NEOGEN®

Product Instructions
MDA2CRO96

- EN Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter*
- FR Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter*
- DE Molekularer Detektions Assay 2 – *Cronobacter*
- ES Ensayo 2 de detección molecular: *Cronobacter*
- PT Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter*
- JA 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用*
- ZH 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌* (Simplified)
- ZH 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌* (Traditional)
- TH ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์*
- KO 분자 검출 키트 2 – *크로노박터*

2

Cronobacter

NEOGEN®

Product Instructions

Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter*

Product Description and Intended Use

The Neogen® Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* is used with the Neogen® Molecular Detection System for the rapid and specific detection of *Cronobacter* in enriched food and food process 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].

The Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* 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 pharmaceutical, cosmetics, clinical or veterinary samples. The Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* has not been evaluated with all possible food products, food processes, 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 including homogenization and mixing, 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/or environmental samples and microbial challenges to ensure that the method meets the user's criteria.

Neogen has evaluated the Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* with Buffered Peptone Water (BPW) ISO as enrichment broth.

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 – *Cronobacter* 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 – *Cronobacter* Reagent Tubes	Orange-red tubes	96 (12 strips of 8 tubes)	Lyophilized specific amplification and detection mix	Ready to use
Extra caps	Orange-red 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 a sterile enrichment medium, e.g., BPW ISO. 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 – *Cronobacter*. 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 – *Cronobacter* in the diagnosis of conditions in humans or animals.

The user must train its personnel in current proper testing techniques: for example, Good Laboratory Practices[3], or CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)[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 – *Cronobacter* as indicated on the package and in the product instructions.
- Always use the Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* by the expiration date.
- Use the Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* with food and food process environmental samples that have been validated internally or by a third party.
- Use the Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* only with surfaces, sanitizers, protocols and bacterial strains that have been validated internally or by a third party.
- For an environmental sample containing Neutralizing Buffer (NB) 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 Handling products which include Neutralizing Buffer with aryl sulfonate complex: 700002040 | RS96010NB, 700002011 | RS9604NB 700002003 | SSL10NB, 700002004 | SSL10NB2G, 700002213 | HS10NB, and 700002002 | HS10NB2G. This protocol has not been tested during the NF Validation study.

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

- 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 and associated contaminated waste according to current local, regional, and national regulations.
- 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 local, regional, and national regulations for disposal requirements.

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, reagent tube rack, etc.) with a 1-5% (v:v in water) chlorine-based household bleach solution (containing sodium hypochlorite) 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) chlorine-based household bleach solution for 1 hour and away from the assay preparation area.
- Never autoclave reagent tubes post amplification.
- If samples are suspected to contain high levels of *Cronobacter* free DNA (e.g., DNA from non-viable *Cronobacter* cells that have been subjected to a kill / inactivation step), presumptive positive enrichments should be treated with a DNA removal procedure (e.g., DNase) or PMAxx before the **Lysis** step. Contact your Neogen Representative for additional instructions. Free DNA removal was not evaluated during the NF Validation study.

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 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 **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 including homogenization and mixing, handling, laboratory technique, and the sample itself 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 fitness for purpose of the method during implementation, Neogen has developed the Neogen Molecular Detection Matrix Control kit (also called an amplification control in ISO 24914:2026[6]). Use the Matrix Control (MDMC96) to assess matrix interference with the results of the Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* during validation and verification. Follow the ISO 16140-3:2021[7] standard and / or your organization's quality assurance program to determine the representative number of samples required when verifying the method performance and defining the scope of its application in your laboratory. Routine use of the Neogen Molecular Detection Matrix Control is not required once the method has been verified and the laboratory scope of application is established. Follow your organization's quality assurance program to determine on a case-by-case basis the need for the Neogen Molecular Detection Matrix Control and its frequency of use during routine testing.

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 versus pasteurized; fresh versus 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. You must promptly notify Neogen within sixty days of discovery of any suspected defects in a product and return it to Neogen. Please contact your Neogen representative or authorized Neogen distributor for any further questions.

For Neogen's full terms and conditions, please visit: https://neogen.com/en/terms-and-conditions/

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 – *Cronobacter* 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 – *Cronobacter* 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 – *Cronobacter* tubes can potentially contain pathogenic materials. When testing is complete, follow local, regional, and national regulations 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, reagent tube rack, etc.) with a 1-5% (v:v in water) chlorine-based household bleach solution or DNA removal solution.

The user should complete the Neogen Molecular Detection System operator qualification training, as described in the "Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System" document[8].

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

Table 3 and 4 for enrichment protocols according to AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2018.01 and *Performance Tested*℠ Certificate number 101703

Table 5 for enrichment protocols according to NF VALIDATION certificate 3M 01/20-03/18

Sample Enrichment

Tables 2, 3, 4, or 5 present guidance for enrichment protocols for food and environmental samples.

It is the user's responsibility to validate alternate sampling or enrichment protocols or dilution ratios to ensure this test method meets the user's criteria.

Foods, Environmental Powders, Dusts, Sweepings and Sponges

1. Equilibrate the enrichment medium to ambient temperature (20-25°C) unless otherwise noted in the enrichment protocol (See Table 2, 3 4, or 5).
2. Aseptically combine the enrichment medium and sample and homogenize thoroughly by blending, stomaching, vortexing or hand mixing for 2 ± 0.2 minutes **or until all lumps are completely dissolved and the enrichment suspension is homogeneous**[9, 10].
    a. Factors such as sample preparation including homogenization and mixing, handling, and laboratory technique may influence results.
    b. For highly particulate samples, the use of filter bags is recommended.
    c. For matrices which swell in water and are highly viscous (e.g., cereals, starches), it is suggested to make further dilutions (> 1:10) until viscosity is suitably reduced or add sterile 1% (w/v) alpha-amylase to BPW (ISO)[10].
    d. For large sample sizes of cereals, add the powdered cereal slowly to the liquid with frequent mixing to avoid clumps.
3. Incubate as outlined in the appropriate protocol table (See Table 2, 3, 4, or 5).

Table 2. General Enrichment Protocols

Sample Matrix	Sample Size[1]	Enrichment Broth Volume[1, 2]	Enrichment Temperature (± 1°C)	Enrichment Time (hours)	Sample Analysis Volume
Powdered infant formula (PIF) and raw materials such as dry milk powder, soy powder, whey powder, lactose, rice flour, and maltodextrin	1X gram sample	9X mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
Raw materials such as salts, minerals, amino acids, DHA (docosahexaenoic acid) and vitamins	1X gram sample	99X mL BPW (ISO) (1:100)	37	18-24	20 µL
Dry environmental samples such as dust, sweepings, vacuum collection	1X gram sample	9X mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
Environmental sponge with 10 mL Letheen Broth or D/E Neutralizing Broth	1 sampling device	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL

1. Neogen has evaluated the Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* using the dilution ratios in Table 2 up to 300g, except for infant formula with and without probiotics, which were evaluated up to 400 g. It is the user's responsibility to validate alternate dilution ratios or protocols to ensure the method meets the user's criteria.
2. Use **pre-warmed** BPW (ISO) if enrichment broth volume is > 300 mL (e.g., sample is > 30 grams).

Specific Instructions for Validated Methods

AOAC® *Official Method of Analysis℠* (OMA) 2018.01

AOAC® *Performance Tested℠* (PTM) Certificate #101703

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

In AOAC Research Institute OMA℠ and PTM℠ studies, the Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* was found to be an effective method for the detection of *Cronobacter.* The matrices tested in the studies are shown in Table 3 and 4.

Prepare the sample according to Table 3 and 4, homogenize thoroughly by blending, stomaching, vortexing or hand mixing for 2 ± 0.2 minutes or until all lumps are completely dissolved and the enrichment suspension is homogeneous[9, 10].

Table 3. Enrichment protocols according to AOAC® *OMA℠* 2018.01 and *PTM℠* 101703

Sample Matrix	Sample Size	Enrichment Broth Volume	Enrichment Temperature (± 1°C)	Enrichment Time (hours)	Sample Analysis Volume
Powdered Infant Formula with probiotics	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
	300 g	2700 mL BPW (ISO) + 10 mg/L Vancomycin)[b]	Pre-Warmed 37	22-24	20 µL
Powdered Infant Cereal without probiotics	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
	300 g	2700 mL BPW (ISO) (1:10)	Pre-Warmed 37	18-24	20 µL
Lactose Powder	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL

Stainless steel (4” x 4”)[c]	1 sponge	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL

[a]Use **pre-warmed** BPW (ISO) if enrichment broth volume is > 300 mL.

Final concentration

[c]Environmental sponge pre-moistened with 10 mL D/E Neutralizing Broth.

Table 4. Enrichment protocols according to AOAC® *PTM*℠ 101703

Sample Matrix	Sample Size	Enrichment Broth Volume[a]	Enrichment Temperature (± 1°C)	Enrichment Time (hours)	Sample Analysis Volume
Powdered Infant Formula with probiotics	400[a] g	3600 mL BPW (ISO) + 10 mg/L Vancomycin)	Pre-Warmed 37	22-24	20 µL
Powdered Infant Formula without probiotics	400[a] g	3600 mL BPW (ISO) (1:10)	Pre-Warmed 37	22-24	20 µL

[a]AOAC PTM approved matrices with the use of free DNA removal steps.

Refer to the free DNA removal instructions for details

NF VALIDATION by AFNOR Certification

3M 01/20-03/18

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 16140-2:2016[11] in comparison to ISO 22964:2017[2].

Scope of the validation: Powdered infant formula and infant cereals with and without probiotics, raw materials and environmental samples.

Sample preparation: Samples should be prepared according to EN ISO 22694:2017[2] and EN ISO 6887[9, 10].

Software version: See certificate.

Table 5. Enrichment Protocols According to NF VALIDATION Certified Method 3M 01/20-03/18

Sample Matrix	Sample Size	Enrichment Broth Volume[1]	Enrichment Temperature (± 1°C)	Enrichment Time (hours)	Sample Analysis Volume	Recommended Interruption Point[2, 3]
• Powdered infant formula • Powdered infant cereals • Ingredients such as dry milk powder, soy powder, whey powder, lactose, rice flour, maltodextrin • Dry environmental samples such as dust, sweepings, vacuum collection,	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL	Enrichment broth or sample lysate can be stored at 2-8°C for up to 72 hours
• Sponge, rinse water, wipes	1 sampling device or 10 mL					Enrichment broth or sample lysate can be stored at 2-8°C for up to 72 hours
Powdered infant formula and powdered infant cereal (non-probiotic)	30-300 g	BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL	Enrichment broth or sample lysate can be stored at 2-8°C for up to 72 hours
Powdered infant cereal and powdered infant formula (including probiotic)	30-300 g	BPW (ISO) + 10 mg/L vancomycin (1:10)	37	22-24	20 µL	None

1. Use pre-warmed BPW (ISO) if enrichment broth volume is > 300 mL (e.g., sample is > 30 grams).
2. After removing the enrichment broth from storage, resume testing from Step 1 in the Lysis section. After removing the sample lysate from storage, resume testing from Step 7 in the Lysis section.
3. Refer to Appendix A for re-testing of stored heat-treated lysates.

Preparation of the Neogen® Molecular Detection Speed Loader Tray

1. Wet a cloth or disposable towel with a 1-5% (v:v in water) household bleach 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.

Two Neogen Molecular Detection Heat/Chill Block Inserts are required for this procedure. Both inserts are the same product (700000145) but are used for different functions.

For clarity within the procedure, the insert used for the heating step will be referred to as the Molecular Detection Heat Block Insert, and the insert used for the cooling step will be referred to as the Molecular Detection Chill Block Insert. These designations are used only to distinguish their roles and do not indicate separate products.

Preparation of the Neogen® Molecular Detection Chill Block Insert

Place the Neogen Molecular Detection Chill Block Insert directly on the laboratory bench. Use the 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, 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.

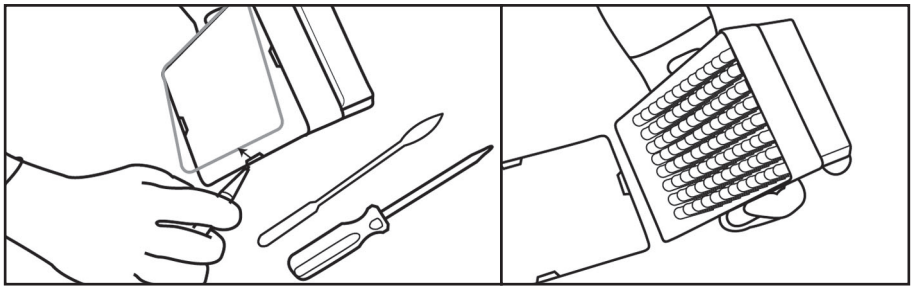
Preparation of the Neogen® Molecular Detection Instrument

1. Launch the Neogen® Molecular Detection 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 before placing it in the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert.

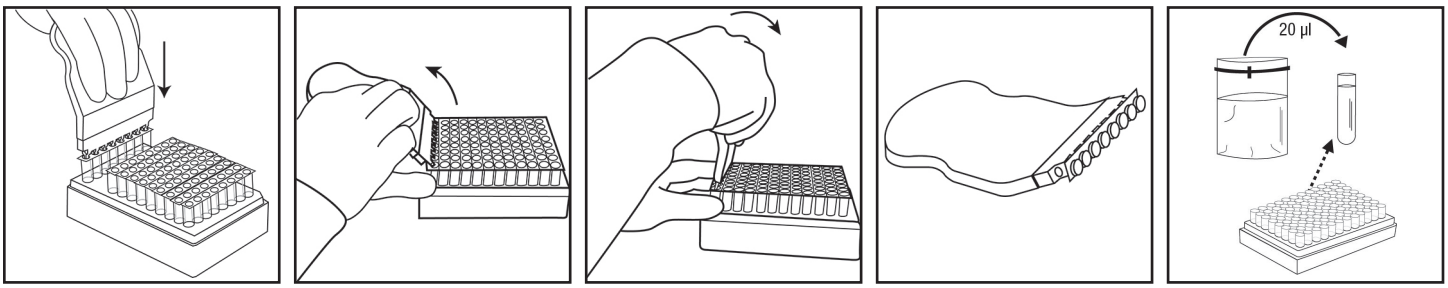


1. Allow the Neogen Lysis Solution tubes to warm up by setting the rack at ambient temperature (20-25°C) overnight (16-18 hours). Alternatives to equilibrate the Neogen Lysis Solution tubes to ambient temperature are to set the Neogen Lysis Solution tubes on the laboratory bench for at least 2 hours, incubate the Neogen Lysis Solution tubes in a 37 ± 1°C incubator for 1 hour or place them in a dry double block heater for 30 seconds at 100 ± 1°C.
2. Invert the capped tubes to mix. Proceed to next step within 4 hours after inverting.
3. Remove the enriched sample from the incubator.
4. One Neogen Lysis Solution tube is required for each sample and the NC sample (sterile enrichment medium).
   - 4.1 Neogen Lysis Solution tube strips can be cut to desired 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 sample to Neogen Lysis Solution tubes as described below:

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

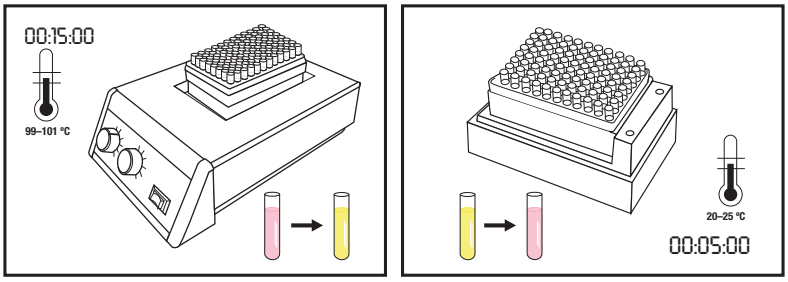
   - 4.4 Use the Neogen® Molecular Detection Cap/Decap Tool-Lysis to decap one Neogen Lysis Solution tube strip - one strip at a time.
   - 4.5 Discard the Neogen Lysis Solution tube cap – If lysate will be retained for retest, place the caps into a clean container for re-application after lysis.
     - 4.5.1. For processing of retained lysate, see Appendix A.
   - 4.6 Agitate the enrichment bag before collecting the sample from the filtered side when working with viscous samples.
   - 4.7 Transfer 20 µL of sample into a Neogen Lysis Solution tube unless otherwise indicated in the protocol table.

5. Repeat step 4.4 to 4.7 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. BPW) into 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 ± 1°C.
8. Heating step: 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).

   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. Cooling step: Remove the uncovered rack of Neogen Lysis Solution tubes from the Neogen Molecular Detection Heat 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 without the Neogen® Molecular Detection Chill Block Tray, should sit directly on the laboratory bench. During cooling, the Neogen 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 – *Cronobacter* Reagent Tube is required for each sample and the NC.
   1.1 Tube strips can be cut to desired tube number. Select the number of individual Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* Reagent Tube or 8-tube strips needed.
   1.2 Place Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* Reagent Tubes in an empty rack.
   1.3 Avoid disturbing the reagent pellets from the bottom of the tubes.
2. Select one Neogen Reagent Control Tube and place in rack.
3. To avoid cross-contamination, decap one Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* Reagent Tube strip at a time and use a new pipette tip for each transfer step.
4. Transfer each lysate to Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* Reagent Tube and Neogen Reagent Control Tube as described below:

Transfer each sample lysate into individual Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* Reagent Tube **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 – *Cronobacter* Reagent tubes –one Reagent tube strip at a time. Discard cap.
   5.1 **Transfer 20 µL of sample lysate from the upper 1/2 of the liquid (avoid precipitate) in the Neogen Lysis Solution Tube into corresponding Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* 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 – *Cronobacter* Reagent Tube in the strip.

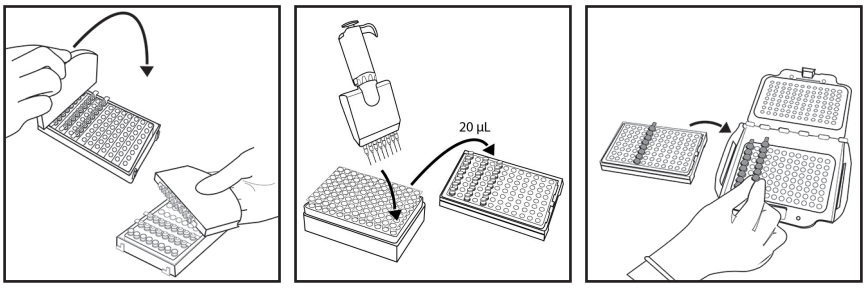
5.3 Cover the Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* Reagent Tubes with the provided extra caps and use the rounded side of the Neogen Molecular Detection Cap/Decap Tool-Reagent to apply pressure in a back and forth motion ensuring that the cap is tightly applied.

5.4 Repeat steps 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 5.1 to 5.3 to transfer 20 µL of NC lysate into a Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* 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 60 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) chlorine-based household bleach 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 – *Cronobacter* Reagent, Neogen Reagent Control, and Neogen Matrix Control Tubes. Always dispose of sealed reagent tubes by soaking in a 1-5% (v:v in water) chlorine-based household bleach 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 enrichments should be confirmed per the laboratory standard operating procedures or by following the appropriate reference method confirmation[1,2], beginning with transfer from the primary enrichment (BPW ISO or BPW ISO supplemented with 10 mg/L of vancomycin) to a secondary enrichment broth, followed by subsequent plating and confirmation of isolates using appropriate biochemical, serological and/or molecular methods.

NOTE: Even a negative sample will not give a zero reading as the system and Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* 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.[1,2]

Table 6. Symbols and info for various software results

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.
Sample		Inspect	The presence or absence of the target pathogen was indeterminate. A re-test may be required.
Sample		Error*	No bioluminescence was detected. A re-test may be required.

*Refer to the run report for additional details on the results. If needed, contact your local Neogen representative for troubleshooting assistance.

Free DNA Removal Instructions

Note: Free DNA removal was not evaluated as part of the NF validation study.

1. PMAxx

a. Transfer 45 µL of molecular grade water (MGW) into a microtube.

b. Dispense 5 µL of PMAxx™ Dye (20 mM) directly into the microtube with 45 µL MGW. Mix gently by pipetting up and down.

NOTE: The solution may be stored refrigerated, protected from light, for up to 1 h.

c. Transfer 400 µL of the enriched sample into a microcentrifuge tube.

d. Under low light conditions, add 5 µL of the PMAxx solution to the sample aliquot.

e. Place microtubes on a rotator for 10 minutes, covered and protected from light.

f. Place the PMAxx-treated tubes into the PMA-Lite™ instrument for 10 minutes.

g. Vortex each tube for 3 seconds, then place the tubes back in the PMA-Lite for an additional 10 minutes.

h. Transfer 20 µL of the PMAxx-treated samples into Neogen Lysis Solution tubes and proceed with the lysis steps.

2. Cronobacter Selective Broth (CSB)

a. Transfer 0.1 mL of primary enrichment to 10 mL of CSB.

b. Incubate at 41.5 ± 1°C for 24 ± 2 h.

c. Following incubation, proceed with the lysis steps..

Confirmation of Results According to the NF VALIDATION Certified Method

In the context of the NF VALIDATION, all samples identified as positive by the Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* must be confirmed by one of the following tests. Confirmation must be performed from the enrichment broth stored at +2°C to +8°C within 72 hours following the end of the incubation period.

Option 1: Using the ISO 22964:2017[2] standard starting from BPW ISO enrichment.

- Subculture in CSB (1/10 dilution) for 24 h ± 2h at 41.5°C ± 1°C
- Streak onto CCI agar and incubate for 24 h ± 2h at 41.5°C ± 1°C
- Streak up to five typical colonies onto a non-selective agar plate and incubate for 21 h ± 3h at 37°C ± 1°C
- Perform appropriate biochemical confirmatory tests (Oxidase test and biochemical galleries)

Option 2: Using nucleic acid probes as described in the ISO 7218:2024[4] standard, performed on isolated colonies from selective agar (see Option 1). According to the ISO 7218:2024 rules, a molecular screening assay may be confirmed by a second molecular assay targeting a different gene region with distinct primers and/or probes. The confirmation method shall be validated according to an appropriate ISO 16140 standard with evaluated protocol and materials for colony confirmation.

Option 3: Using any other method certified by NF VALIDATION, the principle of which must be different from Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter*. 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 Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter,* non-confirmed by one of the means described above), the laboratory should follow their established standard operating procedures to report their results.

If you have questions about specific applications or procedures, please visit our website at 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** section 4.5)
2. Store at 2 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 ± 1°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 Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO 7218:2024. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
5. CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMLB) 6th Edition. Effective Date: 29 August 2025
6. ISO 24914:2026 Microbiology of the food chain — Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of microorganisms and associated genetic markers — General requirements and definitions. International Standard Organization (ISO), Geneva, Switzerland. www.iso.org
7. ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain — Method validation Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory
8. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
9. ISO 6887-5:2020. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
10. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
11. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

Refer to the current versions of the standard methods listed above.

Explanation of Symbols

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
Auchincruive House
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation, 620 Lesher Place, Lansing, MI 48912 USA.
© Neogen Corporation 2026. All rights reserved. Neogen is a registered trademarks of Neogen Corporation.
All other brand and product names are trademarks or registered trademarks of their respective companies. Patent: neogen.com/patents
FS00879B_0826

NEOGEN®

Instructions relatives au produit

Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter*

Description et utilisation du produit

Le Neogen® kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* est utilisé avec le système de détection moléculaire Neogen® pour une détection rapide et précise des *Cronobacter* dans les prélèvements environnementaux d'aliments supplémentés et d'aliments transformés.

Les kits Neogen de détection moléculaire utilisent l'amplification isotherme médiée par des boucles afin d'amplifier rapidement les séquences d'acides nucléiques avec une grande spécificité et sensibilité, en association avec 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 les méthodes usuelles ou en fonction des méthodes spécifiques répondant aux normes locales[1, 2].

Le Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* 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 documenté ce produit dans le cadre de tests sur des échantillons de produits pharmaceutiques, cosmétiques, cliniques ou vétérinaires. Le Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* n'a pas été évalué en utilisant tous les produits et processus de transformation alimentaire, tous les 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, notamment l'homogénéisation et le mélange, 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 épreuves alimentaires et microbiennes et/ou des prélèvements environnementaux déterminés pour répondre aux critères de l'utilisateur.

Neogen a évalué le Kit Neogen de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* avec de l'eau peptonée tamponnée (EPT) ISO comme bouillon d'enrichissement.

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.

La conception et la fabrication Neogen Sécurité Alimentaire sont certifiées ISO (International Organization for Standardization) 9001.

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

Tableau 1. Composants du Neogen Kit de détection moléculaire

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 Neogen® Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter*	Tubes rouge orangé	96 (12 barrettes de 8 tubes)	Mélange spécifique lyophilisé pour l'amplification et la détection	Prêts à l'emploi
Bouchons supplémentaires	Bouchons rouge orangé	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, p. ex. de l'eau peptonée tamponnée ISO. Ne pas utiliser de l'eau comme témoin négatif.

Consignes de 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 Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter*. Conserver ces consignes de sécurité pour s'y référer ultérieurement.

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

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

⚠ AVERTISSEMENT

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

L'utilisateur doit former son personnel aux techniques de test actuelles appropriées : par exemple, Bonnes pratiques de laboratoire[3] ou Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) du CDC[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 Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* conformément aux indications sur l'emballage et aux instructions relatives au produit.
- Toujours utiliser le Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* avant la date de péremption.
- Utiliser le Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* avec les échantillons environnementaux d'aliments et d'aliments transformés qui ont été validés en interne ou par une tierce partie.
- N'utiliser le Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* qu'avec des surfaces, des désinfectants, des protocoles et des souches bactériennes validés en interne ou par une tierce partie.
- Dans le cas d'un échantillon environnemental contenant un tampon neutralisant (NB) avec un complexe de sulfonate d'aryle, effectuer une dilution 1:2 avant le test (1 volume d'échantillon dans 1 volume de bouillon d'enrichissement stérile). Une autre option consiste à transférer 10 µl de l'enrichissement TN dans les tubes de solution de lyse Neogen. Produits pour la manipulation des échantillons Neogen® comprenant un tampon neutralisant contenant une composition d'aryle sulfonate : RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G et HS2410NB2G. Ce protocole n'a pas été testé dans le cadre de l'étude NF Validation.

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

- 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 et les déchets contaminés associés conformément aux réglementations locales, régionales et nationales en vigueur.
- Les échantillons qui n'ont pas été soumis à un traitement thermique adéquat lors de la phase de lyse de l'analyse peuvent être considérés comme présentant un risque biologique potentiel 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'essai :

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

Pour réduire les risques liés à la contamination de l'environnement :

- Respecter les réglementations locales, régionales et nationales en matière de mise au rebut.

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.

REMARQUE

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

- Changer de gants avant l'hydratation des pastilles réactives.
- Il est recommandé d'utiliser des embouts de pipette stériles, avec barrière contre les aérosols (à filtre), de qualité biologie moléculaire.
- Utiliser une nouvelle 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 paillasses et le matériel du laboratoire (pipettes, outils de pose/retrait de bouchons, portoirs de tubes de réactifs, etc.) avec une solution d'eau de Javel ménagère à base de chlore (contenant de l'hypochlorite de sodium) à 1-5 % (v:v dans l'eau) ou une solution d'élimination de l'ADN.

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

- Ne jamais ouvrir les tubes de réactifs après l'amplification.
- Toujours éliminer les tubes contaminés en les faisant tremper dans une solution d'eau de Javel à base de chlore à 1-5 % (v:v dans l'eau) pendant 1 heure et à distance de la zone de préparation de l'analyse.
- Ne jamais stériliser à l'autoclave les tubes de réactifs après amplification.
- Si des niveaux élevés d'ADN libre de Cronobacter sont suspectés dans les échantillons (p. ex., de l'ADN de cellules de Cronobacter non viables ayant fait l'objet d'une étape de destruction/d'inactivation), les enrichissements présumés positifs doivent être traités avec une procédure d'élimination de l'ADN (p. ex., DNase) ou PMAxx avant l'étape de **Lyse**. Pour en savoir plus, contacter un représentant Neogen. L'élimination de l'ADN libre n'a pas été évaluée dans le cadre de l'étude de Validation NF.

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 neogen.com ou contacter le représentant ou distributeur Neogen local.

Responsabilité de l'utilisateur

Il incombe aux utilisateurs de connaître les instructions et les informations relatives au produit. Rendez-vous sur notre site **neogen.com**, ou contactez 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 de test, la préparation des échantillons, notamment l'homogénéisation et le mélange, la manipulation, les techniques de laboratoires et l'échantillon lui-même 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.

Afin d'aider les clients à évaluer l'adéquation de la méthode à l'usage prévu lors de sa mise en œuvre, Neogen a développé le kit de contrôle de matrice pour détection moléculaire Neogen (également appelé « contrôle d'amplification » dans la norme ISO 24914:2026[6]). Utiliser le Contrôle de matrice (MDMC96) pour évaluer l'interférence de la matrice avec les résultats du Kit Neogen de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* lors de la validation et de la vérification. Respecter la norme ISO 16140-3:2021[7] et/ou le programme d'assurance qualité de votre établissement afin de déterminer le nombre représentatif d'échantillons requis au moment de la vérification des performances de la méthode et de la définition de son champ d'application au sein de votre laboratoire. L'utilisation systématique du contrôle matriciel de détection moléculaire Neogen n'est pas requise une fois que la méthode a été vérifiée et que le champ d'application du laboratoire a été établi. Suivre le programme d'assurance qualité de votre établissement afin de déterminer au cas par cas la nécessité du Contrôle de matrice de détection moléculaire Neogen et sa fréquence d'utilisation lors des tests de routine.

Une matrice peut être définie comme un type de produit présentant des propriétés intrinsèques telles que sa composition et son procédé de fabrication. Les différences entre les matrices peuvent être aussi simples que les effets causés par les différences de traitement ou de présentation, par exemple, cru ou pasteurisé, frais ou séché, etc.

Limitation de garantie/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. Informer rapidement Neogen dans les soixante jours suivant la découverte de tout défaut suspecté dans un produit et retourner ce dernier à Neogen. Merci de contacter votre représentant Neogen ou votre distributeur Neogen agréé pour toute autre question.

Pour consulter l'intégralité des conditions générales de Neogen, veuillez vous rendre sur : https://neogen.com/en/terms-and-conditions/

Limitation de responsabilité de Neogen

NEOGEN NE SERA PAS TENUE POUR 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.

Conservation et élimination des déchets

Conserver le Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* 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 Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* après la date de péremption. La date de péremption et le numéro de lot sont inscrits sur l'étiquette à l'extérieur de la boîte. Après utilisation, il est possible que les tubes de milieu d'enrichissement et du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* contiennent des éléments pathogènes. Une fois les analyses terminées, respecter les réglementations locales, régionales et nationales relatives à 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 paillasses et le matériel du laboratoire (pipettes, outils de pose/retrait de bouchons, portoir de tubes de réactifs, etc.) avec une solution d'eau de Javel ménagère à base de chlore à 1-5 % (v:v dans l'eau) ou une solution d'élimination de l'ADN.

L'utilisateur doit suivre la formation de qualification destinée à l'opérateur du système de détection moléculaire Neogen, comme décrit dans le document « Protocoles et instructions de qualification de l'installation (IQ)/qualification opérationnelle (OQ) du système de détection moléculaire Neogen »[8].

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

Tableaux 3 et 4 pour les protocoles d'enrichissement selon l'AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2018.01 et le certificat *Performance Tested*℠, numéro 101703

Tableau 5 pour les protocoles d'enrichissement selon le certificat NF VALIDATION 3M 01/20-03/18

Enrichissement de l'échantillon

Les tableaux 2, 3, 4 et 5 fournissent des indications pour les protocoles d'enrichissement des échantillons alimentaires et environnementaux.

Il incombe à l'utilisateur de valider des protocoles d'échantillonnage/d'enrichissement ou des proportions de dilution différents pour garantir que cette méthode d'analyse est conforme à ses critères.

Aliments, poudres environnementales, poussières, balayures et éponges

1. Équilibrer le milieu d'enrichissement à température ambiante (20-25 °C), sauf mention contraire dans le protocole d'enrichissement (voir tableau 2, 3, 4 et 5).
2. Mélanger de manière aseptique le milieu d'enrichissement et l'échantillon et homogénéiser soigneusement à l'aide d'un mixeur, d'un stomacher, d'un vortex ou par mélange à la main pendant 2 ± 0,2 minutes **ou jusqu'à dissolution complète de tous les grumeaux et obtention d'une suspension d'enrichissement homogène**[9, 10].
    a. Des facteurs tels que la préparation des échantillons, notamment l'homogénéisation et le mélange, la manipulation et les techniques de laboratoires peuvent influencer les résultats.
    b. Pour les échantillons à forte teneur en particules, il est recommandé d'utiliser des sacs avec filtre.
    c. Pour les matrices qui gonflent au contact de l'eau et qui sont très visqueuses (p. ex., céréales, amidons), il est recommandé de réaliser des dilutions supplémentaires (> 1:10) jusqu'à ce que la viscosité soit réduite de manière appropriée, ou d'ajouter de l'alpha-amylase à 1 % (p/v) stérile à l'EPT (ISO)[10].
    d. Pour les échantillons de céréales de grande taille, ajouter lentement les céréales en poudre au liquide en mélangeant régulièrement pour éviter la création d'amas particulaires.
3. Incuber comme indiqué dans le tableau du protocole approprié (voir le tableaux 2, 3, 4 ou 5).

Tableau 2. Protocoles d'enrichissement généraux

Matrice de l'échantillon	Taille de l'échantillon[1]	Volume de bouillon d'enrichissement[1, 2]	Température d'enrichissement (± 1 °C)	Durée d'enrichissement (h)	Volume d'analyse d'échantillon
Préparation en poudre pour nourrisson (PEP) et matières premières telles que lait en poudre, soja en poudre, petit-lait en poudre, lactose, farine de riz et maltodextrine	1X échantillon gram	9X ml EPT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Matières premières telles que sels, minéraux, acides aminés, DHA (acide docosahexaénoïque) et itamines	1X gram échantillon	99X ml EPT (ISO) (1:100)	37	18-24	20 µl
Échantillons environnementaux secs comme les poussières, les balayures, les collectes par aspiration	1X échantillon gram	9X ml EPT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Éponge environnementale avec bouillon Letheen 10 ml ou bouillon neutralisant (D/E)	1 dispositif d'échantillonnage	90 ml EPT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl

1. Neogen a évalué le Kit Neogen de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* à l'aide des proportions de dilution figurant dans le tableau 2 jusqu'à 300 g, à l'exception des préparations pour nourrissons avec et sans probiotiques, évaluées jusqu'à 400 g. Il incombe à l'utilisateur de valider des proportions ou des protocoles de dilution différents pour garantir que cette méthode d'analyse est conforme à ses critères
2. Utiliser une EPT ISO **préchauffée** si le volume du bouillon d'enrichissement est supérieur à 300 ml (p. ex. si l'échantillon est > 30 grammes).

Instructions spécifiques pour méthodes validées

AOAC® *Official Method of Analysis℠* (OMA) 2018.01

AOAC® *Performance Tested℠* (PTM) Certificat n° 101703

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

Dans les études « Official Methods of Analysis℠ » et « Performance Tested Method℠ » de l'Institut de recherche de l'AOAC, il a été démontré que le Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* était une méthode efficace de détection de *Cronobacter.* Les matrices testées au cours des études sont présentées dans les tableaux 3 et 4.

Préparer l'échantillon conformément aux tableaux 3 et 4, puis homogénéiser soigneusement à l'aide d'un mixeur, d'un stomacher, d'un vortex ou par mélange à la main pendant 2 ± 0,2 minutes ou jusqu'à dissolution complète de tous les grumeaux et obtention d'une suspension d'enrichissement homogène[9, 10].

Tableau 3. Protocoles d'enrichissement selon AOAC® *OMA℠* 2018.01 et *PTM℠* 101703

Matrice de l'échantillon	Taille de l'échantillon	Volume de bouillon d'enrichissement[a]	Température d'enrichissement (± 1 °C)	Durée d'enrichissement (h)	Volume d'analyse d'échantillon
Préparation en poudre avec probiotiques pour nourrisson	10 g	90 ml EPT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
	300 g	2 700 mL d'EPT (ISO) + 10 mg/L de vancomycine)[b]	Préchauffé à 37	22-24	20 µl

Céréales en poudre sans probiotiques pour nourrisson x	10 g	90 mL d'EPT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
	300 g	2 700 mL d'EPT (ISO) (1:10)	Préchauffé à 37	18-24	20 µl
Lactose en poudre	10 g	90 ml EPT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Acier inoxydable (4" x 4")[c]	1 éponge	90 ml EPT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl

[a]Use **pre-warmed** BPW (ISO) if enrichment broth volume is > 300 mL.

[b]Concentration finale

[c]Environmental sponge pre-moistened with 10 mL D/E Neutralizing Broth.

Table 4. Enrichment protocols according to AOAC® *PTM*℠ 101703

Matrice de l'échantillon	Taille de l'échantillon	Volume de bouillon d'enrichissement[1]	Température d'enrichissement (± 1 °C)	Durée d'enrichissement (h)	Volume d'analyse d'échantillon
Préparation en poudre avec probiotiques pour nourrisson	400[a] g	3 600 mL d'EPT (ISO) + 10 mg/L de vancomycine)	Préchauffé à 37	22-24	20 µl
Préparation en poudre sans probiotiques pour nourrisson	400[a] g	3 600 mL d'EPT (ISO) (1:10)	Préchauffé à 37	22-24	20 µl

[a]AOAC PTM approved matrices with the use of free DNA removal steps.

Refer to the free DNA removal instructions for details

Méthode certifiée par AFNOR Certification

3M 01/20-03/18

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 certifiée NF VALIDATION conforme à la norme ISO 16140-2:2016[11] par rapport à la norme ISO 22964:2017[2].

Portée de la validation : Préparation en poudre pour nourrisson et céréales pour nourrisson avec et sans probiotiques, matières premières et échantillons environnementaux.

Préparation des échantillons : Les échantillons doivent être préparés conformément aux normes EN ISO 22694:2017[2] et EN ISO 6887[9, 10].

Version de logiciel : voir le certificat.

Tableau 5. Protocoles d'enrichissement selon la méthode de certification NF VALIDATION 3M 01/20-03/18

Matrice de l'échantillon	Taille de l'échantillon	Volume de bouillon d'enrichissement[1]	Température d'enrichissement (± 1 °C)	Durée d'enrichissement (heures)	Volume d'analyse d'échantillon	Point d'interruption recommandé[2, 3]
• Préparation en poudre pour nourrisson • Céréales en poudre pour nourrisson • Ingrédients tels que lait en poudre, soja en poudre, petit-lait en poudre, lactose, farine de riz, maltodextrine • Échantillons environnementaux secs comme les poussières, les balayures, les collectes par aspiration,	10 g	90 ml EPT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl	Le bouillon d'enrichissement ou le lysat de l'échantillon peuvent être stockés à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant une durée maximale de 72 heures
• Éponge, eau de rinçage, lingettes	1 dispositif d'échantillonnage ou 10 ml					Le bouillon d'enrichissement ou le lysat de l'échantillon peuvent être stockés à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant une durée maximale de 72 heures
Préparation en poudre pour nourrisson et céréales en poudre pour nourrisson (sans probiotiques)	30-300 g	EPT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl	Le bouillon d'enrichissement ou le lysat de l'échantillon peuvent être stockés à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant une durée maximale de 72 heures
Céréales en poudre pour nourrisson et préparation en poudre pour nourrisson (avec probiotiques)	30-300 g	EPT (ISO) + 10 mg/L vancomycine (1:10)	37	22-24	20 µl	Aucun

1. Utiliser une EPT ISO préchauffée si le volume du bouillon d'enrichissement est supérieur à 300 ml (p. ex. si l'échantillon est > 30 grammes).
2. Après avoir retiré le bouillon d'enrichissement de son lieu de stockage, reprendre l'analyse à partir de l'étape 1 de la section Lyse. Après avoir retiré le lysat de l'échantillon de son lieu de stockage, reprendre l'analyse à partir de l'étape 7 de la section Lyse.
3. Se reporter à l'Annexe A pour le nouveau test des lysats stockés soumis à un traitement thermique.

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

1. Humidifier un chiffon ou une serviette jetable à l'aide d'une solution de 1-5 % d'eau de Javel (v:v dans de l'eau) 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.

Deux supports de bloc chauffant/refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen sont nécessaires pour cette procédure. Les deux supports correspondent à un même produit (700000145), mais sont utilisés pour des usages différents.

Pour faciliter la compréhension de la procédure, le support utilisé pour l'étape de chauffage sera appelé « support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire », et celui utilisé pour l'étape de refroidissement « support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire ». Ces désignations ont pour seul but de distinguer leurs usages et n'indiquent pas des produits distincts.

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

Placer le support du bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen directement sur la paillasse du laboratoire. Utilisez le bloc à la température ambiante du laboratoire (20-25 °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.

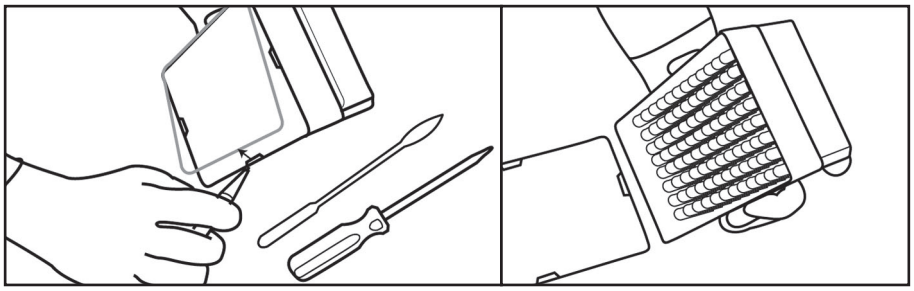
Préparation de l'instrument de détection moléculaire Neogen®

1. Lancer le logiciel 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 avant de le placer dans le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen.

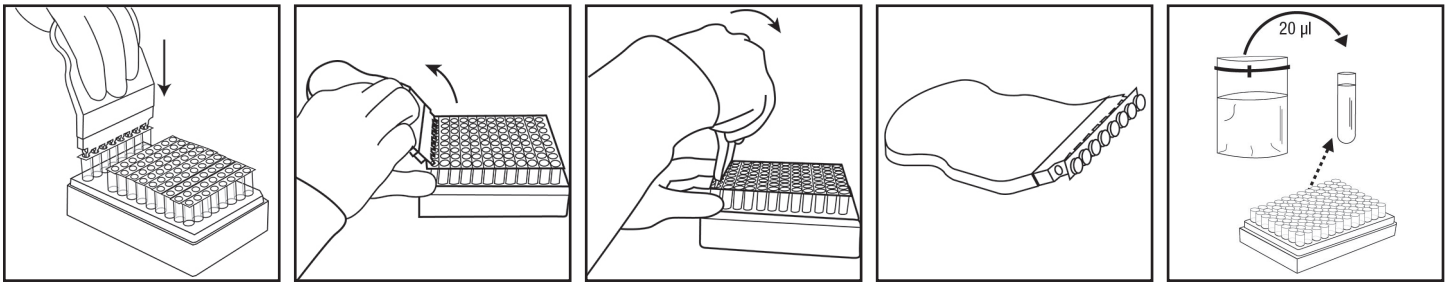


1. Laisser les tubes de solution de lyse Neogen se réchauffer en plaçant le support à température ambiante (20 à 25 °C) pendant une nuit (16 à 18 heures). Il est également possible d'amener les tubes de solution de lyse Neogen à température ambiante en les plaçant sur le plan de travail du laboratoire 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 ± 1 °C.
2. Retourner les tubes recouverts d'un bouchon pour les mélanger. Passer à l'étape suivante dans un délai de 4 heures après avoir retourné les tubes.
3. Retirer l'échantillon enrichi de l'incubateur.
4. Un tube de solution de lyse Neogen est nécessaire pour chaque échantillon et pour l'échantillon TN (milieu d'enrichissement stérile).
   - 4.1 Les barrettes de tubes de solution de lyse Neogen peuvent être coupées de manière à obtenir le nombre 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 les barrettes de tubes de solution de lyse Neogen une à une et utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque étape de transfert.
   - 4.3 Transférer l'échantillon enrichi 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**.

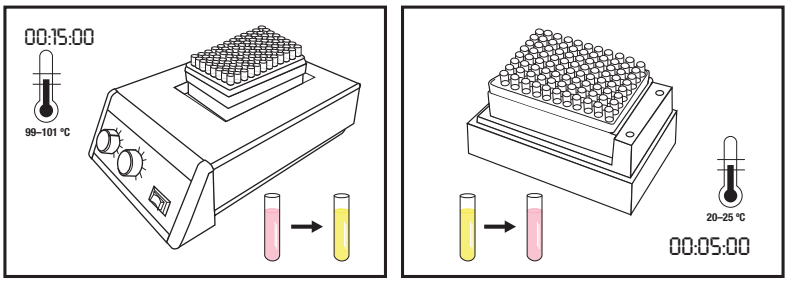
   - 4.4 Ouvrir les barrettes de tubes de solution de lyse Neogen une à une à l'aide de l'outil d'ouverture/fermeture pour système de détection moléculaire Neogen® - Lyse.
   - 4.5 Jeter le bouchon du tube de solution de lyse Neogen. Si le lysat doit être soumis à un nouveau test, placer les bouchons dans un récipient propre pour réapplication après la lyse.
     - 4.5.1. Pour le traitement du lysat conservé, voir l'annexe A.
   - 4.6 Agiter le sac contenant l'enrichissement avant de prélever des échantillons du côté filtré lors du travail avec des échantillons visqueux.
   - 4.7 Transférer 20 µl d'échantillon dans un tube de solution de lyse Neogen, sauf indication contraire mentionnée dans le tableau de protocole.

5. Répéter l'étape 4.4 à 4.7 jusqu'à ce que chaque échantillon individuel soit ajouté à un tube de solution de lyse Neogen correspondant au niveau de la barrette.



6. Une fois tous les échantillons transférés, transférer 20 µl de TN (milieu d'enrichissement stérile, p. ex. EPT) dans un tube de solution de lyse Neogen. Ne pas utiliser d'eau comme témoin négatif.
7. Vérifier que la température du support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen est de 100 ± 1 °C.
8. Étape de chauffage : 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).

   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. Étape de refroidissement : Retirer le portoir non couvert de tubes de solution de lyse Neogen du bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen et le laisser refroidir dans le support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen pendant au moins 5 minutes et au plus 10 minutes. Utilisé à température ambiante sans le plateau de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen®, le support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen doit être posé directement sur le plan de travail du laboratoire. À l'étape du refroidissement, la solution de lyse Neogen reprendra 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 Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* pour chaque échantillon et pour le NC.
   1.1 Les barrettes de tubes peuvent être coupées de manière à obtenir le nombre de tubes souhaité. Sélectionner le nombre de tubes de réactif du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* ou de barrettes de 8 tubes nécessaire.
   1.2 Placer les tubes de réactif du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* dans un portoir vide.
   1.3 Éviter de toucher les pastilles réactives se trouvant au fond des tubes.
2. Sélectionner un tube de contrôle de réactif (RC) Neogen et le placer dans le portoir.
3. Afin d'éviter toute contamination croisée, ouvrir une barrette de tubes de réactif du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* à la fois et utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque étape de transfert.
4. Transférer chaque lysat dans un tube de réactif du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* 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 Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter*, puis faites de même avec le NC. Hydrater le tube de contrôle de réactif Neogen **en dernier**.
5. Ouvrir les tubes de réactif du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* un à un à l'aide de l'outil d'ouverture/fermeture pour système de détection moléculaire Neogen® – Réactif. Jeter le bouchon.
   5.1 **Transférer 20 µl de lysat d'échantillon prélevé au niveau de la moitié (1/2) supérieure du liquide (éviter le précipité) dans le tube de solution de lyse Neogen du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* correspondant. Incliner la pipette pour ne pas agiter 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 Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* correspondant dans la barrette.

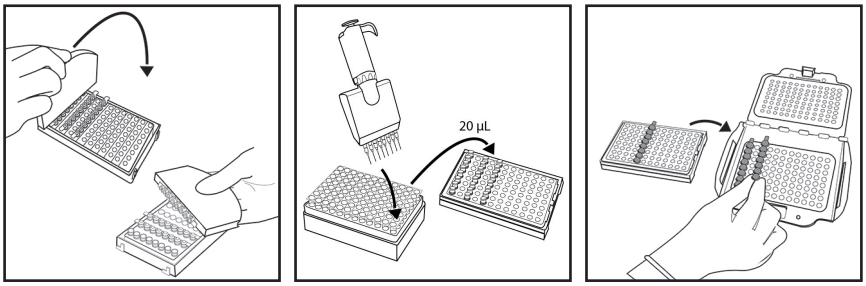
5.3 Placer la capsule supplémentaire prévue à cet effet sur les tubes de réactif du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter*, puis prendre le bord arrondi de l'outil d'ouverture/fermeture pour système de détection moléculaire Neogen – Réactif et appuyer dans un mouvement de va-et-vient afin de s'assurer que la capsule 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 à 5.3 afin de transférer 20 µl de lysat de TN dans un tube de réactif Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter*

5.6 Transférer **20 µl de lysat de TN dans un tube de contrôle de réactif Neogen**. Incliner la pipette pour ne pas agiter 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. Vérifier et confirmer la configuration de l'analyse dans 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 60 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 et éliminer les tubes en les faisant tremper dans une solution d'eau de Javel à base de chlore à 1-5 % (v:v dans l'eau) pendant 1 heure et à l'écart de la zone de préparation des analyses.

REMARQUE : 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 Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter*, les tubes de contrôle de réactif Neogen et les tubes de contrôle de matrice Neogen. Toujours éliminer les tubes de réactif fermés en les faisant tremper dans une solution d'eau de Javel à base de chlore à 1-5 % (v:v dans l'eau) pendant 1 heure et à l'écart de la zone de préparation des analyses.

Résultats et interprétation

Un algorithme interprète la courbe de résultats lumineuse provenant de la détection de l'amplification de l'acide nucléique. 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'essai.

Les enrichissements présumés positifs doivent être confirmés selon les procédures opérationnelles standard des laboratoires ou en suivant la confirmation par la méthode de référence appropriée[1,2], en commençant par effectuer un transfert de l'enrichissement primaire (EPT ISO ou EPT ISO contenant de 10 mg/L de vancomycine) dans un bouillon d'enrichissement secondaire, suivi d'un étalement et de la confirmation des isolats à l'aide de méthodes biochimiques, sérologiques et/ou moléculaires appropriées.

REMARQUE : même un échantillon négatif ne donnera pas de résultat égal à 0 RLU car le système et les réactifs d'amplification du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* effectuent une lecture d'unité relative de lumière (RLU) « de base ».

Dans le cas rare d'une émission lumineuse inhabituelle, l'algorithme considérera ce dernier comme « À vérifier ». Neogen recommande à l'utilisateur de recommencer l'analyse pour tout échantillon considéré comme « À vérifier ». Si le résultat reste « À vérifier », passer au test de confirmation en utilisant la méthode de votre choix ou une méthode conforme aux réglementations locales.[1,2]

Tableau 6. Symboles et informations pour différents résultats du logiciel

Type de puits	Symbole de 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 était inhibitrice pour le test. Un nouveau test peut être nécessaire.
Échantillon		À vérifier	La présence ou l'absence du pathogène cible était indéterminée. Un nouveau test peut être nécessaire.
Échantillon		Erreur*	Aucune bioluminescence n'a été détectée. Un nouveau test peut être nécessaire.

*Veuillez vous référer au rapport d'exécution pour plus de détails sur les résultats. Si nécessaire, contactez votre représentant Neogen local pour obtenir une assistance technique.

Instructions pour l'élimination de l'ADN libre

Remarque : L'élimination de l'ADN libre n'a pas été évaluée dans le cadre de l'étude de validation NF.

1. PMAxx

a. Transférer 45 µL d'eau de qualité biologie moléculaire (MGW) dans un microtube.

b. Ajouter 5 µL de PMAxx™ Dye (20 mM) directement dans le microtube contenant 45 µL de MGW. Mélanger délicatement en pipetant plusieurs fois de haut en bas.

REMARQUE : la solution peut être conservée au réfrigérateur, à l'abri de la lumière, pendant 1 heure maximum.

c. Transférer 400 µL de l'échantillon enrichi dans un tube de microcentrifugation.

d. Dans des conditions de faible luminosité, ajouter 5 µL de la solution de PMAxx à l'échantillon.

e. Placer les microtubes dans un agitateur rotatif pendant 10 minutes, couverts et à l'abri de la lumière.

f. Placer les tubes traités au PMAxx dans l'instrument PMA-Lite™ pendant 10 minutes.

g. Passer chaque tube au vortex pendant 3 secondes, puis replacer les tubes dans le PMA-Lite pendant 10 minutes supplémentaires.

h. Transférer 20 µL des échantillons traités au PMAxx dans des tubes de solution de lyse Neogen et passer aux étapes de lyse.

2. Bouillon sélectif pour Cronobacter (CSB)

a. Transférer 0,1 mL d'enrichissement primaire dans 10 mL de CSB.

b. Incuber à 41,5 ± 1 °C pendant 24 ± 2 h.

c. Après l'incubation, passer aux étapes de lyse.

Confirmation des résultats selon la méthode certifiée NF VALIDATION

Dans le cadre de la NF VALIDATION, tous les échantillons identifiés comme positifs par le Kit Neogen de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter* doivent être confirmés par l'un des tests suivants. La confirmation doit être effectuée à partir du bouillon d'enrichissement conservé entre +2 °C et +8 °C dans les 72 heures suivant la fin de la période d'incubation.

Option 1 : utilisation de la norme ISO 22964:2017(2) à partir de l'enrichissement en EPT ISO.

- Repiquer dans du CSB (dilution 1/10) pendant 24 h ± 2 h à 41,5 °C ± 1 °C
- Ensemencer par stries sur gélose CCI et incuber pendant 24 h ± 2 h à 41,5 °C ± 1 °C
- Ensemencer par stries jusqu'à cinq colonies typiques sur une gélose non sélective et incuber pendant 21 h ± 3 h à 37 °C ± 1 °C
- Réaliser les tests de confirmation biochimiques appropriés (test d'oxydase et galeries biochimiques)

Option 2 : utilisation de sondes d'acides nucléiques telles que décrites dans la norme ISO 7218:2024[4], appliquées sur des colonies isolées issues de la gélose sélective (voir option 1). Selon les règles de la norme ISO 7218:2024, un test de dépistage moléculaire peut être confirmé par un second test moléculaire ciblant une région différente du gène avec des amorces et/ou sondes distinctes. La méthode de confirmation doit être validée conformément à une norme ISO 16140 appropriée avec un protocole et du matériel évalués pour la confirmation des colonies.

Option 3 : utilisation de toute autre méthode certifiée NF VALIDATION, dont le principe doit être différent de celui du Kit Neogen de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter*. Vous devez appliquer le protocole complet décrit pour cette deuxième méthode validée. Toutes les étapes préalables au début de la confirmation doivent être communes aux deux méthodes.

En cas de résultats discordants (présumé positif avec le Kit Neogen de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter*, non confirmé par l'un des moyens décrits ci-dessus), le laboratoire doit suivre ses procédures opérationnelles standard établies pour communiquer ses résultats.

Si vous avez des questions sur des applications ou des procédures spécifiques, veuillez consulter notre site Web à l'adresse suivante 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 la section **Lyse**, 4.5)
2. Stocker à une température comprise entre 2 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 de 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 pour tubes de solution de lyse du bloc chauffant et laisser refroidir dans le support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen entre 5 et 10 minutes.
7. Poursuivre le protocole à la section **Amplification** détaillée ci-dessus.

Références :

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO 7218:2024. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Exigences générales et recommandations pour les examens microbiologiques.
5. CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMLB) 6th Edition. Date d'entrée en vigueur : 29 août 2025
6. ISO 24914:2026 Microbiologie de la chaîne alimentaire – Amplification isothermique à médiation par boucle (LAMP) pour la détection de micro-organismes et de marqueurs génétiques associés – Exigences générales et définitions. Organisation internationale de normalisation (ISO), Genève, Suisse. www.iso.org
7. ISO 16140-3:2021 Microbiologie de la chaîne alimentaire – Validation des méthodes, Partie 3 : Protocole pour la vérification dans un seul laboratoire de méthodes de référence et de méthodes alternatives validées
8. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
9. ISO 6887-5:2020. Microbiologie des aliments et des aliments pour animaux – Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique, Partie 5 : Règles spécifiques pour la préparation du lait et des produits laitiers.
10. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
11. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

Se reporter aux versions en cours de validité des méthodes normalisées citées plus haut.

Explication des symboles

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
Auchincruive House
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation, 620 Lesher Place, Lansing, MI 48912 USA.
© Neogen Corporation 2026. Tous droits réservés. Neogen est une marque déposée de Neogen Corporation.
Tous les autres noms de marques et de produits sont des marques commerciales ou des marques déposées de leurs sociétés respectives. Patent: neogen.com/patents
FS00879B_0826

NEOGEN®

Gebrauchsanweisungen

Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter*

Produktbeschreibung und Verwendungszweck

Der Neogen® Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* wird in Verbindung mit dem Neogen® Molekulares Detektionssystem für den schnellen und spezifischen Nachweis von *Cronobacter* in angereicherten Proben aus Lebens- und Futtermitteln sowie Umgebungen der Lebensmittelverarbeitung verwendet.

Die molekularen Detektionsnachweise von Neogen verwenden die Loop-vermittelte isothermale Amplifikation zur schnellen Vervielfältigung von Nukleinsäuresequenzen mit hoher Spezifität und Sensitivität, kombiniert mit Biolumineszenz zur Detektion der Amplifikation. Die vorläufig positiven Ergebnisse werden in Echtzeit erstellt, während negative Ergebnisse erst nach Abschluss des Tests dargestellt werden. Die vorläufig positiven Ergebnisse sollten mithilfe eines Testverfahrens Ihrer Wahl oder gemäß der jeweils geltenden Richtlinien bestätigt werden[1, 2].

Der Neogen Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* ist für den Gebrauch in Labors bestimmt und muss von in Laborverfahren geschultem Fachpersonal angewendet werden. 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 Pharmazeutika-, Kosmetika- oder klinischen und tiermedizinischen Proben. Der Neogen Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* wurde nicht für alle möglichen Lebensmittelprodukte, Lebensmittelverarbeitungsverfahren, Testprotokolle oder alle möglichen Bakterienstämme evaluiert.

Wie bei allen Testverfahren können die Ergebnisse durch die Quelle, Zusammensetzung und Qualität des Anreicherungsmediums beeinflusst werden. Faktoren wie Probennahme, Testprotokolle, Probenaufbereitung einschließlich Homogenisierung und Mischung, 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/oder Umgebungsproben und mikrobiellen Pathogenen, um sicherzustellen, dass die Methode den Anforderungen des Benutzers entspricht.

Neogen hat den „Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter*" unter Verwendung von gepuffertem Peptonwasser (BPW) nach ISO-Norm als Anreicherungsmedium evaluiert.

Das Neogen® Molekulare Detektion – Gerät ist für die Verwendung mit Proben bestimmt, die während der Assay-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 Molekulares 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.

Der Neogen Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* enthält 96 Testverfahren, die in Tabelle 1 beschrieben werden.

Tabelle 1. Komponenten des Neogen Molekulares Detektions Assay

Artikel	Kennzeichnung	Stückzahl	Inhalt	Kommentare
Neogen® Lyselösung (LS)	Rosafarbene Lösung in transparenten Gefäßen	96 (12 Streifen in 8 Gefäßen)	580 µl LS pro Gefäß	Abgefüllt und gebrauchsfertig
Reagenzgefäße für Neogen® Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter*	Orangerote Gefäße	96 (12 Streifen in 8 Gefäßen)	Lyophilisierte spezifische Amplifikations- und Detektionsmischung	Gebrauchsfertig
Zusätzliche Kappen	Orangerote Kappen	96 (12 Streifen in 8 Kappen)		Gebrauchsfertig
Neogen® Reagenzkontrolle (RC)	Durchsichtige Kippgefäße	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. BPW ISO. Verwenden Sie kein Wasser als Negativkontrolle.

Sicherheit

Der Anwender sollte sämtliche in der Gebrauchsanleitung des Neogen Molekulares Detektionssystems und des Neogen Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* 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 Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* nicht zur Diagnose von Erkrankungen bei Menschen oder Tieren einsetzen.

Der Benutzer muss sein Personal in aktuellen ordnungsgemäßen Testtechniken schulen: zum Beispiel gemäß „Gute Laborpraxis“[3], oder „CDC-Leitlinien zur Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Laboren (BMBL)“[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 Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* wie auf der Packung und in der Gebrauchsanweisung beschrieben.
- Verwenden Sie den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* stets vor Ablauf des Verfalldatums.
- Verwenden Sie den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* mit Lebensmittel-, Futter- und Lebensmittelverfahrensproben, die entweder intern oder von einem Dritten evaluiert worden sind.
- Verwenden Sie den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* nur mit Oberflächen, Desinfektionsmitteln, Protokollen und Bakterienstämmen, die intern oder durch Dritte validiert wurden.
- Bei einer Umgebungsprobe, die Neutralisationspuffer (NP) mit Arylsulfonatkomplex enthält, ist vor dem Test eine Verdünnung von 1:2 durchzuführen (1 Teil Probe in 1 Teil steriler Anreicherungsbouillon). Ebenso können Sie 10 µl Anreicherungsmedium mit Neutralisationspuffer in die Neogen Lyselösungsgefäße übertragen. Neogen® Produkte zur Probenhandhabung, die Neutralisierungspuffer mit Acrylsulfonat-Komplex enthalten: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G und HS2410NB2G. Dieses Protokoll wurde nicht im Rahmen der NF Validation Studie getestet.

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

- 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.
- Entsorgen Sie angereicherte Proben und entsprechende kontaminierte Abfälle gemäß aktueller örtlicher/regionaler und nationaler Normen.
- Proben, die im Rahmen des Nachweises während des Lyseschritts nicht ordnungsgemäß wärmebehandelt wurden, sind als potenziell biogefährlich einzustufen und dürfen NICHT in das molekulare Detektionsgerät von Neogen 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).

Um die mit einer Umgebungskontamination verbundenen Risiken zu reduzieren, beachten Sie Folgendes:

- Beachten Sie die örtlichen, regionalen und nationalen Vorschriften zur Entsorgung.

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 Molekularen Detektion – Heizblockeinsatzes platziert werden.

HINWEIS

Zur Verminderung von Kreuzkontaminationsrisiken bei der Vorbereitung des Tests:

- Wechseln Sie vor Hydratation des Reagenzpellets die Handschuhe.
- Es wird empfohlen, sterile Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere (gefiltert) in Molekularbiologiequalität 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.
- Dekontaminieren Sie Laborwerkbänke und Geräte (Pipetten, Capper/Decapper, Reagenzröhrchenhalter usw.) regelmäßig mit einer 1–5%igen (v:v in Wasser) chlorhaltigen Bleichmittellösung (enthält Natriumhypochlorit) oder Lösung zur DNA-Entfernung.

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

- Öffnen Sie niemals Reagenzröhrchen nach der Amplifikation.
- Entsorgen Sie die kontaminierten Röhrchen stets durch einstündiges Einweichen in einer 1–5%igen (v:v in Wasser) Bleichmittellösung (auf Chlorbasis) abseits des Nachweis-Vorbereitungsbereichs.
- Autoklavieren Sie die Reagenzgefäße niemals nach der Amplifikation.
- Wenn bei Proben ein hoher Gehalt an freier *Cronobacter*-DNA vermutet wird (z. B. DNA aus nicht lebensfähigen *Cronobacter*-Zellen, die einem Abtötungs- bzw. Inaktivierungsschritt unterzogen wurden), sollten mutmaßlich positive Anreicherungen vor dem Schritt der **Lyse** einer DNA-Entfernungsbehandlung (z. B. mit DNase) oder einer Behandlung mit PMAxx unterzogen werden. Wenden Sie sich für weitere Anweisungen an Ihren Ansprechpartner bei Neogen. Die Entfernung freier DNA wurde im Rahmen der NF-Validierungsstudie nicht untersucht.

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 neogen.com oder wenden Sie sich an den lokalen Neogen-Verkaufsvertreter oder Händler.

Anwenderverantwortung

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

Bei der Auswahl einer Testmethode ist es wichtig zu berücksichtigen, dass externe Faktoren wie Probenahmemethoden, Testprotokolle, Probenvorbereitung, einschließlich Homogenisierung und Vermischung, Handhabung, Labortechnik und die Probe selbst 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.

Ebenso liegt es in der Verantwortung des Anwenders, zu bestätigen, dass die 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 Matrizen oder Prozesse dar.

Um Kunden dabei zu unterstützen, die Eignung der Methode während der Umsetzung zu bewerten, hat Neogen das „Neogen Molecular Detection Matrix Control Kit“ entwickelt (in ISO 24914:2026[6] auch als „Amplifikationskontrolle“ bezeichnet). Verwenden Sie die Matrixkontrolle (MDMC96), um während der Validierung und Verifizierung die Beeinflussung der Ergebnisse des Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* durch die Matrix zu bewerten. Befolgen Sie die Norm ISO 16140-3:2021[7] und/oder das Qualitätssicherungsprogramm Ihrer Organisation, um die repräsentative Anzahl der Proben zu ermitteln, die zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Methode und zur Festlegung ihres Anwendungsbereichs in Ihrem Labor erforderlich ist. Die routinemäßige Verwendung der Neogen Molecular Detection Matrix Control ist nicht erforderlich, sobald die Methode validiert und der Anwendungsbereich des Labors festgelegt wurde. Befolgen Sie das Qualitätssicherungsprogramm Ihres Unternehmens, um im Einzelfall zu entscheiden, ob die Neogen Molecular Detection Matrix Control erforderlich ist und wie oft sie bei Routinetests eingesetzt werden soll.

Eine Matrix kann definiert werden als Produkttyp mit intrinsischen Eigenschaften wie Zusammensetzung und Verfahren. Unterschiede zwischen Matrices können einfache Auswirkungen von Unterschieden in Verarbeitung oder Präsentation sein, wie roh oder pasteurisiert, frisch oder getrocknet usw.

Haftungsbeschränkungen/Beschränktes Rechtsmittel

AUSSER ES WIRD AUSDRÜCKLICH ANDERS IM ABSCHNITT DER HAFTUNGSBESCHRÄNKUNGEN DER VERPACKUNG DES JEWEILIGEN PRODUKTS ANGEGEBEN, LEHNT NEOGEN ALLE AUSDRÜCKLICHEN UND STILLSCHWEIGENDEN GARANTIEN, 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. Sie müssen Neogen unverzüglich innerhalb von sechzig Tagen nach Entdeckung vermuteter Mängel an einem Produkt benachrichtigen und das Produkt an Neogen zurücksenden. Bei weiteren Fragen wenden Sie sich bitte an Ihren Neogen-Vertreter oder autorisierten Neogen-Händler.

Die vollständigen Allgemeinen Geschäftsbedingungen von Neogen finden Sie unter: https://neogen.com/en/terms-and-conditions/

Einschränkung der Haftung 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 der Neogen den Kaufpreis des angeblich defekten Produkts.

Lagerung und Entsorgung

Lagern Sie den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* bei 2–8 °C. Nicht einfrieren. 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 bis 8 °C aufbewahrt werden.

Verwenden Sie den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* 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 Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* pathogene Stoffe enthalten. Wenn die Tests abgeschlossen sind, befolgen Sie die lokalen, regionalen und nationalen Bestimmungen für die Entsorgung kontaminierter Abfälle. Weitere Informationen sowie die jeweils vor Ort geltenden Richtlinien zur Entsorgung entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt.

Bedienungsanleitung

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

Dekontaminieren Sie Laborwerkbänke und Geräte (Pipetten, Capper/Decapper, Reagenzröhrchenhalter usw.) regelmäßig mit einer 1–5%igen (v:v in Wasser) chlorhaltigen Bleichmittellösung oder Lösung zur DNA-Entfernung.

Der Benutzer muss die Bedienerqualifikationsschulung für das molekulare Detektionssystem von Neogen absolvieren, wie im Dokument „Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System"[8] beschrieben.

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

Tabelle 3 und 4 zu Anreicherungsprotokollen gemäß AOAC® *Offizielle Analysemethode℠* 2018.01 und *Leistungsgeprüft℠* Zertifikatsnummer 101703

Tabelle 5 für Anreicherungsprotokolle gemäß NF VALIDATION-Zertifikat 3M 01/20-03/18

Probenanreicherung

Die Tabellen 2, 3, 4 und 5 enthalten Leitlinien für Anreicherungsprotokolle für Lebensmittel- und Umweltproben.

Der Anwender ist selbst für die Validierung von alternativen Probennahme- oder Anreicherungsprotokollen oder Verdünnungsverhältnissen verantwortlich, durch die sichergestellt werden muss, dass dieses Testverfahren den Anforderungen entspricht.

Lebensmittel, Umgebungspulver, Stäube, Kehricht und Schwämme

1. Das Anreicherungsmedium auf Raumtemperatur (20–25 °C) bringen, sofern im Anreicherungsprotokoll nichts anderes angegeben ist (siehe Tabelle 2, 3, 4 oder 5).
2. Das Anreicherungsmedium und die Probe aseptisch vermischen und durch Mixen, gründliches Homogenisieren, Vortexen oder manuelles Mischen 2 ± 0,2 Minuten lang **oder bis sich alle Klumpen vollständig aufgelöst haben und die Anreicherungssuspension homogen ist, gründlich homogenisieren**[9, 10].
    a. Faktoren wie Probenaufbereitung einschließlich Homogenisierung und Mischung, Handhabung und Labortechnik können die Ergebnisse beeinflussen.
    b. Bei der Handhabung von partikelreichen Proben wird die Verwendung von Filterbeuteln empfohlen.
    c. Bei Matrizen, die in Wasser aufquellen und eine hohe Viskosität aufweisen (z. B. Getreide, Stärke), wird empfohlen, weitere Verdünnungen (> 1:10) vorzunehmen, bis die Viskosität ausreichend reduziert ist, oder sterile 1 %ige (w/v) Alpha-Amylase zum BPW (ISO)[10] hinzuzufügen.
    d. Bei umfangreichen Getreideproben das Getreidepulver allmählich und unter häufigem Mischen der Flüssigkeit beifügen, um Klumpenbildung zu vermeiden.
3. Die Inkubation erfolgt gemäß den Angaben in der entsprechenden Protokolltabelle (siehe Tabelle 2, 3, 4 oder 5).

Tabelle 2. Allgemeine Anreicherungsprotokolle

Probenmatrix	Probengröße[1]	Menge der Anreicherungs-bouillon[1,2]	Anreiche-rungstemperatur (± 1 °C)	Anreicherungs-zeit (Stunden)	Probenanalyse-volumen
Säuglingsmilch in Pulverform (PIF) und Rohstoffe wie Trockenmilchpulver, Sojapulver, Molkenproteinpulver, Laktose, Reismehl und Maltodextrin	1X Gramm Probe	9X ml Gepuffertes Peptonwasser ISO (1:10)	37	18–24	20 µl
Rohstoffe wie Salze, Mineralien, Aminosäuren, DHA (Docosahexaensäure) und Vitamine	1X Gramm Probe	99X ml Gepuffertes Peptonwasser ISO (1:100)	37	18–24	20 µl
Trockene Umgebungsproben wie Staub, Kehricht, Staubsaugerproben	1X Gramm Probe	9X ml Gepuffertes Peptonwasser ISO (1:10)	37	18–24	20 µl
Umgebungsschwamm mit 10 ml Letheen-Bouillon oder Dey-Engley (D/E)-Neutralisationsbouillon	1 Probengerät	90 ml Gepuffertes Peptonwasser ISO (1:10)	37	18–24	20 µl

1. Neogen hat den Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* unter Verwendung der in Tabelle 2 angegebenen Verdünnungsverhältnisse bis zu einer Menge von 300 g untersucht, mit Ausnahme von Säuglingsnahrung mit und ohne Probiotika, die bis zu einer Menge von 400 g untersucht wurde. Der Anwender ist selbst für die Validierung von alternativen Verdünnungsverhältnissen oder Protokollen verantwortlich, durch die sichergestellt werden muss, dass das Verfahren den Anforderungen entspricht.
2. Verwenden Sie **vorgewärmtes** gepuffertes Peptonwasser ISO, wenn die Menge der Anreicherungsbouillon > 300 ml ist (z. B. Probe > 30 Gramm).

Spezifische Anweisungen für validierte Verfahren

AOAC® *Official Method of Analysis℠* (OMA) 2018.01

AOAC® *Performance Tested ℠* (PTM) Certificate #101703

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

In OMA℠ und PTM℠-Studien des AOAC-Forschungsinstituts wurde Neogen Molekularer Detektions Assay 2 – *Cronobacter* als effektive Methode für den Nachweis von *Cronobacter bewertet.* Die in den Studien geprüften Matrizes sind in den Tabellen 3 und 4 aufgeführt.

Die Probe gemäß den Tabellen 3 und 4 vorbereiten und durch Mixen, gründliches Homogenisieren, Vortexen oder manuelles Mischen 2 ± 0,2 Minuten lang oder so lange gründlich homogenisieren, bis sich alle Klumpen vollständig aufgelöst haben und die Anreicherungssuspension homogen ist[9, 10].

Tabelle 3. Anreicherungsprotokolle gemäß AOAC® *OMA℠* 2018.01 und *PTM℠* 101703

Probenmatrix	Probengröße	Menge der Anrei-cherungsbouillon[a]	Anreicherungs-temperatur (± 1 °C)	Anreicherungs-zeit (Stunden)	Probenanalyse-volumen
Säuglingsnahrung in Pulverform mit Probiotika	10 g	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl
	300 g	2700 ml BPW (ISO) + 10 mg/l Vancomycin)[b]	Vorgewärmt 37	22–24	20 µl
Getreidebrei in Pulverform für Säuglinge ohne Probiotika	10 g	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl
	300 g	2700 ml BPW (ISO) (1:10)	Vorgewärmt 37	18–24	20 µl
Laktosepulver	10 g	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl

Edelstahl (4" x 4")[c]	1 Schwamm	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl

[a]Verwenden Sie **vorgewärmte** BPW (ISO), wenn das Volumen der Anreicherungsbouillon > 300 ml beträgt.

[b]Endkonzentration

[c]Umweltschwamm, vorbefeuchtet mit 10 ml D/E-Neutralisationsbrühe.

Tabelle 4. Anreicherungsprotokolle gemäß AOAC® *PTM*℠ 101703

Probenmatrix	Proben-größe	Menge der Anreiche-rungsbouillon[a]	Anreicherungs-temperatur (± 1 °C)	Anreicherungs-zeit (Stunden)	Probenana-lyse-volumen
Säuglingsnahrung in Pulverform mit Probiotika	400[a] g	3600 ml BPW (ISO) + 10 mg/l Vancomycin)[b]	Vorgewärmt 37	22-24	20 µL
Säuglingsnahrung in Pulverform ohne Probiotika	400[a] g	3600 ml BPW (ISO) (1:10)	Vorgewärmt 37	22-24	20 µL

[a]Von der AOAC PTM zugelassene Matrizen unter Anwendung von Schritten zur Entfernung freier DNA.

Weitere Informationen finden Sie in der kostenlosen Anleitung zur DNA-Entfernung

NF VALIDATION gemäß AFNOR Certification

3M 01/20-03/18

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 ISO 16140-2:2016[11] im Vergleich zu ISO 22964:2017[2].

Einsatzgebiet der Validierung: Säuglingsmilch in Pulverform und Säuglingsgetreide in Pulverform mit und ohne Probiotika, Rohstoffe und Umgebungsproben.

Probenvorbereitung: Probenvorbereitung: Proben müssen gemäß EN ISO 22694:2017[2] und EN ISO 6887[9, 10] vorbereitet werden.

Softwareversion: Siehe Zertifikat.

Tabelle 5. Anreicherungsprotokolle gemäß NF VALIDATION zertifizierte Methode 3M 01/20–03/18

Probenmatrix	Proben-größe	Menge der Anrei-cherungsbouillon[1]	Anreiche-rungstempe-ratur (± 1 °C)	Anrei-cherungszeit (Stunden)	Probenana-lysevolu-men	Empfohlener Unter-brechungspunkt[2, 3]
• Säuglingsmilch in Pulverform • Säuglingsgetreide in Pulverform • Inhaltsstoffe wie Trockenmilchpulver, Sojapulver, Molkenproteinpulver, Laktose, Reismehl und Maltodextrin • Trockene Umgebungsproben wie Staub, Kehricht, Staubsaugerproben,	10 g	90 ml Gepuffertes Peptonwasser ISO (1:10)	37	18–24	20 µl	Die Anreicherungs-bouillon bzw. das Pro-benlysat kann bis zu 72 Stunden bei 2–8 °C gelagert werden.
• Schwamm, Spülwasser, Wischtücher	1 Pro-bengerät oder 10 ml					Die Anreicherungs-bouillon bzw. das Pro-benlysat kann bis zu 72 Stunden bei 2–8 °C gelagert werden.
Säuglingsmilch in Pulverform und Säuglingsgetreide in Pulverform (nicht-probiotisch)	30–300 g	Gepuffertes Peptonwasser ISO (1:10)	37	18–24	20 µl	Die Anreicherungs-bouillon bzw. das Pro-benlysat kann bis zu 72 Stunden bei 2–8 °C gelagert werden.
Säuglingsmilch in Pulverform und Säuglingsgetreide in Pulverform (einschließlich probiotisch)	30–300 g	Gepuffertes Peptonwasser (ISO) + 10 mg/l Vancomycin (1:10)	37	22–26	20 µl	Keine

1. Verwenden Sie vorgewärmtes gepuffertes Peptonwasser ISO, wenn die Menge der Anreicherungsbouillon > 300 ml ist (z. B. Probe > 30 Gramm).
2. Fahren Sie mit dem Testen ab Schritt 1 im Abschnitt Lyse fort, nachdem Sie die Anreicherungsbouillon aus der Lagerung genommen haben. Fahren Sie mit dem Testen ab Schritt 7 im Abschnitt Lyse fort, nachdem Sie das Probenlysat aus der Lagerung genommen haben.
3. Weitere Informationen zum erneuten Testen von gelagerten wärmebehandelten Lysaten entnehmen Sie bitte Anhang A.

Vorbereitung der Neogen® Molekulare Detektion – Beladehilfe

1. Befeuchten Sie ein Tuch oder ein Einwegtuch mit einer 1–5%igen Haushaltsbleichmittellösung (v:v in Wasser) 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.

Für dieses Verfahren sind zwei Einsätze des Neogen Molekulare Detektion Heiz/Kühl Block erforderlich. Beide Einsätze sind das gleiche Produkt (700000145), werden jedoch für unterschiedliche Funktionen verwendet.

Der Übersichtlichkeit halber wird der für den Erhitzungsschritt verwendete Einsatz als „Molekulare Detektion Heizblock Insert“ bezeichnet, während der für den Kühlschritt verwendete Einsatz als „Molekulare Detektion Kühlblock Insert“ bezeichnet wird. Diese Bezeichnungen dienen lediglich der Unterscheidung ihrer Funktionen und weisen nicht auf separate Produkte hin.

Vorbereitung des Neogen® Molekularen Detektion – Kühlblockeinsatzes

Neogen-Kühlblockeinsatz für molekulare Detektion direkt auf der Laborwerkbank platzieren. Block bei Umgebungstemperatur im Labor (20–25 °C) verwenden.

Vorbereitung des Neogen® Molekularen Detektion – Heizblockeinsatzes

Legen Sie den Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz in ein Trocken-Doppelblock-Heizgerät. Schalten Sie das Trocken-Blockheizgerät 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.

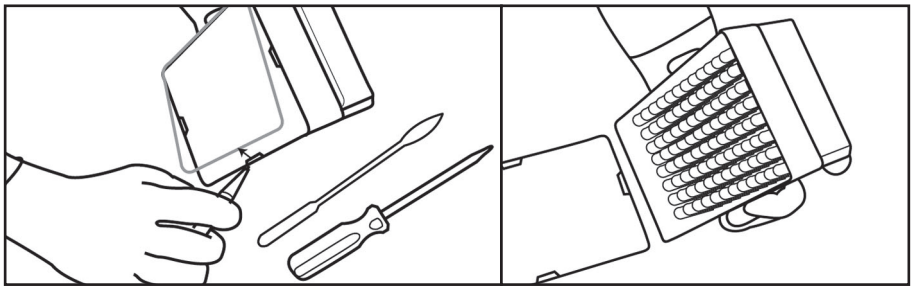
Vorbereitung des Neogen® Molekulare Detektion – Geräts

1. Starten Sie die Neogen® Molekulare Detektion – Software und loggen Sie sich ein. Setzen Sie sich mit dem Ihrem Neogen Food Safety Verkaufsvertreter 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

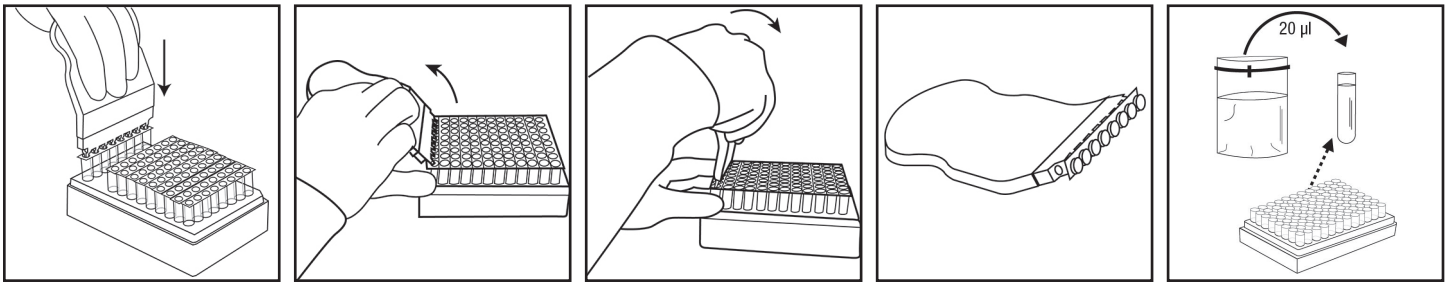
Entfernen Sie die Unterseite des Neogen Lyselösungs-Trägers mit einem Schraubendreher, bevor Sie ihn im Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz platzieren.



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

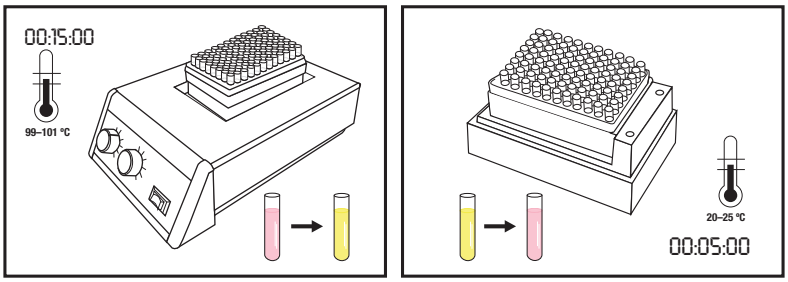
     Übertragen Sie **zuerst** die angereicherten Proben jeweils einzeln in ein Neogen Lyselösungsgefäß. Übertragen Sie die NC **zuletzt**.
   - 4.4 Öffnen Sie jeden Neogen Streifen mit Lyselösungsgefäßen einzeln mit dem Neogen® Molekulare Detektion – Cap/Decap-Werkzeug – Lyse.
   - 4.5 Entsorgen Sie die Kappen der Neogen Lyselösungsgefäße. 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 Schütteln Sie bei der Arbeit mit viskosen Proben den Anreicherungsbeutel, bevor Sie die Probe über die gefilterte Seite entnehmen.
   - 4.7 Übertragen Sie 20 µl der Probe in ein Neogen Lyselösungsgefäß sofern in der Protokolltabelle nichts anderes angegeben ist.

5. Wiederholen Sie Schritte 4.4 bis 4.7, bis jede einzelne Probe in ein zugeordnetes Neogen Lyselösungsgefäß im Streifen gegeben wurde.



6. Sobald Sie alle Proben übertragen haben, übertragen Sie 20 µl der Negativkontrolle (steriles Anreicherungsmedium, z. B. gepuffertes Peptonwasser BPW) in ein Neogen Lyselösungsgefäß. Als Negativkontrolle kein Wasser verwenden.
7. Stellen Sie fest, ob der Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz die erforderliche Temperatur von 100 ± 1 °C erreicht hat.
8. Heizschritt: Das nicht abgedeckte Gestell mit Röhrchen mit Neogen Lyselösung im Neogen Heizblockeinsatz für molekulare Detektion platzieren und 15 ± 1 Minuten lang aufheizen. Dabei ändert sich die Farbe der Neogen Lyselösung von rosafarben (kalt) zu gelb (heiß).

   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.
9. Kühlschritt: Das nicht abgedeckte Gestell mit Röhrchen mit Neogen Lyselösung aus dem Neogen Heizblock für molekulare Detektion nehmen und mindestens 5 Minuten und maximal 10 Minuten lang im Neogen Kühlblockeinsatz für molekulare Detektion abkühlen. Der Neogen Kühlblockeinsatz für molekulare Detektion muss bei Verwendung bei Raumtemperatur ohne das Neogen® Kühlblockfach für molekulare Detektion direkt auf der Laborwerkbank stehen. Während des Abkühlens nimmt die Neogen-Lysislösung wieder eine rosa Färbung an.
10. Nehmen Sie den Träger mit den Neogen Lyselösungsgefäßen aus dem Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz.



Amplifikation

1. Für jede Probe und ihre Negativkontrolle ist ein Reagenzgefäß für Neogen Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* erforderlich.
   1.1 Die Gefäßstreifen können auf die gewünschte Anzahl der Gefäße zurechtgeschnitten werden. Wählen Sie die Anzahl der erforderlichen Reagenzgefäße für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* bzw. der Gefäßstreifen zu 8 Gefäßen.
   1.2 Stellen Sie die Reagenzgefäße für Neogen Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* in einen leeren Gefäßträger.
   1.3 Vermeiden Sie es, die Reagenzkügelchen im unteren Teil der Gefäße aufzurühren.
2. Wählen Sie ein 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 Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* und verwenden Sie bei jedem Übertragungsschritt eine neue Pipettenspitze.
4. Übertragen Sie wie unten beschrieben die einzelnen Lysate in ein Reagenzgefäß für Neogen Molekulares Detektion Assay 2 – *Cronobacter* und ein Gefäß mit Neogen Reagenzkontrolle:

   Übertragen Sie jedes Probenlysat *zuerst* in ein eigenes Reagenzgefäß für Neogen Molekulares Detektions Assay 2 – **Cronobacter**, gefolgt von der neutralen Kontrolle. Hydrieren Sie das Gefäß mit Neogen Reagenzkontrolle als **letztes**.
5. Öffnen Sie die Reagenzgefäße für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* 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 Lyselösungsgefäß in das entsprechende Reagenzgefäß für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter*. 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 den Neogen Molekulares Detektion Assay 2 – *Cronobacter* Nachweis im Streifen hinzugefügt haben.

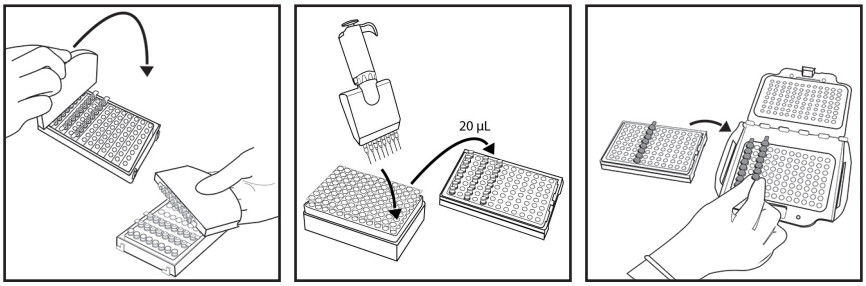
5.3 Verschließen Sie die Reagenzgefäße für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* mit den mitgelieferten zusätzlichen Kappen und üben Sie mit der abgerundeten Seite des Neogen Molekularen Detektion Cap/Decap-Werkzeugs – Reagenz in einer Vorwärts- und Rückwärtsbewegung Druck aus, um 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 die Schritte 5.1 bis 5.3, um 20 µl des NC-Lysats in ein Reagenzgefäß für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* 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. Den konfigurierten Durchgang in der Neogen Software für molekulare Detektion prüfen und bestätigen.
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 60 Minuten verfügbar, obgleich positive Ergebnisse möglicherweise schneller erfasst werden.
10. Nach Abschluss des Nachweises das Neogen Molekulare Detektion-Speed Loader Tray aus dem Neogen Molekulare Detektion – Gerät entnehmen und die Röhrchen durch einstündiges Einweichen in einer 1–5%igen (v:v in Wasser) chlorhaltigen Bleichmittellösung abseits des Nachweis-Vorbereitungsbereichs entsorgen.

HINWEIS: Um das Risiko eines falsch positiven Ergebnisses infolge einer Kreuzkontamination zu minimieren, öffnen Sie niemals Reagenzgefäße, die amplifizierte DNS enthalten. Dies betrifft Reagenzien für den Neogen Molekularen Detektions Assay 2 – *Cronobacter* sowie Gefäße mit Neogen Reagenzkontrolle und Neogen Matrixkontrolle. Versiegelte Reagenzröhrchen stets durch einstündiges Einweichen in einer 1–5%igen (v:v in Wasser) chlorhaltigen Bleichmittellösung abseits des Nachweis-Vorbereitungsbereichs entsorgen.

Auslegung 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 mutmaßlich positiven Ergebnisse werden in Echtzeit erstellt, während negative und zu überprüfende Ergebnisse erst nach Abschluss des Testdurchlaufs dargestellt werden.

Vermutlich positive Anreicherungsergebnisse sollten gemäß den Standardarbeitsanweisungen des Labors oder unter Anwendung der entsprechenden Referenzmethode zur Bestätigung [1,2], bestätigt werden, beginnend mit der Übertragung aus der Primäranreicherung (BPW ISO oder BPW ISO, ergänzt mit 10 mg/l Vancomycin) in eine Sekundäranreicherungsboullion, gefolgt von der anschließenden Ausstrichkultur und der Bestätigung der Isolate mittels geeigneter biochemischer, serologischer und/oder molekularer Methoden.

HINWEIS: Selbst ein negatives Ergebnis führt nicht zu einem Ergebnis von null, da das System und die Amplifikationsreagenzien des Neogen Molekulares Detektions Assay 2 – *Cronobacter* über einen „Hintergrund“ verfügen, der in relativem Verhältnis zur Lichteinheit (RLE) steht.

In dem seltenen Fall, dass eine ungewöhnliche Lichtleistung auftritt, stuft der Algorithmus dies als „Zu überprüfen“ ein. Neogen empfiehlt dem Anwender, den Assay für alle „zu überprüfenden“-Proben zu wiederholen. Wenn das Ergebnis weiterhin „zu überprüfen” lautet, erfolgt ein Bestätigungstest mit der bevorzugten Methode oder wie in den örtlichen Bestimmungen angegeben.[1,2]

Tabelle 6. Symbole und Informationen zu verschiedenen Softwareergebnissen.

Vertiefungstyp	Ergebnissymbol für Vertiefung	Ergebnis	Interpretation
Probe		Positiv	Die Probe ist vermutlich positiv hinsichtlich des Zielpathogens.
Probe		Negativ	Die Probe ist negativ hinsichtlich des Zielerregers.
Probe		Inhibiert*	Die Probenmatrix war hemmend für den Nachweis. Der Test muss möglicherweise wiederholt werden.
Probe		Zu überprüfen	Das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein des Zielerregers konnte nicht genau bestimmt werden. Der Test muss möglicherweise wiederholt werden.
Probe		Fehler*	Es wurde keine Biolumineszenz festgestellt. Der Test muss möglicherweise wiederholt werden.

* Siehe den Durchgangsbericht für weitere Details zu den Ergebnissen. Wenn nötig, wenden Sie sich an Ihren örtlichen Neogen-Vertreter für Hilfe bei der Fehlerbehebung.

Anleitung zur Entfernung freier DNA
Hinweis: Die Entfernung freier DNA wurde im Rahmen der NF-Validierungsstudie nicht untersucht.

1. **PMAxx**
   a. 45 µl Wasser in Molekularqualität (MGW) in ein Mikroröhrchen überführen.
   b. 5 µL PMAxx™-Farbstoff (20 mM) direkt in das Mikroröhrchen mit 45 µl MGW pipettieren. Sanft Auf- und Abpipettieren, um zu mischen.

HINWEIS: Die Lösung kann gekühlt und lichtgeschützt bis zu 1 Stunde lang aufbewahrt werden.

   c. 400 µl der angereicherten Probe in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführen.
   d. Bei schlechten Lichtverhältnissen 5 µl der PMAxx-Lösung in das Probenaliquot geben.
   e. Die Mikroröhrchen 10 Minuten lang abgedeckt und vor Licht geschützt auf einen Rotator stellen.
   f. Die mit PMAxx behandelten Röhrchen für 10 Minuten in das PMA-Lite™-Gerät einsetzen.
   g. Jedes Röhrchen 3 Sekunden lang im Vortex schütteln und anschließend die Röhrchen für weitere 10 Minuten in den PMA-Lite zurückstellen.
   h. 20 µl der mit PMAxx behandelten Proben in Röhrchen mit Neogen Lyselösung überführen und mit den Lyseschritten fortfahren.

2. **Selektive Cronobacter-Nährbouillon (Cronobacter Selective Broth, CSB)**
   a. 0,1 ml der Primäranreicherung in 10 ml CSB überführen.
   b. Bei 41,5 ± 1 °C für 24 ± 2 Stunden inkubieren.
   c. Nach der Inkubation mit den Lyseschritten fortfahren.

Bestätigung der Ergebnisse gemäß NF VALIDATION zertifizierter Methode
Im Kontext der NF VALIDATION müssen alle von Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* als positiv identifizierten Proben mit einem der folgenden Tests bestätigt werden. Die Bestätigung muss innerhalb von 72 Stunden nach Ablauf der Inkubationszeit anhand der bei +2 °C bis +8 °C gelagerten Anreicherungsbouillon erfolgen.

Option 1: Verwendung der Norm ISO 22964:2017[2], beginnend mit der BPW-ISO-Anreicherung.

- Subkultivierung in CSB (Verdünnung 1:10) für 24 h ± 2 h bei 41,5 °C ± 1 °C
- Auf CCI-Agar ausstreifen und 24 h ± 2 h bei 41,5 °C ± 1 °C inkubieren
- Bis zu fünf typische Kolonien auf eine nicht-selektive Agarplatte auftragen und 21 h ± 3 h bei 37 °C ± 1 °C inkubieren
- Führen Sie geeignete biochemische Bestätigungstests durch (Oxidase-Test und biochemische Testreihen)

Option 2: Unter Verwendung von nucleinsäurebasierten Sonden gemäß der Norm ISO 7218:2024[4] durchgeführt an isolierten Kolonien aus selektivem Agar (siehe Option 1). Gemäß den Vorgaben der Norm ISO 7218:2024 kann ein molekularer Screening-Test durch einen zweiten molekularen Test bestätigt werden, der auf einen anderen Genbereich abzielt und bei dem andere Primer und/oder Sonden zum Einsatz kommen. Das Bestätigungsverfahren ist gemäß einer geeigneten Norm nach ISO 16140 mit einem validierten Protokoll und Materialien zur Koloniebestätigung zu validieren.

Option 3: Verwendung einer anderen, von NF VALIDATION-zertifizierten Methode, deren Prinzip sich von dem des Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* unterscheiden muss. Es muss das vollständige Protokoll verwendet werden, das für diese zweite validierte Methode beschrieben wurde. Alle Schritte vor dem Beginn der Bestätigung müssen für beide Methoden gleich sein.

Im Falle widersprüchlicher Ergebnisse (vermutlich positives Ergebnis beim Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter*, das nicht durch eines der oben beschriebenen Verfahren bestätigt wurde) sollte das Labor bei der Meldung seiner Ergebnisse seine festgelegten Standardarbeitsanweisungen befolgen.

Wenn Sie Fragen zu bestimmten Anwendungen oder Verfahren haben, besuchen Sie bitte unsere Website unter neogen.com oder wenden Sie sich an Ihren örtlichen Neogen-Verkaufsvertreter oder -Händler.

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

1. Um ein wärmebehandeltes Lysat zu lagern, setzen Sie eine saubere Kappe auf das Lysegefäß (siehe **Lyse**, Abschnitt 4.5)
2. Lagern Sie sie bis zu 72 Stunden bei 2 bis 8 °C.
3. Bereiten Sie eine gelagerte Probe zur Amplifikation vor, indem Sie sie zum Mischen 2 bis 3 Mal umdrehen.
4. Entkappen Sie die Gefäße.
5. Setzen Sie die gemischten Lysatgefäße in den Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz und erwärmen Sie sie 5 Minuten ± 1 Minute lang bei 100 ± 1 °C.
6. Nehmen Sie den Träger mit den Neogen Lyselösungsgefäßen aus dem Heizblockeinsatz. Lassen Sie ihn 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 Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO 7218:2024. Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen.
5. CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMLB) 6. Auflage. Datum des Inkrafttretens: 29. August 2025.
6. ISO 24914:2026 Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Loop-vermittelte isotherme Amplifikation (LAMP) zum Nachweis von Mikroorganismen und zugehörigen genetischen Markern – Allgemeine Anforderungen und Definitionen. Internationale Organisation für Normung (ISO), Genf, Schweiz. www.iso.org
7. ISO 16140-3:2021 Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Methodenvalidierung – Teil 3: Protokoll zur Validierung von Referenzmethoden und validierten alternativen Methoden in einem einzigen Labor
8. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
9. ISO 6887-5:2020. Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen-- Teil 5: Spezifische Regeln für die Zubereitung von Milch und Milchprodukten.
10. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
11. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

Konsultieren Sie bitte die jeweils aktuelle Version der oben aufgelisteten Standardmethoden.

Erklärung der Symbole

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
Auchincruive House
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation, 620 Lesher Place, Lansing, MI 48912 USA.
© Neogen Corporation 2026. Alle Rechte vorbehalten. Neogen ist eine eingetragene Marke von Neogen Corporation.
Alle anderen Marken- und Produktnamen sind Marken oder eingetragene Marken der jeweiligen Unternehmen. Patent: neogen.com/patents
FS00879B_0826

Fecha de emisión: 2026-07

NEOGEN®

Instrucciones del Producto

Ensayo 2 de detección molecular: *Cronobacter*

Descripción del producto y uso previsto

El Ensayo 2 Detección Molecular Neogen® – *Cronobacter* se utiliza con el Sistema de Detección Molecular Neogen® para la detección específica y rápida de *Cronobacter* en muestras enriquecidas de alimentos y muestras ambientales de donde se procesan alimentos.

Los ensayos de detección molecular de Neogen usan amplificación isotérmica mediada por bucle para amplificar con rapidez secuencias de ácido nucleico con alta especificidad y sensibilidad, combinados con bioluminiscencia para detectar la amplificación. Los resultados presuntamente positivos se reportan en tiempo real, mientras que los resultados negativos se revelan una vez 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].

El Ensayo 2 de detección molecular: *Cronobacter* está previsto para su 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 ha documentado este producto para la evaluación de muestras farmacéuticas, cosméticas, clínicas o veterinarias. Ensayo 2 de detección molecular: *Cronobacter* no se evaluó con todos los productos alimenticios, los procesos de alimentos o protocolos de pruebas posibles ni con todas las cepas de bacterias posibles.

Como con todos los métodos de prueba, el origen, la formulación y la calidad del medio de enriquecimiento puede influir sobre los resultados. Los factores como los métodos de toma de muestras, los protocolos de prueba, la preparación de la muestra, incluso la homogenización y mezclado, manipulación y técnicas de laboratorio aplicados sobre las muestras también pueden influir sobre los resultados. Neogen recomienda la evaluación del método lo que incluye el medio de enriquecimiento en el ambiente del usuario mediante un número suficiente de muestras con determinados alimentos o muestras ambientales y retos microbianos para garantizar que el método satisface los criterios del usuario.

Neogen ha evaluado el Ensayo 2 de detección molecular de Neogen – *Cronobacter* con agua peptonada tamponada (BPW) ISO como caldo de enriquecimiento.

El Equipo de Detección Molecular Neogen® está previsto para ser utilizado con muestras que hayan sido tratadas con calor durante el paso de lisis del ensayo, que se diseñó para destruir los organismos 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 tiene certificación ISO (International Organization for Standardization) 9001 para diseño y fabricación.

El kit de prueba para el Ensayo 2 de detección molecular: *Cronobacter* contiene 96 pruebas, que se describen en la Tabla 1.

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

Artículo	Identificación	Cantidad	Contenido	Comentarios
Solución de Lisis (LS) Neogen®	Solución rosada en tubos transparentes	96 (12 tiras de 8 tubos)	580 µl de LS por tubo	En bastidor y lista para usar
Tubos de reactivos para el Ensayo 2 Detección Molecular Neogen® – *Cronobacter*	Tubos naranjas-rojos	96 (12 tiras de 8 tubos)	Mezcla de detección y amplificación específica liofilizada	Listos para usar
Tapas adicionales	Tapas naranjas-rojas	96 (12 tiras de 8 tapas)		Listos para usar
Control de Reactivos Neogen® (RC)	Tubos transparentes con tapa de bisagra	16 (2 bolsas de 8 tubos individuales)	Mezcla de detección y amplificación de control liofilizado de ADN	Listos para usar

El control negativo, que no está incluido en el kit, es un medio de enriquecimiento estéril, p. ej. BPW ISO. No use agua como control negativo.

Seguridad

El usuario debe leer, comprender y proceder de acuerdo con toda la información sobre seguridad incluida en las instrucciones para el Sistema de Detección Molecular Neogen y el Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter*. Guarde las instrucciones de seguridad como referencia en el futuro.

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

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

⚠ ADVERTENCIA

No use el Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter* para el diagnóstico de afecciones en seres humanos ni animales.

El usuario debe capacitar a su personal en técnicas de prueba adecuadas actuales: por ejemplo, Buenas Prácticas de Laboratorio[3], o la guía de Bioseguridad en LABORATORIOS MICROBIOLÓGICOS Y BIOMÉDICOS (BMBL) de los CDC[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 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter* como se indica en el embalaje y en las Instrucciones del producto.
- Siempre use el Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter* antes de su fecha de vencimiento.
- Use el Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter* con muestras de alimentos y muestras ambientales de donde se procesan alimentos validadas internamente o por un tercero.
- Use el Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter* solo con superficies, desinfectantes, protocolos y cepas bacterianas que hayan sido validados internamente o por un tercero.
- Para una muestra ambiental que contenga tampón neutralizante (NB) con complejo de aril sulfonato, realice una dilución 1:2 antes de la prueba (1 parte de muestra en 1 parte de caldo de enriquecimiento estéril). Otra opción es transferir 10 µL de la solución amortiguadora neutralizante a los tubos de Solución de Lisis Neogen. Productos de manipulación de la muestra Neogen® que incluyen la solución amortiguadora neutralizante con el complejo de aril sulfonato: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G y HS2410NB2G. Este protocolo no se ha evaluado durante el estudio de validación NF.

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

- Realice las pruebas de patógenos en un laboratorio debidamente equipado, bajo la supervisión de personal capacitado. El medio de enriquecimiento incubado y el equipo o las superficies que hayan entrado en contacto con el medio de enriquecimiento podrían contener patógenos en niveles suficientes para provocar un riesgo para la salud humana.
- Siempre proceda de acuerdo con las prácticas estándar de seguridad del laboratorio. Eso incluye usar la ropa de protección adecuada y protección para los ojos al manipular reactivos y muestras contaminadas.
- Evite el contacto con el contenido del medio de enriquecimiento y de los tubos de reactivos después de la amplificación.
- Deseche las muestras enriquecidas y desechos contaminados asociados de acuerdo con los estándares locales, regionales y nacionales vigentes.
- Las muestras que no se hayan tratado con calor de forma adecuada durante el paso de lisis del ensayo podrían considerarse un riesgo biológico potencial y NO deberían introducirse en el instrumento de detección molecular de Neogen.

Para reducir los riesgos 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 asociados con la contaminación ambiental:

- Siga las normativas locales, regionales y nacionales en cuanto a los requisitos de eliminación.

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

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

ATENCIÓN

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

- Cámbiese los guantes antes de hidratar los gránulos reactivos.
- Se recomienda el uso de puntas de pipeta de grado biológico molecular con barrera de aerosol (filtrada) estéril.
- 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 mesas y equipo de laboratorio (pipetas, herramientas para tapar/destapar, gradillas para tubos de reactivos, etc.) con una solución a base de cloro de uso doméstico al 1-5 % (v:v en agua) (es decir, que contenga hipoclorito de sodio) o una solución de remoción de ADN.

Para reducir los riesgos relacionados con un resultado falso positivo:

- Nunca abra a los tubos de reactivos después de la amplificación.
- Siempre deseche los tubos contaminados. Para ello, sumérjalos en una solución de cloro de uso doméstico al 1-5 % (v:v en agua) durante 1 hora, alejado del área de preparación del ensayo.
- Nunca abra los tubos de reactivos después de la amplificación.
- Si se sospecha que las muestras contienen altos niveles de ADN libre de *Cronobacter* (por ejemplo, ADN de células de *Cronobacter* no viables que han sido sometidas a un paso de eliminación o inactivación), los enriquecimientos positivos presuntivos deben tratarse con un procedimiento de eliminación de ADN (por ejemplo, DNasa) o PMAxx antes del paso de **lisis**. Comuníquese con su representante de Neogen para obtener instrucciones adicionales. La eliminación de ADN libre no se evaluó durante el estudio de validación de NF.

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

Si tiene preguntas acerca de los procedimientos o las aplicaciones específicas, visite nuestro sitio web en 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 **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 hay factores externos como los métodos de muestreo, los protocolos de prueba, la preparación de muestras que incluye homogeneización y mezcla, el manejo, la técnica de laboratorio y la muestra en sí que pueden influir en los resultados.

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

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 la idoneidad para el propósito del método durante la implementación, Neogen ha desarrollado el kit de Control Matriz de Detección Molecular Neogen (también llamado control de amplificación en ISO 24914:2026[6]). Utilice el control de la matriz (MDMC96) para evaluar la interferencia de la matriz en los resultados del Ensayo 2 de detección molecular de Neogen: *Cronobacter* durante la validación y la verificación. Siga la norma ISO 16140-3:2021[7] o el programa de aseguramiento de calidad de su organización para determinar el número representativo de muestras necesarias al verificar el rendimiento del método y definir el alcance de su aplicación en su laboratorio. El uso rutinario del Control Matriz de Detección Molecular de Neogen no es necesario una vez que el método ha sido verificado y se ha establecido el alcance de aplicación en laboratorio. Siga el programa de aseguramiento de la calidad de su organización para determinar caso por caso la necesidad del Control Matriz de Detección Molecular Neogen y su frecuencia de uso durante las pruebas rutinarias.

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

Limitación de garantías / Recurso limitado

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. Debe notificar de inmediato a Neogen dentro de los sesenta días posteriores al descubrimiento de cualquier defecto sospechoso en un producto y devolverlo a Neogen. Póngase en contacto con su representante de Neogen o distribuidor autorizado de Neogen para que se le responda cualquier otra pregunta.

Para consultar los términos y condiciones completos de Neogen, visite: https://neogen.com/en/terms-and-conditions/

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

No use el Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter* 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 usarlos, el medio de enriquecimiento y los tubos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter* podrían contener materiales patógenos. Una vez finalizadas las pruebas, siga los reglamentos locales, regionales y nacionales para la eliminación de desechos contaminados. Consulte la Hoja de Datos de Seguridad para obtener más información y conocer las regulaciones 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, gradillas para tubos de reactivos, etc.) con una solución a base de cloro de uso doméstico al 1-5 % (v:v en agua) o una solución de remoción de ADN.

El usuario debería completar la capacitación de calificación de operador del Sistema de Detección Molecular de Neogen, según se describe en el documento “Protocolos e instrucciones de calificación de instalación (Installation Qualification, IQ)/calificación operativa (Operational Qualification, OQ) para el Sistema de Detección Molecular de Neogen”[8].

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

Tablas 3 y 4 para protocolos de enriquecimiento según el AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2018.01 y *Performance Tested*℠ Número de certificado 101703

Tabla 5 para protocolos de enriquecimiento de acuerdo con el certificado de VALIDACIÓN NF 3M 01/20-03/18

Enriquecimiento de la muestra

Las tablas 2, 3, 4 o 5 presentan orientación para protocolos de enriquecimiento de muestras alimentarias y ambientales.

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

Alimentos, polvos ambientales, polvos, barreduras y esponjas

1. Equilibrar el medio de enriquecimiento con la temperatura ambiente (20-25 °C) salvo que se indique lo contrario en el protocolo de enriquecimiento (véase tablas 2, 3, 4 o 5).
2. Combine asépticamente el medio de enriquecimiento y la muestra y homogeneice a fondo mediante mezclado, agitador peristáltico, vórtices o mezclado manual durante 2 ± 0,2 minutos **o hasta que todos los grumos se hayan disuelto por completo y la suspensión de enriquecimiento sea homogénea**[9, 10].
    a. Los factores como la preparación de la muestra, incluso la homogenización y mezclado, manipulación y técnicas de laboratorio pueden influir sobre los resultados.
    b. Para muestras con alto contenido de partículas, se recomienda utilizar bolsas con filtro.
    c. Para matrices que se hinchan en agua y son muy viscosas (por ejemplo, cereales, almidones), se recomienda hacer más diluciones (>1:10) hasta que la viscosidad se reduzca adecuadamente o añadir alfa-amilasa estéril al 1 % (p/v) a BPW (ISO)[10].
    d. Para muestras de gran tamaño de cereales, agregue el cereal en polvo lentamente al líquido mezclando frecuentemente para evitar los grumos.
3. Incube como se indica en la tabla de protocolos correspondiente (véase tabla 2, 3, 4 o 5).

Tabla 2. Protocolos Generales de Enriquecimiento

Matriz de muestreo	Tamaño de la muestra[1]	Volumen del caldo de enriquecimiento[1, 2]	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Volumen de análisis de la muestra
Fórmula en polvo para lactantes (Powdered infant formula, PIF) y materias primas tales como leche en polvo, polvo de soja, suero en polvo, lactosa, harina de arroz y maltodextrina	Muestra de 1X gramos	9X ml de BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Materias primas como sales, minerales, aminoácidos, DHA (ácido docosahexaenoico)	1X gramos Muestra de	99X ml de BPW (ISO) (1:100)	37	18-24	20 µl
Muestras ambientales secas como polvo, barreduras y suciedad aspirada	Muestra de 1X gramos	9X ml de BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Esponja ambiental con 10 ml de caldo de Letheen o D/E Caldo Neutralizante	1 dispositivo de muestreo	90 ml de BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl

1. Neogen ha evaluado el Ensayo de detección molecular 2 – *Cronobacter* utilizando las proporciones de dilución de la tabla 2 hasta 300 g, excepto para fórmulas infantiles con y sin probióticos, que se evaluaron hasta 400 g. Es responsabilidad del usuario validar protocolos o las proporciones de dilución alternativos para garantizar que este método de prueba satisface los criterios del usuario.
2. Use BPW (ISO) **precalentada** si el volumen del caldo de enriquecimiento es >300 ml (por ejemplo, si la muestra es >30 gramos).

Instrucciones Específicas para Métodos Validados

AOAC® *Official Method of Analysis℠* (OMA) 2018.01

AOAC® *Performance Tested℠* (PTM) N.º de certificado 101703

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

En los estudios de AOAC Research Institute, OMA℠ y PTM℠, se descubrió que el Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter* era un método efectivo para la detección de la *Cronobacter.* En las tablas 3 y 4, se muestran las matrices que se probaron en los estudios.

Preparar la muestra según las tablas 3 y 4, homogeneizar a fondo mediante mezclaado, agitación peristáltica, vórtices o mezclado a mano durante 2 ± 0,2 minutos o hasta que todos los grumos se hayan disuelto por completo y la suspensión de enriquecimiento sea homogénea[9, 10].

Tabla 3. Protocolos de enriquecimiento según AOAC® *OMA℠* 2018.01 y *PTM℠*101703

Matriz de muestreo	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento[a]	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Volumen de análisis de la muestra
Fórmula infantil en polvo con probióticos	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
	300 g	2700 mL BPW (ISO) + 10 mg/L vancomicina)[b]	37 precalentado	22-24	20 µL
Cereales infantiles en polvo sin probióticos	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
	300 g	2700 mL BPW (ISO) (1:10)	37 precalentado	18-24	20 µL

Lactosa en polvo	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
Acero inoxidable (4" x 4")[c]	1 esponja	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL

[a]Use BPW (ISO) **precalentada** si el volumen del caldo de enriquecimiento es >300 ml.

[b]Concentración final

[c]Esponja para muestreo ambiental, previamente humedecida con 10 mL de caldo neutralizante D/E.

Tabla 4. Protocolos de enriquecimiento según AOAC® *PTM*℠ 101703

Matriz de Muestreo	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento[a]	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Volumen de análisis de la muestra
Fórmula infantil en polvo con probióticos	400[a] g	3600 mL BPW (ISO) + 10 mg/L vancomicina)	37 precalentado	22-24	20 µL
Fórmula infantil en polvo sin probióticos	400[a] g	3600 mL BPW (ISO) (1:10)	37 precalentado	22-24	20 µL

[a]Matrices aprobadas por AOAC PTM que incluyen etapas de eliminación de ADN libre.

Consulte las instrucciones para la eliminación de ADN libre si desea obtener más detalles.

Validación NF por AFNOR Certification

3M 01/20-03/18

METODOS ALTERNATIVOS DE ANÁLISIS PARA LA AGROINDUSTRIA

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

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

Método de certificación de VALIDACIÓN NF en cumplimiento con ISO 16140-2:2016[11] en comparación con ISO 22964:2017[2].

Alcance de la validación: Fórmula en polvo para lactantes y cereal en polvo para lactantes con y sin probióticos, materias primas y muestras ambientales.

Preparación de la muestra: Las muestras se deben preparar de acuerdo con las normas EN ISO 22694:2017[2] y EN ISO 6887[9, 10].

Versión de Software: Consulte el certificado.

Tabla 5. Protocolos de enriquecimiento según el método certificado de NF VALIDATION 3M 01/20-03/18.

Matriz de muestreo	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento[1]	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Volumen de análisis de la muestra	Punto de interrupción recomendado[2, 3]
• Fórmula en polvo para lactantes • Cereal en polvo para lactantes • Ingredientes como leche en polvo, polvo de soja, suero en polvo, lactosa, harina de arroz, maltodextrina • Muestras ambientales secas como polvo, barreduras y suciedad aspirada,	10 g	90 ml de BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl	El caldo de enriquecimiento o el lisado de muestra se puede almacenar a 2-8 °C por hasta 72 horas.
• Esponja, agua de enjuague, paños	1 dispositivo de muestreo o 10 ml					El caldo de enriquecimiento o el lisado de muestra se puede almacenar a 2-8 °C por hasta 72 horas.
Fórmula en polvo para lactantes y cereal en polvo para lactantes (no probiótico)	30-300 g	BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl	El caldo de enriquecimiento o el lisado de muestra se puede almacenar a 2-8 °C por hasta 72 horas.
Fórmula en polvo para lactantes y cereal en polvo para lactantes (incluso probióticos)	30-300 g	BPW (ISO) + 10 mg/l de vancomicina (1:10)	37	22-24	20 µl	Ninguno

1. Use BPW (ISO) precalentada si el volumen del caldo de enriquecimiento es >300 ml (por ejemplo, si la muestra es >30 gramos).
2. Después de extraer el caldo de enriquecimiento del almacenamiento, retome la prueba desde el Paso 1 en la sección Lisis. Después de extraer el lisado de muestra del almacenamiento, retome la prueba desde el Paso 7 en la sección Lisis.
3. Consulte el Apéndice A para repetir las pruebas de lisados tratados con calor.

Preparación de la bandeja de carga rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen®

1. Humedezca un paño o una toalla desechable con una solución de cloro de uso doméstico del 1 % al 5 % (v:v en agua) y limpie la bandeja de carga rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen.
2. Enjuague la bandeja de carga rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen con agua.
3. Utilice una toalla desechable para secar la bandeja de carga rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen.
4. Antes de utilizarla, asegúrese de que la bandeja de carga rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen esté seca.

Para este procedimiento se requieren dos bloques insertables de calentamiento/enfriamiento de detección molecular Neogen. Ambos insertables son el mismo producto (700000145) pero se utilizan para funciones diferentes.

Para mayor claridad dentro del procedimiento, el insertable utilizado para el paso de calentamiento se denominará bloque insertable de calentamiento de detección molecular, y el insertable utilizado para el paso de enfriamiento se denominará bloque insertable de enfriamiento de detección molecular. Estas designaciones se utilizan únicamente para distinguir sus funciones y no indican productos separados.

Preparación del bloque de frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen®

Coloque el bloque insertable de enfriamiento de detección molecular de Neogen directamente sobre una mesa de laboratorio. Utilice el bloque a temperatura ambiente del laboratorio (20-25 °C).

Preparación del bloque de calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen®

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

NOTA: Según la unidad de calentamiento, espere aproximadamente 30 minutos para que el bloque de calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen alcance la temperatura deseada. Con un termómetro calibrado apropiado (por 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.

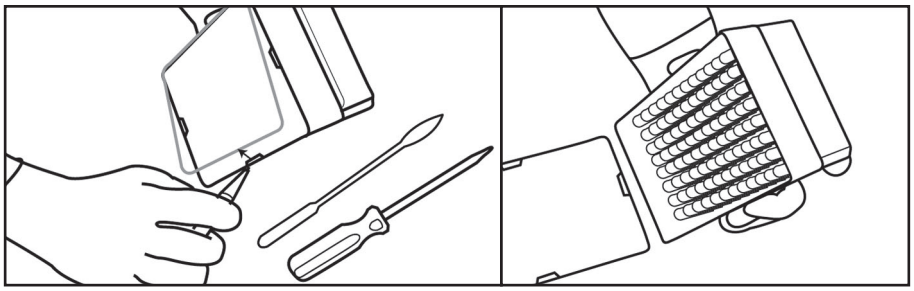
Preparación del equipo de detección molecular Neogen®

1. Inicie el Software de Detección Molecular Neogen® e inicie sesión. Comuníquese con su representante de Neogen Food Safety para asegurarse de que cuenta con la versión más actualizada del software.
2. Encienda el equipo de detección molecular Neogen.
3. Cree o edite una corrida 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 una corrida, la barra de estado se cambiará a color VERDE.

Lisis

Retire la parte inferior de la gradilla de solución de lisis de Neogen con un destornillador antes de colocarlo en el bloque de calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen.

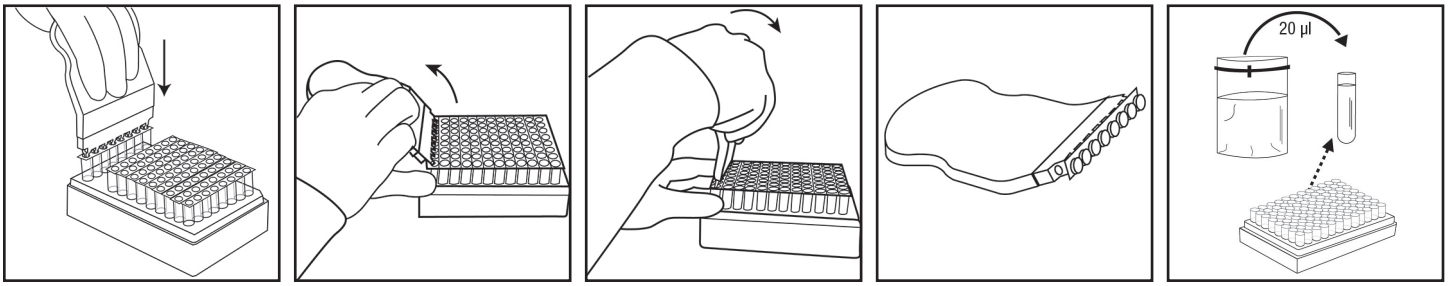


1. Permita que los tubos de solución de lisis Neogen se calienten colocando la gradilla a temperatura ambiente (20-25 °C) durante la noche (16 a 18 horas). Las alternativas para que los tubos de Solución de Lisis Neogen alcancen temperatura ambiente son colocar los tubos de solución de lisis Neogen sobre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

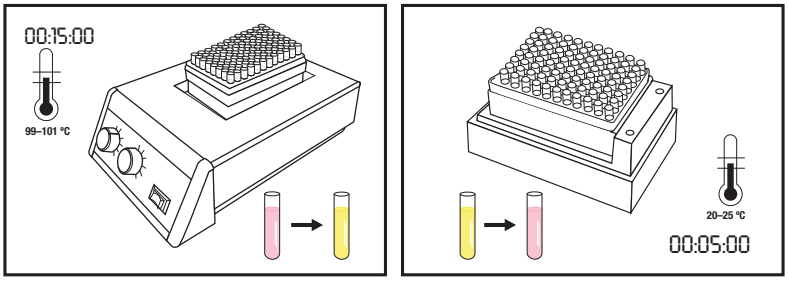
   - 4.4 Utilice la herramienta para encapuchado/desencapuchado del Sistema de Detección Molecular – Lisis Neogen® para destapar una tira de tubos de solución de lisis Neogen, una tira por vez.
   - 4.5 Deseche la tapa del tubo de solución de lisis Neogen; si se conservara el lisado para una repetición de prueba, coloque las tapas en un envase limpio para su reaplicación luego de la lisis.
     - 4.5.1. Para ver cómo procesar el lisato conservado, consulte el Apéndice A.
   - 4.6 Agite la bolsa de enriquecimiento antes de recolectar la muestra del lado filtrado cuando trabaje con muestras viscosas.
   - 4.7 Transfiera 20 µl de la muestra a un tubo de solución de lisis Neogen a menos que se indique de manera contraria en la tabla de protocolo.

5. Repita los pasos 4.4 a 4.7 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, por ejemplo, BPW) a un tubo de solución de lisis Neogen. No use agua como un NC.
7. Verifique que la temperatura del bloque de calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen sea de 100 °C ±1 °C.
8. Paso de calentamiento: Coloque la gradilla destapada de tubos de solución de lisis Neogen en el bloque insertable de calentamiento para detección molecular Neogen y caliente durante 15 ± 1 minutos.

   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. Paso de enfriamiento: Retire la gradilla destapada de los tubos de la solución de lisis Neogen del Bloque de Calentamiento y deje que se enfríe en el Bloque Insertable de Enfriamiento para Detección Molecular Neogen durante al menos 5 minutos y un máximo de 10 minutos. El Bloque Insertable de Enfriamiento Molecular Neogen, usado a temperatura ambiente sin la bandeja de bloque de enfriamiento para Detección Molecular de Neogen®, debe colocarse directamente sobre la mesa del laboratorio. Durante el enfriamiento, la solución de lisis de Neogen volverá a un color rosa.
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 reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter* por cada muestra y el NC.
   1.1 Las tiras de tubos pueden cortarse para obtener la cantidad de tubos deseada. Seleccione la cantidad de tubos de reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter* o tiras de 8 tubos según sea necesario.
   1.2 Tubos de reactivos para el Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter*
   1.3 Evite mover las perlas de reactivo en el fondo de los tubos.
2. Seleccione un tubo de control de reactivos Neogen y colóquelo en la gradilla.
3. Para evitar la contaminación cruzada, destape una tira de tubos de reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter* por vez y use una nueva punta de pipeta para cada paso de transferencia.
4. Transfiera cada uno de los lisados a un tubos de reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter* y a un tubo de control de reactivos Neogen como se describe a continuación:

   Transfiera el lisado de cada muestra a los tubos de reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter* **primero**, seguido por el NC. Hidrate el tubo de control de reactivos Neogen **al final**.
5. Use la Herramienta para Encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular – Reactivo Neogen® para destapar los tubos de reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter*, una tira de tubo a la vez. Desecha la tapa.
   5.1 **Transfiera 20 µl del lisado de muestra de la 1/2 superior del líquido (evite el precipitado) en el tubo de solución de lisis Neogen que corresponde al tubo de reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter*. Aplique en un ángulo que permita evitar que se muevan los gránulos. Mezcle pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.**
   5.2 Repita el paso 5.1 hasta que se haya añadido una muestra individual del lisado a un Tubo de Reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter* en la tira.

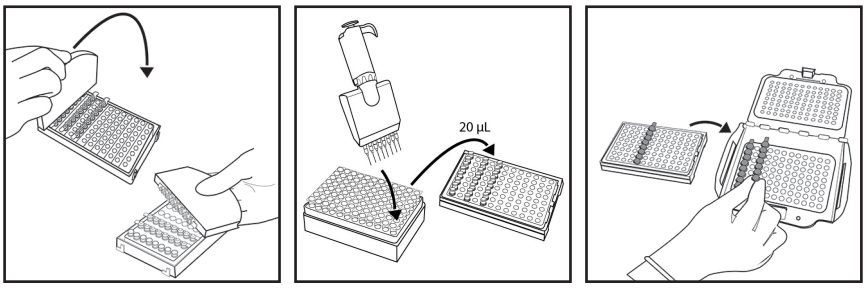
5.3 Cubra los Tubos de Reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter* con las tapas adicionales provistas y utilice el lado redondeado de la herramienta para encapuchado/desencapuchado del Sistema de Detección Molecular – Reactivo Neogen para aplicar presión con un movimiento hacia 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 los pasos 5.1 a 5.3 para transferir 20 µl de lisado NC a un tubo de reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter*.

5.6 Transfiera los **20 µl del lisado NC a un tubo de Control de Reactivos Neogen**. Aplique en un ángulo que permita evitar que se muevan los gránulos. Mezcle pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.

6. Cargue los tubos tapados en una bandeja de carga rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen limpia y descontaminada. Cierre y trabe la tapa de la bandeja de carga rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen.



7. Revise y confirme la ejecución configurada en el Software del Sistema de Detección Molecular de Neogen.
8. Haga clic en el botón de inicio del software y seleccione el equipo que usará. La tapa del equipo seleccionado se abrirá automáticamente.
9. Coloque la bandeja de carga rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen en el equipo de detección molecular Neogen y cierre la tapa para comenzar con el ensayo. Obtendrá los resultados al cabo de 60 minutos, aunque los positivos pueden detectarse antes.
10. Una vez que el ensayo esté completo, retire la bandeja de carga rápida de Detección Molecular de Neogen del instrumento de Detección Molecular y deseche los tubos. Para ello, sumérjalos en una solución de cloro de uso doméstico al 1-5 % (v:v en agua) durante 1 hora, alejado del área de preparación del 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 2 Detección Molecular Neogen – *Cronobacter*, el control de reactivos Neogen y los tubos de control de matriz Neogen. Siempre deseche los tubos de reactivos cerrados. Para ello, sumérjalos en una solución a base de cloro de uso doméstico al 1- 5 % (v:v en agua) durante 1 hora, alejado del área de preparación del ensayo.

Resultados e interpretación

Un algoritmo interpreta la curva de producción de luz que se obtiene de la detección de ácido nucleico amplificado. El software analiza automáticamente los resultados y los expresa en color según el resultado. Los resultados Positivo o Negativo se determinan mediante el análisis de una cantidad de parámetros característicos de la curva. Los resultados presuntivos positivos se informan en tiempo real, mientras que los resultados Negativo e Inspeccionar se muestran una vez terminado el análisis.

Los enriquecimientos positivos presuntivos deben confirmarse según los procedimientos operativos estándar del laboratorio o siguiendo la confirmación del método de referencia apropiado[1,2], comenzando con la transferencia desde el enriquecimiento primario (BPW ISO o BPW ISO suplementado con 10 mg/L de vancomicina) a un caldo de enriquecimiento secundario, seguido de un posterior aislamiento y confirmación de aislados usando el método bioquímico, serológico o molecular adecuado.

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

En el evento improbable de que se produzca una salida de luz inusual, el algoritmo etiqueta esto como “Inspeccionar”. Neogen recomienda al usuario repetir el ensayo para cualquier muestra etiquetada como “Inspeccionar”. Si el resultado sigue siendo “Inspeccionar”, continúe con la prueba de confirmación usando su método de preferencia o según lo especifiquen las regulaciones locales.[1,2]

Tabla 6. Símbolos e información para varios resultados de software

Tipo de pocillo	Símbolo de resultado del pocillo	Resultado	Interpretación
Muestra		Positivo	La muestra es presuntiva positiva para el patógeno objetivo.
Muestra		Negativo	La muestra es negativa para el patógeno objetivo.
Muestra		Inhibido*	La matriz de la muestra fue inhibidora para el ensayo. Es posible que se deba repetir la prueba.
Muestra		Inspeccionar	La presencia o ausencia del patógeno objetivo era indeterminada. Es posible que se deba repetir la prueba.
Muestra		Error*	No se detectó bioluminiscencia. Es posible que se deba repetir la prueba.

*Consulte el informe del análisis para obtener más detalles sobre los resultados. Si es necesario, comuníquese con su representante local de Neogen para solicitar ayuda en la resolución de problemas.

Instrucciones para la extracción de ADN libre

Nota: La extracción de ADN libre no se evaluó como parte del estudio de validación de NF.

1. PMAxx

a. Transfiera 45 µL de agua de grado molecular (MGW) a un microtubo.

b. Dispense 5 µL de tinte PMAxx™ (20 mM) directamente en el microtubo con 45 µL de MGW. Mezcle con cuidado aspirando y expulsando el líquido con la pipeta 5 veces.

NOTA: La solución puede almacenarse refrigerada, protegida de la luz, por hasta 1 hora.

c. Transfiera 400 µL de la muestra enriquecida a un tubo para microcentrífuga.

d. En condiciones de poca luz, añada 5 µL de la solución PMAxx a la alícuota de la muestra.

e. Coloque microtubos en un rotador por 10 minutos, cubiertos y protegidos de la luz.

f. Coloque los tubos tratados con PMAxx en el instrumento PMA-Lite™ durante 10 minutos.

g. Agite cada tubo en vortex por 3 segundos y luego vuelva a colocar los tubos en el PMA-Lite durante 10 minutos adicionales.

h. Transfiera 20 µL de las muestras tratadas con PMAxx a tubos de solución de lisis de Neogen y proceda con los pasos de lisis.

2. Caldo selectivo de Cronobacter (CSB)

a. Transfiera 0,1 mL de enriquecimiento primario a 10 mL de CSB.

b. Incube a 41,5 ± 1 °C durante 24 ± 2 horas.

c. Después de la incubación, proceda con los pasos de lisis.

Confirmación de resultados según el método certificado de VALIDACIÓN NF

En el contexto de VALIDACIÓN NF, todas las muestras que el Ensayo de Detección Molecular de Neogen 2 – *Cronobacter* identificó como positivas se deben confirmar mediante alguna de las pruebas siguientes. La confirmación se debe obtener a partir del caldo de enriquecimiento almacenado entre +2 °C y +8 °C dentro de las 72 horas posteriores al final del período de incubación.

Opción 1: Utilizando la norma ISO 22964:2017[2] partiendo del enriquecimiento ISO BPW.

- Subcultivo en CSB (dilución 1/10) durante 24 horas ± 2 horas a 41,5 °C ± 1 °C
- Estrie sobre el agar CCI e incube por 24 horas ± 2 horas a 41,5 °C ± 1 °C
- Resiembre hasta cinco colonias típicas sobre una placa de agar no selectivo e incube por 21 h ± 3 h a 37 °C ± 1 °C
- Realice pruebas bioquímicas confirmatorias pertinentes (prueba de oxidasa y galerías bioquímicas)

Opción 2: Utilizando sondas de ácidos nucleicos como se describe en la norma ISO 7218:2024[4], efectuado en colonias aisladas de agar selectivo (véase Opción 1). Según las normas ISO 7218:2024, un ensayo de detección molecular puede confirmarse mediante un segundo ensayo molecular dirigido a una región génica diferente con iniciadores y/o sondas distintas. El método de confirmación deberá validarse según una norma ISO 16140 adecuada, con protocolo y materiales evaluados para la confirmación de la colonia.

Opción 3: Utilizando cualquier otro método certificado por VALIDACIÓN NF, cuyo principio debe ser diferente del ensayo de detección molecular Neogen 2 – *Cronobacter*. Se debe utilizar el protocolo completo descrito para este segundo método validado. Todos los pasos previos al inicio de la confirmación deben ser comunes a ambos métodos.

En caso de resultados discordantes (presuntivamente positivo con el Ensayo de Detección Molecular Neogen 2 – *Cronobacter*, no confirmado por uno de los métodos descritos antes), el laboratorio debe seguir sus procedimientos operativos estándar establecidos para informar sus resultados.

Si tiene preguntas sobre aplicaciones o procedimientos específicos, visite nuestro sitio web en 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 con calor

1. Para almacenar un lisato tratado con calor, vuelva a tapar el tubo de lisis con una tapa limpia (consulte **Lysis**, la sección 4.5)
2. Almacene entre 2 y 8 °C por hasta 72 horas.
3. Prepare una 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 Solución de Lysis Neogen del bloque de calentamiento 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 Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO 7218:2024. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
5. Guía de Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos (BMBL, 6.ª ed.) de los CDC. Fecha de vigencia: 29 de agosto de 2025
6. ISO 24914:2026 Microbiology of the food chain — Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of microorganisms and associated genetic markers — General requirements and definitions. International Standard Organization (ISO), Geneva, Switzerland. www.iso.org
7. ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain — Method validation Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory
8. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
9. ISO 6887-5:2020. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
10. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
11. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

Consulte las versiones actuales de los métodos estándar enumerados anteriormente.

Explicación de los símbolos

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
Auchincruive House
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation, 620 Lesher Place, Lansing, MI 48912 EE. UU.
© Neogen Corporation 2026. Todos los derechos reservados. Neogen es una marca registrada de Neogen Corporation.
Todos los otros nombres de marcas y productos son marcas comerciales o marcas registradas de sus respectivas empresas. Patente: neogen.com/patents
FS00879B_0826

Data de emissão: 2026-07

NEOGEN®

Instruções do Produto

Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter*

Descrição do produto e Uso Recomendado

O Neogen® Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* é usado com o Neogen® Sistema de Detecção Molecular para a detecção rápida e específica de *Cronobacter* em alimentos enriquecidos e amostras ambientais da produção de alimentos.

Os Ensaios de Detecção Molecular Neogen usam amplificação isotérmica mediada por loop 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 de preferência ou conforme especificado pelos regulamentos locais[1, 2].

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

Como acontece 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, incluindo mistura e homogeneização, manuseio e técnica de laboratório também podem influenciar os resultados. A Neogen recomenda avaliação do método, incluindo o meio de enriquecimento, no ambiente do usuário, usando um número suficiente de amostras com alimentos e/ou amostras ambientais específicos e desafios microbianos para garantir que o método atenda aos critérios do usuário.

A Neogen avaliou o Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 – *Cronobacter* com água peptonada tamponada (BPW) (ISO) como caldo de enriquecimento.

O Neogen® Equipamento de Detecção Molecular destina-se ao uso com amostras que passaram por tratamento térmico durante a etapa lise do ensaio, projetado para destruir organismos presentes na amostra. Amostras que não foram tratadas com aquecimento de forma adequada durante a etapa 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 para Normatização (ISO) 9001 para projeto e fabricação.

O kit de testes do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* contém 96 testes, descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes do kit Neogen Ensaio de Detecção Molecular

Item	Identificação	Quantidade	Conteúdo	Comentários
Solução de Lise Neogen® (SL)	Solução rosa em tubos transparentes	96 (12 tiras de 8 tubos)	580 µL de SL por tubo	Armazenados na rack e prontos para o uso
Tubos de Reagentes para Neogen® Ensaio de Detecção Molecular 2 –*Cronobacter*	Tubos laranja-avermelhados	96 (12 tiras de 8 tubos)	Mistura de detecção e amplificação específica liofilizada	Pronto para uso
Tampas adicionais	Tampas laranja-avermelhadas	96 (12 tiras de 8 tampas)		Pronto para uso
Neogen® Controle de Reagentes (CR)	Tubos transparentes com tampa articulada	16 (2 pacotes de 8 tubos individuais)	Mistura de DNA de controle liofilizado, amplificação e detecção	Pronto para uso

O Controle Negativo, não fornecido no kit, é um meio de enriquecimento estéril, por exemplo, BPW ISO. 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 de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter*. Guarde as instruções de segurança para consulta futura.

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

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

⚠ AVISO

Não utilize o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* em diagnósticos da saúde humana e animal.

O usuário deve treinar seu pessoal nas técnicas de teste adequadas e atuais: por exemplo, Boas Práticas de Laboratório[3] ou CDC Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories (BMBL)[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 de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* conforme indicado na embalagem e nas instruções do produto.
- Sempre utilize o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* dentro da data de validade.
- Use o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* com alimentos e amostras ambientais de processos de alimentos que tenham sido validadas internamente ou por um terceiro.
- Utilize o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* somente com superfícies, desinfetantes, protocolos e linhagens de bactérias que tenham sido validados internamente ou por um terceiro.
- Para uma amostra ambiental contendo tampão neutralizante (NB) com complexo aril sulfonato, realize uma diluição 1:2 antes do teste (1 parte de amostra em 1 parte de caldo de enriquecimento estéril). Outra opção é transferir 10 µL do enriquecimento NB para os tubos de Solução de Lise Neogen. Produtos Neogen® Sample Handling que incluem Tampão de Neutralização com complexo de sulfonato de arila: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G e HS2410NB2G. Este protocolo não foi testado durante o estudo da NF Validation.

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

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

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 regulamentações locais, regionais e nacionais quanto aos requisitos de descarte.

Para reduzir os riscos de exposição com 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 de inserção do Neogen® Bloco de Aquecimento de 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 de Detecção Molecular.

RECOMENDAÇÃO

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

- Troque de luvas antes da hidratação do pellet do reagentes.
- Recomenda-se o uso de pontas de pipeta estéreis, com barreira contra aerossóis (filtradas) e de qualidade para 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.
- Descontamine periodicamente as bancadas e equipamentos do laboratório (pipetas, ferramentas para tampar/destampar, rack de tubos reagentes etc.) com uma solução de alvejante doméstico de 1–5% (v:v em água) baseada em cloro (contendo hipoclorito de sódio) ou solução de remoção de DNA.

Para reduzir os riscos de um resultado falso-positivo:

- Nunca abra tubos reagentes pós-amplificação.
- Elimine sempre os tubos contaminados mergulhando-os em uma solução de alvejante doméstico a 1-5% (v:v em água) baseada em cloro durante 1 hora e longe da área de preparação do ensaio.
- Nunca submeta os tubos de reagentes a autoclave após a amplificação.
- Se houver suspeitas de as amostras conterem altos níveis de DNA livre de *Cronobacter* (por exemplo, DNA de células não viáveis de *Cronobacter* que foram submetidas a uma etapa de eliminação/inativação), enriquecimentos presumivelmente positivos devem ser tratados com um procedimento de remoção de DNA (por exemplo, DNase) ou PMAxx antes da etapa de **Lise**. Entre em contato com seu representante da Neogen para receber instruções adicionais. A remoção de DNA livre não foi avaliada durante o estudo da NF Validation.

Consulte a Ficha 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 neogen.com ou entre em contato com o seu representante ou distribuidor local Neogen.

Responsabilidade do usuário

Os usuários são responsáveis por se familiarizarem com as informações e instruções do produto. Acesse nosso website em **neogen.com**, ou contate o seu representante ou distribuidor local da Neogen para obter mais informações.

Ao selecionar um método de teste, é importante reconhecer que fatores externos, como métodos de amostragem, protocolos de teste, preparação da amostra, incluindo homogeneização e mistura, o manuseio, a técnica laboratorial e a própria amostra podem influenciar os resultados.

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

Também é de responsabilidade do usuário determinar se o método de teste e os resultados satisfazem as exigências de seus clientes ou fornecedores.

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

Para ajudar os clientes a avaliar a adequação para o propósito do método durante a implementação, a Neogen desenvolveu o kit Controle de Matriz de Detecção Molecular Neogen (também chamado de controle de amplificação na ISO 24914:2026[6]). Use o Controle de matriz (MDMC96) para avaliar a interferência da matriz com os resultados do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 – *Cronobacter* durante a validação e verificação. Siga a norma ISO 16140-3:2021[7] e/ou o programa de garantia de qualidade da sua organização para determinar o número representativo de amostras necessárias ao verificar o desempenho do método e definir o escopo de sua aplicação em seu laboratório. O uso rotineiro do Controle de Matriz de Detecção Molecular Neogen não é necessário uma vez que o método tenha sido verificado e o escopo de aplicação do laboratório seja estabelecido. Siga o programa de garantia de qualidade da sua organização para determinar, caso a caso, a necessidade do Controle de Matriz de Detecção Molecular Neogen e sua frequência de uso durante testes rotineiros.

Uma matriz pode ser definida como um tipo de produto com propriedades intrínsecas como composição e processo. As diferenças entre matrizes podem ser tão simples como os efeitos causados por diferenças no seu processamento ou apresentação, por exemplo, cru versus pasteurizado; fresco versus seco etc.

Limitação de Garantia/Recursos Limitados

EXCETO EM CASOS ESPECÍFICOS DE GARANTIA LIMITADA DE PRODUTOS INDIVIDUAIS, A NEOGEN REJEITA TODOS OS TERMOS EXPRESSOS E IMPLÍCITOS DE GARANTIA, INCLUINDO MAS NÃO SE LIMITANDO A, QUAISQUER GARANTIAS DE COMERCIALIZAÇÃO OU DE ADEQUAÇÃO PARA UM DETERMINADO USO. Se ficar provado que qualquer produto da Neogen Food Safety encontra-se 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. Você deve notificar imediatamente a Neogen dentro de sessenta dias após a descoberta de qualquer suspeita de defeitos em um produto e devolvê-lo à Neogen. Entre em contato com seu representante da Neogen ou distribuidor autorizado da Neogen para qualquer dúvida adicional.

Para os termos e condições completos da Neogen, acesse: https://neogen.com/en/terms-and-conditions/

Limitação de responsabilidade da Neogen

A NEOGEN NÃO SERÁ RESPONSÁVEL POR QUAISQUER DANOS, SEJAM DIRETOS, INDIRETOS, ESPECIAIS, ACIDENTAIS OU SUBSEQUENTES, INCLUINDO, MAS SEM EXCLUSIVIDADE, A PERDA DE LUCROS. Exceto quando for proibido por lei, em nenhuma circunstância nem ao abrigo seja de que teoria jurídica for, deverá a responsabilidade da Neogen exceder o preço de compra dos produtos supostamente defeituosos.

Armazenamento e Descarte

Armazene o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* a 2-8°C. Não congele. Mantenha o kit fora do alcance da luz durante o armazenamento. Após abrir o kit, verifique se a embalagem protetora 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 de 2 a 8 °C por, no máximo, 60 dias.

Não utilize o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* após a data de validade. A data de vencimento e o número do lote estão impressos na parte externa da caixa. Após o uso, o meio de enriquecimento e os tubos do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* podem conter materiais patogênicos. Quando os testes estiverem concluídos, siga as regulamentações locais, regionais e nacionais para o descarte de resíduos contaminados. Consulte a Ficha 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.

Descontamine periodicamente as bancadas e equipamentos do laboratório (pipetas, ferramentas para tampar/destampar, rack de tubos reagentes etc.) com uma solução de alvejante doméstico baseada em cloro de 1-5% (v:v em água) ou solução de remoção de ácido nucleico ou solução de remoção de DNA.

O usuário deve concluir o treinamento de qualificação de operador do Sistema de Detecção Molecular Neogen, conforme descrito no documento “Protocolos e instruções de qualificação de instalação (IQ) / Qualificação operacional (OQ) para o Sistema de Detecção Molecular Neogen”[8].

Consulte a seção “Instruções Específicas para Métodos Validados” para obter os requisitos específicos:

Tabelas 3 e 4 para protocolos de enriquecimento de acordo com AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2018.01 e *Performance Tested*℠ Certificado número 101703

Tabela 5 para protocolos de enriquecimento de acordo com o certificado da NF VALIDATION 3M 01/20-03/18

Enriquecimento da Amostra

As Tabelas 2, 3, 4 ou 5 apresentam orientações para protocolos de enriquecimento para amostras de alimentos e ambientais.

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

Alimentos, Pós Ambientais, Poeiras, Varreduras e Esponjas

1. Equilibre o meio de enriquecimento à temperatura ambiente (20-25 °C), salvo indicação em contrário no protocolo de enriquecimento (consulte as Tabelas 2, 3, 4 ou 5).
2. Combine assepticamente o meio de enriquecimento e a amostra misturando, triturando, utilizando vórtice ou misturando manualmente por 2 ± 0,2 minutos **ou até que todos os grumos estejam completamente dissolvidos e a suspensão de enriquecimento seja homogênea**[9, 10].
    a. Fatores como a preparação de amostras, incluindo mistura e homogeneização, manuseio e técnica de laboratório podem influenciar os resultados.
    b. Para amostras altamente particuladas, recomenda-se o uso de sacos de filtragem.

c. Para matrizes que incham em água e são altamente viscosas (por exemplo, cereais, amidos), é recomendável fazer diluições adicionais (> 1:10) até que a viscosidade seja adequadamente reduzida ou adicionar alfa-amilase estéril de 1% (p/v) ao BPW (ISO)[10].

d. Para amostras maiores de cereal, adicione o cereal em pó no líquido vagarosamente, mexendo com frequência para evitar grumos.

3. Incube conforme descrito na tabela de protocolo apropriada (consulte a Tabela 2, 3, 4 ou 5).

Tabela 2. Protocolos Gerais de Enriquecimento

Matriz de Amostra	Tamanho da Amostra[1]	Volume do Caldo de Enriquecimento[1, 2]	Temperatura de Enriquecimento (± 1°C)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Volume Analisado da Amostra
Fórmulas infantis em pó (PIF – powdered infant formula) e matérias-primas como leite em pó, soja em pó, soro de leite em pó, lactose, farinha de arroz e maltodextrina	Amostra de 1X g	9X mL de APT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
Matérias-primas como sais, minerais, aminoácidos, DHS (ácido docosahexaenoico) e vitaminas	Amostra de 1X g	99X mL de APT (ISO) (1:100)	37	18-24	20 µL
Amostras ambientais secas, tais como poeira, varreduras e coleta a vácuo	Amostra de 1X g	9X mL de APT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
Esponja ambiental com 10 mL de caldo Letheen ou caldo neutralizante D/E	1 dispositivo de amostragem	90 mL de APT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL

1. A Neogen avaliou o Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 – *Cronobacter* usando as razões de diluição da Tabela 2 até 300 g, exceto para fórmulas infantis com e sem probióticos, que foram avaliadas até 400 g. É responsabilidade do usuário validar protocolos ou taxas de diluição alternativos para garantir que o método atenda aos seus critérios.

2. Use APT (ISO) **preaquecido** se o volume do caldo de enriquecimento for > 300 mL (por exemplo, a amostra é > 30 g).

Instruções Específicas para Métodos Validados

AOAC® *Official Method of Analysis℠* (OMA) 2018.01

Certificado AOAC® *Performance Tested℠* (PTM) nº 101703

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

Nos programas do Instituto de Pesquisa AOAC OMA℠ e PTM℠, o Neogen Ensaio de Detecção Molecular de 2 – *Cronobacter* foi constatado como um método eficiente para a detecção de *Cronobacter.* As matrizes testadas nos estudos são mostradas nas Tabelas 3 e 4.

Prepare a amostra de acordo com as Tabelas 3 e 4, homogeneíze completamente misturando, triturando, utilizando vórtices ou misturando manualmente por 2 ± 0,2 minutos ou até que todos os grumos estejam completamente dissolvidos e a suspensão de enriquecimento esteja homogênea[9, 10].

Tabela 3. Protocolos de enriquecimento segundo a AOAC® *OMA*℠ 2018.01 e *PTM*℠ 101703

Matriz de Amostra	Tamanho da amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento[a]	Temperatura de Enriquecimento (± 1°C)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Volume Analisado da Amostra
Fórmula infantil em pó com probióticos	10 g	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
	300 g	2.700 ml BPW (ISO) + 10 mg/L de vancomicina)[b]	Pré-aquecido 37	22-24	20 µL
Cereal infantil em pó sem probióticos	10 g	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
	300 g	2.700 ml BPW (ISO) (1:10)	Pré-aquecido 37	18-24	20 µL
Pó de lactose	10 g	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
Aço inoxidável (4" x 4")[c]	1 esponja	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL

[a]Usar BPW (ISO) **pré-aquecido** se o volume do caldo de enriquecimento for > 300 ml

[b]Concentração final

[c]Esponja de amostras ambientais pré-umedecida com 10 ml de Caldo Neutralizante D/E

Tabela 4. Protocolos de enriquecimento segundo a AOAC® *PTM*℠ 101703

Matriz de Amostra	Tamanho da amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento[a]	Temperatura de Enriquecimento (± 1°C)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Volume Analisado da Amostra
Fórmula infantil em pó com probióticos	400[a] g	3.600 ml BPW (ISO) + 10 mg/L de vancomicina)	Pré-aquecido 37	22-24	20 µL
Fórmula infantil em pó sem probióticos	400[a] g	3.600 ml BPW (ISO) (1:10)	Pré-aquecido 37	22-24	20 µL

[a]Matrizes aprovadas de AOAC PTM com o uso de etapas de remoção de DNA livre.

Consulte as instruções de remoção de DNA livre para obter detalhes

NF VALIDATION da AFNOR Certification

3M 01/20-03/18

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

Para obter mais informações sobre o final da validade, consulte o certificado NF VALIDATION disponível no site mencionado acima.

Método de certificação NF VALIDATION em conformidade com ISO 16140-2:2016[11] em comparação com ISO 22964:2017[2].

Escopo da validação: Fórmula infantil em pó e cereais infantis com e sem probióticos, matérias-primas e amostras ambientais.

Preparo da amostra: As amostras devem ser preparadas de acordo com EN ISO 22694:2017[2] e EN ISO 6887[9, 10].

Versão do software: Consulte o certificado.

Tabela 5. Protocolos de enriquecimento de acordo com o método certificado da NF VALIDATION 3M 01/20-03/18

Matriz de Amostra	Tamanho da amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento[1]	Temperatura de Enriquecimento (± 1°C)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Volume Analisado da Amostra	Ponto de Interrupção recomendado[2, 3]
• Fórmula infantil em pó • Cereais infantis em pó • Ingredientes como leite em pó, soja em pó, soro de leite em pó, lactose, farinha de arroz, maltodextrina • Amostras ambientais secas, tais como poeira, varreduras e coleta a vácuo,	10 g	90 mL de APT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL	Os caldos de enriquecimento ou lisados de amostra podem ser armazenados entre 2°C e 8°C por até 72 horas
• Esponja, enxágue com água, toalhas	1 dispositivo de amostragem ou 10 mL					Os caldos de enriquecimento ou lisados de amostra podem ser armazenados entre 2°C e 8°C por até 72 horas
Fórmula infantil em pó e cereal infantil em pó (não probiótico)	30-300 g	APT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL	Os caldos de enriquecimento ou lisados de amostra podem ser armazenados entre 2°C e 8°C por até 72 horas
Fórmula infantil em pó e cereal infantil em pó (incluindo probiótico)	30-300 g	APT (ISO) + 10 mg/L de vancomicina (1:10)	37	22-24	20 µL	Nenhum

1. Use APT (ISO) preaquecido se o volume do caldo de enriquecimento for > 300 mL (por exemplo, a amostra é > 30 g).
2. Após a remoção do caldo de enriquecimento do armazenamento, continue o teste a partir da Etapa 1, na seção Lise. Após a remoção do lisado de amostra do armazenamento, continue o teste a partir da Etapa 7, na seção Lise.
3. Consulte o Apêndice A para testar novamente lisados armazenados tratados termicamente.

Preparo da Neogen® Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular

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

Dois Blocos de Calor/Resfriamento de Detecção Molecular Neogen são necessários para este procedimento. Ambos os blocos são o mesmo produto (700000145), mas são usadas para funções diferentes.

Para maior clareza dentro do procedimento, o bloco usado na etapa de aquecimento será chamado de Bloco de Calor por Detecção Molecular, e o bloco usado para a etapa de resfriamento será chamado de Bloco de Resfriamento por Detecção Molecular. Essas designações são usadas apenas para distinguir seus papéis e não indicam produtos separados.

Preparação do Neogen® Bloco de Resfriamento de Detecção Molecular

Coloque o Bloco de Resfriamento de Detecção Molecular Neogen direto na bancada do laboratório: Use o bloco à temperatura ambiente de laboratório (20-25 °C).

Preparo do Neogen® Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular

Coloque o Neogen Bloco de Aquecimento de 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 de Detecção Molecular alcance e mantenha a temperatura de 100 ± 1°C.

NOTA: Dependendo da unidade de aquecimento, aguarde aproximadamente 30 minutos até que o Neogen Bloco de Aquecimento de 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 de Detecção Molecular está a 100 ± 1°C.

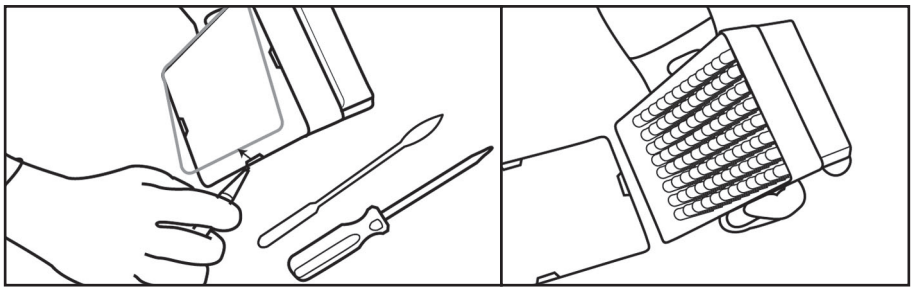
Preparo do Neogen® Equipamento de Detecção Molecular

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

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

Lise

Remova o fundo do Neogen Rack de Solução de Lise com uma chave de fenda antes de inserir o Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular.



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

     Primeiro, transfira cada amostra enriquecida para tubos Neogen SL individuais. **Por último**, transfira o NC.

   - 4.4 Utilize a Neogen® Ferramenta de Tampar/Destampar de Detecção Molecular - Lise para destampar uma tira de tubos Neogen SL – uma tira de cada vez.

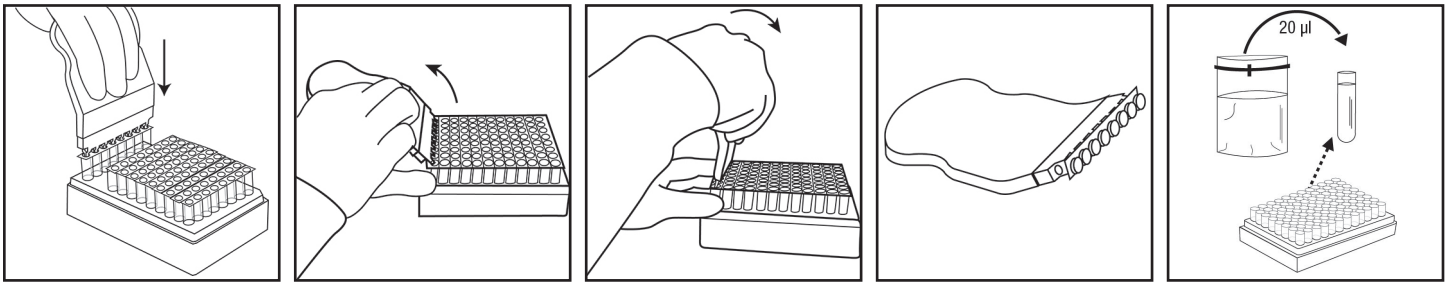
4.5 Descarte a tampa do tubo de Neogen Solução de Lise; se o lisado for mantido para novo teste, coloque as tampas em um recipiente limpo para reutilização após a lise.

4.5.1. Para processar o lisado mantido, consulte o Apêndice A.

4.6 Agite o saco de enriquecimento antes de coletar a amostra do lado filtrado ao trabalhar com amostras viscosas.

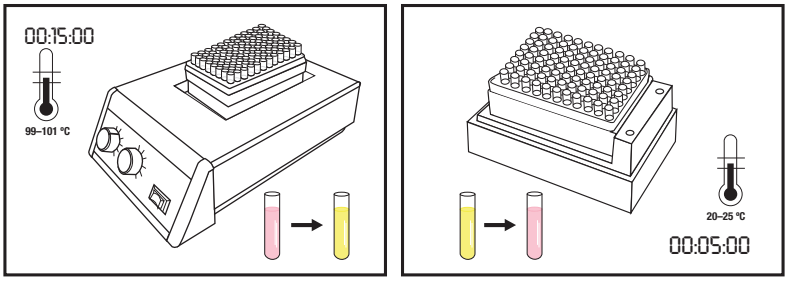
4.7 Transfira 20 µL de amostra para um tubo de Neogen Solução de Lise, salvo indicação contrária na tabela do protocolo.

5. Repita as etapas 4.4 a 4.7, até que todas as amostras individuais tenham sido adicionadas a um tubo correspondente de Neogen Solução de Lise na tira.



6. Quando todas as amostras tiverem sido transferidas, transfira 20 µL de CN (meio de enriquecimento estéril, por exemplo, APT) para um tubo Neogen SL. Não use água como CN.
7. Verifique se a temperatura do Neogen Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular está a 100 ± 1°C.
8. Etapa de aquecimento: Coloque o rack descoberto de tubos de Solução de Lise Neogen no Inserto do Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular Neogen e aqueça por 15 ± 1 minutos. Durante o aquecimento, a solução Neogen SL irá mudar de cor de rosa (frio) para amarelo (quente).

   Amostras que não foram tratadas com aquecimento de forma adequada durante a etapa lise do ensaio, podem ser consideradas um risco biológico potencial e NÃO devem ser inseridas no Neogen Equipamento de Detecção Molecular.
9. Etapa de resfriamento: Remova o rack descoberto dos tubos da Solução de Lise Neogen do Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular Neogen e deixe esfriar no Inserto do Bloco de Resfriamento de Detecção Molecular Neogen pelo menos 5 minutos e no máximo 10 minutos. O Inserto do Bloco de Resfriamento de Detecção Molecular Neogen, usado à temperatura ambiente sem a Bandeja do Bloco de Resfriamento de Detecção Molecular Neogen®, deve ficar diretamente na bancada do laboratório. Durante o resfriamento, a Solução de Lise Neogen voltará a ter uma cor rosa.
10. Retire a rack de tubos Neogen SL do Bloco de Resfriamento de Detecção Molecular Neogen.



Amplificação

1. É necessário um Tubo de Reagente Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* para cada amostra e o para o CN.

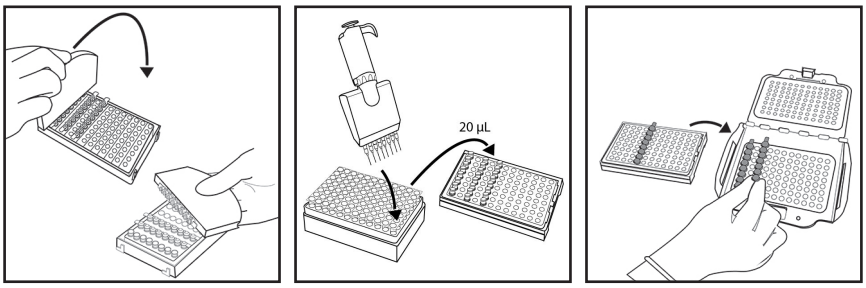
   1.1 As tiras de tubos podem ser cortadas para obter o número de tubos desejado. Selecione o número de tiras individuais de 8 Tubos de Reagentes necessárias para Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter*.

   1.2 Coloque os Tubos de Reagentes Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* em uma rack vazia.

   1.3 Evite agitar os reagentes precipitados da parte inferior dos tubos.
2. Selecione um Neogen Tubo de Controle de Reagentes e coloque-o na rack.
3. Para evitar contaminação cruzada, destampe uma tira de Tubo de Reagente Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* de cada vez e utilize uma nova ponteira de pipeta para cada etapa da transferência.
4. Transfira cada um dos lisados a um Tubo de Reagente Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* e Neogen Tubo de Controle de Reagentes conforme descrito abaixo:

Transfira cada amostra de lisado em Tubos de Reagente Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* individuais **primeiro**; depois transfira o CN. Hidrate o Neogen Tubo de Controle de Reagentes **por último**.

5. Use a Ferramenta Reagente de Tampar/Destampar de Detecção Neogen® para destampar o Tubo de Reagente para Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* - uma tira de Tubos de Reagentes por vez. Descarte a tampa.
   - 5.1 **Transfira 20 µL de amostra de lisado da metade superior do líquido (evite o precipitado) no tubo de Neogen Solução de Lise para o Tubo de Reagente para Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter*. Dispense em ângulo para evitar a agitação dos pellet. 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 de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* correspondente na tira.
   - 5.3 Cubra os Tubos de Reagentes para Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* com a tampa adicional fornecida e utilize o lado arredondado da Neogen Ferramenta de Tampar/Destampar para Detecção Molecular para aplicar pressão 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 a 5.3 para transferir 20 µL de lisado CN para um Neogen Tubo de Reagente para Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter*.
   - 5.6 Transfira **20 µL de lisado CN para um Neogen Tubo de Controle de Reagente**. Dispense em ângulo para evitar a agitação dos pellet. Misture pipetando gentilmente 5 vezes.
6. Carregue os tubos tampados em uma Neogen Bandeja de Carga Rápida de Detecção Molecular limpa e descontaminada. Feche e trave a tampa da Neogen Bandeja de Carga Rápida de Detecção Molecular.



7. Revise e confirme a execução configurada no Software do Sistema de Detecção Molecular Neogen.
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 de Detecção Molecular no Neogen Equipamento de Detecção Molecular e feche a tampa para iniciar o ensaio. Os resultados são fornecidos em 60 minutos, embora os positivos possam ser detectados ainda mais cedo.
10. Após a conclusão do ensaio, remova a Bandeja do Carregador Rápido de Detecção Molecular Neogen do Instrumento de Detecção Molecular Neogen e descarte os tubos mergulhando-os em uma solução de alvejante doméstico de 1-5% (v:v em água) baseada em cloro por 1 hora e longe do área de preparação do ensaio.

RECOMENDAÇÃO: Para minimizar o risco de falso-positivos por contaminação cruzada, nunca abra Tubos de Reagentes que contenham DNA amplificado. Isso inclui o Tubo de Reagente para Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter*, Tubos Neogen Controle de Reagentes e Neogen Tubos de Controle de Matriz. Elimine sempre os tubos de reagente vedados mergulhando-os em uma solução de alvejante doméstico baseada em cloro a 1-5% (v:v em água) durante 1 hora e longe 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 através da análise de diversos parâmetros exclusivos das curvas. Resultados positivos presuntivos são relatados em tempo real, enquanto resultados negativos e a verificar serão exibidos após a conclusão da execução.

Os enriquecimentos presumivelmente positivos devem ser confirmados conforme os procedimentos operacionais padrão laboratoriais ou seguindo a confirmação do método de referência apropriado[1,2], começando com a transferência do enriquecimento primário (BPW ISO ou BPW ISO suplementado com 10 mg/l de vancomicina) para um caldo de enriquecimento secundário, seguido por posterior deposição e confirmação dos isolados usando métodos bioquímicos, sorológicos e/ou moleculares apropriados.

NOTA: Até mesmo uma amostra negativa não resultará em leitura zero, uma vez que o sistema e os reagentes de amplificação do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 – *Cronobacter* possuem uma leitura da unidade de luz relativa (RLU) intrínseca.

No raro caso de qualquer emissão de luz incomum, o algoritmo rotula isso como "Inspecionar". A Neogen recomenda que o usuário repita o ensaio para quaisquer amostras do tipo "Inspecionar". Se o resultado continuar sendo Inspecionar, prossiga com o teste de confirmação usando o método de sua preferência ou conforme especificado pelas regulamentações locais[1,2]

Tabela 6. Símbolos e informações para vários resultados de software

Tipo de poço	Símbolo do resultado do poço	Resultado	Interpretação
Amostra		Positivo	A amostra é presumivelmente positiva para o patógeno alvo.
Amostra		Negativo	A amostra é negativa para o patógeno alvo.
Amostra		Inibido*	A matriz da amostra foi inibitória para o ensaio. Pode ser necessário um novo teste.
Amostra		Inspecionar	A presença ou ausência do patógeno alvo era indeterminada. Pode ser necessário um novo teste.
Amostra		Erro*	Nenhuma bioluminescência foi detectada. Pode ser necessário um novo teste.

*Consulte o relatório de execuções para mais detalhes sobre os resultados. Se necessário, entre em contato com o representante local da Neogen para obter assistência na solução de problemas.

Instruções para remoção de DNA livre
Observação: A remoção de DNA livre não foi avaliada como parte do estudo da NF Validation.

1. PMAxx

a. Transfira 45 µL de água de grau molecular (MGW) para um microtubo.

b. Dispense 5 µL de corante PMAxx™ (20 mM) diretamente no microtubo com 45 µL de MGW. Misture com cuidado pipetando para cima e para baixo.

OBSERVAÇÃO: A solução pode ser armazenada refrigerada, protegida da luz, por até 1 hora.

c. Transfira 400 µL da amostra enriquecida para um tubo de microcentrífuga.

d. Em condições de baixa luz, adicione 5 µL da solução PMAxx à alíquota da amostra.

e. Coloque microtubos em um agitador rotativo por 10 minutos, cobertos e protegidos da luz.

f. Coloque os tubos tratados com PMAxx no instrumento PMA-Lite™ por 10 minutos.

g. Utilize vórtice em cada tubo por 3 segundos, depois coloque os tubos de volta no PMA-Lite por mais 10 minutos.

h. Transfira 20 µL das amostras tratadas com PMAxx para tubos de Solução de Lise Neogen e prossiga com as etapas de lise.

2. Caldo Seletivo de Cronobacter (CSB)

a. Transfira 0,1 ml de enriquecimento primário para 10 ml de CSB.

b. Incube a 41,5 ± 1 °C por 24 ± 2 horas.

c. Após a incubação, prossiga com as etapas de lise.

Confirmação de resultados de acordo com o método de certificação NF VALIDATION

No contexto da NF Validation, todas as amostras identificadas como positivas pelo Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 – *Cronobacter* devem ser confirmadas por um dos testes a seguir. A confirmação deve ser realizada a partir do caldo de enriquecimento armazenado entre +2 °C e +8 °C dentro de 72 horas após o término do período de incubação.

Opção 1: Usando o padrão ISO 22964:2017[2] começando pelo enriquecimento ISO BPW.

- Subcultura em CSB (diluição 1/10) por 24 horas ± 2 horas a 41,5 °C ± 1 °C
- Faça o estriamento em ágar CCI e incube por 24 h ± 2h a 41,5 °C ± 1 °C
- Faça o estriamento de até cinco colônias típicas em uma placa de ágar não seletiva e incube por 21 h ± 3h a 37 °C ± 1 °C
- Realize testes bioquímicos confirmatórios apropriados (teste de oxidase e galerias bioquímicas)

Opção 2: Utilizando sondas de ácidos nucleicos, conforme descrito na norma ISO 7218:2024[4], realizado em colônias isoladas de ágar seletivo (veja a Opção 1). De acordo com as regras da norma ISO 7218:2024, um ensaio de triagem molecular pode ser confirmado por um segundo ensaio molecular direcionado a uma região gênica diferente com primers e/ou sondas distintas. O método de confirmação deve ser validado de acordo com uma norma ISO 16140 apropriada, com protocolo e materiais avaliados para confirmação da colônia.

Opção 3: Utilizando qualquer outro método certificado pela NF VALIDATION, cujo princípio deve ser diferente do Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 – *Cronobacter*. Deve-se utilizar o protocolo completo descrito para este segundo método validado. Todas as etapas antes do início da confirmação devem ser comuns a ambos os métodos.

Em caso de resultados dissonantes (presumivelmente positivo com o Ensaio de Detecção Molecular Neogen 2 – *Cronobacter*, não confirmado por um dos meios descritos acima), o laboratório deve seguir seus procedimentos operacionais padrão estabelecidos para relatar seus resultados.

Se tiver dúvidas sobre aplicações ou procedimentos específicos, visite o nosso site em neogen.com ou entre em contato com seu representante ou distribuidor local da 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 a seção **Lise**, 4.5)
2. Armazene à temperatura na faixa de 2°C a 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 de Detecção Molecular e aqueça a 100 ± 1°C por 5 ± 1 minutos.
6. Retire o suporte 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 Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO 7218:2024. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
5. CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMLB) 6th Edition. Data de vigência: 29 de agosto de 2025
6. ISO 24914:2026 Microbiology of the food chain — Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of microorganisms and associated genetic markers — General requirements and definitions. International Standard Organization (ISO), Geneva, Switzerland. www.iso.org
7. ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain — Method validation Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory

8. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
9. ISO 6887-5:2020. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
10. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
11. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

Consulte as versões atuais dos métodos-padrão listados acima.

Explicação dos Símbolos

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
Auchincruive House
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation, 620 Lesher Place, Lansing, MI 48912 EUA.
© Neogen Corporation 2026. Todos os direitos reservados. Neogen é uma marca comercial registrada da Neogen Corporation.
Todas as outras marcas e nomes de produtos são marcas comerciais ou marcas registradas de suas respectivas empresas. Patente: neogen.com/patents
FS00879B_0826

NEOGEN

製品情報

病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用*

製品の概要および用途

Neogen® 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用*は、Neogen® 病原菌自動検出システムを用いて前培養した食品および食品工程中環境検体における*クロノバクター属菌*を迅速かつ特異的に検出するときに使用します。

Neogen 病原菌検出アッセイは、LAMP法（ループ媒介等温増幅法）を用いて核酸配列を高い特異性と感度で迅速に増幅し、その増幅をバイオルミネッセンス技術により検出します。推定陽性結果はリアルタイムに表示され、陰性結果は検査が完了してから表示されます。結果が陽性と推定される場合は、任意の別の方法または行政の規制によって指定された通りに確認する必要があります[1,2]。

Neogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用*は、検査技術の訓練を受けた技術者が検査室環境で使用することを想定しています。Neogenは、食品または飲料以外の産業における本製品の使用に関しては検証しておりません。例えば、Neogenは、本製品を医薬品、化粧品、臨床または動物診断検体の検査で使用することについて検証しておりません。Neogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用*は、可能性のあるすべての食品や食品製造工程、検査プロトコル、あるいはすべての菌株について評価されたわけではありません。

すべての検査法と同様に、増菌培地のメーカーや組成、品質などの要因が結果に影響する場合があります。採取方法、検査プロトコル、均質化や混合などの検体の準備、取り扱い、および検査手技などの要因が結果に影響する場合もあります。Neogenは、お客様の基準を満たすように、お客様の環境において、特定の食材または環境検体および菌株を用いた十分な数の検体で、増菌培地を含む検査方法を評価することをお勧めします。

Neogen は、緩衝ペプトン水 (BPW) ISO を前増菌培地として Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - クロノバクター属菌用を評価しました。

Neogen® 測定機器 病原菌自動検出システム用は、アッセイのライシスステップ中に熱処理を行った検体を測定することを目的としており、検体中に存在する有機物を分解するように設計されています。アッセイのライシスステップ中に適切な熱処理を行っていない検体は、潜在的バイオハザードと考えられる可能性がありますので、Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用の装置内には入れないでください。

Neogen食品衛生管理製品は、設計と製造においてISO（国際標準化機構）9001の認証を得ています。

Neogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用*検査キットは、表1に記載のとおり96検体用となっています。

表1. Neogen 病原菌検出アッセイキットの内容

品目	特徴	数量	内容量	コメント
Neogen® ライシス液 (LS溶液)	クリアチューブに入ったピンク色の液体	96テスト分（8連チューブ12セット）	チューブ1本につき LS 580 µL	ラック入り、調整済み
Neogen® 病原菌検出アッセイ 2 – *クロノバクター属菌用* 試薬 チューブ	赤褐色のチューブ	96テスト分（8連チューブ12セット）	凍結乾燥済み特異増幅試薬および検出試薬	調整済み
予備キャップ	赤褐色のキャップ	96検体分（8連キャップ12セット）		調整済み
Neogen® 試薬コントロール (RC)	フリップトップ式クリアチューブ	16（チューブ8本入り2パウチ）	凍結乾燥済みコントロールDNA、増幅試薬および検出試薬	調整済み

陰性コントロール (NC) (キットには付属しません) には、BPW ISO などの滅菌増菌培地を使用します。水は陰性コントロールとして使用しないでください。

安全性

Neogen 病原菌自動検出システムおよびNeogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用*の製品情報に記載のすべての安全情報を読み、理解し、遵守してください。また、これらの情報は大切に保管してください。

⚠**警告：** 適切な危険予防措置が行われていない場合、死亡または重篤な傷害や、物的損害が発生する可能性があります。

注記： 適切な危険予防措置が行われていない場合、危険な状況により物的損害が発生する場合があります。

⚠ 警告

Neogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用*は、ヒトまたは動物の診断用に使用しないでください。

ユーザーは、最新の適切な試験技術について担当者を訓練する必要があります。例：Good Laboratory Practices[3]、またはCDCの微生物・生物医学研究施設におけるバイオセーフティガイドライン (BMBL)[5]。

汚染検体の偽陰性結果のリスクを回避するために：

- プロトコルに従い、製品情報に記載のとおりに検査を行ってください。
- Neogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用*は、外装表示および製品情報に記載のとおりに保管してください。
- Neogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用*は使用期限までに必ず使用してください。
- Neogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用*は、社内または第三者による検証を行った食品、飼料、食品加工環境検体に使用してください。
- Neogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用*は、社内または第三者による検証を行った表面、殺菌剤、プロトコル、菌株のみに使用してください。
- アリルスルホン酸塩添加中和緩衝液 (Neutralizing Buffer, NB) を含む環境検体については、検査前に2倍希釈を行ってください (検体1に対して滅菌増菌培地1)。別の方法としては、中和緩衝液増菌培地10 µLをNeogen ライシスチューブに滴下します。Neogen® 検体処理製品のうち、アリルスルホン酸塩添加中和緩衝液を含む製品は、RS96010NB、RS9604NB、SSL10NB、SSL10NB2G、HS10NB、HS10NB2G、HS2410NB2Gです。このプロトコルは、NF Validation検証で試験を実施しておりません。

化学物質およびバイオハザードへの暴露に伴う危険を回避するために：

- 技能訓練を受けた検査実施担当者の管理下で、適切な設備のある検査室にて食中毒菌検査を行ってください。培養済み増菌培地および培養済み増菌培地と接触する機器または接触面には、人体に有害となりうる量の病原体が含まれている可能性があります。
- 試薬および汚染された検体を取り扱う際は、適切な保護衣、保護メガネの装着など、標準的な検査室の安全手順に常に従ってください。
- 増菌後の培地や、増幅後の試薬チューブ内容物には触れないでください。
- 増菌した検体および関連する汚染廃棄物は、地方、地域、国の最新の規制に従って廃棄してください。
- アッセイのライシス ステップ中に適切な熱処理を行っていない検体は、潜在的バイオハザードとみなされる場合があるので、Neogen 病原菌検出装置内には入れないでください。

アッセイ準備中の交差汚染に伴う危険を回避するために：

- 手袋を必ず着用してください（ユーザー保護と遺伝子の混入を避けるため）。

環境汚染に関連するリスクを軽減する方法：

- 廃棄に関する要件については、地方、地域、および国の規制に従ってください。

高温の液体への暴露に伴う危険を回避するために：

- ヒーターの温度設定を推奨温度以上にしないでください。
- 推奨される加熱時間を超えないでください。
- 適切な較正済みの温度計を使用して、Neogen® 測定機器 病原菌自動検出システム用ヒートブロックインサートの温度を確認してください（例：浸線付温度計またはデジタル熱電対温度計。全浸没温度計は使用しないこと）。温度計は、必ずNeogen 測定機器 病原菌自動検出システム用ヒートブロックインサートの指定の部位に設置してください。

注記

アッセイ準備中の交差汚染に伴う危険を回避するために：

- 試薬ペレットを水和する前に、手袋を交換してください。
- 滅菌済み、エアロゾルバリア材 (フィルター) 付き、分子生物学グレードのピペットチップの使用を推奨します。
- 検体ごとに新しいピペットチップを使用してください。
- GLP（医薬品安全性試験実施基準）に従って検体を増菌培地からライシスチューブに移してください。ピペットの汚染を回避するため、中間的な滴下ステップを追加することもできます。例えば、増菌された各検体を滅菌チューブに滴下することができます。
- 利用可能な場合は、殺菌灯が装備された病原菌取扱エリアを使用してください。
- 実験台と器具 (ピペット、キャップ/デキャップツール、試薬チューブラックなど) は、水で1〜5 % (v/v) に希釈した家庭用塩素系漂白剤 (次亜塩素酸ナトリウム含有) または DNA 除去剤を使用して定期的に除染してください。

偽陽性の結果に伴う危険を回避するために：

- 増幅後は試薬チューブを開けないでください。
- 汚染されたチューブは、必ず、水で1～5 % (v/v) に希釈した家庭用塩素系漂白剤に1時間浸した後に、アッセイ準備エリアから離れた場所に廃棄してください。
- 増幅後の試薬チューブは絶対にオートクレーブで加熱滅菌処理しないください。
- 検体に*クロノバクター*の遊離DNAが高濃度で存在すると考えられる場合 (例：殺菌/不活化工程により死滅したクロノバクター細胞由来のDNA)、推定陽性の増菌培養液は、**溶菌**工程の前にDNA除去処理 (例：DNase) または PMAxx処理を行ってください。詳細な手順については、Neogenの担当者にお問い合わせください。遊離DNAの除去については、NFバリデーションの試験では評価されていません。

廃棄に関する詳細および行政の規制については、製品安全データシートを参照してください。

具体的な用途や手順についてご質問がありましたら、当社のウェブサイト（neogen.com）をご覧いただくか、Neogen販売担当者または取り扱い販売店までお問い合わせください。

お客様の使用責任

お客様には、使用前に添付文書および製品情報を熟読し、情報に精通する責任があります。詳細につきましては、当社ウェブサイト**neogen.com**をご覧いただくか、お近くのNeogen販売担当者または販売店にお問い合わせください。

試験方法を選択する際には、サンプリングの方法、試験のプロトコル、均質化や混合を含む検体の調製、取り扱い方法、実験技術、検体自体などの外的要因が結果に影響を与える可能性があることを認識しておくことが重要です。

適切な食材及び菌株を用いて、試験法がお客様のご要求の基準を満たすかどうかの十分な事前確認、ご評価をお願いいたします。

また、その検査方法および結果が顧客あるいは供給業者の要求を満たしているかにつきましても、お客様のご判断となります。

どの検査方法を使用した場合でも、Neogen食品衛生管理製品を使用して得られた検査結果により、検査で確認した食材または工程中の品質を保証するものではありません。

導入時にお客様が試験法の目的適合性を評価できるよう、Neogenは、Neogen マトリックスコントロール 病原菌自動検出システム用 (ISO 24914:2026(6)では増幅コントロールとも呼ばれる) を開発しました。妥当性確認および検証の際には、マトリックスコントロール (MDMC96) を用いてNeogen 病原菌検出アッセイ 2 - クロノバクター属菌用の結果に対するマトリックスの干渉を評価してください。ISO 16140-3:2021[7]規格および/またはお客様の品質保証プログラムに従い、試験法の性能検証や試験室での適用範囲を定義する際に必要な代表的な検体数を決定してください。試験法が検証され、試験室での適用範囲が確定した後は、Neogen マトリックスコントロールの日常的な使用は不要です。組織の品質保証プログラムに従い、日常的な検査においてNeogen マトリックスコントロールが必要かどうか、またその使用頻度をケースバイケースで判断してください。

マトリックスは、組成やプロセスなどの固有の特性を備える製品の種類と定義できます。マトリックスの違いは、処理や表示方法の違いによって起きる影響と同じくらい単純な場合があります。たとえば、生と低温殺菌の違い、生と乾燥の違いなどがあります。

保証の制限／限定的救済策

個々の製品パッケージの限定保証条項に明示されている場合を除き、NEOGENは明示または黙示を問わず、商品性または特定の目的への適合性に関する保証を含むがこれに限定されない、あらゆる種類の保証も負いかねます。Neogen食品衛生部門の製品に欠陥があった場合、Neogenまたは取扱販売店で交換あるいは返品処理をいたします。製品の欠陥が疑われる場合は、発見から60日以内に速やかに Neogen に連絡して、製品を Neogen に返却してください。ご不明な点がございましたら、Neogenの担当者またはNeogenの正規卸売業者にお問い合わせください。

Neogenの利用規約の詳細については、以下をご覧ください。https://neogen.com/en/terms-and-conditions/

Neogenの保証責任範囲

NEOGENは、直接的・間接的、特殊、偶発的または必然的を問わず、利益損失を含むあらゆる損失に対しての責任を負いません。いかなる場合においても、あらゆる法的理論に対しても、Neogenの保証責任範囲は、欠陥と認められた製品の購入金額を超えることはありません。

保管と廃棄

Neogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用*は2～8°Cで保管してください。冷凍しないでください。暗所で保管してください。キット開封後は、ホイルパウチが破損していないことを確認してください。パウチが破損している場合は、使用しないでください。開封後、使用しない試薬チューブは、凍結乾燥試薬の安定性を保つため、乾燥剤と共に再密閉可能なパウチ内に必ず保管してください。再密閉したパウチは2～8°Cで、60日間保存することができます。

使用期限を過ぎたNeogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用*は使用しないでください。使用期限およびロット番号は外箱ラベルに記載されています。使用後、増菌培地およびNeogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用*には病原性の物質が含まれる可能性があります。検査が完了したら、汚染廃棄物の処分に関する地方、地域、国の規制に従ってください。廃棄に関する詳細および行政の規制については、製品安全データシートを参照してください。

使用方法

すべての指示に、注意深く従ってください。従わない場合、正確な結果が得られないことがあります。

実験台と器具 (ピペット、キャップ/デキャップツール、試薬チューブラックなど) は、水で1～5 % (v/v) に希釈した家庭用塩素系漂白剤またはDNA除去剤を使用して定期的に除染してください。

ユーザーは、「Neogen 病原菌検出システムの設置適格性 (IQ)/実施適格性 (OQ) プロトコルと手順」文書[8]に記載されている Neogen 病原菌検出システムオペレーター資格トレーニングを修了する必要があります。

具体的な要件については、「妥当性確認された方法」の項を参照してください。

表 3 および表 4 : AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2018.01 および Performance TestedSM No. 101703 に基づく増菌プロトコル

表 5 : NFバリデーション認証 3M 01/20-03/18 に基づく増菌プロトコル

検体の増菌

表 2、3、4、または 5 は、食品および環境サンプルの増菌プロトコルに関するガイダンスを示しています。

この検査法がお客様の基準に合致するかを確かめるため、十分な数の検体または増菌プロトコル、あるいは希釈率で事前確認いただき、お客様の責任で使用の可否をご判断ください。

食品、環境粉体、埃、ごみ、スポンジ

1. 増菌プロトコルに特に記載がない限り、増菌培地は周囲温度 (20～25 °C) に平衡させてください (表 2、3、4、または 5 参照)。
2. 増菌培地と検体を無菌的に混合し、ブレンダー、ストマッキング、ボルテックス、または手作業で 2±0.2 分間、**あるいはすべての塊が完全に溶解し増菌懸濁液が均一になるまで、十分に均質化します**[9、10]。
   a. 均質化や混合などの検体の準備、取り扱い、および検査手技などの要因が結果に影響する場合があります。
   b. 超微粒子検体に関しては、フィルターバッグの使用を推奨します。
   c. 水を吸収して膨潤し高粘性となるマトリックス (例：穀物、デンプン) については、粘度が十分に低下するまでさらに希釈するか (10倍超)、BPW (ISO)[10]に滅菌済み1 % (w/v) α-アミラーゼを加えることを推奨します。
   d. 検体量が多いシリアルの場合、凝集しないよう、頻繁に混合しながら液体に粉末シリアルを徐々に加えます。
3. 適切なプロトコル表 (表2、3、4、5) に従って培養します。

表2. 一般的な増菌プロトコル

検体マトリックス	検体量[1]	増菌培地の量[1, 2]	増菌温度（±1°C）	増菌時間（時間）	検体の分析量
乳児用調製粉乳（PIF）および、粉乳、大豆粉、ホエイパウダー、ラクトース、米粉、マルトデキストリンなどの原料	検体1X g	BPW（ISO）9X mL（1:10）	37	18～24	20 µL
塩、ミネラル、アミノ酸、DHA（ドコサヘキサエン酸）、ビタミンなどの原料	検体1X g	BPW（ISO）99X mL（1:100）	37	18～24	20 µL
埃、ごみ、掃除機による集塵などの乾燥した環境検体	検体1X g	BPW（ISO）9X mL（1:10）	37	18～24	20 µL
リージンブロス10 mLまたはD/E希釈液を含ませた環境スポンジ	検体採取装置1個	BPW（ISO）90 mL（1:10）	37	18～24	20 µL

1. Neogen は、表 2 の希釈比を用いてNeogen 病原菌検出アッセイ 2 – *クロノバクター属菌用*を最大300 gまで評価しました。プロバイオティクス添加および非添加の乳児用調製粉乳は最大400 gまで評価しました。この方法がお客様の基準に合致するかを確かめるため、事前に他の希釈率あるいはプロトコルでご確認いただいた上で、使用の可否をご判断ください。
2. 増菌培地の量が300 mLを超える場合（例：検体量が30 gを超える）は、**あらかじめ加温した**BPW（ISO）を使用してください。

妥当性確認された方法

AOAC® *Official Method of Analysis℠*（OMA）2018.01

AOAC® *Performance Tested℠*（PTM）認証#101703

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

AOAC Research Institute OMA℠およびPTM℠を用いた試験において、Neogen 病原菌検出アッセイ2　*クロノバクター属菌用*は、*クロノバクター属菌の検出に有効な方法であることが確認されています。*試験で評価したマトリックスを、表3および4に示します。

表 3 および 4 に従って検体を準備し、2±0.2分間またはすべての塊が完全に溶けて増菌懸濁液が均一になるまで、ブレンド、ストマッキング、ボルテックス、あるいは手作業で十分に均質化します[9、10]。

表3. AOAC® *OMA℠* 2018.01および*PTM℠* 101703に基づく増菌プロトコル

検体マトリックス	検体量	増菌培地の量[1]	増菌温度（±1°C）	増菌時間（時間）	検体の分析量
プロバイオティクス添加の乳児用調製粉乳	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18〜24	20 µL
	300 g	2700 mL BPW (ISO) + 10 mg/L バンコマイシン)[b]	37 (予備加温)	22-24	20 µL
プロバイオティクス非添加の乳児用粉末シリアル	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
	300 g	2700 mL BPW (ISO) (1:10)	37 (予備加温)	18-24	20 µL
ラクトース粉末	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18〜24	20 µL
ステンレススチール (4 インチ x 4 インチ)[c]	1 スポンジ	BPW（ISO） 90 mL（1:10）	37	18〜24	20 µL

[a]増菌培地の量が300 mLを超える場合は、**あらかじめ加温した**BPW（ISO）を使用してください。

[b]最終濃度

[c]Environmental sponge pre-moistened with 10 mL D/E Neutralizing Broth.

Table 4. Enrichment protocols according to AOAC® *PTM℠* 101703

検体マトリックス	検体量	増菌培地の量[1]	増菌温度（±1°C）	増菌時間（時間）	検体の分析量
プロバイオティクス添加の乳児用調製粉乳	400[a] g	3600 mL BPW (ISO) + 10 mg/L バンコマイシン)	37 (予備加温)	22-24	20 µL
プロバイオティクス非添加の乳児用調製粉乳	400[a] g	3600 mL BPW (ISO) (1:10)	37 (予備加温)	22-24	20 µL

[a]AOAC PTM approved matrices with the use of free DNA removal steps.

Refer to the free DNA removal instructions for details

AFNOR CertificationによるNF VALIDATION

3M 01/20-03/18

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

効力の失効についての詳細は、上記のWebサイト上で入手できるNF VALIDATION認証を参照してください。

ISO 22964:2017[2] を参照法とし、 ISO 16140-2:2016[11]に従うNFバリデーション認証法。

適応範囲： 粉末乳児用調合乳および幼児用シリアル（プロバイオティクス含有／非含有）、原材料、環境検体。

検体の準備: 検体の準備は、EN ISO 22694:2017[2]およびEN ISO 6887[9、10]に従って行う必要があります。

ソフトウェアバージョン： 認定証を参照してください。

表5. NF VALIDATIONにより認証された方法3M 01/20-03/18に基づく増菌プロトコル

検体マトリックス	検体量	増菌培地の量[1]	増菌温度（±1°C）	増菌時間（時間）	検体の分析量	推奨される中断ポイント[2,3]
• 乳児用調製粉乳 • 乳児用粉末シリアル • 粉乳、大豆粉、ホエイパウダー、ラクトース、米粉、マルトデキストリンなどの原料 • 埃、ごみ、掃除機による集塵などの乾燥した環境検体	10 g	BPW（ISO）90 mL（1:10）	37	18〜24	20 µL	増菌培地または検体溶解物は、2〜8°Cで最大72時間保管することができます
• スポンジ、洗浄水、拭き取り用ワイプ	検体採取装置1個または10 mL					増菌培地または検体溶解物は、2〜8°Cで最大72時間保管することができます
乳児用調製粉乳および乳児用粉末シリアル（プロバイオティクスを含有しない）	30〜300 g	BPW（ISO）（1:10）	37	18〜24	20 µL	増菌培地または検体溶解物は、2〜8°Cで最大72時間保管することができます
乳児用粉末シリアルおよび乳児用調製粉乳（プロバイオティクスを含有する）	30〜300 g	BPW（ISO）+ バンコマイシン10 mg/L（1:10）	37	22〜24	20 µL	なし

1. 増菌培地の量が300 mLを超える場合（例：検体量が30 gを超える）は、あらかじめ加温したBPW（ISO）を使用してください。
2. 増菌培地を保管場所から取り出したら、「ライシス」セクションのステップ1から再開してください。検体ライシスを保管場所から取り出したら、「ライシス」セクションのステップ7から再開してください。
3. 保管された加熱処理済み溶解物の再検査については、付録Aを参照してください。

Neogen® 測定機器 病原菌自動検出システム用スピードローダートレイの準備

1. 1〜5%（v/v in water）の家庭用漂白液で湿らせた布か使い捨て用タオルを使って、Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用スピードローダートレイを拭きます。
2. 水でNeogen 測定機器 病原菌自動検出システム用スピードローダートレイを濯ぎます。
3. 使い捨てペーパータオル等で、Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用スピードローダートレイを拭きます。
4. 使用前に、Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用スピードローダートレイが乾燥していることを確認してください。

この手順には2つのNeogen 病原菌自動検出システム用ヒート/チルブロックインサートが必要です。いずれのインサートも同じ製品 (700000145) ですが、用途は異なります。

手順を明確にするため、加熱工程で使用されるインサートを「病原菌検出システム用ヒートブロックインサート」、冷却工程で使用されるインサートを「病原菌検出システム用チルブロックインサート」と呼びます。これらの名称は役割を区別するためにのみ使用され、別の製品を示すものではありません。

Neogen® 測定機器 病原菌自動検出システム用チルブロックインサートの準備

Neogen 病原菌検出システム用チルブロックインサートを実験台の上に直接置きます。ブロックは検査室の常温 (20〜25 °C) で使用してください。

Neogen® 測定機器 病原菌自動検出システム用ヒートブロックインサートの準備

Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用ヒートブロックインサートをドライダブルブロックヒーターユニットに入れます。ドライブロックヒーターユニットをオンにして、温度を100±1°Cに設定します。Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用ヒートブロックインサートが設定温度に達したら、温度を保持します。

注： 使用するヒーターユニットにより、Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用ヒートブロックインサートが設定温度に達するまでに約30分かかります。適切な較正済みの温度計（例：浸線付温度計またはデジタル熱電対温度計。全浸没温度計は使用しないこと）を指定の部位に設置し、Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用ヒートブロックインサートが100±1°Cであることを確認します。

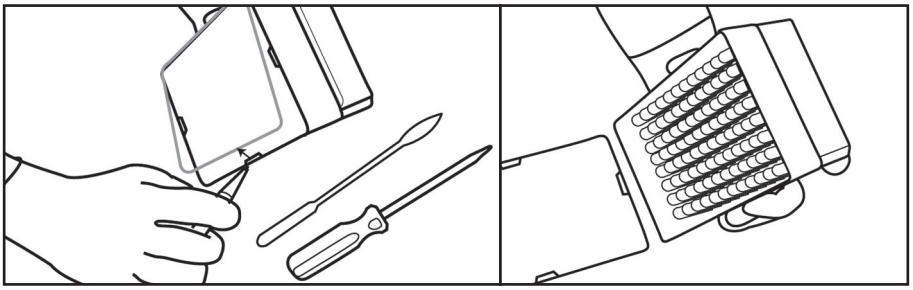
Neogen® 測定機器 病原菌自動検出システム用の準備

1. Neogen® 測定機器　病原菌自動検出システム用ソフトウェアを起動して、ログインします。お使いのソフトウェアが最新バージョンであるかどうかを確認するには、Neogen食品衛生部門の営業担当者あるいは販売店までお問い合わせください。
2. Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用の電源を入れます。
3. 各検体のデータを含む検出結果を作成、編集します。詳細については、Neogen 病原菌自動検出システムユーザーマニュアルを参照してください。

注： Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用は、反応チューブと共にNeogen 測定機器 病原菌自動検出システム用スピードローダートレイを入れる前に、待機状態になっている必要があります。この加熱ステップには約20分かかり、装置のステータスバーがオレンジ色に点灯します。装置の準備ができると、ステータスバーは緑色に変わります。

ライシス

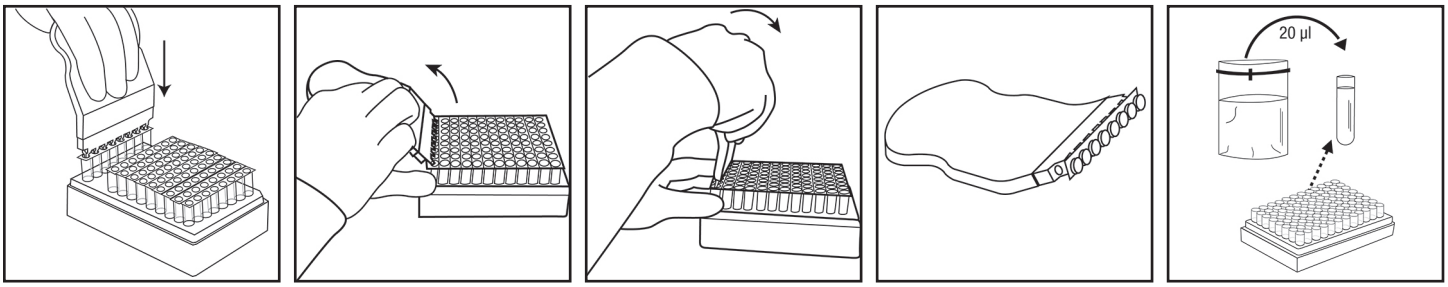
Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用ヒートブロックインサートに入れる前に、ドライバーでNeogen ライシスチューブラックの底部を取り外します。



1. Neogen ライシスチューブは、ラックに一晩（16〜18時間）静置して、室温（20〜25°C）に戻します。Neogen ライシスチューブを室温に戻す別の方法としては、Neogen ライシスチューブを作業台の上に2時間以上静置するか、Neogen ライシスチューブを37±1°Cの培養器内で1時間保温するか、Neogen ライシスチューブをドライダブルブロックヒーターに入れて1°Cで30秒間加熱します。

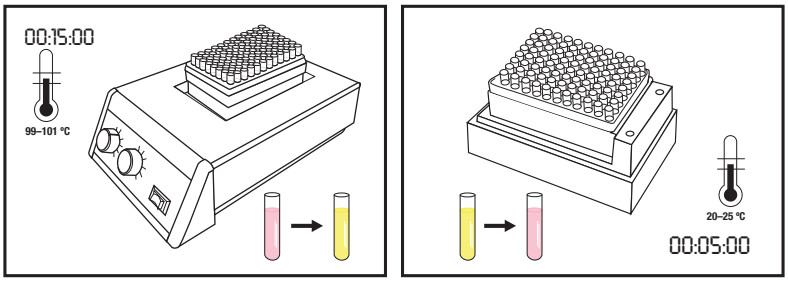
2. キャップを閉めた状態のライシスチューブを反転させて中の液を混合させます。反転後4時間以内に次のステップに進みます。
3. 増菌検体を培養器から取り出します。
4. 各検体およびNC検体（滅菌増菌培地）につきNeogen ライシスチューブ1本が必要です。
   - 4.1 Neogen ライシスチューブのストリップは、必要な数に合わせてカットできます。各Neogen ライシスチューブまたは8連チューブのストリップの数を選択してください。Neogen ライシスチューブを空のラックに置きます。
   - 4.2 交差汚染を回避するため、Neogen ライシスチューブのキャップは一度に1ストリップずつ外し、滴下ステップごとに新しいピペットチップを使用してください。
   - 4.3 以下に記載のとおり、増菌した検体をNeogen ライシスチューブに滴下します。

     最初に、増菌した各検体を各Neogen ライシスチューブに滴下します。**最後に**NCを滴下します。
   - 4.4 Neogen® 病原菌自動検出システム用キャップ／デキャップツール ― 溶解を使用して、Neogen ライシスチューブのキャップを一度に1ストリップずつ外します。
   - 4.5 Neogen ライシスチューブのキャップを廃棄します。ライシス液を再検査用に保存する場合は、キャップを清潔な容器に入れておき、ライシス後に再度キャップを嵌めます。
     - 4.5.1. 保存した溶解物の処理については、付録Aを参照してください。
   - 4.6 粘度の高い検体を扱うときは、濾過された面から検体を採取する前に増菌バッグを撹拌します。
   - 4.7 プロトコルの表に別の指示がある場合を除き、検体20 µLをNeogen ライシスチューブに移注します。
5. 各検体が、ストリップの対応するNeogen ライシスチューブに添加されるまでステップ4.4～4.7を繰り返します。



6. すべての検体を移注したら、NC（ネガティヴコントロール用滅菌増菌培地、例：BPW）20 µLをNeogen ライシスチューブに滴下します。水は陰性コントロールとして使用しないでください。
7. Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用ヒートブロックインサートの温度が100±1°Cであることを確認してください。
8. 加熱工程：カバーを外したNeogen ライシスチューブのラックをNeogen 病原菌検出システム用ヒートブロックインサートに置き、15±1分間加熱します。加熱中、Neogen ライシス液はピンク色（低温）から黄色（高温）に変色します。

   アッセイのライシスステップ中に適切な熱処理を行っていない検体は、潜在的バイオハザードと考えられる可能性がありますので、Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用の装置内には入れないでください。
9. 冷却工程：カバーを外したNeogen ライシスチューブのラックをNeogen 病原菌検出システム用ヒートブロックから取り出し、Neogen 病原菌検出システム用チルブロックインサートで少なくとも5分間、最長10分間冷却します。Neogen 病原菌検出システム用チルブロックインサートは、Neogen® 病原菌検出システム用チルブロックトレイを用いず、常温にて実験台に直接置いて使用します。冷却中、Neogen ライシス液はピンク色に戻ります。
10. Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用チルブロックインサートからNeogen ライシスチューブラックを取り出します。

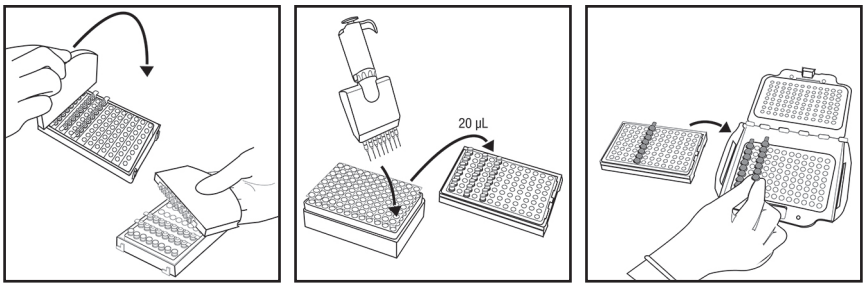


増幅

1. 各検体およびNCにつきNeogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用* 試薬チューブ1本が必要です。
   1.1 チューブのストリップは、必要な数に合わせてカットできます。各Neogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用* 試薬チューブまたは8連チューブのストリップの数を選択してください。
   1.2 Neogen® 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用* 試薬チューブを空のラックに置きます。
   1.3 チューブの底の試薬ペレットを撹拌しないでください。
2. Neogen 試薬コントロールチューブを1本選択して、ラックに置きます。
3. 交差汚染を回避するため、Neogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用*の試薬チューブのキャップは一度に1ストリップずつ外し、分注ステップごとに新しいピペットチップを使用してください。
4. 下記のように、各溶解物を、Neogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用* 試薬チューブおよびNeogen 試薬コントロールチューブに滴下してください。

   Neogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用*の各試薬チューブに**最初に**各検体溶解物を滴下し、次にNCを滴下します。**最後に**Neogen 試薬コントロールチューブを水和します。

5. Neogen® 測定機器 病原菌自動検出システム用キャップ／デキャップツール ― 試薬を使用して、Neogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用* 試薬チューブのキャップを一度に1ストリップずつ外します。キャップを廃棄します。
   5.1 **検液20 µLをNeogen ライシスチューブの液体の上部1/2（沈澱物は避けてください）から取り、対応するNeogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用* 試薬チューブに分注します。ペレットが撹拌されないよう、一定の角度で分注します。ピペッティングを上下5回やさしく行って混合します。**
   5.2 各検体溶解物が、ストリップの対応するNeogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用* 試薬チューブに添加されるまでステップ5.1を繰り返します。
   5.3 付属の予備キャップを使用してNeogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用* 試薬チューブをカバーし、Neogen® 測定機器 病原菌自動検出システム用キャップ／デキャップツール ― 試薬の丸い方を使って、キャップがしっかりと嵌るよう前後に動かして圧力をかけます。
   5.4 検査する検体数に応じて、ステップ5.1～5.3を繰り返します。
   5.5 すべての検体ライシス液を滴下したら、ステップ5.1～5.3を繰り返してNCライシス液20 µLをNeogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用* 試薬チューブに滴下します。
   5.6 **Neogen 試薬コントロールチューブにNC溶解物20 µL**を滴下します。ペレットが撹拌されないよう、一定の角度で分注します。ピペッティングを上下5回やさしく行って混合します。
6. 清潔な、殺菌済みNeogen 測定機器 病原菌自動検出システム用スピードローダートレイにキャップをしたチューブを装填します。Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用スピードローダートレイを閉めて、留めがねをかけます。



7. 設定済みのランをNeogen 病原菌検出システムのソフトウェアでレビューし確定します。
8. ソフトウェアのスタートボタンをクリックして、使用する装置を選択します。選択された装置の蓋が自動的に開きます。
9. Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用装置内にNeogen 測定機器 病原菌自動検出システム用スピードローダートレイを置き、蓋を閉めてアッセイをスタートします。結果は60分ほどで判定されますが、陽性の場合はもっと早く検出されます。
10. アッセイ完了後、Neogen 病原菌自動検出システム用スピードローダートレイをNeogen 病原菌自動検出システムから取り出し、チューブを水で 1～5 % (v/v) に希釈した家庭用塩素系漂白剤に1時間浸した後に、アッセイ準備エリアから離れた場所に廃棄します。

注記： 交差汚染による偽陽性の危険を最小限に抑えるため、増幅DNAの入った試薬チューブは絶対に開けないでください。これには、Neogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用* 試薬、Neogen 試薬コントロール、Neogen マトリックスコントロールチューブが含まれます。試薬チューブは必ず密封したまま、水で 1〜5 % (v/v) に希釈した家庭用塩素系漂白剤に1時間浸した後に、アッセイ準備エリアから離れた場所に廃棄してください。

結果と解釈

アルゴリズムが核酸増幅の結果より得られた光出力曲線を解釈します。結果はソフトウェアが自動的に解析し、結果に応じて色分けされます。陽性または陰性の結果は、それぞれが持つ固有の曲線パラメータを解析することにより特定されます。結果が陽性と推定される場合はリアルタイムでレポートされますが、陰性および再検査が必要な場合は、その検査が完了した後に表示されます。

推定陽性の増菌培養液については、試験室の標準作業手順に従うか、適切な参照法の確認試験手順[1,2]に従って確認してください。一次増菌培地 (BPW ISO または 10 mg/L バンコマイシンを添加した BPW ISO) から二次増菌培地への移し替えから開始し、その後、分離培養による菌株に対して適切な生化学的、血清学的および/または分子学的手法による確認を行います。

注： Neogen 病原菌検出アッセイ2 – *クロノバクター属菌用*の試薬は「バックグラウンド」相対発光量（RLU）を持っていますので陰性検体がシステム上のグラフ数値として0を示さない場合もあります。

まれに異常な光出力が発生した場合、アルゴリズムはこれを「不確定」と判定します。Neogen は「不確定」の検体に対してアッセイを再度行うことを推奨しています。結果が引き続き「不確定」となった場合には、任意の方法または地域の規制に従って確認試験に進んでください。[1、2]

表 6. ソフトウェアの各種結果に関する記号と情報

ウェルタイプ	ウェルの結果の記号	結果	解釈
検体		陽性	ターゲットとする病原菌に対してこの検体は推定陽性となります。
検体		陰性	ターゲットとする病原菌に対してこの検体は陰性となります。
検体		阻害 *	検体マトリックスが反応を阻害しました。再検査が必要な可能性があります。
検体		不確定（検証が必要）	対象の病原菌の有無を確定できませんでした。再検査が必要な可能性があります。
検体		エラー *	蛍光発光が測定されませんでした。再検査が必要な可能性があります。

*結果の詳細はランレポートを参照してください。ご質問がありましたらNeogenの担当者までお問い合わせください。

遊離DNA除去手順

注：遊離DNAの除去については、NFバリデーションの試験では評価されていません。

1. **PMAxx**
   a. 分子生物学グレード水 (MGW) 45 µL をマイクロチューブに分注します。
   b. 45 µLのMGWを含むマイクロチューブに、PMAxx™ Dye (20 mM) 5 µLを直接添加します。ピペッティングにより穏やかに混和します。

注：溶液は遮光、冷蔵で最大1時間保存できます。

   c. 増菌検体400 µL をマイクロ遠心チューブに移します。
   d. 遮光下で、PMAxx溶液5 µLを試料分取液に加えます。
   e. マイクロチューブを覆って遮光し、チューブローテーター上で10分間回転混和します。
   f. PMAxx処理したチューブを PMA-Lite™ 装置に入れ、10分間処理します。
   g. 各チューブを3秒間ボルテックスした後にPMA-Lite装置に戻し、さらに10分間処理します。
   h. PMAxx処理済み試料20 µLを Neogen ライシスチューブに移し、溶菌工程を進めます。

2. **クロノバクター選択ブロス (CSB)**
   a. 一次増菌液0.1 mLを10 mLのCSBに移します。
   b. 41.5±1 °Cで24±2時間培養します。
   c. 培養後、溶菌工程を進めます。

NFバリデーション認証法に基づく結果の確認
NFバリデーションにおいて、Neogen 病原菌検出アッセイ 2 - クロノバクター属菌用により陽性と判定された検体はすべて、以下のいずれかの試験法により確認試験を実施する必要があります。確認試験は、培養終了後72時間以内に、2〜8 °Cで保存した増菌培養液から実施する必要があります。

オプション1：BPW ISO増菌培養液を用い、ISO 22964:2017[2]に従って確認試験を実施します。

- CSBに10倍希釈となるように接種し、41.5±1 °Cで24±2時間継代培養します。
- CCI寒天培地に画線塗抹し、41.5±1 °Cで24±2時間培養します。
- 典型的なコロニーを最大5個釣菌し、非選択寒天培地に画線塗抹し、37±1 °Cで21±3時間培養します。
- 適切な生化学的確認検査 (オキシダーゼ試験および生化学的性状試験キット) を実施します。

オプション2：選択寒天培地から分離したコロニー (オプション1参照) を用いて、ISO 7218:2024[4]に記載された核酸プローブ法により確認試験を実施します。ISO 7218:2024の規定に従い、分子スクリーニング法による結果は、異なる遺伝子領域を標的とし、かつ異なるプライマーおよび/またはプローブを使用する第2の分子生物学的手法によって確認することができます。確認法は、コロニー確認のための手順および使用材料が評価された適切なISO 16140シリーズ規格に従って妥当性確認されていなければなりません。

オプション3：Neogen 病原菌検出アッセイ 2 – *クロノバクター属菌用*とは異なる測定原理に基づくNFバリデーション認証法を用いて確認試験を実施します。この第2の妥当性確認済み試験法については、記載されたプロトコル全体を完全に実施しなければなりません。確認試験開始前までのすべての手順は、両方の試験法で共通している必要があります。

結果に不一致が生じた場合 (Neogen 病原菌検出アッセイ 2 – クロノバクター属菌用では推定陽性であるものの、前述のいずれかの方法による確認試験で確認されなかった場合)、試験室ではあらかじめ定められた標準作業手順に従って結果を報告する必要があります。

特定の用途や手順についてご不明な点がございましたら、当社ウェブサイト (neogen.com) をご覧いただくか、最寄りのNeogenの担当者または販売代理店にお問い合わせください。

付録A. プロトコルの中断： 加熱処理済み溶解物の保管と再検査
1. 加熱処理済み溶解物を保管するには、ライシスチューブに清潔なキャップを嵌めます（「**ライシス**」セクション、4.5を参照）
2. 2〜8°Cで最大72時間保管します。
3. 保管された検体を2〜3回反転させて混合し、増幅用として準備します。
4. チューブのキャップを外します。
5. 混合したライシスチューブをNeogen 測定機器
   病原菌自動検出システム用ヒートブロックインサートに置き、100±1°Cで5±1分間加熱します。
6. ヒートブロックからNeogen ライシスチューブラックを取り出し、Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用チルブロックインサート内で5分間以上（最大10分間）冷却します。
7. 上記の「**増幅**」セクションに詳述されているプロトコルを継続します。

参考文献：

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO 7218:2024.Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
5. CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMLB) 6th Edition. Effective Date: 29 August 2025
6. ISO 24914:2026 Microbiology of the food chain — Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of microorganisms and associated genetic markers — General requirements and definitions.International Standard Organization (ISO), Geneva, Switzerland. www.iso.org

7. ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain — Method validation Part 3:Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory
8. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
9. ISO 6887-5:2020.Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5:Specific rules for the preparation of milk and milk products.
10. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
11. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

上述の標準試験法については、現行の最新版を参照してください。

記号の説明

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
Auchincruive House
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation, 620 Lesher Place, Lansing, MI 48912 USA.
© Neogen Corporation 2026. All rights reserved. Neogen は、Neogen Corporation の登録商標です。
その他のブランド名および製品名は、各社の商標または登録商標です。特許:neogen.com/patents
FS00879B_0826

发行日期：2026-07

产品信息

分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*

产品说明及预期用途

Neogen® 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*与 Neogen® 分子检测系统一起使用，用于快速、专门检测增菌后的食品和食品加工环境样品中的*阪崎肠杆菌*。

Neogen 分子检测试剂盒 采用环介导等温扩增技术，以高特异性和高灵敏度快速扩增核酸序列，并结合生物发光法检测扩增产物。实时报告假定阳性结果，阴性结果将在分析完成之后显示。应该使用您喜欢的方法或按照当地法规指定的方法确认假定阳性结果[1,2]。

Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*专供受过实验室技术培训的专业人员在实验室环境下使用。对于在食品或饮料以外的行业中使用此产品，Neogen 尚未有资料可证。例如，对于此产品用于检测制药、化妆品、临床或兽医样品，Neogen 尚未有资料可证。尚未针对所有可能的食品产品、食品加工、检测方案或针对所有可能的细菌类型评估 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*。

对于所有检测方法，增菌培养基的来源、配方和质量都可能会影响结果。取样方法、检测方案、样品制备（包括均质及混合）、处理和实验室技术等因素都可能会影响结果。Neogen 建议在用户环境中利用充足数量的样品以及特定的食品和/或环境样品以及微生物挑战性试验对包括增菌培养基在内的方法进行评估，确保相应的方法符合用户的标准。

Neogen 已使用 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* 配合 Buffered Peptone Water (BPW) ISO 作为增菌培养基进行了评估。

Neogen® 分子检测仪器专用于在分析裂解步骤中经过热处理的样品，该步骤旨在破坏样品中存在的生物体。未在分析裂解步骤中经过适当热处理的样品可以被视为潜在的生物危害，不应将其插入 Neogen 分子检测仪器。

Neogen 食品安全的设计和生产已经获得 ISO（国际标准化组织）9001 认证。

Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*检测盒包含 96 个测试，如表 1 所述。

表 1. Neogen 分子检测试剂盒构成

项目	标识	数量	内容物	备注
Neogen® 裂解溶液 (LS)	透明管中的粉红溶液	96（12 条,每条 8 管）	每管 580 µL LS	已上架并可以使用
Neogen® 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*试剂管	橙色-红色管	96（12 条,每条 8 管）	特定扩增和检测混合物的冻干样	可以立即使用
附加盖子	橙色-红色盖	96（12 条，每条 8 盖）		可以立即使用
Neogen® 试剂对照 (RC)	透明翻盖管	16（2 袋，每袋 8 根管）	对照 DNA、扩增和检测混合物的冻干样	可以立即使用

阴性对照（试剂盒中未提供）为无菌富集培养基，例如 BPW ISO。请勿使用水作为阴性对照。

安全

用户应该阅读、理解并遵守 Neogen 分子检测系统和 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*说明中的所有安全信息。妥善保存安全说明书，以备日后查阅。

⚠**警告：** 表示危险情况，如果不注意避免，可能造成死亡或严重的人身伤害和/或财产损失。

注意： 表示潜在的危险情况，如果不注意避免，可能导致财产损失。

⚠ 警告

请勿在人类或动物的各种诊断中使用 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*。

用户必须对其人员就当前正确的测试技术进行培训：例如，遵循《药物非临床研究质量管理规范》[3] 或美国 CDC《微生物和生物医学实验室生物安全指南》(BMBL)[5]。

为了降低与假阴性结果关联的风险，避免释放出污染产品：

- 遵守操作流程并按照产品信息中提供的方法执行检测。
- 请按照包装和产品说明中的指示存储 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*。
- 始终在过期日期之前使用 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*。
- 将 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*用于经内部或第三方验证的食品和食品加工环境样品。
- 仅将 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*用于经内部或第三方验证的表面、消毒剂、方案和菌株。
- 如果是含有含芳基磺酸盐络合物的中和缓冲液 (NB) 的环境样本，请在测试前进行 1:2 稀释（将 1 份样本放入 1 份无菌增菌液体培养基中）。另一种选择是将 10 µL 的中和缓冲培养液转移至 Neogen 裂解溶液管内。Neogen® 采样产品中包含芳基磺酸酯复合物的中和缓冲液：700002040 | RS96010NB、700002011 | RS9604NB 700002003 | SSL10NB、700002004 | SSL10NB2G、700002213 | HS10NB 和 700002002 | HS10NB2G。该方案尚未在 NF Validation 研究中进行检测。

为了降低与化学品和生物危害暴露相关的风险，请注意以下事项：

- 在训练有素的工作人员的控制下，于妥善配备的实验室中执行致病菌检测。增菌培养基以及接触过增菌培养基的设备或表面可能含有致病菌，足以对人体健康造成风险。
- 始终遵守标准实验室安全规范，包括在处理试剂和受污染样品时穿戴适当的防护服和眼睛防护装置。
- 扩增后避免接触增菌培养基和试剂管的内容物。
- 根据现行的地方、地区和国家法规，处理增菌样品及相关受污染的废弃物。
- 在分析裂解步骤中未经适当热处理的样本可能被视为潜在的生物危害，不得将其插入 Neogen 分子检测仪器。

为了在准备分析时降低与交叉污染相关联的风险，请注意以下事项：

- 始终戴手套（保护操作者和防止引入核酸酶）。

为了降低环境污染带来的风险：

- 遵守地方、区域和国家的处置规定。

为了降低与高温液体暴露相关的风险，请注意以下事项：

- 不要超出建议的加热器温度设置。
- 不要超出建议的加热时间。
- 使用正确的经过校准的温度计检验 Neogen® 分子检测加热插块温度（如局浸温度计或热电偶数字温度计，而非全浸温度计）。温度计必须放置于 Neogen 分子检测加热插块中的指定位置。

注意

为了在准备分析时降低与交叉污染相关联的风险，请注意以下事项：

- 在进行试剂小球水化之前更换手套。
- 建议使用带气溶胶屏障（经过滤处理）的分子生物学级无菌移液器吸头。
- 每次转移样品时使用新的吸头。
- 采用药物非临床研究质量管理规范将样品从培养基转移至裂解管。为了避免吸头污染，用户可以选择增加一个中间转移步骤。例如，用户可以将每个经过增菌的样品转移至无菌管中。
- 在适用的地方使用配有杀菌灯的分子生物工作站。
- 使用 1 - 5 % (v:v，水溶液) 氯基家用漂白溶液（含次氯酸钠）或 DNA 去除溶液，定期消毒实验室工作台和设备（移液器、合盖/开盖工具、试剂管架等）。

为了降低假阳性结果的相关风险，请注意以下事项：

- 切勿在扩增后将试剂管打开。
- 受污染的试管应始终通过浸泡在 1 - 5 %（v:v，水溶液）的含氯家用漂白剂溶液中处理 1 小时，且处理地点应远离检测准备区。
- 请勿在扩增后对试剂管进行高压灭菌。
- 若样品怀疑含有高水平的 Cronobacter 游离 DNA（例如，经灭活/失活步骤处理的非存活 Cronobacter 细胞的 DNA），则应在**裂解**步骤前对推定阳性增菌液进行 DNA 去除程序（如 DNase 处理）或 PMAxx 处理。有关其他说明，请联系您的 Neogen 代表。在 NF 验证研究期间，未对游离 DNA 去除进行评估。

请参考安全数据表了解其它信息和当地处置法规。

如果您对于特定的应用或程序存有疑问，请访问我们的网站 neogen.com，也可与您当地的 Neogen 代表或经销商联系以获得帮助。

用户责任

用户负责熟悉本产品的说明和信息。请访问我们的网站 **neogen.com** 或联系您当地的 Neogen 代表或经销商，以了解更多信息。

在选择检测方法时，务必认识到外部因素（如采样方法、检测方案、样品制备（包括均质和混合）、操作处理、实验技术以及样品本身）可能影响结果。

用户在选择检测方法时，应自行负责选用合适的基质和微生物挑战性试验对足够多的样品进行评估，以确保所选择的检测方法符合用户的标准。

用户也应自行负责确定任何检测方法和结果符合其客户和供应商的要求。

同所有检测方法一样，使用任何 Neogen 食品安全产品得到的结果，并不保证受检基质或程序的质量。

为帮助客户在方法实施过程中评估其适用性，Neogen 开发了 Neogen 分子检测基质对照试剂盒（在 ISO 24914:2026 中亦称为扩增对照 [6]）。在验证和确认过程中，使用该基质对照评估样品基质对 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* 检测结果的干扰。在方法性能验证及实验室应用范围界定时，应遵循 ISO 16140-3:2021 [7] 标准和/或所在机构的质量保证体系，以确定所需的代表性样本数量。方法验证完成且实验室应用范围已确定之后，常规检测中无需持续使用基质对照。遵循贵组织的质量保证计划，逐案确定 Neogen 分子检测基质对照的需求及其在常规测试中的使用频率。

“基质”可以定义为一种具有固有性质（如成分和工艺）的产品。可以将基质之间的差异理解为其在加工或呈现方式方面的差异会带来不同影响，例如，未经处理的基质 vs. 经过巴氏杀菌的基质；新鲜基质 vs. 干基质等。

保证限制/有限补救措施

除非各个产品包装的有限保证部分明确声明，NEOGEN 就所有明示或默示保证做出免责声明，包括但不限于适销性及适合某种特定用途的保证。如果证明任何 Neogen 食品安全产品存在缺陷，Neogen 或其授权经销商可以进行换货或者由其决定是否为该产品进行退款。这些都是专门针对您而设计的解决方案。您必须在发现产品存在任何可疑缺陷后六十天内立即通知 Neogen，并将其退回给 Neogen。

有关 Neogen 的完整条款和条件，请访问：https://neogen.com/en/terms-and-conditions/

Neogen 责任限制

NEOGEN 不会对任何损失或损害负责，无论造成的损害是直接、间接、特殊、偶然或随后产生的，包括但不限于利润损失。根据法律理论 Neogen 对所谓存在缺陷的产品的赔付不可能超过产品的购买价格。

存储和弃置

在 2-8°C 温度下存储 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*。请勿冰冻。避光存储试剂盒。打开试剂盒后，检查铝箔袋是否破损。如果破损，请不要使用。打开之后，未使用的试剂管应始终存储在内部带有干燥剂的可重新密封铝箔袋中，以保持冻干试剂的稳定性。将重新密封的铝箔袋存储在 2-8°C 温度下，但存储时间不能超过 60 天。

请勿使用过期的 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*。过期日期和批号注明在包装箱外侧的标签上。使用之后，增菌培养基和 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*管可能会含有带菌材料。检测完成后，应按照当地、区域及国家法规处置受污染废弃物。请参考安全数据表了解其它信息和当地处置法规。

使用说明

仔细遵循所有说明。否则，可能导致不准确的结果。

使用 1 - 5 %（v:v，水溶液）氯基家用漂白溶液或 DNA 去除溶液，定期消毒实验室工作台和设备（移液器、合盖/开盖工具、试剂管架等）。

用户应完成“Neogen 分子检测系统安装认证 (IQ) / 操作认证 (OQ) 方案和说明”文件[8]中所述的 Neogen 分子检测系统操作员资格培训。

请参看“验证方法具体说明”部分，了解特定要求：

表 3 和表 4 为根据 AOAC® *官方分析方法* SM 2018.01 和 *Performance Tested*SM 证书编号 101703 的增菌方案。

表 5 为根据 NF VALIDATION 证书 3 M 01/20 - 03/18 的增菌方案。

样品增菌

表 2、表 3、表 4 或表 5 提供了食品及环境样品的增菌操作指南。

用户有责任验证备用取样或培养方案或者稀释率，以确保本检测方法符合用户的标准。

食品、环境粉末、灰尘、碎屑及海绵

1. 除非增菌方案中另有说明（见表 2、3、4 或 5），否则将增菌培养基平衡至环境温度（20 - 25 °C）。
2. 在无菌条件下将增菌培养基与样品混合，并通过搅拌、拍击、涡旋或手摇方式彻底均质化 2 ± 0.2 分钟，**或直至所有团块完全溶解且增菌悬液均一** [9, 10]。
   a. 样品制备（均质及混合）、处理和实验室技术等因素都可能会影响结果。
   b. 对于微粒样品，建议使用过滤袋。
   c. 对于在水中膨胀且粘度较高的基质（如谷物、淀粉），建议进一步稀释（> 1:10）直至粘度适当降低，或向 BPW（ISO）中添加无菌的 1 %（w/v）α - 淀粉酶 [10]。
   d. 为了大样品量的谷物样品，将谷物粉慢慢加入液体中，频繁混合，避免结块。
3. 按相应方案表中的条件进行培养（见表 2、表 3、表 4 或表 5）。

表 2. 通用培养方案

样品基质	样品大小[1]	培养肉汤量[1,2]	培养温度 (± 1°C)	培养时间 (小时)	样品分析量
婴儿配方乳粉 (PIF) 和原材料，如干奶粉、大豆粉、乳清粉、乳糖、米粉、麦芽糖糊精	1X 克样品	9X mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
原材料，如盐、矿物质、氨基酸、DHA（二十二碳六烯酸）和维生素	1X 克 样品	99X mL BPW (ISO) (1:100)	37	18-24	20 µL
干燥环境样品，如灰尘、碎屑、真空收集	1X 克样品	9X mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
含有 10 mL 李氏肉汤或 D/E 中和肉汤的环境海绵	1 套取样设备	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL

1. Neogen 已使用表 2 中的稀释比例对 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *Cronobacter* 进行了评估，最高至 300 g，但含或不含益生菌的婴儿配方奶粉除外，其评估最高至 400 g。用户有责任验证备用稀释率或方案，以确保本方法符合用户的标准。
2. 如果培养肉汤量大于 300 mL（如样品大于 30g），使用**预热** BPW (ISO)。

验证方法具体说明

AOAC® *Official Method of Analysis℠* (OMA) 2018.01

AOAC® *Performance Tested℠* (PTM) 证书 #101703

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

在 AOAC 研究机构OMA℠ 和 PTM℠ 研究中，Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*被发现是用于检测*阪崎肠杆菌的有效方法*。研究中测试的基质见表 3 和表 4。

根据表 3 和表 4 准备样品，通过搅拌、拍击、涡旋或手摇方式彻底均质化 2 ± 0.2 分钟，或直至所有团块完全溶解且增菌悬液均一[9, 10]。

表 3. 遵照 AOAC® *OMA℠* 2018.01 和 *PTM℠* 101703 实施的培养方案

样品基质	样品大小	培养肉汤量[1]	培养温度 (± 1°C)	培养时间 (小时)	样品分析量
含益生菌的婴儿配方奶粉（粉状）	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
	300 g	2700 mL BPW (ISO) + 10 mg/L 万古霉素)[b]	预热至 37 °C	22-24	20 µL
不含益生菌的婴儿谷物粉（粉状）	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
	300 g	2700 mL BPW (ISO) (1:10)	预热至 37 °C	18-24	20 µL
乳糖粉	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
不锈钢（4 英寸 x 4 英寸）[c]	1 块海绵	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL

[a]如果培养肉汤量大于 300 mL，使用**预热** BPW (ISO)。

[b]最终浓度

[c]Environmental sponge pre-moistened with 10 mL D/E Neutralizing Broth.

表 4. 根据 AOAC® *PTM*℠ 101703 的增菌方案

样品基质	样品大小	培养肉汤量[2]	培养温度 (± 1°C)	培养时间（小时）	样品分析量
含益生菌的婴儿配方奶粉（粉状）	400[a] g	3600 mL BPW (ISO) + 10 mg/L 万古霉素）	预热至 37 °C	22-24	20 µL
不含益生菌的婴儿配方奶粉（粉状）	400[a] g	3600 mL BPW (ISO) (1:10)	预热至 37 °C	22-24	20 µL

[a]经 AOAC PTM 批准的基质（配合游离 DNA 去除步骤使用）。

详情请参阅游离 DNA 去除说明。

AFNOR Certification 认证的 NF VALIDATION

3M 01/20-03/18

农业综合企业的替代分析方法

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

有关有效性截止日期的详细信息，请参阅上述网站中提供的 NF VALIDATION 证书。

经 NF VALIDATION 认证，符合 ISO 16140-2:2016 [11] 要求，以 ISO 22964:2017 [2] 为参照。

验证范围： 婴儿配方乳粉以及含/不含益生菌的婴儿谷物、原料及和环境样品。

样品制备： 应根据 EN ISO 22694:2017 [2] 和 EN ISO 6887 [9, 10] 制备样品。

软件版本： 参见证书。

表 5. 遵照 NF VALIDATION 认证方法 3M 01/20-03/18 实施的培养方案

样品基质	样品大小	培养肉汤量[1]	培养温度 (± 1°C)	培养时间 (小时)	样品分析量	建议的中断点[2, 3]
• 婴儿配方乳粉 • 婴儿谷粉 • 原材料，如干奶粉、大豆粉、乳清粉、乳糖、米粉、麦芽糖糊精 • 干燥环境样品，如灰尘、碎屑、真空收集物	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL	培养肉汤或样品裂解液可在 2-8°C 下储存最长 72 小时
• 海绵、冲洗水、擦拭巾	1 套取样设备或 10 mL					培养肉汤或样品裂解液可在 2-8°C 下储存最长 72 小时
婴儿配方乳粉及婴儿谷粉（无益生菌）	30-300 g	BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL	培养肉汤或样品裂解液可在 2-8°C 下储存最长 72 小时
婴儿谷粉和婴儿配方乳粉（含益生菌）	30-300 g	BPW (ISO) + 10 mg/L 万古霉素 (1:10)	37	22-24	20 µL	无

1. 如果培养肉汤量大于 300 mL（如样品大于 30g），使用预热 BPW (ISO)。
2. 在从储存处取出培养肉汤后，从裂解部分的步骤 1 重新开始检测。在从储存处取出样品裂解液后，从裂解部分的步骤 7 重新开始检测。
3. 参阅附录 A，了解如何重新检测储存的热处理后裂解液。

Neogen® 分子检测快速装载托盘的准备工作

1. 将一块干布或一次性纸巾用 1 - 5 %（与水的比例为 v:v）家用漂白溶液浸湿，用来擦拭 Neogen 分子检测快速装载托盘。
2. 用清水清洗 Neogen 分子检测快速装载托盘。
3. 使用一次性纸巾擦干 Neogen 分子检测快速装载托盘。
4. 使用前确保 Neogen 分子检测快速装载托盘是干燥的。

本流程需使用两个 Neogen 加热/冷却插块，两个插块是相同的产品 (700000145)，但用途不同：

为了在流程中更清晰起见，用于加热步骤的插块称为分子检测加热插块，用于冷却步骤的插块则称为分子检测冷却块插块。这些名称仅为区分功能，并非不同产品。

Neogen® 分子检测冷却插块的准备工作

将Neogen分子检测冷却插块直接放置在实验室工作台上。请在实验室环境温度 (20-25°C) 下使用该冷却插块。

Neogen® 分子检测加热插块的准备工作

将 Neogen 分子检测加热插块放入双干燥块加热器中。开启干燥模块加热装置并设定温度，使 Neogen 分子检测加热插块达到并保持 100 ±1°C。

注意：根据不同的加热器，允许 Neogen 分子检测加热插块使用约 30 分钟来达到工作温度。使用指定位置中的正确的经过校准的温度计（如局浸温度计或热电偶数字温度计，而非全浸温度计）检验 Neogen 分子检测加热模块温度是否达到 100 ±1°C。

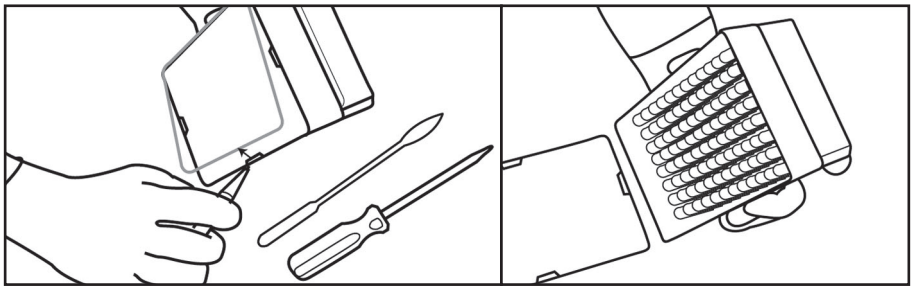
Neogen® 分子检测仪器的准备工作

1. 启动 Neogen® 分子检测软件并登录。联络您的 Neogen 食品安全代表，确保拥有最新版软件。
2. 打开 Neogen 分子检测仪器。
3. 为每个样品创建或编辑一次运行检测。请参考 Neogen 分子检测系统用户手册了解详细信息。

注意：插入带反应管的 Neogen 分子检测快速装载托盘前，Neogen 分子检测仪器必须达到就绪状态。此加热步骤大概需要 20 分钟，由仪器状态栏中的一个橙色灯进行指示。当仪器准备好启动检测时，状态栏将变为绿色。

裂解

置于 Neogen 分子检测加热插块中之前，用螺丝刀移除 Neogen 裂解溶液管架的底部。



1. 将管架置于室温 (20-25°C) 一整夜（16-18 小时），让 Neogen 裂解溶液管预热。使 Neogen 裂解溶液管平衡到室温的另一种方法是将 Neogen 裂解溶液管放在实验室工作台上至少 2 小时、在 37 ±1°C 培养设备中培养 Neogen 裂解溶液管 1 小时或将其置于双干燥块加热器，在 100 ± 1°C 下持续 30 秒。
2. 倒置封闭后的裂解液管进行混合。在倒置后 4 小时内继续下一步。
3. 将富集样本从培养箱中取出。
4. 每个样品和每个 NC 样品（无菌增菌培养基）需要一根 Neogen 裂解溶液管。
   - 4.1 可以将 Neogen 裂解溶液管条切割为需要管数。选择单个 Neogen 裂解溶液管的数量或需要的 8 管条。将 Neogen 裂解溶液管放在空管架中。
   - 4.2 为了避免交叉污染，请一次只开一根 Neogen 裂解溶液管条的盖，并且每次转移时使用新的移液器吸头。
   - 4.3 按如下所述将经过增菌的样本转移到 Neogen 裂解溶液管：

     首先将每个经过增菌的样品转移到单个 Neogen 裂解溶液管。**最后**转移 NC。

4.4 使用 Neogen® 分子检测开盖器 - 打开 Neogen 裂解溶液管条的盖，一次只打开一条。

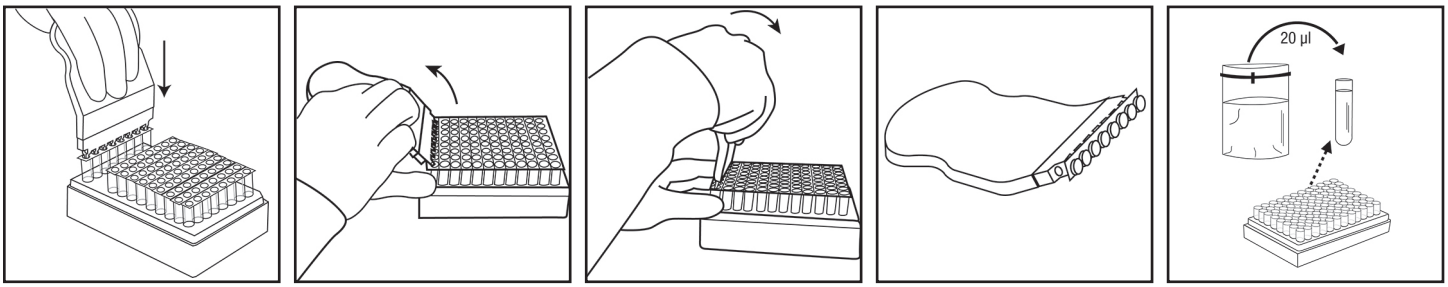
4.5 弃置 Neogen 裂解溶液管盖 – 如果保留裂解液以重新检测，请将管盖放入清洁容器，以备裂解后重新使用。

4.5.1. 如需处理保留的裂解液，请参阅附录 A。

4.6 在处理黏性样品时，搅动增菌袋，然后从过滤一侧收集样品。

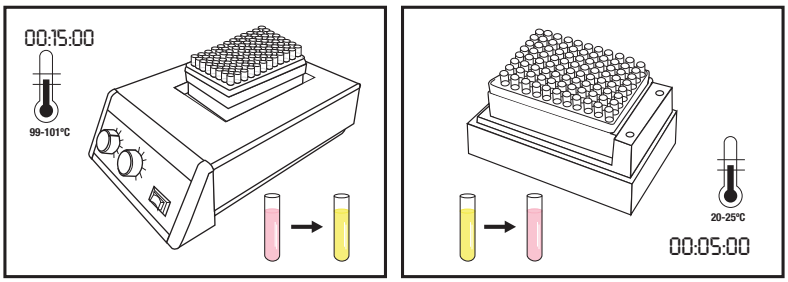
4.7 将 20 µL 样品转移到 Neogen 裂解溶液管内，除非方案表中另有说明。

5. 重复步骤 4.4 到 4.7，直到将每个样品添加到条内对应的 Neogen 裂解溶液管为止。



6. 当转移完所有样品时，将 20 µL 的 NC（无菌增菌培养基，如 BPW）转移到一个 Neogen 裂解溶液管中。请勿将水用作 NC。
7. 检验 Neogen 分子检测加热插块的温度是否达到了 100 ± 1°C。
8. 加热步骤：将未加盖的 Neogen 裂解液试管架放入 Neogen 分子检测加热插块中，加热 15 ± 1 分钟。加热期间，Neogen 裂解溶液将从粉红（冷）变为黄色（热）。

   未在分析裂解步骤中经过适当热处理的样品可以被视为潜在的生物危害，不应将其插入 Neogen 分子检测仪器。
9. 冷却步骤：将未加盖的 Neogen 裂解液试管架从 Neogen 分子检测加热插块中取出，并在 Neogen 分子检测冷却插块中冷却至少 5 分钟，最多不超过 10 分钟。在环境温度下使用的 Neogen 分子检测冷却插块（不配合 Neogen® 分子检测冷却托盘使用）应直接放置在实验室工作台上。冷却过程中，Neogen 裂解溶液会恢复为粉红色。
10. 从 Neogen 分子检测冷却插块上移除 Neogen 裂解溶液管架。



扩增

1. 每个样品和每个NC 需要一根 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*试剂管。

   1.1 可以将管条切割为需要的管数。选择需要的单个 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*试剂管或 8 管条的数量。

   1.2 将 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*试剂管放在空管架中。

   1.3 请勿将试剂小球搅离管底。
2. 选择 1 根 Neogen 试剂对照管并放入管架。
3. 为了避免交叉污染，请一次只开一根 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*试剂管条的盖，并且每次转移时使用新的移液器吸头。
4. 按如下所述将每个裂解液转移到 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*试剂管和 Neogen 试剂对照管：

   先将每个样品裂解液转移到单个 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*试剂管，**然后**转移到 NC。水化，**最后**转移到 Neogen 试剂对照管。
5. 使用 Neogen® 分子检测开盖器 - Reagent 打开 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*试剂管的盖，一次只打开一条。

丢弃盖子。

5.1 **将 Neogen 裂解溶液管液体上部 1/2 中的 20 µL 样品裂解液（避免沉淀）转移到对应的 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*试剂管。成角度注入，以避免搅动小球。轻轻地上下吸动 5 次，以充分混合。**

5.2 重复步骤 5.1，直到将单个样品裂解液添加到条内对应的 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*试剂管为止。

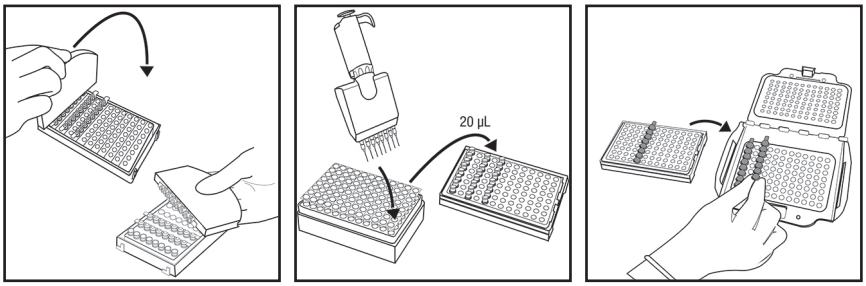
5.3 使用附加盖盖住 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*试剂管并使用 Neogen 分子检测开盖器 - Reagent 较圆的一侧以前后移动的方式加压，以确保将盖子盖紧。

5.4 根据需要对要进行检测的样品，重复步骤 5.1 到 5.3。

5.5 当转移完所有样品裂解液时，重复 5.1 到 5.3 以将 20 µL NC 裂解液转移到 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*试剂管。

5.6 将 **20 µL NC 裂解液转移至 Neogen 试剂对照管**。成角度注入，以避免搅动小球。轻轻地上下吸动 5 次，以充分混合。

6. 将加盖的管 装进干净和经过灭菌的 Neogen 分子检测快速装载托盘。关闭并锁定 Neogen 分子检测快速装载托盘盖。



7. 在 Neogen 分子检测系统软件中查看已配置的运行并确认。
8. 在软件中单击“启动”按钮并选择使用的仪器。所选仪器的盖会自动打开。
9. 将 Neogen 分子检测快速装载托盘放入 Neogen 分子检测仪器并关闭盖，以启动分析。结果将在 60 分钟之内提供，但阳性结果可以更快检测到。
10. 检测完成后，从 Neogen 分子检测仪器中取出 Neogen 分子检测快速装载托盘，并将试管浸泡在 1 - 5 %（v:v，水溶液）的含氯家用漂白剂溶液中处理 1 小时，处理地点应远离检测准备区。

注意：为了将因为交叉污染而导致的假阳性结果风险降至最低，请勿打开包含扩增的 DNA 的反应管。这包括 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*试剂、Neogen 试剂对照和 Neogen 基质对照管。密封的试剂管应始终通过浸泡在 1 - 5 %（v:v，水溶液）的含氯家用漂白剂溶液中处理 1 小时，且处理地点应远离检测准备区。

结果和说明

一种解释来自核酸扩增检测的光输出曲线的算法。软件会自动分析结果并根据不同结果用不同颜色标记。通过分析一系列独一无二的曲线参数可以确定阳性结果或阴性结果。实时报告假定阳性结果，阴性结果和检查结果将在检测完成之后显示。

推定阳性增菌液应按照实验室标准操作规程或通过适当的参考方法确认 [1, 2] 进行确认，从初级增菌液（BPW ISO 或添加了 10 mg/L 万古霉素的 BPW ISO）转接至次级增菌肉汤开始，然后进行后续划线接种，并使用适当的生化、血清学和/或分子方法分离和确认菌株。

注意：因为系统和 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *阪崎肠杆菌*扩增试剂带有“背景”相对光单位 (RLU) 读数，即使阴性样品也不会给出零读数。

在极少数出现异常光输出的情况下，算法会将其标记为“Inspect”（检查）。Neogen 建议用户对任何“Inspect”样品重复检测。如果结果仍为“Inspect”，则使用您首选的方法或按照当地法规规定的方法进行确认试验 [1, 2]。

表 6.各种软件结果的符号和信息。

孔类型	孔结果符号	结果	解读
样品		阳性	该样品为目标致病菌推定阳性。
样品		阴性	样品对目标致病菌呈阴性。
样品		受抑制*	样品基质对检测产生了抑制作用。可能需要进行再测试。
样品		检查	尚不确定是否存在目标致病菌。可能需要进行再测试。
样品		错误*	未检测到生物发光。可能需要进行再测试。

*有关结果的更多详细信息，请参阅运行报告。如果需要，请联系您当地的 Neogen 代表，寻求故障排除协助。

游离 DNA 去除操作说明
备注：游离 DNA 去除未作为 NF 验证研究的一部分进行评估。

1. **PMAxx**
   a. 将 45 µL 分子生物学级水（MGW）转移至微量管中。
   b. 将 5 µL PMAxx™ 染料（20 mM）直接分装到含有 45 µL MGW 的微量管中。通过反复吹吸轻轻混合。

备注：该溶液可冷藏避光保存，最长 1 小时。

   c. 将 400 µL 增菌样品转移至微量离心管中。
   d. 在弱光条件下，向样品分装液中加入 5 µL PMAxx 溶液。
   e. 将微量管放在旋转混匀器上，避光旋转 10 分钟。
   f. 将经 PMAxx 处理的试管放入 PMA - Lite™ 仪器中处理 10 分钟。
   g. 涡旋每支试管 3 秒，然后将试管放回 PMA - Lite 中再处理 10 分钟。
   h. 将 20 µL 经 PMAxx 处理的样品转移至 Neogen 裂解液试管中，继续进行裂解步骤。

2. **Cronobacter 选择性肉汤（CSB）**
   a. 将 0.1 mL 初级增菌液转移至 10 mL CSB 中。
   b. 在 41.5 ± 1 °C 下培养 24 ± 2 小时。
   c. 培养后，继续进行裂解步骤。

根据经 NF VALIDATION 认证的方法确认结果

在 NF VALIDATION 的框架下，所有经 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *Cronobacter* 鉴定为阳性的样品必须通过以下测试之一进行确认。确认必须从培养结束后 72 小时内储存在 + 2 °C 至 + 8 °C 的增菌肉汤中进行。

选项 1：使用 ISO 22964:2017[2] 标准，从 BPW ISO 增菌开始。

- 转接至 CSB（1/10 稀释），在 41.5 °C ± 1 °C 下培养 24 小时 ± 2 小时
- 划线接种至 CCI 琼脂，在 41.5 °C ± 1 °C 下培养 24 小时 ± 2 小时
- 将最多五个典型菌落划线接种至非选择性琼脂平板上，在 37 °C ± 1 °C 下培养 21 小时 ± 3 小时
- 进行适当的生化确认试验（氧化酶试验和生化鉴定板条）

选项 2：可按照 ISO 7218:2024[4]使用核酸探针法，对从选择性培养基（见选项 1）分离得到的菌落进行检测。根据 ISO 7218:2024 规则，分子筛查测定可通过使用不同引物和/或探针靶向不同基因区域的第二项分子测定进行确认。确认方法应根据适当的 ISO 16140 标准进行验证，并使用经评估的方案和材料进行菌落确认。

选项 3：使用经 NF VALIDATION 认证的任何其他方法，其原理必须与 Neogen 分子检测试剂盒 2 – *Cronobacter* 不同。必须使用为该第二种验证方法描述的完整方案。确认开始之前的所有步骤必须对这两种方法通用。

若结果不一致（Neogen 分子检测试剂盒 2 – *Cronobacter* 检测为推定阳性，但上述方法之一未能确认），实验室应遵循其既定的标准操作规程来报告结果。

如果您对特定应用或程序有疑问，请访问我们的网站 neogen.com 或联系您当地的 Neogen 代表或经销商。

附录 A. 方案中断：储存并重新检测热处理后的裂解液

1. 如需储存热处理后的裂解液，用干净盖子为裂解管重新盖上盖子（请参阅 4.5：“**裂解**”）
2. 在 2 至 8°C 下存放 72 小时。
3. 倒置 2-3 次进行混合，借此准备用以扩增的储存样品。
4. 打开管盖。
5. 将混合后的裂解液管置于 Neogen 分子检测加热插块并在 100 ± 1°C 温度下加热 5 ± 1 分钟。
6. 从加热块中取出 Neogen 裂解溶液管架，将其放进 Neogen 分子检测冷却插块冷却最短 5 分钟，最长 10 分钟。
7. 继续执行上文详述的“**扩增**”部分的方案。

参考资料：

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO 7218:2024. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
5. CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMLB) 6th Edition. Effective Date: 29 August 2025
6. ISO 24914:2026 Microbiology of the food chain — Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of microorganisms and associated genetic markers — General requirements and definitions. International Standard Organization (ISO), Geneva, Switzerland. www.iso.org
7. ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain — Method validation Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory
8. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
9. ISO 6887-5:2020. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
10. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
11. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

Refer to the current versions of the standard methods listed above.

符号说明

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
Auchincruive House
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation, 620 Lesher Place, Lansing, MI 48912 USA.
© Neogen Corporation 2026. 保留所有权利。Neogen 是 Neogen Corporation 的注册商标。
所有其他品牌和产品名称是其各自公司的商标或注册商标。专利：neogen.com/patents
FS00879B_0826

發行日期：2026-07

產品說明書

二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*

產品說明和預期用途

Neogen® 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*與 Neogen® 分子檢測系統搭配使用，可用於快速、特異性地檢測增菌後的食品和食品加工環境樣本中的*克羅諾桿菌*。

Neogen 分子檢測分析使用環介導等溫擴增技術，憑藉高特異性和敏感度，快速擴增核酸序列，並結合生物發光技術檢測擴增結果。即時報告推定陽性結果，而陰性結果將在分析完成後顯示。推定陽性結果應依照您偏好的方法或依當地法規[1、2]進行確認。

Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*設計用於實驗室環境，供受過實驗室技術訓練的專業人員使用。Neogen 尚未記錄此產品在食品或飲料以外產業的使用情況。例如，Neogen 尚未記錄此產品用於測試藥品、化妝品、臨床或獸醫樣本。Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*尚未評估所有可能的食品、食品製程、測試規程或所有可能的細菌菌株。

如同所有測試方法，增菌培養基的來源、配方及品質會影響結果。取樣方法、測試規程、樣本製備 (含均質與混合)、處理及實驗室技術等因素也可能影響結果。Neogen 建議評估包括增菌培養基等方法，在使用者環境中，使用足夠樣本及特定食品及/或環境樣本及微生物挑戰，以確保方法符合使用者的標準。

Neogen 已評估 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*，並使用蛋白胨緩衝液 (BPW) ISO 做為增殖肉湯培養液。

Neogen® 分子檢測儀器設計用於在檢測裂解步驟中經過熱處理的樣本，該步驟可破壞樣本中的微生物。在檢測裂解步驟中未經適當熱處理的樣本可能被視為潛在的生物危害，不應插入 Neogen 分子檢測儀器中。

Neogen 食品安全部門已通過 ISO (國際標準化組織) 9001 設計和製造認證。

Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*測試套組包含 96 個測試，如表 1 所述。

表 1. Neogen 分子檢測分析套組元件

項目	標識	數量	內容物	備註
Neogen® 裂解液 (LS)	透明管中的粉紅色溶液	96 支 (12 條，每條 8 管)	每管 580 µL LS	已架設好，即可使用
Neogen® 二代分子檢測分析 - *克羅諾桿菌*試劑管	橙紅色管	96 支 (12 條，每條 8 管)	凍乾特異性擴增和檢測混合物	即可使用
備用蓋	橙紅色蓋	96 個 (12 條，每條 8 蓋)		即可使用
Neogen® 試劑對照 (RC)	透明翻蓋管	16 支 (2 包，每包 8 支單管)	凍乾對照 DNA、擴增和檢測混合物	即可使用

套組中未提供的陰性對照組是無菌增菌培養基，例如 BPW ISO。請勿用水做為陰性對照組。

安全

使用者應閱讀、理解並遵循 Neogen 分子檢測系統和 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*說明中的所有安全資訊。請保留安全說明以供日後參考。

⚠**警告：** 表示危險情況，如果不加以避免，可能導致死亡或嚴重傷害和/或財產損失。

注意： 表示潛在危險情況，若不避免，可能導致財產損失。

⚠警告

請勿使用 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*診斷人類或動物的病況。

使用者必須給予相關人員執行目前適當測試技術的訓練：例如，優良實驗室操作[3]，或美國疾病管制與預防中心微生物與生物醫學實驗室生物安全 (BMBL)[5]。

為了降低與假陰性結果關聯的風險，避免釋放出污染產品：

- 請依照產品說明書中所述的規程執行檢測。
- 儲存 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*，詳情如包裝和產品說明書所示。
- 務必在有效期限前使用 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*。
- 使用 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*，處理經內部或第三方確效的食品及食品加工環境樣本。
- Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*只能用來處理經過內部或第三方確效的表面、消毒劑、方案及菌株。
- 如果是芳基磺酸鹽複合物成分中和緩衝液 (NB) 的環境樣本，測試前需進行 1：2 稀釋 (1 份樣本加入 1 份無菌增菌肉湯培養液)。另一選項是將 10 µL 的 NB 增菌培養液轉移到 Neogen 裂解液管中。Neogen®採樣產品，包含芳基磺酸鹽複合物成分的中和緩衝液：700002040 | RS96010NB、700002011 | RS9604NB 700002003 | SSL10NB、700002004 | SSL10NB2G、700002213 | HS10NB 以及 700002002 | HS10NB2G。此規程尚未經過 NF 確效研究測試。

為降低與化學品和生物危害物接觸相關的風險：

- 在適當配備的實驗室中，由受過訓練的人員進行致病菌測試。培養過的增菌培養基，以及接觸過培養過增菌培養基的設備或表面，可能含有足以對人體健康造成風險的致病菌。
- 在處理試劑和受污染的樣本時，請務必遵守標準的實驗室安全實踐，包括穿戴適當的防護衣和護目鏡。
- 擴增後避免接觸增菌培養基及試劑管中的內容物。
- 廢棄處理增菌樣本及相關污染廢棄物時必須遵守最新當地、區域及國家法規。
- 在檢測裂解步驟中未經適當熱處理的樣本可能被視為潛在的生物危害，不應插入 Neogen 分子檢測儀器中。

為降低準備檢測時交叉污染相關的風險：

- 務必戴手套 (保護使用者並防止核酸酶的引入)。

為降低環境污染相關的風險：

- 請遵守地方、區域及國家法規的廢棄物處理規定。

為降低接觸高溫液體相關的風險：

- 不要超過加熱器建議的溫度設定。
- 不要超過建議的加熱時間。
- 使用適當且經校準的溫度計來驗證 Neogen® 分子檢測加熱板插入件溫度 (例如，使用部分浸入式溫度計或數位熱電偶溫度計，而非全浸入式溫度計)。溫度計必須放置在 Neogen 分子檢測加熱板插入件的指定位置。

注意

為降低準備檢測時交叉污染相關的風險：

- 在試劑小球水化之前更換手套。
- 建議使用無菌、氣溶膠屏障 (帶濾芯)、分子生物學等級的移液吸頭。
- 每次轉移樣本時使用新的移液吸頭。
- 使用優良實驗室操作，從增菌培養基轉移樣本至裂解管。若要避免移液管污染，使用者可選擇加入中間轉移步驟。例如，使用者可以將每個增菌樣本轉移到無菌管中。
- 在可能的情況下，使用配備殺菌燈的分子生物學工作台。
- 定期使用 1–5% (體積比，水溶) 含氯家用漂白水溶液 (含次氯酸鈉) 或 DNA 去除溶液對實驗室工作台和設備 (移液器、開/關蓋工具、試劑管架等) 進行清潔。

為降低假陽性結果相關的風險：

- 切勿開啟擴增後的試劑管。
- 務必將受污染的試管浸泡在 1–5% (體積比，水溶) 家用漂白水溶液中 1 小時後處置，且應遠離分析準備區。
- 切勿對擴增後的試劑管進行高壓滅菌。
- 如果懷疑樣本中含有高濃度的*克羅諾桿菌*游離 DNA (例如，已經過殺滅/滅活處理的非活體*克羅諾桿菌*細胞之 DNA)，則推定陽性的增殖菌液應先進行 DNA 去除程序 (例如，DNase） 或 PMAxx 處理，再進行**裂解**步驟。聯絡您的 Neogen 代表以獲得其他說明。NF 確效研究期間未評估游離 DNA 移除。

請參閱安全資料表以獲取額外資訊以及當地廢棄物法規。

如果您對特定應用或程序有疑問，請造訪我們的網站 neogen.com 或聯繫您當地的 Neogen 代表或經銷商。

使用者責任

使用者有責任熟悉產品說明書和資訊。造訪我們的網站 **neogen.com**，或聯繫您當地的 Neogen 代表或經銷商以獲得詳細資訊。

選取測試方法時，必須認知到取樣方法、測試規程、樣本製備 (含均質與混合)、處理、實驗室技術和樣本身等外部因素可能會影響結果。

使用者在選擇任何測試方法或產品時，有責任評估足夠數量具適當基質和微生物挑戰性的樣品，以確保所選擇的測試方法符合使用者的標準。

使用者也有責任確定任何測試方法和結果符合其客戶和供應商的要求。

如同任何測試方法，使用任何 Neogen 食品安全產品所得到的結果並不能保證受測基質或程序的品質。

為了協助客戶在導入過程中評估本方法的適用性，Neogen 開發了 Neogen 分子檢測基質對照 (ISO 24914:2026[6] 中也稱為擴增對照)。在確效與驗證期間，請使用基質對照 (MDMC96) 評估基質干擾對於 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*檢測結果的影響。遵循 ISO 16140-3:2021[7] 標準及/或貴單位的品質保證計畫，以決定驗證方法效能及定義其在實驗室應用範圍時所需的代表性樣本數量。一旦方法驗證完成且實驗室應用範圍確立後，即無需於例行檢測中持續使用 Neogen 分子檢測基質對照。請依據貴單位的品質保證計畫，視個別情況決定是否需要使用 Neogen 分子檢測基質對照及其在例行檢測中的使用頻率。

基質可被定義為一種具有成分與製程等固有特性的產品。基質之間的差異，可能僅僅是因其加工方式或呈現狀態不同所造成的影響，例如：生鮮與殺菌、新鮮與乾燥等。

保證限制/有限補救措施

除個別產品包裝的有限保固部分明確說明外，NEOGEN 否認所有明示和暗示的保固，包括但不限於任何適銷性或特定用途適用性的保固。如果任何 Neogen 食品安全產品有缺陷，Neogen 或其授權經銷商將自行選擇更換產品或退還購買價格。這些是您的專屬補救措施。您必須在發現任何疑似產品缺陷後六十天內立即通知 Neogen 並將產品退回 Neogen。如有任何進一步問題，請聯繫您的 Neogen 代表或授權 Neogen 經銷商。

如需 Neogen 的完整條款與條件，請造訪：https://neogen.com/en/terms-and-conditions/

Neogen 責任限制

NEOGEN 不對任何損失或損害負責，無論是直接、間接、特殊、附帶或衍生性損害，包括但不限於利潤損失。在任何情況下，Neogen 在任何法律理論下的責任均不得超過受指稱有缺陷產品的購買價格。

儲存和處置

將 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*儲存於 2-8°C。請勿冷凍。儲存時避光。打開套組後，檢查鋁箔袋是否完好無損。如果鋁箔袋損壞，請勿使用。開啟後，未使用的試劑管應始終儲存在可重封的袋中，內含乾燥劑以維持凍乾試劑的穩定性。重封的袋子可在 2-8°C 儲存不超過 60 天。

請勿使用過期的 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*。有效期限和批號標註在外箱標籤上。使用之後，增菌培養基及 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*管內可能含有病原性物質。完成測試後，請遵循當地、區域及國家法規處置受污染的廢棄物。請參閱安全資料表以獲取額外資訊以及當地廢棄物法規。

使用說明

請仔細遵循所有說明。未能遵循可能導致不準確的結果。

定期使用 1–5% (體積比，水溶) 含氯家用漂白水溶液或 DNA 去除溶液對實驗室工作台和設備 (移液器、開/關蓋工具、試劑管架等) 進行清潔。

使用者應完成 Neogen 分子檢測系統操作人員資格 (OQ) 訓練，如「Neogen 分子檢測系統安裝驗證 (IQ)/操作驗證 (OQ) 規程和說明」文件[8]所述。

請參閱「具體的經確效方法說明」一節以了解特定需求：

表 3 及表 4，依據 AOAC® *官方分析方法*℠ 2018.01 及 *Performance Tested*℠ 證書編號 101703 的增菌方案

表 5，依據 NF 確效證書 3M 01/20-03/18 的增菌方案

樣本增菌

表 2、3、4 或 5 提供了食品及環境樣本增菌方案的指引。

使用者有責任確效替代取樣或增殖規程或稀釋比例，以確保此測試方法符合使用者標準。

食物、環境粉末、灰塵、掃集樣品與海綿

1. 平衡增菌培養基至環境溫度 (20-25°C)，除非增菌方案另有說明 (詳見表 2、3、4 或 5)。
2. 無菌混合增菌培養基，並透過攪拌、均質機、渦旋或手工混合，進行 2 ± 0.2 分鐘，**或，直到所有團塊完全溶解，且增菌懸浮液徹底均勻化** [9、10]。
   a. 樣本製備 (包括均質化與混合)、處理及實驗室技術等因素都可能影響結果。
   b. 如果是高顆粒樣本，建議使用濾袋。
   c. 如果是在水中膨脹且黏度高的基質 (例如穀物、澱粉)，建議進一步稀釋 (> 1：10)，直到黏度適當降低，或向 BPW 加入無菌 1% (w/v) α-澱粉酶 (ISO)[10]。
   d. 如果穀物樣本量大，則將粉末狀穀物慢慢加入液體，並頻繁混合，以避免結塊。
3. 依照適當方案表 (詳見表 2、3、4 或 5) 進行培養。

表 2. 一般增菌方案

樣本基質	樣本大小[1]	增菌肉湯培養液體積[1、2]	增菌溫度 (±1°C)	增菌時間 (小時)	樣本分析體積
嬰兒配方奶粉 (PIF) 及原料，例如乾奶粉、大豆粉、乳清粉、乳糖、米粉和麥芽糊精	1X 克樣本	9X mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
原料如鹽類、礦物質、胺基酸、DHA (二十二碳六烯酸) 及維生素	1X 克樣本	99X mL BPW (ISO) (1:100)	37	18-24	20 µL
乾燥的環境樣本，如塵埃、清掃、吸塵器採樣	1X 克樣本	9X mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
環境採樣海綿，搭配 10 mL Letheen 肉湯培養液或 D/E 中和肉湯培養液	1 台取樣裝置	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL

1. Neogen 已評估過 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*，使用表 2 的稀釋比例，最多 300g，但含有及不含益生菌的嬰兒配方奶粉除外，其評估量最多 400 g。使用者有責任確效替代稀釋比例或規程，以確保此方法符合使用者標準。
2. 如果增菌肉湯培養液體積超過 (>) 300 mL (例如，樣本 > 30 g)，則使用**預熱** BPW (ISO)。

具體的驗證方法說明

AOAC® *官方分析方法℠* (OMA) 2018.01

AOAC® *Performance Tested℠* (PTM) 證書 #101703

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

在 AOAC 研究所 OMA℠ 與 PTM℠ 研究中，發現 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*是檢測克羅諾桿菌的有效方法。在研究中測試的基質如表 3 和表 4 所示。

依照表 3 和表 4，透過攪拌、均質機、渦旋或手工混合，徹底均質化，製備樣本，2 ± 0.2 分鐘，直到所有團塊完全溶解，且增菌懸浮液均勻混合[9、10]。

表 3. 增菌方案，根據 AOAC® *OMA*℠ 2018.01 和 *PTM*℠ 101703

樣本基質	樣本大小	增菌肉湯培養液體積	增菌溫度 (± 1°C)	增菌時間 (小時)	樣本分析體積
含益生菌的嬰兒配方奶粉	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
	300 g	2700 mL BPW (ISO) + 10 mg/L Vancomycin)[b]	預熱 37	22-24	20 µL
不含益生菌的嬰兒穀物粉	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
	300 g	2700 mL BPW (ISO) (1:10)	預熱 37	18-24	20 µL
乳糖粉	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
不鏽鋼 (4” x 4”)[c]	1 個採樣海綿	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL

[a] 如果增菌肉湯培養液體積 > 300 mL，使用**預熱 BPW (ISO)**。

[b] 最終濃度

[c] 環境採樣海綿，使用 10 mL 的 D/E 中和肉湯培養液預先濕潤。

表 4. 增菌方案，根據 AOAC® *PTM*℠ 101703

樣本基質	樣本大小	增菌肉湯培養液體積[a]	增菌溫度 (± 1°C)	增菌時間 (小時)	樣本分析體積
含益生菌的嬰兒配方奶粉	400[a] g	3600 mL BPW (ISO) + 10 mg/L Vancomycin)	預熱 37	22-24	20 µL
不含益生菌的嬰兒配方奶粉	400[a] g	3600 mL BPW (ISO) (1:10)	預熱 37	22-24	20 µL

[a]AOAC PTM 核准的基質，配合使用游離 DNA 移除步驟。

參閱游離 DNA 移除說明以了解詳細資料

NF 確效由 AFNOR 認證

3M 01/20-03/18
農業產品的替代分析方法
http://nf-validation.afnor.org/en
如需關於有效期結束的詳細資訊，請參閱上述網站提供可用的 NF 確效證書。

NF 確效認證方法符合 ISO 16140-2:2016(11)，經比較 ISO 22964:2017(2) 結果。

確效的範圍：嬰兒配方奶粉與嬰兒穀物粉 (含益生菌及不含益生菌)、原料及環境樣本。

樣本製備：樣本製備依據為 EN ISO 22694:2017[2] 和 EN ISO 6887[9、10]。

軟體版本：參閱證書。

表 5.根據 NF 確效認證方法的增菌方案 3M 01/20-03/18

樣本基質	樣本大小	增菌肉湯培養液體積[1]	增菌溫度 (±1 °C)	增菌時間 (小時)	樣本分析體積	建議中斷點[2、3]
• 嬰兒配方奶粉 • 嬰兒穀物粉 • 成分包括乾奶粉、大豆粉、乳清粉、乳糖、米粉、麥芽糊精 • 乾燥的環境樣本，如塵埃、清掃、吸塵器採樣	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL	增菌肉湯培養液或樣本裂解液可在 2-8°C 下儲存長達 72 小時
• 海綿、清水沖洗、濕巾	1 台取樣裝置或 10 mL					增菌肉湯培養液或樣本裂解液可在 2-8°C 下儲存長達 72 小時
嬰兒配方奶粉與嬰兒穀物粉 (不含益生菌)	30-300 g	BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL	增菌肉湯培養液或樣本裂解液可在 2-8°C 下儲存長達 72 小時
嬰兒穀物粉和嬰兒配方奶粉 (含益生菌)	30-300 g	BPW (ISO) + 10 mg/L vancomycin (1:10)	37	22-24	20 µL	無

1. 如果增菌肉湯培養液體積超過 (>) 300 mL (例如，樣本 > 30 g)，則使用預熱 BPW (ISO)。
2. 將增菌肉湯培養液從儲存處取出後，繼續從裂解部分的步驟 1 進行測試。將樣本裂解液從儲存處取出後，繼續從裂解區的步驟 7 進行測試。
3. 請參閱附錄 A，以獲得儲存熱處理裂解物重新測試的說明。

Neogen® 分子檢測快速裝載托盤準備

1. 使用浸潤 1-5% (體積比，水溶) 家用漂白水溶液的布或拋棄式濕巾擦拭 Neogen 分子檢測快速裝載托盤。
2. 用水沖洗 Neogen 分子檢測快速裝載托盤。
3. 使用拋棄式濕巾擦乾 Neogen 分子檢測快速裝載托盤。
4. 使用前確保 Neogen 分子檢測快速裝載托盤乾燥。

本程序需要兩個 Neogen 分子檢測加熱模塊/冷卻模塊。兩種模塊都屬於同一款產品 (700000145)，但用途不同。

為使操作步驟的說明更清晰，加熱步驟所使用的加熱塊將稱為「分子檢測加熱模塊」，而冷卻步驟所使用的冷卻塊將稱為「分子檢測冷卻模塊」。這些名稱僅用來區分其功能角色，而不是指不同產品。

Neogen® 分子檢測冷卻模塊準備

將 Neogen 分子檢測冷卻模塊直接放在實驗室工作台上。在實驗室環境溫度 (20-25°C) 下使用該冷卻模塊。

Neogen® 分子檢測加熱模塊準備

將 Neogen 分子檢測加熱塊放入乾式雙加熱器中。開啟乾式加熱器並設定溫度，使 Neogen 分子檢測加熱模塊達到並維持 100 ± 1°C。

註：根據加熱器型號，Neogen 分子檢測加熱模塊需約 30 分鐘達到溫度。使用適當且經校準的溫度計 (如部分浸入式溫度計、數位熱電偶溫度計，而非全浸入式溫度計) 放置在指定位置，確認 Neogen 分子檢測加熱模塊溫度為 100 ± 1°C。

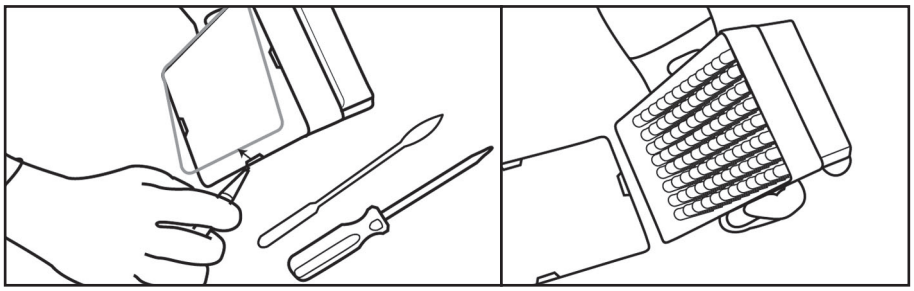
Neogen® 分子檢測儀器準備

1. 啟動 Neogen® 分子檢測軟體並登入。聯繫您的 Neogen 食品安全代表以確保您使用最新版本的軟體。
2. 開啟 Neogen 分子檢測儀器。
3. 建立或編輯每個樣本資料的執行。詳情請參閱 Neogen 分子檢測系統使用手冊。

註：在插入裝有反應管的 Neogen 分子檢測快速裝載托盤前，Neogen 分子檢測儀器必須達到「就緒」狀態。此加熱步驟約需 20 分鐘，儀器狀態欄會顯示橙色指示燈。當儀器準備好開始檢測時，狀態欄會變為綠色。

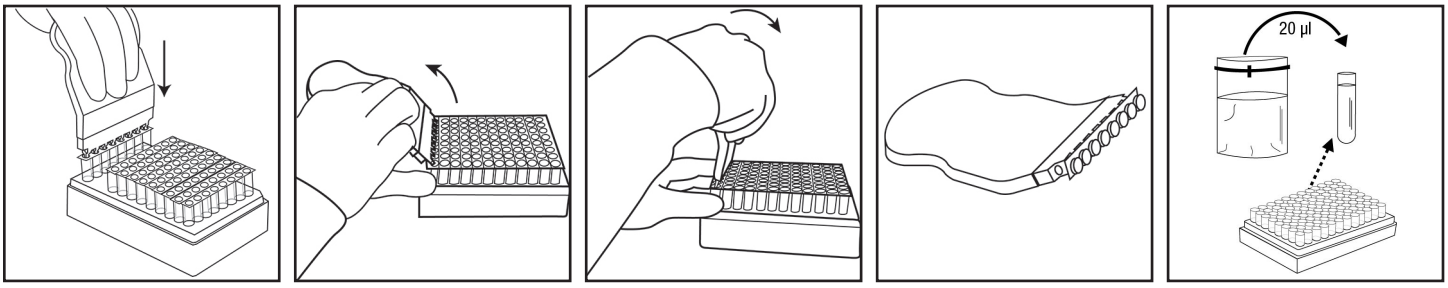
裂解

先用螺絲起子卸下 Neogen 裂解液架底部，再將其放入 Neogen 分子檢測加熱模塊。



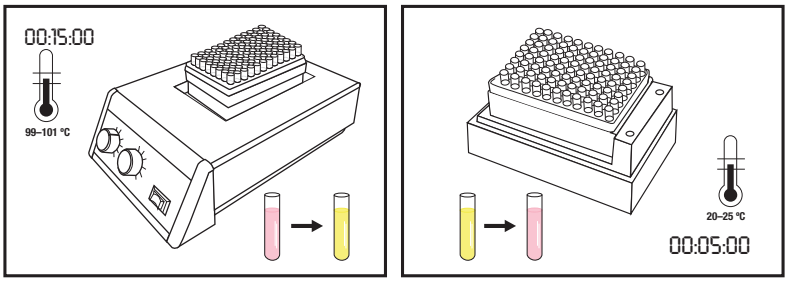
1. Neogen 裂解溶液管進行預熱，將管架放在常溫 (20-25°C) 過夜 (16-18 小時)。將 Neogen 裂解液管平衡至常溫的替代方案包括將 Neogen 裂解液管置於實驗室工作台上至少 2 小時，或將 Neogen 裂解液管置於 37 ± 1°C 的培養箱中培養 1 小時，或置於乾燥雙段加熱器中 30 秒，溫度為 100 ± 1°C。
2. 倒轉蓋住的管子進行混合。倒置後 4 小時內進行下一步。
3. 從培養箱中取出增菌樣本。
4. 每個樣本及 NC 樣本 (無菌增菌培養基) 均配備一支 Neogen 裂解液管。
   - 4.1 Neogen 裂解液管試劑條可裁切至所需數量。視需要選取單個Neogen 裂解液管或 8 管試劑條的數量。將 Neogen 裂解液管放入空管架中。
   - 4.2 為避免交叉污染，一次開蓋一支 Neogen 裂解液管試劑條，並且每次轉移步驟都使用新的移液吸頭。
   - 4.3 將增菌樣本轉移至 Neogen 裂解液管，如下所述：

     首先，將每個增菌樣本轉移到個別 Neogen 裂解液管。**最後，**轉移 NC。
   - 4.4 使用 Neogen® 分子檢測開/關蓋工具 - 裂解管開蓋器，將 Neogen 裂解液管試劑條開蓋，一次一條試劑條。
   - 4.5 丟棄 Neogen 裂解液管蓋：如果裂解液將保留以供重測，將蓋子放入乾淨容器中，以便裂解後再重新蓋上。
     - 4.5.1. 如需保留裂解液的處理，請參見附錄 A。
   - 4.6 處理黏稠樣本時，應在過濾面採集樣本前先搖晃增菌袋。
   - 4.7 將 20 µL 樣本轉移至 Neogen 裂解液管中，除非方案表另有指示。
5. 重複步驟 4.4 至 4.7，直到每個樣本都加入試劑條中對應的 Neogen 裂解液管。



6. 當所有樣本轉移完成之後，將 20 µL 的 NC (無菌增殖培養基，如 BPW) 轉移至 Neogen 裂解液管中。不要使用水作為 NC。
7. 確認 Neogen 分子檢測加熱板插入件的溫度為 100 ± 1°C。
8. 加熱步驟：將未加蓋的 Neogen 裂解液管架放入 Neogen 分子檢測加熱模塊中加熱 15 ± 1 分鐘。加熱過程中，Neogen 裂解液會從粉紅色 (冷) 變成黃色 (熱)。

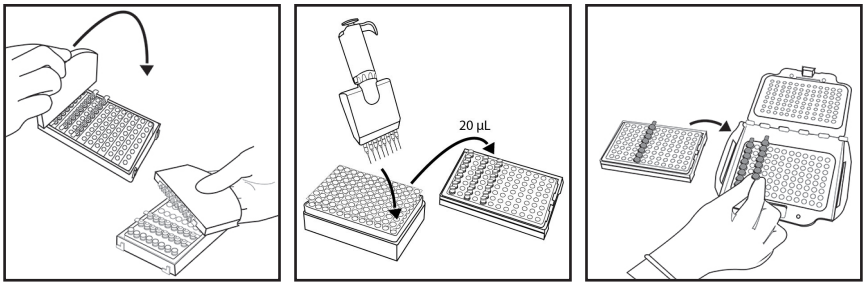
   在檢測裂解步驟中未經適當熱處理的樣本可能被視為潛在的生物危害，不應插入 Neogen 分子檢測儀器中。
9. 冷卻步驟：從 Neogen 分子檢測加熱模塊上取下未加蓋的 Neogen 裂解液管架，放入 Neogen 分子檢測冷卻模塊中冷卻至少 5 分鐘，最多 10 分鐘。Neogen 分子檢測冷卻模塊，若在常溫下使用，且不使用 Neogen® 分子冷卻模塊托盤，則應直接放置在實驗室工作台上。冷卻過程中，Neogen 裂解液將會恢復為粉紅色。
10. 從 Neogen 分子冷卻模塊上取下 Neogen 裂解液管架。



擴增

1. 每個樣本和 NC 各需要一個 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*試劑管。
   1.1 試劑管條可裁切成所需數量的管子。視需要選取個別 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*試劑管或 8 管試劑條數量。
   1.2 將 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*試劑管放入空架。
   1.3 請勿將試劑小球攪離管底。
2. 選取一支 Neogen 試劑對照管，並放入管架。
3. 為避免交叉污染，一次只取下一條 Neogen 分子檢測 2 – *克羅諾桿菌*試劑管條的蓋子，並且每次轉移步驟都使用新的移液吸頭。
4. 將個別裂解物轉移至 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*試劑管和 Neogen 試劑對照管，如下所述：

   首先將每個樣本裂解液轉移到單一 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*試劑管中，接著進行 NC。**最後，**水化 Neogen 試劑對照管。
5. 使用 Neogen® 分子檢測開/關蓋工具-試劑，將 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*試劑管，一次開啟一條試劑管條。丟棄蓋子。
   5.1 **將 20 µL 樣本裂解液從液體上半層 (避免沉澱物) 轉移至 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*試劑管中。以傾斜角度分注以避免擾動小球。輕輕上下吸打 5 次混合。**
   5.2 重複步驟 5.1，直到單一樣本裂解液加入對應的 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*試劑管中。
   5.3 使用提供的額外蓋子蓋住 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*試劑管，並使用 Neogen 分子檢測開/關蓋工具-試劑的圓面來回施加壓力，確保蓋子蓋緊。
   5.4 視需要，重複步驟 5.1 至 5.3，處理待測樣本數量。
   5.5 當所有樣本裂解液轉移完畢後，重複 5.1 至 5.3 步驟，將 20 µL NC 裂解液轉移至 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*試劑管中。
   5.6 將 **20 µL of NC 裂解液轉移至 Neogen 試劑對照管中**。以傾斜角度分注以避免擾動顆粒。輕輕上下吸打 5 次混合。
6. 將已蓋蓋的試管裝入清潔且已去污的 Neogen 分子檢測快速裝載托盤中。關閉並扣緊 Neogen 分子檢測快速裝載托盤蓋。



7. 檢查並確認 Neogen 分子檢測系統軟體中設定的檢測。
8. 按一下軟體中的 [開始] 按鈕並選取要使用的儀器。所選儀器的蓋子會自動開啟。
9. 將 Neogen 分子檢測快速裝載托盤放入 Neogen 分子檢測儀器中並關閉蓋子以開始檢測。結果將在 60 分鐘內提供，但陽性結果可能更早檢出。
10. 檢測完成後，從 Neogen 分子檢測儀器中取出 Neogen 分子檢測快速裝載托盤，將試管浸泡在 1–5% (體積比，水溶) 含氯家用漂白水溶液中 1 小時後處置，且應遠離分析準備區。

注意：為降低因交叉污染導致假陽性的風險，切勿開啟含有擴增 DNA 的試劑管。這點適用於 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*試劑、Neogen 試劑對照組及 Neogen 基質對照管。務必將密封的試劑管浸泡在 1–5% (體積比，水溶) 含氯家用漂白水溶液中 1 小時後棄置，且應遠離分析準備區。

結果與解讀

演算法會解讀核酸擴增檢測產生的光輸出曲線。結果由軟體自動分析並根據結果以顏色編碼。陽性或陰性結果是透過分析多個獨特的曲線參數來判定。推定的陽性結果即時報告，而陰性和檢查結果將在檢測完成後顯示。

推定的陽性增菌物應依實驗室標準作業程序確認，或依照適當的參考方法確認 (1、2)，一開始從初級增菌 (BPW ISO 或 BPW ISO 補充 10 mg/L Vancomycin) 轉移至次級增菌肉湯培養液，隨後進行分離菌株的劃線培養，並使用適當的生化、血清學和/或分子生物學方法進行確認。

註：即使是陰性樣本也不會顯示零讀數，因為系統和 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*擴增試劑具有「背景」相對光單位 (RLU) 讀數。

在極少數發生光輸出異常的情況下，演算法會將其標記為「檢查」。Neogen 建議使用者對任何「檢查」樣本重複檢測。如果結果持續為「檢查」，請依照您偏好的方法或當地法規進行確認測試。(1、2)

表 6. 各種軟體結果的符號與資訊

孔位類型	孔位結果符號	結果	解讀
樣本	⊕	陽性	樣本推定為目標致病菌陽性。
樣本	⊖	陰性	樣本的目標病致病菌為陰性。
樣本	⊘	受抑制*	樣本基質對此分析有抑制作用。可能需要重新檢測。
樣本	?	檢查	無法判讀目標致病菌是否存在。可能需要重新檢測。
樣本	⊘	錯誤*	未檢測到生物發光。可能需要重新檢測。

*有關結果的更多詳細資訊，請參閱檢測報告。如有需要，請聯絡當地的 Neogen 代表以獲得疑難排解協助。

游離 DNA 移除說明

註：游離 DNA 移除並未納入 NF 確效研究評估。

1. PMAxx

a. 將 45 µL 分子級水 (MGW) 轉移到微量離心管。

b. 將 5 µL PMAxx™ Dye (20 mM) 直接分注到有 45 µL MGW 的微量離心管。輕輕上下吸打進行混合。

註：這種溶液可冷藏保存，避免光照，最長保存時間 1 小時。

c. 將 400 µL 增菌樣本轉移至微量離心管。

d. 在低光環境下，將 5 µL PMAxx 溶液加入樣本分量。

e. 將微量離心管置於旋轉混勻器上旋轉 10 分鐘，期間須加蓋並注意避光。

f. 將 PMAxx 處理過的管子放入 PMA-Lite™ 儀器中，靜置 10 分鐘。

g. 將每支管子振盪混勻 3 秒，隨後將管子放回 PMA-Lite 儀器中繼續處理10 分鐘。

h. 吸取 20 µL 的 PMAxx 處理樣本，加進 Neogen 裂解液管中，隨後進行裂解步驟。

2. 克羅諾桿菌選擇性肉湯培養液 (CSB)

a. 將 0.1 mL 的初級增菌培養液轉移至 10 mL 的 CSB。

b. 在 41.5 ± 1°C 下培養 24 ± 2 小時。

c. 培養之後，繼續進行裂解步驟.....

依據 NF 確效認證方法確認結果

在 NF 確效的前提下，所有經 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*判定為陽性的樣本，必須通過以下其中一項檢測進行確認。確認作業必須在培養期結束後 72 小時內進行，採用儲存於 +2°C 至 +8°C 的增菌肉湯培養液進行。

選項 1：使用 ISO 22964:2017[2] 標準規程，從 BPW ISO 增菌培養液開始。

- 在 CSB (1/10 稀釋) 中二次培養，41.5°C ± 1°C，24 小時 ± 2 小時
- 劃線至 CCI 瓊脂上，並在 41.5°C ± 1°C 培養 24 小時 ± 2 小時
- 在非選擇性瓊脂平板培養基上最多劃線 5 個典型菌落，並在 37°C ± 1°C 下培養 21 ± 3 小時
- 進行適當的生化確認測試 (氧化酶測試及生化鑑定套組)

選項 2：在選擇性瓊脂培養基上的分離菌落上 (見選項 1)，使用 ISO 7218:2024[4] 標準所述的核酸探針進行測試。根據 ISO 7218:2024 規則，分子篩選系統可以透過針對不同基因區域、使用不同引子和/或探針的第二次分子檢測來確認。確認方法應符合適當的 ISO 16140 標準，並採用經過評估、可驗證菌落確認的規程與材料。

選項 3：使用其他任何經 NF 確效認證的方法時，其原理必須不同於 Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*。接著必須使用描述第二種經確效方法的完整方案。這兩種方法的確認前置作業都是相同的步驟。

如果結果不一致 (Neogen 二代分子檢測分析 – *克羅諾桿菌*未經上述方法確認)，實驗室應依照既定標準作業程序報告結果。

如果您對特定應用或程序有疑問，請造訪我們的網站 neogen.com 或聯繫您當地的 Neogen 代表或經銷商。

附錄 A. 規程中斷：熱處理裂解液的儲存與重測

1. 若要儲存加熱處理的裂解液，請用乾淨蓋子將裂解管重新加蓋 (詳見 4.5 節**裂解**)
2. 保存於 2 至 8°C，最多 72 小時。
3. 倒置 2-3 次管子進行混合，製備要擴增的儲存樣本。
4. 試管開蓋。
5. 將混合裂解液管置於 Neogen 分子檢測加熱模塊上，以 100 ± 1°C 加熱 5 ± 1 分鐘。
6. 從加熱板上取下 Neogen 裂解液管架，放入 Neogen 分子檢測冷卻板插入件中冷卻至少 5 分鐘，最多 10 分鐘。
7. 繼續上述**擴增**部分的規程。

References:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO 7218:2024. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
5. CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMLB) 6th Edition. Effective Date: 29 August 2025
6. ISO 24914:2026 Microbiology of the food chain — Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of microorganisms and associated genetic markers — General requirements and definitions. International Standard Organization (ISO), Geneva, Switzerland. www.iso.org
7. ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain — Method validation Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory

8. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
9. ISO 6887-5:2020. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
10. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
11. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

請參閱上述標準方法的最新版本。

符號說明

info.neogen.com/symbols

Neogen 食品安全

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
Auchincruive House
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation, 620 Lesher Place, Lansing, MI 48912 USA.
© Neogen 公司 2026 年。保留所有權利。Neogen 是 Neogen Corporation 的註冊商標。
所有其他品牌和產品名稱均為其各自公司的商標或註冊商標。專利：neogen.com/patents
FS00879B_0826

NEOGEN®

คำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์

ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์*

รายละเอียดผลิตภัณฑ์และวัตถุประสงค์การใช้งาน

Neogen® ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์* จะนำมาใช้กับระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® สำหรับการตรวจหาเชื้อ *ครอโนแบคเตอร์* อย่างรวดเร็วและเฉพาะเจาะจงในตัวอย่างอาหารหลังเพิ่มจำนวนเชื้อและตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมจากกระบวนการแปรรูปอาหาร

ชุดทดสอบ Neogen Molecular Detection Assays ใช้การเพิ่มขยายจำนวนโดยอาศัยหลักการ loop-mediated isothermal amplification เพื่อเพิ่มขยายจำนวนกรดนิวคลีอิกอย่างรวดเร็วโดยมีความจำเพาะเจาะจงและความว่องไวสูง ร่วมกับการเรืองแสงทางชีวภาพสำหรับการตรวจหาการเพิ่มขยายจำนวน ผลการทดสอบเบื้องต้นที่เป็นบวกจะได้รับการรายงานในทันที ขณะที่ผลการทดสอบที่เป็นลบจะแสดงผลภายหลังจากที่การทดสอบดังกล่าวเสร็จสมบูรณ์แล้ว ผลการทดสอบเบื้องต้นที่เป็นบวกควรได้รับการยืนยันโดยใช้วิธีการที่ท่านเห็นสมควรหรือตามที่ระบุไว้ในระเบียบข้อบังคับต่าง ๆ ในท้องถิ่น[1, 2]

ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์* โดยวิธี Neogen มีจุดมุ่งหมายให้ใช้ในสภาพแวดล้อมในห้องปฏิบัติการโดยผู้เชี่ยวชาญด้านวิชาชีพที่ผ่านการอบรมเทคนิคการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ Neogen ยังไม่ได้จัดทำเอกสารเกี่ยวกับการใช้ผลิตภัณฑ์นี้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ นอกจากอุตสาหกรรมอาหารหรือเครื่องดื่ม ตัวอย่างเช่น Neogen ยังไม่ได้ออกเอกสารเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์นี้สำหรับการทดสอบตัวอย่างยา ตัวอย่างเครื่องสำอาง ตัวอย่างทางคลินิก หรือตัวอย่างเกี่ยวกับสัตว์ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์* ยังไม่ได้รับการประเมินกับผลิตภัณฑ์อาหาร การแปรรูปอาหาร ระเบียบการทดสอบที่เป็นไปได้ทั้งหมดหรือกับสายพันธุ์แบคทีเรียที่เป็นไปได้ทั้งหมด

แหล่งที่มา สูตร และคุณภาพของอาหารสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อสามารถส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบที่ได้เช่นเดียวกับวิธีการทดสอบอื่น ๆ นอกจากนี้ ปัจจัยต่าง ๆ เช่น วิธีการสุ่มเก็บตัวอย่าง วิธีการทดสอบ การเตรียมตัวอย่าง การทำให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกันและการผสม รวมถึงการจัดการและเทคนิคที่ใช้ในห้องปฏิบัติการอาจส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบที่ได้ด้วยเช่นกัน Neogen ขอแนะนำให้ประเมินวิธีการทดสอบรวมทั้งอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อในสภาพแวดล้อมของผู้ใช้โดยใช้จำนวนตัวอย่างที่เพียงพอกับอาหารแต่ละชนิดและ/หรือตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและสภาวะที่มีความท้าทายกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีการดังกล่าวเป็นไปตามเกณฑ์ของผู้ใช้

Neogen ได้ทดสอบประเมินชุดทดสอบ Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* โดยใช้อาหารเหลว Buffered Peptone Water, BPW) ISO สำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ

เครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® มีจุดมุ่งหมายในการใช้กับตัวอย่างที่ได้ผ่านกระบวนการให้ความร้อนในระหว่างขั้นตอนการไลซีสของการทดสอบซึ่งได้รับการออกแบบมาเพื่อทำลายเชื้อที่มีในตัวอย่าง ตัวอย่างซึ่งไม่ได้รับความร้อนอย่างเหมาะสมในระหว่างขั้นตอนการไลซีสของชุดทดสอบอาจถือว่าเป็นสารที่อาจมีอันตรายทางชีวภาพ และไม่ควรใส่เข้าไปในเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

ชุดทดสอบอาหารปลอดภัย Neogen ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO (องค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน) 9001 ด้านการออกแบบและการผลิต

ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์* โดยวิธี Neogen มีทั้งหมด 96 ชุดทดสอบตามที่อธิบายไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

รายการ	ลักษณะ	จำนวน	สิ่งที่บรรจุภายใน	ความคิดเห็น
หลอดสารละลายไลซีส Neogen® (LS)	สารละลายสีชมพูในหลอดใส	96 หลอด (12 แถว แถวละ 8 หลอด)	ปริมาตร LS 580 ไมโครลิตรต่อหลอด	บรรจุอยู่ในที่วางและพร้อมใช้งาน
หลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์* โดยวิธี Neogen®	หลอดสีแดงส้ม	96 หลอด (12 แถว แถวละ 8 หลอด)	ส่วนผสมสำหรับการเพิ่มขยายและการตรวจหาเชื้อโรคแบบเฉพาะเจาะจงที่ทำแห้งเยือกแข็งแล้ว	พร้อมใช้งาน
ฝาสำรอง	ฝาสีแดงส้ม	96 หลอด (12 แถว แถวละ 8 ฝา)		พร้อมใช้งาน
Neogen® รีเอเจ้นท์คอนโทรล (RC)	หลอดใสชนิดเปิดฝาด้านบน	16 หลอด (2 ถุง ถุงละ 8 หลอด)	ส่วนผสมที่ทำแห้งเยือกแข็งแล้วสำหรับการเพิ่มและการตรวจหา DNA สำหรับใช้เป็นมาตรฐานเทียบ	พร้อมใช้งาน

ตัวควบคุมเชิงลบ (Negative control) ที่ไม่ได้ให้มาในชุดทดสอบ ให้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปราศจากเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ เช่น BPW ISO แทน ห้ามใช้น้ำเป็นตัวควบคุมเชิงลบ

ความปลอดภัย

ผู้ใช้ควรอ่าน ทำความเข้าใจและปฏิบัติตามข้อมูลความปลอดภัยทั้งหมดในคำแนะนำ การใช้งานระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen และ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์* เก็บคำแนะนำด้านความปลอดภัยนี้ไว้สำหรับใช้อ้างอิงในอนาคต

⚠**คำเตือน:** แสดงสถานการณ์ที่เป็นอันตราย ซึ่งหากไม่หลีกเลี่ยง อาจก่อให้เกิดการเสียชีวิตหรือการบาดเจ็บรุนแรง และ/หรือความเสียหายต่อทรัพย์สิน

ข้อสังเกต: ระบุสถานการณ์ที่อาจเป็นอันตราย หากไม่หลีกเลี่ยง อาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อทรัพย์สิน

⚠ คำเตือน

ห้ามใช้ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์* โดยวิธี Neogen ในการวินิจฉัยโรคในมนุษย์หรือสัตว์

ผู้ใช้งานต้องฝึกอบรมบุคลากรเกี่ยวกับเทคนิคการทดสอบที่เหมาะสมในปัจจุบัน: ตัวอย่างเช่น แนวปฏิบัติที่ดีในห้องปฏิบัติการ[3] หรือหลักความปลอดภัยทางชีวภาพสำหรับห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและชีวการแพทย์ (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, BMBL) ของศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งชาติสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control and Prevention, CDC)[5]

เพื่อลดความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับผลลบปลอมซึ่งนำไปสู่การปล่อยผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนไปขาย ให้ปฏิบัติดังนี้:

- ปฏิบัติตามระเบียบการและดำเนินการทดสอบดังที่ระบุไว้อย่างชัดเจนในคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์
- เก็บรักษา Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์* ตามที่ระบุไว้บนบรรจุภัณฑ์และในคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์
- ใช้ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์* ก่อนวันหมดอายุเสมอ
- ใช้ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์* กับตัวอย่างอาหารและตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตอาหารซึ่งได้รับการพิสูจน์ยืนยันเป็นการภายในหรือโดยหน่วยงานภายนอกแล้ว
- ใช้ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์* เฉพาะกับพื้นผิว สารฆ่าเชื้อ วิธีการและสายพันธุ์แบคทีเรีย ซึ่งได้รับการพิสูจน์ยืนยันเป็นการภายในหรือโดยหน่วยงานภายนอกแล้วเท่านั้น
- สำหรับตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมซึ่งประกอบด้วยบัฟเฟอร์สำหรับทำให้เป็นกลาง (Neutralizing Buffer หรือ NB) ที่มีสารประกอบเชิงซ้อนเอริลซัลโฟเนตให้ทำการเจือจางในอัตราส่วน 1:2 ก่อนการทดสอบ (เติมตัวอย่าง 1 ส่วน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปราศจากเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ 1 ส่วน) อีกวิธีหนึ่ง คือถ่ายอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อที่มี นิวทรอไรซิ่งบัฟเฟอร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงในหลอดสารละลายไลซีส Neogen ผลิตภัณฑ์เก็บตัวอย่างของ Neogen® ซึ่งประกอบด้วย นิวทรอไรซิ่งบัฟเฟอร์โดยมีสารประระกอบเชิงซ้อนของเอริลซัลโฟเนตมีดังนี้: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G และ HS2410NB2G วิธีนี้ยังไม่ผ่านการทดสอบในช่วงที่ทำการศึกษา NF Validation

เพื่อลดความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการสัมผัสสารเคมีหรือสารอันตรายทางชีวภาพ ให้ปฏิบัติดังนี้:

- ให้ทำการทดสอบเชื้อก่อโรคในห้องปฏิบัติการที่มีอุปกรณ์อย่างเหมาะสมภายใต้การควบคุมของบุคลากรที่ได้รับการอบรม อาหารที่เพิ่มจำนวนเชื้อหลังจากที่บ่มแล้ว หรือพื้นผิวที่มีการสัมผัสกับอาหาร หลังเพิ่มจำนวนเชื้อโดยบ่มแล้ว อาจจะมีเชื้อโรคในระดับเพียงพอที่จะก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์ได้
- ปฏิบัติตามแนวปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการมาตรฐานทุกครั้ง โดยรวมถึงการสวมเครื่องแต่งกายเพื่อป้องกันและอุปกรณ์ปกป้องดวงตาในขณะที่ปฏิบัติงานกับ รีเอเจนต์และตัวอย่างที่มีการปนเปื้อน
- หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับอาหารหลังบ่มเพิ่มจำนวนเชื้อและหลอดรีเอเจนต์ภายหลังการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ
- กำจัดตัวอย่างหลังเพิ่มจำนวนเชื้อและของเสียที่มีการปนเปื้อนที่เกี่ยวข้อง ตามมาตรฐานของท้องถิ่น ภูมิภาค และประเทศในปัจจุบัน
- ตัวอย่างที่ยังไม่ผ่านการให้ความร้อนอย่างเหมาะสมในระหว่างขั้นตอนการย่อยสลายเซลล์ (lysis) ในการทดสอบอาจถือเป็นสิ่งที่อาจเป็นอันตรายทางชีวภาพ และไม่ควรใส่เข้าไปในเครื่อง Neogen Molecular Detection System

เพื่อลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนข้ามขณะเตรียมชุดทดสอบ ให้ปฏิบัติดังนี้:

- สวมถุงมือตลอดเวลา (เพื่อปกป้องผู้ใช้งานและป้องกันการเกิดนิวคลีเอส)

เพื่อลดความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม:

- ปฏิบัติตามข้อกำหนดของท้องถิ่น ภูมิภาค และประเทศสำหรับข้อกำหนดด้านการกำจัดของเสีย

เพื่อเป็นการลดความเสี่ยงอันเกิดจากการสัมผัสโดนของเหลวร้อน ให้ปฏิบัติดังนี้:

- ห้ามใช้อุณหภูมิสูงกว่าที่แนะนำไว้บนเครื่องทำความร้อน
- ห้ามใช้เวลาทำความร้อนเกินที่แนะนำ
- ใช้เทอร์โมมิเตอร์ที่ได้รับการสอบเทียบตามมาตรฐานและเหมาะสม เพื่อยืนยันอุณหภูมิของฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen® (เช่น เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มบางส่วน หรือเทอร์โมมิเตอร์แบบดิจิตอล ที่ไม่ใช่เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มทั้งหมด) จะต้องวางเทอร์โมมิเตอร์ในบริเวณที่กำหนดไว้ของฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen

ข้อสังเกต

เพื่อลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนข้ามขณะเตรียมชุดทดสอบ ให้ปฏิบัติดังนี้:

- เปลี่ยนถุงมือก่อนขั้นตอนการผสมสารละลายกับเม็ดรีเอเจนต์
- แนะนำให้ใช้ปิเปตทิประดับชีววิทยาโมเลกุลที่มีตัวกันละอองลอย (มีตัวกรอง) และปราศจากเชื้อ
- ใช้ปิเปตทิปอันใหม่สำหรับการถ่ายตัวอย่างในแต่ละครั้ง
- ใช้ Good Laboratory Practices (การดำเนินงานของห้องปฏิบัติการที่ดี) เพื่อถ่ายตัวอย่างจากอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อ หลังบ่มไปยังหลอดสายละลายไลซีส เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนในขั้นตอนไปเปตเตอร์ ผู้ใช้อาจเพิ่มขั้นตอนในการถ่ายตัวอย่างสารละลาย ตัวอย่างเช่น ผู้ใช้อาจถ่ายตัวอย่างอาหารที่เพิ่มจำนวนเชื้อแต่ละตัวอย่างใส่ในหลอดที่ฆ่าเชื้อแล้ว
- ทำการทดสอบงานทางชีววิทยาโมเลกุลในพื้นที่ที่มีหลอดไฟฆ่าเชื้อหากทำได้
- ฆ่าเชื้อบนโต๊ะและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ (ปิเปต เครื่องมือเปิด/ปิดฝาหลอดทดลอง rack วางหลอดรีเอเจนต์ ฯลฯ) ด้วยสารละลายน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนซึ่งมีคลอรีนเป็นส่วนประกอบ (มีส่วนประกอบของโซเดียมไฮโปคลอไรต์) ในระดับความเข้มข้น 1–5% (โดยปริมาตรต่อน้ำ) หรือสารละลายขจัดดีเอ็นเอ

เพื่อลดความเสี่ยงจากผลบวกที่เป็นเท็จ ให้ปฏิบัติดังนี้

- ห้ามเปิดหลอดรีเอเจนต์หลังการเพิ่มขยายจำนวน
- กำจัดหลอดที่ปนเปื้อนแล้วเสมอ โดยแช่ในสารละลายน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนซึ่งมีระดับความเข้มข้น 1-5% (โดยปริมาตรต่อน้ำ) และมีคลอรีนเป็นส่วนประกอบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยให้อยู่ห่างจากบริเวณที่เตรียมชุดทดสอบเสมอ
- ห้ามนึ่งฆ่าเชื้อหลอด รีเอเจนต์ภายหลังการเพิ่มขยายจำนวน
- หากสงสัยว่าตัวอย่างมีดีเอ็นเออิสระของ *Cronobacter* ในระดับสูง (เช่น ดีเอ็นเอจากเซลล์ *Cronobacter* ที่ไม่มีชีวิต ซึ่งผ่านขั้นตอนการฆ่าหรือทำให้หมดฤทธิ์แล้ว) ตัวอย่างจากการเพิ่มจำนวนเชื้อที่มีผลบวกควรผ่านกระบวนการกำจัดดีเอ็นเอ (เช่น DNase) หรือ PMAxx ก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการสลายเซลล์ **(lysis)** ติดต่อตัวแทน Neogen เพื่อขอคำแนะนำเพิ่มเติม ไม่มีการประเมินการกำจัดดีเอ็นเออิสระในระหว่างการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบของ NF

ศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมในเอกสารข้อมูลความปลอดภัยและระเบียบข้อบังคับการกำจัดทิ้งในประเทศ

หากท่านมีข้อสงสัยเกี่ยวกับการใช้งานหรือกรรมวิธีที่เฉพาะเจาะจงใด ๆ โปรดเยี่ยมชมเว็บไซต์ของเราที่ neogen.com หรือติดต่อตัวแทนจำหน่ายหรือผู้จัดจำหน่ายของบริษัท Neogen ในท้องถิ่นของท่าน

ความรับผิดชอบของผู้ใช้

ผู้ใช้จะต้องทำความเข้าใจในคู่มือการใช้งานผลิตภัณฑ์และข้อมูลเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ หากต้องการข้อมูลเพิ่มเติม สามารถเยี่ยมชมเว็บไซต์ของเราได้ที่ **neogen.com** หรือติดต่อตัวแทนหรือผู้จัดจำหน่าย Neogen ในท้องถิ่นของท่าน

เมื่อเลือกวิธีการทดสอบ สิ่งสำคัญคือต้องตระหนักว่าปัจจัยภายนอก เช่น วิธีการสุ่มตัวอย่าง โพรโทคอลการทดสอบ การเตรียมตัวอย่าง รวมถึงการปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันและการผสม การจัดการ เทคนิคในห้องปฏิบัติการ และตัวอย่างเองอาจส่งผลต่อผลการทดสอบ

ผู้ใช้มีหน้าที่ในการเลือกวิธีการทดสอบ ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ รวมถึงจำนวนตัวอย่างที่เพียงพอเพื่อใช้ในการประเมินและตรวจสอบจุลินทรีย์ในสภาวะต่าง ๆ และในเมทริกซ์ที่เหมาะสม เพื่อให้ผู้ใช้มั่นใจได้ว่าวิธีการทดสอบที่เลือกนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ของผู้ใช้

นอกจากนี้ ผู้ใช้จะต้องรับผิดชอบในการเลือกวิธีการทดสอบและผลลัพธ์ที่ได้ว่าเป็นไปตามข้อกำหนดของลูกค้าและของผู้จัดส่งสินค้า

เช่นเดียวกับวิธีการทดสอบอื่น ๆ ผลลัพธ์ที่ได้จากการใช้ผลิตภัณฑ์ของ Neogen Food Safety ใด ๆ ก็ตาม ไม่ได้รับประกันถึงคุณภาพของเมทริกซ์หรือขั้นตอนที่ใช้ทดสอบ

เพื่อช่วยให้ลูกค้าสามารถประเมินความเหมาะสมของวิธีการทดสอบสำหรับวัตถุประสงค์ที่กำหนดในระหว่างการนำไปใช้งาน Neogen ได้พัฒนาชุดตัวควบคุมดูการรบกวนปฏิกิริยาของประเภทตัวอย่าง Neogen Molecular Detection Matrix Control (เรียกอีกอย่างว่า การควบคุมการเพิ่มขยายจำนวน ตามมาตรฐาน ISO 24914:2026[6]) ใช้ตัว Matrix Control (MDMC96) เพื่อประเมินการรบกวนปฏิกิริยาจากประเภทตัวอย่างต่อผลลัพธ์ของชุดทดสอบ Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* ในระหว่างการตรวจสอบความถูกต้องและการยืนยันผล ปฏิบัติตามมาตรฐาน ISO 16140-3:2021[7] และ/หรือโปรแกรมประกันคุณภาพขององค์กร เพื่อกำหนดจำนวนตัวอย่างที่เป็นตัวแทนที่เหมาะสมในการยืนยันสมรรถนะของวิธีการและกำหนดขอบเขตการประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการของคุณ ไม่จำเป็นต้องใช้ Neogen Molecular Detection Matrix Control เป็นประจำ หากวิธีการได้รับการยืนยันและขอบเขตการประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการได้รับการกำหนดแล้ว ให้ปฏิบัติตามโปรแกรมประกันคุณภาพขององค์กรเพื่อพิจารณาเป็นรายกรณีถึงความจำเป็นในการใช้ Neogen Molecular Detection Matrix Control และความถี่ในการใช้งานระหว่างการทดสอบตามปกติ

ประเภทตัวอย่าง (matrix) สามารถหมายถึงผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติในตัว เช่น ส่วนประกอบและกระบวนการ ความแตกต่างระหว่าง matrix ชนิดต่าง ๆ อาจเป็นเพียงผลที่เกิดจากความแตกต่างของการแปรรูปหรือสภาพลักษณะ ตัวอย่างเช่น ดิบเทียบกับผ่านการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอไรส์ สดเทียบกับแห้ง

เงื่อนไขการรับประกัน

เว้นแต่จะระบุอย่างชัดแจ้งในข้อจำกัดการรับผิดเกี่ยวกับบรรจุภัณฑ์ของสินค้าแต่ละประเภท Neogen ขอสงวนสิทธิ์ในการรับประกันใด ๆ ไม่ว่าโดยชัดแจ้งหรือโดยปริยาย ซึ่งรวมถึงแต่ไม่จำกัดเพียง การรับประกันใด ๆ ในความสามารถในการค้าขายได้ (Merchantability) หรือ การใช้สอยสินค้าให้สมประโยชน์ตามความมุ่งหมายเฉพาะ (Fitness) หากสินค้าใด ๆ ของนNeogen มีข้อบกพร่องในความปลอดภัยเกี่ยวกับอาหาร Neogen หรือตัวแทนจัดจำหน่ายที่ได้รับอนุญาตจาก Neogen จะเลือกว่าจะเปลี่ยนสินค้าทดแทนหรือคืนเงินค่าสินค้า ซึ่งเป็นการเยียวยาเฉพาะตัวแก่ลูกค้าหากมีคำถามเพิ่มเติม คุณต้องแจ้ง Neogen ทันทีภายในหกสิบวันหลังจากเกิดข้อสงสัยว่าผลิตภัณฑ์มีข้อบกพร่องใด ๆ และส่งผลิตภัณฑ์คืนให้กับ Neogen กรุณาติดต่อตัวแทนของน Neogen หรือตัวแทนจัดจำหน่ายที่ได้รับอนุญาตจากน Neogen

สำหรับข้อกำหนดและเงื่อนไขฉบับสมบูรณ์ของ Neogen โปรดเยี่ยมชมได้ที่: https://neogen.com/th/terms-and-conditions/

ขอบเขตความรับผิดชอบของ Neogen

NEOGEN จะไม่รับผิดชอบต่อการสูญเสียหรือความเสียหายใด ๆ ทั้งโดยตรง โดยอ้อม ความเสียหายจำเพาะที่เกิดขึ้นเนื่องจากการผิดสัญญา หรือที่เป็นผลสืบเนื่อง รวมถึงแต่ไม่จำกัดเพียงการสูญเสียผลกำไร ความรับผิดชอบของทาง Neogen ในทางกฎหมายจะต้องไม่เกินราคาของผลิตภัณฑ์ที่เสียหายหรือบกพร่องไม่ว่ากรณีใด ๆ ก็ตาม

การเก็บรักษาและการกำจัด

เก็บ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์*ที่อุณหภูมิ 2-8°C ห้ามแช่แข็ง เก็บชุดอุปกรณ์ให้พ้นแสงในระหว่างการเก็บรักษา หลังจากเปิดชุดอุปกรณ์แล้ว ให้ตรวจสอบว่าถุงฟอยล์ไม่ชำรุดเสียหาย หากถุงฟอยล์ชำรุดเสียหาย ห้ามใช้ผลิตภัณฑ์นั้น หลังจากเปิดแล้ว ควรเก็บรักษาหลอดรีเอเจนต์ที่ยังไม่ได้ใช้ไว้ในถุงที่ซีลปิดซ้ำได้โดยมีสารดูดความชื้นใส่อยู่ภายในเพื่อรักษาความคงตัวของ รีเอเจนต์ที่ทำแห้งเยือกแข็งแล้ว เก็บรักษาถุงที่ซีลปิดซ้ำแล้วไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C เป็นเวลาไม่เกิน 60 วัน

ห้ามใช้ชุดทดสอบเชื้อ*ครอโนแบคเตอร์*ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ที่พ้นกำหนดวันหมดอายุแล้ว วันหมดอายุและหมายเลขล็อตจะแสดงไว้บนฉลากด้านนอกของกล่อง หลังใช้งาน อาหารเพิ่มจำนวนเชื้อและหลอด Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์*อาจมีสารก่อให้เกิดโรคอยู่ เมื่อการทดสอบเสร็จสมบูรณ์ ให้ปฏิบัติตามข้อบังคับท้องถิ่น ภูมิภาค และประเทศสำหรับการกำจัดของเสียที่มีการปนเปื้อน ศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมในเอกสารข้อมูลความปลอดภัยและระเบียบข้อบังคับการกำจัดทิ้งในประเทศ

คำแนะนำสำหรับการใช้งาน

ปฏิบัติตามคำแนะนำทั้งหมดอย่างละเอียดรอบคอบ หากไม่ปฏิบัติเช่นนั้น อาจให้ผลที่ไม่ถูกต้องแม่นยำได้

ฆ่าเชื้อบนโต๊ะและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ (ปิเปต เครื่องมือเปิด/ปิดฝาหลอดทดลอง rack วางหลอดรีเอเจนต์ ฯลฯ) ด้วยสารละลายน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนซึ่งมีคลอรีนเป็นส่วนประกอบ(มีส่วนประกอบของโซเดียมไฮโปคลอไรต์) ในระดับความเข้มข้น 1–5% (โดยปริมาตรต่อน้ำ) หรือสารละลายขจัดดีเอ็นเอ

ผู้ใช้งานควรผ่านการฝึกอบรมการตรวจรับรองผู้ปฏิบัติงาน Neogen Molecular Detection System ตามที่อธิบายไว้ในเอกสาร “โพรโตคอลการตรวจรับรองการติดตั้ง (Installation Qualification หรือ IQ) / การตรวจรับรองการทำงาน (Operational Qualification หรือ OQ) และคู่มือการใช้งานสำหรับ Neogen Molecular Detection System”[8]

ดูในส่วน “คำแนะนำเฉพาะสำหรับวิธีการที่ได้รับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี” สำหรับข้อกำหนดเฉพาะ:

ตารางที่ 3 และ 4 สำหรับโพรโทคอลการเพิ่มจำนวนเชื้อตาม AOAC® *Official Method of Analysis*SM 2018.01 และ *Performance Tested*SM ใบรับรองเลขที่ 101703

ตารางที่ 5 สำหรับโพรโทคอลการเพิ่มจำนวนเชื้อตามใบรับรองการตรวจสอบ NF เลขที่ 3M 01/20-03/18

การเพิ่มจำนวนเชื้อในตัวอย่าง

ตารางที่ 2, 3, 4 หรือ 5 นำเสนอคำแนะนำสำหรับโพรโทคอลการเพิ่มจำนวนเชื้อสำหรับตัวอย่างอาหารและตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม

ผู้ใช้มีหน้าที่รับผิดชอบในการพิสูจน์ยืนยันระเบียบการสุ่มตัวอย่างหรืออัตราส่วนการเจือจางแบบอื่นเพื่อให้ความเชื่อมั่นว่าวิธีการทดสอบนี้สอดคล้องกับเกณฑ์ของผู้ใช้งานเอง

อาหาร ฝุ่นผงจากสิ่งแวดล้อม ฝุ่นละออง เศษจากการปัดกวาดและดูดซับด้วยฟองน้ำ

1. ปรับสมดุลอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อให้เข้ากับอุณหภูมิแวดล้อม (20-25°C) เว้นแต่จะระบุไว้เป็นอย่างอื่นในโพรโทคอลการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ดูตารางที่ 2, 3, 4 หรือ 5)
2. ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อเข้ากับตัวอย่างอย่างปลอดเชื้อ และทำให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่างทั่วถึงด้วยการปั่น การตีป่น การหมุนวน หรือการผสมด้วยมือเป็นเวลา 2 ± 0.2 **นาที หรือจนกว่าจะละลายจดหมดไม่เป็นก้อน จนกลายเป็นเนื้อเดียวกัน สำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ**[9, 10]
   - ก. ปัจจัยต่าง ๆ เช่น การเตรียมตัวอย่าง รวมถึงการทำให้เป็นเนื้อเดียวกันและการผสม การจัดการและเทคนิคที่ใช้ในห้องปฏิบัติการอาจส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบ
   - ข. สำหรับตัวอย่างที่ลักษณะเป็นละอองอนุภาคขนาดเล็ก แนะนำให้ใช้ถุงกรอง
   - ค. สำหรับ matrix ที่พองตัวในน้ำและมีความหนืดสูง (เช่น ธัญพืช แป้ง) แนะนำให้เจือจางเพิ่มเติม (> 1:10) จนกว่าความหนืดจะลดลงอย่างเหมาะสม หรือเติมแอลฟา-อะไมเลสปราศจากเชื้อ 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงใน BPW (ISO)[10]
   - ง. สำหรับตัวอย่างผงธัญพืช ให้เติมผงธัญพืชลงในของเหลวนั้นอย่างช้า ๆ โดยใช้วิธีการผสมอย่างต่อเนื่อง เพื่อไม่ให้จับตัวเป็นก้อน
3. บ่มเพาะเชื้อตามที่ระบุไว้ในตารางโพรโทคอลที่เหมาะสม (ดูตารางที่ 2 3 4 หรือ 5)

ตารางที่ 2 ระเบียบการของอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อทั่วไป

เมทริกซ์ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่าง[1]	ปริมาตรอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ[1, 2]	อุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (± 1°C)	เวลาการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)	ปริมาตรสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่าง
นมผงดัดแปลงสำหรับทารก (PIF) และวัตถุดิบ เช่น นมผงแห้ง ผงถั่วเหลือง เวย์ผง น้ำตาลแลคโตส แป้งข้าวเจ้าและมอลโทเดกซ์ทริน	ตัวอย่าง 1X กรัม	BPW (ISO) (1:10) 9X มล.	37	18-24	20 ไมโครลิตร
วัตถุดิบต่าง ๆ เช่น เกลือ แร่ธาตุ กรดอะมิโน DHA (กรดโดโคซะเฮกซะอีโนอิก) และวิตามิน	ตัวอย่าง 1X กรัม	BPW (ISO) (1:100) 99X มล.	37	18-24	20 ไมโครลิตร
ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมที่แห้ง เช่น ฝุ่น มูลฝอยจากการปัดกวาด ฝุ่นละอองจากการดูดเก็บตัวอย่าง	ตัวอย่าง 1X กรัม	BPW (ISO) (1:10) 9X มล.	37	18-24	20 ไมโครลิตร
ฟองน้ำเก็บตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ เลทีน บรอธ หรืออาหารเลี้ยงเชื้อ ดี/อี นิวทรอไลซิ่ง บรอธ 10 มล.	อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง 1 ชิ้น	BPW (ISO) (1:10) 90 มล.	37	18-24	20 ไมโครลิตร

1. Neogen ได้ทดสอบประเมินชุดทดสอบ Neogen Molecular Detection Assay 2 –*Cronobacter* โดยใช้อัตราส่วนการเจือจางในตารางที่ 2 สูงสุด 300 กรัม ยกเว้นนมผงสำหรับทารกที่มีและไม่มีโพรไบโอติก ซึ่งถูกประเมินที่ปริมาณสูงสุด 400 กรัม ผู้ใช้มีหน้าที่รับผิดชอบในการพิสูจน์ยืนยันอัตราส่วนการเจือจางหรือระเบียบวิธีการแบบอื่นเพื่อให้มั่นใจว่าวิธีการทดสอบนี้สอดคล้องกับเกณฑ์ของผู้ใช้
2. ใช้ BPW (ISO) **ที่ผ่านการอุ่นไว้ล่วงหน้า** ในกรณีที่อาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อมีปริมาตร > 300 มล. (เช่น ตัวอย่าง > 30 กรัม)

คำแนะนำเฉพาะสำหรับวิธีการทดสอบที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

AOAC® *Official Method of Analysis℠* (OMA) 2018.01

AOAC® *Performance Tested℠* (PTM) Certificate #101703

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

จากการศึกษา OMA℠ และ PTM℠ ของสถาบันวิจัย AOAC ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์* โดยวิธี Neogen พบว่าเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ*ครอโนแบคเตอร์* Matrix ที่ทำการทดสอบแสดงอยู่ในตารางที่ 3 และ 4

เตรียมตัวอย่างตามตารางที่ 3 และ 4 จากนั้นทำให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่างทั่วถึงโดยการปั่น การตีปั่น การหมุนวน หรือการผสมด้วยมือเป็นเวลา 2 ± 0.2 นาที หรือจนกว่าจะละลายจดหมดไม่เป็นก้อน จนกลายเป็นเนื้อเดียวกัน สำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ[9, 10]

ตารางที่ 3 เกณฑ์วิธีการเพิ่มจำนวนเชื้อตาม AOAC® *OMA℠* 2018.01 และ *PTM℠* 101703

เมทริกซ์ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ[1]	อุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (± 1°C)	เวลาการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)	ปริมาตรสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่าง
นมผงสำหรับทารกที่มีโพรไบโอติก	10 ก.	BPW (ISO) (1:10) 90 มล.	37	18-24	20 ไมโครลิตร
	300 g	BPW (ISO) 2700 มล. + แวนโคมัยซิน 10 มก./ลิตร)[b]	อุ่นล่วงหน้า 37	22-24	20 ไมโครลิตร
อาหารซีเรียลผงสำหรับทารกที่ไม่มีโพรไบโอติก	10 g	BPW (ISO) (1:10) 90 มล.	37	18-24	20 ไมโครลิตร
	300 g	BPW (ISO) (1:10) 2700 มล.	อุ่นล่วงหน้า 37	18-24	20 ไมโครลิตร
ผงแลคโตส	10 ก.	BPW (ISO) (1:10) 90 มล.	37	18-24	20 ไมโครลิตร
สแตนเลสสตีล (4" x 4")[c]	ฟองน้ำ 1 ชิ้น	BPW (ISO) (1:10) 90 มล.	37	18-24	20 ไมโครลิตร

[a]ใช้ BPW (ISO) **ที่ผ่านการอุ่นไว้ล่วงหน้า** ในกรณีที่อาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อมีปริมาตร > 300 มล.

[b]ความเข้มข้นสุดท้าย

[c]Environmental sponge pre-moistened with 10 mL D/E Neutralizing Broth.

ตารางที่ 4 Enrichment protocols according to AOAC® *PTM℠* 101703

เมทริกซ์ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ[a]	อุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (± 1°C)	เวลาการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)	ปริมาตรสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่าง
นมผงสำหรับทารกที่มีโพรไบโอติก	400[a] กรัม	BPW (ISO) 3600 มล. + แวนโคมัยซิน 10 มก./ลิตร)	อุ่นล่วงหน้า 37	22-24	20 ไมโครลิตร
นมผงสำหรับทารกที่ไม่มีโพรไบโอติก	400[a] กรัม	BPW (ISO) (1:10) 3600 มล.	อุ่นล่วงหน้า 37	22-24	20 ไมโครลิตร

[a]AOAC PTM approved matrices with the use of free DNA removal steps.

Refer to the free DNA removal instructions for details

NF VALIDATION โดย AFNOR Certification



3M 01/20-03/18

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

หากต้องการข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับการสิ้นสุดการบังคับใช้ของผลจากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ โปรดอ่านเอกสารรับรองของ NF VALIDATION ที่พร้อมให้ใช้งานได้ตามเว็บไซต์ที่ระบุไว้ข้างต้น

วิธีการตรวจสอบ NF ที่ได้รับการรับรองเป็นไปตาม ISO 16140-2:2016[11] โดยเปรียบเทียบกับ ISO 22964:2017[2]

ขอบเขตของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ มีดังต่อไปนี้: นมผงดัดแปลงสำหรับทารกและธัญพืชผงสำหรับทารก ชนิดที่มีโปรไบโอติกและปราศจากโปรไบโอติก วัตถุดิบและตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม

การเตรียมตัวอย่าง: ควรเตรียมตัวอย่างตาม EN ISO 22694:2017[2] และ EN ISO 6887[9, 10]

เวอร์ชั่นซอฟต์แวร์: ดูใบรับรอง

ตารางที่ 5 เกณฑ์วิธีการเพิ่มจำนวนเชื้อตามวิธีการที่ได้รับการรับรองของ NF VALIDATION 3M 01/20-03/18

เมทริกซ์ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ[1]	อุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (± 1°C)	ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)	ปริมาตรสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่าง	จุดที่หยุดการทดสอบชั่วคราวตามที่แนะนำ[2, 3]
• นมผงดัดแปลงสำหรับทารก • ธัญพืชผงสำหรับทารก • ส่วนผสมต่าง ๆ เช่น นมผงแห้ง ผงถั่วเหลือง เวย์ผง น้ำตาลแลคโตส แป้งข้าวเจ้าแลละมอลโทเดกซ์ทริน • ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมที่แห้ง เช่น ฝุ่น มูลฝอยจากการปัดกวาด ฝุ่นละอองจากการดูดเก็บตัวอย่าง	10 ก.	BPW (ISO) (1:10) 90 มล.	37	18-24	20 ไมโครลิตร	อาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ หรือไลเซตตัวอย่างสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C ได้นานที่สุดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง
• ฟองน้ำ น้ำชะล้าง วัสดุสำหรับเช็ดทำความสะอาด	อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง 1 ชิ้น หรือ 10 มล.					อาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ หรือไลเซตตัวอย่างสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C ได้นานที่สุดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง
นมผงดัดแปลงสำหรับทารกและธัญพืชผงสำหรับทารก (ชนิดปราศจากโพรไบโอติก)	30-300 ก.	BPW ISO (1:10)	37	18-24	20 ไมโครลิตร	อาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ หรือไลเซตตัวอย่างสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C ได้นานที่สุดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง
นมผงดัดแปลงสำหรับทารกและธัญพืชผงสำหรับทารก (ชนิดมีโพรไบโอติก)	30-300 ก.	BPW (ISO) + 10 มก./ล. แวนโคมัยซิน (1:10)	37	22-24	20 ไมโครลิตร	ไม่มี

1. ใช้ BPW (ISO) ที่ผ่านการอุ่นไว้ล่วงหน้า ในกรณีที่อาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อมีปริมาตร > 300 มล. (เช่น ตัวอย่าง > 30 กรัม)
2. หลังจากนำอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อออกจากที่เก็บ ให้ทำการทดสอบจากขั้นที่ 1 ในหัวข้อ ไลซีส หลังจากนำไลเซตตัวอย่างออกจากที่เก็บ ให้ทำการทดสอบจากขั้นที่ 7 ในหัวข้อ ไลซีส
3. โปรดดูภาคผนวก A หากต้องการทดสอบซ้ำไลเซตที่เก็บไว้และผ่านความร้อนมาแล้ว

การเตรียมถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen®

1. จุ่มผ้าหรือกระดาษเช็ดมือแบบใช้แล้วทิ้งลงในน้ำยาฟอกขาว 1-5% (ผสมกับน้ำตามอัตราส่วน) และเช็ดถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen
2. ใช้น้ำล้างถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen นี้
3. ใช้กระดาษเช็ดมือแบบใช้แล้วทิ้งเช็ดถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ให้แห้ง
4. ตรวจสอบให้แน่ใจว่าถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen แห้งสนิทก่อนใช้งาน

ขั้นตอนนี้จำเป็นต้องใช้ Neogen Molecular Detection Heat/Chill Block Insert จำนวน 2 ชิ้น ทั้งสองชิ้นเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวกัน (รหัสสินค้า 700000145) แต่ใช้สำหรับหน้าที่ที่แตกต่างกัน

เพื่อความชัดเจนในขั้นตอนการปฏิบัติงาน บล็อกสำหรับขั้นตอนการให้ความร้อนจะเรียกว่า Molecular Detection Heat Block Insert และบล็อกสำหรับขั้นตอนการทำให้เย็นจะเรียกว่า Molecular Detection Chill Block Insert โดยการเรียกชื่อดังกล่าวใช้เพื่อแยกแยะหน้าที่การทำงานเท่านั้น และไม่ได้หมายความว่าเป็นผลิตภัณฑ์แยกจากกัน

การเตรียมชิลบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen®

วาง Neogen Molecular Detection Chill Block Insert ไว้บนโต๊ะปฏิบัติการโดยตรง ใช้บล็อกที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการโดยรอบ (20-25°C)

การเตรียมฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen®

วางฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen ในเครื่องทำความร้อนบล็อกคู่แบบแห้ง เปิดเครื่องทำความร้อนบล็อคแบบแห้งและตั้งอุณหภูมิเพื่อให้ฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen มีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึง 100 ±1°C

หมายเหตุ: ให้ฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen มีอุณหภูมิตามที่กำหนดโดยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการทำงานของเครื่องทำความร้อน ใช้เทอร์โมมิเตอร์ที่ได้รับการสอบเทียบมาตรฐานและเหมาะสม (เช่น เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มบางส่วน เทอร์โมมิเตอร์แบบดิจิตอล ที่ไม่ใช่เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มทั้งหมด) วางไว้ในบริเวณที่กำหนด ตรวจสอบให้อุณหภูมิของฮีทบล็อกคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen อยู่ที่ 100 ±1°C

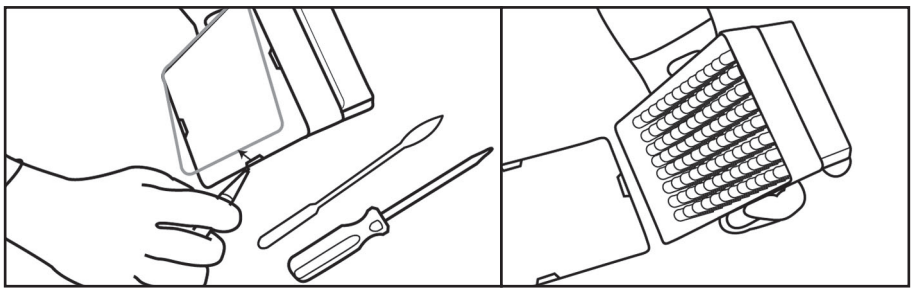
การเตรียมเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen®

1. เปิดใช้ซอฟต์แวร์ทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® แล้วเข้าสู่ระบบ ติดต่อตัวแทนแผนก Neogen Food Safety ของคุณ เพื่อให้แน่ใจว่าคุณมีซอฟต์แวร์เวอร์ชันที่อัปเดตล่าสุด
2. เปิดเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen
3. สร้างหรือแก้ไขชุดการทำงานที่มีข้อมูลสำหรับแต่ละตัวอย่าง ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในคู่มือการใช้งานระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

หมายเหตุ: ต้องรอให้เครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen มีสถานะพร้อมใช้ ก่อนที่จะใส่ถาด ใส่หลอดทดสอบเข้าเครื่องทดสอบเชื้อระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ขั้นตอนของการทำความร้อนนี้ใช้เวลาประมาณ 20 นาทีและบ่งชี้ด้วยไฟสีส้มบนแถบบอกสถานะของเครื่อง เมื่อเครื่องมือพร้อมที่จะเริ่มต้นการทำงาน แถบบอกสถานะดังกล่าวจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว

การไลซีส

ใช้ไขควงไขด้านล่าง ของที่วางสารละลายไลซีส Neogen ออก ก่อนวางลงบนฮีทบล็อกคสำหรับใส่หลอดทดสอบแชื้อระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen



1. รอให้หลอดสารละลายไลซีส Neogen อุ่นขึ้นโดยนำออกมาวางที่อุณหภูมิห้อง (20-25 °C) ข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) อีกวิธีหนึ่งในการปรับอุณหภูมิของหลอดสารละลายไลซีส Neogen ให้เท่ากับอุณหภูมิห้อง คือ วางหลอดไลซีส Neogen ไว้บนโต๊ะในห้องปฏิบัติการอย่างน้อย 2 ชั่วโมง หรือนำหลอดสารละลายไลซีส Neogen ไปบ่มในที่ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ±1°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือวางหลอดสารละลายไลซีสบนเครื่องทำความร้อนแบบแห้งเป็นเวลา 30 วินาทีที่อุณหภูมิ 100 ± 1°C
2. พลิกหลอดสารละลายไลซีสที่ปิดฝาอยู่ เพื่อผสมให้เข้ากัน ดำเนินการต่อในขั้นถัดไปไปภายใน 4 ชั่วโมง หลังจากพลิกหลอดแล้ว
3. นำตัวอย่างที่ผ่านการเพิ่มจำนวนเชื้อออกจากตู้บ่มเพาะเชื้อ
4. ตัวอย่างแต่ละชนิดและตัวอย่าง NC (อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อ) จะต้องใช้หลอดสารละลายไลซีส Neogen หนึ่งหลอดต่อหนึ่งตัวอย่าง

4.1 แถวของหลอดสารละลายไลซีส Neogen สามารถตัดออกเพื่อให้มีจำนวนตามที่ต้องการได้ เลือกจำนวนหลอดสารละลายไลซีส Neogen แต่ละหลอดหรือแถวที่มี 8 หลอด ตามความจำเป็น วางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ลงในชั้นวางที่ว่างอยู่

4.2 เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนข้าม ให้เปิดฝาของหลอดสารละลายไลซีส Neogen ทั้งแถวในครั้งเดียว และใช้ปิเปตทิป อันใหม่สำหรับถ่ายตัวอย่างในแต่ละขั้นตอน

4.3 ถ่ายตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนเชื้อแล้วไปยังหลอดสารละลายไลซีส Neogen ตามคำอธิบายด้านล่างนี้:

> ถ่ายตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนเชื้อแต่ละตัวอย่างลงไปในหลอดสารละลายไลซีส Neogen แต่ละหลอด **เป็นอันดับแรก**
> ถ่าย NC เป็น**อันดับสุดท้าย**

4.4 ใชเครื่องมือเปิด/ปิดฝาหลอดสารละลายไลซีสโดยวิธี Neogen® ในการเปิดฝาหลอดสารละลายไลซีส Neogen ทีละแถว

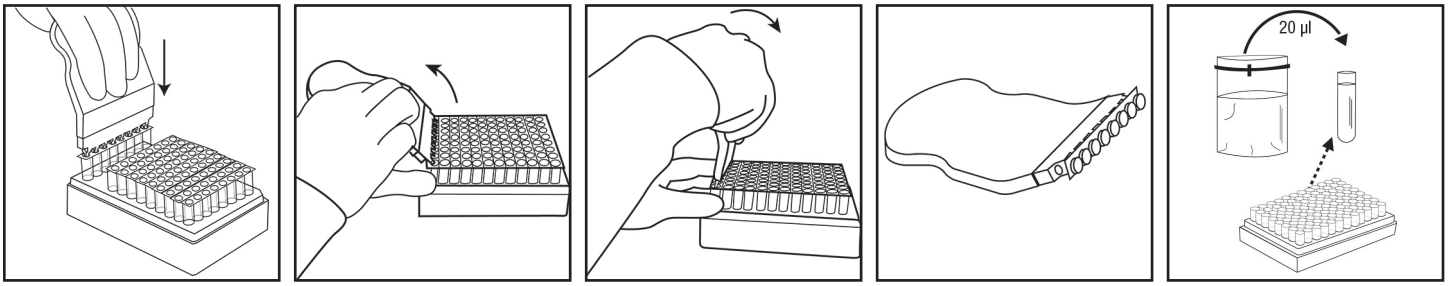
4.5 ทิ้งฝาหลอดสารละลายไลซีส Neogen – หากจะเก็บไลเซตเอาไว้เพื่อทดสอบซ้ำ ให้วางฝาในภาชนะที่สะอาดเพื่อนำกลับมาใช้ซ้ำ

4.5.1. หากต้องการดูข้อมูลเกี่ยวกับการดำเนินการเก็บไลเซต โปรดดูภาคผนวก A

4.6 เขย่าถุงตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนเชื้อ ก่อนทำการดึงตัวอย่างจากด้านที่มีการกรอง สำหรับตัวอย่างที่มีความหนืด

4.7 ถ่ายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรลงในหลอดสารละลายไลซีส Neogen ยกเว้นว่าจะระบุไว้เป็นปริมาณอื่นตามตารางเกณฑ์วิธี

5. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 4.4 ถึง 4.7 จนกว่าจะเติมตัวอย่างแต่ละตัวอย่างลงในหลอดสารละลายไลซีส Neogen ในแถวดังกล่าวเสร็จสิ้น



6. เมื่อถ่ายตัวอย่างทั้งหมดเสร็จแล้ว ให้ถ่าย NC (อาหารเพิ่มจำนวนเชื้อ ที่ปลอดเชื้อ เช่น BPW) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดสารละลายไลซีส Neogen ห้ามใช้น้ำเป็น NC

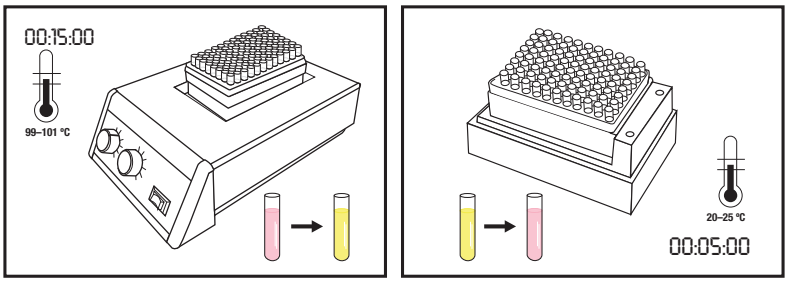
7. ตรวจสอบว่าอุณหภูมิของฮีทบล็อกคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen อยู่ที่ 100 ±1°C

8. ขั้นตอนการให้ความร้อน: นำ rack ที่มี Neogen Lysis Solution tubes ซึ่งไม่ปิดฝาไปวางใน Neogen Molecular Detection Heat Block Insert แล้วให้ความร้อนเป็นเวลา 15 ± 1 นาที ระหว่างการอุ่นร้อน สารละลายในหลอดทดสอบไลซีส Neogen จะเปลี่ยนจากสีชมพู (เย็น) เป็นเหลือง (ร้อน)

   ตัวอย่างซึ่งไม่ได้รับความร้อนอย่างเหมาะสมในระหว่างขั้นตอนการไลซีสของชุดทดสอบอาจถือว่าเป็นสารที่อาจมีอันตรายทางชีวภาพ และไม่ควรใส่เข้าไปในเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

9. ขั้นตอนการทำให้เย็น: นำ rack ที่มี Neogen Lysis Solution tubes ซึ่งไม่ปิดฝาออกจาก Neogen Molecular Detection Heat Block และปล่อยให้เย็นใน Neogen Molecular Detection Chill Block Insert อย่างน้อย 5 นาทีและไม่เกิน 10 นาที ควรวาง Neogen Molecular Detection Chill Block Insert ไว้บนโต๊ะปฏิบัติการโดยตรง ณ อุณหภูมิแวดล้อมปกติ ในระหว่างการทำให้เย็น Neogen Lysis Solution จะเปลี่ยนกลับเป็นสีชมพู

10. นำเอาถาดวางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ออกจาก ชิลบล็อกคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen



การเพิ่มขยาย

1. ต้องมีหลอด รีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen หนึ่งหลอดสำหรับตัวอย่างแต่ละตัวอย่างและ NC

   1.1 สามารถตัดแถวของหลอดออก เพื่อให้มีจำนวนหลอดตามที่ต้องการได้ เลือกจำนวนหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen แต่ละหลอด หรือแถวที่มี 8 หลอด ตามที่ต้องการ

   1.2 วางหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen ลงในถาดวางที่ยังว่างอยู่

   1.3 หลีกเลี่ยงการรบกวนเม็ด รีเอเจนต์ที่ก้นหลอด

2. เลือกหลอด Neogen รีเอเจ้นท์คอนโทรลหนึ่งหลอดแล้ววางลงในถาดวาง

3. เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนข้าม ให้เปิดฝาหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen ทีละแถว และใช้ปิเปตทิปอันใหม่ในการถ่ายตัวอย่างในแต่ละขั้นตอน

4. ถ่ายไลเซตแต่ละตัวอย่างไปยังหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen และหลอด Neogen รีเอเจนต์คอนโทรล ตามคำอธิบายด้านล่าง:

ถ่ายไลเซตของแต่ละตัวอย่างลงในหลอด รีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen **แต่ละหลอดเป็นอันดับแรก** แล้วจึงถ่าย NC เติมสารละลายลงในหลอด Neogen รีเอเจนต์อนโทรลเป็น**ลำดับสุดท้าย**

5. ใช้เครื่องมือเปิด/ปิดฝาหลอดทดสอบ-รีเอเจนต์ โดยวิธี Neogen® ในการเปิดหลอด รีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์* โดยวิธี Neogen ทีละแถว ทิ้งฝาปิด

   5.1 **ถ่ายไลเซตของตัวอย่างปริมาณ 20 ไมโครลิตร จากด้านบน 1/2 ของของเหลว (หลีกเลี่ยงส่วนตะกอน) ในหลอดสารละลายไลซีส Neogen ลงไปในหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ไครโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen ปล่อยสารละลายด้านข้างหลอด เพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนเม็ดรีเอเจนต์ที่ก้นหลอด ผสมโดยใช้ปิเปต ดูดขึ้นและลงเบา ๆ 5 ครั้ง**

   5.2 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 5.1 จนกว่าจะเติมแต่ละไลเซตตัวอย่างลงไปในหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์* โดยวิธี Neogen ในแถวนั้น

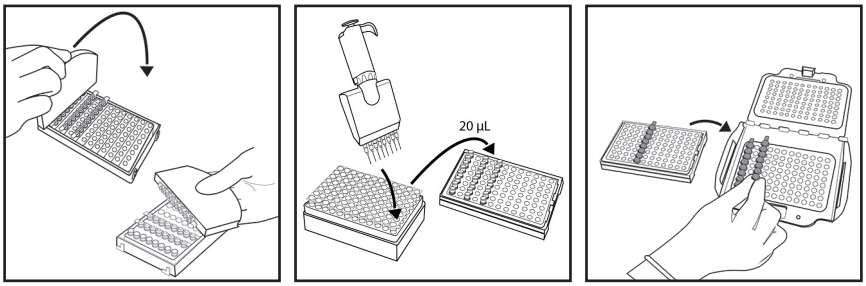
   5.3 ปิดหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen ด้วยเครื่องมือเปิด/ปิดฝาหลอดทดสอบ - รีเอเจนต์ให้มา และใช้ด้านมนของเครื่องมือเปิด/ปิดฝา หลอดทดสอบ - รีเอเจนต์โดยวิธี Neogen กดซ้ำไปซ้ำมา เพื่อให้แน่ใจว่าฝานั้นปิดสนิท

   5.4 ทำซ้ำขั้นตอน 5.1 ถึง 5.3 ตามความจำเป็นสำหรับจำนวนตัวอย่างที่จะทดสอบ

   5.5 เมื่อถ่ายไลเซตตัวอย่างทั้งหมดแล้ว ให้ทำซ้ำขั้นตอนที่ 5.1 ถึง 5.3 เพื่อถ่ายไลเซต NC ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen

   5.6 ถ่าย**ไลเซต NC <u>ปริมาณ</u> 20 ไมโครลิตร เข้าไปในหลอด Neogen รีเอเจนต์คอนโทรล** ปล่อยสารละลายด้านข้างหลอด เพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนเม็ดรีเอเจนต์ที่ก้นหลอด ผสมโดยใช้ปิเปต ดูดขึ้นและลงเบา ๆ 5 ครั้ง

6. บรรจุหลอดที่ปิดฝาแล้วลงในถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ที่สะอาดและขจัดการปนเปื้อนแล้ว ปิดและล็อกฝาถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen



7. ตรวจสอบและยืนยันการรันที่กำหนดค่าไว้ในซอฟต์แวร์ระบบการตรวจหาระดับโมเลกุลของ Neogen
8. คลิกปุ่ม Start ในซอฟต์แวร์ แล้วเลือกเครื่องมือที่จะใช้ ฝาปิดของอุปกรณ์ที่เลือกจะเปิดโดยอัตโนมัติ
9. ใส่ถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ในเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen แล้วปิดฝาเพื่อเริ่มต้นการทดสอบ ระบบจะให้ผลการทดสอบภายในเวลา 60 นาที แม้ว่าผลที่เป็นบวกอาจจะตรวจจับได้เร็วกว่านั้นก็ตาม
10. หลังจากการทดสอบเสร็จสมบูรณ์ ให้นำ Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray ออกจากเครื่อง Neogen Molecular Detection System แล้วนำหลอดทดลองไปแช่ในสารละลายฟอกขาวในครัวเรือนซึ่งมีคลอรีนเป็นส่วนประกอบและมีความเข้มข้น 1-5% (โดยปริมาตรในน้ำ) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยให้อยู่ห่างจากบริเวณที่เตรียมชุดทดสอบ

ข้อสังเกต: เพื่อลดความเสี่ยงในการได้ผลบวกปลอมอันเนื่องมาจากการปนเปื้อนข้าม ห้ามเปิดหลอดรีเอเจนต์ซึ่งบรรจุ DNA ที่เพิ่มขยายแล้ว ซึ่งรวมถึงหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen หลอดรีเอเจนต์คอนโทรล Neogen และหลอดเมตริกซ์คอนโทรล Neogen นำหลอดรีเอเจนต์ที่ปิดสนิทไปแช่ในสารละลายน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนซึ่งมีคลอรีนเป็นส่วนประกอบและมีความเข้มข้น 1-5% (โดยปริมาตรต่อน้ำ) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยให้อยู่ห่างจากบริเวณที่เตรียมชุดทดสอบเสมอ

ผลการทดสอบและการแปลความหมาย

อัลกอริทึมจะแปลความหมายเส้นโค้งของแสงที่ส่งออกมาอันเป็นผลมาจากการตรวจพบการเพิ่มขยายของกรดนิวคลีอิก ซอฟต์แวร์จะวิเคราะห์ผลการทดสอบนี้โดยอัตโนมัติและจะมีการเข้ารหัสสีตามผลที่ได้ดังกล่าว ผลการทดสอบที่ให้ค่าเป็นบวกหรือลบจะพิจารณาตัดสินโดยการวิเคราะห์พารามิเตอร์ของเส้นโค้งที่มีลักษณะเฉพาะตัวจำนวนหนึ่ง ผลการทดสอบเบื้องต้นที่เป็นบวกจะมีการรายงานในทันที ขณะที่ผลที่เป็นลบและผลที่น่าสงสัยจะแสดงผลภายหลังการทดสอบเสร็จสมบูรณ์แล้ว

ตัวอย่างจากการเพิ่มจำนวนเชื้อที่มีผลบวกเบื้องต้น ควรได้รับการยืนยันตามขั้นตอนการปฏิบัติงานตามมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ หรือโดยปฏิบัติตามการยืนยันวิธีการอ้างอิงที่เหมาะสมต่อไปนี้[1,2] โดยเริ่มต้นจากการถ่ายเชื้อจากอาหารหลักสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อขั้นต้น (BPW ISO หรือ BPW ISO เสริมด้วยแวนโคมันซิน 10 มก./ลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อลำดับที่สอง ตามด้วยการเพาะเชื้อในเพลทและการยืนยันเชื้อที่แยกได้โดยใช้วิธีทางชีวเคมี ซีรัมวิทยา และ/หรือระดับโมเลกุลที่เหมาะสม

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบก็จะไม่ให้ค่าที่อ่านได้เป็นศูนย์ เนื่องจากรีเอเจนต์ในการเพิ่มขยายสำหรับชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 – *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen จะมีค่าพื้นหลังในหน่วยแสงสัมพัทธ์ (RLU)

ในกรณีที่พบน้อยว่ามีแสงที่ปล่อยออกมาผิดปกติ อัลกอริทึมจะติดป้ายกำกับว่า "ตรวจสอบ (Inspect)" Neogen แนะนำให้ผู้ใช้งานทำการทดสอบซ้ำสำหรับตัวอย่างใด ๆ ที่ให้ผลว่า "ตรวจสอบ (Inspect)" หากผลยังคงเป็น "ตรวจสอบ (Inspect)" ให้ดำเนินการทดสอบยืนยันโดยใช้วิธีการที่คุณเลือกใช้หรือตามที่ข้อบังคับท้องถิ่นกำหนดไว้[1,2]

ตารางที่ 6 สัญลักษณ์และข้อมูลสำหรับผลลัพธ์ต่าง ๆ ของซอฟต์แวร์

ประเภทหลุม	สัญลักษณ์แทนผลของหลุม	ผล	การแปลผล
ตัวอย่าง		บวก	ตัวอย่างมีผลบวกเบื้องต้นสำหรับเชื้อก่อโรคเป้าหมาย
ตัวอย่าง		ลบ	ตัวอย่างเป็นลบสำหรับเชื้อก่อโรคเป้าหมาย
ตัวอย่าง		ถูกยับยั้ง*	Matrix ในตัวอย่างมีฤทธิ์ยับยั้งต่อการทดสอบ อาจต้องทำการทดสอบซ้ำ
ตัวอย่าง		ต้องตรวจสอบ	การมีหรือไม่มีเชื้อก่อโรคเป้าหมายไม่แน่ชัด อาจต้องทำการทดสอบซ้ำ
ตัวอย่าง		เกิดข้อผิดพลาด*	ตรวจไม่พบการเรืองแสงทางชีวภาพ อาจต้องทำการทดสอบซ้ำ

*โปรดดูรายงานการรันสำหรับรายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลลัพธ์ หากจำเป็น โปรดติดต่อผู้จัดจำหน่ายของ Neogen ในท้องถิ่นของคุณเพื่อขอความช่วยเหลือในการแก้ไขปัญหา

คำแนะนำการกำจัดดีเอ็นเออิสระ
หมายเหตุ: ไม่มีการประเมินการกำจัดดีเอ็นเออิสระในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบของ NF

1. PMAxx

a. เติมน้ำเกรดอณูวิทยา (MGW) ปริมาณ 45 ไมโครลิตร ลงในหลอดขนาดเล็ก (microtube)

b. เติมสีย้อม PMAxx™ (20 mM) ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ลงใน microtube ที่มี MGW ปริมาณ 45 ไมโครลิตร ผสมโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นและปล่อยลงเบา ๆ

หมายเหตุ: อาจเก็บรักษาสารละลายในตู้เย็น ป้องกันจากแสงได้นานสูงสุด 1 ชั่วโมง

c. ถ่ายตัวอย่างที่ผ่านการเพิ่มจำนวนเชื้อ 400 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ (microcentrifuge tube)

d. เติมสารละลาย PMAxx ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ลงในส่วนแบ่งตัวอย่าง โดยทำภายใต้สภาวะที่มีแสงน้อย

e. นำหลอดไมโครทิวป์ใส่ในเครื่องหมุนผสมเป็นเวลา 10 นาที โดยปิดฝาและป้องกันแสง

f. นำหลอดที่บ่มด้วย PMAxx ใส่ในเครื่อง PMA-Lite™ เป็นเวลา 10 นาที

g. หมุนวน (votex) แต่ละหลอดเป็นเวลา 3 วินาที จากนั้นนำหลอดกลับไปยังเครื่อง PMA-Lite ต่ออีก 10 นาที

h. ถ่ายตัวอย่างที่บ่มด้วย PMAxx ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ไปยังหหลอด Lysis Solution ของ Neogen และทำตามขั้นตอนการย่อยสลายเซลล์ (lysis)

2. Cronobacter Selecive Broth (CSB)

a. ถ่ายอาหารสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อขั้นต้น 0.1 มิลลิลิตรลงสู่ CSB 10 มล.

b. บ่มเชื้อ 41.5 ± 1°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

c. หลังจากบ่มเชื้อแล้ว ให้ดำเนินการตามขั้นตอนการย่อยสลาย (lysis)

การยืนยันผลตามวิธีการตรวจสอบ NF ที่ได้รับการรับรอง
ในบริบทของการตรวจสอบ NF ตัวอย่างทั้งหมดที่ชุดทดสอบ Neogen Molecular Detection Assay 2 –*Cronobacter* ระบุว่าให้ผลบวกนั้นต้องได้รับการยืนยันยืนยันโดยการทดสอบอย่างใดอย่างหนึ่งต่อไปนี้ ต้องทำการยืนยันจากอาหารเหลวสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ +2°C ถึง +8°C ภายใน 72 ชั่วโมงหลังจากสิ้นสุดระยะบ่มเชื้อ

ตัวเลือกที่ 1: การใช้มาตรฐาน ISO 22964:2017[2] โดยเริ่มจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ BPW ISO

- ถ่ายเชื้อไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ใน CSB (การทำเจือจาง 1/10) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ± 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 41.5°C ± 1°C
- Streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CCI และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ± 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 41.5°C ± 1°C
- นำโคโลนีที่มีลักษณะจำเพาะจำนวนสูงสุด 5 โคโลนี มา streak บนเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ non-selective agar แล้วนำไปบ่มเชื้อเป็นเวลา 21 ± 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C ± 1°C
- ดำเนินการทดสอบยืนยันทางชีวเคมีตามความเหมาะสม (การทดสอบออกซิเดสและชุดทดสอบทางชีวเคมี)

ตัวเลือกที่ 2: การใช้โพรบกรดนิวคลีอิกตามที่อธิบายอยู่ใน ISO 7218:2024[4] โดยใช้โคโลนีที่แยกออกมาจาก selective agar (ดูตัวเลือกที่ 1) ตามข้อกำหนดของ ISO 7218:2024 การทดสอบคัดกรองระดับโมเลกุลอาจได้รับการยืนยันโดยการทดสอบระดับโมเลกุลครั้งที่สองที่มุ่งเป้าไปยังขอบเขตของยีนที่แตกต่างกัน พร้อมไพรเมอร์และ/หรือโพรบที่แตกต่างกัน วิธีการยืนยันจะต้องผ่านการตรวจสอบตามมาตรฐาน ISO 16140 ที่เหมาะสม พร้อมด้วยโพรโทคอลและวัสดุสำหรับการยืนยันโคโลนีที่ผ่านการประเมินแล้ว

ตัวเลือกที่ 3: การใช้วิธีอื่นที่ได้รับการรับรองโดยการตรวจสอบ NF ซึ่งหลักการจะต้องแตกต่างจากชุดทดสอบ Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* และต้องใช้โปรโตคอลเต็มที่อธิบายไว้สำหรับวิธีที่สองที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องแล้วนี้ ขั้นตอนทั้งหมดก่อนเริ่มการยืนยันจะต้องเหมือนกันในทั้งสองวิธี

ในกรณีที่ได้ผลไม่สอดคล้องกัน (ให้ผลบวกเบื้องต้นในชุดทดสอบ Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter*, โดยไม่ได้รับการยืนยันด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งที่อธิบายไว้ข้างต้น) ห้องปฏิบัติการความปฏิบัติตามขั้นตอนการปฏิบัติงานมาตรฐานที่มีอยู่เพื่อรายงานผลของตน

หากคุณมีข้อสงสัยเกี่ยวกับแอปพลิเคชันหรือขั้นตอนที่เฉพาะเจาะจง โปรดไปที่เว็บไซต์ของเราที่ neogen.com หรือติดต่อตัวแทนหรือผู้จัดจำหน่าย Neogen ในท้องถิ่นของคุณ

ภาคผนวก A การหยุดการทดสอบชั่วคราว: การเก็บรักษาและการนำไลเซตมาทดสอบซ้ำ

1. หากต้องการเก็บไลเซตที่ผ่านความร้อนมาแล้ว ให้ปิดฝาหลอดสารละลายไลซิสด้วยฝาที่สะอาด (โปรดดู**ไลซิส**ส่วนที่ 4.5)
2. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 ถึง 8°C ไม่เกิน 72 ชั่วโมง
3. เตรียมตัวอย่างที่เก็บไว้ โดยพลิกหลอดสารละลายไลซิสไปมา 2-3 ครั้งเพื่อผสมตัวอย่างให้เข้ากัน
4. เปิดฝาหลอด
5. ใส่หลอดไลเซตที่ผสมตัวอย่างเข้ากันแล้วลงในฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen และให้ความร้อนที่ 100 ±1°C เป็นเวลา 5 ±1 นาที
6. นำที่วางหลอดใส่สารละลายไลซิส Neogen ออกจากฮีทบล็อกคและปล่อยให้เย็นลงในชิลบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen อย่างน้อย 5 นาทีแต่ไม่เกิน 10 นาที
7. ดำเนินการทดสอบขั้นต่อไปในส่วน**การเพิ่มจำนวนเชื้อ**ตามรายละเอียดด้านล่าง

เอกสารอ้างอิง:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO 7218:2024. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
5. CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMLB) 6th Edition. Effective Date: 29 August 2025
6. ISO 24914:2026 Microbiology of the food chain — Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of microorganisms and associated genetic markers — General requirements and definitions International Standard Organization (ISO), Geneva, Switzerland. www.iso.org
7. ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain — Method validation Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory
8. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
9. ISO 6887-5:2020. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
10. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
11. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

โปรดอ้างอิงวิธีการมาตรฐานฉบับปัจจุบันที่แสดงรายการไว้ข้างต้น

คำอธิบายสัญลักษณ์

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
Auchincruive House
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation, 620 Lesher Place, Lansing, MI 48912 USA.
© Neogen Corporation 2026 สงวนลิขสิทธิ์ Neogen เป็นเครื่องหมายการค้าจดทะเบียนของ Neogen Corporation
ชื่อแบรนด์และผลิตภัณฑ์อื่นๆ ทั้งหมดเป็นเครื่องหมายการค้าหรือเครื่องหมายการค้าจดทะเบียนของบริษัทที่เกี่ยวข้อง สิทธิบัตร: neogen.com/patents
FS00879B_0826

발행 날짜: 2026-07

NEOGEN®

제품 설명서

분자 검출 키트 2 – *크로노박터*

제품 설명 및 용도

Neogen® 분자 검출 키트 2 – *크로노박터*는 Neogen® 분자 검출 시스템을 사용하여 증균된 식품 및 식품 가공 환경 시료에서 *크로노박터*를 신속하고 명확하게 검출합니다.

Neogen Molecular Detection Assays는 높은 특이성과 민감도로 핵산 서열을 신속하게 증폭하는 루프-매개 등온 증폭법과 증폭을 검출하는 생체발광 기술을 결합하여 사용합니다. 추정 양성 결과는 실시간으로 보고되는 반면, 음성 결과는 시험이 완료된 후 표시됩니다. 추정 양성 결과는 원하는 방법을 사용하거나 현지 규정에 지정된 대로 확인되어야 합니다[1, 2].

Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터*는 시험 기법에 대해 적절한 교육을 받은 전문가들이 실험실 환경에서 사용하도록 고안되었습니다. Neogen은 식품이나 음료가 아닌 다른 산업에서의 이 제품 사용을 문서화하지 않았습니다. 예를 들어 Neogen은 약품, 화장품, 임상 또는 수의학 시료 시험에 대해 이 제품을 문서화하지 않았습니다. Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터*는 가능한 모든 식품, 식품 가공, 시험 프로토콜 또는 가능한 모든 박테리아 변종에 평가되지는 않았습니다.

모든 시험 방법처럼 증균 배지의 원료, 제조법 및 특성은 결과에 영향을 미칠 수 있습니다. 시료 추출 방법, 검사 계획서, 시료 준비(균질화 및 혼합 포함), 조작 및 실험 기법 또한 결과에 영향을 미칠 수 있습니다. Neogen은 충분한 수의 특정 식품 시료 및/또는 환경 시료와 미생물을 이용하여 사용자의 환경에서 사용자의 기준을 충족하는지 확인하기 위해 증균 배지를 포함한 해당 방법의 평가를 권장합니다.

Neogen은 펩톤식염완충액(Buffered Peptone Water) ISO를 증균 액체 배지로 사용하여 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *크로노박터*를 평가했습니다.

Neogen® 분자 검출기는 시료에 있는 유기체를 파괴하기 위한 Lysis 단계 중에 열처리를 거친 시료와 함께 사용하기 위한 것입니다. Lysis 단계 동안 적절하게 열처리가 되지 않은 샘플은 잠재적인 생물학적 위험으로 간주되어 Neogen 분자 검출기에 절대로 삽입하지 마십시오.

Neogen Food Safety는 설계 및 제조에 관한 ISO(International Organization for Standardization) 9001 인증을 받았습니다.

Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터* 시험 키트에는 표 1에 설명된 바와 같이 96회 시험분이 포함되어 있습니다.

표 1. Neogen 분자 검출 키트 구성요소

항목	ID	수량	내용물	설명
Neogen® LS(Lysis Solution)	투명한 튜브의 분홍색 용액	96개(8개들이 튜브 12개 스트립)	튜브당 580µL의 LS	랙에 꽂혀 있고 바로 사용 가능함
Neogen® 분자 검출 키트 2 – *크로노박터* Reagent 튜브	오렌지-레드 색의 튜브	96개(8개들이 튜브 12개 스트립)	동결 건조된 특정 증폭 및 검출 혼합물	사용 준비됨
예비 캡	오렌지-레드 캡	96개(8개들이 캡 12개 스트립)		사용 준비됨
Neogen® Reagent 컨트롤(RC)	투명 플립톱 튜브	16개(8개들이 개별 튜브 2개 파우치)	동결 건조된 컨트롤 DNA, 증폭 및 검출 혼합물	사용 준비됨

키트에 제공되지 않는 음성 대조군은 멸균된 증균 배지(예: BPW ISO)를 사용합니다. 물을 음성 대조군으로 사용하지 마십시오.

안전

사용자는 Neogen 분자 검출 시스템 및 Neogen 분자 검출 키트 2 –*크로노박터*와 관련된 지침의 안전 정보 일체를 숙지하고 따라야 합니다. 나중에 참조할 수 있도록 안전 지침을 보관하십시오.

⚠**경고:** 피하지 못할 경우 사망이나 심각한 부상 및/또는 재산상의 손해를 초래할 수 있는 위험 상황을 의미합니다.

알림: 피하지 못할 경우 재산상의 피해를 초래할 수 있는 잠재적으로 위험한 상황을 나타냅니다.

⚠ 경고

인간 또는 동물의 상태를 진단하는 데 Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터*를 사용해서는 안 됩니다.

사용자는 현재의 적절한 실험 기법을 직원에게 교육해야 합니다. 예를 들어, Good Laboratory Practices[3] 또는 CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories(BMBL)[5] 등이 해당됩니다.

오염된 제품의 출고를 초래하는 위음성 결과와 관련된 위험을 줄이려면:
- 계획서를 준수하고 제품 설명서에 명시된 대로 정확하게 시험을 수행하십시오.
- Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터*를 보관할 때는 포장 및 제품 지침에 명시된 바를 따릅니다.
- Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터*는 유효 기간까지만 사용해야 합니다.
- Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터*는 내부 또는 제3자가 확인한 식품 및 식품 처리 환경 시료와 함께 사용합니다.
- Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터*에는 내부적으로 또는 타사에 의해 검증된 표면, 멸균제, 프로토콜 및 박테리아 종만 사용하십시오.
- 아릴 설포네이트 복합체가 함유된 Neutralizing Buffer(NB) 환경 시료의 경우, 테스트 전에 1:2 희석을 수행합니다(시료 1+멸균 증균배지 1). NB 증균액 10µL를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮기는 방법도 있습니다. 아릴설포네이트 화합물이 포함된 Neutralizaing 버퍼를 함유하는 Neogen® 샘플 핸들링 제품: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G 및 HS2410NB2G. 이 프로토콜은 NF Validation 연구 중에 시험하지 않았습니다.

화학물질 및 생물학적 유해 물질 노출 관련 위험을 줄이려면:
- 교육을 받은 사람의 통제하에 적절하게 준비된 실험실에서 병원성균 시험을 수행하십시오. 배양된 증균 배지 및 장비 또는 배양된 증균 배지에 접촉한 표면에는 인체 건강에 위험을 초래할 수 있을 정도의 병원성균이 들어있을 수 있습니다.
- 시약 및 오염된 시료를 다룰 때는 적절한 보호복과 보안경 착용을 비롯하여 항상 표준 실험실 안전 방침을 준수하십시오.
- 증폭 후 증균 배지 및 Reagent 튜브의 내용물과 접촉하지 않도록 하십시오.
- 증균 시료 및 관련 오염 폐기물은 해당 지역 및 국가 규정에 따라 폐기하십시오.
- 용해(Lysis) 단계에서 적절히 열처리되지 않은 샘플은 잠재적인 생물학적 위해물질로 간주될 수 있으므로, Neogen Molecular Detection 장비에 삽입해서는 안 됩니다.

시험을 준비하는 동안 교차 오염과 관련된 위험을 줄이려면:
- (사용자를 보호하고 뉴클레아제의 침투를 막기 위해) 항상 장갑을 착용해야 합니다.

환경 오염과 관련된 위험을 줄이기 위해 다음 사항을 준수하십시오:
- 폐기 요건과 관련된 해당 지역 및 국가 규정을 준수하십시오.

뜨거운 액체에 노출된 경우 가능한 위험을 줄이려면:
- 권장 가열 온도를 초과하지 마십시오.
- 권장 가열 시간을 초과하지 마십시오.
- 적절한 눈금이 있는 온도계를 사용하여 Neogen® 분자 검출 히팅 블록 인서트 온도를 확인하십시오(예: 부분 침지 온도계 또는 디지털 열전대 온도계. 전체 침지 온도계는 안됨). 온도계는 반드시 Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트의 지정된 장소에 놓아야 합니다.

참고

시험을 준비하는 동안 교차 오염과 관련된 위험을 줄이려면:
- 시약 펠릿 수화 전에 장갑을 교체하십시오.
- 멸균된 에어로졸 차단형(필터형) 분자 생물학 등급 피펫 팁의 사용을 권장합니다.
- 각 시료 이동 시 새 피펫 팁을 사용하십시오.
- 우수 실험실 관리기준을 적용하여 샘플을 증균에서 용해 튜브로 옮기십시오. 피펫 오염을 방지하려면 중간 분주 단계를 추가해야 할 수도 있습니다. 예를 들어 사용자는 증균된 각 샘플을 멸균 튜브로 옮길 수 있습니다.
- 해당되는 경우 살균 램프가 있는 분자생물학 워크스테이션을 사용하십시오.
- 주기적으로 물에 희석한 1~5%(v:v) 염소계 가정용 표백제 용액(차아염소산나트륨 함유) 또는 DNA 제거 용액을 사용하여 실험대와 장비(피펫, 캡/디캡 도구, 시약 튜브 랙 등)의 오염을 제거하십시오.

위양성 결과가 발생할 위험을 줄이려면:

- 증폭 후에는 시약 튜브를 절대 열지 마십시오.
- 오염된 튜브는 항상 물에 희석한 1~5%(v:v) 염소계 가정용 표백제 용액에 1시간 동안 담근 후 분석 준비 영역에서 떨어진 곳에 폐기하십시오.
- 증폭 후 Reagent 튜브는 절대 오토클레이브하지 마십시오.
- 시료 내 사멸 또는 불활화 처리된 크로노박터 세포의 DNA 등 유리 DNA가 고농도로 존재할 것으로 의심되는 경우, 추정 양성 증균액을 용해 단계 전에 DNA 제거 절차(예: DNase) 또는 PMAxx로 처리하여 주시기 바랍니다. 추가 지침은 Neogen 담당자에게 문의하십시오. 유리 DNA 제거는 NF VALIDATION 연구에서 평가되지 않았습니다.

폐기에 대한 추가 정보 및 현지 규정은 안전보건자료(SDS)를 참조하십시오.

구체적인 용도나 절차에 대하여 궁금한 점이 있으면 당사 웹 사이트(neogen.com)를 방문하거나 현지 Neogen 또는 판매업체로 문의하십시오.

사용자 책임

사용자는 제품 설명서와 정보를 숙지할 책임이 있습니다. 더 자세한 정보는 당사의 웹사이트 **neogen.com**를 참고하거나 현지 Neogen 또는 판매점에 문의하십시오.

검사 방법을 선택할 때는 시료 채취 방법, 검사 프로토콜, 균질화 및 혼합을 포함한 시료 준비, 취급, 실험실 기법 및 시료 자체와 같은 외부 요인이 결과에 영향을 미칠 수 있음을 인지해야 합니다.

시험 방법이나 제품을 선택할 때 선택된 시험 방법이 사용자의 기준을 충족할 수 있도록 적합한 매트릭스와 미생물 유발 시험을 사용하여 충분한 수의 시료를 평가하는 것은 사용자의 책임입니다.

또한 사용자에게는 여느 테스트 방법 및 결과가 해당 고객 및 공급자의 요구 사항을 충족하는지 판단할 책임이 있습니다.

여느 테스트 방법과 마찬가지로 Neogen Food Safety 제품을 사용하여 얻은 결과가 테스트된 매트릭스나 프로세스의 품질을 보장하는 것은 아닙니다.

구현 과정에서 고객이 해당 방법의 목적 적합성을 평가할 수 있도록 Neogen은 Neogen Molecular Detection Matrix Control 키트(ISO 24914:2026[6]에서는 amplification control 이라고도 함)를 개발했습니다. Matrix Control(MDMC96)을 사용하여 유효성 확인 및 검증 과정에서 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *크로노박터* 결과에 미치는 매트릭스 간섭을 평가하십시오. 시험법 성능을 검증하고 실험실 내 적용 범위를 정의할 때 필요한 대표성 있는 시료 수를 결정하기 위해 ISO 16140-3:2021[7] 표준 및/또는 조직의 품질보증 프로그램을 따르십시오. 시험법이 검증되고 실험실의 적용 범위가 확립되면 Neogen Molecular Detection Matrix Control의 정기적인 사용은 필요하지 않습니다. Neogen Molecular Detection Matrix Control의 필요성과 정기 검사 중 사용 빈도를 사례별로 판단하기 위해 조직의 품질 보증 프로그램을 따르십시오.

매트릭스는 조성 및 제조 공정 같은 고유한 특성이 있는 제품 유형으로 정의할 수 있습니다. 매트릭스 간의 차이는 원료의 처리 방식이나 시험에 사용되는 형태의 차이로 인해 발생할 수 있습니다. 예를 들어 생(raw) 제품과 저온살균(pasteurized) 제품, 신선 제품과 건조 제품 등의 차이가 이에 해당됩니다.

보증의 한계/제한적 구제

개별 제품 포장의 제한적 보증 부분에 명시된 경우를 제외하고, NEOGEN은 상품성 또는 특정 용도 적합성에 대한 보증을 포함한 어떤 명시적이거나 암묵적인 보증도 거부합니다. Neogen Food Safety 제품에 결함이 있을 경우, Neogen이나 그의 공식 판매업체는 자체 판단에 따라 제품을 교체하거나 구매 금액을 환불해 드립니다. 다음은 귀하의 유일한 구제 방법입니다. 귀하는 제품에서 의심되는 결함을 발견한 날로부터 60일 이내에 Neogen에 즉시 통지하고 Neogen에 해당 제품을 반환해야 합니다. 추가 질문이 있으면 Neogen 담당자 또는 Neogen 공인 대리점에 문의하십시오.

Neogen의 전체 약관을 확인하려면 다음 페이지를 방문하십시오: https://neogen.com/en/terms-and-conditions/

Neogen 책임의 한계

NEOGEN은 수익의 상실을 포함하여 어떤 직접적인, 간접적인, 특별한, 부수적인, 결과적인 손해나 손실에 대해서도 책임지지 않습니다. 법 이론에 따른 Neogen의 책임은 어떤 경우에도 결함이 있다고 주장된 제품의 구매 대금을 초과하지 않습니다.

보관 및 폐기

Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터*는 2-8°C에서 보관합니다. 동결시키지 마십시오. 보관 중 키트가 빛을 받지 않도록 하십시오. 키트를 열어 보고 호일 파우치가 손상되지 않았는지 확인합니다. 파우치가 손상된 경우 사용하지 마십시오. 개봉 후, 사용하지 않은 Reagent 튜브는 항상 다시 밀봉 가능한 파우치에 건조제와 함께 넣어 보관하여 건조 동결된 시약의 안정성을 유지해야 합니다. 다시 밀봉한 제품은 최대 60일 동안 2-8°C에서 보관하십시오.

유효 기간이 지난 Neogen 분자 검출 키트 2 – 크로노박터는 사용하지 마십시오. 유통기한과 품목 번호는 상자의 외부 라벨에 기입되어 있습니다. 사용하고 난 증균 배지와 Neogen 분자 검출 키트 2 – 크로노박터용 튜브에는 잠재적으로 병원성 물질이 들어 있을 수 있습니다. 시험이 완료되면 오염 폐기물의 처리에 관한 해당 지역 및 국가 규정을 준수하십시오. 폐기에 대한 추가 정보 및 현지 규정은 안전보건자료(SDS)를 참조하십시오.

사용 지침

모든 지침을 주의 깊게 준수하십시오. 그렇지 않으면 부정확한 결과가 나올 수 있습니다.

주기적으로 물에 희석한 1~5%(v:v) 염소계 가정용 표백제 용액 또는 DNA 제거 용액을 사용하여 실험대와 장비(피펫, 캡/디캡 도구, 시약 튜브 랙 등)의 오염을 제거하십시오.

사용자는 “설치 적격성 평가(IQ) / 운전 적격성 평가(OQ) 프로토콜 및 Neogen Molecular Detection 시스템” 문서[8]지침에 설명된 대로, Neogen Molecular Detection 시스템 운전 적격성 평가 훈련을 완료해야 합니다.

특정 요건에 관해서는 "검증 방법 관련 상세 설명" 섹션을 참조하십시오.

AOAC® Official Method of AnalysisSM 2018.01 및 Performance TestedSM 인증서 번호 101703에 따른 증균 프로토콜은 표 3 및 표 4를 참조하십시오.

NF VALIDATION 인증서 3M 01/20-03/18에 따른 증균 프로토콜은 표 5를 참조하십시오.

시료 증균

표 2, 3, 4 또는 5는 식품, 사료 및 환경 시료를 위한 일반 증균 프로토콜에 대한 지침을 제공합니다.

다른 시료 추출법, 증균 프로토콜 또는 희석 비율을 검증하여 이 시험 방법이 사용자의 기준을 충족하도록 하는 것은 사용자의 책임입니다.

식품, 환경 분말, 먼지, 이물질, 스펀지

1. 증균 프로토콜에 달리 명시되지 않는 한, 증균 배지를 상온(20~25°C)에 도달하도록 평형화하십시오(표 2, 3, 4 또는 5 참조).
2. 증균 배지와 시료를 무균적으로 혼합하고, 2 ± 0.2분 동안 또는 모든 덩어리가 완전히 용해되고 증균 현탁액이 균질해질 때까지 블렌딩, 스토마칭, 볼텍싱 또는 수동 혼합을 통해 충분히 균질화하십시오[9, 10].
   a. 시료 준비(균질화 및 혼합 포함), 조작 및 실험 기법이 결과에 영향을 미칠 수 있습니다.
   b. 입자가 매우 미세한 시료에 대해서는 필터 백을 사용하는 것이 좋습니다.
   c. 물에서 팽윤하고 점도가 높은 매트릭스(예: 곡물, 전분)의 경우, 점도가 적절히 낮아질 때까지 추가로 희석(> 1:10)하거나 BPW(ISO)[10]에 멸균 1%(w/v) 알파-아밀라아제를 첨가하는 것이 권장됩니다.
   d. 양이 많은 곡물 시료의 경우 덩어리가 생기지 않도록 자주 혼합하면서 액체에 분말 곡물을 천천히 추가하십시오.
3. 해당 프로토콜 표(표 2, 3, 4 또는 5 참조)에 명시된 대로 배양합니다.

표 2. 일반 증균 프로토콜

시료 매트릭스	시료 크기[1]	증균액량[1, 2]	증균 온도 (±1°C)	증균 시간 (hr)	시료 분석량
조제 분유(PIF) 및 건조 우유 분말, 대두 분말, 유청 분말, 유당, 쌀가루 및 말토덱스트린 등의 원료	1X 그램 시료	9XmL BPW(ISO) (1:10)	37	18~24	20µL
염분, 미네랄, 아미노산, DHA(docosahexaenoic acid) 및 비타민 등의 원료	1X 그램 시료	99XmL BPW(ISO) (1:100)	37	18~24	20µL
먼지, 이물질, 진공 흡수된 잔류물과 같은 건조 환경 시료	1X 그램 시료	9XmL BPW(ISO) (1:10)	37	18~24	20µL
10mL Letheen Broth 또는 D/E Neutralizaing Broth로 적신 환경 스펀지	시료 추출 기기 1개	90mL BPW(ISO) (1:10)	37	18~24	20µL

1. Neogen은 표 2의 희석 비율을 사용하여 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *크로노박터*를 최대 300g까지 평가했으며, 단 프로바이오틱스 함유 및 비함유 영아용 조제분유는 최대 400g까지 평가했습니다.
2. 증균액이 300mL보다 많을 시에는 **미리 가열된** BPW(ISO)를 사용하십시오(예: 시료 > 30그램).

검증 방법 관련 상세 설명

AOAC® *Official Method of Analysis℠*(OMA) 2018.01

AOAC® *Performance Tested℠*(PTM) 인증서 101703

PERFORMANCE TESTED
AOAC
RESEARCH INSTITUTE
LICENSE NUMBER 101703

AOAC Research Institute OMA℠및 PTM℠ 연구에서, Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터는 크로노박터 검출에 효과적인 방법이라는 점이 밝혀졌습니다.* 해당 연구에서 테스트된 매트릭스는 표 3과 4에 나와 있습니다.

표 3과 4에 따라 시료를 준비하고, 2 ± 0.2분 동안 또는 모든 덩어리가 완전히 용해되고 증균 현탁액이 균질해질 때까지 블렌딩, 스토마킹, 볼텍싱 또는 수동 혼합을 통해 충분히 균질화하십시오[9, 10].

표 3. AOAC® *OMA℠* 2018.01 및 *PTM℠* 101703에 따른 증균 프로토콜

시료 매트릭스	시료 크기	증균액량[1]	증균 온도 (±1°C)	증균 시간 (hr)	시료 분석량
프로바이오틱스 함유 분말 영아용 조제분유	10g	BPW(ISO)(1:10) 90mL	37	18~24	20µL
	300g	BPW(ISO) 2700mL + Vancomycin 10mg/L)[b]	37로 예열	22~24	20µL
프로바이오틱스 비함유 분말 영아용 곡류식	10g	BPW(ISO)(1:10) 90mL	37	18~24	20µL
	300g	BPW(ISO)(1:10) 2700mL	37로 예열	18~24	20µL
유당 분말	10g	BPW(ISO)(1:10) 90mL	37	18~24	20µL
스테인리스 스틸(4" x 4")[c]	스폰지 1개	BPW(ISO)(1:10) 90mL	37	18~24	20µL

[a]증균액이 300mL보다 많을 시에는 **미리 가열된** BPW ISO를 사용하십시오.

[b]최종 농도

[c]환경 스폰지는 10mL의 DE Neutralizing Broth로 미리 적셔져 있습니다.

표 4. AOAC® *PTM℠* 101703에 따른 증균 프로토콜

시료 매트릭스	시료 크기	증균액량[1]	증균 온도 (±1°C)	증균 시간(hr)	시료 분석량
프로바이오틱스 함유 분말 영아용 조제분유	400[a]g	BPW(ISO) 3600mL + Vancomycin 10mg/L)	37로 예열	22~24	20µL
프로바이오틱스 비함유 분말 영아용 조제분유	400[a]g	3600 mL BPW (ISO) (1:10)	37로 예열	22~24	20µL

[a]AOAC PTM 승인을 받은 매트릭스와 함께 유리 DNA 제거 절차 사용.

자세한 내용은 유리 DNA 제거 지침을 참조하십시오.

AFNOR Certification에 의한 NF Validation

3M 01/20-03/18

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

유효기간 관련하여 상세 정보는 상기에 명시한 웹 사이트에 있는 NF VALIDATION 인증서를 참고하십시오.

ISO 22964:2017[2]과 비교하여 ISO 16140-2:2016[11]을 준수하는 NF VALIDATION 인증을 받은 방법입니다.

검증의 범위: 조제 분유와 유아용 분말 시리얼(생균제 포함 또는 미포함), 원료 및 환경 시료.

시료 준비: 시료는 EN ISO 22694:2017[2] 및 EN ISO 6887[9, 10]에 따라 준비해야 합니다.

소프트웨어 버전: 인증서 참고.

표 5. NF VALIDATION 인증 방법 3M 01/20-03/18에 따른 증균 프로토콜

시료 매트릭스	시료 크기	증균액량[1]	증균 온도 (±1°C)	증균 시간 (hr)	시료 분석량	권장 중단 시점[2, 3]
• 조제 분유 • 유아용 분말 시리얼 • 건조 우유 분말, 대두 분말, 유청 분말, 유당, 쌀가루, 말토덱스트린 등의 성분 • 먼지, 이물질, 진공 흡수된 잔류물과 같은 건조 환경 시료	10g	90mL BPW(ISO) (1:10)	37	18~24	20µL	증균액 또는 시료 용해물은 최대 72시간까지 2~8°C에서 보관할 수 있습니다.
• 스폰지, 헹굼물, 닦개	시료 추출 기기 1개 또는 10mL					증균액 또는 시료 용해물은 최대 72시간까지 2~8°C에서 보관할 수 있습니다.
조제 분유와 유아용 분말 시리얼(비생균제)	30~300g	BPW(ISO) (1:10)	37	18~24	20µL	증균액 또는 시료 용해물은 최대 72시간까지 2~8°C에서 보관할 수 있습니다.
유아용 분말 시리얼과 조제 분유(생균제 포함)	30~300g	BPW(ISO) + 10mg/L 반코마이신 (1:10)	37	22~24	20µL	없음

1. 증균액이 300mL보다 많을 시에는 미리 가열된 BPW ISO를 사용하십시오(예: 시료 > 30그램).
2. 증균액을 보관소에서 꺼낸 후 Lysis 섹션의 1단계부터 시험을 다시 시작하십시오. 시료 용해물을 보관소에서 꺼낸 후 Lysis 섹션의 7단계부터 시험을 다시 시작하십시오.
3. 저장된 열처리 용해물의 재시험은 부록 A를 참조하십시오.

Neogen® 분자 검출 스피드 로더 트레이 준비

1. 1-5%(v:v 물) 가정용 표백 용액을 천 또는 1회용 타월에 적셔 Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이를 닦습니다.
2. 물로 Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이를 헹굽니다.
3. 1회용 타월을 사용하여 Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이를 닦아서 말립니다.
4. 사용하기 전에 Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이가 마른 상태인지 확인하십시오.

이 절차에는 Neogen Molecular Detection 히팅/칠링 블록 인서트 2개가 필요합니다. 두 인서트는 동일한 제품(700000145)이지만 서로 다른 용도로 사용됩니다.

절차상 명확성을 위해 가열 단계에 사용되는 인서트는 Molecular Detection 히팅 블록 인서트, 냉각 단계에 사용되는 인서트는 Molecular Detection 칠링 블록 인서트라고 지칭합니다. 이러한 명칭은 역할을 구분하기 위한 것일 뿐이며, 별도의 제품을 의미하지는 않습니다.

Neogen® 분자 검출 냉각 블록 인서트 준비

Neogen Molecular Detection 칠링 블록 인서트를 실험실 벤치 위에 직접 올려 놓습니다. 주변 실험실 온도(20~25°C)에서 블록을 사용하십시오.

Neogen® 분자 검출 히팅 블록 인서트 준비

건조 이중 블록 히터 장치에 Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트를 놓습니다. 건조 블록 히터 장치를 켜고 Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트가 100±1°C를 유지할 수 있도록 합니다.

참고: 히터 장치에 따라, Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트가 온도에 도달하는 데 약 30분이 걸릴 수 있습니다. 적절한 눈금이 있는 온도계(예: 부분 침지 온도계 또는 디지털 열전대 온도계. 전체 침지 온도계는 아님)를 지정된 위치에 놓아 Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트의 온도가 100±1°C인지 확인합니다.

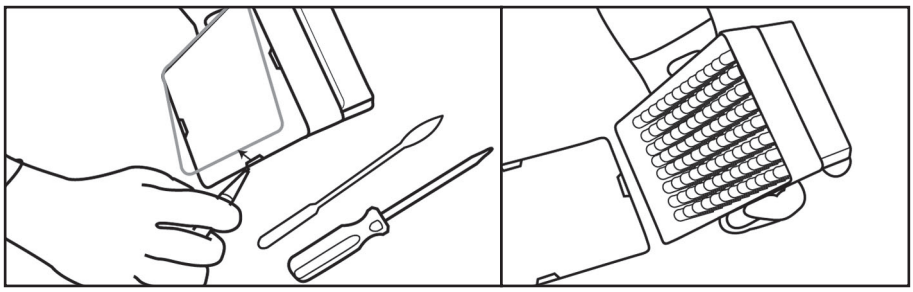
Neogen® 분자 검출기 준비

1. Neogen® 분자 검출 소프트웨어를 시작하고 로그인합니다. 소프트웨어가 최신 업데이트 버전인지 확인하려면 Neogen Food Safety 담당자에게 문의하십시오.
2. Neogen 분자 검출기를 켭니다.
3. 각 시료에 대한 데이터를 포함하는 실행을 만들거나 편집합니다. 자세한 내용은 Neogen 분자 검출 시스템 사용 설명서를 참조하십시오.

참고: 반응 튜브를 포함한 Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이를 삽입하기 전에 Neogen 분자 검출기는 준비 상태에 도달해야 합니다. 이 가열 단계는 약 20분이 걸리며 완료되면 기기의 상태 표시줄에 주황색 등이 켜집니다. 기기가 실행할 준비가 되면 상태 표시줄이 녹색으로 바뀝니다.

LYSIS

Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트에 부착하기 전에 스크루드라이버로 Neogen Lysis Solution 랙의 하단을 제거합니다.



1. 랙을 주변 온도(20~25°C)에서 하룻밤 동안(16~18시간) 두어 Neogen Lysis Solution 튜브를 예열합니다. Neogen Lysis Solution 튜브를 주변 온도로 평형시키는 또 다른 방법은 최소 2시간 동안 실험실 벤치에 Neogen Lysis Solution 튜브를 두거나, 37±1°C 배양기에 1시간 동안 Neogen Lysis Solution 튜브를 배양하거나 100±1°C의 건조한 이중 블록 히터에 30초간 두는 것입니다.
2. 캡을 씌운 튜브를 뒤집어 섞습니다. 뒤집은 다음 4시간 이내에 다음 단계를 진행하십시오.
3. 배양기에서 증균 시료를 꺼내십시오.

4. 각 시료와 NC 시료(멸균 증균 배지)에 Neogen Lysis Solution 튜브 1개가 필요합니다.

   4.1 Neogen Lysis Solution 튜브 스트립을 원하는 수로 자를 수 있습니다. 필요한 개별 Neogen Lysis Solution 튜브 또는 8-튜브 스트립 수를 선택합니다. Neogen Lysis Solution 튜브를 빈 랙에 놓습니다.

   4.2 교차 오염을 방지하기 위해 한 번에 하나씩 Neogen Lysis Solution 튜브 스트립의 캡을 벗기고 각 분주 단계에 새 피펫 팁을 사용합니다.

   4.3 아래 설명된 대로, 증균된 시료를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮깁니다.

   > 각 증균된 시료를 개별 Neogen Lysis Solution 튜브로 **먼저** 옮깁니다. NC를 **마지막**으로 옮깁니다.

   4.4 Neogen® 분자 검출 Lysis Cap/Decap Tool을 사용하여 한 번에 스트립 하나씩, Neogen Lysis Solution 튜브 스트립 1개의 캡을 벗깁니다.

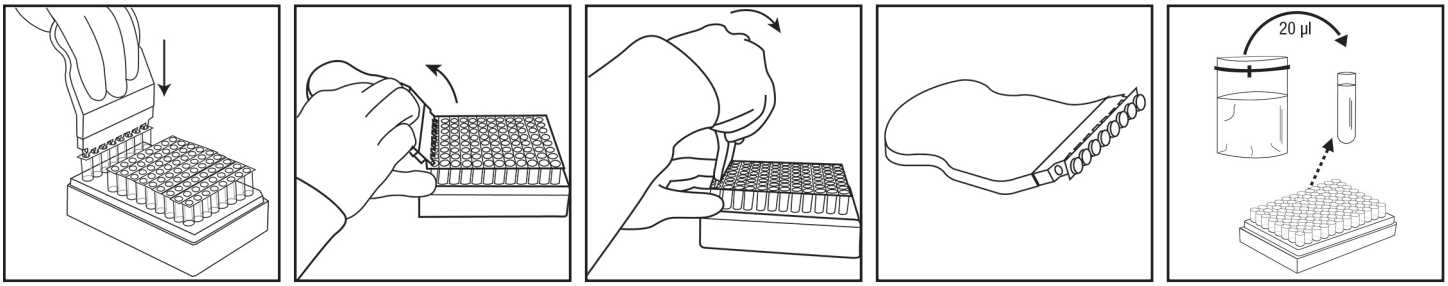
   4.5 Neogen Lysis Solution 튜브 캡 폐기 – 재시험을 위해 용해물을 그대로 둘 경우 캡을 깨끗한 용기에 두어 용해 후 다시 사용할 수 있도록 합니다.

      4.5.1. 보존된 용해물 처리에 대해서는 부록 A를 참조하십시오.

   4.6 점성 있는 시료를 사용할 때는 여과된 쪽의 시료를 수집하기 전에 증균 백을 저어주십시오.

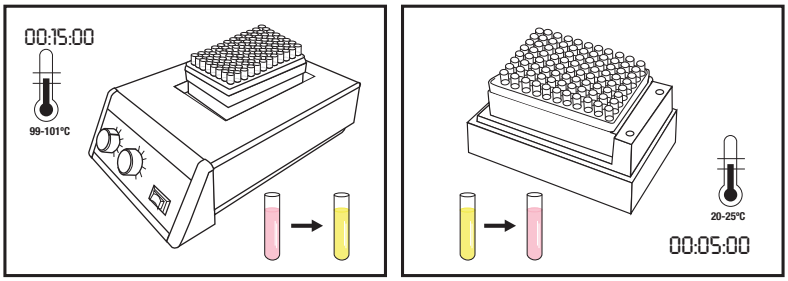
   4.7 프로토콜 표에 별다른 표시가 없으면 20µl의 시료를 Neogen Lysis Solution 튜브에 옮기십시오.

5. 각 시료가 스트립의 해당 Neogen Lysis Solution 튜브에 추가될 때까지 4.4~4.7단계를 반복합니다.



6. 모든 시료를 옮겼을 때 NC(멸균 증균 배지, 예: BPW) 20µL를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮깁니다. 물을 NC로 사용하지 마십시오.
7. Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트의 온도가 100±1°C인지 확인합니다.
8. 가열 단계: Neogen Lysis Solution 튜브가 들어 있는 덮개를 제거한 랙을 Neogen Molecular Detection 히팅 블록 인서트에 놓고 15 ± 1분간 가열하십시오.

   Lysis 단계 동안 적절하게 열처리가 되지 않은 샘플은 잠재적인 생물학적 위험으로 간주되어 Neogen 분자 검출기에 절대로 삽입하지 마십시오.
9. 냉각 단계: Neogen Lysis Solution 튜브가 들어 있는 덮개를 제거한 랙을 Neogen Molecular Detection 히팅 블록에서 꺼내 Neogen Molecular Detection 칠링 블록 인서트에서 최소 5분, 최대 10분 동안 냉각하십시오. Neogen® Molecular Detection 칠링 블록 트레이 없이 상온에서 사용하는 Neogen Molecular Detection 칠링 블록 인서트는 실험대에 직접 놓아야 합니다. 냉각 과정에서 Neogen Lysis Solution은 다시 분홍색으로 변합니다.
10. Neogen Lysis Solution 튜브의 랙을 Neogen 분자 검출 냉각 블록 인서트에서 제거합니다.

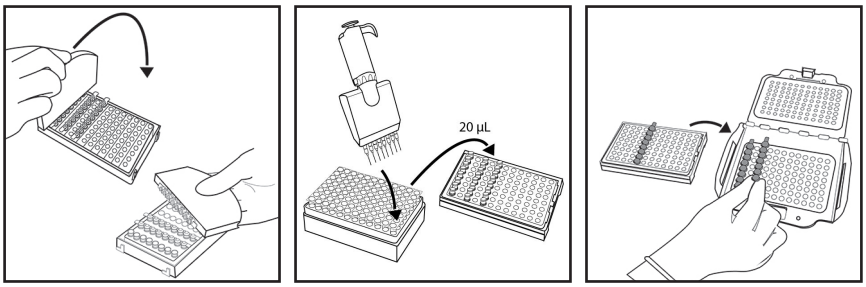


증폭

1. 각 시료와 NC를 위해 1개의 Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터* Reagent 튜브가 필요합니다.
   1.1 튜브 스트립을 원하는 튜브 개수로 자를 수 있습니다. 개별 Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터* Reagent 튜브 또는 필요한 8-튜브 스트립 수를 선택합니다.
   1.2 Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터* Reagent 튜브를 빈 랙에 놓습니다.
   1.3 튜브 맨 아래 시약 알갱이를 휘젓지 마십시오.
2. 하나의 Neogen Reagent 컨트롤 튜브를 선택하고 랙에 놓습니다.
3. 교차 오염을 방지하기 위해 한 번에 Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터* Reagent 튜브 스트립 1개의 캡을 벗기고 각 분주 단계마다 새 피펫을 사용합니다.
4. 아래 설명된 대로 각 용해물을 Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터* Reagent 튜브 및 Neogen Reagent 컨트롤 튜브로 옮깁니다.

   각 시료 용해물을 개별 Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터* Reagent 튜브로 **먼저** 옮긴 뒤 NC를 옮기십시오. **마지막에** Neogen Reagent 컨트롤 튜브를 수화합니다.

5. Neogen® 분자 검출 Reagent Cap/Decap Tool을 사용하여 한 번에 Reagent 튜브 스트립 하나씩 Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터* Reagent 튜브를 벗깁니다. 캡을 버리십시오.
   5.1 **Neogen Lysis Solution 튜브에서 용액의 상부 1/2에서 시료 용해물 20µL를 침전되지 않도록 하여 해당 Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터* Reagent 튜브로 옮깁니다. 알갱이가 휘저어져 섞이지 않도록 기울여 붓습니다. 위아래로 가볍게 5번을 피펫팅하여 섞습니다.**
   5.2 개별 시료 용해물이 스트립의 해당 Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터* Reagent 튜브에 추가될 때까지 5.1단계를 반복합니다.
   5.3 제공된 여분의 마개로 Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터* Reagent 튜브를 덮고, Neogen 분자 검출 Reagent Cap/Decap Tool을의 둥근 면을 사용하여 앞뒤로 압력을 가하여 캡이 단단히 닫혀 있는지 확인하십시오.
   5.4 시험할 시료 수에 대해, 필요한 만큼 5.1~5.3단계를 반복합니다.
   5.5 모든 시료 용해물을 옮긴 후 5.1~5.3단계를 반복하여 NC 용해물 20µL를 Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터* Reagent 튜브로 옮깁니다.
   5.6 **NC 용해물 20µL를 Neogen Reagent 컨트롤 튜브**로 옮깁니다. 알갱이가 휘저어져 섞이지 않도록 기울여 붓습니다. 위아래로 가볍게 5번을 피펫팅하여 섞습니다.
6. 캡이 씌워진 튜브를 깨끗하고 오염되지 않은 Neogen 분자 검출 간편 장착 트레이에 내려 놓습니다. Neogen 분자 검출 간편 장착 트레이 뚜껑을 닫고 걸쇠로 잠급니다.



7. Neogen Molecular Detection 시스템 소프트웨어에서 설정된 런을 검토하고 확인하십시오.
8. 소프트웨어에서 시작 버튼을 클릭하고 사용할 기기를 선택합니다. 선택한 기기의 뚜껑이 자동으로 열립니다.
9. Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이를 Neogen 분자 검출기에 놓고 뚜껑을 닫으면 시험이 시작됩니다. 결과는 60분 이내에 제공되지만 양성 여부는 더 일찍 검출할 수 있습니다.
10. 분석이 완료된 후, Neogen Molecular Detection 스피드 로더 트레이를 Neogen Molecular Detection 기기에서 제거하고, 튜브를 물에 희석한 1~5%(v:v) 염소계 가정용 표백제 용액에 1시간 동안 담근 후 분석 준비 구역에서 떨어진 곳에 폐기하십시오.

알림: 교차 오염으로 인한 위양성의 위험을 최소화하려면 증폭된 DNA를 함유한 Reagent 튜브를 절대 열지 마십시오. 여기에는 Neogen 분자 검출 키트 2 – 크로노박터 Reagent, Neogen Reagent 컨트롤 및 Neogen 매트릭스 컨트롤 튜브가 포함됩니다. 밀봉된 시약 튜브는 항상 물에 희석한 1~5%(v:v) 염소계 가정용 표백제 용액에 1시간 동안 담근 후 분석 준비 구역에서 떨어진 곳에 폐기하십시오.

결과 및 해석

알고리즘은 핵산증폭을 탐지할 때 생성되는 빛 출력 곡선을 해석합니다. 결과는 소프트웨어에 의해 자동으로 분석되고 결과에 기반하여 색상으로 구분됩니다. 양성 또는 음성 결과는 다양한 고유 곡선 매개변수의 분석으로 판별됩니다. 추정 양성 결과는 실시간으로 보고되는 반면, 음성 결과는 실행이 완료된 후 표시됩니다.

추정 양성 증균액은 실험실 표준 운영 절차 또는 적절한 기준 방법에 따른 확인 절차[1,2]에 따라 확인 시험을 진행해야 합니다. 확인 시험은 1차 증균액(BPW ISO 또는 10mg/L의 vancomycin이 첨가된 BPW ISO)에서 2차 증균 액체 배지로 옮기는 단계부터 시작하며, 이후 적절한 배지에 접종하여 분리한 후 적절한 생화학적, 혈청학적 및/또는 분자학적 방법을 사용하여 분리균를 확인합니다.

참고: 시스템과 Neogen 분자 검출 키트 2 – *크로노박터*용 증폭 시약은 "배경" RLU(Relative Light Unit)를 가지므로 음성 시료도 0을 기록값으로 제공하지 않습니다.

드물게 비정상적인 발광 신호가 발생하는 경우 알고리즘은 해당 결과를 'Inspect'로 표시합니다. Neogen은 Inspect로 표시된 모든 시료에 대해 반복 시험할 것을 권장합니다. 결과가 계속 Inspect로 표시되는 경우 선호하는 방법 또는 현지 규정에 명시된 방법을 사용하여 확인 시험을 진행하십시오.[1,2]

표 6. 다양한 소프트웨어 결과의 기호 및 정보

웰 유형	웰 결과 기호	결과	판독
시료		양성	이 시료는 타겟 병원성 미생물 검사 결과 추정 양성입니다.
시료		음성	이 시료는 타겟 병원성 미생물 검사 결과 음성입니다.
시료		억제됨*	이 시료 매트릭스에 의해 시험이 억제되었습니다. 재검사가 필요할 수 있습니다.
시료		검사	타겟 병원성 미생물의 존재 여부를 판정할 수 없습니다. 재검사가 필요할 수 있습니다.
시료		오류*	생체발광 값은 검출되지 않았습니다. 재검사가 필요할 수 있습니다.

*결과에 대한 추가 정보는 런 보고서를 참조하십시오. 필요한 경우, 현재 Neogen 담당자에게 연락하여 문제 해결에 도움을 받으십시오.

유리 DNA 제거 지침

참고: 유리 DNA 제거는 NF VALIDATION 연구의 일부로 평가되지 않았습니다.

1. PMAxx

a. 분자생물학 등급의 물(Molecular grade water, MGW) 45µL를 마이크로튜브에 옮깁니다.

b. 45µL의 MGW가 들어 있는 마이크로튜브에 PMAxx™ 염료(20mM) 5µL를 직접 분주합니다. 피펫팅을 위아래로 부드럽게 반복하여 혼합합니다.

참고: 용액은 차광하여 최대 1시간 동안 냉장 보관할 수 있습니다.

c. 증균 시료 400µL를 마이크로원심분리 튜브에 옮깁니다.

d. 조도가 낮은 조건에서 시료 분취액에 PMAxx 용액 5µL를 첨가합니다.

e. 마이크로튜브를 덮고 차광한 상태로 회전기에 놓고 10분간 회전시킵니다.

f. PMAxx 처리된 튜브를 PMA-Lite™ 기기에 넣고 10분간 처리합니다.

g. 각 튜브를 3초간 볼텍싱한 후 튜브를 다시 PMA-Lite에 넣고 추가로 10분간 처리합니다.

h. PMAxx 처리된 시료 20µL를 Neogen Lysis Solution 튜브에 옮기고 용해 단계를 진행합니다.

2. Cronobacter Selective Broth (CSB)

a. 1차 증균 배양물 0.1mL를 CSB 10mL에 옮깁니다.

b. 41.5 ± 1°C에서 24 ± 2시간 동안 배양합니다.

c. 배양 후 용해 단계를 진행합니다.

NF VALIDATION 방법에 따라 결과를 확인

NF VALIDATION에서는 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *크로노박터에서* 양성으로 판정된 모든 시료를 다음 시험 중 하나를 통해 확인해야 합니다. 확인 시험은 배양 기간 종료 후 72시간 이내에 +2~+8°C에서 보관한 증균 액체 배지를 사용하여 수행해야 합니다.

옵션 1: BPW ISO 증균부터 시작하여 ISO 22964:2017[2] 표준을 사용합니다.

- CSB에 계대배양(1/10 희석)하고 41.5 ± 1°C에서 24 ± 2시간 동안 배양합니다.
- CCI 한천에 획선 도말하고 41.5 ± 1°C에서 24 ± 2시간 동안 배양합니다.
- 최대 5개의 전형적인 집락을 비선택성 배지에 획선 도말하고 37 ± 1°C에서 21 ± 3시간 동안 배양합니다.
- 적절한 생화학적 확인 시험(산화효소 시험 및 생화학 동정 키트)을 수행합니다.

옵션 2: 선택 배지에서 분리된 집락을 대상으로 ISO 7218:2024[4] 표준에 기술된 핵산 프로브를 사용하여 주십시오(옵션 1 참조). ISO 7218:2024 규정에 따라, 분자 스크리닝 분석법은 서로 다른 프라이머 및/또는 프로브를 사용하여 다른 유전자 영역을 표적으로 하는 2차 분자 분석법으로 확인 절차를 거칠 수 있습니다. 확인 시험 방법은 집락 확인을 위해 평가된 시험 절차 및 시약을 바탕으로, 적절한 ISO 16140 표준에 따라 검증되어야 합니다.

옵션 3: NF VALIDATION에서 인증한 다른 방법을 사용합니다. 단, 해당 방법의 원리는 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *크로노박터*의 원리와 달라야 합니다. 이 두 번째 유효성 검사 방법에 대해 설명된 전체 프로토콜을 사용해야 합니다. 확인 시작 전의 모든 단계는 두 방법 모두에 공통적이어야 합니다.

결과가 불일치하는 경우(Neogen Molecular Detection Assay 2 - *크로노박터에서* 추정 양성이지만 위에 설명된 방법 중 하나로 확인되지 않은 경우), 실험실은 해당 실험실에서 수립한 표준 운영 절차에 따라 결과를 보고해야 합니다.

특정 용도 또는 절차에 대한 질문이 있으면, neogen.com 웹사이트를 참조하거나 Neogen 담당자 또는 공인 대리점에 문의하십시오.

부록 A. 시험 계획서 중단: 열처리된 용해물 보관 및 재시험

1. 열처리된 용해물을 보관하려면 깨끗한 캡으로 용해 튜브를 다시 씌웁니다(**Lysis** 섹션 4.5 참조).
2. 2-8°C에서 최대 72시간 동안 보관합니다.
3. 2-3번 뒤집어서 혼합하여 보관된 시료를 증폭하도록 준비합니다.
4. 튜브의 캡을 벗깁니다.
5. Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트에 혼합된 용해물 튜브를 놓고 100±1°C에서 5±1분 간 가열합니다.
6. Neogen Lysis Solution 튜브의 랙을 히팅 블록에서 제거하고 Neogen 분자 검출 냉각 블록 인서트에 최소 5분, 최대 10분 냉각시킵니다.
7. 위에서 상세히 설명한 **증폭** 섹션의 프로토콜을 계속합니다.

참조:

1. 미국 식품의약국 박테리아 분석 매뉴얼(BAM) 29장, 2012년 3월
2. ISO 22964:2017 식품 사슬의 미생물학 -- *크로노박터* 종의 수평 검출법
3. 미국 식품의약국. 미 연방 규정, 타이틀 21, 파트 58. 비임상 실험 연구에 대한 우수 실험실 기준.
4. ISO 7218:2024. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
5. CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMLB) 6th Edition. 시행 날짜: 2025년 8월 29일
6. ISO 24914:2026 Microbiology of the food chain — Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of microorganisms and associated genetic markers — General requirements and definitions. International Standard Organization (ISO), Geneva, Switzerland. www.iso.org

7. ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain — Method validation Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory
8. 설치 적격성 평가(IQ)/작동 적격성 평가(OQ) Neogen® 분자 검출 시스템. 본 문서의 사본을 얻으려면 Neogen Food Safety 담당자에게 문의하십시오.
9. ISO 6887-5:2020. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
10. ISO 6887-4:2017. 식품 및 동물 사료류의 미생물학 – 미생물학적 시험을 위한 시험 시료, 초기 현탁액 및 십진희석법 준비 -- 파트 4: 기타 제품 준비 관련 특수 규정.
11. ISO 16140-2:2016. 식품 사슬의 미생물학 – 방법 검증 – 파트 2: 참조 방법에 대한 대체(독점) 방법 검증 프로토콜.

위에 열거된 표준 방법의 최신 버전을 참고하십시오.

기호 설명

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
Auchincruive House
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

Neogen Corporation, 620 Lesher Place, Lansing, MI 48912 USA.
© Neogen Corporation 2026. All rights reserved. Neogen은 Neogen Corporation의 등록 상표입니다.
기타 모든 브랜드 및 제품 이름은 해당 회사의 상표 또는 등록 상표입니다. 특허: neogen.com/patents
FS00879B_0826