvät laboratoriotäytäntöt, ISO/IEC 17025⁽⁴⁾ tai ISO 7218⁽⁵⁾.

Väärin negatiivisten tulosten vuoksi markkinoille voi päästä kontaminoituneita tuotteita. Voit vähentää tähän liittyviä riskejä toimimalla seuraavasti:

- Noudata käytäntöä ja tee testit täsmälleen tuoteselosteessa esitetyllä tavalla.
- Säilytä Neogen Molekylääristä testisettiä 2 - *Listeria monocytogenes* pakkausmerkintöjen ja tuoteselosteen mukaan.
- Käytä Neogen Molekyläärinen testisettiä 2 - *Listeria monocytogenes* aina ennen viimeistä käyttöpäivää.
- Käytä Neogen Molekylääristä testisettiä 2 - *Listeria monocytogenes* sellaisiin ympäristönäytteisiin, jotka on validoitu sisäisesti tai ulkopuolisen tahon toimesta.
- Käytä Neogen Molekylääristä testisettiä 2 - *Listeria monocytogenes* vain sellaisten pintojen, puhdistusaineiden, käytäntöjen ja bakteerikantojen kanssa, jotka on hyväksytty sisäisesti tai kolmannen osapuolen toimesta.
- Laimenna ympäristönäytteet, joissa käytetään aryyilisulfonaattikompleksia sisältävää neutraloivaa puskuria, suhteessa 1:2 ennen testausta (1 osa näytettä 1 osaan steriiliä rikastusliuosta). Toinen vaihtoehto on siirtää 10 µl neutraloivaa puskuririkastusliuosta Neogen-lyysiliuosputkiin. Neogen®-näytteiden keräystuotteet, jotka sisältävät aryyilisulfonaattikompleksia sisältävää neutraloivaa puskuria, ovat seuraavat: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G ja HS2410NB2G.

Kemikaaleille ja biologisille vaaratekijöille altistumiseen liittyvien riskien vähentäminen:

- On erittäin suositeltavaa, että naispuoliselle laboratoriohenkilöstölle tiedotetaan, että kehittyvälle sikiölle aiheutuu vaaraa äidin *Listeria monocytogenes* -altistuksen aiheuttamasta tartunnasta.
- Testaa taudinaiheuttajat asianmukaisesti varustetussa laboratoriossa koulutetun henkilöstön valvonnassa. Inkuboitu rikastusaine ja laitteet tai pinnat, jotka ovat joutuneet kosketuksiin inkuboidun rikastusaineen kanssa, saattavat sisältää taudinaiheuttajia määrän, joka riittää aiheuttamaan vaaran ihmisten terveydelle.
- Noudata aina laboratoriodien vakioturvallisuuskäytäntöjä, joihin kuuluu asianmukaisten suojavaatteiden ja silmäsuojainten käyttäminen reagensseja ja kontaminoituja näytteitä käsiteltäessä.
- Vältä kosketusta rikastusalustan ja reagenssiputkien sisällön kanssa monistuksen jälkeen.
- Hävitä rikastetut näytteet alan voimassa olevien standardien mukaisesti.
- Jos näytteitä ei ole asianmukaisesti lämpökäsitelty testin lyysivaiheen aikana, ne saattavat muodostaa biologisen vaaratekijän, jolloin niitä EI saa asettaa Neogen Molekylääriseen testi-instrumenttiin.

**Testisetin valmistelun aikana tapahtuvaan ristikontaminaatioon liittyvien riskien vähentäminen:**

- Käytä aina suojakäsineitä (käyttäjän suojaamiseksi ja nukleaaasien siirtymisen estämiseksi).

Ympäristön kontaminoitumiseen liittyvien riskien vähentäminen:

- Noudata hävittämisessä voimassa olevia kontaminoituneen jätteen hävittämistä koskevia alan standardeja.

Jotta voit vähentää kuumille nesteille altistumisesta aiheutuvia riskejä, noudata seuraavia ohjeita:

- Älä ylitä lämmityslaitteeseen merkittyä suositeltua lämpötila-asetusta.
- Älä ylitä suositeltua kuumennusaikaa.
- Tarkasta Neogen® Molekyläärinen testilämpölohkon pistokkeen lämpötila tarkoituksenmukaisella kalibroidulla lämpömittarilla (esim. osittain upotettavalla lämpömittarilla tai digitaalisella termoparimittarilla, ei kokonaan upotettavalla lämpömittarilla.) Lämpömittari on asetettava sille määrättyyn paikkaan Neogen Molekyläärinen testilämpölohkon pistokkeessa.

HUOMAUTUS**Testisetin valmistelun aikana tapahtuvaan ristikontaminaatioon liittyvien riskien vähentäminen:**

- Vaihda käsiin ennen reagenssipelletin kastelemista.
- Steriilien aerosoliesteen muodostavien molekyylibiologiaan soveltuvaa laatua olevien pipetinkärkien (suodatinkärkien) käyttö on suositeltavaa.
- Käytä jokaisen näytteen siirtämiseen uutta pipetinkärkeä.
- Käytä näytteiden siirtämiseen rikastamisesta lyysiputkeen hyviä laboratoriokäytäntöjä. Pipetoijan kontaminoitumisen välttämiseksi käyttäjä voi halutessaan lisätä ylimääräisen siirtovaiheen. Jokaisen rikastetun näytteen voi esimerkiksi siirtää steriiliin putkeen.
- Jos mahdollista, käytä molekyylibiologista työasemaa, jossa on bakteerintuholamppu. Steriloi laboratorion työtasot ja välineet (pipetit, sulk- ja avaustyökälyt jne.) säännöllisesti 1–5-tilavuusprosenttisella (veteen laimennetulla) talouskäyttöisellä valkaisuaineliuksella tai DNA:n poistoliuksella.

Vähennä vääriin positiivisiin tuloksiin liittyviä riskejä toimimalla seuraavasti:

- Älä koskaan avaa reagenssiputkia monistuksen jälkeen.
- Hävitä kontaminoituneet putket aina liottamalla niitä 1–5-tilavuusprosenttisessa (veteen laimennetussa) valkaisuaineliuksessa 1 tunnin ajan etäällä testin valmistelualueelta.
- Älä koskaan autoklavoi reagenssiputkia monistuksen jälkeen.

Katso lisätietoja hävittämisestä ja paikallisista määräyksistä käyttöturvallisuustiedotteesta.

Jos sinulla on jotain tiettyä sovellusta tai menetelmää koskevia kysymyksiä, käy verkkosivuiltamme osoitteessa www.neogen.com tai ota yhteyttä paikalliseen Neogen-edustajaan tai -jälleenmyyjään.

Käyttäjän vastuu

Käyttäjän vastuulla on tutustua tuoteselosteeseen ja -tietoihin. Lisätietoja saat verkkosivustolla osoitteesta www.neogen.com tai ottamalla yhteyttä paikalliseen Neogen-edustajaan tai -jälleenmyyjään.

Testausmenetelmää valitessa on tärkeää ottaa huomioon, että ulkoiset tekijät, kuten näytteenottomenetelmä, testausprotokollat, näytteiden valmistus, käsittely ja laboratoriotekniikat, voivat vaikuttaa testituloksiin.

Käyttäjä on aina testausmenetelmää tai tuotetta valitessaan vastuussa siitä, että hän arvioi riittävän määrän näytteitä kyseisistä elintarvikkeista ja mikrobialtistuksista käyttäjän kriteerien täyttymisen varmistamiseksi.

Käyttäjän vastuulla on myös varmistaa, että testausmenetelmät ja tulokset täyttävät hänen asiakkaidensa tai toimittajiensa vaatimukset.

Kuten kaikkien testausmenetelmien kohdalla, minkä tahansa Neogen Food Safety -tuotteen käytöstä saavutetut tulokset eivät ole takuu matriisien tai testattujen prosessien laadusta.

Voidakseen auttaa erilaisten elintarvikematriisien arvioinnissa Neogen on kehittänyt Neogen® Molekyläärinen testitaulukon valvontasarjan. Määritä tarvittaessa testitaulukon hallinnan avulla, vaikuttaako matriisi Neogen Molekyläärinen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* tuloksiin. Testaa validointivaiheiden aikana useita matriisia edustavia näytteitä, ts. eri lähteistä saatuja näytteitä, kun olet ottamassa käyttöön Neogen-menetelmää tai kun olet testaamassa uusia tai tuntemattomia matriiseja tai matriiseja, joiden raaka-aineita tai valmistustapoja on muutettu.

Matriisi voidaan määrittää tuotetyypiksi, jolla on sisäisiä ominaisuuksia, kuten koostumus ja valmistustapa. Matriisien väliset erot voivat johtua niinkin yksinkertaisista tekijöistä kuin eroista niiden käsittelyssä tai jalostusasteessa, esim. raaka tai pastöroitu, tuore tai kuivattu.

Takuun rajoitus / rajoitettu korvausvelvollisuus

NEOGEN KIISTÄÄ KAIKKI NIMENOMAISET JA EPÄSUORAT TAKUUT, MUKAAN LUKIEN KAIKKI TAKUUT KÄYPPYDESTÄ TAI SOPIVUUDESTA TIETTYYN KÄYTTÖTARKOITUKSEEN, PAITSI JOS TUOTEPAKKAUKSEN TAKUUOSIOSSA TOISIN MAINITAAN. Jos mikä tahansa Neogen Food Safety -tuote on viallinen, Neogen tai sen valtuutettu jälleenmyyjä joko korvaa tuotteen tai palauttaa sen ostohinnan. Nämä ovat ainoat myönnetyt korvaukset. Ota yhteyttä Neogen-edustajaasi tai valtuutettuun Neogen-jälleenmyyjään, jos sinulla on kysyttävää.



Neogen:n vastuun rajoitukset

NEOGEN EI OLE VASTUUSSA MENETYKSISTÄ TAI VAHINGOISTA, OLIVAT NE SITTEN SUORIA, EPÄSUORIA, ERITYISLAATUISIA, SATUNNAISIA TAI VÄLILLISIÄ, MUKAAN LUKIEN VOITONMENETYKSET. Missään tapauksessa Neogen:n vastuu ei minkään laillisen perusteen mukaan ole suurempi kuin vialliseksi väitetyn tuotteen hinta.

Säilytys ja hävittäminen

Säilytä Neogen Molekylääristä testisettiä 2 - *Listeria monocytogenes* 2–8 °C:n lämpötilassa. Suojattava jäätymiseltä. Säilytä paketti valolta suojattuna. Kun olet avannut paketin, tarkista, että foliopussi on ehjä. Ei saa käyttää, jos pussi on vahingoittunut. Avaamisen jälkeen käyttämättömät reagenssiputket on aina säilytettävä uudelleensuljettavassa pussissa, jonka sisällä on kuivausainetta lyofilisoitujen reagenssien stabiliteetin ylläpitämiseksi. Säilytä uudelleensuljettuja pusseja 2–8 °C:n lämpötilassa enintään 60 päivän ajan.

Älä käytä Neogen Molekylääristä testisettiä 2 - *Listeria monocytogenes* viimeisen käyttöpäivän jälkeen. Viimeinen käyttöpäiväys ja eränumero on merkitty pakkauksen ulkopuolelle. Käytön jälkeen rikastusaine ja Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* putket voivat sisältää mahdollisesti patogeenisia aineita. Kun testi on suoritettu loppuun, noudata saastuneen jätteen hävittämisessä alan nykykäytäntöjä. Katso lisätietoja hävittämisestä ja paikallisista määräyksistä käyttöturvallisuustiedotteesta.

Käyttöohjeet

Noudata huolellisesti kaikkia ohjeita. Jos ohjeita ei noudateta, tulokset saattavat olla epätarkkoja.

Steriloi laboratorion työtasot ja välineet (pipetit, sulk- ja avaustyökalut jne.) säännöllisesti 1–5-tilavuusprosenttisella (veteen laimennetulla) talouskäyttöisellä valkaisuaineliuoksella tai DNA:n poistoliuoksella.

Käyttäjän on suoritettava Neogen Molekyläärisen testijärjestelmän käyttäjäkoulutus, kuten asiakirjassa ”Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System”⁽⁶⁾ kuvataan.

Katso erityisvaatimukset kohdasta Erikoisohjeet validoituja menetelmiä varten:

Taulukko 3 sisältää rikastuskäytännöt seuraavien mukaisesti: AOAC® *Official Method of Analysis*SM 2016.08 ja AOAC® *Performance Tested Method*SM -sertifikaatti #081501.

Taulukko 4 sisältää NF Validation -sertifikaatin 3M 01/15-09/16 mukaisen rikastuskäytännön.

Näytteiden rikastus

Taulukossa 2, 3 tai 4 on rikastuskäytäntöjen ohjeet elintarvike- ja ympäristönäytteille. Käyttäjän vastuulla on vahvistaa vaihtoehtoisten näytteenottokäytäntöjen ja laimennussuhteiden soveltuvuus sen varmistamiseksi, että testimenetelmä vastaa käyttäjän kriteereitä.

Elintarvikkeet

1. Anna (ferriammoniumsitraattia sisältävän) Demi Fraser -rikastusalustan lämmitä laboratorion ilman lämpötilaan.
2. Yhdistä rikastusalusta ja näyte aseptisesti taulukoiden 2, 3 tai 4 mukaisesti. Kaikkien lihanäytteiden ja erittäin hiukkaspiitoisten näytteiden yhteydessä suositellaan käyttämään suodatinpusseja.
3. Homogenoi huolellisesti sekoittamalla, vatsasekoituksella tai käsin sekoittamalla $2 \pm 0,2$ minuuttia. Inkuboi 37 ± 1 °C:ssa taulukoiden 2, 3 tai 4 mukaisesti.
4. Raakoja maitotuotteita varten (katso taulukot 2, 3 tai 4) siirrä 0,1 ml ensisijaista rikastuslientä 10 ml:aan Fraser-lientä. Inkuboi 37 ± 1 °C:ssa 20–24 tunnin ajan.

Ympäristönäytteet

Näytteenkeräyslaitteena voidaan käyttää puhdistusaineiden vaikutusten kumoamiseksi neutraalivalla liuoksella kosteutettua sientä. Neogen suositaa käyttämään biosiditonta selluloosasientä. Neutraalivana liuoksena voidaan käyttää neutraalivaa Dey-Engleyn (D/E) -lientä tai Lethen-lientä. Suosittelemme puhdistamaan alueen näytteenoton jälkeen.

VAROITUS: Mikäli päätät käyttää sienen hydratointiliuoksena aryyli-sulfonaattikompleksia sisältävää neutraalia puskuria, rikastettu ympäristönäyte on laimennettava suhteessa 1:2 (1 osa näytettä 1 osaan steriiliä rikastusliuosta) ennen testausta sellaisten väriä negatiivisten tulosten riskien vähentämiseksi, joiden vuoksi markkinoille voi päästä kontaminoituneita tuotteita. Toinen vaihtoehto on siirtää 10 µL neutraalivaa puskuririkastusliuosta Neogen-lyysiliuosputkiin.

Näytteenottoalueen suositeltava koko patogeenin esiintymisen tai puuttumisen havaitsemiseksi pinnalla on vähintään 100 cm² (10 cm x 10 cm tai 4 tuumaa x 4 tuumaa). Sienellä näytettä ottaessasi käy läpi koko alue kahdessa suunnassa (vasemmalta oikealle ja sen jälkeen ylhäältä alas) tai kerää ympäristönäytteet voimassa olevia näytteenottokäytäntöjä noudattaen tai asiakirjojen FDA BAM⁽¹⁾, USDA FSIS MLG⁽²⁾ tai standardin ISO 18593⁽⁷⁾ ohjeiden mukaisesti.

1. Anna (ferriammoniumsitraattia sisältävän) Demi Fraser -rikastusalustan lämmitä laboratorion ilman lämpötilaan.
2. Yhdistä rikastusalusta ja näyte aseptisesti taulukoiden 2, 3 tai 4 mukaisesti.
3. Homogenoi huolellisesti sekoittamalla, vatsasekoituksella tai käsin sekoittamalla $2 \pm 0,2$ minuuttia. Inkuboi 37 ± 1 °C:ssa 24–30 tunnin ajan taulukoiden 2, 3 tai 4 mukaisesti.



Taulukko 2: Yleiset rikastuskäytännöt 37 ± 1 °C:ssa Demi Fraser -lientä ja Fraser-lientä tarpeen mukaan.

Näyttematriisi	Näytteen koko	Rikastusliemen tilavuus (ml)	Rikastusaika (h)				
Lämpökäsitelty, keitetty, suolattu tai savustettu liha, siipikarja, äyriäiset ja kala	25 g	225	24–30				
Lämpökäsitellyt/pastöroidut maitotuotteet							
Hedelmät ja vihannekset							
Monikomponenttielintarvikkeet							
Ympäristönäytteet ^(a)	1 sieni	100 tai 225	24–30				
	1 tossunäyte	10	24–30				
Raaka liha, siipikarjanliha, äyriäiset ja kala	25 g	475	28–32				
Näyttematriisi	Ensisijainen rikastusliemi (Demi Fraser -liemi) ^(a)			Toissijainen rikastusliemi (Fraser-liemi) ^(a)			Näytteen analyysitilavuus ^(b)
	Näytteen koko	Rikastusliemen tilavuus (ml)	Rikastusaika (h)	Näytteen koko	Rikastuslämpötila (°C)	Rikastusaika (h)	
Raa'at maitotuotteet	25 g	225	20–24	Siirrä 0,1 ml 10 ml:aan Fraser-lientä	37 ± 1	20–24	10 µl

(a) Demi Fraser- ja Fraser-liemiin on aina lisättävä Fraser-liemen rikastussuplementtia (ferriammoniumsitraattia) ensi- tai toissijaisen rikastuksen aikana.

(b) Neogen-lyysiliuosputkiin siirrettävä näytteen tilavuus. Katso Lyysi-osion vaihe 4.6.

Erikoisohjeet validoituja menetelmiä varten
AOAC® Official Method of AnalysisSM 2016.08
AOAC® Performance Tested MethodSM #081501



Tutkimuslaitos AOAC:n OMASM- ja PTMSM-ohjelmissa Neogen Molekyläärinen testisetti 2 - *Listeria monocytogenes* todettiin tehokkaaksi *Listeria monocytogenes*in havaitsemismenetelmäksi. Tutkimuksessa testatut matriisit näkyvät taulukossa 3.



Taulukko 3. Rikastuskäytännöt, joissa käytetään Demi-Fraser -lientä^(a) 37 ± 1 °C:ssä AOAC OMASM 2016.08 ja PTMSM -sertifikaatin #081501 mukaisesti.

Näytematriisi		Näytteen koko	Rikastusliemen tilavuus (ml)	Rikastusaika (h)
Hot dogit naudanlihasta, queso fresco, vaniljakermajäätelö, 4-prosenttinen tuorejuusto maidosta, 3-prosenttinen kaakao täysmaidosta, romaine-sidesalaatti, pakattu tuore pinaatti, kylmäsavulohi		25 g	225	24–30
Raaka broileri		25 g	475	28–32
Kalkkunaleike		125 g	1125	24–30
Cantaloupenmeloni ^(b)		Koko meloni	Riittävästi, jotta meloni kelluu	26–30
Ympäristönäytteet:	Ruostumaton teräs	1 sieni	225	24–30
	Pinnoitettu betoni	1 sieni	100	24–30
	Muovi ^(c)	1 tossunäyte	10	24–30

Kaikki AOAC-validointiin tarkoitetut näytteet homogenoitiin vatsasekoituksella, jollei muuta mainita.

- (a) Demi Fraser- ja Fraser-liemiin on aina lisättävä Fraser-liemen rikastussupplementtia (ferriammoniumsitraattia) ensi- tai toissijaisen rikastuksen aikana.
- (b) Homogenoi näyte sekoittamalla käsin.
- (c) Homogenoi näyte vortex-sekoituksella.

AFNOR Certificationin myöntämä NF VALIDATION -sertifikaatti



3M 01/15-09/16

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

Lisätietoja validointiajan päättymisestä on NF VALIDATION -sertifikaatissa, joka on saatavissa edellä mainitulta verkkosivustolta.

NF Validation -sertifioitu ISO 16140-2⁽⁶⁾ -standardin mukainen menetelmä verrattuna ISO 11290⁽³⁾ -standardiin Validoinnin soveltamisala: Kaikki ihmisravinnoksi tarkoitetut elintarvikenäytteet ja ympäristönäytteet (ensisijaisen tuotannon näytteitä lukuun ottamatta)

Näytteen valmistus: Näytteiden valmistamisessa on noudatettava standardeja EN ISO 11290-1⁽³⁾ ja EN ISO 6887⁽⁸⁾

Ohjelmistoversio: Katso sertifikaatista

Taulukko 4: Rikastuskäytännöt NF VALIDATION -sertifioidun menetelmän 3M 01/15-09/16 mukaisesta 37 ± 1 °C:ssa käyttäen Demi Fraser- ja Fraser-liemiä tarpeen mukaan.



Yleinen käytäntö	Näytteen koko	Rikastusliemen tilavuus (ml)	Rikastuslämpötila ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)	Rikastusaika (h)	Näytteen analyysitilavuus ^(a)	Hyväksyttävä keskeytyspiste
Kaikki elintarvikenäytteet (paitsi raaka liha, raa'at äyräiset ja raa'at maitotuotteet)	25 g	225	37	24–30	20 μl	<ul style="list-style-type: none"> • Demi Fraser -liemellä enintään 72 tunnin ajan • Lysaatti $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa • Lysaatti $4\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa enintään 72 tunnin ajan
Ympäristönäytteet	25 g, 1 tossunäyte tai 1 pyyhintänäyte					

Erityinen käytäntö	Ensisijainen rikastusliemi (Demi Fraser -liemi) ^(b)				Toissijainen rikastusliemi (Fraser-liemi) ^(b)				Hyväksyttävä keskeytyspiste
	Näytteen koko	Rikastusliemen tilavuus (ml)	Rikastuslämpötila ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)	Rikastusaika (h)	Näytteen koko	Rikastuslämpötila ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)	Rikastusaika (h)	Näytteen analyysitilavuus ^(c)	
Raaka liha, raa'at äyräiset ja raa'at maitotuotteet	25 g	225	37	20–24	Siirrä 0,1 ml 10 ml:aan Fraser-lientä	37	20–24	10 μl	<ul style="list-style-type: none"> • Fraser-liemellä enintään 72 tunnin ajan • Lysaatti $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa • Lysaatti $4\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa enintään 72 tunnin ajan

(a) Neogen-lyysiliuosputkiin siirrettävä näytteen tilavuus. Katso Lyysi-osion vaihe 4.6.

(b) Demi Fraser- ja Fraser-liemiin on aina lisättävä Fraser-liemen rikastussupplementtia (ferriammoniumsitraattia) ensi- tai toissijaisen rikastuksen aikana.

(c) Neogen-lyysiliuosputkiin siirrettävä näytteen tilavuus. Katso Lyysi-osion vaihe 4.6.

HUOMAUTUS: Yli 25 g:n näytteitä ei ole testattu NF validation -tutkimuksessa.

Neogen® Molekyläärisen testinopeuden latausalustan valmistelu

1. Kostuta liina 1–5-tilavuusprosenttisella (veeten laimennetulla) talouskäyttöisellä valkaisuliuksella tai vastaavalla liuksella ja pyyhi Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalusta.
2. Huuhtelee Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalusta vedellä.
3. Pyyhi Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalusta kuivaksi kertakäyttöisellä liinalla.
4. Varmista ennen käyttöä, että Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalusta on kuiva.

Neogen® Molekyläärisen testijäähdytyslohkon pistokkeen valmistelu

Aseta Neogen® Molekyläärinen testijäähdytyslohko suoraan laboratorion työtasolle; käytä jäähdytyslohkoa laboratorion ilman lämpötilassa ($20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Neogen® Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeen valmistelu

Aseta Neogen® Molekyläärisen testilämpölohkon pistoke kaksilohkoiseen kuivalämmityslaitteeseen. Kytke kuivalohkolämmitin päälle, aseta lämpötila ja anna Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeen lämmitä $100 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilaan niin, että saavutettu lämpötila pysyy samana.

HUOMAUTUS: Anna Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeen lämmitä asetuslämpötilaan noin 30 minuuttia lämmityslaitteen mukaan. Varmista tarkoituksenmukaisen kalibroidun lämpömittarin avulla (esim. osittain upotettava lämpömittari tai digitaalinen termoparimittari, ei kokonaan upotettava lämpömittari), joka on asetettu sille määrättyyn paikkaan, että Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeen lämpötila on $100 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Neogen® Molekyläärisen testi-instrumentin valmistelu

1. Käynnistä Neogen® Molekyläärisen testijärjestelmän ohjelmisto ja kirjaudu sisään. Varmista Neogen Food Safety -edustajaltasi, että käytössäsi on ohjelmiston uusin versio.

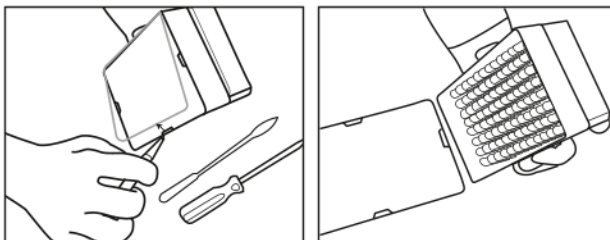


2. Kytke Neogen Molekyläärinen testi-instrumentti päälle.
3. Luo tai muokkaa ajo kunkin näytteen tiedoille. Katso tarkemmat tiedot Neogen Molekyläärisen testijärjestelmän käyttöoppaasta.

HUOMAUTUS: Neogen Molekyläärisen testi-instrumentin on saavutettava Valmis-tila ennen Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalustan ja reaktioputkien asettamista laitteeseen. Lämmitysvaihe kestää noin 20 minuuttia, ja sen merkiksi instrumentin tilarivillä palaa ORANSSI valo. Kun instrumentti on valmis ajon käynnistämistä varten, tilarivin valo muuttuu VIHREÄKSI.

Lyysi

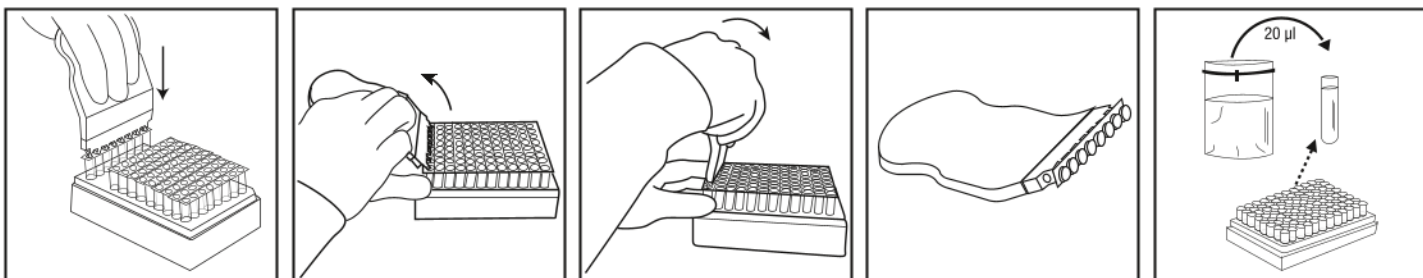
Poista Neogen Lyysiliuostelineen pohja ruuvimeisselillä tai lastalla, ennen kuin asetat sen Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeeseen.



1. Anna lyysiliuosputkien (Neogen Lyysiliuos) lämmetä jättämällä teline huoneenlämpöön (20–25 °C) yön yli (16–18 tunnin ajaksi). Neogen Lyysiliuosputket voi lämmittää huoneenlämpöön myös asettamalla ne laboratorion työtasolle vähintään 2 tunniksi, inkuboimalla Neogen Lyysiliuosputkia inkubaattorissa 37 ± 1 °C:ssa 1 tunnin ajan tai asettamalla Neogen Lyysiliuosputket kaksilohkoiseen kuivalämmittimeen 100 °C:n lämpötilaan 30 sekunniksi.
2. Sekoita suljetut putket kääntämällä ne ylösalaisin. Siirry seuraavaan vaiheeseen 4 tunnin kuluessa.
3. Poista rikastusliemi inkubaattorista.
4. Jokaiselle näytteelle ja negatiiviselle kontrollinäytteelle (NC) (steriili rikastusaine) tarvitaan yksi Neogen Lyysiliuosputki.
 - 4.1 Neogen Lyysiliuos-putkiliuskat voidaan leikata haluttuun Neogen Lyysiliuosputkien putkimäärään. Valitse tarvittava yksittäisten Neogen Lyysiliuosputkien tai 8 putken liuskojen määrä. Aseta Neogen Lyysiliuosputket tyhjiin telineeseen.
 - 4.2 Ristikontaminaation välttämiseksi poista suojus yhdestä Neogen Lyysiliuosputkiliuskasta kerrallaan ja käytä jokaiseen siirtovaiheeseen uutta pipettiä.
 - 4.3 Siirrä rikastetut näytteet Neogen Lyysiliuosputkiin seuraavien ohjeiden mukaisesti:

Siirrä jokainen rikastettu näyte **ensin** erilliseen Neogen Lyysiliuosputkeen. Siirrä negatiivinen kontrolli (NC) **viimeiseksi**.

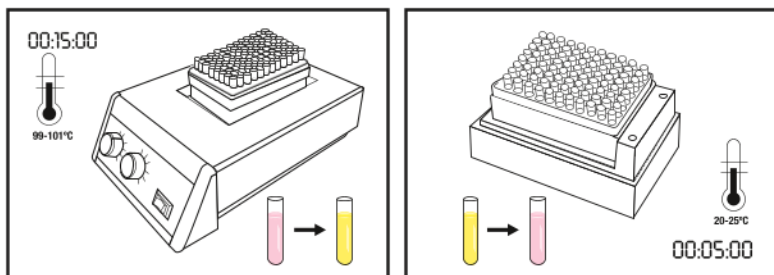
- 4.4 Käytä Neogen® Molekyläärisen testin cap/decap-työkalua – Lysis yhden Neogen Lyysiliuosputkiliuskan avaamiseen – yksi liuska kerrallaan.
- 4.5 Heitä Neogen Lyysiliuosputken suojus pois – jos lysaatti säilytetään uudelleentestausta varten, laita suojukset puhtaaseen astiaan lyysin jälkeistä uudelleenkäyttöä varten.
 - 4.5.1 Säilytetyn lysaatin käsittelyyn liittyvät ohjeet ovat liitteessä A.
- 4.6 Siirrä 20 µl näytettä Neogen Lyysiliuosputkeen, jollei näytteenottokäytäntötaulukossa 2, 3 tai 4 muuta mainita (esim. raa'at maitotuotteet tai käytettäessä ympäristönäytteitä ja neutraloivaa puskuririkastusliuosta, käytä 10 µl).



5. Toista vaihe 4.4–4.6, kunnes kukin yksittäinen näyte on lisätty vastaavaan Neogen Lyysiliuosputkeen liuskassa.
6. Kun kaikki näytteet on siirretty, siirrä 20 µl negatiivista kontrollia (steriiliä rikastusainetta, Demi Fraser -liuosta) Neogen Lyysiliuosputkeen. Älä käytä vettä negatiivisena kontrollina.
7. Varmista, että Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeen lämpötila on 100 ± 1 °C.
8. Aseta peittämätön Neogen Lyysiliuosputkiteline Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeeseen ja kuumenna 15 ± 1 minuuttia. Kuumennuksen aikana Neogen Lyysiliuosputkien väri muuttuu vaaleanpunaisesta (viileä) keltaiseksi (kuuma).



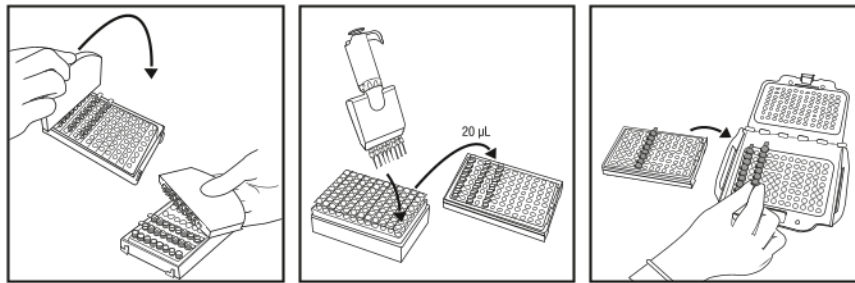
- 8.1 Jos näytteitä ei ole asianmukaisesti lämpökäsitelty testin lyysivaiheen aikana, ne saattavat muodostaa biologisen vaaratekijän, jolloin niitä EI saa asettaa Neogen Molekylääriseen testi-instrumenttiin.
9. Poista peittämätön Neogen Lyysiliuosputkeline lämmityslohkosta ja anna sen viilentyä Neogen Molekylääriseen testijäähdytyslohkon pistokkeessa vähintään 5 minuuttia ja enintään 10 minuuttia. Neogen Molekylääriseen testijäähdytyslohkon pistoke, jota käytetään ympäristön lämpöisenä, asetetaan suoraan laboratorion työtasolle. Viileänä lyysiliuoksen väri palaa vaaleanpunaiseksi.
10. Poista Neogen Lyysiliuosputkeline Neogen Molekylääriseen testijäähdytyslohkon pistokkeesta.



Monistaminen

- Jokaiselle näytteelle ja negatiiviselle kontrollinäytteelle tarvitaan yksi Neogen Molekylääriseen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputki.
 - Reagenssiputkiliuskat voidaan leikata haluttuun määrään putkia. Valitse tarvittava yksittäisten Neogen Molekylääriseen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputkien tai 8 putken liuskosten määrä.
 - Aseta Neogen Molekylääriseen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputket tyhjiin telineeseen.
 - Vältä liikuttamasta reagenssipellettejä putkien pohjalta.
- Valitse 1 Neogen Reagenssin valvontaputki ja aseta telineeseen.
- Ristikontaminaation välttämiseksi poista suojus yhdestä Neogen Molekylääriseen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputkinauhasta kerrallaan ja käytä uutta pipetin kärkeä jokaisessa siirtovaiheessa.
- Siirrä lyaatti Neogen Molekylääriseen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputkeen ja Neogen Reagenssin valvontaputkeen seuraavasti:

Siirrä jokainen näytelysaatti yksittäiseen Neogen Molekylääriseen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputkeen **ensin** ja sitten negatiivinen kontrolli. Hydratoi Neogen Reagenssin valvontaputki **viimeisenä**.
- Avaa Neogen Molekylääriseen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputki käyttämällä Neogen® Molekylääriseen testin cap/decap-työkalua - Reagenssi. Avaa yksi reagenssiputkeen putkiliuska kerrallaan. Heitä suojus pois.
 - Siirrä 20 µl näytelysaattia Neogen Lyysiliuosputkessa olevan nesteeseen ylemmästä puoliskosta (vältä sakkaa) vastaavaan Neogen Molekylääriseen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputkeen. Annostelee vinossa kulmassa, jotta et liikuta pellettejä. Sekoita pipetoimalla varovasti ylös ja alas 5 kertaa.
 - Toista vaihe 5.1, kunnes kaikki yksittäiset näytelysaatit on lisätty vastaavaan Neogen Molekylääriseen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputkeen liuskassa.
 - Peitä Neogen Molekylääriseen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputket mukana toimitetuilla lisäsuojuksilla ja varmista, että ne ovat tiukasti paikoillaan, painamalla niitä Neogen Molekylääriseen testin cap/decap-työkalun - Reagenssi pyöristetyllä puolella eteen- ja taaksepäin suuntautuvalla liikkeellä.
 - Toista tarvittaessa vaiheet 5.1–5.3 testattavien näytteiden määrän mukaan.
 - Kun kaikki näytelysaatit on siirretty, siirrä 20 µl negatiivista kontrollilysaattia Neogen Molekylääriseen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputkeen toistamalla vaiheet 5.1.
 - Siirrä 20 µl **negatiivista kontrollilysaattia** Neogen Reagenssin valvontaputkeen. Annostelee vinossa kulmassa, jotta et liikuta pellettejä. Sekoita pipetoimalla varovasti ylös ja alas 5 kertaa.
- Aseta suojuksella suljetut putket puhtaaseen ja steriloituun Neogen Molekylääriseen testinopeuden latausalustaan. Sulje ja lukitse Neogen Molekylääriseen testinopeuden latausalustan kansi.



7. Tarkasta ja vahvista määritetty ajo Neogen Molekyläärisen testijärjestelmän ohjelmistossa.
8. Napsauta ohjelmiston Start (Käynnistä) -painiketta ja valitse käytettävä instrumentti. Valitun instrumentin kansi aukeaa automaattisesti.
9. Aseta Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalusta Neogen Molekylääriseen testi-instrumenttiin ja aloita testi sulkemalla kansi. Saat tulokset 75 minuutin kuluessa, positiiviset tulokset saatetaan kuitenkin havaita jo aikaisemmin.
10. Kun testi on suoritettu loppuun, ota Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalusta Neogen Molekyläärisestä testi-instrumentista ja hävitä putket liottamalla niitä 1–5-tilavuusprosenttisessa (veteen laimennetussa) talouskäyttöisessä valkaisuaineliuoksessa tai vastaavassa liuoksessa 1 tunnin ajan ja etäällä testin valmistelualueelta.

HUOMAUTUS: Jotta ristikontaminaation aiheuttamien väärin positiivisten riski olisi mahdollisimman pieni, älä koskaan avaa monistettua DNA:ta sisältäviä reagenssiputkia. Tämä koskee Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputkia, Neogen Reagenssin valvonnan putkia ja testitaulukon valvonnan putkia. Hävitä kontaminoituneet putket aina liottamalla niitä 1–5-tilavuusprosenttisessa (veteen laimennetussa) valkaisuaineliuoksessa tai vastaavassa liuoksessa 1 tunnin ajan etäällä testin valmistelualueelta.

Tulokset ja tulkinta

Algoritmi tulkitsee nukleiinihappojen monistuksen tunnistuksesta saatavaa valon sirontakäyrää. Ohjelmisto analysoi tulokset automaattisesti, ja tulokset värikoodataan tuloksen mukaan. Positiivinen tai negatiivinen tulos määritetään analysoimalla useita yksilöllisiä käyräparametreja. Oletetut positiiviset tulokset ilmoitetaan reaaliaikaisesti, kun taas negatiiviset ja tarkastettavat tulokset näytetään ajon valmistumisen jälkeen.

Oletetut positiiviset näytteet on vahvistettava laboratorion vakiotoimintamenetelmien mukaisesti tai noudattamalla asianmukaista vertailumenetelmää^(1, 2, 3) aloittamalla näytteen siirrosta ensisijaisesta rikastusliemestä toissijaiseen rikastusliemeen (jos käytössä), mitä seuraa kasvatusalustaan asettaminen ja isolaattien vahvistaminen asianmukaisilla biokemiallisilla ja serologisilla menetelmillä.

HUOMAUTUS: Negatiivinen näyte ei anna nollalukemaa, sillä järjestelmällä ja Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -monistusreagensseilla on tausta-RLU-lukema (suhteellinen valoyksikkö).

Joissain harvoissa tapauksissa valon sironta voi olla epätavallinen, jolloin algoritmi merkitsee sen tarkastettavaksi. Neogen suosittelee testin uusimista tarkastettavaksi merkittyjen näytteiden osalta. Jos tulokseksi tulee jatkuvasti Inspect (Tarkasta), tee varmistustesti käyttämällä itse parhaaksi katsomaasi menetelmää tai paikallisten määräysten mukaista menetelmää.

Taulukko 5: Neogen Molekyläärisen testijärjestelmän ohjelmistossa käytetyt näytteiden tulossymbolit ja niiden tulkinta.

Putken tyyppi	Putken tulossymboli	Tulos	Tulkinta
Näyte		Positiivinen	Oletettu positiivinen näyte kohdepatogeenin osalta.
Näyte		Negatiivinen	Negatiivinen näyte kohdepatogeenin osalta.
Näyte		Estetty	Näytematriisi inhiboi testin. Uusintatestaus voi olla välttämätön. Katso lisätietoja viannmäärityskohdasta ja testisetin tuoteselosteesta.
Näyte		Tarkasta	Kohdepatogeenin esiintymistä tai sen puuttumista ei voitu määrittellä. Uusintatestaus voi olla välttämätön. Katso lisätietoja viannmäärityskohdasta ja testisetin tuoteselosteesta.
Näyte		Virhe	Bioluminesenssia ei havaittu. Uusintatestaus voi olla välttämätön. Katso lisätietoja viannmäärityskohdasta ja testisetin tuoteselosteesta.



Tulosten vahvistaminen NF VALIDATION -sertifioidun menetelmän mukaisesti

Vaihtoehto 1: Käyttämällä ISO 11290⁽³⁾ -standardia aloittaen Demi Fraser -rikastamisesta.

Vaihtoehto 2: Eristäminen PALCAM-agarilla (O&A) tai kromogeenisella agarilla osana NF VALIDATION -sertifioitua *Listeria monocytogenes* -bakteerin havaitsemismenetelmää. Tunnusomaisten pesäkkeiden esiintyminen riittää vahvistamaan *Listeria monocytogenes* -bakteerien esiintymisen.

Vaihtoehto 3: Käyttämällä EN ISO 7218⁽⁵⁾-standardissa kuvattuja DNA-koettimia selektiiviseltä agarlevyltä eristettyihin pesäkkeisiin (katso vaihtoehdot 1 tai 2).

Vaihtoehto 4: Käyttämällä jotain muuta NF VALIDATION -sertifioitua menetelmää, jonka periaatteen on oltava erilainen kuin Neogen Molekyläärissä testisettissä 2 - *Listeria monocytogenes*. On käytettävä tälle toiselle validoidulle menetelmälle kuvattua koko käytäntöä. Kaikkien vahvistamisen alkua edeltävien vaiheiden on oltava kummallekin menetelmälle yhteisiä.

Jos tulokset ovat ristiriitaisia (vaihtoehtoisella menetelmällä saatu oletettu positiivinen tulos, jota ei saada vahvistettua jollakin edellä kuvatuista tavoista), laboratorion on tehtävä tarvittavat toimenpiteet saadun tuloksen validoimiseksi.

Jos tulokset ovat ristiriitaisia (Neogen Molekyläärisen testisettin 2 - *Listeria monocytogenes* saatu oletettu positiivinen tulos, jota ei saada vahvistettua jollakin edellä kuvatuista tavoista), laboratorion on tehtävä tarvittavat toimenpiteet saadun tuloksen validoimiseksi.

Jos sinulla on jotain tiettyä sovellusta tai menetelmää koskevia kysymyksiä, käy verkkosivuillamme osoitteessa www.neogen.com tai ota yhteyttä paikalliseen Neogen-edustajaan tai -jälleenmyyjään.

Liite A. Käytännön keskeystys: Lämpökäsitteltyjen lyaattien säilyttäminen ja uudelleentestaus.

1. Säilytä lämpökäsittelty lyaatti sulkemalla lyysiputki uudelleen puhtaalla suojuksella (katso ”Lyysi”, 4.5).
2. Säilytä 4–8 °C:ssa enintään 72 tuntia.
3. Valmistele säilytetty näyte monistamista varten kääntelemällä sitä 2–3 kertaa, jotta se sekoittuu.
4. Poista suojuksut putkista.
5. Aseta sekoitetut lyysiputket Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeeseen ja kuumenna 100 ± 1 °C:ssa 5 ± 1 minuuttia.
6. Poista Neogen Lyysiliuosputkiteline lämmityslohkosta ja anna sen viilentyä Neogen Molekyläärisen testijäähdytyslohkon pistokkeessa vähintään 5 minuuttia ja enintään 10 minuuttia.
7. Jatka käytäntöä edellä olevasta kohdasta ”Monistaminen”.

Viitteet:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Tuotteen tarrasymbolien selitykset

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.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.
FS00867B

Instruções do produto

Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2

Descrição e uso recomendado do produto

O Neogen® Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 é usado com o Neogen® Sistema de Detecção Molecular para a detecção rápida e específica de *Listeria monocytogenes* em amostras enriquecidas de alimentos e ambientais de processos de alimentos. O Neogen Ensaio para 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 através do seu método preferencial ou conforme especificado pelos regulamentos locais^(1, 2, 3).

O Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 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 de água, produtos farmacêuticos, cosméticos, clínicas ou veterinárias. O Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 não foi avaliado com todos os possíveis protocolos de teste nem com todas as linhagens 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 para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 com Demi Fraser Caldo contendo citrato férrico amoniacal e Fraser Caldo contendo citrato férrico amoniacal conforme necessário. Uma formulação típica desse meio pode ser vista abaixo.

Fórmula típica de Demi Fraser Caldo Base	(g/L)	Fórmula típica de Fraser Caldo Base	(g/L)
Cloreto de sódio	20 g	Cloreto de sódio	20 g
Fosfato de sódio, dibásico, anidro*	9,6 g	Fosfato de sódio, dibásico, anidro*	9,6 g
Extrato de carne	5,0 g	Extrato de carne	5,0 g
Digestão pancreática de caseína	5,0 g	Digestão pancreática de caseína	5,0 g
Digestão péptica de tecido animal	5,0 g	Digestão péptica de tecido animal	5,0 g
Extrato de levedura	5,0 g	Extrato de levedura	5,0 g
Cloreto de lítio	3,0 g	Cloreto de lítio	3,0 g
Fosfato de potássio, monobásico	1,35 g	Fosfato de potássio, monobásico	1,35 g
Esculina	1,0 g	Esculina	1,0 g
Cloridrato de acriflavina	0,0125 g	Cloridrato de acriflavina	0,025 g
Ácido nalidíxico	0,01 g	Ácido nalidíxico	0,02 g

* Substituto: Fosfato de sódio, dibásico, di-hidrato 12,0 g

Suplemento de Fraser Caldo

(Ingredientes por frasco de 10 mL. (Um frasco é adicionado a um litro de meio basal.)

Citrato férrico amoniacal 0,5 g/10 mL

pH final 7,2 ± 0,2 a 25 °C

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 para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 contém 96 testes, descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes do kit Neogen Ensaio de 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
Neogen® Ensaio para Detecção Molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> 2 Tubos de reagentes	Tubos amarelos	96 (12 tiras de 8 tubos)	Mistura de detecção e amplificação específica liofilizada	Pronto para uso
Tampas adicionais	Tampas amarelas	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, não fornecido no kit, é um meio de enriquecimento estéril, por exemplo, Demi Fraser Caldo. Não utilize água como Controle Negativo.

Segurança

O usuário deve ler, compreender e seguir todas as informações de segurança presentes nas instruções do Neogen Sistema de Detecção Molecular e do Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2. 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 para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 no diagnóstico de problemas de saúde em humanos ou animais.

O método Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 pode gerar *Listeria monocytogenes* a níveis suficientes para causar a ocorrência de natimortos e morte em mulheres grávidas e imunocomprometidos, case sejam expostos.

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

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 para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 conforme indicado na embalagem e nas instruções do produto.
- Sempre use o Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 antes do vencimento.
- Utilize o Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 para amostras de alimentos e ambientais que tenham sido validadas internamente ou por um terceiro.
- Utilize o Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 somente para superfícies, desinfetantes, protocolos e linhagens de bactérias que tenham sido aprovados 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 (NB) para os tubos de Neogen Solução de Lise. Produtos Neogen® Sample Collection 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:

- É altamente recomendável que a equipe de mulheres do laboratório seja informada sobre o risco para o desenvolvimento do feto resultante da infecção da mãe pela exposição a *Listeria monocytogenes*.
- 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 as normas vigentes do setor.
- 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 associados à contaminação ambiental:

- Siga as normas vigentes do setor referentes ao descarte de resíduos contaminados.

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 ponteiras 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) ou solução equivalente 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 mais próximo para obter mais informações.

Ao selecionar qualquer método de teste, é importante considerar que fatores externos, como métodos de amostragem, protocolos de teste, preparo de amostras, manipulação e técnica laboratorial utilizada, podem influenciar os 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 Controle de Matriz (MC) para determinar se a matriz pode influenciar os resultados do Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2. Teste diversas amostras representativas da matriz, ou seja, amostras obtidas a partir de diferentes origens, durante qualquer período de validação quando adotar o método da Neogen, ou 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. Entre em contato com seu 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 para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 a 2–8 °C. 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 resseladas a 2–8 °C por, no máximo, 60 dias.

Não utilize o Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 após o 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 do Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 podem conter materiais potencialmente 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"⁽⁶⁾.

Consulte a seção "Instruções específicas para métodos comprovados" para obter os requisitos específicos:

Tabela 3 para protocolos de enriquecimento de acordo com o AOAC® *Official Method of Analysis*SM 2016.08 e Certificado AOAC® *Performance Tested Method*SM #081501.

Tabela 4 para protocolos de enriquecimento conforme o certificado NF Validation 3M 01/15-09/16.

Enriquecimento de amostra

As Tabelas 2, 3 e 4 oferecem diretrizes sobre enriquecimento para alimentos e amostras ambientais. É responsabilidade do usuário validar os protocolos de amostragem alternativos ou diluição para garantir que este método de teste atenda aos critérios do usuário.

Alimentos

1. Deixe que o meio de enriquecimento Demi Fraser Caldo (incluindo o citrato férrico amoniacal) equilibre à temperatura ambiente do laboratório.
2. Misture asépticamente o meio de enriquecimento e a amostra conforme as Tabelas 2, 3 ou 4. Para carnes e amostras altamente particuladas, recomenda-se o uso de sacos de amostra com filtro.
3. Homogeneíze totalmente por mistura, esmagamento (no stomacher) ou mistura manual por 2 ± 0,2 minutos. Incube a 37 ± 1 °C conforme as Tabelas 2, 3 ou 4.
4. Para laticínios crus (consulte 2, 3 ou 4), transfira 0,1 mL do enriquecimento primário para 10 mL de Fraser Caldo. Armazene a 37 ± 1 °C por até 20–24 horas.

Amostras ambientais

Os dispositivos de coleta de amostra podem ser uma esponja hidratada com uma solução neutralizante para desativar os efeitos dos desinfetantes. A Neogen recomenda o uso de uma esponja de celulose livre de biocidas. A solução neutralizante pode ser Caldo Neutralizante Dey-Engley (D/E) ou Caldo Lethen. Recomenda-se desinfetar a área após a amostragem.

ADVERTÊNCIA: Caso escolha utilizar tampão neutralizante (NB) 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.

O tamanho recomendado da área de amostragem para confirmar a presença ou ausência do patógeno na superfície é de, no mínimo, 100 cm² (10 cm x 10 cm ou 4" x 4"). Caso a amostragem seja realizada com uma esponja, toda a área deve ser coberta em duas direções (esquerda e direita, depois para cima e para baixo) ou as amostras ambientais devem ser coletadas em conformidade com o protocolo de amostragem vigente ou de acordo com as diretrizes do FDA BAM⁽¹⁾, USDA FSIS MLG⁽²⁾ ou ISO 18593⁽⁷⁾.

1. Deixe que o meio de enriquecimento Demi Fraser Caldo (incluindo o citrato férrico amoniacal) equilibre à temperatura ambiente do laboratório.
2. Misture assepticamente o meio de enriquecimento e a amostra conforme as Tabelas 2, 3 ou 4.
3. Homogeneíze totalmente por mistura, esmagamento (no stomacher) ou mistura manual por 2 ± 0,2 minutos. Incube a 37 ± 1 °C por 24–30 horas conforme as Tabelas 2, 3 ou 4.

Tabela 2: Protocolos gerais de enriquecimento a 37 ± 1 °C usando o Demi Fraser Caldo e o Fraser Caldo conforme necessário.

Matriz de amostra	Tamanho da amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento (mL)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Enriquecimento primário (Demi Fraser Caldo) ^(a)			Enriquecimento secundário (Fraser Caldo) ^(a)			Volume de análise da amostra ^(b)
				Tamanho da amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento (mL)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Tamanho da amostra	Temperatura de enriquecimento (°C)	Tempo de Enriquecimento (horas)	
Carnes termoprocessadas, cozidas, curadas, aves, pescados e peixes	25 g	225	24–30							
Produtos lácteos termoprocessados/pasteurizados	25 g	225	24–30							
Hortifruti e vegetais	25 g	225	24–30							
Alimentos compostos	25 g	225	24–30							
Amostras ambientais ^(a)	1 esponja	100 ou 225	24–30							
	1 swab	10	24–30							
Carnes cruas, aves, pescados e peixes	25 g	475	28–32							
Laticínios crus	25 g	225	20–24							10 µL

(a) O Demi Fraser Caldo e o Fraser Caldo devem sempre ser suplementados com suplemento de Fraser Caldo (citrato férrico amoniacal) durante o enriquecimento primário ou secundário.

(b) Volume de amostra transferido para tubos de Neogen Solução de Lise. Consulte a etapa 4.6 da seção Lise.

Instruções específicas para métodos comprovados
AOAC® Official Method of AnalysisSM 2016.08
AOAC® Performance Tested MethodSM N° 081501



Nos programas OMASM e PTMSM do Instituto de Pesquisa AOAC, o Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 foi constatado como um método eficiente para a detecção de *Listeria monocytogenes*. As matrizes testadas no estudo são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Protocolos de enriquecimento usando o Demi Fraser Caldo^(a) 37 ± 1 °C de acordo com AOAC OMASM 2016.08 e PTMSM Certificado N° 081501.

Matriz de amostra		Tamanho da amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento (mL)	Tempo de Enriquecimento (horas)
Salsicha de carne bovina, queijo fresco, sorvete de baunilha, queijo cottage de leite com 4% de gordura, achocolatado de leite integral 3%, alface romana, espinafre cru ensacado, salmão defumado a frio		25 g	225	24–30
Carne de frango crua		25 g	475	28–32
Embutido de peru		125 g	1125	24–30
Melão ^(b)		Melão inteiro	Volume suficiente para o melão flutuar	26–30
Amostras ambientais:	Aço inoxidável	1 esponja	225	24–30
	Concreto selado	1 esponja	100	24–30
	Plástico ^(c)	1 swab	10	24–30

Todas as amostras para a validação da AOAC foram homogeneizadas no stomacher, salvo indicação em contrário.

- (a) O Demi Fraser Caldo e o Fraser Caldo devem sempre ser suplementados com suplemento de Fraser Caldo (citrato férrico amoniacal) durante o enriquecimento primário ou secundário.
- (b) Homogeneíze a amostra por mistura manual.
- (c) Homogeneíze a amostra por vórtex.

NF VALIDATION da AFNOR Certification



3M 01/15-09/16

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

Para obter mais informações sobre o término da validade, consulte o certificado NF VALIDATION disponível no site supracitado.

Método certificado NF VALIDATION em conformidade com ISO 16140-2⁽⁶⁾ em comparação com ISO 11290⁽³⁾

Escopo da validação: Amostras de todos os alimentos humanos e ambientais (com exceção de amostras de produção primária)

Preparo da amostra: As amostras devem ser preparadas conforme EN ISO 11290-1⁽³⁾ e EN ISO 6887⁽⁸⁾

Versão do software: Consulte o certificado

Tabela 4: Protocolos de enriquecimento conforme o método certificado NF VALIDATION 3M 01/15-09/16 a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ usando Demi Fraser Caldo e Fraser Caldo conforme necessário.

Protocolo geral	Tamanho da amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento (mL)	Temperatura de Enriquecimento ($\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Volume de análise da amostra ^(a)	Ponto de interrupção aceitável
Amostras de todos os alimentos (exceto carnes cruas, pescados crus e laticínios crus)	25 g	225	37	24–30	20 μL	<ul style="list-style-type: none"> • Demi Fraser Caldo até 72 horas • Lisado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ • Lisado a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ até 72 horas
Amostras ambientais	25 g, 1 swab, 1 lenço					

Protocolo específico	Enriquecimento primário (Demi Fraser Caldo) ^(b)				Enriquecimento secundário (Fraser Caldo) ^(b)				Ponto de interrupção aceitável
	Tamanho da amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento (mL)	Temperatura de Enriquecimento ($\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Tamanho da amostra	Temperatura de Enriquecimento ($\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Volume de análise da amostra ^(c)	
Carnes cruas, pescados crus e laticínios crus	25 g	225	37	20–24	Transfira 0,1 mL para 10 mL de Fraser Caldo	37	20–24	10 μL	<ul style="list-style-type: none"> • Fraser Caldo até 72 horas • Lisado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ • Lisado a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ até 72 horas

(a) Volume de amostra transferido para tubos de Neogen Solução de Lise. Consulte a etapa 4.6 da seção Lise.

(b) O Demi Fraser Caldo e o Fraser Caldo devem sempre ser suplementados com suplemento de Fraser Caldo (citrato férrico amoniacal) durante o enriquecimento primário ou secundário.

(c) Volume de amostra transferido para tubos de Neogen Solução de Lise. Consulte a etapa 4.6 da seção Lise.

NOTA: Amostras mais pesadas que 25 g não foram testadas no estudo NF Validation.

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 ou solução equivalente 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; utilize o bloco de resfriamento à temperatura ambiente do laboratório ($20\text{--}25 \text{ }^\circ\text{C}$).

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

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

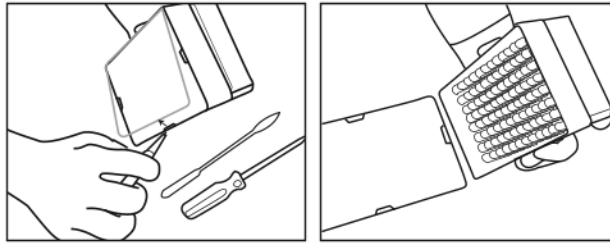
Preparo do Neogen® Equipamento de Detecção Molecular

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.

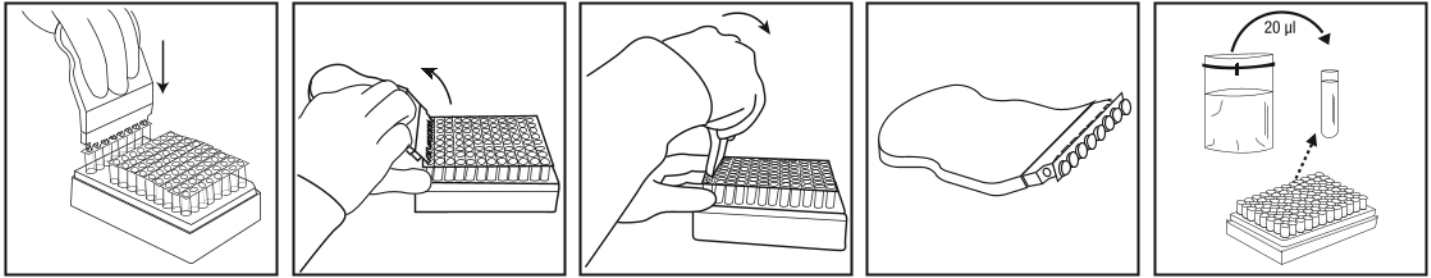
Lise

Remova o fundo do Neogen Rack de Solução de Lise com uma chave de fenda ou espátula antes de inserir o Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular.

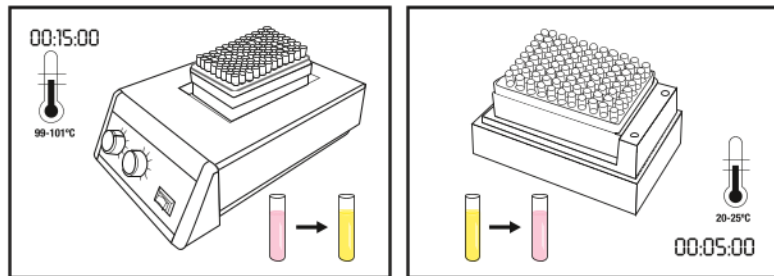


1. Deixe que os tubos de solução de Lise (Neogen Solução de Lise) cheguem à temperatura ambiente (20–25 °C), deixando as racks fora de refrigeração de um dia para o outro (16–18 horas). A alternativa para equilibrar os tubos Neogen Solução de Lise à temperatura ambiente é posicioná-los na bancada do 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.
3. Remova o caldo de enriquecimento da incubadora.
4. Um tubo de Neogen Solução de Lise é necessário para cada amostra e para a amostra do Controle Negativo (NC) (meio de enriquecimento esterilizado).
 - 4.1 As tiras de tubos Neogen Solução de Lise podem ser cortadas para obter o número desejado de tubos. Selecione o número de tubos de Neogen Solução de Lise individuais ou as tiras de 8 tubos necessárias. Coloque os tubos de Neogen Solução de Lise em um rack vazio.
 - 4.2 Para evitar contaminação cruzada, destampe uma tira de tubo Neogen Solução de Lise de cada vez e utilize uma nova ponteira de pipeta para cada etapa da transferência.
 - 4.3 Transfira as amostras enriquecidas para os tubos 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 Utilize a Neogen® Ferramenta de Tampar/Destampar para Detecção Molecular – Lise para destampar uma tira de tubos Neogen Solução de Lise – uma tira de cada vez.
 - 4.5 Descarte a tampa do tubo 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 em um tubo Neogen Solução de Lise, exceto se indicado de outro modo nos protocolos das tabelas 2, 3, ou 4 (por exemplo, laticínios crus ou quando as amostras com tampão neutralizante usarem 10 µL).



5. Repita da etapa 4.4 à 4.6 até que todas as amostras individuais tenham sido adicionadas a um tubo Neogen Solução de Lise correspondente na tira.
6. Quando todas as amostras tiverem sido transferidas, transfira **20 µL de NC** (meio de enriquecimento estéril, por exemplo, Demi Fraser Caldo) 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 a rack descoberta 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 maneira 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 a rack descoberta de tubos Neogen Solução de Lise do bloco de aquecimento 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, deve ser colocado diretamente sobre a bancada do laboratório. Quando resfriada, a 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.



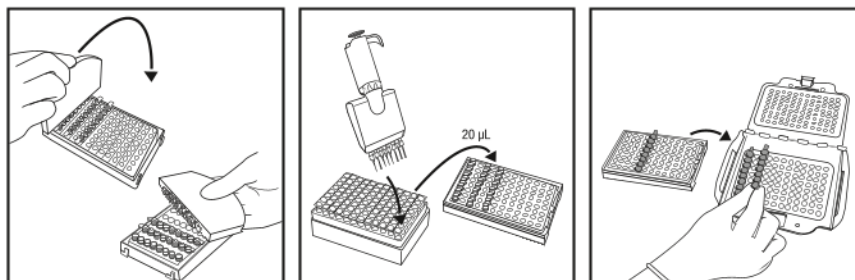
Amplificação

1. É necessário um Tubo de Reagente de Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 para cada amostra e para o NC.
 - 1.1 As tiras de tubos de reagentes podem ser cortadas para obter o número de tubos desejado. Selecione o número de Tubos de Reagente individuais ou de tiras de 8 tubos necessárias para Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2.
 - 1.2 Coloque os Tubos de Reagente Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 em uma rack vazia.
 - 1.3 Evite agitar os pellets reagentes da parte inferior dos tubos.
2. Selecione um tubo Neogen Controle de Reagentes e coloque-o na rack.
3. Para evitar contaminação cruzada, destampe uma tira de Tubo Reagente para Neogen Ensaio de Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 de cada vez e utilize uma nova ponteira de pipeta para cada etapa da transferência.
4. Transfira o lisado para Tubos de Reagente Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 e tubo Neogen Controle de Reagentes conforme descrito abaixo:

Primeiro, transfira cada amostra de lisado para Tubos de Reagentes individuais de Neogen Ensaio de Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 seguido do NC. **Por último**, hidrate o tubo Neogen Controle de Reagentes.

5. Use a Neogen® Ferramenta de Tampar/Destampar para Detecção Molecular – Reagente para destampar o Tubo de Reagente para Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 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) do tubo de Neogen Solução de Lise para o Tubo de Reagente do Neogen Ensaio de Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 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 Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 correspondente na tira.
 - 5.3 Cubra os Tubos de Reagentes para Neogen Ensaio de Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 com as tampas extras fornecidas e utilize o lado arredondado da Neogen Ferramenta de Tampar/Destampar para Detecção Molecular – Reagente para apertar com um movimento de vai e vem, garantindo que a tampa fique bem apertada.
 - 5.4 Repita as etapas 5.1 a 5.3, conforme necessário, para o número de amostras a serem testadas.
 - 5.5 Quando todas as amostras de lisado tiverem sido transferidas, repita as etapas de 5.1 para transferir 20 µL de lisado do NC para o Tubo Reagente de Neogen Ensaio de Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2.
 - 5.6 Transfira 20 µL de lisado NC para um tubo 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 75 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 ou solução equivalente 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 Tubos de Reagente para Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2, Neogen Controle de Reagentes e Tubos de 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 Inspeccionar serão exibidos após a conclusão da execução.

Amostras positivas presuntivas devem ser confirmadas de acordo com os procedimentos operacionais padrão de laboratório, ou seguindo o método de confirmação de referência apropriado^(1,2,3), começando com a transferência do enriquecimento primário para caldo de enriquecimento secundário (se aplicável), seguida pelo plaqueamento e a confirmação dos isolados usando métodos bioquímicos e sorológicos adequados.

NOTA: Até mesmo uma amostra negativa não resultará em leitura zero uma vez que o sistema e os reagentes de amplificação do Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 têm uma leitura de unidade de luz relativa (RLU) 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 ou conforme especificado pelos regulamentos locais.

Tabela 5: Símbolos de resultado para amostras e interpretação conforme fornecidos pelo software do Neogen Sistema de Detecção Molecular.

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		Inspecionar	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.

Confirmação de resultados segundo o método certificado NF VALIDATION

Opção 1: Uso da norma ISO 11290⁽³⁾ a partir do enriquecimento de Demi Fraser.

Opção 2: Por isolamento em Ágar PALCAM ou ágar (O&A) cromogênico formando parte do método do certificado NF VALIDATION para a detecção da *Listeria monocytogenes*. A presença de colônias características é suficiente para confirmar a presença de *Listeria monocytogenes*.

Opção 3: Utilização de sondas de ácido nucleico conforme descrito na norma EN ISO 7218⁽⁵⁾, em colônias isoladas, ágar seletivo (consulte as Opções 1 ou 2).

Opção 4: Utilização de algum outro método certificado pelo NF VALIDATION, cujo princípio seja diferente do Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2. Deve ser usado o protocolo completo descrito para esse segundo método comprovado. Todas as etapas anteriores ao início da confirmação devem ser comuns a ambos os métodos.

Na ocorrência de resultados divergentes (positivo presuntivo com o método alternativo, não confirmado por um dos meios acima descritos) o laboratório deve seguir as etapas necessárias para garantir a validade dos resultados obtidos.

Na ocorrência de resultados divergentes (positivo presuntivo com o Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2, não confirmado por um dos meios acima descritos) o laboratório deve seguir as etapas necessárias para garantir a validade dos resultados obtidos.

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.

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

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

Referências:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Explicação dos símbolos dos rótulos de produtos

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.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.
FS00867B

Πληροφορίες προϊόντος

Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes*

Περιγραφή του προϊόντος και σκοπός χρήσης

Η Neogen® Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* χρησιμοποιείται με το Neogen® Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης για τη γρήγορη και εξειδικευμένη ανίχνευση του *Listeria monocytogenes*, σε εμπλουτισμένα δείγματα τροφίμων και περιβαλλοντικά δείγματα. Οι Neogen Δοκιμασίες Μοριακής Ανίχνευσης χρησιμοποιούν ισοθερμικό πολλαπλασιασμό με μεσολάβηση βρόχου για τον γρήγορο πολλαπλασιασμό αλληλουχιών νουκλεϊνικών οξέων με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, σε συνδυασμό με βιοφωταύγεια για την ανίχνευση του πολλαπλασιασμού. Τα υποθετικά θετικά αποτελέσματα αναφέρονται σε πραγματικό χρόνο, ενώ τα αρνητικά αποτελέσματα εμφανίζονται μετά την ολοκλήρωση της δοκιμασίας. Τα υποθετικά θετικά αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που προτιμάτε ή όπως καθορίζεται από τους τοπικούς κανονισμούς^(1, 2, 3).

Η Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* προορίζεται για χρήση σε εργαστηριακό περιβάλλον από επαγγελματίες, εκπαιδευμένους στις εργαστηριακές τεχνικές. Η Neogen δεν έχει τεκμηριώσει τη χρήση αυτού του προϊόντος σε βιομηχανίες άλλες από εκείνες των τροφίμων και ποτών. Για παράδειγμα, η Neogen δεν έχει τεκμηριώσει αυτό το προϊόν για τον έλεγχο δειγμάτων νερού, φαρμακευτικών προϊόντων, καλλυντικών, κλινικών ή κτηνιατρικών δειγμάτων. Η Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* δεν έχει αξιολογηθεί με όλα τα πιθανά πρωτόκολλα ελέγχου ή με όλα τα πιθανά στελέχη βακτηριδίων.

Όπως και με όλες τις δοκιμαστικές μεθόδους, η προέλευση, η σύνθεση και η ποιότητα του μέσου εμπλουτισμού μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Παράγοντες όπως οι μέθοδοι δειγματοληψίας, τα πρωτόκολλα ελέγχου, η προετοιμασία των δειγμάτων, ο χειρισμός και η εργαστηριακή τεχνική μπορούν επίσης να επηρεάσουν τα αποτελέσματα. Η Neogen συνιστά την αξιολόγηση της μεθόδου, συμπεριλαμβανομένου του μέσου εμπλουτισμού, στο περιβάλλον του χρήστη με τη χρήση επαρκούς αριθμού δειγμάτων με συγκεκριμένα τρόφιμα και μικροβιακές προκλήσεις ώστε να διασφαλιστεί ότι η μέθοδος πληροί τα κριτήρια του χρήστη.

Η Neogen αξιολόγησε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* με Ζυμό Demi-Fraser που περιείχε Εναμμώνιο Κιτρικός Σίδηρο και με Ζυμό Fraser που περιείχε Εναμμώνιο Κιτρικός Σίδηρο, βάσει των απαιτήσεων. Μια τυπική σύνθεση αυτού του μέσου ακολουθεί παρακάτω.

Τυπική σύνθεση Βάσης Ζυμού Demi-Fraser	(g/L)	Τυπική σύνθεση Βάσης Ζυμού Fraser	(g/L)
Χλωριούχο νάτριο	20 g	Χλωριούχο νάτριο	20 g
Φωσφορικό νάτριο, διβασικό, άνυδρο*	9,6 g	Φωσφορικό νάτριο, διβασικό, άνυδρο*	9,6 g
Εκχύλισμα βόειου κρέατος	5,0 g	Εκχύλισμα βόειου κρέατος	5,0 g
Παγκρεατική πέψη Καζεΐνης	5,0 g	Παγκρεατική πέψη Καζεΐνης	5,0 g
Πεπτική πέψη Ζωικού ιστού	5,0 g	Πεπτική πέψη Ζωικού ιστού	5,0 g
Εκχύλισμα Ζύμης	5,0 g	Εκχύλισμα Ζύμης	5,0 g
Χλωριούχο λίθιο	3,0 g	Χλωριούχο λίθιο	3,0 g
Φωσφορικό κάλιο, μονοβασικό	1,35 g	Φωσφορικό κάλιο, μονοβασικό	1,35 g
Εσκουλίνη	1,0 g	Εσκουλίνη	1,0 g
Υδροχλωρική ακριβλαβίνη	0,0125 g	Υδροχλωρική ακριβλαβίνη	0,025 g
Ναλιδιξικό οξύ	0,01 g	Ναλιδιξικό οξύ	0,02 g

* Υποκατάστατο: Φωσφορικό νάτριο, διβασικό, διυδρικό 12,0 g

Συμπλήρωμα Ζυμού Fraser

(Συστατικά ανά φιαλίδιο 10 mL. Ένα φιαλίδιο προστίθεται σε ένα λίτρο βασικού θρεπτικού υλικού.)

Εναμμώνιος κιτρικός σίδηρος 0,5 g/10 mL

Τελικό pH 7,2 ± 0,2 στους 25°C

Το Neogen® Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης προορίζεται για χρήση με δείγματα που έχουν υποβληθεί σε θερμική επεξεργασία κατά τη διάρκεια του σταδίου λύσης της δοκιμασίας, το οποίο είναι σχεδιασμένο για την καταστροφή των οργανισμών που είναι παρόντες στο δείγμα. Δείγματα που δεν έχουν υποβληθεί στην κατάλληλη θερμική

επεξεργασία κατά τη διάρκεια του σταδίου λύσης της δοκιμασίας μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανός βιολογικός κίνδυνος και ΔΕΝ πρέπει να εισάγονται στο Neogen Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης.

Η Neogen Food Safety φέρει πιστοποίηση σύμφωνα με το πρότυπο του Διεθνούς Οργανισμού Τυποποίησης (ISO) 9001 για σχεδιασμό και παραγωγή.

Το κιτ ελέγχου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* περιέχει 96 δοκιμαστικά τεστ που περιγράφονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Επιμέρους στοιχεία του κιτ Neogen Δοκιμής Μοριακής Ανίχνευσης

Είδος	Ταυτοποίηση	Ποσότητα	Περιεχόμενα	Σχόλια
Neogen® Διάλυμα Λύσης (LS)	Ροζ διάλυμα σε διαφανείς δοκιμαστικούς σωλήνες	96 (12 σειρές των 8 δοκιμαστικών σωλήνων)	580 μL LS ανά δοκιμαστικό σωλήνα	Σε στατώ και έτοιμο προς χρήση
Neogen® Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – <i>Listeria monocytogenes</i> Δοκιμαστικοί Σωλήνες Αντιδραστηρίων	Κίτρινοι δοκιμαστικοί σωλήνες	96 (12 σειρές των 8 δοκιμαστικών σωλήνων)	Λυοφιλοποιημένο ειδικό μείγμα πολλαπλασιασμού και ανίχνευσης	Έτοιμο προς χρήση
Επιπλέον πώματα	Κίτρινα πώματα	96 (12 σειρές των 8 πωμάτων)		Έτοιμο προς χρήση
Neogen® Έλεγχος Αντιδραστηρίου (RC)	Διαφανείς δοκιμαστικοί σωλήνες με αρθρωτό πώμα	16 (2 σακουλάκια των 8 ατομικών δοκιμαστικών σωλήνων)	Λυοφιλοποιημένος έλεγχος DNA, μείγμα πολλαπλασιασμού και ανίχνευσης	Έτοιμο προς χρήση

Ο Αρνητικός Έλεγχος, που δεν παρέχεται στο κιτ, είναι ένα στείρο μέσο εμπλουτισμού, π.χ. Ζυμός Demi-Fraser. Μη χρησιμοποιείτε νερό ως Αρνητικό Έλεγχο.

Ασφάλεια

Ο χρήστης πρέπει να διαβάσει, να κατανοήσει και να ακολουθήσει όλες τις πληροφορίες ασφαλείας στις οδηγίες για το Neogen Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης και την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes*. Φυλάξτε τις οδηγίες ασφαλείας για μελλοντική αναφορά.

- Δ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ:** Υποδεικνύει μια επικίνδυνη κατάσταση, η οποία, εάν δεν αποφευχθεί, ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα θάνατο ή σοβαρό τραυματισμό ή/και υλική ζημιά.
- ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Υποδεικνύει μια δυνητικά επικίνδυνη κατάσταση, η οποία, εάν δεν αποφευχθεί, ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα υλική ζημιά.

⚠ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Μη χρησιμοποιείτε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* για τη διάγνωση καταστάσεων σε ανθρώπους ή ζώα.

Η Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* ενδέχεται να παράξει *Listeria monocytogenes* σε επίπεδα επαρκή για την πρόκληση θνησιγένειας και θνησιμότητας σε εγκύους και άτομα σε ανοσοκαταστολή, σε περίπτωση έκθεσης.

Ο χρήστης πρέπει να εκπαιδευθεί το προσωπικό του στις τρέχουσες κατάλληλες τεχνικές ελέγχου: για παράδειγμα, Καλές Εργαστηριακές Πρακτικές, ISO/IEC 17025⁽⁴⁾ ή ISO 7218⁽⁵⁾.

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα που οδηγεί στην αποδέσμευση μολυσμένου προϊόντος:

- Ακολουθείτε το πρωτόκολλο και διενεργείτε τους ελέγχους ακριβώς όπως περιγράφεται στις πληροφορίες του προϊόντος.
- Φυλάσσετε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* όπως υποδεικνύεται στη συσκευασία και στις πληροφορίες προϊόντος.
- Χρησιμοποιείτε πάντοτε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* μέχρι την ημερομηνία λήξης της.
- Χρησιμοποιείτε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* για περιβαλλοντικά δείγματα που έχουν επικυρωθεί εσωτερικά ή από τρίτο μέρος.
- Χρησιμοποιείτε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* μόνο για επιφάνειες, αποστειρωτικά μέσα, πρωτόκολλα και βακτηριακά στελέχη που έχουν επικυρωθεί εσωτερικά ή από τρίτο μέρος.



- Για ένα περιβαλλοντικό δείγμα που περιέχει Ρυθμιστικό Διάλυμα Ουδετεροποίησης με αρυλ-σουλφονικό σύμπλοκο, πραγματοποιήστε αραιώση 1:2 πριν τον έλεγχο (1 μέρος δείγματος σε 1 μέρος στείρου ζωμού εμπλουτισμού). Μια άλλη επιλογή είναι να μεταφέρετε 10 µL εμπλουτισμού NB μέσα στους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης. Προϊόντα Συλλογής Δειγμάτων της Neogen® που περιέχουν Ρυθμιστικό Διάλυμα Ουδετεροποίησης με αρυλ-σουλφονικό σύμπλοκο: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G και HS2410NB2G.

Για να μειώσετε τον κίνδυνο που σχετίζεται με την έκθεση σε χημικές ουσίες και βιολογικούς κινδύνους:

- Συστήνεται έντονα το γυναικείο εργαστηριακό προσωπικό να ενημερωθεί σχετικά με τον κίνδυνο για αναπτυσσόμενα έμβρυα που προκύπτει από λοίμωξη της μητέρας μέσω έκθεσης στο *Listeria monocytogenes*.
- Διενεργείτε τον έλεγχο παθογόνων σε κατάλληλα εξοπλισμένο εργαστήριο υπό τον έλεγχο εκπαιδευμένου προσωπικού. Επωασμένα μέσα εμπλουτισμού και εξοπλισμός ή επιφάνειες που έχουν έρθει σε επαφή με επωασμένα μέσα εμπλουτισμού μπορεί να περιέχουν παθογόνα σε επίπεδα επαρκή ώστε να προκαλέσουν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία.
- Τηρείτε πάντοτε τις σύνηθες πρακτικές εργαστηριακής ασφάλειας, όπως χρήση κατάλληλης προστατευτικής ενδυμασίας και προστασίας ματιών, όταν χειρίζεστε αντιδραστήρια και μολυσμένα δείγματα.
- Αποφεύγετε την επαφή με τα περιεχόμενα των μέσων εμπλουτισμού και με τους δοκιμαστικούς σωλήνες αντιδραστήριου μετά τον πολλαπλασιασμό.
- Απορρίψτε τα εμπλουτισμένα δείγματα σύμφωνα με τα τρέχοντα πρότυπα της βιομηχανίας.
- Δείγματα που δεν έχουν υποβληθεί στην κατάλληλη θερμική επεξεργασία κατά τη διάρκεια του σταδίου λύσης της δοκιμασίας μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανός βιολογικός κίνδυνος και ΔΕΝ πρέπει να εισάγονται στο Neogen Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης.

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με διασταυρούμενη μόλυνση κατά την προετοιμασία της δοκιμασίας:

- Φοράτε πάντοτε γάντια (για την προστασία του χρήστη και την πρόληψη εισαγωγής νουκλεασών).

Για τη μείωση των κινδύνων που σχετίζονται με τη μόλυνση του περιβάλλοντος:

- Ακολουθείτε τα τρέχοντα πρότυπα της βιομηχανίας για την απόρριψη μολυσμένων αποβλήτων.

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με την έκθεση σε καυτά υγρά:

- Μην υπερβαίνετε τη συνιστώμενη ρύθμιση θερμοκρασίας στον θερμαντήρα.
- Μην υπερβαίνετε τον συνιστώμενο χρόνο θέρμανσης.
- Χρησιμοποιείτε ένα κατάλληλο, βαθμονομημένο θερμόμετρο για να επαληθεύσετε τη θερμοκρασία του Neogen® Ένθετου για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρας Μοριακής Ανίχνευσης (π.χ. θερμόμετρο μερικής εμβύθισης ή ψηφιακό θερμόμετρο θερμοστοιχείου, όχι θερμόμετρο ολικής εμβύθισης). Το θερμόμετρο πρέπει να τοποθετείται στην προβλεπόμενη θέση στο Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με διασταυρούμενη μόλυνση κατά την προετοιμασία της δοκιμασίας:

- Αλλάξτε γάντια πριν από την ενυδάτωση των σφαιριδίων αντιδραστήριου.
- Συνιστάται να χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα, με φραγμό για αερολύματα (με φίλτρο), ρύγχη πιπέτας κατηγορίας μοριακής βιολογίας.
- Χρησιμοποιείτε νέο ρύγχος πιπέτας για κάθε μεταφορά δείγματος.
- Χρησιμοποιείτε Καλές Εργαστηριακές Πρακτικές για τη μεταφορά του δείγματος από τον δοκιμαστικό σωλήνα εμπλουτισμού στον δοκιμαστικό σωλήνα λύσης. Για να αποφευχθεί η μόλυνση της πιπέτας, ο χρήστης μπορεί να επιλέξει να προσθέσει ένα ενδιάμεσο βήμα μεταφοράς. Για παράδειγμα, ο χρήστης μπορεί να μεταφέρει κάθε εμπλουτισμένο δείγμα μέσα σε έναν αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα.
- Χρησιμοποιείτε σταθμό εργασίας μοριακής βιολογίας που να περιέχει μικροβιοκτόνο λυχνία, όπου είναι διαθέσιμη. Απολυμαίνετε περιοδικά τους πάγκους και τον εξοπλισμό του εργαστηρίου (πιπέτες, εργαλεία σφράγισης/αποσφράγισης κτλ.) με διάλυμα οικιακής χλωρίνης 1-5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) ή με διάλυμα απομάκρυνσης DNA.

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με ψευδώς θετικό αποτέλεσμα:

- Μην ανοίγετε ποτέ τους δοκιμαστικούς σωλήνες αντιδραστήριου μετά τον πολλαπλασιασμό.
- Απορρίψτε πάντοτε τους μολυσμένους δοκιμαστικούς σωλήνες μουλιάζοντάς τους σε διάλυμα οικιακής χλωρίνης ή αντίστοιχο διάλυμα 1-5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) για 1 ώρα και μακριά από την περιοχή προετοιμασίας της δοκιμασίας.
- Μην κλιβανίσετε ποτέ τους δοκιμαστικούς σωλήνες αντιδραστήριου μετά τον πολλαπλασιασμό.

Για επιπλέον πληροφορίες συμβουλευθείτε το Φύλλο Δεδομένων Ασφαλείας και τους τοπικούς κανονισμούς σχετικά με την απόρριψη.

Εάν έχετε ερωτήσεις σχετικά με συγκεκριμένες εφαρμογές ή διαδικασίες, παρακαλούμε επισκεφθείτε την ιστοσελίδα www.neogen.com ή επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο ή διανομέα της Neogen.

Ευθύνη του χρήστη

Οι χρήστες είναι υπεύθυνοι να εξοικειωθούν με τις οδηγίες και τις πληροφορίες του προϊόντος. Επισκεφθείτε την ιστοσελίδα μας στο www.neogen.com ή επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο ή διανομέα της Neogen για περισσότερες πληροφορίες.

Κατά την επιλογή μίας μεθόδου ελέγχου, είναι σημαντικό να αναγνωρίζετε ότι εξωτερικοί παράγοντες, όπως μέθοδοι δειγματοληψίας, πρωτόκολλα ελέγχου, προετοιμασία και χειρισμός δειγμάτων και η εργαστηριακή τεχνική μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα.

Αποτελεί ευθύνη του χρήστη η επιλογή οποιασδήποτε μεθόδου ή προϊόντος ελέγχου, για να αξιολογήσει έναν επαρκή αριθμό δειγμάτων με κατάλληλα είδη τροφίμων και μικροβιακές προκλήσεις, ώστε η επιλεγμένη μέθοδος να ικανοποιεί τα κριτήρια του χρήστη.

Αποτελεί επίσης ευθύνη του χρήστη να καθορίσει ότι όλες οι μέθοδοι δοκιμασίας και τα αποτελέσματα ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις των πελατών και των προμηθευτών του.

Όπως και με κάθε μέθοδο ελέγχου, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τη χρήση οποιουδήποτε προϊόντος Neogen Food Safety δεν συνιστούν εγγύηση της ποιότητας των σχετικών τροφίμων ή των διαδικασιών που υποβάλλονται σε έλεγχο.

Για να βοηθήσει τους πελάτες να αξιολογήσουν τη μέθοδο για τις διάφορες μήτρες τροφίμων, η Neogen έχει αναπτύξει το κιτ Neogen® Πίνακας Ελέγχου Μοριακής Ανίχνευσης. Όταν χρειάζεται, χρησιμοποιήστε τον Πίνακα Ελέγχου (MC) για να προσδιορίσετε εάν η μήτρα έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει τα αποτελέσματα από την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes*. Ελέγξτε διάφορα δείγματα που είναι αντιπροσωπευτικά της μήτρας, δηλ. δείγματα που λαμβάνονται από διαφορετική προέλευση, κατά τη διάρκεια οποιασδήποτε περιόδου επικύρωσης όταν υιοθετείτε τη μέθοδο της Neogen, ή όταν ελέγχετε νέες ή άγνωστες μήτρες ή μήτρες που έχουν υποβληθεί σε αλλαγές στις πρώτες ύλες ή στην επεξεργασία.

Μια μήτρα μπορεί να οριστεί ως ένας τύπος προϊόντος με ενδογενείς ιδιότητες όπως σύνθεση και επεξεργασία. Οι διαφορές μεταξύ των μητρών μπορεί να είναι απλές, όπως οι επιδράσεις που προκαλούνται από διαφορές στην επεξεργασία ή στην παρουσίασή τους, για παράδειγμα, ακατέργαστο έναντι παστεριωμένου, φρέσκο έναντι αποξηραμένου κτλ.

Περιορισμός εγγυήσεων / Περιορισμένη αποκατάσταση

ΕΚΤΟΣ ΕΑΝ ΔΗΛΩΝΕΤΑΙ ΡΗΤΑ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΕΝΗΣ ΕΓΓΥΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΤΟΜΙΚΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ, Η ΝΕΟΓΕΝ ΠΑΡΑΙΤΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΡΗΤΕΣ ΚΑΙ ΕΝΝΟΟΥΜΕΝΕΣ ΕΓΓΥΗΣΕΙΣ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΑ ΑΛΛΑ ΟΧΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ, ΟΠΟΙΩΝΔΗΠΟΤΕ ΕΓΓΥΗΣΕΩΝ ΕΜΠΟΡΕΥΣΙΜΟΤΗΤΑΣ Ή ΚΑΤΑΜΗΛΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΜΙΑ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ. Εάν οποιοδήποτε προϊόν Neogen Food Safety είναι ελαττωματικό, η Neogen ή ο εξουσιοδοτημένος διανομέας της, σύμφωνα με την κρίση τους, θα αντικαταστήσουν ή επιστρέψουν την αξία αγοράς του προϊόντος. Αυτοί είναι οι αποκλειστικοί τρόποι αποκατάστασης. Επικοινωνήστε με τον αντιπρόσωπο της Neogen ή τον εξουσιοδοτημένο διανομέα της Neogen για περαιτέρω ερωτήσεις.

Περιορισμός της ευθύνης της Neogen

Η ΝΕΟΓΕΝ ΔΕΝ ΕΥΘΥΝΕΤΑΙ ΓΙΑ ΟΠΟΙΟΔΗΠΟΤΕ ΑΠΩΛΕΙΑ Ή ΖΗΜΙΑ, ΕΙΤΕ ΑΜΕΣΗ, ΕΜΜΕΣΗ, ΕΙΔΙΚΗ, ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΗ Ή ΑΠΟΘΕΤΙΚΗ ΖΗΜΙΑ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΑ, ΑΛΛΑ ΟΧΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ, ΔΙΑΦΥΓΟΝΤΩΝ ΚΕΡΔΩΝ. Η ευθύνη της Neogen δεν υπερβαίνει σε καμία περίπτωση και υπό καμία νομική θεωρία την αξία αγοράς του προϊόντος που εικάζεται ότι είναι ελαττωματικό.

Αποθήκευση και απόρριψη

Φυλάσσετε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* στους 2-8°C. Μην καταψύχετε. Αποφεύγετε την έκθεση του κιτ στο φως κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Αφού ανοίξετε το κιτ, ελέγξτε ότι το αλουμινένιο σακουλάκι είναι άθικτο. Εάν το αλουμινένιο σακουλάκι έχει υποστεί ζημιά, μην χρησιμοποιήσετε το προϊόν. Μετά το άνοιγμα, οι αχρησιμοποίητοι δοκιμαστικοί σωλήνες αντιδραστηρίων πρέπει πάντοτε να φυλάσσονται στο επανασφραγιζόμενο σακουλάκι με το αφυγραντικό μέσο, ώστε να διατηρείται η σταθερότητα των λυοφιλοποιημένων αντιδραστηρίων. Φυλάσσετε τα επανασφραγισμένα σακουλάκια στους 2-8°C για χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο από 60 ημέρες.

Μην χρησιμοποιείτε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* μετά την ημερομηνία λήξης και ο αριθμός παρτίδας επισημαίνονται στην εξωτερική ετικέτα του κουτιού. Μετά τη χρήση, το μέσο εμπλουτισμού και οι δοκιμαστικοί σωλήνες της Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* μπορεί ενδεχομένως να περιέχουν παθογόνα υλικά. Μετά την ολοκλήρωση του ελέγχου, τηρείτε τα τρέχοντα βιομηχανικά πρότυπα για την απόρριψη μολυσμένων αποβλήτων. Για επιπλέον πληροφορίες συμβουλευθείτε το Φύλλο Δεδομένων Ασφαλείας και τους τοπικούς κανονισμούς σχετικά με την απόρριψη.

Οδηγίες χρήσης

Τηρείτε προσεκτικά όλες τις οδηγίες. Η μη τήρηση των οδηγιών μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβή αποτελέσματα.

Απολυμαίνετε περιοδικά τους πάγκους και τον εξοπλισμό του εργαστηρίου (πιπέτες, εργαλεία σφράγισης/ αποσφράγισης κτλ.) με διάλυμα οικιακής χλωρίνης 1-5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) ή με διάλυμα απομάκρυνσης DNA.

Ο χρήστης πρέπει να ολοκληρώσει την εκπαίδευση πιστοποίησης χειριστή (OQ) για το Neogen Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης, όπως περιγράφεται στο έγγραφο «Πρωτόκολλα και οδηγίες πιστοποίησης εγκατάστασης (IQ) / πιστοποίησης λειτουργίας (OQ) για το Neogen Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης»⁽⁶⁾.

Βλέπε την ενότητα «Ειδικές οδηγίες για επικυρωμένες μεθόδους» για τις ειδικές απαιτήσεις:

Πίνακας 3, για πρωτόκολλα εμπλουτισμού σύμφωνα με AOAC® *Official Method of Analysis*SM 2016.08 και AOAC® *Performance Tested Method*SM Πιστοποιητικό #081501.

Πίνακας 4 για τα πρωτόκολλα εμπλουτισμού σύμφωνα με το πιστοποιητικό NF Validation 3M 01/15-09/16.

Εμπλουτισμός του δείγματος

Οι Πίνακες 2, 3 ή 4 παρουσιάζουν οδηγίες για τον εμπλουτισμό δειγμάτων τροφίμων και περιβαλλοντικών δειγμάτων. Αποτελεί ευθύνη του χρήστη η επικύρωση εναλλακτικών πρωτοκόλλων δειγματοληψίας ή αναλογιών αραιώσης, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι αυτή η μέθοδος ελέγχου πληροί τα κριτήρια του χρήστη.

Τρόφιμα

1. Επιτρέψτε στο μέσο εμπλουτισμού Ζωμός Demi-Fraser (περιλαμβάνει εναμμώνιο κιτρικό σίδηρο) να εξισορροπηθεί σε θερμοκρασία εργαστηριακού περιβάλλοντος.
1. Συνδυάστε άσηπτα το μέσο εμπλουτισμού και το δείγμα, σύμφωνα με τους Πίνακες 2, 3 ή 4. Για όλα τα δείγματα κρέατος και τα δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε σωματιδιακή ύλη, συνιστάται η χρήση ασκών φιλτραρίσματος.
1. Ομογενοποιήστε καλά με ανάμειξη, ομογενοποίηση ή ανάμειξη με το χέρι για $2 \pm 0,2$ λεπτά. Επώαστε στους $37 \pm 1^\circ\text{C}$ σύμφωνα με τους Πίνακες 2, 3 ή 4.
1. Για νωπά γαλακτοκομικά προϊόντα (βλ. Πίνακες 2, 3 ή 4), μεταφέρετε 0,1 mL του πρωτογενούς εμπλουτισμού σε 10 mL Ζωμό Fraser. Επώαστε στους $37 \pm 1^\circ\text{C}$ για 20-24 ώρες.

Περιβαλλοντικά δείγματα

Οι συσκευές συλλογής δειγμάτων μπορεί να είναι ένα σφουγγάρι ενυδατωμένο με ένα διάλυμα ουδετεροποίησης για την αδρανοποίηση της επίδρασης των απολυμαντικών. Η Neogen συνιστά τη χρήση σπόγγου κυτταρίνης χωρίς βιοκτόνα. Το διάλυμα ουδετεροποίησης μπορεί να είναι ένας ουδετεροποιητικός ζωμός Dey-Engley (D/E) ή ένας ζωμός Lethen. Συνιστάται η απολύμανση της περιοχής μετά τη δειγματοληψία.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Σε περίπτωση που επιλέξετε να χρησιμοποιήσετε Ουδετεροποιητικό Ρυθμιστικό Διάλυμα (NB) που περιέχει αρυλ-σουλφονικό σύμπλοκο ως ενυδατικό διάλυμα για τον σπόγγο, απαιτείται να πραγματοποιήσετε αραιώση 1:2 (1 μέρος δείγματος σε 1 μέρος στείρου ζωμού εμπλουτισμού) του εμπλουτισμένου περιβαλλοντικού δείγματος πριν από τον έλεγχο, έτσι ώστε να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα που θα μπορούσε να οδηγήσει σε αποδέσμευση μολυσμένου προϊόντος. Μια άλλη επιλογή είναι να μεταφέρετε 10 μL ουδετεροποιητικού ρυθμιστικού διαλύματος εμπλουτισμού μέσα στους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης.

Το προτεινόμενο μέγεθος της περιοχής δειγματοληψίας για επιβεβαίωση της παρουσίας ή απουσίας του παθογόνου στην επιφάνεια είναι τουλάχιστον 100 cm^2 ($10\text{ cm} \times 10\text{ cm}$ ή $4'' \times 4''$). Κατά τη δειγματοληψία με χρήση σπόγγου, καλύψτε ολόκληρη την περιοχή προς δύο κατευθύνσεις (αριστερά προς δεξιά και, στη συνέχεια, επάνω και κάτω) ή συλλέξτε περιβαλλοντικά δείγματα σύμφωνα με το τρέχον πρωτόκολλο δειγματοληψίας σας ή βάσει των οδηγιών FDA BAM⁽¹⁾, USDA FSIS MLG⁽²⁾ ή ISO 18593⁽⁷⁾.

1. Επιτρέψτε στο μέσο εμπλουτισμού Ζωμός Demi-Fraser (περιλαμβάνει εναμμώνιο κιτρικό σίδηρο) να εξισορροπηθεί σε θερμοκρασία εργαστηριακού περιβάλλοντος.
2. Συνδυάστε άσηπτα το μέσο εμπλουτισμού και το δείγμα, σύμφωνα με τους Πίνακες 2, 3 ή 4.
3. Ομογενοποιήστε καλά με ανάμειξη, ομογενοποίηση ή ανάμειξη με το χέρι για $2 \pm 0,2$ λεπτά. Επώαστε στους $37 \pm 1^\circ\text{C}$ για 24-30 ώρες, σύμφωνα με τους Πίνακες 2, 3 ή 4.

Πίνακας 2: Γενικά πρωτόκολλα εμπλουτισμού στους $37 \pm 1^\circ\text{C}$ με χρήση Ζωμού Demi-Fraser και Ζωμού Fraser, βάσει των απαιτήσεων.

Πίνακας δειγμάτων	Μέγεθος δείγματος	Όγκος ζωμού εμπλουτισμού (mL)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)				
Επεξεργασμένα με θερμότητα, μαγειρεμένα, αλίπαστα κρεατικά, πουλερικά, θαλασσινά και ψάρια	25 g	225	24-30				
Επεξεργασμένα με θερμότητα / παστεριωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα							
Λαχανικά Πολυ-τμηματικά τρόφιμα							
Περιβαλλοντικά δείγματα ^(α)	1 σπόγγος	100 ή 225	24-30				
	1 μάκτρο	10	24-30				
Νωπά κρέατα, πουλερικά, θαλασσινά, ψάρια	25 g	475	28-32				
Πίνακας δειγμάτων	Πρωτογενής εμπλουτισμός (Ζωμός Demi-Fraser) ^(α)			Δευτερογενής εμπλουτισμός (Ζωμός Fraser) ^(α)			Όγκος ανάλυσης δείγματος ^(β)
	Μέγεθος δείγματος	Όγκος ζωμού εμπλουτισμού (mL)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)	Μέγεθος δείγματος	Θερμοκρασία εμπλουτισμού (°C)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)	
Νωπά γαλακτοκομικά προϊόντα	25 g	225	20-24	Μεταφέρετε 0,1 mL σε 10 mL Ζωμό Fraser	37 ± 1	20-24	10 µL

(α) Ο Ζωμός Demi-Fraser και ο Ζωμός Fraser πρέπει πάντα να συμπληρώνονται με συμπλήρωμα Ζωμού Fraser (εναμμώνιος κιτρικός σίδηρος) κατά τη διάρκεια πρωτογενή ή δευτερογενή εμπλουτισμού.

(β) Όγκος δείγματος μεταφερόμενου σε δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης. Ανατρέξτε στο βήμα 4.6 της ενότητας «Λύσης».

Ειδικές οδηγίες για επικυρωμένες μεθόδους
AOAC® Official Method of AnalysisSM 2016.08
AOAC® Performance Tested MethodSM #081501



Στα προγράμματα του AOAC Research Institute OMASM και PTMSM, η Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* βρέθηκε ότι αποτελεί αποτελεσματική μέθοδο για την ανίχνευση του *Listeria monocytogenes*. Οι μήτρες που ελέγχθηκαν στη μελέτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Πρωτόκολλα εμπλουτισμού με χρήση Ζυμού Demi-Fraser^(α) στους 37 ± 1 °C σύμφωνα με AOAC OMASM 2016.08 και PTMSM Πιστοποιητικό #081501.

Πίνακας δειγμάτων		Μέγεθος δείγματος	Όγκος ζυμού εμπλουτισμού (mL)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)
Χοι ντογκ βόειου κρέατος, queso fresco, παγωτό βανίλια, τυρί κότατζ με 4% λιπαρά γάλακτος, πλήρες σοκολατούχο γάλα 3%, μαρούλι ρωμάνα, φρέσκο σπανάκι σε σακούλα, ψυχρά καπνιστός σολομός		25 g	225	24-30
Νωπό κοτόπουλο		25 g	475	28-32
Γαλοπούλα ντελικατέσεν		125 g	1125	24-30
Πεπόνι ^(β)		Ολόκληρο πεπόνι	Αρκετός όγκος προκειμένου να επιπλέει το πεπόνι	26-30
Περιβαλλοντικά δείγματα:	Ανοξείδωτος χάλυβας	1 σπόγγος	225	24-30
	Στεγανοποιημένο σκυρόδεμα	1 σπόγγος	100	24-30
	Πλαστικό ^(γ)	1 μάκτρο	10	24-30

Όλα τα δείγματα για την επικύρωση AOAC ομογενοποιήθηκαν με ομογενοποίηση εκτός εάν σημειώνεται άλλως.

- (α) Ο Ζυμός Demi-Fraser και ο Ζυμός Fraser πρέπει πάντα να συμπληρώνονται με συμπλήρωμα Ζυμού Fraser (εναμμώνιος κιτρικός σίδηρος) κατά τη διάρκεια πρωτογενή ή δευτερογενή εμπλουτισμού.
- (β) Ομογενοποιήστε το δείγμα με ανάμειξη με το χέρι.
- (γ) Ομογενοποιήστε το δείγμα με αναδευτήρα.

NF VALIDATION από την AFNOR Certification



3M 01/15-09/16

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη λήξη της επικύρωσης, παρακαλούμε ανατρέξτε στο πιστοποιητικό NF VALIDATION που διατίθεται στον ιστότοπο που αναφέρεται παραπάνω.

Μέθοδος πιστοποίησης NF VALIDATION σύμφωνα με το πρότυπο ISO 16140-2⁽⁶⁾ σε σύγκριση με το πρότυπο ISO 11290⁽³⁾

Πεδίο εγκυρότητας: Όλα τα δείγματα ανθρώπινων τροφίμων και περιβαλλοντικά δείγματα (εκτός δειγμάτων πρωτογενούς παραγωγής)

Προετοιμασία δείγματος: Τα δείγματα πρέπει να προετοιμάζονται σύμφωνα με τα πρότυπα EN ISO 11290-1⁽³⁾ και EN ISO 6887⁽⁸⁾

Έκδοση λογισμικού: Βλ. πιστοποιητικό

Πίνακας 4: Πρωτόκολλα εμπλουτισμού σύμφωνα με πιστοποιημένη από την NF VALIDATION μέθοδο 3M 01/15-09/16 στους $37 \pm 1^\circ\text{C}$ με χρήση Ζωμού Demi-Fraser και Ζωμού Fraser βάσει των απαιτήσεων.

Γενικό πρωτόκολλο	Μέγεθος δείγματος	Όγκος ζωμού εμπλουτισμού (mL)	Θερμοκρασία εμπλουτισμού ($\pm 1^\circ\text{C}$)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)	Όγκος ανάλυσης δείγματος ^(α)	Αποδεκτό σημείο παρέμβασης
Όλα τα δείγματα τροφίμων (εκτός νωπών κρεάτων, νωπών θαλασσινών και νωπών γαλακτοκομικών προϊόντων)	25 g	225	37	24-30	20 μL	<ul style="list-style-type: none"> • Ζωμός Demi-Fraser έως 72 ώρες • Διαδικασία λύματος στους -20°C • Διαδικασία λύματος στους 4°C έως 72 ώρες
Περιβαλλοντικά δείγματα	25 g, 1 μάκτρο ή 1 μαντηλάκι					

Ειδικό πρωτόκολλο	Πρωτογενής εμπλουτισμός (Ζωμός Demi-Fraser) ^(β)				Δευτερογενής εμπλουτισμός (Ζωμός Fraser) ^(β)				Αποδεκτό σημείο παρέμβασης
	Μέγεθος δείγματος	Όγκος ζωμού εμπλουτισμού (mL)	Θερμοκρασία εμπλουτισμού ($\pm 1^\circ\text{C}$)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)	Μέγεθος δείγματος	Θερμοκρασία εμπλουτισμού ($\pm 1^\circ\text{C}$)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)	Όγκος ανάλυσης δείγματος ^(γ)	
Νωπά κρέατα, νωπά θαλασσινά και νωπά γαλακτοκομικά προϊόντα	25 g	225	37	20-24	Μεταφέρετε 0,1 mL σε 10 mL Ζωμό Fraser	37	20-24	10 μL	<ul style="list-style-type: none"> • Ζωμός Fraser έως 72 ώρες • Διαδικασία λύματος στους -20°C • Διαδικασία λύματος στους 4°C έως 72 ώρες

(α) Όγκος δείγματος μεταφερόμενου σε δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης. Ανατρέξτε στο βήμα 4.6 της ενότητας «Λύσης».

(β) Ο Ζωμός Demi-Fraser και ο Ζωμός Fraser πρέπει πάντα να συμπληρώνονται με συμπλήρωμα Ζωμού Fraser (εναμμώνιος κιτρικός σίδηρος) κατά τη διάρκεια πρωτογενή ή δευτερογενή εμπλουτισμού.

(γ) Όγκος δείγματος μεταφερόμενου σε δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης. Ανατρέξτε στο βήμα 4.6 της ενότητας «Λύσης».

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Δείγματα μεγαλύτερα των 25 g δεν έχουν ελεγχθεί στη μελέτη NF Validation.

Προετοιμασία του Neogen® Δίσκου Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης

1. Βρέξτε ένα πανί με διάλυμα οικιακής χλωρίνης ή αντίστοιχο διάλυμα 1-5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) και σκουπίστε τον Neogen® Δίσκο Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης.
2. Ξεπλύνετε τον Neogen Δίσκο Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης με νερό.
3. Χρησιμοποιήστε μια πετσέτα μίας χρήσης για να στεγνώσετε τον Neogen Δίσκο Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης.
4. Διασφαλίστε ότι ο Neogen Δίσκος Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης είναι στεγνός πριν τη χρήση.

Προετοιμασία του Neogen® Ένθετου Υποδοχής Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης

Τοποθετήστε την Neogen® Υποδοχή Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης απευθείας στον εργαστηριακό πάγκο. Χρησιμοποιήστε την υποδοχή ψύξης σε εργαστηριακή θερμοκρασία περιβάλλοντος (20-25°C).

Προετοιμασία του Neogen® Ένθετου για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρος Μοριακής Ανίχνευσης

Τοποθετήστε το Neogen® Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης σε μια διπλή μονάδα υποδοχής σωλήνων ξηρής θέρμανσης. Ενεργοποιήστε τη μονάδα ξηρής θέρμανσης και ρυθμίστε τη θερμοκρασία για να επιτρέψετε στο Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης να φθάσει και να διατηρήσει θερμοκρασία 100 ± 1°C.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Ανάλογα με τη μονάδα θέρμανσης, αφήστε το Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης να φθάσει στην κατάλληλη θερμοκρασία για περίπου 30 λεπτά. Χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο, βαθμονομημένο θερμόμετρο (π.χ. θερμόμετρο μερικής εμβύθισης ή ψηφιακό θερμόμετρο θερμοστοιχείου, **όχι** θερμόμετρο ολικής εμβύθισης) τοποθετημένο στην καθορισμένη θέση, επαληθεύστε ότι το Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης βρίσκεται στους 100 ± 1°C.

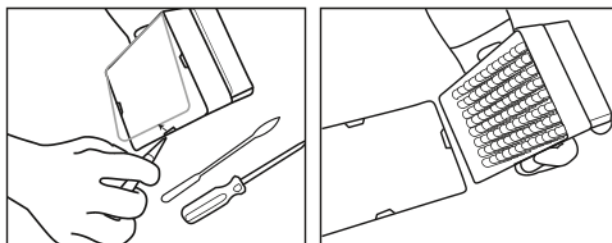
Προετοιμασία του Neogen® Οργάνου Μοριακής Ανίχνευσης

1. Εκκινήστε το Neogen® Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης και συνδεθείτε. Επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο της Neogen Food Safety ώστε να διασφαλίσετε ότι διαθέτετε την τελευταία έκδοση του λογισμικού.
2. Ενεργοποιήστε το Neogen Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης.
3. Δημιουργήστε ή επεξεργαστείτε μια διαδικασία με δεδομένα για κάθε δείγμα. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του Neogen Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης για λεπτομέρειες.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το Neogen Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης πρέπει να φθάσει σε κατάσταση Ετοιμότητας προτού εισαχθεί ο Neogen Δίσκος Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης με τους δοκιμαστικούς σωλήνες αντίδρασης. Αυτό το στάδιο θέρμανσης διαρκεί περίπου 20 λεπτά και υποδεικνύεται με ένα ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ φως στη γραμμή κατάστασης του συστήματος. Όταν το σύστημα είναι έτοιμο για να ξεκινήσει μια διαδικασία, η γραμμή κατάστασης θα γίνει ΠΡΑΣΙΝΗ.

Λύση

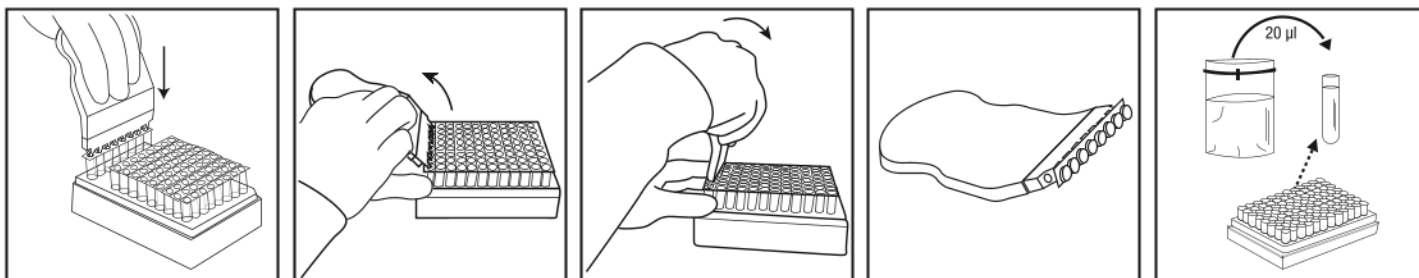
Αφαιρέστε τον πυθμένα του στατώ Neogen Διαλύματος Λύσης με ένα κατσαβίδι ή μια σπάτουλα πριν το τοποθετήσετε στο Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης.



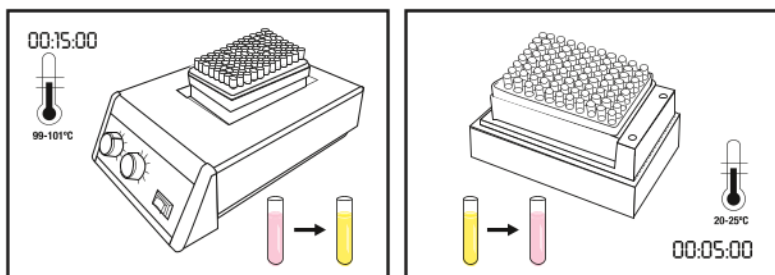
1. Αφήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες διαλύματος λύσης (Neogen Διάλυμα Λύσης) να θερμανθούν αφήνοντας το στατώ σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) κατά τη διάρκεια της νύχτας (16-18 ώρες). Εναλλακτικές λύσεις για την εξισορρόπηση των δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης σε θερμοκρασία δωματίου είναι να αφήσετε τους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης επάνω στον πάγκο του εργαστηρίου για τουλάχιστον 2 ώρες, να επωάσετε τους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης σε επωαστήρα 37 ± 1°C για 1 ώρα ή να τους τοποθετήσετε σε διπλή μονάδα υποδοχής σωλήνων ξηρής θέρμανσης για 30 δευτερόλεπτα στους 100°C.
2. Αναστρέψτε τους πωματισμένους δοκιμαστικούς σωλήνες για να αναμίξετε. Προχωρήστε στο επόμενο στάδιο εντός 4 ωρών.
3. Βγάλτε τον ζυμό εμπλουτισμού από τον επωαστήρα.
4. Απαιτείται ένας δοκιμαστικός σωλήνας Neogen Διαλύματος Λύσης για κάθε δείγμα και δείγμα Αρνητικού Ελέγχου (NC) (στείρο μέσο εμπλουτισμού).
 - 4.1 Οι σειρές των δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης μπορούν να κοπούν στον επιθυμητό αριθμό δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης. Επιλέξτε τον αριθμό των μεμονωμένων δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης ή τις απαιτούμενες σειρές των 8 δοκιμαστικών σωλήνων. Τοποθετήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης σε ένα κενό στατώ.
 - 4.2 Για να αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση, αποσφραγίζετε μία σειρά δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης κάθε φορά, και χρησιμοποιείτε νέο ρύγχος πιπέτας για κάθε βήμα μεταφοράς.
 - 4.3 Μεταφέρετε τα εμπλουτισμένα δείγματα στους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης όπως περιγράφεται παρακάτω:

Μεταφέρετε κάθε εμπλουτισμένο δείγμα σε μεμονωμένο σωλήνα Neogen Διαλύματος Λύσης πρώτα. Μεταφέρετε τον NC **τελευταίο**.

- 4.4 Χρησιμοποιήστε το Neogen® Εργαλείο Σφράγισης / Αποσφράγισης - Λύσης Μοριακής Ανίχνευσης για να αποσφραγίσετε μία σειρά δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης - μία σειρά κάθε φορά.
- 4.5 Απορρίψτε το πώμα του δοκιμαστικού σωλήνα Neogen Διαλύματος Λύσης - Εάν το λύμα πρόκειται να διατηρηθεί για επανέλεγχο, τοποθετήστε τα πώματα μέσα σε ένα καθαρό δοχείο, για εκ νέου εφαρμογή μετά τη λύση.
- 4.5.1 Για την επεξεργασία του διατηρημένου λύματος, βλ. Παράρτημα Α.
- 4.6 Μεταφέρετε 20 µL δείγματος μέσα σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Διαλύματος Λύσης, εκτός εάν αναφέρεται διαφορετικά στα Πρωτόκολλα από τους Πίνακες 2, 3 ή 4 (π.χ. νωπά γαλακτοκομικά προϊόντα ή κατά τη χρήση περιβαλλοντικών δειγμάτων με ουδετεροποιητικό ρυθμιστικό διάλυμα, χρησιμοποιείτε 10 µL).



5. Επαναλάβετε τα βήματα 4.4 έως 4.6 μέχρι το κάθε επιμέρους δείγμα να έχει προστεθεί σε έναν αντίστοιχο δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Διαλύματος Λύσης της σειράς.
6. Όταν έχουν μεταφερθεί όλα τα δείγματα, μεταφέρετε 20 µL NC (στείρο μέσο εμπλουτισμού, π.χ. Ζυμός Demi-Fraser) μέσα σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Διαλύματος Λύσης. Μην χρησιμοποιείτε νερό ως NC.
7. Επαληθεύστε ότι η θερμοκρασία του Neogen Ένθετου για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης βρίσκεται στους $100 \pm 1^\circ\text{C}$.
8. Τοποθετήστε το ακάλυπτο στατώ δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης στο Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης και θερμάνετε για 15 ± 1 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της θέρμανσης, το Neogen Διάλυμα Λύσης θα αλλάξει από ροζ (ψυχρό) σε κίτρινο (θερμό).
- 8.1 Δείγματα που δεν έχουν υποβληθεί στην κατάλληλη θερμική επεξεργασία κατά τη διάρκεια του σταδίου λύσης της δοκιμασίας μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανός βιολογικός κίνδυνος και ΔΕΝ πρέπει να εισάγονται στο Neogen Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης.
9. Αφαιρέστε το ακάλυπτο στατώ των δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης από το ένθετο θέρμανσης και αφήστε το να κρυώσει στο Neogen Ένθετο Υποδοχής Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης για τουλάχιστον 5 λεπτά και μέγιστο 10 λεπτά. Το Neogen Ένθετο Υποδοχής Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης, όταν χρησιμοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, πρέπει να τοποθετηθεί απευθείας επάνω στον πάγκο του εργαστηρίου. Όταν κρυώσει, το διάλυμα λύσης θα αποκτήσει ξανά ροζ χρώμα.
10. Αφαιρέστε το στατώ των δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης από το Neogen Ένθετο Υποδοχής Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης.



Πολλαπλασιασμός

1. Απαιτείται ένας δοκιμαστικός σωλήνας αντιδραστήριου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Listeria monocytogenes* για κάθε δείγμα και τον NC.
- 1.1 Οι σειρές των δοκιμαστικών σωλήνων αντιδραστηρίων μπορούν να κοπούν στον επιθυμητό αριθμό δοκιμαστικών σωλήνων. Επιλέξτε τον απαιτούμενο αριθμό των μεμονωμένων δοκιμαστικών σωλήνων αντιδραστήριου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Listeria monocytogenes* ή τις απαιτούμενες σειρές των 8 δοκιμαστικών σωλήνων.

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

Distributed by:

NELSON JAMESON
INC.

800-826-8302 nelsonjameson.com



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.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.
FS00867B

dZ

Requester: Kristin Wincek
Creator: deZinnia_33022
File Name: FS00867B.indd
Structure #: N/A
Date: 01/31/23

Printed Colors – Front:



Printed Colors – Back:



Match Colors:

Scale:  1 Inch

This artwork has been created as requested by Neogen. Neogen is responsible for the artwork AS APPROVED and assumes full responsibility for its correctness.