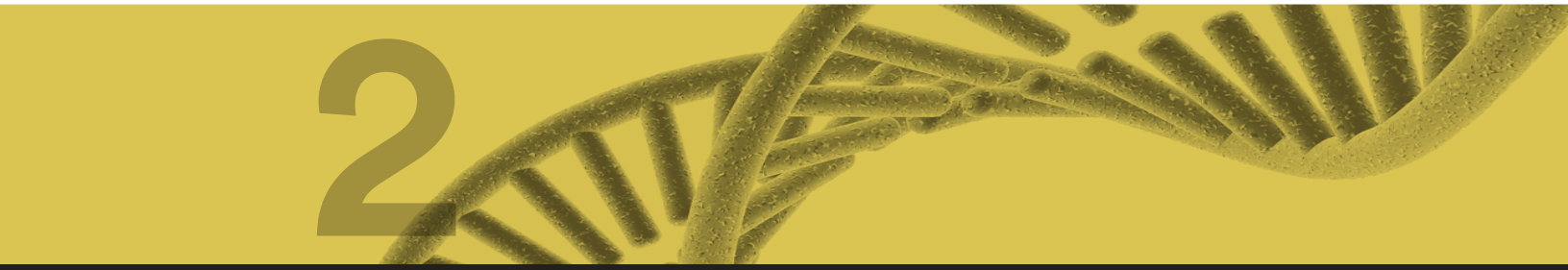
NEOGEN®

Product Instructions
MDA2LMO96

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



Listeria Monocytogenes

Issue Date: 2024-07

Product Instructions

Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes*

Product Description and Intended Use

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

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

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

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

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

***** Substitute: Sodium Phosphate, dibasic, dihydrate 12.0 g

Fraser Broth Supplement

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

Ferric Ammonium Citrate	0.5g/10mL
Final pH	7.2 ± 0.2 at 25°C

LESS Plus (g/L)

Peptone	15.0
Buffer	15.7
Growth enhancers	8.3
Selective mix	5.0
Final pH	7.0 ± 0.2 at 25°C

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

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

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

Table 1. Neogen Molecular Detection Assay Kit Components

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

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

Safety

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

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

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

⚠ WARNING

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

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

The user must train its personnel in current proper testing techniques: for example, general requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO/IEC 17025[4], or general requirements and guidance for microbiological examinations ISO 7218:2024[5].

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

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

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

- It is strongly recommended that female laboratory staff be informed of the risk to a developing fetus resulting from infection of the mother through exposure to *Listeria monocytogenes*.
- Perform pathogen testing in a properly equipped laboratory under the control of trained personnel. Incubated enrichment media and equipment or surfaces that have come into contact with incubated enrichment media may

contain pathogens at levels sufficient to cause risk to human health.
- Always follow standard laboratory safety practices, including wearing appropriate protective apparel and eye protection while handling reagents and contaminated samples.
- Avoid contact with the contents of the enrichment media and reagent tubes after amplification.
- Dispose of enriched samples according to current industry standards.
- Samples that have not been properly heat treated during the assay lysis step may be considered a potential biohazard and should NOT be inserted into the Neogen Molecular Detection Instrument.

To reduce the risks associated with cross-contamination while preparing the assay:
- Always wear gloves (to protect the user and prevent introduction of nucleases).

To reduce the risks associated with environmental contamination:
- Follow current industry standards for disposal of contaminated waste.

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

NOTICE

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

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

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

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

User Responsibility

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

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

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

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

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

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

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

Limitation of Warranties / Limited Remedy

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

Limitation of Neogen Liability

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

Storage and Disposal

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

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

Instructions for Use

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

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

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

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

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

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

Sample Enrichment

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

Foods

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

Raw Matrices (Raw Meat, Raw Dairy and Raw Seafood)

1. Allow the LESS Plus Broth enrichment medium to equilibrate to ambient laboratory temperature.
2. Aseptically combine the enrichment medium and sample according to Tables 2 or 4. For all meat and highly particulate samples, the use of filter bags is recommended.
3. Homogenize thoroughly by blending, stomaching, or hand mixing for 2 ± 0.2 minutes. Incubate at 37 ± 1°C according to Tables 2 or 4.

Environmental samples

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

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

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

1. Allow the Demi-Fraser Broth (includes ferric ammonium citrate) or LESS Plus Broth enrichment medium to equilibrate to ambient laboratory temperature.
2. Aseptically combine the enrichment medium and sample according to Tables 2, 3 or 4.
3. Homogenize thoroughly by blending, stomaching, or hand mixing for 2 ± 0.2 minutes. Incubate at 37 ± 1°C for 24-30 hours according to Tables 2, 3, or 4.

Table 2: General enrichment protocols at 37 ± 1 °C using Demi-Fraser Broth and Fraser Broth or LESS Plus Broth as needed.

Sample Matrix	Sample Size (g)	Demi-Fraser Broth Volume (mL)	Enrichment Time (hours)	Enrichment Temperature (°C)	Sample Analysis Volume (µL)
Heat-processed, cooked, cured meats, poultry, seafood and fish Heat-processed / pasteurized dairy products Produce and vegetables Multi-component foods	25	225	24-30	37 +- 1 for all	20 for all
Environmental samples[a]	1 sponge	100 or 225	24-30		
	1 swab	10	24-30		
Raw meat, poultry, seafood, fish	25	475	28-32		
Sample Matrix	**Sample Size (g)**	**LESS Plus Broth Volume (mL)**	**Enrichment Time (hours)**		
Raw meat, raw seafood, raw dairy	25	225	28-32		

Sample Matrix	Primary Enrichment (Demi-Fraser Broth)[a]			Secondary Enrichment (Fraser Broth)[a]			Sample Analysis Volume (µL)[b]
	Sample Size (g)	Enrichment Broth Volume (mL)	Enrichment Time (hours)	Sample Size	Enrichment Temperature (°C)	Enrichment Time (hours)	
Raw dairy products	25	225	20-24	Transfer 0.1 mL into 10 mL Fraser Broth	37 ± 1	20-24	10

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

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

Specific Instructions for Validated Methods
AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2016.08
AOAC® *Performance Tested Method*℠ #081501

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

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

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

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

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

(b) Homogenize sample by hand mixing.

(c) Homogenize sample by vortexing.

NF VALIDATION by AFNOR Certification

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

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

NF VALIDATION certified method in compliance with ISO 16140-2(6) in comparison to ISO 11290(3)
Scope of the validation: All human food and environmental samples (excluding primary production samples)
Sample preparation: Samples should be prepared according to EN ISO 11290-1(3) and EN ISO 6887(8)
Software version: See certificate

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

General Protocol	Sample Size (g)	Demi-Fraser Broth Volume (mL)	Enrichment Time (hours)	Enrichment Temperature (±1°C)	Sample Analysis Volume (µL)[a]	Accepted Interruption Point
All food samples (excepted raw meats, raw seafood, and raw dairy products	25	225	24-30	37	20	• Post Enrichment up to 72 hours • Lysate at -20°C • Lysate at 4°C up to 72 hours
Environmental samples	25, 1 swab, or 1 wipe					

Sample Matrix	Sample Size (g)	LESS Plus Broth Volume (mL)	Enrichment Time (hours)	Enrichment Temperature (±1°C)	Sample Analysis Volume (µL)
Raw meat, raw seafood, raw dairy	25	225	28-32	37	20

Specific Protocol	Primary Enrichment (Demi-Fraser Broth)[b]				Secondary Enrichment (Fraser Broth)[b]				Accepted Interruption Point
	Sample Size (g)	Enrichment Broth Volume (mL)	Enrichment Temperature (±1°C)	Enrichment Time (hours)	Sample Size	Enrichment Temperature (±1°C)	Enrichment Time (hours)	Sample Analysis Volume (µL)[c]	
Raw meats, raw seafood, and raw dairy products	25	225	37	20-24	Transfer 0.1 mL into 10 mL Fraser Broth	37	20-24	10	• Fraser Broth up to 72 hours • Lysate at -20°C • Lysate at 4°C up to 72 hours

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

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

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

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

Preparation of the Neogen® Molecular Detection Speed Loader Tray

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

Preparation of the Neogen® Molecular Detection Chill Block Insert

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

Preparation of the Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert

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

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

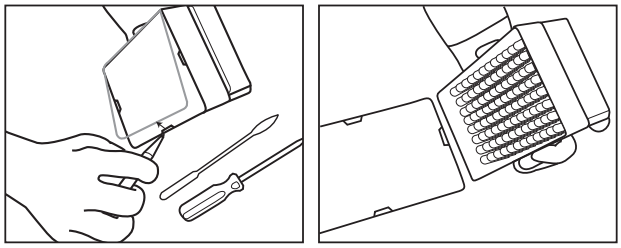
Preparation of the Neogen® Molecular Detection Instrument

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

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

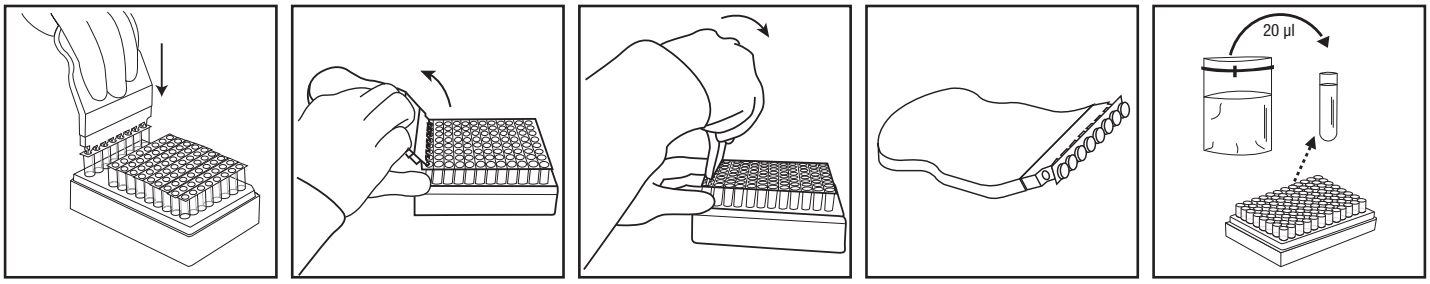
Lysis

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

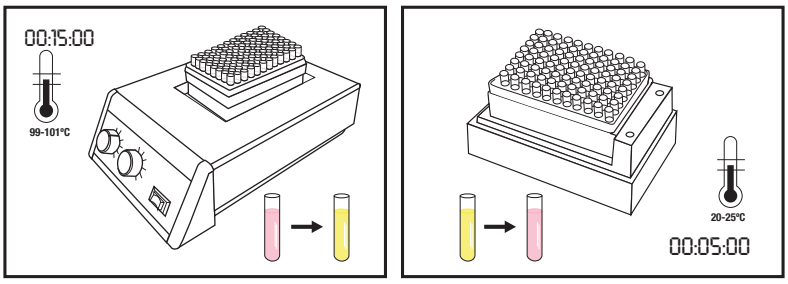


1. Allow the lysis solution (Neogen Lysis Solution) tubes to warm up by setting the rack at room temperature (20-25°C) overnight (16-18 hours). Alternatives to equilibrate the Neogen Lysis Solution tubes to room temperature are to set the Neogen Lysis Solution tubes on the laboratory bench for at least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

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



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



Amplification

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

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

5. Use the Neogen® Molecular Detection Cap/Decap Tool-Reagent to decap the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* Reagent Tubes –one Reagent tube strip at a time. Discard cap.
   5.1 **Transfer 20 µL of Sample lysate from the upper ½ of the liquid (avoid precipitate) in the Neogen Lysis Solution tube into corresponding Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* Reagent Tube. Dispense at an angle to avoid disturbing the pellets. Mix by gently pipetting up and down 5 times.**
   5.2 Repeat step 5.1 until individual Sample lysate has been added to a corresponding Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* Reagent Tube in the strip.

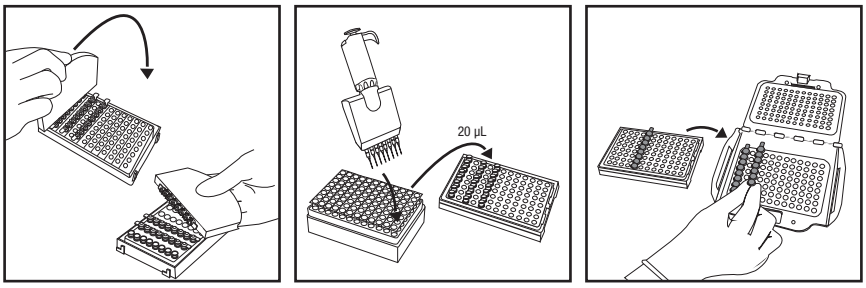
5.3 Cover the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* Reagent Tubes with the provided extra caps and use the rounded side of the Neogen Molecular Detection Cap/Decap Tool-Reagent to apply pressure in a back and forth motion ensuring that the cap is tightly applied.

5.4 Repeat step 5.1 to 5.3 as needed, for the number of samples to be tested.

5.5 When all sample lysates have been transferred, repeat steps 5.1 to transfer 20 µL of NC lysate into a Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* Reagent Tube.

5.6 Transfer **20 µL of NC lysate into a Neogen Reagent Control tube**. Dispense at an angle to avoid disturbing the pellets. Mix by gently pipetting up and down 5 times.

6. Load capped tubes into a clean and decontaminated Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray. Close and latch the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray lid.



7. Review and confirm the configured run in the Neogen Molecular Detection System Software.
8. Click the Start button in the software and select instrument for use. The selected instrument's lid automatically opens.
9. Place the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray into the Neogen Molecular Detection Instrument and close the lid to start the assay. Results are provided within 75 minutes, although positives may be detected sooner.
10. After the assay is complete, remove the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray from the Neogen Molecular Detection Instrument and dispose of the tubes by soaking in a 1-5% (v:v in water) household bleach solution or equivalent solution for 1 hour and away from the assay preparation area.

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

Results and Interpretation

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

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

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

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

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

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

Confirmation of Results According to the NF VALIDATION Certified Method

Option 1: By streaking 10 or 100 µL of enriched LESS plus broth on O&A agar plate. The presence of characteristic colony is sufficient to confirm the MDS result.

Option 2: *By using the tests described in the ISO 11290-1 starting from the Demi-Fraser or Less Plus broth.*

Option 3: Using nucleic acid probes from a different kit than the one used for screening as described in EN ISO 7218[5] standard, performed on isolated colonies, from selective agar (see Options 1 or 2).

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

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

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

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

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

1. To store a heat-treated lysate, re-cap the lysis tube with a clean cap (see “Lysis”, 4.5)
2. Store at 4 to 8°C for up to 72 hours.
3. Prepare a stored sample for amplification by inverting 2-3 times to mix.
4. Decap the tubes.
5. Place the mixed lysate tubes on Neogen Molecular Detection Heat Block Insert and heat at 100 ± 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 Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Explanation of Product Label Symbols

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

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

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

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

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

FS00867C

Date de parution : 2024-07

Instructions relatives au produit

Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* version 2

Description et utilisation du produit

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

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

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

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

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

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

Supplément du bouillon Fraser

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

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

pH final 7,2 ± 0,2 à 25 °C

LESS Plus (g/L)

Peptone 15.0

Buffer 15.7

Growth enhancers	8.3
Selective mix	5.0
Final pH	7.0 ± 0.2 at 25°C

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

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

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

Tableau 1. Composants du Kit de détection moléculaire Neogen

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

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

Sécurité

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

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

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

⚠ AVERTISSEMENT

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

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

L'utilisateur doit former son personnel aux techniques d'analyse actuelles appropriées, par exemple : exigences générales relatives à la compétence des laboratoires d'essais et d'étalonnage, ISO/IEC 17025[4], ou exigences générales et lignes directrices pour les examens microbiologiques ISO 7218:2024[5].

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

- Se conformer au protocole et effectuer les tests en suivant exactement les instructions relatives au produit.
- Conserver le Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 conformément aux indications sur l'emballage et aux instructions relatives au produit.
- Toujours utiliser le Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 avant la date de péremption.
- Utiliser le Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 pour des aliments et des échantillons environnementaux ayant été validés en interne ou par une tierce partie.
- N'utiliser le Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 pour des surfaces, des désinfectants, des protocoles et des souches bactériennes validés en interne ou par une tierce partie.

- En cas d'échantillon environnemental contenant un tampon neutralisant avec un composé d'aryle sulfonate, diluer l'échantillon dans un bouillon d'enrichissement stérile 1:2 avant l'analyse (1 volume d'échantillon pour 1 volume de bouillon). Une autre option consiste à transférer 10 µL de l'enrichissement du tampon neutralisant dans les tubes de solution de lyse Neogen. Produits pour le recueil des échantillons Neogen® comprenant un tampon neutralisant contenant un complexe d'aryle sulfonate : RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G et HS2410NB2G.

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

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

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

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

Pour réduire les risques associés à la contamination environnementale :

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

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

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

AVIS

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

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

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

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

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

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

Responsabilité de l'utilisateur

Il incombe aux utilisateurs de prendre connaissance des instructions et des informations relatives au produit. Consulter notre site Web **www.neogen.com** ou contacter votre représentant ou distributeur Neogen local pour obtenir de plus amples informations.

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

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

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

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

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

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

Limitations de garanties/Limites de recours

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

Limitation de responsabilité de Neogen

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

Stockage et mise au rebut

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

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

Instructions d'utilisation

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

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

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

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

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

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

Enrichissement de l'échantillon

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

Aliments

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

Matrices crues (viande crue, produits laitiers crus et fruits de mer crus)

1. Laisser le milieu d'enrichissement LESS Plus Broth s'équilibrer à la température ambiante du laboratoire.

2. Combiner de manière aseptique le milieu d'enrichissement et l'échantillon conformément aux tableaux 2 ou 4. Pour tous les échantillons de viande et à forte teneur en particules, l'utilisation de sacs filtrants est recommandée.

3. Homogénéiser soigneusement en mélangeant à la main pendant 2 ± 0,2 minutes. Incuber à 37 ± 1°C selon aux tableaux 2 ou 4.

Échantillons environnementaux

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

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

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

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

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

Matrice de l'échantillon	Taille de l'échantillon (g)	Volume du bouillon d'enrichissement (mL)	Durée d'enrichissement (h)	Température d'enrichissement (°C)	Volume d'echantillon d'analyse (µL)
Viandes, volaille et poisson transformés par la chaleur, cuits ou séchés Produits laitiers transformés par la chaleur ou pasteurisés Fruits et légumes Aliments multi-composants	25 g	225	24-30	37 +- 1 for all	20 for all
Échantillons environnementaux[a]	1 éponge	100 ou 225	24-30		
	1 tampon	10	24-30		
Viande, volaille, fruits de mer, poissons crus	25 g	475	28-32		
Matrice de l'échantillon	**Taille de l'échantillon (g)**	**Volume du bouillon d'enrichissement (mL)**	**Temps d'enrichissement (h)**		
viande crue, produits laitiers crus et fruits de mer crus	25	225	28-32		

Matrice de l'échantillon	Enrichissement primaire (bouillon demi-Fraser)[a]			Enrichissement secondaire (bouillon Fraser)[a]			Volume d'échantillon d'analyse (µL) [b]
	Taille de l'échantillon (g)	Volume du bouillon d'enrichissement (mL)	Durée d'enrichissement (h)	Taille de l'échantillon	Température d'enrichissement (°C)	Durée d'enrichissement (h)	
Produits laitiers crus	25	225	20-24	Transférez 0,1 mL dans 10 mL de bouillon Fraser	37 ± 1	20-24	10

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

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

Instructions spécifiques pour méthodes validées

***Official Method of Analysis*SM de l'AOAC® 2016.08**

AOAC® *Performance Tested Method*SM #081501

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

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

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

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

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

(b) Homogénéiser l'échantillon en mélangeant à la main.

(c) Homogénéiser l'échantillon au vortex.

Méthode certifiée par AFNOR Certification

3M 01/15-09/16

MÉTHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE POUR L'AGROALIMENTAIRE

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

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

Méthode de certification NF VALIDATION, conformément à la norme ISO 16140-2[(6)] par rapport à la norme ISO 11290[(3)]

Portée de la validation : tous aliments pour l'alimentation humaine et échantillons environnementaux (à l'exception des échantillons de production primaires)
Préparation de l'échantillon : les échantillons doivent être préparés conformément aux normes EN ISO 11290-1[3] et EN ISO 6887[8]
Version logicielle : voir le certificat

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

Protocole général	Taille de l'échantillon (g)	Volume du bouillon d'enrichissement (mL)	Durée d'enrichissement (h)	Température d'enrichissement (± 1 °C)	Volume d'échantillon d'analyse (µL)[a]	Point d'interruption accepté
Tout type d'échantillon alimentaire (sauf viandes crues, fruits de mer crus et produits laitiers crus)	25	225	24-30	37	20 µL	• Post-enrichissement jusqu'à 72 heures • Lysat à -20 °C • Lysat à 4 °C jusqu'à 72 heures
Échantillons environnementaux	25, 1 écouvillon ou 1 lingette					

Matrice de l'échantillon	Taille de l'échantillon (g)	Volume du bouillon d'enrichissement (mL)	Enrichissement Température (±1°C)	Temps d'enrichissement (h)	Volume d'analyse de l'échantillon (µL)
viande crue, produits laitiers crus et fruits de mer crus	25	225	37	28-32	20

Protocole spécifique	Enrichissement primaire (bouillon demi-Fraser)[b]				Enrichissement secondaire (bouillon Fraser)[b]				Point d'interruption accepté
	Taille de l'échantillon (g)	Volume du bouillon d'enrichissement (mL)	Température d'enrichissement (± 1 °C)	Durée d'enrichissement (h)	Taille de l'échantillon	Température d'enrichissement (± 1 °C)	Durée d'enrichissement (h)	Volume d'échantillon d'analyse (µL)[c]	
Viandes crues, fruits de mer crus et produits laitiers crus	25	225	37	20-24	Transférer 0,1 mL dans 10 mL de bouillon Fraser	37	20-24	10	• Bouillon Fraser jusqu'à 72 heures • Lysat à -20 °C • Lysat à 4 °C jusqu'à 72 heures

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

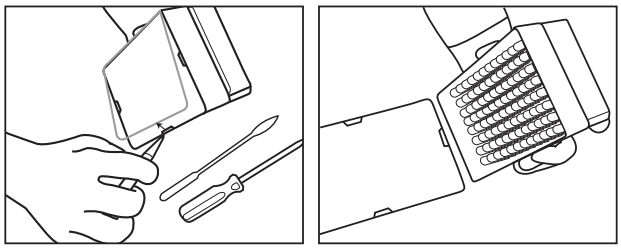
Préparation de l'instrument de détection moléculaire Neogen®

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

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

Lyse

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



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

4.2 Pour éviter toute contamination croisée, ouvrir une barrette de tubes de solution de lyse Neogen à la fois et utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque étape de transfert.

4.3 Transférer les échantillons enrichis dans les tubes de solution de lyse Neogen comme indiqué ci-dessous :

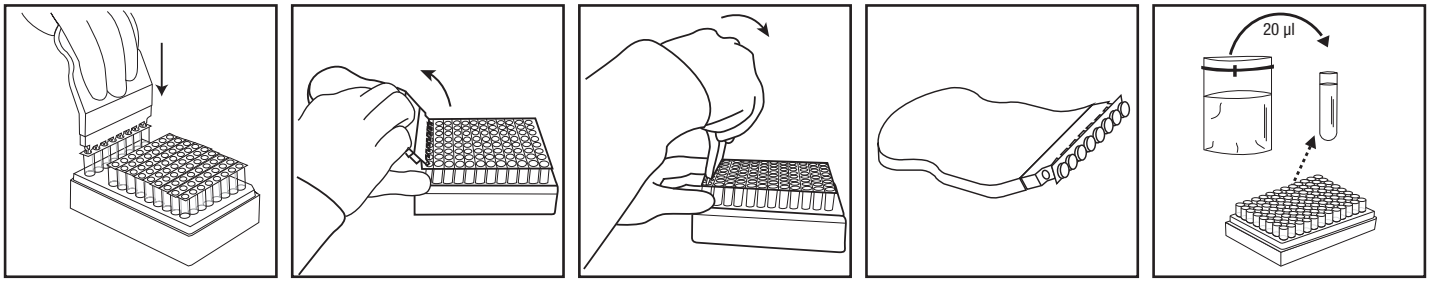
Transférer tout **d'abord** chaque échantillon enrichi dans des tubes de solution de lyse Neogen individuels. Transférer le NC en **dernier**.

4.4 Ouvrir les barrettes de tubes de solution de lyse Neogen une à une à l'aide de l'outil d'ouverture/fermeture pour système de détection moléculaire Neogen® - Lyse.

4.5 Jeter le bouchon du tube de solution de lyse Neogen. Si le lysat doit être soumis à un nouveau test, placer les bouchons dans un récipient propre pour réapplication après la lyse.

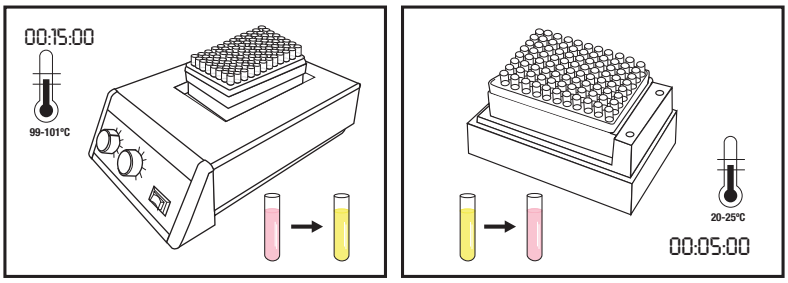
4.5.1 Pour le traitement du lysat conservé, voir l'annexe A.

4.6 Transférer 20 µL d'échantillon dans un tube de solution de lyse Neogen, sauf indication contraire dans le tableau du 2, 3 ou 4 (exemple : utiliser 10 µl avec les produits laitiers crus ou les échantillons environnementaux avec tampon neutralisant).



5. Répéter les étapes 4.4 et 4.6 jusqu'à ce que chaque échantillon individuel soit ajouté à un tube de solution de lyse Neogen correspondant sur la barrette.
6. Une fois tous les échantillons transférés, transférer 20 µL de NC (milieu d'enrichissement stérile, p. ex. bouillon demi-Fraser) dans un tube de solution de lyse Neogen. Ne pas utiliser d'eau comme NC.
7. Vérifier que la température du support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen est de 100 ± 1 °C.
8. Placer le portoir non couvert de tubes de solution de lyse Neogen dans le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen et chauffer pendant 15 ± 1 minutes. Lors du chauffage, la solution de lyse Neogen passera de rose (froide) à jaune (chaude).

   8.1 Les échantillons qui n'ont pas été soumis à un traitement thermique adéquat pendant l'étape de lyse peuvent être considérés comme potentiellement dangereux et ne doivent PAS être insérés dans l'Instrument de détection moléculaire Neogen.
9. Retirer le portoir non couvert de tubes de solution de lyse Neogen du bloc chauffant et laisser refroidir dans le support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen pendant une durée comprise entre 5 et 10 minutes. Le support de bloc refroidissant Neogen utilisé à température ambiante doit être posé directement sur le plan de travail du laboratoire. Une fois froide, la solution de lyse retrouvera une couleur rose.
10. Retirer le couvercle des tubes de solution de lyse Neogen du support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen.



Amplification

1. Il est nécessaire d'utiliser un tube de réactif du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 pour chaque échantillon et pour le NC.

   1.1 Les barrettes de tubes de réactifs peuvent être coupées de manière à obtenir le nombre de tubes souhaité. Sélectionner le nombre nécessaire de tubes de réactif du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes*

Neogen version 2 ou de barrettes de 8 tubes.

1.2 Placer les tubes de réactifs du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 dans un portoir vide.

1.3 Éviter d'agiter les pastilles réactives se trouvant au fond des tubes.

2. Sélectionner 1 tube de contrôle de réactif Neogen et le placer dans le portoir.
3. Afin d'éviter toute contamination croisée, ouvrir une barrette de tubes de réactif Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 à la fois et utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque étape de transfert.
4. Transférer le lysat dans des tubes de réactif du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 et dans un tube de contrôle de réactif Neogen comme décrit ci-dessous :

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

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

5.1 **Transférer 20 µL de lysat d'échantillon prélevé au niveau de la moitié (½) supérieure du liquide (éviter le précipité) dans le tube de solution de lyse Neogen du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 correspondant. Incliner la pipette pour ne pas toucher les pastilles. Mélanger en effectuant 5 cycles d'aspiration/de refoulement avec la pipette.**

5.2 Répéter l'étape 5.1 jusqu'à ce que chaque lysat d'échantillon individuel ait été ajouté au tube de réactif du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2 correspondant dans la barrette.

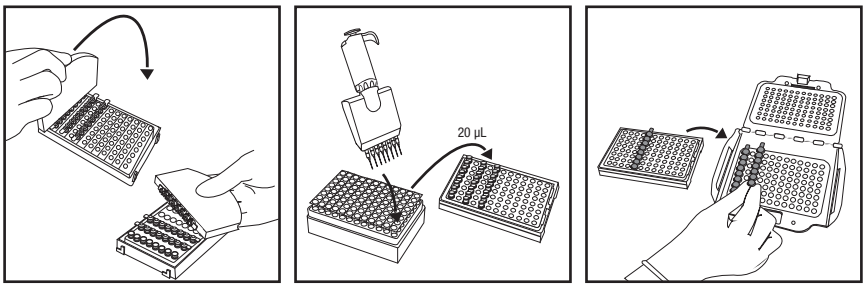
5.3 Placer le capuchon supplémentaire prévu à cet effet sur les tubes de réactif du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2, puis prendre le bord arrondi de l'outil d'ouverture/fermeture pour système de détection moléculaire Neogen - Réactif et appuyer dans un mouvement de va-et-vient afin de s'assurer que le capuchon est fermement insérée sur le tube.

5.4 Répéter les étapes 5.1 à 5.3 pour tous les échantillons à analyser.

5.5 Lorsque tous les lysats d'échantillons ont été transférés, répéter les étapes 5.1 afin de transférer 20 µL de lysat de NC dans un tube de réactif du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2.

5.6 Transférer **20 µL de lysat de NC dans un tube de contrôle de réactif Neogen**. Incliner la pipette pour ne pas toucher les pastilles. Mélanger en effectuant 5 cycles d'aspiration/de refoulement avec la pipette.

6. Charger les tubes recouverts d'un bouchon dans un plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen propre et décontaminé. Fermer et verrouiller le couvercle du plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen.



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

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

Résultats et interprétation

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

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

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

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

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

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

Confirmation des résultats selon la méthode de certification NF VALIDATION

Option 1 : En étalant 10 ou 100 µL de bouillon LESS plus enrichi sur une plaque de gélose O&A. La présence de une colonie caractéristique suffit à confirmer le résultat MDS.

Option 2 : En utilisant les tests décrits dans la norme ISO 11290-1 à partir du bouillon Demi-Fraser ou Less Plus

Option 3 : utilisation de sondes nucléiques à partir d'un kit différent de celui utilisé pour la détection tel que décrit dans la norme EN ISO 7218[5], à partir de colonies isolées provenant de gélose sélective (voir option 1 ou 2).

Option 4 : utilisation de n'importe quelle autre méthode certifiée NF VALIDATION, dont le principe doit être différent du Kit de détection moléculaire *Listeria monocytogenes* Neogen version 2. Il convient d'utiliser l'intégralité du protocole

décrit pour cette seconde méthode de validation. Toutes les étapes précédant le début de la confirmation doivent être communes aux deux méthodes.

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

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

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

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

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

Références :

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218:2024 Microbiology of the food chain — General requirements and guidance for microbiological examination
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Explication des symboles des échantillons

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

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

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

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

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

FS00867C

NEOGEN

Gebrauchsanweisungen

Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis

Produktbeschreibung und Verwendungszweck

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

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

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

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

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

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

Fraser Basis Bouillon-Ergänzung

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

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

Finaler pH-Wert 7,2 ± 0,2 bei 25 °C

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

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

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

Tabelle 1. Komponenten des Neogen Molekularen Detektions Assays

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

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

Sicherheit

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

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

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

⚠ WARNUNG

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

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

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

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

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

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

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

Zur Verminderung von Kreuzkontaminationsrisiken bei der Vorbereitung des Tests:

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

Zur Verringerung der Risiken, die mit Umweltkontamination verbunden sind:

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

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

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

HINWEIS

Zur Verminderung von Kreuzkontaminationsrisiken bei der Vorbereitung des Tests:

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

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

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

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

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

Verantwortung des Anwenders

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

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

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

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

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

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

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

Haftungsbeschränkungen/Beschränkte Rechtsmittel

AUSSER ES WIRD AUSDRÜCKLICH ANDERS IM ABSCHNITT DER HAFTUNGSBESCHRÄNKUNGEN DER VERPACKUNG DES JEWEILIGEN PRODUKTS ANGEGEBEN, LEHNT NEOGEN ALLE AUSDRÜCKLICHEN UND STILLSCHWEIGENDEN 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. Bei weiteren Fragen wenden Sie sich bitte an Ihren Neogen-Vertreter oder autorisierten Neogen-Händler.

Haftungsbeschränkungen von Neogen

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

Lagerung und Entsorgung

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

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

Gebrauchsanweisung

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

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

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

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

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

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

Probenanreicherung

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

Lebensmittel

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

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

Umgebungsproben

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Spezifische Anweisungen für validierte Verfahren

AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2016.08

AOAC® *Performance Tested Method*℠ #081501

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

Tabelle 3. Anreicherungsprotokolle mit Verwendung der Demi Fraser Bouillon[a] bei 37 ± 1 °C gemäß AOAC OMA℠ 2016.08 und PTM℠ Zertifikat Nr. 081501.

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

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

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

(b) Probe durch Mischen per Hand homogenisieren.

(c) Probe mit dem Vortexmischer homogenisieren.

NF VALIDATION gemäß AFNOR Certification

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

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

NF VALIDATION zertifizierte Methode in Übereinstimmung mit der ISO 16140-2[6] im Vergleich zur ISO 11290[3]
Einsatzgebiet der Validierung: Proben von allen für den Menschen vorgesehenen Lebensmitteln und deren Umgebung (außer Proben aus der Primärproduktion)
Probenaufbereitung: Die Proben müssen gemäß EN ISO 11290-1[3] und EN ISO 6887[8] vorbereitet werden
Softwareversion: Siehe Zertifikat

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

Allgemeines Protokoll	Probengröße	Anreicherungsbouillonvolumen (ml)	Anreicherungstemperatur (± 1 °C)	Anreicherungszeit (Stunden)	Probenanalysevolumen[a]	Akzeptierte Unterbrechungspunkte
Alle Lebensmittelproben (außer rohes Fleisch, rohe Meeresfrüchte und Rohmilchprodukte)	25 g	225	37	24–30	20 µl	• Demi Fraser Bouillon bis zu 72 Stunden • Lysat bei –20 °C • Lysat bei 4 °C bis zu 72 Stunden
Umgebungsproben	25 g, 1 Tupfer oder 1 Tuch					

Spezifisches Protokoll	Erstanreicherung (Demi Fraser Bouillon)[b]				Zweitanreicherung (Fraser Bouillon)[b]				Akzeptierte Unterbrechungspunkte
	Probengröße	Anreicherungsbouillonvolumen (ml)	Anreicherungstemperatur (± 1 °C)	Anreicherungszeit (Stunden)	Probengröße	Anreicherungstemperatur (± 1 °C)	Anreicherungszeit (Stunden)	Probenanalysevolumen[c]	
Rohes Fleisch, rohe Meeresfrüchte und Rohmilchprodukte	25 g	225	37	20–24	0,1 ml in 10 ml Fraser Bouillon geben	37	20–24	10 µl	• Fraser Bouillon bis zu 72 Stunden • Lysat bei –20 °C • Lysat bei 4 °C bis zu 72 Stunden

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

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

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

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

Vorbereitung der Neogen® Molekulare Detektion – Beladehilfe

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

4. Vergewissern Sie sich, dass die Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe vor dem Gebrauch trocken ist.

Vorbereitung des Neogen® Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatzes

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

Vorbereitung des Neogen® Molekulare Detektion – Heizblockeinsatzes

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

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

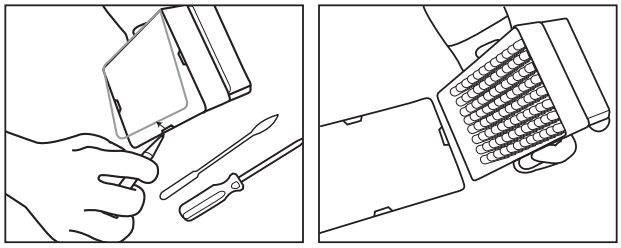
Vorbereitung des Neogen® Molekulare Detektion – Geräts

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

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

Lyse

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



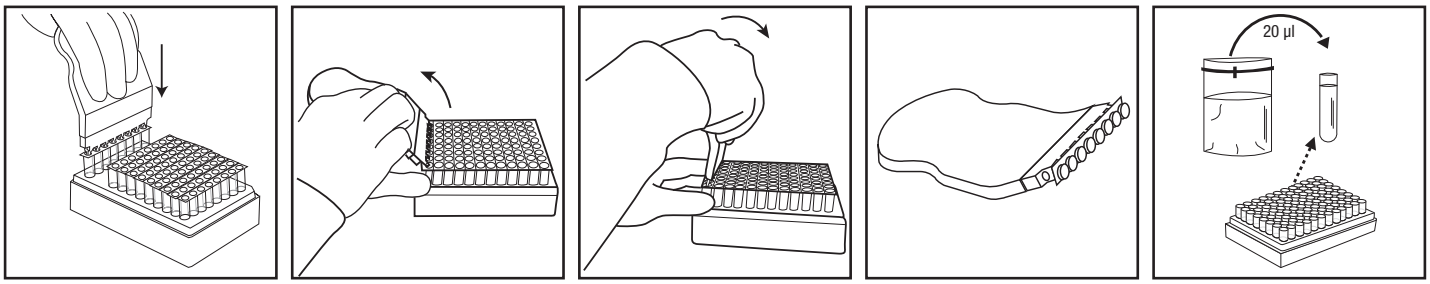
1. Lassen Sie die Lyselösung (Neogen Lyselösung) im Gefäß über Nacht (16–18 Stunden) bei Raumtemperatur (20–25 °C) aufwärmen. Um die Neogen Lysegefäße auf Raumtemperatur zu erwärmen, können Sie die Neogen Lysegefäße auch für mindestens 2 Stunden auf die Laborbank stellen, für 1 Stunde bei 37 ± 1 °C inkubieren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

     Übertragen Sie **zuerst** die angereicherten Proben jeweils einzeln in ein Neogen Lysegefäß. Übertragen Sie die NC **zuletzt**.
   - 4.4 Öffnen Sie jeden Neogen Streifen mit Lysegefäßen einzeln mit dem Neogen® Molekulare Detektion – Cap/Decap-Werkzeug – Lyse.

4.5 Entsorgen Sie die Kappen der Neogen Lysegefäße – wenn noch Lysat für weitere Tests übrig bleibt, bewahren Sie die Kappen in einem sauberen Container auf, um sie nach der Lyse wieder aufzusetzen.

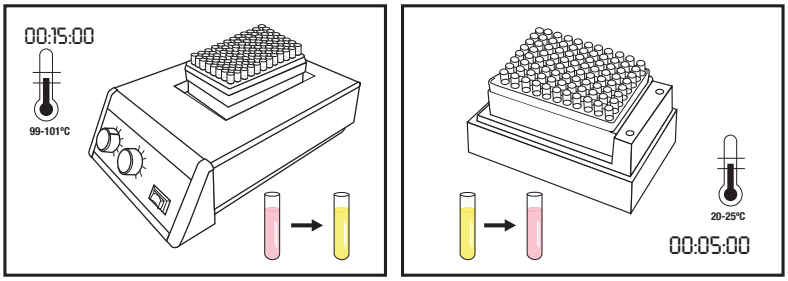
4.5.1 Informationen zur Verarbeitung von nicht verwendetem Lysat finden Sie in Anhang A.

4.6 Übertragen Sie 20 µl Probe in ein Neogen- Lysegefäß, sofern in der Protokolltabelle 2, 3 oder 4 nicht anders angegeben (z. B. bei Rohmilchprodukten oder wenn Sie Umgebungsproben mit Neutralisierungspuffer verwenden, sind 10 µl zu verwenden).



5. Wiederholen Sie Schritt 4.4 bis 4.6, bis jede einzelne Probe in ein zugeordnetes Neogen Lysegefäße im Streifen gegeben wurde.
6. Sobald Sie alle Proben übertragen haben, übertragen Sie 20 µl der NC (steriles Anreicherungsmedium, z. B., Demi Fraser Bouillon) in ein Neogen Lysegefäß. Als NC kein Wasser verwenden.
7. Stellen Sie fest, ob der Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz die erforderliche Temperatur von 100 ± 1 °C erreicht hat.
8. Stellen Sie den Träger ohne Deckel mit Neogen Lysegefäßen in den Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz und erwärmen Sie ihn 15 ± 1 Minuten lang. Dabei ändert sich die Farbe der Neogen Lyselösung von rosafarben (kalt) zu gelb (heiß).

   8.1 Proben, die während der Lyse nicht ordnungsgemäß wärmebehandelt wurden, stellen möglicherweise ein biologisches Risiko dar und sollten NICHT in das Neogen Molekulare Detektions – Gerät eingesetzt werden.
9. Nehmen Sie den Träger ohne Deckel mit den Neogen Lysegefäßen aus dem Heizblockeinsatz. Lassen Sie ihn maximal 5 bis 10 Minuten lang im Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz abkühlen. Der Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz wird bei Raumtemperatur verwendet und sollte direkt auf die Laborbank gesetzt werden. Wenn die Lyselösung abgekühlt ist, nimmt sie wieder eine rosa Farbe an.
10. Nehmen Sie den Träger mit den Neogen Lysegefäßen aus dem Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz.



Amplifikation

1. Für jede Probe und ihre NC ist ein Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis-Reagenzgefäß erforderlich.

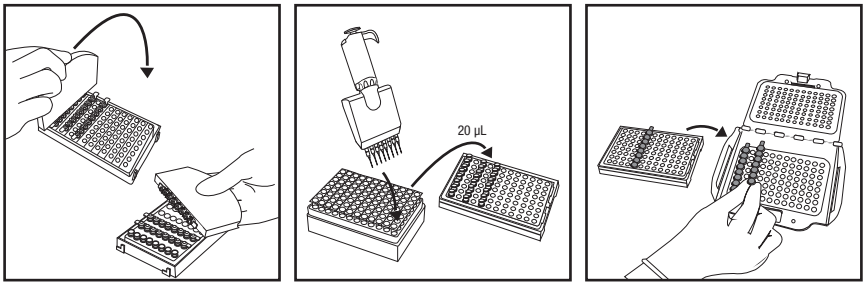
   1.1 Die Gefäßstreifen können auf die gewünschte Anzahl der Reagenzgefäße zurechtgeschnitten werden. Wählen Sie die Anzahl der erforderlichen Reagenzgefäße für den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis oder den 8er Gefäßstreifen.

   1.2 Stellen Sie die Reagenzgefäße für Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis in einen leeren Gefäßträger.

   1.3 Vermeiden Sie es, die Reagenzkügelchen im unteren Teil der Gefäße aufzurühren.
2. Wählen Sie 1 Gefäß mit Neogen Reagenzkontrolle und stellen Sie es in den Gefäßträger.
3. Um eine Kreuzkontamination zu vermeiden, öffnen Sie jeweils nur einen Reagenzgefäßstreifen des Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis und verwenden Sie bei jedem Übertragungsschritt eine neue Pipettenspitze.
4. Übertragen Sie wie nachfolgend beschrieben die einzelnen Lysate in ein Reagenzgefäß für den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Listeria monocytogenes* Nachweis und in ein Gefäß mit Neogen Reagenzkontrolle:

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

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



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

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

Interpretation der Ergebnisse

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

Vorläufig positive Ergebnisse sollten anhand der Standardarbeitsanweisung für Laboratorien oder durch das anschließende Referenzverfahren[1,2,3] bestätigt werden, beginnend mit der Übertragung aus der Erstanreicherung in die

Zweitanreicherungsbouillon (sofern zutreffend), gefolgt von anschließendem Ausplattieren und Bestätigen von Isolaten mittels geeigneter biochemischer und serologischer Verfahren.

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

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

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

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

Bestätigung der Ergebnisse anhand der zertifizierten NF VALIDATION-Methode

Option 1: Nach ISO 11290[3] standardmäßig mit Demi Fraser-Anreicherung.

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

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

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

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

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

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

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

1. Um ein wärmebehandeltes Lysat zu lagern, setzen Sie eine neue, saubere Kappe auf das Lysegefäß (siehe „Lyse“, Abschnitt 4.5).
2. Lagern Sie das Lysat bis zu 72 Stunden bei 4 bis 8 °C.
3. Bereiten Sie eine gelagerte Probe zur Amplifikation vor, indem Sie sie zum Mischen 2–3 Mal umdrehen.
4. Öffnen Sie die Gefäße.
5. Setzen Sie die gemischten Lysatgefäße in den Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz und erwärmen Sie sie 5 ± 1 Minuten lang bei 100 ± 1 °C.

6. Nehmen Sie den Träger mit den Neogen Lysegefäßen en aus dem Heizblockeinsatz und lassen Sie ihn maximal 5 bis 10 Minuten lang im Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz abkühlen.
7. Setzen Sie das Protokoll ab dem oben beschriebenen Abschnitt „Amplifikation“ fort.

Literaturnachweise:

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

Erklärung der Produktbeschriftungs-Symbole

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

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

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

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

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

FS00867C

Data di pubblicazione: 2024-07

Istruzioni sul prodotto

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

Descrizione del prodotto e uso previsto

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

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

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

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

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

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

Supplemento per brodo Fraser

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

Citrato ferrico di ammonio 0,5 g/10 ml

pH finale 7,2 ± 0,2 a 25 °C

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

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

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

Tabella 1. Componenti del kit di analisi molecolare Neogen

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

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

Sicurezza

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

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

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

⚠ AVVERTENZA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Per ridurre i rischi associati a contaminazione ambientale:

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

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

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

AVVISO

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

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

Per ridurre i rischi associati a un risultato falso positivo:

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

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

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

Responsabilità dell'utente

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

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

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

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

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

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

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

Limitazione di garanzia/Rimedio limitato

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

Limitazione di responsabilità da parte di Neogen

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

Conservazione e smaltimento

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

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

Istruzioni per l'uso

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

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

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

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

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

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

Arricchimento del campione

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

Alimenti

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

Campioni ambientali

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

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

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

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

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

Matrice campione	Dimensione campione	Volume brodo di arricchimento (ml)	Tempo di arricchimento (ore)
Carni, pollame, frutti di mare e pesce sottoposti a trattamento termico, cotti, affumicati Prodotti lattiero-caseari sottoposti a trattamento termico/ pastorizzati Verdure e ortaggi Alimenti multicomponente	25 g	225	24-30
Campioni ambientali[a]	1 spugna	100 o 225	24-30
	1 tampone	10	24-30
Carne cruda, pollame, frutti di mare, pesce	25 g	475	28-32

Matrice campione	Arricchimento primario (brodo Demi Fraser)[a]			Arricchimento secondario (Brodo Fraser)[a]			Volume dell'analisi del campione[b]
	Dimensione campione	Volume brodo di arricchimento (ml)	Tempo di arricchimento (ore)	Dimensione campione	Temperatura di arricchimento (°C)	Tempo di arricchimento (ore)	
Prodotti lattiero-caseari crudi	25 g	225	20-24	Trasferire 0,1 ml in 10 ml di brodo Fraser	37 ± 1	20-24	10 µl

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

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

Istruzioni specifiche per metodi validati

AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2016.08

AOAC® *Performance Tested Method℠* #081501

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

Tabella 3. Protocolli di arricchimento che usano brodo Demi Fraser[a] a 37 ± 1 °C secondo AOAC OMA℠ 2016.08 e PTM℠, Certificato n. 081501.

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

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

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

(b) Omogeneizzare il campione miscelando a mano.

(c) Omogeneizzare il campione agitando al Vortex.

NF VALIDATION concessa dalla AFNOR Certification

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

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

Metodo certificato NF VALIDATION in conformità di ISO 16140-2[6] rispetto a ISO 11290[3]
Ambito della validazione: tutti i campioni di alimenti per l'uomo e ambientali (esclusi i campioni di produzione primaria)
Preparazione del campione: i campioni devono essere preparati secondo EN ISO 11290-1[3] ed EN ISO 6887[8]

Versione del software: vedere il certificato

Tabella 4: protocolli di arricchimento secondo il metodo certificato NF VALIDATION 3M 01/15-09/16 a 37 ± 1 °C che usano brodo Demi Fraser e brodo Fraser secondo necessità.

Protocollo generico	Dimensione campione	Volume brodo di arricchimento (ml)	Temperatura di arricchimento (± 1 °C)	Tempo di arricchimento (ore)	Volume dell'analisi del campione[a]	Punto di interruzione accettato
Tutti i campioni alimentari (eccetto carni crude, frutti di mare crudi e prodotti lattiero-caseari crudi)	25 g	225	37	24-30	20 µl	• Brodo Demi Fraser fino a 72 ore • Lisato a -20 °C • Lisato a 4 °C fino a 72 ore
Campioni ambientali	25 g, 1 tampone o 1 salvietta					

Protocollo specifico	Arricchimento primario (brodo Demi Fraser)[b]				Arricchimento secondario (brodo Fraser)[b]				Punto di interruzione accettato
	Dimensione campione	Volume brodo di arricchimento (ml)	Temperatura di arricchimento (± 1 °C)	Tempo di arricchimento (ore)	Dimensione campione	Temperatura di arricchimento (± 1 °C)	Tempo di arricchimento (ore)	Volume dell'analisi del campione[c]	
Carni crude, frutti di mare crudi e prodotti lattiero-caseari crudi	25 g	225	37	20-24	Trasferire 0,1 ml in 10 ml di brodo Fraser	37	20-24	10 µl	• Brodo Fraser fino a 72 ore • Lisato a -20 °C • Lisato a 4 °C fino a 72 ore

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

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

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

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

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

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

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

Posizionare il Blocco di raffreddamento estraibile per il sistema di rilevamento molecolare Neogen® direttamente sul banco del laboratorio; utilizzare il pozzetto di raffreddamento alla temperatura ambiente del laboratorio (20-25 °C).

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

Posizionare l'Inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen® in un'unità riscaldante a secco con doppio blocco. Accendere l'unità riscaldante a secco con blocco e impostare la temperatura per consentire all'Inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen di raggiungere e mantenere una temperatura di 100 ± 1 °C.

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

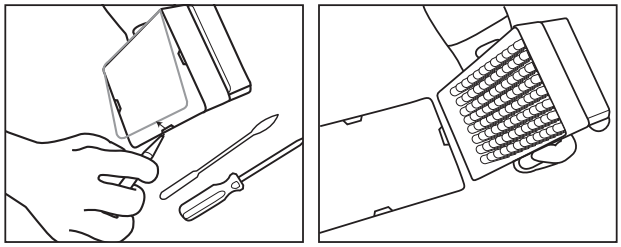
Preparazione dello Strumento per l'analisi molecolare Neogen®

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

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

Lisi

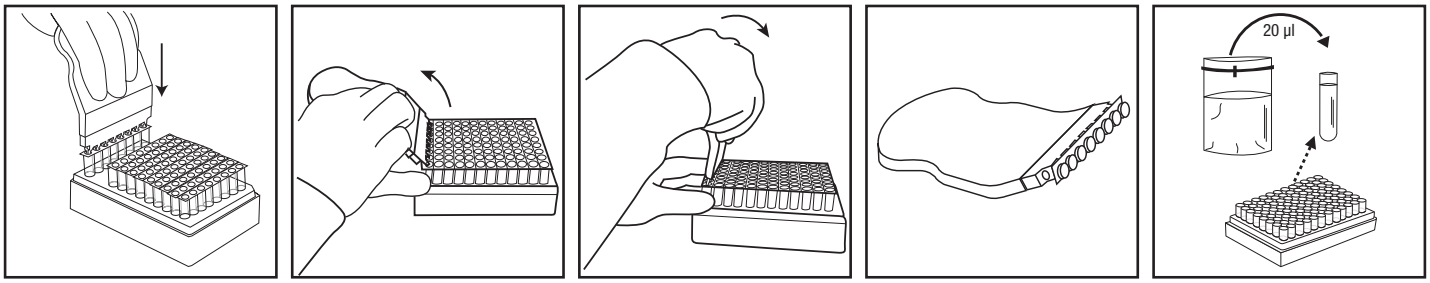
Rimuovere la parte inferiore della rastrelliera per la soluzione di lisi Neogen con un cacciavite o con una spatola prima di posizionarla nell'Inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen.



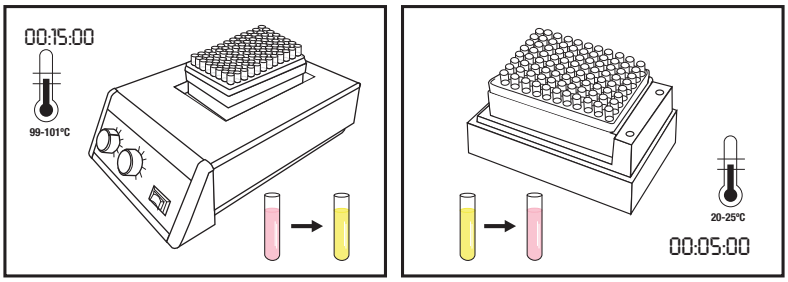
1. Far riscaldare le provette per la soluzione di lisi (Soluzione di lisi Neogen) lasciando la rastrelliera a temperatura ambiente (20-25 °C) per una notte (16-18 ore). Le alternative per equilibrare i tubi per Soluzione di lisi Neogen a temperatura ambiente sono: posizionare i tubi per soluzione di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

     Trasferire **innanzitutto** ciascun campione arricchito in una singola provetta per Soluzione di lisi Neogen. Trasferire l'NC per **ultimo**.

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



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

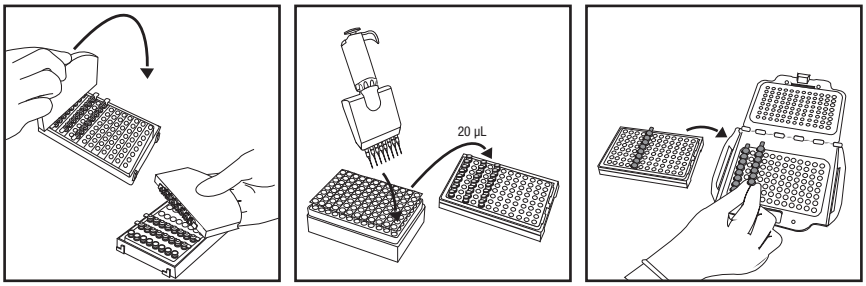


Amplificazione

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

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

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



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

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

Risultati e interpretazione

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

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

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

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

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

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

Conferma dei risultati secondo il metodo certificato NF VALIDATION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Bibliografia:

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

Legenda dei simboli delle etichette dei prodotti

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

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

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

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

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

FS00867C

NEOGEN

Fecha de emisión: 2024-07

Instrucciones del Producto

Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes*

Descripción del producto y uso adecuado

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

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

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

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

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

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

Suplemento de Caldo de Fraser

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

Citrato de amonio férrico 0,5 g/10 mL

pH final 7,2 ± 0,2 a 25 °C

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

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

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

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

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

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

Seguridad

El usuario debe leer, comprender y seguir la información de seguridad incluida en las instrucciones para el Sistema de Detección Molecular Neogen y el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen. Guarde las instrucciones de seguridad para consultas futuras.

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

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

⚠ ADVERTENCIA

No utilice el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen para el diagnóstico de afecciones en seres humanos ni animales.

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

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

Para reducir los riesgos asociados con un resultado falso negativo que provoque la liberación de productos contaminados:

- Siga el protocolo y realice las pruebas exactamente como se indica en las instrucciones del producto.
- Almacene el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen como se indica en el empaque y en las instrucciones del producto.
- Utilice siempre el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen antes de su fecha de vencimiento.
- Utilice el Análisis de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen con muestras de alimentos y ambientales que hayan sido validadas internamente o por un tercero.
- Utilice el Análisis de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen solo con superficies, desinfectantes, protocolos y cepas bacterianas que hayan sido validadas internamente o por un tercero.
- En el caso de muestras ambientales que contengan una solución de caldo neutralizante con complejo aril sulfonato, prepare una dilución en una proporción de 1:2 (1 parte de muestra en 1 parte de caldo de enriquecimiento estéril) antes de realizar la prueba. Otra opción es transferir 10 µL de la muestra del caldo neutralizante de enriquecimiento a los tubos de Solución de Lisis Neogen. Productos para la Recolección de Muestras Neogen® que incluyen una Solución de Caldo Neutralizante con el complejo aril sulfonato: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G y HS2410NB2G.

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

- Se recomienda enfáticamente informar al personal femenino de laboratorio sobre el riesgo, en caso de estar embarazada, que se genera por la infección de la madre por exposición a *Listeria monocytogenes*.
- Realice las pruebas de patógenos en un laboratorio debidamente equipado, bajo la supervisión de personal capacitado. El medio de enriquecimiento incubado y el equipo o las superficies que hayan entrado en contacto con el medio de enriquecimiento podrían contener patógenos en niveles suficientes para provocar un riesgo para la salud humana.

- Siempre proceda según las prácticas estándar de seguridad del laboratorio. Eso incluye usar la ropa de protección adecuada y protección para los ojos al manipular reactivos y muestras contaminadas.
- Evite el contacto con el contenido del medio de enriquecimiento y de los tubos de reactivos después de la amplificación.
- Deseche las muestras enriquecidas conforme a los estándares de la industria.
- Las muestras que no se hayan tratado debidamente con calor durante el paso de lisis del ensayo pueden considerarse un posible riesgo biológico y NO deben introducirse en el Equipo de Detección Molecular Neogen.

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

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

Para reducir los riesgos relacionados con la contaminación ambiental:

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

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

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

ATENCIÓN

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

- Cámbiese los guantes antes de hidratar los gránulos reactivos.
- Se recomienda usar puntas de pipetas estériles de calidad de biología molecular con barrera para aerosoles (con filtro).
- Use una nueva punta de pipeta para cada transferencia de muestra.
- Use las Buenas Prácticas de Laboratorio para transferir la muestra del enriquecimiento al tubo de lisis. Para evitar la contaminación de la pipeta, el usuario puede elegir agregar un paso de transferencia intermedia. Por ejemplo, el usuario puede transferir cada muestra enriquecida a un tubo estéril.
- Use una estación de trabajo de calidad para biología molecular con una lámpara germicida, siempre que disponga de una. Descontamine periódicamente las mesas y el equipo de laboratorio (pipetas, herramientas para tapar/destapar, etc.) con una solución de cloro de uso doméstico del 1% al 5% (v:v en agua) o en una solución para eliminación de ADN.

Para reducir los riesgos relacionados con un resultado falso positivo:

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

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

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

Responsabilidad del usuario

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

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

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

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

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

Para ayudar a los clientes a evaluar el método para varias matrices, Neogen ha desarrollado el kit de Control de Matriz para Detección Molecular Neogen®. Cuando sea necesario, utilice el Control de Matriz (MC) para determinar si la matriz puede afectar los resultados del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen. Analice varias muestras representativas de la matriz, es decir, las muestras obtenidas de diferente origen, durante cualquier periodo de validación

al adoptar el método de Neogen, al analizar matrices nuevas o desconocidas, o matrices que hayan sido sometidas a cambios en el proceso o la materia prima.

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

Limitación de garantía/Recurso limitado

SALVO LO EXPRESAMENTE ESTIPULADO EN UNA SECCIÓN DE GARANTÍA LIMITADA O EN EL EMBALAJE DE UN PRODUCTO ESPECÍFICO, NEOGEN RENUNCIA A TODAS LAS GARANTÍAS EXPRESAS Y TÁCITAS INCLUIDA, ENTRE OTRAS, CUALQUIER GARANTÍA DE COMERCIABILIDAD O IDONEIDAD PARA UN USO EN PARTICULAR. Si un producto de Neogen Food Safety es defectuoso, Neogen o su distribuidor autorizado reemplazará el producto o reembolsará el precio de compra del producto, a su elección. Estos son sus recursos exclusivos. Póngase en contacto con su representante de Neogen o distribuidor autorizado de Neogen para que se le responda cualquier otra pregunta.

Limitación de responsabilidad de Neogen

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

Almacenamiento y desecho

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

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

Instrucciones de uso

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

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

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

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

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

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

Enriquecimiento de la muestra

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

Alimentos

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

10 mL de Caldo Fraser. Incube a una temperatura de 37 °C ± 1° C entre 20 y 24 horas.

Muestras ambientales

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

ADVERTENCIA: Si decidiera utilizar una solución de caldo neutralizante (NB) que contenga el complejo aril sulfonato como solución hidratante para la esponja, deberá preparar una dilución 1:2 (1 parte de muestra en 1 parte de caldo de enriquecimiento estéril) de la muestra ambiental enriquecida antes de realizar la prueba para reducir los riesgos asociados con un resultado falso negativo que resultará en la liberación del producto contaminado. Otra opción es transferir 10 µL de la solución de caldo neutralizante enriquecida a los tubos de Solución de Lisis Neogen.

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

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

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

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

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

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

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

Instrucciones específicas para métodos validados

AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2016.08

AOAC® *Performance Tested Method*℠ n.° 081501

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 081501

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

Tabla 3. Protocolos de enriquecimiento en los que se utiliza Caldo Demi Fraser[a] a 37 °C ± 1 °C según AOAC OMA℠ 2016.08 y el certificado PTM℠ n.° 081501.

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

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

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

(b) Homogeneizar la muestra mediante mezclado manual.

(c) Homogeneizar la muestra mediante agitador eléctrico.

NF VALIDATION por AFNOR Certification

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

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

Método certificado de NF VALIDATION en cumplimiento de la norma ISO 16140-2[6], en comparación con la norma ISO 11290[3] Alcance de la validación: todas las muestras ambientales y de alimentos para humanos (excluidas las muestras de la producción primaria)
Preparación de la muestra: las muestras deben prepararse según las normas EN ISO 11290-1[3] y EN ISO 6887[8]
Versión de software: consulte el certificado

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

Protocolos generales	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento (mL)	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Volumen de análisis de la muestra[a]	Punto de interrupción aceptado
Todas las muestras de alimentos (excepto carnes crudas, mariscos crudos y productos lácteos crudos)	25 g	225	37	24-30	20 µL	• Caldo Demi Fraser hasta 72 horas • Lisado a –20 °C • Lisado a 4 °C hasta 72 horas
Muestras ambientales	25 g, 1 hisopo o 1 toalla					

Protocolo específico	Enriquecimiento primario (Caldo Demi Fraser)[b]				Enriquecimiento secundario (Caldo Fraser)[b]				Punto de interrupción aceptado
	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento (mL)	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Tamaño de la muestra	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Volumen de análisis de la muestra[c]	
Carnes crudas, mariscos crudos y productos lácteos crudos	25 g	225	37	20-24	Transfiera 0,1 mL a 10 mL de Caldo Fraser	37	20-24	10 µL	• Caldo Fraser hasta 72 horas • Lisado a –20 °C • Lisado a 4 °C hasta 72 horas

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

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

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

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

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

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

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

Coloque la Bandeja para el Bloque de Frío del Sistema de Detección Molecular Neogen® directamente sobre la mesa de laboratorio. Utilice el Bloque de Enfriamiento a temperatura ambiente de laboratorio (20 °C-25 °C).

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

Coloque el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen® en la unidad calentadora seca de bloques doble. Encienda la unidad calentedora seca de bloques y ajuste la temperatura para permitir que el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen alcance y mantenga una temperatura de 100 °C ± 1 °C.

NOTA: Según la unidad de calentamiento, espere aproximadamente 30 minutos para que el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen alcance la temperatura deseada. Con un termómetro calibrado adecuado (p. ej., un termómetro de inmersión parcial o un termómetro digital termopar, **no** un termómetro de inmersión total) colocado en la ubicación designada, verifique que el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen se encuentre a 100 °C ± 1 °C.

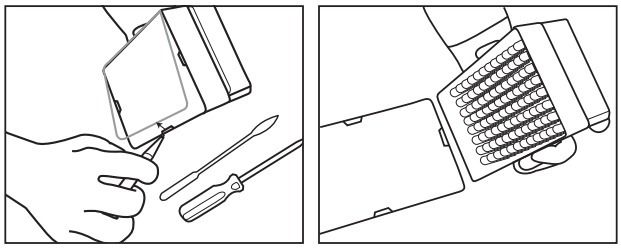
Preparación del Equipo de Detección Molecular Neogen®

1. Inicie el software del Sistema de Detección Molecular Neogen® e inicie sesión. Contacte a su representante de Neogen Food Safety para asegurarse de que tiene la última versión del software.
2. Encienda el Equipo de Detección Molecular Neogen.
3. Cree o edite un ensayo con datos para cada muestra. Para obtener detalles, consulte el Manual del Usuario del Sistema de Detección Molecular Neogen.

NOTA: El Equipo de Detección Molecular Neogen debe alcanzar el estado de Listo antes de insertar la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen con los tubos de reacción. Este paso de calentamiento lleva unos 20 minutos y aparece indicado por una luz NARANJA en la barra de estado del equipo. Una vez que el equipo esté listo para iniciar un ensayo, la barra de estado se cambiará a color VERDE.

Lisis

Retire la parte inferior de la Gradilla para Solución de Lisis de Neogen con un destornillador o una espátula antes de colocarla en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen.



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

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

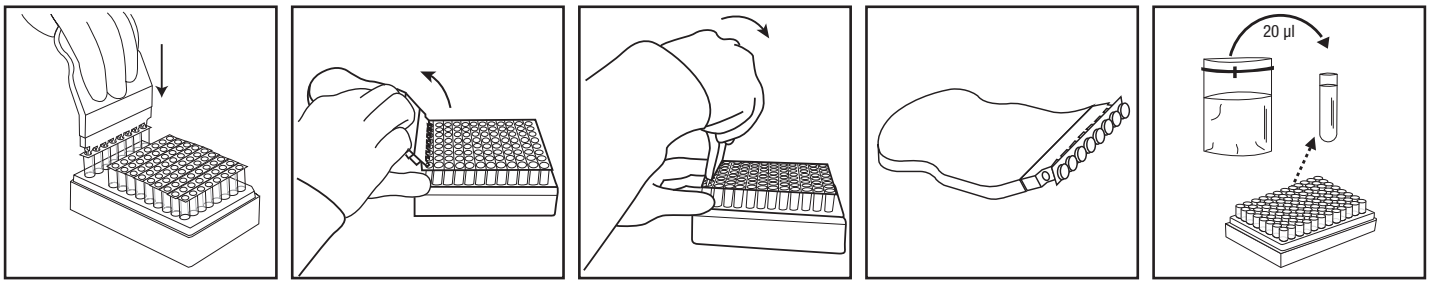
Transfiera cada muestra enriquecida a un tubo de Solución de Lisis Neogen individual **primero**. Transfiera el NC **al final**.

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

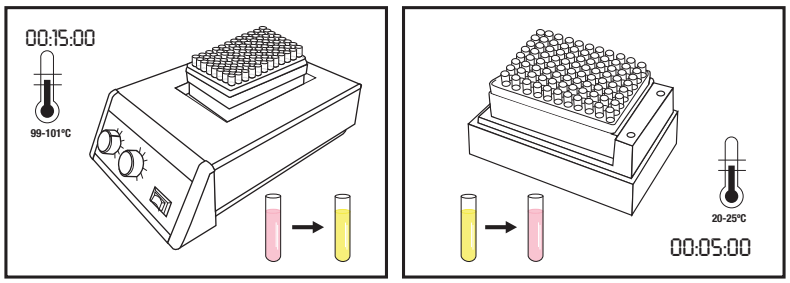
4.5 Deseche la tapa del tubo de Solución de Lisis Neogen; si se conservará el lisado para repetir la prueba, coloque las tapas en un envase limpio para reutilizarlas luego de la lisis.

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

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



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



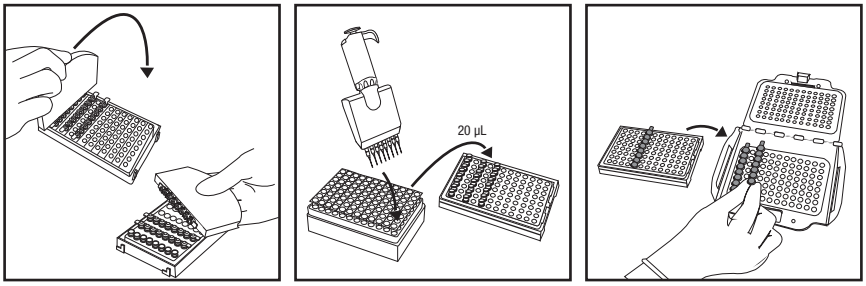
Amplificación

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

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

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

5. Utilice la Herramienta para Encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular – Reactivo Neogen® para destapar el Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen, una tira a la vez. Deseche la tapa.
   - 5.1 **Transfiera 20 µL del lisado de muestra de la ½ superior del líquido (evite el precipitado) en el tubo de Solución de Lisis Neogen al Tubo de Reactivo correspondiente del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen. Dispense en un ángulo que evite movimientos en las perlas. Mezcle pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.**
   - 5.2 Repita el paso 5.1 hasta que se haya agregado una muestra individual del lisado a un Tubo de Reactivo correspondiente del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen en la tira.
   - 5.3 Cubra los Tubos de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen con las tapas adicionales provistas y utilice el lado redondeado de la Herramienta para Encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular – Reactivo Neogen para aplicar presión con un movimiento hacia adelante y hacia atrás para asegurarse de que la tapa quede bien ajustada.
   - 5.4 Repita los pasos 5.1 a 5.3, según sea necesario, para la cantidad de muestras que se deben analizar.
   - 5.5 Cuando se hayan transferido todos los lisados de la muestra, repita el paso 5.1 para transferir 20 µL de lisado NC a un Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* Neogen.
   - 5.6 Transfiera **20 µL del lisado NC a un tubo de Control de Reactivos Neogen.** Dispense en un ángulo que evite movimientos en las perlas. Mezcle pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.
6. Cargue los tubos tapados en una Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen limpia y descontaminada. Cierre y trabe la tapa de la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen.



7. Revise y confirme la corrida configurada en el software del Sistema de Detección Molecular Neogen.
8. Haga clic en el botón de inicio del software y seleccione el equipo que usará. La tapa del equipo seleccionado se abrirá automáticamente.
9. Coloque la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen en el Equipo de Detección Molecular Neogen y cierre la tapa para comenzar con el ensayo. Obtendrá los resultados al cabo de 75 minutos, aunque los positivos pueden detectarse antes.
10. Después de completar el ensayo, retire la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen del Equipo de Detección Molecular Neogen y deseche los tubos dejándolos inmersos en una solución de cloro de uso doméstico del 1% al 5% (v:v en agua) durante 1 hora y lejos del área en que se prepara el ensayo.

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

Resultados e interpretación

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

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

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

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

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

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

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

Confirmación de los resultados según el Método Certificado de NF VALIDATION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Referencias:

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

Explicación de los Símbolos de la Etiqueta del Producto

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

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

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

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

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

FS00867C

NEOGEN

Datum van uitgifte: 2024-07

Productinstructies

Moleculaire detectie assay 2 *Listeria monocytogenes*

Productbeschrijving en beoogd gebruik

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

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

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

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

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

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

Fraser bouillon-supplement

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

IJzerammoniumcitraat	0,5 g/10 ml
Definitieve pH-waarde	7,2 ± 0,2 bij 25 °C

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

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

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

Tabel 1. Onderdelen Neogen Moleculaire detectie assay-set

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

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

Veiligheid

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

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

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

⚠ WAARSCHUWING

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KENNISGEVING

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

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

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

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

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

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

Verantwoordelijkheid van de gebruiker

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

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

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

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

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

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

die grondstof- of procesveranderingen hebben ondergaan.

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

Beperkte garantie / beperkt verhaal

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

Beperking van Neogen aansprakelijkheid

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

Opslag en afvalverwerking

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

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

Gebruiksaanwijzingen

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

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

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

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

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

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

Monsterverrijking

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

Voedingsmiddelen

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

Incubeer gedurende 20-24 uur bij een temperatuur van 37 ± 1 °C.

Omgevingsmonsters

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

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

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

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

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

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

Rauw(e) vlees, gevogelte, zeevruchten, vis	25 g	475	28-32				
Monstermatrix	**Primaire verrijking (Demi Fraser bouillon)[a]**			**Secundaire verrijking (Fraser bouillon)[a]**			**Volume monsteranalyse[b]**
	Monstergrootte	**Volume verrijkingsbouillon (ml)**	**Verrijkingstijd (uur)**	**Monstergrootte**	**Verrijkingstemperatuur (°C)**	**Verrijkingstijd (uur)**	
Rauwe melkproducten	25 g	225	20-24	Breng 0,1 ml over naar 10 ml Fraser bouillon	37 ± 1	20-24	10 µl

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

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

Specifieke instructies voor gevalideerde methoden

AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2016.08

AOAC® *Performance Tested Method℠* nr. 081501

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

Tabel 3. Verrijkingsprotocollen waarbij wordt gebruikgemaakt van Demi Fraser bouillon[a] bij 37 ± 1 °C, conform AOAC OMA℠ 2016.08 en PTM℠, certificaatnr. 081501.

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

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

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

(b) Homogeniseer het monster door met de hand te mixen.

(c) Homogeniseer het monster in de vortexmixer.

NF VALIDATION door AFNOR Certification

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

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

Door NF VALIDATION gecertificeerde methode conform ISO 16140-2[6] vergeleken met ISO 11290[3]
Toepassingsgebied van de validatie: Alle monsters van voedingsproducten voor menselijke consumptie en omgevingsmonsters (met uitzondering van primaire productiemonsters)
Monstervoorbereiding: Monsters moeten worden voorbereid conform EN ISO 11290-1[3] en EN ISO 6887[8]
Softwareversie: Zie certificaat

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

Algemeen protocol	Monstergrootte	Volume verrijkingsbouillon (ml)	Verrijkingstemperatuur (± 1 °C)	Verrijkingstijd (uur)	Volume monsteranalyse[a]	Geaccepteerd onderbrekingspunt
Alle voedselmonsters (met uitzondering van monsters van rauw vlees, rauwe zeevruchten en rauwe melkproducten)	25 g	225	37	24-30	20 µl	• Demi Fraser bouillon maximaal 72 uur • Lysaat bij -20 °C • Lysaat bij 4 °C maximaal 72 uur
Omgevingsmonsters	25 g, 1 staafje, of 1 doekje					

Specifiek protocol	Primaire verrijking (Demi Fraser bouillon)[b]				Secundaire verrijking (Fraser bouillon)[b]				Geaccepteerd onderbrekingspunt
	Monstergrootte	Volume verrijkingsbouillon (ml)	Verrijkingstemperatuur (± 1 °C)	Verrijkingstijd (uur)	Monstergrootte	Verrijkingstemperatuur (± 1 °C)	Verrijkingstijd (uur)	Volume monsteranalyse[c]	
Rauw vlees, rauwe zeevruchten en rauwe melkproducten	25 g	225	37	20-24	Breng 0,1 ml over naar 10 ml Fraser bouillon	37	20-24	10 µl	• Fraser bouillon maximaal 72 uur • Lysaat bij -20 °C • Lysaat bij 4 °C maximaal 72 uur

(a) Volume van het naar de buisjes met Neogen Lyse-oplossing overgebrachte monster. Raadpleeg stap 4.6 'Lyse'.

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

(c) Volume van het naar de buisjes met Neogen Lyse-oplossing overgebrachte monster. Raadpleeg stap 4.6 'Lyse'.

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

Voorbereiding van de Neogen® Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray

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

Voorbereiding van het Neogen® Moleculaire Detectie - Koelblokinzetstuk

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

Voorbereiding van het Neogen® Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk

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

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

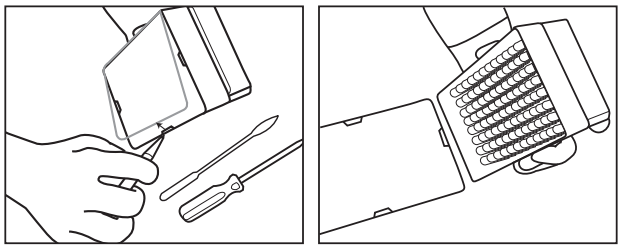
Voorbereiding van het Neogen® Moleculair Detectieinstrument

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

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

Lyse

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



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

(NC; steriel verrijkingsmedium).

4.1 Stroken met buisjes met Neogen Lyse-oplossing kunnen worden afgesneden tot het gewenste aantal buisjes met Neogen Lyse-oplossing. Selecteer het benodigde aantal individuele buisjes met Neogen Lyse-oplossing of stroken met 8 buisjes. Plaats de buisjes met Neogen Lyse-oplossing in een leeg rek.

4.2 Haal de stroken van de buisjes met Neogen Lyse-oplossing één voor één uit de verpakking en gebruik een nieuwe pipettip voor elke overdrachtsstap om zo kruisbesmetting te voorkomen.

4.3 Breng de verrijkte monsters over naar de buisjes met Neogen Lyse-oplossing zoals hieronder wordt beschreven:

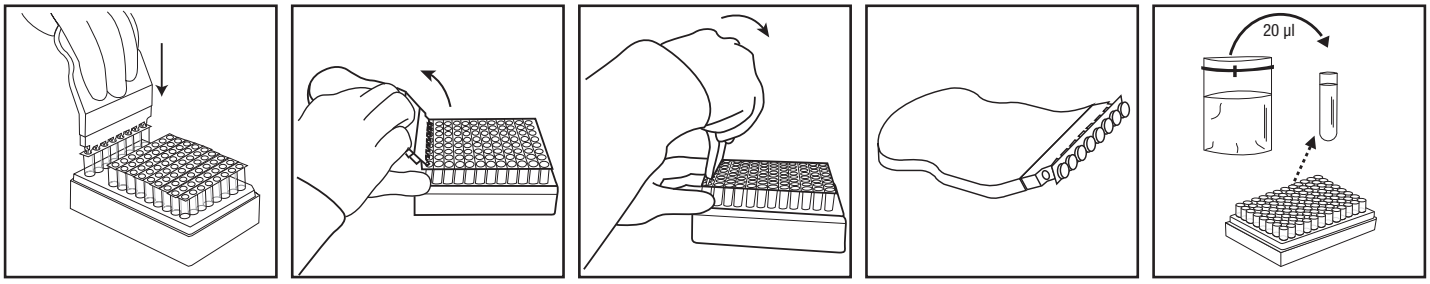
Breng **eerst** elk verrijkt monster over naar een individueel buisje met Neogen Lyse-oplossing. Breng de NC als **laatste** over.

4.4 Gebruik de lyse van het Neogen® Moleculaire Detectie Cap/Decap gereedschap - Lyse om één voor één een strook van een buisje met Neogen Lyse-oplossing open te maken.

4.5 Gooi de dop van het buisje met Neogen Lyse-oplossing weg – als er lysaat voor een hertest wordt bewaard, dienen de doppen in een schone bak te worden geplaatst om deze na de lyse opnieuw aan te brengen.

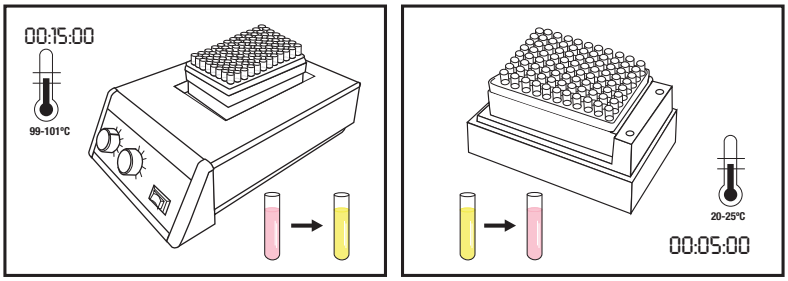
4.5.1 Zie Appendix A voor de verwerking van bewaard lysaat.

4.6 Breng 20 µl van het monster over in een buisje met Neogen Lyse-oplossing, tenzij in de protocoltabellen 2, 3 en 4 anders wordt aangegeven (bij monsters van rauwe melkproducten of omgevingsmonsters met een neutraliserende buffer moet bijvoorbeeld 10 µl worden gebruikt).



5. Herhaal stap 4.4 tot 4.6 totdat elk individueel monster aan het bijhorende buisje met Neogen Lyse-oplossing in de strook toegevoegd is.
6. Wanneer alle monsters overgebracht zijn, brengt u 20 µl NC (steriel verrijkingsmedium, zoals, Demi Fraser bouillon) over naar een buisje met Neogen Lyse-oplossing. Gebruik geen water als NC.
7. Controleer of de temperatuur van het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk zich op 100 ± 1 °C bevindt.
8. Plaats het onbedekte rek met buisjes met Neogen Lyse-oplossing in het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk en verwarm gedurende 15 ± 1 minuten. Tijdens de verwarming verandert de Neogen Lyse-oplossing van roze (koel) naar geel (heet).

   8.1 Monsters die tijdens de lyseanalysestap niet de juiste warmtebehandeling hebben ondergaan, kunnen als een potentieel biologisch gevaar worden beschouwd en mogen NIET in het Neogen Moleculaire Detectieinstrument worden geplaatst.
9. Haal het onbedekte rek met buisjes met Neogen Lyse-oplossing uit het verwarmingsblok en laat het minimaal 5 minuten en maximaal 10 minuten afkoelen in het Neogen Moleculaire Detectie - Koelblokinzetstuk. Het Neogen Moleculaire Detectie - Koelblokinzetstuk wordt op omgevingstemperatuur gebruikt en moet rechtstreeks op de laboratoriumtafel geplaatst zijn. Zodra de lyse-oplossing koel is, krijgt deze een roze kleur.
10. Haal het rek met buisjes met Neogen Lyse-oplossing uit het Neogen Moleculaire Detectie - Koelblokinzetstuk.

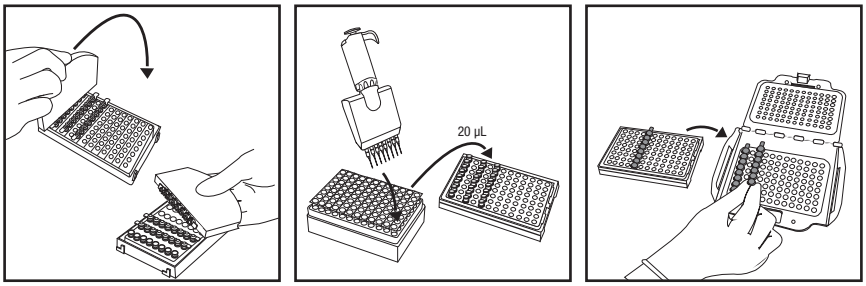


Amplificatie

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

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

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



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

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

Resultaten en interpretatie

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

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

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

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

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

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

Verificatie van resultaten conform de met NF VALIDATION gecertificeerde methode

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

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

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

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

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

verkregen resultaat te garanderen.

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

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

Appendix A. Protocolonderbreking: Warmtebehandelde lysaten opslaan en hertesten.

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

Referenties:

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

Uitleg over de symbolen op productlabels

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

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

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

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

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

FS00867C

NEOGEN

Datum för utgåva: 2024-07

Produktinformation

Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes*

Produktbeskrivning och avsedd användning

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

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

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

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

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

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

Fraser buljongersättning

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

Ferriammoniumcitrat 0,5 g/10 ml

Slutligt pH-värde 7,2 ± 0,2 vid 25°C

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

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

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

Tabell 1. Komponenter i Neogen Molecular Detection testsats

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

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

Säkerhet

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

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

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

⚠ VARNING

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

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

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

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

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

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

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

För att minska riskerna för korskontaminering vid analysförberedelserna:

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

För att minska riskerna som är förbundna med miljöföroreningar:

- Följ gällande branschstandarder för kassering av förorenat avfall.

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

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

OBSERVERA

För att minska riskerna för korskontaminering vid analysförberedelserna:

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

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

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

Se säkerhetsdatabladet för ytterligare information och lokala föreskrifter för kassering.

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

Användaransvar

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

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

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

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

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

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

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

Garantibegränsningar/begränsad ersättning

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

Begränsning av Neogen:s ansvar

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

Förvaring och kassering

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

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

Bruksanvisning

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

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

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

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

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

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

Provanrikning

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

Livsmedel

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

Miljöprover

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

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

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

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

Tabell 2: Allmänna anrikningsprotokoll vid 37 ± 1°C med användning av Demi-Fraser-buljong och Fraser-buljong efter behov.

Provmatris	Provstorlek	Anrikningsbuljongvolym (ml)	Anrikningstid (h)
Värmebehandlat, kokt, marinerat kött, fågel, skaldjur och fisk Värmebehandlade/ pastöriserade mejeriprodukter Produkter och grönsaker Flerkomponents-livsmedel	25 g	225	24–30
Miljöprover[a]	1 svamp	100 eller 225	24–30
	1 svabb	10	24–30
Rått kött, fågel, skaldjur, fisk	25 g	475	28–32

Provmatris	Primäranrikning (Demi-Fraser-buljong)[a]			Sekundär anrikning (Fraser-buljong)[a]			Volym provanalys[b]
	Provstorlek	Anrikningsbuljongvolym (ml)	Anrikningstid (h)	Provstorlek	Anrikningstemperatur (°C)	Anrikningstid (h)	
Råa mejeriprodukter	25 g	225	20–24	Överför 0,1 ml till 10 ml Fraser-buljong	37 ± 1	20–24	10 µl

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

(b) Provvolym överförd till Neogen Lyseringslösningsrören. Se steg 4.6 i avsnittet om lysering.

Specifika anvisningar för validerade metoder

AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2016.08

AOAC® *Performance Tested Method*℠ #081501

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

Tabell 3. Anrikningsprotokoll med Demi-Fraser-buljong[a] vid 37 ± 1°C enligt AOAC OMA℠ 2016.08 och PTM℠ Certifikat nr. 081501.

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

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

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

(b) Homogenisera provet med manuell blandning.

(c) Homogenisera provet genom att vortexa det.

NF VALIDATION av AFNOR Certification

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

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

NF VALIDATION-certifierad metod i enlighet med ISO 16140-2[6] jämfört med ISO 11290[3]
Valideringsomfång: Alla livsmedels- och miljöprover (exklusive prover för primärproduktion)
Provberedning: Prover bör beredas enligt EN ISO 11290-1[3] och EN ISO 6887[8]
Programversion: Se certifikat

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

Allmänt protokoll	Provstorlek	Anrikningsbuljongvolym (ml)	Anrikningstemperatur (± 1°C)	Anrikningstid (h)	Volym provanalys[a]	Accepterad avbrottspunkt
Alla matprover (utom rått kött, råa skaldjur och råa mejeriprodukter	25 g	225	37	24–30	20 µl	• Demi-Fraser Buljong upp till 72 timmar • Lysat vid -20°C • Lysera vid 4°C upp till 72 timmar
Miljöprover	25 g, 1 svabb eller 1 torkduk					

Specifikt protokoll	Primäranrikning (Demi-Fraser-buljong)[b]				Sekundär anrikning (Fraser-buljong)[b]				Accepterad avbrottspunkt
	Provstorlek	Anrikningsbuljongvolym (ml)	Anrikningstemperatur (± 1°C)	Anrikningstid (h)	Provstorlek	Anrikningstemperatur (± 1°C)	Anrikningstid (h)	Volym provanalys[c]	
Rått kött, råa skaldjur och råa mejeriprodukter	25 g	225	37	20–24	Överför 0,1 ml till 10 ml Fraserbuljong	37	20–24	10 µl	• Fraser Buljong upp till 72 timmar • Lysat vid -20°C • Lysera vid 4°C upp till 72 timmar

(a) Provvolym överförd till Neogen Lyseringslösningsrören. Se steg 4.6 i avsnittet om lysering.

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

(c) Provvolym överförd till Neogen Lyseringslösningsrören. Se steg 4.6 i avsnittet om lysering.

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

Förberedelse av Neogen® Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda

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

Förberedning av Neogen® Molekylär Detektion, Insats för kylblock

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

Förberedelse av Neogen® Molekylär Detektion, Insats för värmeblock

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

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

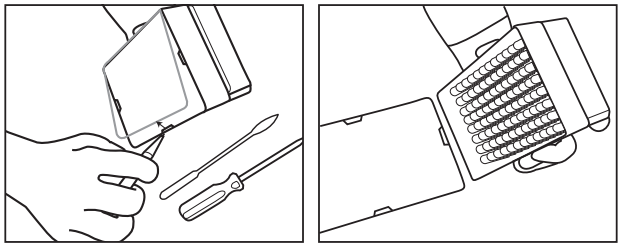
Beredning av Neogen® Molekylärt Detektionsinstrument

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

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

Lysering

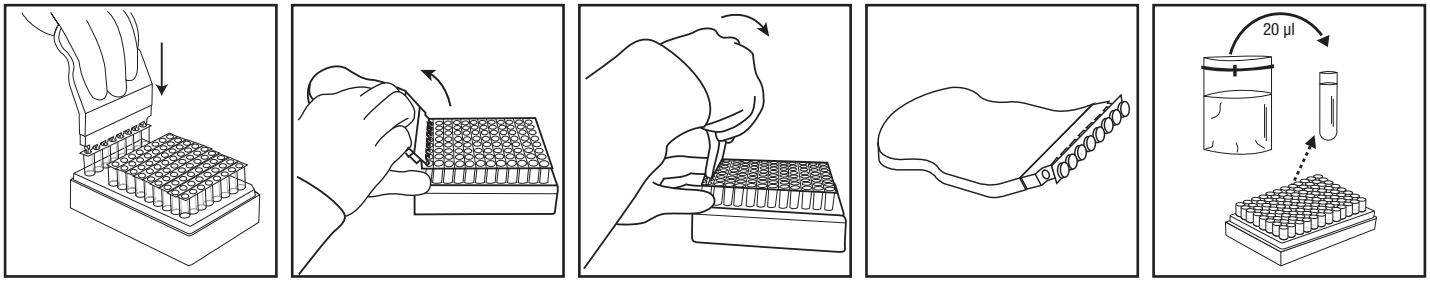
Avlägsna nedre delen av Neogen Provrörsställ för lyseringslösning med en skruvmejsel eller spatel innan du placerar det i Neogen Molekylär Detektion, Insats för värmeblock.



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

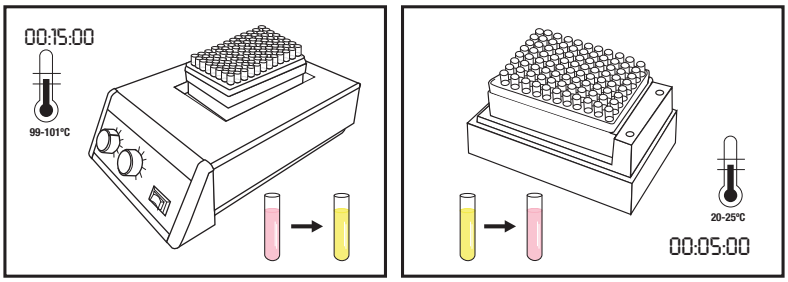
För över varje anrikat prov till ett enskilt Neogen Lyseringslösningsrör **först**. Överför NC **sist**.

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



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

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

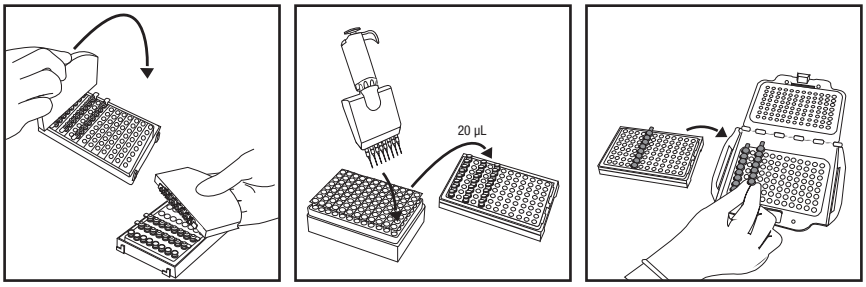


Amplifiering

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

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

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



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

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

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

Resultat och tolkning

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

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

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

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

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

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

Bekräftelse av resultat enligt NF VALIDATION-certifierad metod

Alternativ 1: Använda ISO 11290[3]-standarden från Demi-Fraser-anrikningen.

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

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

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

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

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

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

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

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

Referenser:

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

Förklaring av produktetikettsymbolerna

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

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

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

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

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

FS00867C

NEOGEN

Udstedelsesdato: 2024-07

Produktvejledning

Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*

Produktbeskrivelse og tilsigtet brug

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

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

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

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

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

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

Suppleret med Fraser Bouillon

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

Ferriammoniumcitrat	0,5 g/10 ml
Slut-pH	7,2 ± 0,2 ved 25°C

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

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

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

Tabel 1. Neogen Molekylær Detektions Analyse-kittets komponenter

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

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

Sikkerhed

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

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

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

⚠ ADVARSEL

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

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

Brugeren skal uddanne sit personale i aktuelle korrekte prøveteknikker: for eksempel god laboratoriepraksis, ISO/IEC 17025[4] eller ISO 7218[5].

For at reducere risiciene forbundet med et falsk-negativt resultat, der fører til frigørelse af kontaminerede produkter:

- Følg protokollen, og udfør tests præcist som angivet i produktvejledningen.
- Opbevar Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* som angivet på pakken og i produktvejledningen.
- Anvend altid Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* inden udløbsdatoen.
- Anvend Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* til fødevare- og miljøprøver, der er blevet godkendt internt eller af en tredjepart.
- Anvend udelukkende Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* med overflader, desinfektionsmidler, protokoller og bakteriestammer, der er blevet evalueret internt eller af en tredjepart.
- For at lave en miljøprøve, der indeholder neutraliserende buffer med arylsulfonatkompleks, foretages fortynding 1:2 inden testning (1 del prøve til 1 del steril opformeringsbouillon). En anden mulighed er at overføre 10 µl af NB-opformeringsmediet til Neogen LS-reagensglassene. Neogen®-prøveindsamlingsprodukter, som inkluderer neutraliserende buffer med arylsulfonatkompleks: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G og HS2410NB2G.

For at reducere risiciene forbundet med eksponering med kemikalier og biologiske farer:

- Det anbefales kraftigt, at kvindeligt laboratoriepersonale informeres om risikoen for fosterets udvikling som følge af infektion hos moderen ved eksponering med *Listeria monocytogenes*.
- Foretag patogentestning i et korrekt udstyret laboratorium under uddannet personales kontrol. Inkuberet opformeringsmedie og udstyr eller overflader, der har været i kontakt med inkuberet opformeringsmedie, kan indeholde patogenniveauer, der er tilstrækkelige til at udgøre en risiko for menneskelig sundhed.
- Følg altid sikkerhedspraksis for et standardlaboratorium, inklusive brug af passende beskyttelsesudstyr og beskyttelsesbriller under håndtering af reagenser og kontaminerede prøver.
- Undgå kontakt med indholdet af opformeringsmediet og reagensglas efter amplifikationen.
- Bortskaf opformerede prøver i overensstemmelse med gældende branchestandarder.
- Prøver, som ikke er blevet korrekt varmebehandlet under analysens lysinbehandlingstrin, kan udgøre en væsentlig

miljørisiko og bør IKKE sættes ind i Neogen Molekylær Detektions Instrument.

Overhold følgende forholdsregler for at reducere risiciene i forbindelse med krydskontaminering under klargøring af analysen:

- Brug altid handsker (for at beskytte brugeren og undgå introduktion af nukleaser).

For at reducere risici forbundet med miljøkontaminering:

- Følg de gældende branchestandarder for bortskaffelse af kontamineret affald.

For at reducere risici forbundet med eksponering med varme væsker:

- Overskrid ikke den anbefalede temperaturindstilling på varmeelementet.
- Overskrid ikke den anbefalede opvarmningstid.
- Brug et passende, kalibreret termometer til at verificere temperaturen for Neogen® Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg (f.eks. et termometer til delvis nedsænkning eller et digitalt termoelementtermometer, ikke et termometer til hel nedsænkning). Termometeret skal anbringes på det dertil indrettede sted i Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg.

BEMÆRK

Overhold følgende forholdsregler for at reducere risiciene i forbindelse med krydskontaminering under klargøring af analysen:

- Skift handsker før reagenskuglehydrering.
- Der anbefales brug af sterile, aerosol-barriere (filtrerede), molekylærbiologiske pipettespidser.
- Brug en ny pipettespids til hver prøveoverførsel.
- Anvend god laboratoriepraksis til overførsel af prøven fra opformeringsglasset til lysinreagensglasset. For at undgå kontaminering af pipetterne kan brugeren vælge at tilføje et mellemliggende overførselstrin. For eksempel kan brugeren overføre hver enkel opformerede prøve til et sterilt reagensglas.
- Anvend om muligt en molekylærbiologisk arbejdsstation, der inkluderer en bakteriedræbende lampe. Dekontaminer med jævne mellemrum laboratoriets arbejdsborde og udstyr (pipetter, luknings-/åbningsredskaber osv.) med en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsklorinopløsning eller DNA-renseopløsning.

For at reducere risiciene i forbindelse med et falsk-positivt resultat:

- Reagensglas må aldrig åbnes efter amplifikation.
- Før bortskaffelse af de kontaminerede reagensglas skal de altid iblødlægges i en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsklorinopløsning eller en tilsvarende opløsning i 1 time og holdes væk fra området for analyseforberedelse.
- Reagensglas må aldrig autoklaveres efter amplifikation.

Se sikkerhedsdatabladet for yderligere oplysninger og lokale vedtægter for bortskaffelse.

Hvis du har spørgsmål til specifikke anvendelser eller procedurer, bedes du besøge vores websted på www.neogen.com eller kontakte din lokale Neogen-repræsentant eller -distributør.

Brugerens ansvar

Brugeren er ansvarlig for at gøre sig bekendt med produktvejledninger og -oplysninger. Besøg vores hjemmeside på **www.neogen.com**, eller kontakt din lokale Neogen-repræsentant eller -distributør for at få yderligere oplysninger.

Når der vælges en testmetode, er det vigtigt, at man er klar over, at eksterne faktorer såsom prøveudtagningsmetoder, testprotokoller, prøveforberedelse, håndtering samt laboratorieteknikker kan påvirke resultaterne.

Det er brugerens eget ansvar at vælge en testmetode eller et produkt, som evaluerer et tilstrækkeligt antal prøver med de passende matricer og mikrobielle udfordringer for derved at sikre brugeren, at den valgte testmetode lever op til brugerens krav.

Det er også brugerens eget ansvar at kontrollere, at alle testmetoder og resultater lever op til kundernes og leverandørernes krav.

Som med alle andre testmetoder gælder det, at de resultater, der opnås med dette Neogen Food Safety-produkt, ikke giver garanti for kvaliteten af de testede matricer og processer.

For at hjælpe kunder med at evaluere metoden til flere forskellige fødevarematricer har Neogen udviklet Neogen® Molekylær Detektions Matrix Kontrol-kit. Efter behov kan Matrix Kontrol (MC) anvendes til at afgøre, om matricen har evnen til at påvirke resultaterne af Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*. Test flere forskellige repræsentative prøver fra matricen, dvs. prøver hentet fra forskellige kilder, fra enhver valideringsperiode under anvendelse af Neogen-metoden eller under testning af nye eller ukendte matricer eller matricer, der har gennemgået ændringer i råmaterialet eller i processen.

En matrice kan defineres som en produkttype med iboende egenskaber såsom sammensætning og proces. Forskelle mellem matricer kan være så simple som effekterne forårsaget af forskelle i deres bearbejdning eller præsentation, f.eks. rå vs. pasteuriseret, frisk vs. tørret osv.

Begrænsning af garantier/begrænset retsmiddel

BORTSET FRA HVAD DER ER UDTRYKKELIGT ANFØRT I DEN BEGRÆNSEDE GARANTI PÅ DEN INDIVIDUELLE PRODUKTEMBALLAGE, FRASIGER NEOGEN SIG ALLE UDTRYKKELIGE OG UNDERFORSTÅEDE GARANTIER, HERUNDER, MEN IKKE BEGRÆNSET TIL, ENHVER SALGBARHEDSGARANTI ELLER EGNETHED TIL EN BESTEMT ANVENDELSE. Hvis et Neogen Food Safety-produkt er behæftet med fejl eller mangler, vil Neogen eller en af dennes autoriserede distributører efter dennes eget skøn erstatte produktet eller refundere købsprisen. Dette er det eneste til rådighed værende retsmiddel. Kontakt venligst din Neogen-repræsentant eller autoriserede Neogen-distributør for yderligere spørgsmål.

Begrænsning af Neogen's ansvar

NEOGEN KAN IKKE HOLDES ANSVARLIG FOR NOGEN TAB ELLER SKADER, UANSET OM DET DREJER SIG OM DIREKTE, INDIREKTE, SÆRSKILT DOKUMENTEREDE, HÆNDELIGE SKADER ELLER FØLGESKADER, HERUNDER, MEN IKKE BEGRÆNSET TIL MISTET FORTJENESTE. Under ingen omstændigheder skal Neogen's erstatningsansvar kunne overstige købsprisen for det produkt, der efter sigende er behæftet med fejl.

Opbevaring og bortskaffelse

Opbevar Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* ved 2-8°C. Undlad frysning. Opbevar kittet på et mørkt sted. Efter åbning skal det kontrolleres, at folieposen er intakt. Hvis posen er beskadiget, må produktet ikke anvendes. Efter åbning bør ubenyttede reagensglas altid opbevares i den genlukkelige pose med tørremidlet indeni for at opretholde de frysetørrede reagensers stabilitet. Opbevar de forseglede poser ved temperaturer mellem 2-8°C i højst 60 dage.

Anvend ikke Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* efter udløbsdatoen. Udløbsdato og varepartinummer findes på æskens udvendige mærkat. Efter brug kan det berigede medie og reagensglas med Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* muligvis indeholde sygdomsfremkaldende materialer. Når testning er fuldført, bedes du følge de gældende branchestandarder for bortskaffelse af kontamineret affald. Se sikkerhedsdatabladet for yderligere oplysninger og lokale vedtægter for bortskaffelse.

Brugsanvisning

Følg omhyggeligt alle vejledninger. Hvis dette ikke overholdes, kan det medføre unøjagtige resultater.

Dekontaminer med jævne mellemrum laboratoriets arbejdsborde og udstyr (pipetter, luknings-/åbningsredskaber osv.) med en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsklorinopløsning eller DNA-renseopløsning.

Brugeren skal fuldføre undervisningen til Neogen Molekylær Detektions System brugerkvalifikation (OQ) som beskrevet i dokumentet "Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System"[6].

Se afsnittet "Specifikke instruktioner for validerede metoder" for specifikke krav:

Tabel 3 for opformeringsprotokoller ifølge AOAC® *Official Method of Analysis℠* **2016.08** og AOAC® *Performance Tested Method℠* Certificate **#081501.**

Tabel 4 for opformeringsprotokoller ifølge NF Validation-certifikat **3M 01/15-09/16.**

Prøveopformering

Tabel 2, 3 og 4 viser retningslinjer for opformering af fødevare- og miljøprøver. Det er brugerens ansvar at evaluere alternative prøveprotokoller eller blandingsforhold for at sikre, at denne testmetode imødekommer brugerens kriterier.

Fødevarer

1. Lad Demi Fraser Bouillon opformeringsmedie (med ferriammoniumcitrat) stabilisere til laboratorietemperatur.
2. Kombiner opformeringsmediet og prøven aseptisk iht. tabel 2, 3 eller 4. Til alle kødprøver og højpartikelprøver anbefales brug af filterposer.
3. Homogeniser grundigt ved blendning, centrifugering eller håndmiksning i 2 ± 0,2 minutter. Inkuber ved 37 ± 1°C iht. tabel 2, 3 eller 4.
4. For rå mejeriprodukter (se tabel 2, 3 eller 4) overføres 0,1 ml af den primære opformering til 10 ml Fraser Bouillon. Inkuber ved 37 ± 1°C i 20-24 timer.

Miljøprøver

Prøveindsamlingsanordningen kan være en svamp fugtet med en neutraliserende opløsning til inaktivering af desinfektionsmidlerne. Neogen anbefaler brug af en biocidfri cellulosesvamp. Den neutraliserende opløsning kan være Dey-Engley (D/E) neutraliserende bouillon eller Letheen bouillon. Det anbefales at desinficere området efter prøvetagning.

ADVARSEL: Hvis I vælger at bruge neutraliserende buffer (NB) med arylsulfonatkompleks til hydreringsopløsningen til svampen, skal der foretages fortynding 1:2 (1 del prøve i 1 del steril opformeringsbouilllon) af den opformerede miljøprøve inden testning for at reducere risiciene forbundet med et falsk-negativt resultat, der fører til frigørelse af kontaminerede produkter. En anden mulighed er at overføre 10 µL af den neutraliserende opformeringsbuffer til Neogen LS-reagensglassene.

Den anbefalede størrelse på prøvetagningsområdet til bekræftelse af forekomst eller fravær af patogenet på overfladen er mindst 100 cm^2 (10 cm x 10 cm eller 4 × 4 tommer). Ved prøvetagning med en svamp skal hele området dækkes ved at bevæge den i to retninger (venstre mod højre og derefter op og ned) for at tage miljøprøver ifølge den gældende prøvetagningsprotokol eller iht. retningslinjerne i FDA BAM[1], USDA FSIS MLG[2] eller ISO 18593[7].

1. Lad Demi Fraser Bouillon opformeringsmedie (med ferriammoniumcitrat) stabilisere til laboratorietemperatur.
2. Kombiner opformeringsmediet og prøven aseptisk iht. tabel 2, 3 eller 4.
3. Homogeniser grundigt ved blendning, centrifugering eller håndmiksning i 2 ± 0,2 minutter. Inkuber ved 37 ± 1°C i 24-30 timer iht. tabel 2, 3 eller 4.

Tabel 2: Generelle opformeringsprotokoller ved 37 ± 1°C ved brug af Demi Fraser Bouillon og Fraser Bouillon efter behov.

Prøvematrice	Prøvestørrelse	Opformeringsbouillonens volumen (ml)	Opformeringstid (timer)
Varmebehandlet, tilberedt, konserveret kød, fjerkræ, skaldyr og fisk Varmebehandlede/ pasteuriserede mælkeprodukter Landbrugsprodukter og grøntsager Fødevarer med flere komponenter	25 g	225	24-30
Miljøprøver[a]	1 svamp	100 eller 225	24-30
	1 podepind	10	24-30
Råt kød, fjerkræ, skaldyr, fisk	25 g	475	28-32

Prøvematrice	Primær opformering (Demi Fraser Bouillon)[a]			Sekundær opformering (Fraser Bouillon)[a]			Prøveanalysevolumen[b]
	Prøvestørrelse	Opformeringsbouillonens volumen (ml)	Opformeringstid (timer)	Prøvestørrelse	Opformeringstemperatur (°C)	Opformeringstid (timer)	
Rå mælkeprodukter	25 g	225	20-24	Overfør 0,1 ml til 10 ml Fraser Bouillon	37 ± 1	20-24	10 µl

(a) Demi Fraser og Fraser Bouillon skal altid suppleres med Fraser Bouillon (ferriammoniumcitrat) under primær eller sekundær opformering.

(b) Prøvevolumen overført til Neogen LS-reagensglassene. Se trin 4.6 i afsnittet Lysinbehandling.

Specifikke instruktioner for validerede metoder

AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2016.08

AOAC® *Performance Tested Method*℠ #081501

I OMA℠- og PTM℠-programmer udført af AOAC Research Institute har Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* vist sig at være en effektiv metode til detektion af *Listeria monocytogenes*. Matricerne, der er testet i denne undersøgelse, er vist i Tabel 3.

Tabel 3. Opformeringsprotokoller med Demi Fraser Bouillon[a] ved 37 ± 1°C iht. AOAC OMA℠ 2016.08 og PTM℠-certifikat nr. 081501.

Prøvematrice		Prøvestørrelse	Opformeringsbouillonens volumen (ml)	Opformeringstid (timer)
Hotdogs med oksekød, queso fresco, vanilleis, hytteost med 4 % mælkefedt, sødmælkskakaomælk 3 %, romainesalat, rå spinat i pose, koldrøget laks		25 g	225	24-30
Rå kylling		25 g	475	28-32
Kalkunpålæg		125 g	1125	24-30
Cantaloupemelon[b]		Hel melon	Tilstrækkelig volumen til at melonen kan flyde	26-30
Miljøprøver:	Rustfrit stål	1 svamp	225	24-30
	Forseglet beton	1 svamp	100	24-30
	Plast[c]	1 podepind	10	24-30

Alle prøver til AOAC-valideringen blev homogeniseret med centrifugering, medmindre andet er angivet.

(a) Demi Fraser og Fraser Bouillon skal altid suppleres med Fraser Bouillon (ferriammoniumcitrat) under primær eller sekundær opformering.

(b) Homogeniser prøven ved håndmixning.

(c) Homogeniser prøven i en vortex-blander.

NF VALIDATION med AFNOR Certification

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

For yderligere oplysninger om validering henvises der til NF VALIDATION-certifikatet, der er tilgængeligt på det ovenfor nævnte websted.

NF VALIDATION-certificeret metode i overensstemmelse med ISO 16140-2[6] i sammenligning med ISO 11290[3]
Valideringsområdet: Alle prøver af humane fødevarer samt miljøprøver (med undtagelse af prøver fra primær produktion)
Prøveforberedelse: Prøver bør forberedes i henhold til EN ISO 11290-1[3] og EN ISO 6887[8]
Softwareversion: Se certifikat

Tabel 4: Opformeringsprotokoller iht. NF VALIDATION-certificeret metode 3M 01/15-09/16 ved 37 ± 1°C med Demi Fraser Bouillon og Fraser Bouillon efter behov.

Generel protokol	Prøvestørrelse	Opformeringsbouillonens volumen (ml)	Opformeringstemperatur (±1°C)	Opformeringstid (timer)	Prøveanalysevolumen[a]	Accepteret afbrydelsespunkt
Alle fødevareprøver (undtagen råt kød, rå skaldyr og rå mælkeprodukter)	25 g	225	37	24-30	20 µl	• Demi Fraser Bouillon op til 72 timer • Lyser ved -20°C • Lyser ved 4°C i op til 72 timer
Miljøprøver	25 g, 1 podepind eller 1 serviet					

Specifik protokol	Primær opformering (Demi Fraser Bouillon)[b]				Sekundær opformering (Fraser Bouillon)[b]				Accepteret afbrydelsespunkt
	Prøvestørrelse	Opformeringsbouillonens volumen (ml)	Opformeringstemperatur (±1°C)	Opformeringstid (timer)	Prøvestørrelse	Opformeringstemperatur (±1°C)	Opformeringstid (timer)	Prøveanalysevolumen[c]	
Råt kød, rå skaldyr og rå mælkeprodukter	25 g	225	37	20-24	Overfør 0,1 ml til 10 ml Fraser Bouillon	37	20-24	10 µl	• Fraser Bouillon op til 72 timer • Lyser ved -20°C • Lyser ved 4°C i op til 72 timer

(a) Prøvevolumen overført til Neogen LS-reagensglassene. Se trin 4.6 i afsnittet Lysinbehandling.

(b) Demi Fraser og Fraser Bouillon skal altid suppleres med Fraser Bouillon (ferriammoniumcitrat) under primær eller sekundær opformering.

(c) Prøvevolumen overført til Neogen LS-reagensglassene. Se trin 4.6 i afsnittet Lysinbehandling.

BEMÆRK: Prøver større end 25 g er ikke testet i NF validation-undersøgelsen.

Forberedelse af Neogen® Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning

1. Fugt en klud med en 1-5 % (v: v i vand) husholdningsklorinopløsning eller en tilsvarende opløsning, og aftør Neogen® Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning.
2. Skyl Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning med vand.
3. Brug et engangshåndklæde til at aftørre Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning.
4. Sørg for, at Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning er tør inden brug.

Forberedelse af Neogen® Molekylær Detektions Køleblok Indlæg

Anbring Neogen® Molekylær Detektions Køleblok direkte på laboratoriebordet. Brug køleblokken ved laboratorietemperatur (20-25°C).

Forberedelse af Neogen® Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg

Anbring Neogen® Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg på en tør dobbelt varmeenhed. Tænd for den tørre varmeenhed, og indstil temperaturen, så Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg kan nå og opretholde en temperatur på 100 ± 1°C.

BEMÆRK: Afhængigt af varmeenheden skal man påregne ca. 30 minutter, før Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg opnår temperaturen. Ved hjælp af et passende, kalibreret termometer (f.eks. et termometer til delvis nedsænkning eller et digitalt termoelementtermometer, men **ikke** et termometer til fuld nedsænkning) anbragt på det dertil indrettede sted skal det verificeres, at Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg er på 100 ± 1°C.

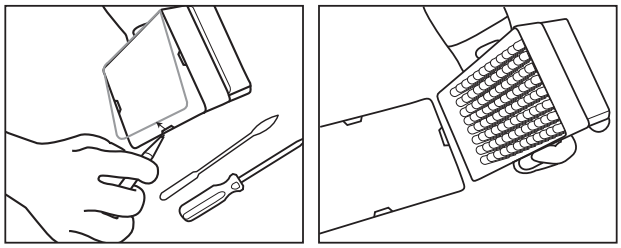
Forberedelse af Neogen® Molekylær Detektions Instrument

1. Start softwaren til Neogen® Molekylær Detektions System, og log på. Kontakt din Neogen Food Safety-repræsentant for at sikre, at du har den mest opdaterede version af softwaren.
2. Tænd for Neogen Molekylær Detektions Instrument.
3. Opret, eller rediger en kørsel med data for hver prøve. Se brugsanvisningen til Neogen Molekylær Detektions System for flere oplysninger.

BEMÆRK: Neogen Molekylær Detektions Instrument skal opnå Klar-tilstanden inden der indsættes reagensglas i Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning. Dette opvarmningstrin varer ca. 20 minutter og bliver angivet med et ORANGE lys på instrumentets statussøjle. Når instrumentet er klar til en kørsel, lyser statussøjlen GRØNT.

Lysinbehandling

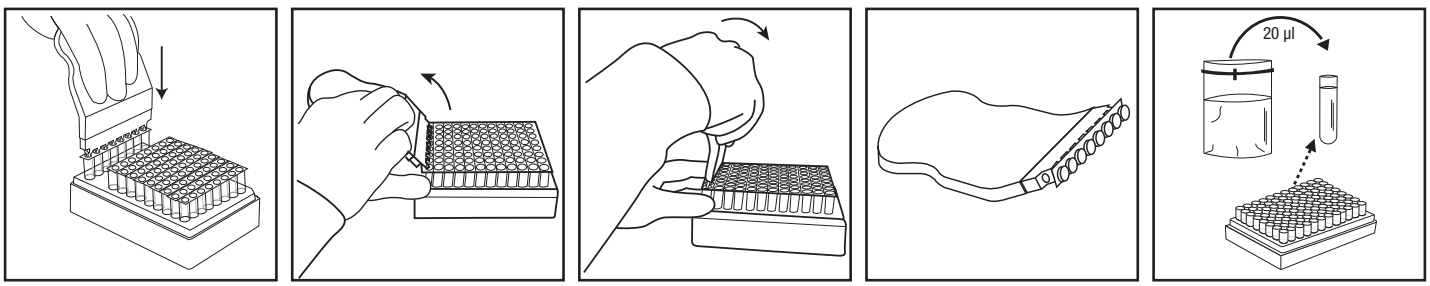
Fjern bunden af holderen til Neogen Lysinbehandlingsopløsning med en skruetrækker eller en spatel, før den placeres i Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg.



1. Lad LS-reagensglassene (Neogen Lysinbehandlingsopløsning) varme op ved at indstille holderen til stuetemperatur (20-25°C) natten over (16-18 timer). Alternativer til at stabilisere Neogen LS-reagensglassene til stuetemperatur er at sætte Neogen LS-reagensglassene på arbejdsbordet i mindst 2 timer, inkubere Neogen LS-reagensglassene i en inkubator ved 37 ± 1°C i 1 time eller stille dem i en tør, dobbelt varmeblok i 30 sekunder ved 100°C.
2. Vend de lukkede reagensglas på hovedet for at blande. Gå til næste trin inden for 4 timer.
3. Fjern opformeringsbouillonen fra inkubatoren.
4. Et Neogen LS-reagensglas er påkrævet til hver prøve og til den negative kontrolprøve (NC) (sterilt opformeringsmedie).
   - 4.1 Neogen LS-reagensglasstrimler kan skæres til det ønskede antal reagensglas til Neogen Lysinbehandlingsopløsning. Vælg antallet af individuelle Neogen LS-reagensglas eller -strimler med 8 reagensglas efter behov. Sæt Neogen LS-reagensglas i en tom holder.
   - 4.2 Åbn én Neogen LS-reagensglasstrimmel ad gangen for at undgå krydskontaminering, og brug en ny pipette til hvert overførselstrin.
   - 4.3 Overfør opformerede prøver til Neogen LS-reagensglas som beskrevet nedenfor:

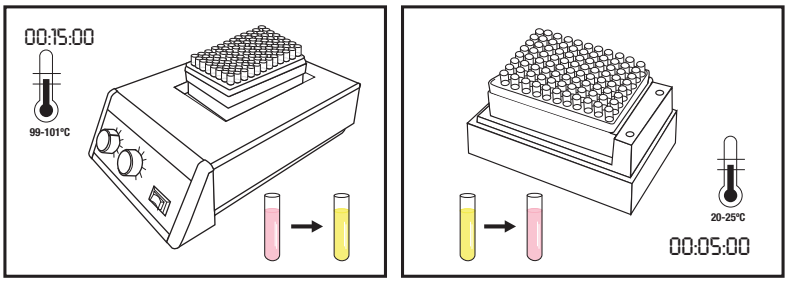
Overfør hver opformeret prøve til et individuelt Neogen LS-reagensglas **først**. Overfør NC **til sidst**.

   - 4.4 Brug Neogen® Molekylær Detektions Værktøj til Cap/Decap (lukning/åbning) – Lysin-behandling til at åbne én Neogen LS-reagensglasstrimmel ad gangen.
   - 4.5 Smid Neogen LS-reagensglassets låg væk – hvis lysat skal gemmes til gentestning, så placer lågene i en ren beholder til genpåsætning efter lysinbehandlingen.
     - 4.5.1 Ved behandling af gemt af lysat, se bilag A.
   - 4.6 Overfør 20 µl prøve til et Neogen LS-reagensglas, medmindre andet er angivet i protokollerne fra tabel 2, 3 eller 4 (ved f.eks. rå mælkeprodukter eller ved brug af miljøprøver med neutraliserende buffer anvendes 10 µl).



5. Gentag trin 4.4 til 4.6, indtil hver enkelt prøve er blevet tilføjet til et tilsvarende Neogen LS-reagensglas i strimlen.
6. Når alle prøver er blevet overført, skal der overføres 20 µl of NC (sterilt opformeringsmedie, f.eks. Demi Fraser Bouillon) til et Neogen LS-reagensglas. Brug ikke vand som en NC.

7. Kontroller, at Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg har en temperatur på 100 ± 1ºC.
8. Anbring den utildækkede holder med Neogen Lysinbehandlingsreagensglas i Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg, og opvarm i 15 ± 1 minutter. I løbet af opvarmningen vil Neogen Lysinopløsningen skifte farve fra lyserød (kølig) til gul (varm).
   8.1 Prøver, som ikke er blevet korrekt varmebehandlet under analysens lysinbehandlingstrin, kan udgøre en væsentlig miljørisiko og bør IKKE sættes ind i Neogen Molekylær Detektions Instrument.
9. Fjern den utildækkede holder med Neogen Lysinbehandlingsreagensglas fra varmeblokken, og lad den køle i Neogen Molekylær Detektions Køleblok Indlæg i mindst 5 minutter og i højst 10 minutter. Neogen Molekylær Køleblok Indlæg brugt ved stuetemperatur bør stå direkte på laboratoriebordet. Når det er koldt, skifter lysinopløsningen farve tilbage til lyserød.
10. Fjern holderen med Neogen Lysinbehandlingsreagensglas fra Neogen Molekylær Detektions Køleblok Indlæg.

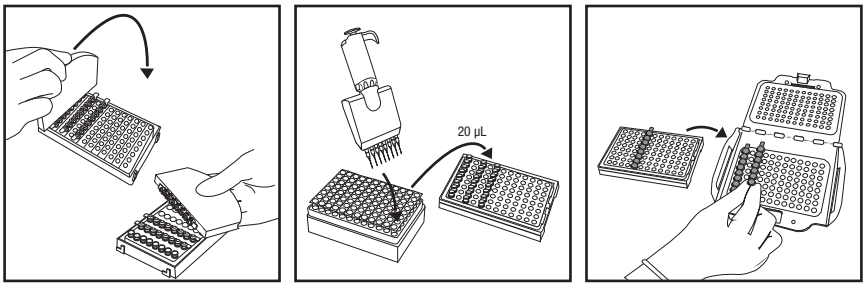


Amplifikation

1. Et Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* -reagensglas er påkrævet til hver prøve og NC.
   1.1 Reagensglasstrimler kan skæres til det ønskede antal reagensglas. Vælg antallet af individuelle Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* -reagensglas eller strimler med 8 reagensglas efter behov.
   1.2 Placer Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglas i en tom bakke.
   1.3 Undgå at forstyrre reagenskuglerne på bunden af reagensglassene.
2. Vælg ét Neogen Reagens Kontrol-reagensglas, og anbring det i holderen.
3. For at undgå krydskontaminering åbnes én Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglasstrimmel ad gangen, og der bruges en ny pipettespids til hvert overførselstrin.
4. Overfør lysat til Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglas og et Neogen Reagens Kontrol-reagensglas som beskrevet nedenfor:

Overfør hver prøvelysat til individuelle Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglas **først**, efterfulgt af NC. Hydrer Neogen Reagens Kontrol-reagensglasset **sidst**.

5. Brug Neogen® Molekylær Detektions Værktøj til Cap/Decap (lukning/åbning) - Reagens til at åbne Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglas - én reagensglasstrimmel ad gangen. Bortskaf hætten.
   5.1 **Overfør 20 µl prøvelysat fra den øverste halvdel af væsken (undgå præcipitat) i Neogen lysinbehandlingsreagens-glasset til et tilsvarende Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglas. Doser med en skrå hældning for at undgå at forstyrre kuglerne. Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned 5 gange.**
   5.2 Gentag trin 5.1, til individuelt prøvelysat er blevet tilføjet til et tilsvarende Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglas i strimlen.
   5.3 Dæk Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglassene med de medfølgende ekstra hætter, og brug den runde side af Neogen Molekylær Detektions Værktøj til Cap/Decap (lukning/åbning) - Reagens til at påføre tryk i en frem- og tilbagegående retning, og sørg for, at låget sidder fast.
   5.4 Gentag trin 5.1 til 5.3 efter behov for det antal prøver, der skal testes.
   5.5 Når alle prøvelysater er blevet overført, gentages trin 5.1 for at overføre 20 µl NC-lysat til et Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglas.
   5.6 Overfør **20 µl NC-lysat til et Neogen Reagens Kontrol-reagensglas**. Doser med en skrå hældning for at undgå at forstyrre kuglerne. Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned 5 gange.
6. Sæt reagensglassene med låg påsat i en ren og dekontamineret Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning. Luk og lås låget til Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning.



7. Gennemgå og bekræft den konfigurerede kørsel i softwaren Neogen Molekylær Detektions System.
8. Klik på startknappen i softwaren, og vælg det instrument, du vil bruge. Det valgte instruments låg åbnes automatisk.
9. Anbring Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning i Neogen Molekylær Detektions Instrument, og luk låget for at påbegynde analysen. Resultaterne fremkommer inden for 75 minutter, skønt positive resultater kan fremkomme hurtigere.
10. Når analysen er færdig, fjernes Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning fra Neogen Molekylær Detektions Instrument, reagensglassene bortskaffes ved at lade dem ligge i blød i en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsklorinopløsning eller en tilsvarende opløsning i 1 time og på god afstand af analyseklargørelsesområdet.

BEMÆRK: For at minimere risikoen for falsk-positiver pga. krydskontaminering må reagensglas, der indeholder forstærket DNA, aldrig åbnes. Dette omfatter Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*-reagensglas samt Neogen Reagens Kontrol- og Matrix Kontrol-reagensglas. De forseglede reagensglas skal altid bortskaffes ved at iblødlægge dem i en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsklorinopløsning eller en tilsvarende opløsning i 1 time og på god afstand af analyseklargørelsesområdet.

Resultater og aflæsning

En algoritme fortolker lyseffektkurven, der er et resultat af detektionen af nukleinsyreamplifikation. Resultaterne bliver automatisk analyseret af softwaren og bliver farvekodet baseret på resultatet. Et positivt eller negativt resultat bliver fastslået ved at analysere et antal unikke kurveparametre. Formodede positive resultater bliver rapporteret i realtid, mens negative resultater og inspektionsresultater bliver vist, efter kørslen er gennemført.

Formodede positive prøver skal bekræftes ifølge sikkerhedspraksis for et standardlaboratorium eller ved at følge den relevante referencemetodebekræftelse[1, 2, 3], der begynder med overførsel fra den primære opformeringsbouillon til den sekundære opformeringsbouillon (hvis relevant) efterfulgt af udpladning og bekræftelse af isolater ved hjælp af passende biokemiske og serologiske metoder.

BEMÆRK: Selv en negativ prøve vil ikke give en nulaflæsning, idet systemet og Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes* amplifikationsreagenser har en "baggrundsmæssig" relativ lysenhed (RLU)-læsning.

I sjældne tilfælde af en usædvanlig lyseffekt vil algoritmemærkaterne kategorisere dette som Inspektion. Neogen anbefaler brugeren at gentage analysen for alle inspektionsprøver. Hvis resultatet fortsat markeres til Inspektion, skal du fortsætte til bekræftelsestest ved brug af din foretrukne metode eller som specificeret i lokale forskrifter.

Tabel 5: Resultatsymboler for prøver og aflæsning, der visers af Neogen Molekylær Detektions System-softwaren.

Brøndtype	Symbol for brøndresultat	Resultat	Aflæsning
Prøve		Positiv	Prøven er formodet positiv for målpatogenet.
Prøve		Negativ	Prøven er negativ for målpatogenet.
Prøve		Hæmmet	Prøvematricen var hæmmende for analysen. En ny test kan være nødvendig. Se afsnittet om fejlfinding og produktvejledningen til analysesættet for at få flere oplysninger.
Prøve		Inspicer	Forekomst eller fravær af patogenet kunne ikke fastslås. En ny test kan være nødvendig. Se afsnittet om fejlfinding og produktvejledningen til analysesættet for at få flere oplysninger.
Prøve		Fejl	Der blev ikke registreret bioluminescens. En ny test kan være nødvendig. Se afsnittet om fejlfinding og produktvejledningen til analysesættet for at få flere oplysninger.

Bekræftelse af resultater ifølge NF VALIDATION-certificeret metode

Mulighed 1: Brug af ISO 11290[3]-standarden fra opformeringen med Demi Fraser Bouillon.

Mulighed 2: Ved isolering på PALCAM-agar eller (O&A) på kromogen agar, som udgør en del af den NF VALIDATION-certificerede metode til detektion af *Listeria monocytogenes*. Forekomsten af karakteristiske kolonier er tilstrækkelig til at bekræfte forekomst af *Listeria monocytogenes*.

Mulighed 3: Brug af nukleinsyreprober som beskrevet i EN ISO 7218[5]-standarden udført på isolerede kolonier fra selektiv agar (se mulighed 1 eller 2).

Mulighed 4: Brug af en anden NF VALIDATION-certificeret metode med et andet princip end Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*. Den komplette protokol, der er beskrevet for denne anden validerede metode, skal anvendes. Alle trin før bekræftelsen startes skal være fælles for begge metoder.

I tilfælde af uoverensstemmende resultater (formodede positive med den alternative metode, som ikke er bekræftet med en af metoderne beskrevet ovenfor), skal laboratoriet anvende den nødvendige procedure for at sikre valideringen af det opnåede resultat.

I tilfælde af uoverensstemmende resultater (formodede positive med Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Listeria monocytogenes*, som ikke er bekræftet med en af metoderne beskrevet ovenfor), skal laboratoriet anvende den nødvendige procedure for at sikre valideringen af de opnåede resultater.

Hvis du har spørgsmål til specifikke anvendelser eller procedurer, bedes du besøge vores websted på www.neogen.com eller kontakte din lokale Neogen-repræsentant eller -distributør.

Bilag A. Protokolafbrydelse: Opbevaring og gentestning af varmebehandlede lysater.

1. Til opbevaring af varmebehandlet lysat påsættes en ren hætte på lysisreagensglasset (se afsnit 4.5 "Lysinbehandling").
2. Opbevar ved 4-8°C i op til 72 timer.
3. Forbered en opbevaret prøve til amplifikation ved at vende den på hovedet 2-3 gange for at blande.
4. Tag lågene af reagensglassene.
5. Placer de blandede lysatreagensglas på Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg, og varm op til 100 ± 1°C i 5 ± 1 minutter.
6. Fjern holderen med Neogen Lysinbehandlingsreagensglas fra varmeblokken, og lad den køle i Neogen Molekylær Detektions Køleblok Indlæg i mindst 5 minutter og i højst 10 minutter.
7. Fortsæt protokollen i afsnittet "Amplifikation" som angivet ovenfor.

Litteraturhenvisninger:

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

Beskrivelser af symboler til produktmærkning

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

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

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

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

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

FS00867C

Utgivelsesdato: 2024-07

Produktveiledning

Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*

Produktbeskrivelse og tiltenkt bruk

Neogen® Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* brukes sammen med Neogen® System for molekylær deteksjon for rask og spesifikk deteksjon av *Listeria monocytogenes* i oppformerte mat- og miljøprøver. Neogen Molekylære deteksjonstester bruker sløyfe-mediert isotermisk amplifikasjon for hurtig amplifikasjon av nukleinsyresekvenser med høy spesifisitet og sensitivitet, kombinert med bioluminescens for å registrere amplifikasjonen. Antatte positive testresultater rapporteres i sanntid, mens negative resultater vises etter at testen er fullført. Antatte positive resultater skal bekreftes ved hjelp av din foretrukne metode eller som spesifisert av lokale forskrifter[1, 2, 3].

Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* er ment for bruk i et laboratoriemiljø av fagpersoner med opplæring i laboratorieteknikker. Neogen har ikke godkjent dette produktet for bruk i andre industrier enn mat og drikke. Neogen har for eksempel ikke godkjent dette produktet for testing av vann, farmasøytiske, kosmetiske og kliniske prøver eller veterinærprøver. Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* er ikke evaluert med alle mulige testprotokoller eller med alle mulige bakteriestammer.

Som for alle testmetoder kan kilden, formuleringen og kvaliteten til anrikningsmediet påvirke resultatene. Faktorer som prøveinnsamlingsmetoder, testprotokoller, prøveforberedelse, håndtering og laboratorieteknikk kan også påvirke resultatet. Neogen anbefaler å evaluere metoden, inkludert anrikningsmediet, i brukerens miljø ved bruk av et tilstrekkelig antall prøver ved spesielle matutfordringer og mikrobielle utfordringer for å sikre at metoden oppfyller brukerens kriterier.

Neogen har evaluert Neogen molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* med Fraser 1/2 buljong som inneholder jernammoniumsitrat, og Fraser buljong som inneholder jernammoniumsitrat etter behov. En typisk formel for dette mediet følger nedenfor.

Typisk formel for Fraser 1/2 buljong base	(g/L)	Typisk formel for Fraser buljong base	(g/L)
Natriumklorid	20 g	Natriumklorid	20 g
Natriumfosfat, dibasisk, vannfritt*	9,6 g	Natriumfosfat, dibasisk, vannfritt*	9,6 g
Storfekjøttekstrakt	5,0 g	Storfekjøttekstrakt	5,0 g
Pankreatisk sammendrag av kasein	5,0 g	Pankreatisk sammendrag av kasein	5,0 g
Peptisk sammendrag av dyrevev	5,0 g	Peptisk sammendrag av dyrevev	5,0 g
Gjærekstrakt	5,0 g	Gjærekstrakt	5,0 g
Litiumklorid	3,0 g	Litiumklorid	3,0 g
Kaliumfosfat, monobasisk	1,35 g	Kaliumfosfat, monobasisk	1,35 g
Eskulin	1,0 g	Eskulin	1,0 g
Akriflavin HCl	0,0125 g	Akriflavin HCl	0,025 g
Nalidixinsyre	0,01 g	Nalidixinsyre	0,02 g

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

Fraser buljong-supplement

(Ingredienser per 10 mL flaske. En flaske tilsettes en liter basalt medium.)

Jernammoniumsitrat 0,5 g/10 mL

Endelig pH 7,2 ± 0,2 ved 25 °C

Neogen® Instrument for molekylær deteksjon er ment for bruk med prøver som har gjennomgått varmebehandling i testens lyseringstrinn, som er konstruert for å ødelegge organismer som finnes i prøven. Prøver som ikke har blitt ordentlig varmebehandlet under testlyseringstrinnet, kan vurderes som en potensiell biologisk fare og skal IKKE settes inn i Neogen Instrument for molekylær deteksjon.

Neogen Food Safety er ISO (International Organization for Standardization) 9001-sertifisert for utforming og produksjon.

Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* inneholder 96 tester, beskrevet i tabell 1.

Tabell 1. Komponenter i Neogen Molekylær deteksjonskit

Artikkel	Beskrivelse	Mengde	Innhold	Kommentarer
Neogen® Lyseringsoppløsning (LS)	Rosa oppløsning i gjennomsiktige rør	96 (12 rekker med 8 rør)	580 µL LS per rør	Plassert i stativ og klar til bruk
Reagensrør for Neogen® Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*	Gule rør	96 (12 rekker med 8 rør)	Lyofilisert spesifikk amplifikasjon og deteksjonsblanding	Klar til bruk
Ekstra lokk	Gule lokk	96 (12 rekker med 8 lokk hver)		Klar til bruk
Neogen® Reagenskontroll (RC)	Gjennomsiktige rør med vippelokk	16 (2 poser med 8 individuelle rør hver)	Lyofilisert kontroll-DNA, amplifikasjon og deteksjonsblanding	Klar til bruk

Den negative kontrollen, som ikke medfølger i kittet, er et sterilt anrikningsmedium, for eksempel Fraser 1/2 buljong. Ikke bruk vann som negativ kontroll.

Sikkerhet

Brukeren må lese, forstå og følge all sikkerhetsinformasjon i instruksjonene for Neogen System for molekylær deteksjon og Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*. Behold sikkerhetsveiledningen for fremtidig referanse.

⚠ **ADVARSEL:** Indikerer en farlig situasjon som, om den ikke unngås, kan resultere i død eller alvorlig personskade og/eller materielle skader.

MERKNAD: Indikerer en potensielt farlig situasjon som, om den ikke unngås, kan føre til materielle skader.

⚠ ADVARSEL

Ikke bruk Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* i diagnostisering av tilstander hos mennesker eller dyr.

Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*-metoden kan generere *Listeria monocytogenes* til nivåer som er tilstrekkelig til å forårsake dødfødsler og dødsfall hos gravide kvinner, og de som har dårlig immunforsvar, hvis de eksponeres.

Brukeren må gi opplæring i korrekte testteknikker til sitt personell: for eksempel Good Laboratory Practices, ISO/IEC 17025[4] eller ISO 7218[5].

For å redusere risikoene forbundet med et falskt negativt resultat som kan føre til utslipp av kontaminert produkt:

- Følg protokollen og utfør testene akkurat slik de beskrives i produktveiledning.
- Oppbevar Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* slik som beskrevet på pakning og i produktveiledning.
- Bruk alltid Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* før utløpsdatoen.
- Bruk Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* for mat- og miljøprøver som er godkjent internt eller av en tredjepart.
- Bruk kun Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* til overflater, desinfeksjonsmidler, protokoller og bakteriestammer som har blitt validert internt eller av en tredjepart.
- For en miljøprøve som inneholder nøytraliserende buffer med arylsulfonat-kompleks, skal du utføre en 1:2 fortynning før testing (1 del prøve i 1 del steril anrikningsbuljong). Et annet alternativ er å overføre 10 µL av NB-anrikningen inn i Neogen lyseringsoppløsningsrørene. Prøvetakingsprodukter fra Neogen® som inkluderer nøytraliserende buffer med arylsulfonatkompleks: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G og HS2410NB2G.

For å redusere risikoene forbundet med eksponering for kjemikalier og biologiske farer:

- Det anbefales sterkt at kvinnelig laboratoriepersonell blir informert om risikoen for et foster i utvikling som resultat av infeksjon hos moren gjennom eksponering for *Listeria monocytogenes*.
- Utfør patogentesting i et laboratorium som er korrekt utstyrt, under oppsyn av fagopplært personell. Inkubert anrikningsmedium og utstyr eller overflater som har vært i kontakt med inkubert anrikningsmedium, kan inneholde patogener på et nivå som kan innebære helserisiko for mennesker.
- Følg alltid standard praksis for laboratoriesikkerhet, inkludert bruk av egnet personlig verneutstyr og øyevern ved håndtering av reagensrør og kontaminerte prøver.
- Unngå kontakt med innholdet i anrikningsmediet og reagensrør etter amplifikasjon.
- Kast anrikede prøver i henhold til gjeldende industristandarder.
- Prøver som ikke har blitt ordentlig varmebehandlet under testlyseringstrinnet, kan vurderes som en potensiell biologisk

fare og skal IKKE settes inn i Neogen Instrument for molekylær deteksjon.

For å redusere risikoene forbundet med krysskontaminering ved klargjøring av test:

- Bruk alltid hansker (for å beskytte brukeren og forhindre innføring av nukleaser).

For å redusere risikoen forbundet med miljøforurensning:

- Følg gjeldende industristandarder for avhending av kontaminert avfall.

For å redusere risiko forbundet med eksponering for varme væsker:

- Ikke overstig den anbefalte temperaturinnstillingen på varmeblokken.
- Ikke overstig den anbefalte oppvarmingstiden.
- Bruk et passende, kalibrert termometer til å kontrollere temperaturen på Neogen® Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon (f.eks. delvis nedsenket termometer eller digitalt termoelement-termometer, ikke et helt nedsenket termometer). Termometeret må plasseres på det angitte stedet på Neogen Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon.

MERKNAD

For å redusere risikoene forbundet med krysskontaminering ved klargjøring av test:

- Skift hansker før hydrering av reagens-pellet.
- Det anbefales å bruke pipettespisser med sterile, spraybaserte barrierer (filtrerte), av molekylærbiologi-karakter.
- Bruk en ny pipettespiss for hver prøveoverføring.
- Bruk god laboratoriepraksis til å overføre prøven fra anrikningen til lyseringsrøret. For å unngå kontaminering av pipetter kan brukeren velge å legge til et mellomtrinn under overføring. Brukeren kan for eksempel overføre hver anriket prøve til et sterilt rør.
- Dersom tilgjengelig, bør brukeren bruke en arbeidsstasjon for molekylær biologi som har en bakteriedrepende lampe. Utfør periodisk dekontaminering av benker og utstyr (pipetter, verktøy for lukking/åpning, osv.) i laboratoriet med en 1-5 % (volumandel i vann) oppløsning av husholdningsblekemiddel eller oppløsning for fjerning av DNA.

For å redusere risikoene forbundet med falskt positivt resultat:

- Åpne aldri reagensrørene etter amplifikasjon.
- Kast alltid de kontaminerte rørene ved å bløtlegge dem i en 1-5 % (volumandel i vann) oppløsning av eller tilsvarende i 1 time og borte fra testens forberedelsesområde.
- Autoklaver aldri rørene etter amplifikasjon.

Se HMS-databladet for ytterligere informasjon og lokale forskrifter for avhending.

Hvis du har spørsmål om spesifikke bruksområder eller prosedyrer, kan du besøke vårt nettsted på www.neogen.com eller ta kontakt med en lokal Neogen-representant eller -forhandler.

Brukeransvar

Brukere er ansvarlige for å sette seg inn i produktveiledningen og informasjon om produktet. Besøk nettsiden vår, **www.neogen.com**, eller kontakt din lokale Neogen-representant eller -distributør for mer informasjon.

Ved valg av testmetode er det viktig å ta hensyn til at eksterne faktorer som metoder for stikkprøver, testprotokoller, preparering av prøver, håndtering og laboratorieteknikk kan påvirke resultatene.

Ved valg av testmetode er det brukerens ansvar å vurdere et tilstrekkelig antall prøver med passende matriks og mikrobielle utfordringer for å tilfredsstille brukeren om at den valgte prøvemetoden oppfyller brukerens kriterier.

Det er også brukerens ansvar å fastslå at alle prøvemetoder og resultater tilfredsstiller kundens og leverandørens krav.

Som med alle testmetoder utgjør ikke resultatene som oppnås ved bruk av noe Neogen Food Safety-produkt, noen garanti om kvaliteten av matriksene eller prosessene som testes.

For å hjelpe kunder med å evaluere metoden for forskjellige matmatriks, har Neogen utviklet Neogen® Matrisekontrollsett for molekylær deteksjon. Bruk matrikskontroll (MC) ved behov for å avgjøre om matrikset har evne til å påvirke resultatene for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*. Test flere prøver som representerer matrikset, dvs. prøver innhentet fra forskjellige opphav, i løpet av en hvilken som helst valideringsperiode når Neogen-metoden brukes, ved testing av nye eller ukjente matriks, eller matriks som har gjennomgått endringer i råvarematerialer eller prosess.

Et matriks kan defineres som en produkttype med indre egenskaper, slik som sammensetning og prosess. Forskjeller mellom matriks kan være så enkle som effekter som skyldes forskjeller i prosessering eller presentasjon, for eksempel rå i forhold til pasteurisert, fersk i forhold til tørket osv.

Begrensing av garantier / begrensede rettigheter

MED MINDRE DET ER UTTRYKKELIG SKREVET I EN BEGRENSET GARANTI PÅ EN PRODUKTPAKNING, FRASKRIVER NEOGEN SEG ALLE DIREKTE OG INDIREKTE GARANTIER, INKLUDERT MEN IKKE BEGRENSET TIL, ENHVER GARANTI OM SALGBARHET ELLER ANVENDELSE TIL ET BESTEMT FORMÅL. Hvis noe Neogen Food Safety-produkt er defekt, vil Neogen eller dets autoriserte distributør erstatte eller refundere produktets kjøpesum etter eget skjønn. Dette er dine ubetingede rettigheter. Kontakt Neogen-representanten din eller den autoriserte Neogen-distributøren hvis du har flere

spørsmål.

Begrensning av Neogens ansvar

NEOGEN VIL IKKE VÆRE ANSVARLIG FOR NOE TAP ELLER SKADE, DIREKTE ELLER INDIREKTE, SPESIELL, TILFELDIG ELLER FØLGESKADE, INKLUDERT, MEN IKKE BEGRENSET TIL, TAPT FORTJENESTE. Ikke under noen omstendighet skal Neogens ansvar, under noen juridisk teori, overstige kjøpesummen for et produkt som antas å være defekt.

Oppbevaring og avhending

Oppbevar Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* ved 2-8 °C. Må ikke fryses. Hold kitet borte fra lys under oppbevaring. Etter at kitet er åpnet, skal folieposen undersøkes for skader. Må ikke brukes dersom posen er skadet. Etter åpning skal ubrukte reagensrør alltid oppbevares i den gjenlukkbare posen med tørkemiddelet inni, for å opprettholde stabiliteten til de lyofiliserte reagensene. Ikke oppbevar reforseglede poser ved 2-8 °C i mer enn 60 dager.

Ikke bruk Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* etter utløpsdatoen. Utløpsdato og partinummer er angitt på etiketten på utsiden av esken. Etter bruk kan rørene med anrikningsmediet og Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* inneholde potensielt patogent materiale. Når testingen er fullført, følger brukeren gjeldende industristandarder for avhending av kontaminert avfall. Se HMS-databladet for ytterligere informasjon og lokale forskrifter for avhending.

Bruksanvisning

Følg alle instruksjonene nøye. Dersom dette ikke blir gjort, kan det føre til unøyaktige resultater.

Utfør periodisk dekontaminering av benker og utstyr (pipetter, verktøy for lukking/åpning, osv.) i laboratoriet med en 1-5 % (volumandel i vann) oppløsning av husholdningsblekemiddel eller oppløsning for fjerning av DNA.

Brukeren må fullføre opplæringen for operatører av Neogen System for molekylær deteksjon (OQ), som beskrevet i dokumentet «Installasjonskvalifikasjon (IQ) / Driftskvalifikasjon (OQ) Protokoller og instruksjoner for Neogen System for molekylær deteksjon»[6].

Se avsnittet «Spesifikke veiledninger for validerte metoder» for spesifikke krav:

Tabell 3 over anrikningsprotokoller i henhold til AOAC® *Official Method of Analysis℠* **2016.08** og AOAC® *Performance Tested Method℠* sertifikat **#081501.**

Tabell 4 for anrikningsprotokoller i henhold til NF Validation-sertifikat **3M 01/15-09/16.**

Prøveanrikning

Tabell 2, 3 eller 4 viser veiledning for anrikning for mat- og miljøprøver. Det er brukerens ansvar å validere alternative prøveprotokoller eller fortynningsforhold for å sikre at testmetoden møter brukerens krav.

Mat

1. La anrikningsmediet Fraser 1/2 buljong (inneholder jernammoniumsitrat) stabiliseres til laboratoriets romtemperatur.
2. Kombiner anrikningsmediet og prøven aseptisk i henhold til tabell 2, 3 eller 4. For alt kjøtt og svært oppdelte prøver anbefales det å bruke filterposer.
3. Homogeniser grundig ved å blande, knuse eller blande for hånd i 2 ± 0,2 minutter. Inkuber ved 37 ± 1 °C i henhold til tabell 2, 3 eller 4.
4. For rå meieriprodukter (se tabell 2, 3 eller 4), overføres 0,1 mL av den primære anrikningen inn i 10 mL av Fraser buljong. Inkuber ved 37 ± 1 °C i 20-24 timer.

Miljøprøver

Prøvetakingsutstyr kan være en svamp fuktet med en nøytraliserende løsning for å motvirke effektene av desinfeksjonsmidlene. Neogen anbefaler å bruke en giftfri cellulosesvamp. Nøytraliseringsløsningen kan være Dey-Engley (D/E) nøytraliserende buljong eller letheen-buljong. Det anbefales å desinfisere området etter prøvetakingen.

ADVARSEL: Hvis man velger å bruke nøytraliserende buffer (NB) som inneholder arylsulfonatkompleks, må man blande ut den berikete miljøprøven i forholdet 1:2 (1 part prøve til 1 del steril anrikningsbuljong) før testing, for å kunne redusere risikoer forbundet med falskt negativt resultat som fører til at det kontaminerte produktet slippes ut. Et annet alternativ er å overføre 10 µL av den nøytraliserende buffer-anrikningen inn i Neogen lyseringsoppløsningsrørene.

Den anbefalte størrelsen på prøvetakingsområdet for å kontrollere nærværet eller fraværet av patogenet på overflaten, er minst 100 cm^2 (10 cm x 10 cm or 4” x 4”). Ved prøvetaking med en svamp må hele området dekkes, ved bevegelse i to retninger (fra venstre mot høyre og deretter ovenfra og ned) eller ved innsamling av miljøprøver i samsvar med gjeldende prøvetakingsprotokoll eller i henhold til retningslinjene fra FDA BAM[1], USDA FSIS MLG[2] eller ISO 18593[7].

1. La anrikningsmediet Fraser 1/2 buljong (inneholder jernammoniumsitrat) stabiliseres til laboratoriets romtemperatur.
2. Kombiner anrikningsmediet og prøven aseptisk i henhold til tabell 2, 3 eller 4.

3. Homogeniser grundig ved å blande, knuse eller blande for hånd i 2 ± 0,2 minutter. Inkuber ved 37 ± 1 °C i 24-30 timer i henhold til tabell 2, 3 eller 4.

Tabell 2: Generelle anrikningsprotokoller ved 37 ± 1 °C ved bruk av Fraser 1/2 buljong og Fraser buljong etter behov.

Prøvematriks	Prøve-størrelse	Anriknings-buljong volum (mL)	Anrikningstid (timer)
Varmebehandlet, tilberedt, røkt kjøtt, fjærfe, skalldyr og fisk Varmebehandlede / pasteuriserte meieriprodukter Jordbruksprodukter og grønnsaker Matvarer med flere komponenter	25 g	225	24-30
Miljøprøver[a]	1 svamp	100 eller 225	24-30
	1 svaber	10	24-30
Rått kjøtt, fjærfe, skalldyr, fisk	25 g	475	28-32

Prøvematriks	Primær anrikning (Fraser 1/2 buljong)[a]			Sekundær anrikning (Fraser buljong)[a]			Prøve-analyse-volum[b]
	Prøve-størrelse	Anriknings-buljong volum (mL)	Anrikningstid (timer)	Prøvestør-relse	An-rikningstem-peratur (°C)	An-rikningstid (timer)	
Rå meieriprodukter	25 g	225	20-24	Overfør 0,1 mL i 10 mL Fraser buljong	37 ± 1	20-24	10 µL

(a) Fraser 1/2 buljong og Fraser buljong må alltid suppleres med Fraser- buljongsupplement (jernammoniumsitrat) under primær eller sekundær anrikning.

(b) Volum av prøve overført til Neogen lyseringsoppløsningsrørene. Se trinn 4.6 i lyseringsdel.

Spesifikke veiledninger for validerte metoder

AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2016.08

AOAC® *Performance Tested Method℠* #081501

I AOAC Research Institute OMA℠- og PTM℠-programmene ble Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* funnet å være en effektiv metode for å påvise *Listeria monocytogenes*. Matriksene som ble testet i studien, er vist i tabell 3.

Tabell 3. Anrikningsprotokoller som brukte Fraser 1/2 buljong[a] ved 37 ± 1 °C i henhold til AOAC OMA℠ 2016.08 og PTM℠-sertifikatet #081501.

Prøvematriks		Prøvestørrelse	Anrikningsbuljong volum (mL)	Anrikningstid (timer)
Grillpølse av storfekjøtt, queso fresco, vaniljeiskrem, 4 % cottage cheese med melkefett, 3 % sjokolademelk av helmelk, romanosalat, rå spinat i pose, kaldrøkt laks		25 g	225	24-30
Rå kylling		25 g	475	28-32
Delikatessekalkun		125 g	1125	24-30
Kantalupp[b]		Hel melon	Nok volum til at melonen flyter	26-30
Miljøprøver:	Rustfritt stål	1 svamp	225	24-30
	Forseglet betong	1 svamp	100	24-30
	Plast[c]	1 svaber	10	24-30

Alle prøvene til AOAC-validering ble homogenisert ved knusing hvis ikke annet er oppgitt.

(a) Fraser 1/2 buljong og Fraser buljong må alltid suppleres med Fraser- buljongsupplement (jernammoniumsitrat) under primær eller sekundær anrikning.

(b) Homogeniser prøven ved blanding for hånd.

(c) Homogeniser prøven ved virvelbevegelse.

NF VALIDATION av AFNOR Certification

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

For mer informasjon om utløp av validitet, henvises det til NF VALIDATION-sertifikat tilgjengelig på nettstedet nevnt over.

NF VALIDATION sertifisert metode i samsvar med ISO 16140-2[6] sammenlignet med ISO 11290[3]
Omfang av godkjenningen: Alle prøver av human mat og alle miljøprøver (unntatt prøver fra primær produksjon)
Prøvepreparering: Prøver skal klargjøres i henhold til EN ISO 11290-1[3] og EN ISO 6887[8]
Programvareversjon: Se sertifikat

Tabell 4: Anrikningsprotokoller i henhold til NF VALIDATION sertifisert metode 3M 01/15-09/16 ved 37 ± 1 °C ved bruk av Fraser 1/2 buljong og Fraser buljong ved behov.

Generell protokoll	Prøvestør-relse	Anrikning-buljong volum (mL)	Anrikningstem-peratur (±1 °C)	Anrikning-stid (timer)	Prøveanaly-sevolum[a]	Akseptert avbrytelsespunkt
Alle prøver av human mat (unntatt råtт kjøtt, rå skalldyr og rå meieriprodukter	25 g	225	37	24-30	20 µL	• Fraser 1/2 buljong inntil 72 timer • Lysat ved -20 °C • Lysat ved 4 °C inntil 72 timer
Miljøprøver	25 g, 1 svaber, eller 1 klut					

Spesifikk protokoll	Primær anrikning (Fraser 1/2 buljong)[b]				Sekundær anrikning (Fraser buljong)[b]				Akseptert avbrytelsespunkt
	Prøvestørrelse	Anrikningsbuljong volum (mL)	Anrikningstemperatur (±1 °C)	Anrikningstid (timer)	Prøvestørrelse	Anrikningstemperatur (±1 °C)	Anrikningstid (timer)	Volum prøveanalyse[c]	
Rått kjøtt, rå skalldyr og rå meieriprodukter	25 g	225	37	20-24	Overfør 0,1 mL i 10 mL Fraser buljong	37	20-24	10 µL	• Fraser buljong inntil 72 timer • Lysat ved -20 °C • Lysat ved 4 °C inntil 72 timer

(a) Volum av prøve overført til Neogen lyseringsoppløsningsrørene. Se trinn 4.6 i lyseringsdel.

(b) Fraser 1/2 og Fraser buljong må alltid suppleres med Fraser buljongsupplement (jernammoniumsitrat) under primær eller sekundær anrikning.

(c) Volum av prøve overført til Neogen lyseringsoppløsningsrørene. Se trinn 4.6 i lyseringsdel.

MERK: Prøver som er større enn 25 g er ikke blitt testet i NF validation-studien.

Klargjøring av Neogen® Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon

1. Væt en klut med 1-5 % (volumandel i vann) husholdningsblekemiddel eller tilsvarende oppløsning, og tørk av Neogen® Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon.
2. Skyll Neogen Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon med vann.
3. Bruk en engangsklut til å tørke Neogen Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon.
4. Sørg for at Neogen Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon er tørt før bruk.

Klargjøring av Neogen® Kjøleblokkinnsats for molekylær deteksjon

Plasser Neogen® Kjøleblokkinnsats for molekylær deteksjon rett på laboratoriebenken; bruk kjøleblokken ved laboratoriets romtemperatur (20-25 °C).

Klargjøring av Neogen® Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon

Plasser Neogen® Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon i en tørr, dobbelblokkvarmeenhet. Slå på den tørre blokkvarmeenheten og still inn temperaturen slik at Neogen Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon når og opprettholder en temperatur på 100 ± 1 °C.

MERK: Avhengig av varmeenheten, skal Neogen Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon bruke omtrent 30 minutter på å nå temperaturen. Bruk et passende, kalibrert termometer (f.eks. et delvis nedsenket termometer eller et digitalt termoelement-termometer, **ikke** et helt nedsenket termometer) plassert på angitt sted og kontroller at Neogen Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon er ved 100 ± 1 °C.

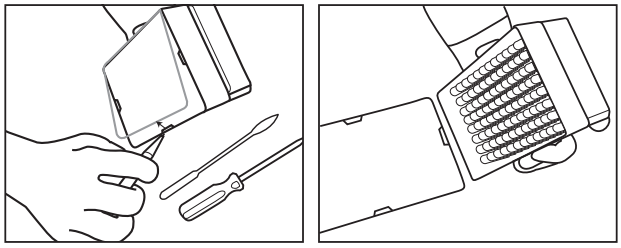
Klargjøring av Neogen® Instrument for molekylær deteksjon

1. Start programvaren for Neogen® System for molekylær deteksjon og logg inn. Kontakt Neogen Food Safety-representanten for å få bekreftet at du har den nyeste versjonen av programvaren.
2. Slå på Neogen Instrument for molekylær deteksjon.
3. Opprett eller endre en gjennomkjøring med data for hver prøve. Se brukermanualen for Neogen System for molekylær deteksjon for mer informasjon.

MERK: Neogen Instrument for molekylær deteksjon må nå klar tilstand før innsetting av Neogen Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon med reagensrør. Dette varmetrinnet tar omtrent 20 minutter og indikeres av et ORANSJE lys på instrumentets statuslinje. Når instrumentet er klart for å starte en gjennomkjøring, vil statuslinjen lyse GRØNT.

Lysering

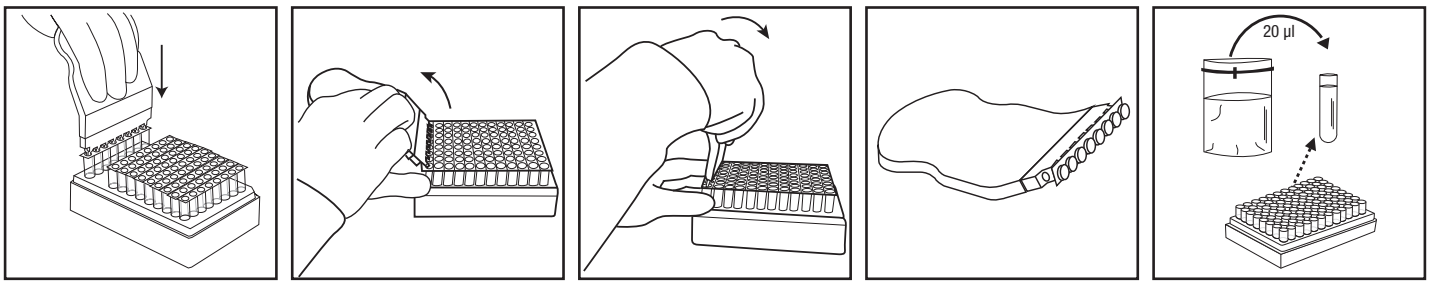
Fjern bunnen av stativet med Neogen lyseringsoppløsningsrør med en skrutrekker eller spatel før du plasserer den i Neogen Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon.



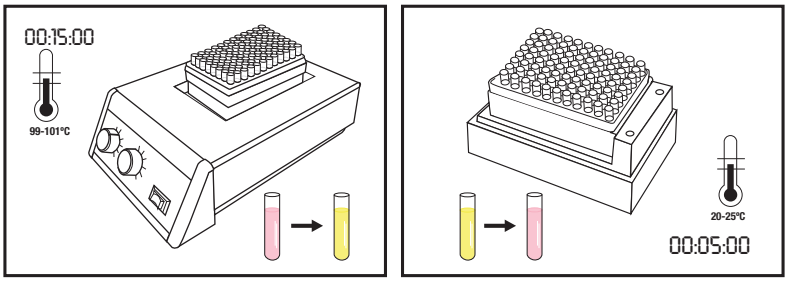
1. La lyseringsoppløsningsrørene (Neogen lyseringsoppløsning) varmes opp ved å sette stativet i romtemperatur (20-25 °C) over natten (16-18 timer). Alternativer til å stabilisere Neogen lyseringsoppløsningsrørene til romtemperatur er å sette Neogen lyseringsoppløsningsrørene på laboratoriebenken i minst 2 timer, inkubere Neogen lyseringsoppløsningsrørene i en inkubator ved 37 ± 1 °C i 1 time, eller plassere dem i en tørr dobbelblokkvarmeenhet i 30 sekunder ved 100 °C.
2. Vend rørene med hetten på for å blande. Fortsett til neste trinn innen 4 timer.
3. Fjern anrikningsbuljongen fra inkubatoren.
4. Ett Neogen lyseringsoppløsningsrør kreves for hver prøve og Negativ kontroll (NC)-prøve (sterilt anrikningsmedium).
   - 4.1 Rekker med Neogen lyseringsoppløsningsrør kan klippes til ønsket antall Neogen lyseringsoppløsningsrør. Velg nødvendig antall enkeltstående Neogen lyseringsoppløsningsrør eller rekker med 8 rør. Plasser Neogen lyseringsoppløsningsrørene i et tomt stativ.
   - 4.2 For å unngå krysskontaminering skal kun én rekke med Neogen lyseringsoppløsningsrør åpnes om gangen og en ny pipettespiss brukes for hvert overføringstrinn.
   - 4.3 Overfør anrikede prøver til Neogen lyseringsoppløsningsrørene som beskrevet under:

Overfør hver anriket prøve til enkeltstående Neogen lyseringsoppløsningsrør **først**. Overfør NC-prøven til **sist**.

   - 4.4 Bruk Neogen® Verktøy for lukking/åpning av lyseringsrør for molekylær deteksjon for å åpne én rekke med Neogen lyseringsoppløsningsrør – én rekke om gangen.
   - 4.5 Kast lokket på Neogen lyseringsoppløsningsrøret - dersom lysatet skal oppbevares for ny test, plasseres lokkene i en ren beholder for å sette dem på igjen etter lysering.
     - 4.5.1 Se vedlegg A for prosessering av tilbakeholdt lysat.
   - 4.6 Overfør 20 µL av prøven inn i et Neogen lyseringsoppløsningsrør hvis ikke annet er oppgitt i protokollene fra tabell 2, 3 eller 4 (bruk f.eks. 10 µL for rå meieriprodukter eller ved bruk av miljøprøver med nøytraliserende buffer).



5. Gjenta trinn 4.4 til 4.6 til alle individuelle prøver er lagt til et korresponderende Neogen lyseringsoppløsningsrør i rekken.
6. Når alle prøvene er overført, overføres 20 µL av NC (sterilt anrikningsmedium, f.eks. Fraser 1/2 buljong) i et Neogen lyseringsoppløsningsrør. Ikke bruk vann som NC.
7. Verifiser at Neogen Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon har en temperatur på 100 ± 1 °C.
8. Plasser det utildekkede stativet med Neogen lyseringsoppløsningsrør i Neogen Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon og varm opp i 15 ± 1 minutter. Under oppvarmingen vil Neogen lyseringsoppløsningen endre farge fra rosa (kald) til gul (varm).
   - 8.1 Prøver som ikke har blitt tilstrekkelig varmebehandlet under testlyseringstrinnet, kan vurderes som en potensiell biologisk fare og skal IKKE settes inn i Neogen Instrument for molekylær deteksjon.
9. Fjern det utildekkede stativet med Neogen lyseringsoppløsningsrør fra varmeblokken og la det avkjøles i Neogen Kjøleblokkinnsats for molekylær deteksjon i minst 5 minutter og maksimum 10 minutter. Når Neogen Molekylær kjøleblokkinnsats brukes ved romtemperatur, skal det plasseres direkte på laboratoriebenken. Når den er avkjølt, vil lyseringsoppløsningen endre farge tilbake til rosa.
10. Fjern stativet med Neogen lyseringsoppløsningsrør fra Neogen Kjøleblokkinnsats for molekylær deteksjon.

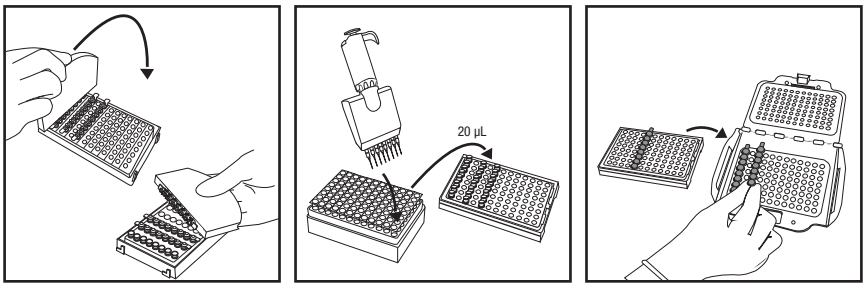


Amplifikasjon

1. Det kreves ett reagensrør for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* for hver prøve og for NC.
   1.1 Rekker med rør kan klippes til ønsket antall rør. Velg det nødvendige antallet enkeltstående reagensrør eller rekker med 8 rør for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*.
   1.2 Plasser reagensrørene for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* i et tomt stativ.
   1.3 Unngå å forstyrre reagenspelletene i bunnen av rørene.
2. Velg 1 Neogen Reagenskontroll-rør og plasser det i stativet.
3. For å unngå krysskontaminering, ta av lokket på én rørrekke for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* om gangen, og bruk ny pipette ved hver prøveoverføring.
4. Overfør lysat til reagensrør og Neogen reagenskontroll-rør for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* som beskrevet nedenfor:

   Overfør hvert prøvelysat til individuelle Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* -reagensrør **først** etterfulgt av NC. Hydrer Neogen Reagenskontroll-røret til **sist**.

5. Bruk Neogen® Verktøy for lukking/åpning av reagensrør for molekylær deteksjon for å åpne én rekke med reagensrør for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* - én rørrekke om gangen. Kast lokket.
   5.1 **Overfør 20 µL av prøvelysatet fra den øverste halvdelen av væsken (unngå presipitat) i Neogen lyseringsoppløsningsrøret inn i det korresponderende reagensrøret for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*. Hold i vinkel under overføring for å unngå å forstyrre pelletene. Bland ved å bevege pipetten forsiktig opp og ned 5 ganger.**
   5.2 Gjenta trinn 5.1 til individuelt prøvelysat har blitt lagt til i et korresponderende reagensrør for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* i rekken.
   5.3 Dekk til reagensrørene for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* med de medfølgende ekstra lokkene, og bruk den avrundede siden av Neogen Verktøy for lukking/åpning av reagensrør for molekylær deteksjon til å presse i en fram-og-tilbake-bevegelse slik at lokket festes godt.
   5.4 Gjenta trinn 5.1 til 5.3 som nødvendig, for antall prøver som skal testes.
   5.5 Når alt prøvelysatet er overført, gjentas trinn 5.1 for å overføre 20 µL med NC-lysat inn i et reagensrør for Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*.
   5.6 Overfør **20 µL NC-lysat inn i et Neogen Reagenskontroll-rør**. Hold i vinkel under overføring for å unngå å forstyrre pelletene. Bland ved å bevege pipetten forsiktig opp og ned 5 ganger.
6. Sett lukkede rør over i et rent og dekontaminert Neogen Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon. Lukk og lås lokket til Neogen Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon.



7. Se igjennom og bekreft den konfigurerte gjennomkjøringen i programvaren for Neogen System for molekylær deteksjon.
8. Klikk på startknappen i programvaren og velg instrumentet som skal brukes. Det valgte instrumentets lokk åpnes automatisk.

9. Plasser Neogen Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon inn i Neogen Instrument for molekylær deteksjon og lukk lokket for å starte testen. Resultatene er klare innen 75 minutter, mens positive resultat kan bli oppdaget raskere.
10. Etter at testen er fullført, fjern Neogen Hurtiglastebrett for molekylær deteksjon fra Neogen Instrument for molekylær deteksjon og kvitt deg med rørene ved å senke dem i en 1-5 % (volumandel i vann) husholdningsblekemiddel eller tilsvarende oppløsning i 1 time og borte fra testens forberedelsesområde.

MERKNAD: For å minimere risikoen for falske positive resultater på grunn av krysskontaminering skal aldri reagensrør som inneholder amplifisert DNA, åpnes. Dette inkluderer Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* reagensrør, Neogen Reagenskontroll-rør og matrikskontrollrør. Kast alltid de forseglede reagensrørene ved å bløtlegge dem i en 1-5 % (volumandel i vann) oppløsning av husholdningsblekemiddel eller tilsvarende oppløsning i 1 time og borte fra testens forberedelsesområde.

Resultater og tolkning

En algoritme tolker lyseffektskurven som er resultatet av deteksjonen av nukleinsyre-amplifikasjon. Resultatene analyseres automatisk av programvaren og er fargekodet basert på resultatet. Et positivt eller negativt resultat fastslås av analysen av flere unike kurveparametere. Antatt positive resultater rapporteres i sann tid, mens negative og «Inspect» (inspiser)-resultater vil vises etter at gjennomkjøringen er fullført.

Antatte positive prøver må bekreftes i henhold til laboratoriets standard operasjonsprosedyrer eller ved å følge den aktuelle referansemetoden for bekreftelse[1, 2, 3], som begynner med overføring fra den primære anriknings- til sekundær anrikningsbuljong (hvis relevant), etterfulgt av påfølgende inokulering og bekreftelse av isolater ved hjelp av egnede biokjemiske og serologiske metoder.

MERK: Ikke engang en negativ prøve vil gi et null-resultat ettersom systemet og amplifikasjonsreagensene til Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes* har en «bakgrunns»-, relativ lysenhet (RLU).

I et sjeldent tilfelle av eventuelle uvanlige lyseffekter, merker algoritmen dette som «Inspect». Neogen anbefaler brukeren å gjenta testen for alle «Inspect»-prøver. Dersom resultatet fortsatt er «Inspect», fortsett til bekreftelsestesten og bruk din foretrukne metode eller som oppgitt av lokale forskrifter.

Tabell 5: Resultatsymboler for prøver og tolkning som angitt av programvaren for Neogen System for molekylær deteksjon.

Brønntypee	Symbol for brønnresultat	Resultat	Tolkning
Prøve		Positiv	Prøven er antatt positiv for målpatogenet.
Prøve		Negativ	Prøven er antatt negativ for målpatogenet.
Prøve		Hemmet	Prøvematriksen var hemmet til testen. Det kan bli nødvendig med en ny test. Se feilsøkingsdelen og produktveiledningen for analysesettet for mer informasjon.
Prøve		Inspiser	Nærvær eller fravær av målpatogenet var ubestemmelig. Det kan bli nødvendig med en ny test. Se feilsøkingsdelen og produktveiledningen for analysesettet for mer informasjon.
Prøve		Feil	Ingen bioluminescens ble detektert. Det kan bli nødvendig med en ny test. Se feilsøkingsdelen og produktveiledningen for analysesettet for mer informasjon.

Bekreftelse av resultatene i henhold til sertifiseringsmetoden NF VALIDATION

Alternativ 1: Bruke ISO 11290[3]-standarden som starter fra Fraser 1/2 anrikningen.

Alternativ 2: Ved isolasjon på PALCAM agar (O&A) eller på kromogent agar, som inngår i en NF VALIDATION-sertifisert metode for deteksjon av *Listeria monocytogenes*. Nærværet av karakteristiske kolonier er tilstrekkelig til å bekrefte nærværet av *Listeria monocytogenes*.

Alternativ 3: Bruk av nukleinsyre-prober som beskrevet i EN ISO 7218[5]-standarden, utført på isolerte kolonier fra selektivt agar (se alternativ 1 eller 2).

Alternativ 4: Ved bruk av enhver annen sertifisert metode NF VALIDATION må det være et annet prinsipp enn Neogen Molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*. Hele protokollen som er beskrevet for denne andre validerte metoden må brukes. Alle trinnene før start av bekreftelse må være felles for begge metodene.

I tilfelle forskjellige resultater (antatt positiv med den alternative metoden, ikke bekreftet av én av metodene beskrevet ovenfor) må laboratoriet følge de nødvendige trinnene for å sikre validitet til resultatene som er oppnådd.

I tilfelle forskjellige resultater (antatt positiv med Neogen molekylær deteksjonstest 2 for *Listeria monocytogenes*, ikke bekreftet av én av metodene beskrevet ovenfor) må laboratoriet følge de nødvendige trinnene for å sikre validitet til resultatene som er oppnådd.

Hvis du har spørsmål om spesifikke bruksområder eller prosedyrer, kan du besøke vårt nettsted på www.neogen.com eller ta kontakt med en lokal Neogen-representant eller -forhandler.

Vedlegg A. Avbrytelse av protokoll: Oppbevaring og ny testing av varmebehandlede lysater.

1. For å oppbevare et varmebehandlet lysat, sett lokket på lyseringsrøret igjen, bruk et rent lokk (se “Lysering”, 4.5).
2. Oppbevar ved 4 til 8 °C i opptil 72 timer.
3. Bland en oppbevart prøve ved å vende den 2-3 ganger for å forberede den på amplifikasjon.
4. Åpne rørene.
5. Plasser de blandede lysatrørene på Neogen Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon og varm ved 100 ± 1 °C i 5 ± 1 minutter.
6. Fjern stativet med Neogen lyseringsoppløsningsrør fra varmeblokken og la det avkjøles i Neogen Kjøleblokkinnsats for molekylær deteksjon i minst 5 minutter og maksimum 10 minutter.
7. Se delen ‘Amplifikasjon’ beskrevet ovenfor for å fortsette protokollen.

Referanser:

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

Forklaring på produktetikettsymboler

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

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

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

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

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

FS00867C

Julkaisuajankohta: 2024-07

Tuoteseloste

Molekyläärinen testisetti 2 - *Listeria monocytogenes*

Tuotteen kuvaus ja käyttötarkoitus

Neogen® Molekyläärinen testisetti 2 - *Listeria monocytogenes* on tarkoitettu käytettäväksi yhdessä Neogen® Molekyläärisen testijärjestelmän kanssa *Listeria monocytogenesin* nopeaan ja täsmälliseen tunnistamiseen rikastetuista elintarvike- ja rehunäytteistä. Neogen Molekyläriset testisetit perustuvat nukleiinihapposekvenssien nopeaan, täsmälliseen ja herkkään silmukkavälitteiseen isotermiseen monistamismenetelmään ja käyttävät monistuksen havaitsemiseen bioluminesenssia. Oletetut positiiviset tulokset ilmoitetaan reaaliaikaisesti, kun taas negatiiviset tulokset näytetään testin valmistumisen jälkeen. Oletetut positiiviset tulokset on vahvistettava käyttämällä itse parhaaksi katsottua tai paikallisten määräysten mukaista menetelmää[1, 2, 3].

Neogen Molekyläärinen testisetti 2 - *Listeria monocytogenes* on tarkoitettu laboratoriotekniikoihin koulutettujen ammattilaisten käytettäväksi laboratorioympäristössä. Neogen ei ole osoittanut tuotetta käytettäväksi muilla kuin elintarvike- ja juomateollisuuden aloilla. Neogen ei esimerkiksi ole osoittanut tuotetta vesi-, lääke- tai kosmetiikkanäytteiden testaamiseen eikä kliinisten tai eläinlääketieteellisten näytteiden testaamiseen. Neogen Molekyläristä testisettiä 2 - *Listeria monocytogenes* ei ole arvioitu kaikkien mahdollisten testauskäytäntöjen eikä kaikkien mahdollisten bakteerikantojen suhteen.

Kuten kaikkien testausmenetelmien tapauksessa, rikastusalustan lähde, koostumus ja laatu voivat vaikuttaa tuloksiin. Esimerkiksi näytteenottomenetelmät, testausprotokollat, näytteiden valmistus, käsittely ja laboratoriotekniikka saattavat myös vaikuttaa tuloksiin. Neogen suosittelee menetelmän sekä rikastusalustan arviointia käyttäjän ympäristössä käyttäen riittävän suurta näytemäärää ja tiettyjä elintarvikenäytteitä ja mikrobisisältöjä sen varmistamiseksi, että menetelmät vastaavat käyttäjän vaatimuksia.

Neogen on arvioinut Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* käyttäen ferriammoniumsitraattia sisältävää Demi Fraser -lientä ja ferriammoniumsitraattia sisältävää Fraser-lientä tarpeen mukaan. Tämän alustan tyypillinen koostumus on kuvattu seuraavassa.

Demi Fraser Elatusainejauheen tyypillinen kaava	**(g/l)**	**Fraser Elatusainejauheen tyypillinen kaava**	**(g/l)**
Natriumkloridi	20 g	Natriumkloridi	20 g
Dinatriumfosfaatti, vedetön*	9,6 g	Dinatriumfosfaatti, vedetön*	9,6 g
Naudanlihauute	5,0 g	Naudanlihauute	5,0 g
Kaseiinin pankreaattinen digesti	5,0 g	Kaseiinin pankreaattinen digesti	5,0 g
Eläinkudoksen peptinen digesti	5,0 g	Eläinkudoksen peptinen digesti	5,0 g
Hiivauute	5,0 g	Hiivauute	5,0 g
Litiumkloridi	3,0 g	Litiumkloridi	3,0 g
Monokaliumfosfaatti	1,35 g	Monokaliumfosfaatti	1,35 g
Eskuliini	1,0 g	Eskuliini	1,0 g
Akriflaviinihydrokloridi	0,0125 g	Akriflaviinihydrokloridi	0,025 g
Nalidiksiinihappo	0,01 g	Nalidiksiinihappo	0,02 g

***** Korvike: Dinatriumfosfaattidihydraatti 12,0 g

Fraser-liemen rikastussuplementti

(Valmistusaineet 10 ml:n ampulliin. Yksi ampulli lisätään litraan peruselatusainetta.)

Ferriammoniumsitraatti 0,5 g / 10 ml

Lopullinen pH 7,2 ± 0,2 lämpötilassa 25 °C

Neogen® Molekyläärinen testi-instrumentti on tarkoitettu käytettäväksi sellaisten näytteiden kanssa, jotka on lämpökäsitelty testin lyysivaiheen aikana näytteessä olevien organismien tuhoamiseksi. Jos näytteitä ei ole asianmukaisesti lämpökäsitelty testin lyysivaiheen aikana, ne saattavat muodostaa biologisen vaaratekijän, jolloin niitä EI saa asettaa Neogen Molekyläriseen testi-instrumenttiin.

Neogen Food Safety -osaston suunnittelu- ja valmistusmenetelmät on ISO (International Organization for Standardization) 9001 -sertifioitu.

Neogen Molekyläärinen testisetti 2 - *Listeria monocytogenes* sisältää 96 testiä, jotka on kuvattu taulukossa 1.

Taulukko 1. Neogen Molekyläärisen testisetin osat

Nimike	Tunnusmerkki	Määrä	Sisältö	Kommentit
Neogen® Lyysiliuos (LS)	Vaaleanpunainen liuos läpinäkyvissä putkissa	96 (12 kpl 8 putken liuskoja)	580 µl lyysiliuosta/putki	Telineessä ja käyttövalmis
Neogen® Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputket	Keltaiset putket	96 (12 kpl 8 putken liuskoja)	Lyofilisoitu spesifi monistus- ja tunnistusyhdistelmä	Käyttövalmis
Lisäsuojukset	Keltaiset suojukset	96 (12 kpl 8 suojuksen liuskoja)		Käyttövalmis
Neogen® Reagenssin valvonta (RC)	Läpinäkyvät flip-top-putket	16 (2 pussia, joissa kummassakin 8 yksittäistä putkea)	Lyofilisoitu kontrolli-DNA, monistus- ja tunnistusyhdistelmä	Käyttövalmis

Negatiivinen kontrolli, jota ei toimiteta paketin mukana, on steriili rikastusalusta, esim. Demi Fraser -liemi. Älä käytä vettä negatiivisena kontrollina.

Turvallisuus

Käyttäjän on luettava ja ymmärrettävä kaikki Neogen Molekylääristä testijärjestelmää ja Neogen Molekylääristä testisettiä 2 - *Listeria monocytogenes* koskevat turvallisuusohjeet ja noudatettava niitä. Säilytä turvallisuusohjeet myöhempää käyttöä varten.

⚠ **VAROITUS:** Osoittaa vaarallisen tilanteen, joka saattaa johtaa kuolemaan tai vakavaan loukkaantumiseen ja/tai omaisuusvahinkoon, jos tilannetta ei vältetä.

HUOMAUTUS: Osoittaa mahdollisesti vaarallisen tilanteen, joka saattaa johtaa aineelliseen vahinkoon, jos tilannetta ei vältetä.

⚠ VAROITUS

Älä käytä Neogen Molekylääristä testisettiä 2 - *Listeria monocytogenes* ihmisten tai eläinten diagnosointiin.

Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* menetelmä saattaa tuottaa siinä määrin *Listeria monocytogenesiä*, että se riittää aiheuttamaan raskaana oleville naisille sikiökuolleisuutta ja immuunipuutteisille kuolemantapauksia altistumisen yhteydessä.

Käyttäjän on järjestettävä henkilökunnalleen koulutusta asianmukaisista testausmenetelmistä, joita ovat esimerkiksi: hyvät laboratoriokäytännöt, ISO/IEC 17025[4] tai ISO 7218[5].

Väärien negatiivisten tulosten vuoksi markkinoille voi päästä kontaminoituneita tuotteita. Voit vähentää tähän liittyvä riskejä toimimalla seuraavasti:

- Noudata käytäntöä ja tee testit täsmälleen tuoteselosteessa esitetyllä tavalla.
- Säilytä Neogen Molekylääristä testisettiä 2 – *Listeria monocytogenes* pakkausmerkintöjen ja tuoteselosteen mukaan.
- Käytä Neogen Molekyläärinen testisetti 2 – *Listeria monocytogenes* aina ennen viimeistä käyttöpäivää.
- Käytä Neogen Molekylääristä testisettiä 2 – *Listeria monocytogenes* sellaisiin ympäristönäytteisiin, jotka on validoitu sisäisesti tai ulkopuolisen tahon toimesta.
- Käytä Neogen Molekylääristä testisettiä 2 – *Listeria monocytogenes* vain sellaisten pintojen, puhdistusaineiden, käytäntöjen ja bakteerikantojen kanssa, jotka on hyväksytty sisäisesti tai kolmannen osapuolen toimesta.
- Laimenna ympäristönäytteet, joissa käytetään aryylisulfonaattikompleksia sisältävää neutraloivaa puskuria, suhteessa 1:2 ennen testausta (1 osa näytettä 1 osaan steriiliä rikastusliuosta). Toinen vaihtoehto on siirtää 10 µl neutraloivaa puskuririkastusliuosta Neogen-lyysiliuosputkiin. Neogen®-näytteiden keräystuotteet, jotka sisältävät aryylisulfonaattikompleksia sisältävää neutraloivaa puskuria, ovat seuraavat: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G ja HS2410NB2G.

Kemikaaleille ja biologisille vaaratekijöille altistumiseen liittyvien riskien vähentäminen:

- On erittäin suositeltavaa, että naispuoliselle laboratoriohenkilöstölle tiedotetaan, että kehittyvälle sikiölle aiheutuu vaaraa äidin *Listeria monocytogenes* -altistuksen aiheuttamasta tartunnasta.
- Testaa taudinaiheuttajat asianmukaisesti varustetussa laboratoriossa koulutetun henkilöstön valvonnassa. Inkuboitu rikastusaine ja laitteet tai pinnat, jotka ovat joutuneet kosketuksiin inkuboidun rikastusaineen kanssa, saattavat sisältää taudinaiheuttajia määrän, joka riittää aiheuttamaan vaaran ihmisten terveydelle.
- Noudata aina laboratorioiden vakioturvallisuuskäytäntöjä, joihin kuuluu asianmukaisten suojavaatteiden ja silmäsuojainten käyttäminen reagensseja ja kontaminoituja näytteitä käsiteltäessä.
- Vältä kosketusta rikastusalustan ja reagenssiputkien sisällön kanssa monistuksen jälkeen.
- Hävitä rikastetut näytteet alan voimassa olevien standardien mukaisesti.
- Jos näytteitä ei ole asianmukaisesti lämpökäsitelty testin lyysivaiheen aikana, ne saattavat muodostaa biologisen vaaratekijän, jolloin niitä EI saa asettaa Neogen Molekyläärisen testi-instrumenttiin.

Testisetin valmistelun aikana tapahtuvaan ristikontaminaatioon liittyvien riskien vähentäminen:

- Käytä aina suojakäsineitä (käyttäjän suojaamiseksi ja nukleaasien siirtymisen estämiseksi).

Ympäristön kontaminoitumiseen liittyvien riskien vähentäminen:

- Noudata hävittämisessä voimassa olevia kontaminoituneen jätteen hävittämistä koskevia alan standardeja.

Jotta voit vähentää kuumille nesteille altistumisesta aiheutuvia riskejä, noudata seuraavia ohjeita:

- Älä ylitä lämmityslaitteeseen merkittyä suositeltua lämpötila-asetusta.
- Älä ylitä suositeltua kuumennusaikaa.
- Tarkasta Neogen® Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeen lämpötila tarkoituksenmukaisella kalibroidulla lämpömittarilla (esim. osittain upotettavalla lämpömittarilla tai digitaalisella termoparimittarilla, ei kokonaan upotettavalla lämpömittarilla.) Lämpömittari on asetettava sille määrättyyn paikkaan Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeessa.

HUOMAUTUS

Testisetin valmistelun aikana tapahtuvaan ristikontaminaatioon liittyvien riskien vähentäminen:

- Vaihda käsineet ennen reagenssipelletin kastelemista.
- Steriilien aerosoliesteen muodostavien molekyylibiologiaan soveltuvaa laatua olevien pipetinkärkien (suodatinkärkien) käyttö on suositeltavaa.
- Käytä jokaisen näytteen siirtämiseen uutta pipetinkärkeä.
- Käytä näytteiden siirtämiseen rikastamisesta lyysiputkeen hyviä laboratoriokäytäntöjä. Pipetoijan kontaminoitumisen välttämiseksi käyttäjä voi halutessaan lisätä ylimääräisen siirtovaiheen. Jokaisen rikastetun näytteen voi esimerkiksi siirtää steriiliin putkeen.
- Jos mahdollista, käytä molekyylibiologista työasemaa, jossa on bakteerintuholamppu. Steriloi laboratorion työtasot ja välineet (pipetit, sulku- ja avaustyökalut jne.) säännöllisesti 1–5-tilavuusprosenttisella (veteen laimennetulla) talouskäyttöisellä valkaisuaineliuoksella tai DNA:n poistoliuoksella.

Vähennä vääriin positiivisiin tuloksiin liittyviä riskejä toimimalla seuraavasti:

- Älä koskaan avaa reagenssiputkia monistuksen jälkeen.
- Hävitä kontaminoituneet putket aina liottamalla niitä 1–5-tilavuusprosenttisessa (veteen laimennetussa) valkaisuaineliuoksessa 1 tunnin ajan etäällä testin valmistelualueelta.
- Älä koskaan autoklavoi reagenssiputkia monistuksen jälkeen.

Katso lisätietoja hävittämisestä ja paikallisista määräyksistä käyttöturvallisuustiedotteesta.

Jos sinulla on jotain tiettyä sovellusta tai menetelmää koskevia kysymyksiä, käy verkkosivuillamme osoitteessa www.neogen.com tai ota yhteyttä paikalliseen Neogen-edustajaan tai -jälleenmyyjään.

Käyttäjän vastuu

Käyttäjän vastuulla on tutustua tuoteselosteeseen ja -tietoihin. Lisätietoja saat verkkosivustolla osoitteesta **www.neogen.com** tai ottamalla yhteyttä paikalliseen Neogen-edustajaan tai -jälleenmyyjään.

Testausmenetelmää valitessa on tärkeää ottaa huomioon, että ulkoiset tekijät, kuten näytteenottomenetelmät, testausprotokollat, näytteiden valmistus, käsittely ja laboratoriotekniikat, voivat vaikuttaa testaustuloksiin.

Käyttäjä on aina testausmenetelmää tai tuotetta valitessaan vastuussa siitä, että hän arvioi riittävän määrän näytteitä kyseisistä elintarvikkeista ja mikrobialtistuksista käyttäjän kriteerien täyttymisen varmistamiseksi.

Käyttäjän vastuulla on myös varmistaa, että testausmenetelmät ja tulokset täyttävät hänen asiakkaidensa tai toimittajiensa vaatimukset.

Kuten kaikkien testausmenetelmien kohdalla, minkä tahansa Neogen Food Safety -tuotteen käytöstä saavutetut tulokset eivät ole takuu matriisien tai testattujen prosessien laadusta.

Voidakseen auttaa erilaisten elintarvikematriisien arvioinnissa Neogen on kehittänyt Neogen® Molekyläärisen testitaulukon valvontasarjan. Määritä tarvittaessa testitaulukon hallinnan avulla, vaikuttaako matriisi Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* tuloksiin. Testaa validointivaiheiden aikana useita matriisia edustavia näytteitä, ts. eri lähteistä saatuja näytteitä, kun olet ottamassa käyttöön Neogen-menetelmää tai kun olet testaamassa uusia tai tuntemattomia matriiseja tai matriiseja, joiden raaka-aineita tai valmistustapoja on muutettu.

Matriisi voidaan määrittää tuotetyypiksi, jolla on sisäisiä ominaisuuksia, kuten koostumus ja valmistustapa. Matriisien väliset erot voivat johtua niinkin yksinkertaisista tekijöistä kuin eroista niiden käsittelyssä tai jalostusasteessa, esim. raaka tai pastöroitu, tuore tai kuivattu.

Takuun rajoitus / rajoitettu korvausvelvollisuus

NEOGEN KIISTÄÄ KAIKKI NIMENOMAISET JA EPÄSUORAT TAKUUT, MUKAAN LUKIEN KAIKKI TAKUUT KÄYPYYDESTÄ TAI SOPIVUUDESTA TIETTYYN KÄYTTÖTARKOITUKSEEN, PAITSI JOS TUOTEPAKKAUKSEN TAKUUOSIOSSA TOISIN MAINITAAN. Jos mikä tahansa Neogen Food Safety -tuote on viallinen, Neogen tai sen valtuutettu jälleenmyyjä joko korvaa tuotteen tai palauttaa sen ostohinnan. Nämä ovat ainoat myönnetyt korvaukset. Ota yhteyttä Neogen-edustajaasi tai valtuutettuun Neogen-jälleenmyyjään, jos sinulla on kysyttävää.

Neogen:n vastuun rajoitukset

NEOGEN EI OLE VASTUUSSA MENETYKSISTÄ TAI VAHINGOISTA, OLIVAT NE SITTEN SUORIA, EPÄSUORIA, ERITYISLAATUISIA, SATUNNAISIA TAI VÄLILLISIÄ, MUKAAN LUKIEN VOITONMENETYKSET. Missään tapauksessa Neogen:n vastuu ei minkään laillisen perusteen mukaan ole suurempi kuin vialliseksi väitetyn tuotteen hinta.

Säilytys ja hävittäminen

Säilytä Neogen Molekylääristä testisettiä 2 - *Listeria monocytogenes* 2–8 °C:n lämpötilassa. Suojattava jäätymiseltä. Säilytä paketti valolta suojattuna. Kun olet avannut paketin, tarkista, että foliopussi on ehjä. Ei saa käyttää, jos pussi on vahingoittunut. Avaamisen jälkeen käyttämättömät reagenssiputket on aina säilytettävä uudelleensuljettavassa pussissa, jonka sisällä on kuivausainetta lyofilisoitujen reagenssien stabiliteetin ylläpitämiseksi. Säilytä uudelleensuljettuja pusseja 2–8 °C:n lämpötilassa enintään 60 päivän ajan.

Älä käytä Neogen Molekylääristä testisettiä 2 - *Listeria monocytogenes* viimeisen käyttöpäivän jälkeen. Viimeinen käyttöpäiväys ja eränumero on merkitty pakkauksen ulkopuolelle. Käytön jälkeen rikastusaine ja Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* putket voivat sisältää mahdollisesti patogeenisia aineita. Kun testi on suoritettu loppuun, noudata saastuneen jätteen hävittämisessä alan nykykäytäntöjä. Katso lisätietoja hävittämisestä ja paikallisista määräyksistä käyttöturvallisuustiedotteesta.

Käyttöohjeet

Noudata huolellisesti kaikkia ohjeita. Jos ohjeita ei noudateta, tulokset saattavat olla epätarkkoja.

Steriloi laboratorion työtasot ja välineet (pipetit, sulku- ja avaustyökalut jne.) säännöllisesti 1–5-tilavuusprosenttisella (veteen laimennetulla) talouskäyttöisellä valkaisuaineliuoksella tai DNA:n poistoliuoksella.

Käyttäjän on suoritettava Neogen Molekyläärisen testijärjestelmän käyttäjäkoulutus, kuten asiakirjassa ”Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System”[6] kuvataan.

Katso erityisvaatimukset kohdasta Erikoisohjeet validoituja menetelmiä varten:

Taulukko 3 sisältää rikastuskäytännöt seuraavien mukaisesti: AOAC® *Official Method of Analysis℠* **2016.08** ja AOAC® *Performance Tested Method℠* -sertifikaatti **#081501.**

Taulukko 4 sisältää NF Validation -sertifikaatin **3M 01/15-09/16** mukaisen rikastuskäytännön.

Näytteiden rikastus

Taulukossa 2, 3 tai 4 on rikastuskäytäntöjen ohjeet elintarvike- ja ympäristönäytteille. Käyttäjän vastuulla on vahvistaa vaihtoehtoisten näytteenottokäytäntöjen ja laimennussuhteiden soveltuvuus sen varmistamiseksi, että testimenetelmä vastaa käyttäjän kriteereitä.

Elintarvikkeet

1. Anna (ferriammoniumsitraattia sisältävän) Demi Fraser -rikastusalustan lämmetä laboratorion ilman lämpötilaan.
2. Yhdistä rikastusalusta ja näyte aseptisesti taulukoiden 2, 3 tai 4 mukaisesti. Kaikkien lihanäytteiden ja erittäin hiukkaspitoisten näytteiden yhteydessä suositellaan käyttämään suodatinpusseja.
3. Homogenoi huolellisesti sekoittamalla, vatsasekoituksella tai käsin sekoittamalla 2 ± 0,2 minuuttia. Inkuboi 37 ± 1 °C:ssa taulukoiden 2, 3 tai 4 mukaisesti.
4. Raakoja maitotuotteita varten (katso taulukot 2, 3 tai 4) siirrä 0,1 ml ensisijaista rikastuslientä 10 ml:aan Fraser-lientä. Inkuboi 37 ± 1 °C:ssa 20–24 tunnin ajan.

Ympäristönäytteet

Näytteenkeräyslaitteena voidaan käyttää puhdistusaineiden vaikutusten kumoamiseksi neutraloivalla liuoksella kosteutettua sientä. Neogen suosittaa käyttämään biosiditonta selluloosasientä. Neutraloivana liuoksena voidaan käyttää neutraloivaa Dey-Engleyn (D/E) -lientä tai Letheen-lientä. Suosittelemme puhdistamaan alueen näytteenoton jälkeen.

VAROITUS: Mikäli päätät käyttää sienen hydratointiliuoksena aryylisulfonaattikompleksia sisältävää neutraalia puskuria, rikastettu ympäristönäyte on laimennettava suhteessa 1:2 (1 osa näytettä 1 osaan steriiliä rikastusliuosta) ennen testausta sellaisten väärien negatiivisten tulosten riskien vähentämiseksi, joiden vuoksi markkinoille voi päästä kontaminoituneita tuotteita. Toinen vaihtoehto on siirtää 10 µL neutraloivaa puskuririkastusliuosta Neogen-lyysiliuosputkiin.

Näytteenottoalueen suositeltava koko patogeenin esiintymisen tai puuttumisen havaitsemiseksi pinnalla on vähintään 100 cm^2 (10 cm x 10 cm tai 4 tuumaa x 4 tuumaa). Sienellä näytettä ottaessasi käy läpi koko alue kahdessa suunnassa (vasemmalta oikealle ja sen jälkeen ylhäältä alas) tai kerää ympäristönäytteet voimassa olevia näytteenottokäytäntöjä noudattaen tai asiakirjojen FDA BAM[1], USDA FSIS MLG[2] tai standardin ISO 18593[7] ohjeiden mukaisesti.

1. Anna (ferriammoniumsitraattia sisältävän) Demi Fraser -rikastusalustan lämmetä laboratorion ilman lämpötilaan.
2. Yhdistä rikastusalusta ja näyte aseptisesti taulukoiden 2, 3 tai 4 mukaisesti.
3. Homogenoi huolellisesti sekoittamalla, vatsasekoituksella tai käsin sekoittamalla 2 ± 0,2 minuuttia. Inkuboi 37 ± 1 °C:ssa

24–30 tunnin ajan taulukoiden 2, 3 tai 4 mukaisesti.

Taulukko 2: Yleiset rikastuskäytännöt 37 ± 1 °C:ssa Demi Fraser -lientä ja Fraser-lientä tarpeen mukaan.

Näytematriisi	Näytteen koko	Rikastusliemen tilavuus (ml)	Rikastusaika (h)
Lämpökäsitelty, keitetty, suolattu tai savustettu liha, siipikarja, äyräiset ja kala Lämpökäsitellyt/ pastöroidut maitotuotteet Hedelmät ja vihannekset Monikomponent-tielintarvikkeet	25 g	225	24–30
Ympäristö-näytteet[a]	1 sieni	100 tai 225	24–30
	1 tossunäyte	10	24–30
Raaka liha, siipikarjanliha, äyriäiset ja kala	25 g	475	28–32

Näytematriisi	Ensisijainen rikastusliemi (Demi Fraser -liemi)[a]			Toissijainen rikastusliemi (Fraser-liemi)[a]			Näytteen analyysi-tilavuus[b]
	Näytteen koko	Rikastusliemen tilavuus (ml)	Rikastusaika (h)	Näytteen koko	Rikastus-lämpötila (°C)	Rikastusaika (h)	
Raa'at maitotuotteet	25 g	225	20–24	Siirrä 0,1 ml 10 ml:aan Fraser-lientä	37 ± 1	20–24	10 µl

(a) Demi Fraser- ja Fraser-liemiin on aina lisättävä Fraser-liemen rikastussuplementtia (ferriammoniumsitraattia) ensi- tai toissijaisen rikastuksen aikana.

(b) Neogen-lyysiliuosputkiin siirrettävä näytteen tilavuus. Katso Lyysi-osion vaihe 4.6.

Erikoisohjeet validoituja menetelmiä varten

AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2016.08

AOAC® *Performance Tested Method*℠ #081501

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 081501

Tutkimuslaitos AOAC:n OMA℠- ja PTM℠ -ohjelmissa Neogen Molekyläärinen testisetti 2 - *Listeria monocytogenes* todettiin tehokkaaksi *Listeria monocytogenesin* havaitsemismenetelmäksi. Tutkimuksessa testatut matriisit näkyvät taulukossa 3.

Taulukko 3. Rikastuskäytännöt, joissa käytetään Demi-Fraser -lientä[a] 37 ± 1 °C:ssä AOAC OMA℠ 2016.08 ja PTM℠ -sertifikaatin #081501 mukaisesti.

Näytematriisi		Näytteen koko	Rikastusliemen tilavuus (ml)	Rikastusaika (h)
Hot dogit naudanlihasta, queso fresco, vaniljakermajäätelö, 4-prosenttinen tuorejuusto maidosta, 3-prosenttinen kaakao täysmaidosta, romaine-sidesalaatti, pakattu tuore pinaatti, kylmäsavulohi		25 g	225	24–30
Raaka broileri		25 g	475	28–32
Kalkkunaleike		125 g	1125	24–30
Cantaloupenmeloni[b]		Koko meloni	Riittävästi, jotta meloni kelluu	26–30
Ympäristönäytteet:	Ruostumaton teräs	1 sieni	225	24–30
	Pinnoitettu betoni	1 sieni	100	24–30
	Muovi[c]	1 tossunäyte	10	24–30

Kaikki AOAC-validointiin tarkoitetut näytteet homogenoitiin vatsasekoituksella, jollei muuta mainita.

(a) Demi Fraser- ja Fraser-liemiin on aina lisättävä Fraser-liemen rikastussuplementtia (ferriammoniumsitraattia) ensi- tai toissijaisen rikastuksen aikana.

(b) Homogenoi näyte sekoittamalla käsin.

(c) Homogenoi näyte vortex-sekoituksella.

AFNOR Certificationin myöntämä NF VALIDATION -sertifikaatti

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

Lisätietoja validointiajan päättymisestä on NF VALIDATION -sertifikaatissa, joka on saatavissa edellä mainitulta verkkosivustolta.

NF Validation -sertifioitu ISO 16140-2[6] -standardin mukainen menetelmä verrattuna ISO 11290[3] -standardiin
Validoinnin soveltamisala: Kaikki ihmisravinnoksi tarkoitetut elintarvikenäytteet ja ympäristönäytteet (ensisijaisen tuotannon näytteitä lukuun ottamatta)
Näytteen valmistus: Näytteiden valmistamisessa on noudatettava standardeja EN ISO 11290-1[3] ja EN ISO 6887[8]
Ohjelmistoversio: Katso sertifikaatista

Taulukko 4: Rikastuskäytännöt NF VALIDATION -sertifioidun menetelmän 3M 01/15-09/16 mukaisesta 37 ± 1 °C:ssa käyttäen Demi Fraser- ja Fraser-liemiä tarpeen mukaan.

Yleinen käytäntö	Näytteen koko	Rikastusliemen tilavuus (ml)	Rikastuslämpötila (± 1 °C)	Rikastusaika (h)	Näytteen analyysitilavuus[a]	Hyväksyttävä keskeytyspiste
Kaikki elintarvikenäytteet (paitsi raaka liha, raa'at äyräiset ja raa'at maitotuotteet)	25 g	225	37	24–30	20 µl	• Demi Fraser -liemellä enintään 72 tunnin ajan • Lysaatti -20 °C:ssa • Lysaatti 4 °C:ssa enintään 72 tunnin ajan
Ympäristönäytteet	25 g, 1 tossunäyte tai 1 pyyhintänäyte					

Erityinen käytäntö	Ensisijainen rikastusliemi (Demi Fraser -liemi)[b]				Toissijainen rikastusliemi (Fraser-liemi)[b]				Hyväksyttävä keskeytyspiste
	Näytteen koko	Rikastusliemen tilavuus (ml)	Rikastuslämpötila (± 1 °C)	Rikastusaika (h)	Näytteen koko	Rikastuslämpötila (± 1 °C)	Rikatusaika (h)	Näytteen analyysitilavuus[c]	
Raaka liha, raa'at äyräiset ja raa'at maitotuotteet	25 g	225	37	20–24	Siirrä 0,1 ml 10 ml:aan Fraser-lientä	37	20–24	10 µl	• Fraser-liemellä enintään 72 tunnin ajan • Lysaatti -20 °C:ssa • Lysaatti 4 °C:ssa enintään 72 tunnin ajan

(a) Neogen-lyysiliuosputkiin siirrettävä näytteen tilavuus. Katso Lyysi-osion vaihe 4.6.

(b) Demi Fraser- ja Fraser-liemiin on aina lisättävä Fraser-liemen rikastussuplementtia (ferriammoniumsitraattia) ensi- tai toissijaisen rikastuksen aikana.

(c) Neogen-lyysiliuosputkiin siirrettävä näytteen tilavuus. Katso Lyysi-osion vaihe 4.6.

HUOMAUTUS: Yli 25 g:n näytteitä ei ole testattu NF validation -tutkimuksessa.

Neogen® Molekyläärisen testinopeuden latausalustan valmistelu

1. Kostuta liina 1–5-tilavuusprosenttisella (veteen laimennetulla) talouskäyttöisellä valkaisuliuoksella tai vastaavalla liuoksella ja pyyhi Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalusta.
2. Huuhtele Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalusta vedellä.
3. Pyyhi Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalusta kuivaksi kertakäyttöisellä liinalla.
4. Varmista ennen käyttöä, että Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalusta on kuiva.

Neogen® Molekyläärisen testijäähdytyslohkon pistokkeen valmistelu

Aseta Neogen® Molekyläärinen testijäähdytyslohko suoraan laboratorion työtasolle; käytä jäähdytyslohkoa laboratorion ilman lämpötilassa (20–25 °C).

Neogen® Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeen valmistelu

Aseta Neogen® Molekyläärisen testilämpölohkon pistoke kaksilohkoiseen kuivalämmityslaitteeseen. Kytke kuivalohkolämmitin päälle, aseta lämpötila ja anna Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeen lämmetä 100 ± 1 °C:n lämpötilaan niin, että saavutettu lämpötila pysyy samana.

HUOMAUTUS: Anna Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeen lämmetä asetuslämpötilaan noin 30 minuuttia lämmityslaitteen mukaan. Varmista tarkoituksenmukaisen kalibroidun lämpömittarin avulla (esim. osittain upotettava lämpömittari tai digitaalinen termoparimittari, **ei** kokonaan upotettava lämpömittari), joka on asetettu sille määrättyyn paikkaan, että Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeen lämpötila on 100 ± 1 °C.

Neogen® Molekyläärisen testi-instrumentin valmistelu

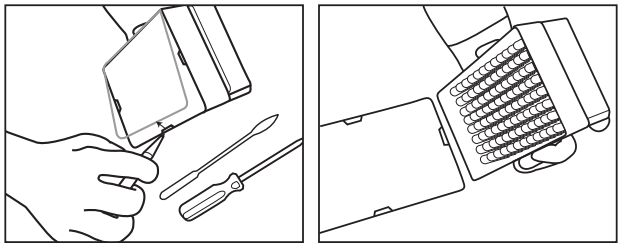
1. Käynnistä Neogen® Molekyläärisen testijärjestelmän ohjelmisto ja kirjaudu sisään. Varmista Neogen Food Safety -edustajaltasi, että käytössäsi on ohjelmiston uusin versio.

2. Kytke Neogen Molekyläärinen testi-instrumentti päälle.
3. Luo tai muokkaa ajo kunkin näytteen tiedoille. Katso tarkemmat tiedot Neogen Molekyläärisen testijärjestelmän käyttöoppaasta.

HUOMAUTUS: Neogen Molekyläärisen testi-instrumentin on saavutettava Valmis-tila ennen Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalustan ja reaktioputkien asettamista laitteeseen. Lämmitysvaihe kestää noin 20 minuuttia, ja sen merkiksi instrumentin tilarivillä palaa ORANSSI valo. Kun instrumentti on valmis ajon käynnistämistä varten, tilarivin valo muuttuu VIHREÄKSI.

Lyysi

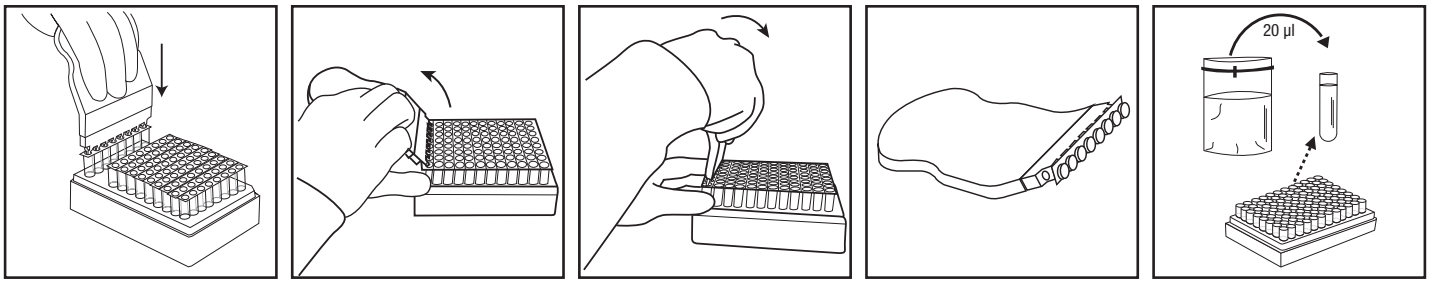
Poista Neogen Lyysiliuostelineen pohja ruuvimeisselillä tai lastalla, ennen kuin asetat sen Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeeseen.



1. Anna lyysiliuosputkien (Neogen Lyysiliuos) lämmetä jättämällä teline huoneenlämpöön (20–25 °C) yön yli (16–18 tunnin ajaksi). Neogen Lyysiliuosputket voi lämmittää huoneenlämpöön myös asettamalla ne laboratorion työtasolle vähintään 2 tunniksi, inkuboimalla Neogen Lyysiliuosputkia inkubaattorissa 37 ± 1 °C:ssa 1 tunnin ajan tai asettamalla Neogen Lyysiliuosputket kaksilohkoiseen kuivalämmittimeen 100 °C:n lämpötilaan 30 sekunniksi.
2. Sekoita suljetut putket kääntämällä ne ylösalaisin. Siirry seuraavaan vaiheeseen 4 tunnin kuluessa.
3. Poista rikastusliemi inkubaattorista.
4. Jokaiselle näytteelle ja negatiiviselle kontrollinäytteelle (NC) (steriili rikastusaine) tarvitaan yksi Neogen Lyysiliuosputki.
   - 4.1 Neogen Lyysiliuos-putkiliuskat voidaan leikata haluttuun Neogen Lyysiliuoksen putkimäärään. Valitse tarvittava yksittäisten Neogen Lyysiliuosputkien tai 8 putken liuskojen määrä. Aseta Neogen Lyysiliuosputket tyhjään telineeseen.
   - 4.2 Ristikontaminaation välttämiseksi poista suojus yhdestä Neogen Lyysiliuosputkiliuskasta kerrallaan ja käytä jokaiseen siirtovaiheeseen uutta pipettiä.
   - 4.3 Siirrä rikastetut näytteet Neogen Lyysiliuosputkiin seuraavien ohjeiden mukaisesti:

   Siirrä jokainen rikastettu näyte **ensin** erilliseen Neogen Lyysiliuosputkeen. Siirrä negatiivinen kontrolli (NC) **viimeiseksi**.

   - 4.4 Käytä Neogen® Molekyläärisen testin cap/decap-työkalua – Lysis yhden Neogen Lyysiliuosputkiliuskan avaamiseen – yksi liuska kerrallaan.
   - 4.5 Heitä Neogen Lyysiliuosputken suojus pois – jos lysaatti säilytetään uudelleentestausta varten, laita suojukset puhtaaseen astiaan lyysin jälkeistä uudelleenkäyttöä varten.
     - 4.5.1 Säilytetyn lysaatin käsittelyyn liittyvät ohjeet ovat liitteessä A.
   - 4.6 Siirrä 20 µl näytettä Neogen Lyysiliuosputkeen, jollei näytteenottokäytäntötaulukoissa 2, 3 tai 4 muuta mainita (esim. raa'at maitotuotteet tai käytettäessä ympäristönäytteitä ja neutraloivaa puskuririkastusliuosta, käytä 10 µl).



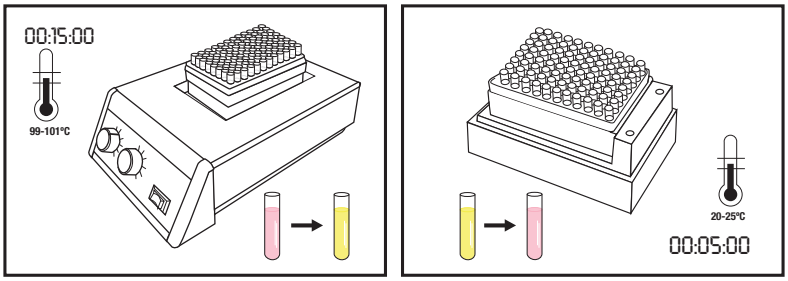
5. Toista vaihe 4.4–4.6, kunnes kukin yksittäinen näyte on lisätty vastaavaan Neogen Lyysiliuosputkeen liuskassa.
6. Kun kaikki näytteet on siirretty, siirrä 20 µl negatiivista kontrollia (steriiliä rikastusainetta, Demi Fraser -liuosta) Neogen Lyysiliuosputkeen. Älä käytä vettä negatiivisena kontrollina.
7. Varmista, että Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeen lämpötila on 100 ± 1 °C.
8. Aseta peittämätön Neogen Lyysiliuosputkiteline Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeeseen ja kuumenna

15 ± 1 minuuttia. Kuumennuksen aikana Neogen Lyysiliuoksen väri muuttuu vaaleanpunaisesta (viileä) keltaiseksi (kuuma).

8.1 Jos näytteitä ei ole asianmukaisesti lämpökäsitelty testin lyysivaiheen aikana, ne saattavat muodostaa biologisen vaaratekijän, jolloin niitä EI saa asettaa Neogen Molekylääriseen testi-instrumenttiin.

9. Poista peittämätön Neogen Lyysiliuosputkiteline lämmityslohkosta ja anna sen viilentyä Neogen Molekyläärisen testijäähdytyslohkon pistokkeessa vähintään 5 minuuttia ja enintään 10 minuuttia. Neogen Molekyläärisen testijäähdytyslohkon pistoke, jota käytetään ympäristön lämpöisenä, asetetaan suoraan laboratorion työtasolle. Viileänä lyysiliuoksen väri palaa vaaleanpunaiseksi.

10. Poista Neogen Lyysiliuosputkiteline Neogen Molekyläärisen testijäähdytyslohkon pistokkeesta.



Monistaminen

1. Jokaiselle näytteelle ja negatiiviselle kontrollinäytteelle tarvitaan yksi Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputki.

   1.1 Reagenssiputkiliuskat voidaan leikata haluttuun määrään putkia. Valitse tarvittava yksittäisten Neogen Molekylääristen testisettien 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputkien tai 8 putken liuskojen määrä.

   1.2 Aseta Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputket tyhjään telineeseen.

   1.3 Vältä liikuttamasta reagenssipellettejä putkien pohjalta.

2. Valitse 1 Neogen Reagenssin valvontaputki ja aseta telineeseen.

3. Ristikontaminaation välttämiseksi poista suojus yhdestä Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputkinauhasta kerrallaan ja käytä uutta pipetin kärkeä jokaisessa siirtovaiheessa.

4. Siirrä lysaatti Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputkeen ja Neogen Reagenssin valvontaputkeen seuraavasti:

Siirrä jokainen näytelysaatti yksittäiseen Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputkeen **ensin** ja sitten negatiivinen kontrolli. Hydratoi Neogen Reagenssin valvontaputki **viimeisenä**.

5. Avaa Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputki käyttämällä Neogen® Molekyläärisen testin cap/decap-työkalua - Reagenssi. Avaa yksi reagenssiputkeen putkiliuska kerrallaan. Heitä suojus pois.

   5.1 **Siirrä 20 µl näytelysaattia Neogen Lyysiliuosputkessa olevan nesteen ylemmästä puoliskosta (vältä sakkaa) vastaavaan Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputkeen. Annostele vinossa kulmassa, jotta et liikuta pellettejä. Sekoita pipetoimalla varovasti ylös ja alas 5 kertaa.**

   5.2 Toista vaihe 5.1, kunnes kaikki yksittäiset näytelysaatit on lisätty vastaavaan Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputkeen liuskassa.

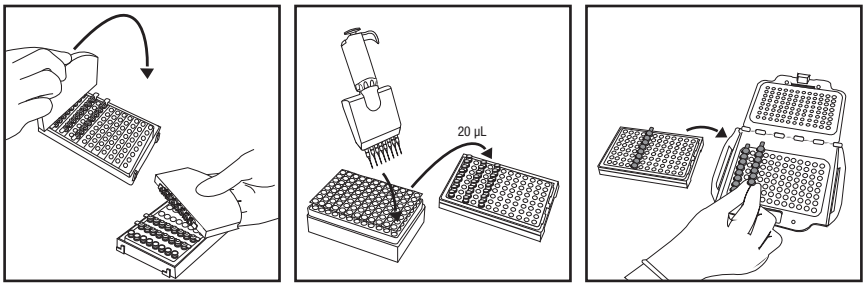
   5.3 Peitä Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputket mukana toimitetuilla lisäsuojuksilla ja varmista, että ne ovat tiukasti paikoillaan, painamalla niitä Neogen Molekyläärisen testin cap/decap-työkalun - Reagenssi pyöristetyllä puolella eteen- ja taaksepäin suuntautuvalla liikkeellä.

   5.4 Toista tarvittaessa vaiheet 5.1–5.3 testattavien näytteiden määrän mukaan.

   5.5 Kun kaikki näytelysaatit on siirretty, siirrä 20 µl negatiivista kontrollilysaattia Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputkeen toistamalla vaiheet 5.1.

   5.6 Siirrä **20 µl negatiivista kontrollilysaattia Neogen Reagenssin valvontaputkeen.** Annostele vinossa kulmassa, jotta et liikuta pellettejä. Sekoita pipetoimalla varovasti ylös ja alas 5 kertaa.

6. Aseta suojuksella suljetut putket puhtaaseen ja steriloituun Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalustaan. Sulje ja lukitse Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalustan kansi.



7. Tarkasta ja vahvista määritetty ajo Neogen Molekyläärisen testijärjestelmän ohjelmistossa.
8. Napsauta ohjelmiston Start (Käynnistä) -painiketta ja valitse käytettävä instrumentti. Valitun instrumentin kansi aukeaa automaattisesti.
9. Aseta Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalusta Neogen Molekyläriseen testi-instrumenttiin ja aloita testi sulkemalla kansi. Saat tulokset 75 minuutin kuluessa, positiiviset tulokset saatetaan kuitenkin havaita jo aikaisemmin.
10. Kun testi on suoritettu loppuun, ota Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalusta Neogen Molekyläärisestä testi-instrumentista ja hävitä putket liottamalla niitä 1–5-tilavuusprosenttisessa (veteen laimennetussa) talouskäyttöisessä valkaisuaineliuoksessa tai vastaavassa liuoksessa 1 tunnin ajan ja etäällä testin valmistelualueelta.

HUOMAUTUS: Jotta ristikontaminaation aiheuttamien väärien positiivisten riski olisi mahdollisimman pieni, älä koskaan avaa monistettua DNA:ta sisältäviä reagenssiputkia. Tämä koskee Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -reagenssiputkia, Neogen Reagenssin valvonnan putkia ja testitaulukon valvonnan putkia. Hävitä kontaminoituneet putket aina liottamalla niitä 1–5-tilavuusprosenttisessa (veteen laimennetussa) valkaisuaineliuoksessa tai vastaavassa liuoksessa 1 tunnin ajan etäällä testin valmistelualueelta.

Tulokset ja tulkinta

Algoritmi tulkitsee nukleiinihappojen monistuksen tunnistuksesta saatavaa valon sirontakäyrää. Ohjelmisto analysoi tulokset automaattisesti, ja tulokset värikoodataan tuloksen mukaan. Positiivinen tai negatiivinen tulos määritetään analysoimalla useita yksilöllisiä käyräparametreja. Oletetut positiiviset tulokset ilmoitetaan reaaliaikaisesti, kun taas negatiiviset ja tarkastettavat tulokset näytetään ajon valmistumisen jälkeen.

Oletetut positiiviset näytteet on vahvistettava laboratorion vakiotoimintamenetelmien mukaisesti tai noudattamalla asianmukaista vertailumenetelmää[1, 2, 3] aloittamalla näytteen siirrosta ensisijaisesta rikastusliemestä toissijaiseen rikastusliemeen (jos käytössä), mitä seuraa kasvatusalustaan asettaminen ja isolaattien vahvistaminen asianmukaisilla biokemiallisilla ja serologisilla menetelmillä.

HUOMAUTUS: Negatiivinenkaan näyte ei anna nollalukemaa, sillä järjestelmällä ja Neogen Molekyläärisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* -monistusreagensseilla on tausta-RLU-lukema (suhteellinen valoyksikkö).

Joissain harvoissa tapauksissa valon sironta voi olla epätavallinen, jolloin algoritmi merkitsee sen tarkastettavaksi. Neogen suosittelee testin uusimista tarkastettavaksi merkittyjen näytteiden osalta. Jos tulokseksi tulee jatkuvasti Inspect (Tarkasta), tee varmistustesti käyttämällä itse parhaaksi katsomaasi menetelmää tai paikallisten määräysten mukaista menetelmää.

Taulukko 5: Neogen Molekyläärisen testijärjestelmän ohjelmistossa käytetyt näytteiden tulossymbolit ja niiden tulkinta.

Putken tyyppi	Putken tulossymboli	Tulos	Tulkinta
Näyte		Positiivinen	Oletettu positiivinen näyte kohdepatogeenin osalta.
Näyte		Negatiivinen	Negatiivinen näyte kohdepatogeenin osalta.
Näyte		Estetty	Näytematriisi inhiboi testin. Uusintatestaus voi olla välttämätön. Katso lisätietoja vianmäärityskohdasta ja testisetin tuoteselosteesta.
Näyte		Tarkasta	Kohdepatogeenin esiintymistä tai sen puuttumista ei voitu määritellä. Uusintatestaus voi olla välttämätön. Katso lisätietoja vianmäärityskohdasta ja testisetin tuoteselosteesta.
Näyte		Virhe	Bioluminesenssia ei havaittu. Uusintatestaus voi olla välttämätön. Katso lisätietoja vianmäärityskohdasta ja testisetin tuoteselosteesta.

Tulosten vahvistaminen NF VALIDATION -sertifioidun menetelmän mukaisesti

Vaihtoehto 1: Käyttämällä ISO 11290[3] -standardia aloittaen Demi Fraser -rikastamisesta.

Vaihtoehto 2: Eristäminen PALCAM-agarilla (O&A) tai kromogeenisella agarilla osana NF VALIDATION -sertifioitua *Listeria monocytogenes* -bakteerin havaitsemismenetelmää. Tunnusomaisten pesäkkeiden esiintyminen riittää vahvistamaan *Listeria monocytogenes* -bakteerien esiintymisen.

Vaihtoehto 3: Käyttämällä EN ISO 7218[5]-standardissa kuvattuja DNA-koettimia selektiiviseltä agarlevyltä eristettyihin pesäkkeisiin (katso vaihtoehdot 1 tai 2).

Vaihtoehto 4: Käyttämällä jotain muuta NF VALIDATION -sertifioitua menetelmää, jonka periaatteen on oltava erilainen kuin Neogen Molekylaarisessä testisetissä 2 - *Listeria monocytogenes*. On käytettävä tälle toiselle validoidulle menetelmälle kuvattua koko käytäntöä. Kaikkien vahvistamisen alkua edeltävien vaiheiden on oltava kummallekin menetelmälle yhteisiä.

Jos tulokset ovat ristiriitaisia (vaihtoehtoisella menetelmällä saatu oletettu positiivinen tulos, jota ei saada vahvistettua jollakin edellä kuvatuista tavoista), laboratorion on tehtävä tarvittavat toimenpiteet saadun tuloksen validoimiseksi.

Jos tulokset ovat ristiriitaisia (Neogen Molekylaarisen testisetin 2 - *Listeria monocytogenes* saatu oletettu positiivinen tulos, jota ei saada vahvistettua jollakin edellä kuvatuista tavoista), laboratorion on tehtävä tarvittavat toimenpiteet saadun tuloksen validoimiseksi.

Jos sinulla on jotain tiettyä sovellusta tai menetelmää koskevia kysymyksiä, käy verkkosivuillamme osoitteessa www.neogen.com tai ota yhteyttä paikalliseen Neogen-edustajaan tai -jälleenmyyjään.

Liite A. Käytännön keskeytys: Lämpökäsiteltyjen lysaattien säilyttäminen ja uudelleentestaus.

1. Säilytä lämpökäsitelty lysaatti sulkemalla lyysiputki uudelleen puhtaalla suojuksella (katso ”Lyysi”, 4.5).
2. Säilytä 4–8 °C:ssa enintään 72 tuntia.
3. Valmistele säilytetty näyte monistamista varten kääntelemällä sitä 2–3 kertaa, jotta se sekoittuu.
4. Poista suojukset putkista.
5. Aseta sekoitetut lyysiputket Neogen Molekylaarisen testilämpölohkon pistokkeeseen ja kuumenna 100 ± 1 °C:ssa 5 ± 1 minuuttia.
6. Poista Neogen Lyysiliuosputkiteline lämmityslohkosta ja anna sen viilentyä Neogen Molekylaarisen testijäähdytyslohkon pistokkeessa vähintään 5 minuuttia ja enintään 10 minuuttia.
7. Jatka käytäntöä edellä olevasta kohdasta ”Monistaminen”.

Viitteet:

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

Tuotteen tarrasymbolien selitykset

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

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

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

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

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

FS00867C

NEOGEN

Instruções do produto

Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2

Descrição e uso recomendado do produto

O Neogen® Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 é usado com o Neogen® Sistema de Detecção Molecular para a detecção rápida e específica de *Listeria monocytogenes* em amostras enriquecidas de alimentos e ambientais de processos de alimentos. O Neogen Ensaio para Detecção Molecular utiliza amplificação isotérmica mediada por alça para amplificar rapidamente sequências de ácidos nucleicos com alta especificidade e sensibilidade, combinadas com bioluminescência para detectar a amplificação. Os resultados positivos presuntivos são relatados em tempo real enquanto os resultados negativos são exibidos após a conclusão do ensaio. Os resultados positivos presuntivos devem ser confirmados através do seu método preferencial ou conforme especificado pelos regulamentos locais[1, 2, 3].

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

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

A Neogen avaliou o Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 com Demi Fraser Caldo contendo citrato férrico amoniacal e Fraser Caldo contendo citrato férrico amoniacal conforme necessário. Uma formulação típica desse meio pode ser vista abaixo.

Fórmula típica de Demi Fraser Caldo Base	**(g/L)**	**Fórmula típica de Fraser Caldo Base**	**(g/L)**
Cloreto de sódio	20 g	Cloreto de sódio	20 g
Fosfato de sódio, dibásico, anidro*	9,6 g	Fosfato de sódio, dibásico, anidro*	9,6 g
Extrato de carne	5,0 g	Extrato de carne	5,0 g
Digestão pancreática de caseína	5,0 g	Digestão pancreática de caseína	5,0 g
Digestão péptica de tecido animal	5,0 g	Digestão péptica de tecido animal	5,0 g
Extrato de levedura	5,0 g	Extrato de levedura	5,0 g
Cloreto de lítio	3,0 g	Cloreto de lítio	3,0 g
Fosfato de potássio, monobásico	1,35 g	Fosfato de potássio, monobásico	1,35 g
Esculina	1,0 g	Esculina	1,0 g
Cloridrato de acriflavina	0,0125 g	Cloridrato de acriflavina	0,025 g
Ácido nalidíxico	0,01 g	Ácido nalidíxico	0,02 g

***** Substituto: Fosfato de sódio, dibásico, di-hidrato 12,0 g

Suplemento de Fraser Caldo

(Ingredientes por frasco de 10 mL. (Um frasco é adicionado a um litro de meio basal.)

Citrato férrico amoniacal 0,5 g/10 mL

pH final 7,2 ± 0,2 a 25 °C

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

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

O kit de testes do Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 contém 96 testes, descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes do kit Neogen Ensaio de Detecção Molecular

Item	Identificação	Quantidade	Conteúdo	Comentários
Neogen® Solução de Lise (LS)	Solução rosa em tubos transparentes	96 (12 tiras de 8 tubos)	580 µL de LS por tubo	Armazenados no rack e prontos para o uso
Neogen® Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 Tubos de reagentes	Tubos amarelos	96 (12 tiras de 8 tubos)	Mistura de detecção e amplificação específica liofilizada	Pronto para uso
Tampas adicionais	Tampas amarelas	96 (12 tiras de 8 tampas)		Pronto para uso
Neogen® Controle de Reagentes (RC)	Tubos transparentes com tampa articulada	16 (2 embalagens de 8 tubos individuais)	Mistura de DNA de controle, amplificação e detecção liofilizada	Pronto para uso

O Controle Negativo, não fornecido no kit, é um meio de enriquecimento estéril, por exemplo, Demi Fraser Caldo. Não utilize água como Controle Negativo.

Segurança

O usuário deve ler, compreender e seguir todas as informações de segurança presentes nas instruções do Neogen Sistema de Detecção Molecular e do Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2. Guarde as instruções sobre segurança para consulta posterior.

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

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

⚠ ADVERTÊNCIA

Não use o Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 no diagnóstico de problemas de saúde em humanos ou animais.

O método Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 pode gerar *Listeria monocytogenes* a níveis suficientes para causar a ocorrência de natimortos e morte em mulheres grávidas e imunocomprometidos, case sejam expostos.

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

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

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

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

- É altamente recomendável que a equipe de mulheres do laboratório seja informada sobre o risco para o desenvolvimento do feto resultante da infecção da mãe pela exposição a *Listeria monocytogenes*.
- Execute testes de agentes patogênicos em um laboratório adequadamente equipado, sob o controle de pessoal bem treinado. O meio de enriquecimento incubado e equipamentos ou superfícies que tenham entrado em contato com o meio de enriquecimento incubado podem conter patógenos em níveis suficientes para apresentar riscos à saúde humana.
- Sempre adote as práticas de segurança padrão em laboratórios, como usar trajes de proteção adequados e óculos de

proteção ao manipular reagentes e amostras contaminadas.
- Evite o contato com o conteúdo do meio de enriquecimento e dos tubos de reagentes após a amplificação.
- Descarte amostras enriquecidas de acordo com as normas vigentes do setor.
- Amostras que não foram tratadas com aquecimento de forma adequada durante a etapa de lise do ensaio podem ser consideradas um risco biológico potencial e NÃO devem ser inseridas no Neogen Equipamento de Detecção Molecular.

Para reduzir os riscos de contaminação cruzada ao preparar o ensaio:
- Sempre use luvas (para proteger o usuário e evitar a introdução de nucleases).

Para reduzir os riscos associados à contaminação ambiental:
- Siga as normas vigentes do setor referentes ao descarte de resíduos contaminados.

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

AVISO

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

Para reduzir os riscos de um resultado falso-positivo:
- Nunca abra tubos de reagentes após a amplificação.
- Sempre descarte os tubos contaminados mergulhando-os em uma solução de água sanitária de 1-5% (v:v em água) ou solução equivalente por 1 hora, longe da área de preparação de ensaio.
- Nunca submeta os tubos de reagentes a autoclave após a amplificação.

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

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

Responsabilidade do usuário

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

Ao selecionar qualquer método de teste, é importante considerar que fatores externos, como métodos de amostragem, protocolos de teste, preparo de amostras, manipulação e técnica laboratorial utilizada, podem influenciar os resultados.

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

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

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

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

Uma matriz pode ser definida como um tipo de produto com propriedades intrínsecas, tais como composição e processamento. As diferenças entre matrizes podem ser tão simples quanto os efeitos causados pelas diferenças em seu

processamento ou apresentação; por exemplo, cru vs. pasteurizado, fresco vs. desidratado, etc.

Limitação de garantias/recurso limitado

SALVO CONFORME DECLARADO EXPRESSAMENTE EM UMA SEÇÃO DE GARANTIA DE EMPACOTAMENTO DE PRODUTO INDIVIDUAL, A NEOGEN REJEITA TODAS AS GARANTIAS EXPRESSAS E IMPLÍCITAS, INCLUINDO, ENTRE OUTRAS, QUAISQUER GARANTIAS DE COMERCIALIZAÇÃO OU ADEQUAÇÃO PARA UM DETERMINADO USO. Se ficar provado que qualquer produto da Neogen Food Safety se encontra defeituoso, a Neogen ou seu distribuidor autorizado procederá à respectiva substituição ou, se assim o decidir, restituirá o dinheiro da compra do produto. Estes são os seus únicos termos de recurso. Entre em contato com seu representante da Neogen ou distribuidor autorizado da Neogen para qualquer dúvida adicional.

Limitações de responsabilidade da Neogen

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

Armazenamento e descarte

Armazene o Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 a 2–8 °C. Não congele. Mantenha o kit longe de luz durante o armazenamento. Após abrir o kit, verifique se a embalagem de alumínio não está danificada. Se a embalagem estiver danificada, não utilize. Após a abertura, os tubos de reagentes não utilizados devem sempre ser armazenados na embalagem resselável, juntamente com o dessecante para manter a estabilidade dos reagentes liofilizados. Armazene as embalagens resseladas a 2–8 °C por, no máximo, 60 dias.

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

Instruções de uso

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

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

O usuário deve concluir o treinamento de qualificação do operador (QO) do Sistema de Detecção Molecular Neogen, conforme descrito no documento "Protocolos e Instruções de Qualificação de Instalação (QI)/Qualificação Operacional (QO) para o Neogen Sistema de Detecção Molecular"[6].

Consulte a seção "Instruções específicas para métodos comprovados" para obter os requisitos específicos:

Tabela 3 para protocolos de enriquecimento de acordo com o AOAC® *Official Method of Analysis℠* **2016.08** e Certificado AOAC® *Performance Tested Method℠* **#081501.**

Tabela 4 para protocolos de enriquecimento conforme o certificado NF Validation **3M 01/15-09/16**.

Enriquecimento de amostra

As Tabelas 2, 3 e 4 oferecem diretrizes sobre enriquecimento para alimentos e amostras ambientais. É responsabilidade do usuário validar os protocolos de amostragem alternativos ou diluição para garantir que este método de teste atenda aos critérios do usuário.

Alimentos

1. Deixe que o meio de enriquecimento Demi Fraser Caldo (incluindo o citrato férrico amoniacal) equilibre à temperatura ambiente do laboratório.
2. Misture assepticamente o meio de enriquecimento e a amostra conforme as Tabelas 2, 3 ou 4. Para carnes e amostras altamente particuladas, recomenda-se o uso de sacos de amostra com filtro.
3. Homogeneíze totalmente por mistura, esmagamento (no stomacher) ou mistura manual por 2 ± 0,2 minutos. Incube a 37 ± 1 °C conforme as Tabelas 2, 3 ou 4.
4. Para laticínios crus (consulte 2, 3 ou 4), transfira 0,1 mL do enriquecimento primário para 10 mL de Fraser Caldo. Armazene a 37 ±1 °C por até 20–24 horas.

Amostras ambientais

Os dispositivos de coleta de amostra podem ser uma esponja hidratada com uma solução neutralizante para desativar os efeitos dos desinfetantes. A Neogen recomenda o uso de uma esponja de celulose livre de biocidas. A solução neutralizante pode ser Caldo Neutralizante Dey-Engley (D/E) ou Caldo Letheen. Recomenda-se desinfetar a área após a amostragem.

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

O tamanho recomendado da área de amostragem para confirmar a presença ou ausência do patógeno na superfície é de, no mínimo, 100 cm^2 (10 cm x 10 cm ou 4" x 4"). Caso a amostragem seja realizada com uma esponja, toda a área deve ser coberta em duas direções (esquerda e direita, depois para cima e para baixo) ou as amostras ambientais devem ser coletadas em conformidade com o protocolo de amostragem vigente ou de acordo com as diretrizes do FDA BAM[1], USDA FSIS MLG[2] ou ISO 18593[7].

1. Deixe que o meio de enriquecimento Demi Fraser Caldo (incluindo o citrato férrico amoniacal) equilibre à temperatura ambiente do laboratório.
2. Misture assepticamente o meio de enriquecimento e a amostra conforme as Tabelas 2, 3 ou 4.
3. Homogeneíze totalmente por mistura, esmagamento (no stomacher) ou mistura manual por 2 ± 0,2 minutos. Incube a 37 ± 1 °C por 24–30 horas conforme as Tabelas 2, 3 ou 4.

Tabela 2: Protocolos gerais de enriquecimento a 37 ± 1 °C usando o Demi Fraser Caldo e o Fraser Caldo conforme necessário.

Matriz de amostra	Tamanho da amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento (mL)	Tempo de Enriquecimento (horas)
Carnes termoprocessadas, cozidas, curadas, aves, pescados e peixes Produtos lácteos termoprocessados/ pasteurizados Hortifruti e vegetais Alimentos compostos	25 g	225	24–30
Amostras ambientais[a]	1 esponja	100 ou 225	24–30
	1 swab	10	24–30
Carnes cruas, aves, pescados e peixes	25 g	475	28–32

Matriz de amostra	Enriquecimento primário (Demi Fraser Caldo)[a]			Enriquecimento secundário (Fraser Caldo)[a]			Volume de análise da amostra[b]
	Tamanho da amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento (mL)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Tamanho da amostra	Temperatura de enriquecimento (°C)	Tempo de Enriquecimento (horas)	
Laticínios crus	25 g	225	20–24	Transfira 0,1 mL para 10 mL de Fraser Caldo	37 ± 1	20–24	10 µL

(a) O Demi Fraser Caldo e o Fraser Caldo devem sempre ser suplementados com suplemento de Fraser Caldo (citrato férrico amoniacal) durante o enriquecimento primário ou secundário.

(b) Volume de amostra transferido para tubos de Neogen Solução de Lise. Consulte a etapa 4.6 da seção Lise.

Instruções específicas para métodos comprovados

AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2016.08

AOAC® *Performance Tested Method*℠ Nº 081501

Nos programas OMA℠ e PTM℠ do Instituto de Pesquisa AOAC, o Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 foi constatado como um método eficiente para a detecção de *Listeria monocytogenes.* As matrizes testadas no estudo são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Protocolos de enriquecimento usando o Demi Fraser Caldo[a] 37 ± 1 °C de acordo com AOAC OMA℠ 2016.08 e PTM℠ Certificado Nº 081501.

Matriz de amostra		Tamanho da amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento (mL)	Tempo de Enriquecimento (horas)
Salsicha de carne bovina, queijo fresco, sorvete de baunilha, queijo cottage de leite com 4% de gordura, achocolatado de leite integral 3%, alface romana, espinafre cru ensacado, salmão defumado a frio		25 g	225	24–30
Carne de frango crua		25 g	475	28–32
Embutido de peru		125 g	1125	24–30
Melão[b]		Melão inteiro	Volume suficiente para o melão flutuar	26–30
Amostras ambientais:	Aço inoxidável	1 esponja	225	24–30
	Concreto selado	1 esponja	100	24–30
	Plástico[c]	1 swab	10	24–30

Todas as amostras para a validação da AOAC foram homogeneizadas no stomacher, salvo indicação em contrário.

(a) O Demi Fraser Caldo e o Fraser Caldo devem sempre ser suplementados com suplemento de Fraser Caldo (citrato férrico amoniacal) durante o enriquecimento primário ou secundário.

(b) Homogeneíze a amostra por mistura manual.

(c) Homogeneíze a amostra por vórtex.

NF VALIDATION da AFNOR Certification

3M 01/15-09/16

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

Para obter mais informações sobre o término da validade, consulte o certificado NF VALIDATION disponível no site supracitado.

Método certificado NF VALIDATION em conformidade com ISO 16140-2[6] em comparação com ISO 11290[3]
Escopo da validação: Amostras de todos os alimentos humanos e ambientais (com exceção de amostras de produção primária)
Preparo da amostra: As amostras devem ser preparadas conforme EN ISO 11290-1[3] e EN ISO 6887[8]
Versão do software: Consulte o certificado

Tabela 4: Protocolos de enriquecimento conforme o método certificado NF VALIDATION 3M 01/15-09/16 a 37 ± 1 °C usando Demi Fraser Caldo e Fraser Caldo conforme necessário.

Protocolo geral	Tamanho da amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento (mL)	Temperatura de Enriquecimento (± 1 °C)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Volume de análise da amostra[a]	Ponto de interrupção aceitável
Amostras de todos os alimentos (exceto carnes cruas, pescados crus e laticínios crus)	25 g	225	37	24–30	20 µL	• Demi Fraser Caldo até 72 horas • Lisado a -20 °C • Lisado a 4 °C até 72 horas
Amostras ambientais	25 g, 1 swab, 1 lenço					

Protocolo específico	Enriquecimento primário (Demi Fraser Caldo)[b]				Enriquecimento secundário (Fraser Caldo)[b]				Ponto de interrupção aceitável
	Tamanho da amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento (mL)	Temperatura de Enriquecimento (± 1 °C)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Tamanho da amostra	Temperatura de Enriquecimento (± 1 °C)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Volume de análise da amostra[c]	
Carnes cruas, pescados crus e laticínios crus	25 g	225	37	20–24	Transfira 0,1 mL para 10 mL de Fraser Caldo	37	20–24	10 µL	• Fraser Caldo até 72 horas • Lisado a -20 °C • Lisado a 4 °C até 72 horas

(a) Volume de amostra transferido para tubos de Neogen Solução de Lise. Consulte a etapa 4.6 da seção Lise.

(b) O Demi Fraser Caldo e o Fraser Caldo devem sempre ser suplementados com suplemento de Fraser Caldo (citrato férrico amoniacal) durante o enriquecimento primário ou secundário.

(c) Volume de amostra transferido para tubos de Neogen Solução de Lise. Consulte a etapa 4.6 da seção Lise.

NOTA: Amostras mais pesadas que 25 g não foram testadas no estudo NF Validation.

Preparo da Neogen® Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular

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

Preparação do Neogen® Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular

Coloque o Neogen® Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular diretamente sobre a bancada do laboratório; utilize o bloco de resfriamento à temperatura ambiente do laboratório (20–25 °C).

Preparo do Neogen® Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular

Coloque o Neogen® Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular em uma unidade de aquecimento com bloco seco duplo. Ligue a unidade de aquecimento de bloco a seco e defina a temperatura para permitir que o Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular alcance e mantenha a temperatura de 100 ± 1 °C.

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

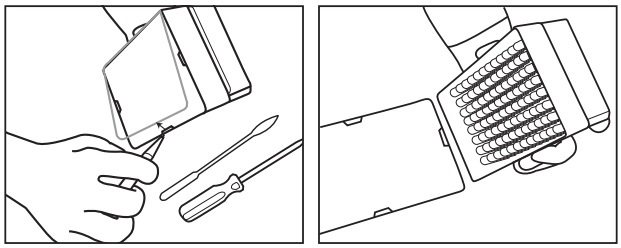
Preparo do Neogen® Equipamento de Detecção Molecular

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

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

Lise

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



1. Deixe que os tubos de solução de Lise (Neogen Solução de Lise) cheguem à temperatura ambiente (20–25 °C), deixando as racks fora de refrigeração de um dia para o outro (16–18 horas). A alternativa para equilibrar os tubos Neogen Solução de Lise à temperatura ambiente é posicioná-los na bancada do laboratório durante pelo menos 2 horas, incubá-los em uma incubadora de 37 ± 1 °C por 1 hora ou colocá-los em um aquecedor com bloco seco duplo por 30 segundos a 100 °C.
2. Inverta os tubos com tampa para misturar. Prossiga para a próxima etapa em até 4 horas.
3. Remova o caldo de enriquecimento da incubadora.
4. Um tubo de Neogen Solução de Lise é necessário para cada amostra e para a amostra do Controle Negativo (NC) (meio de enriquecimento esterilizado).

   4.1 As tiras de tubos Neogen Solução de Lise podem ser cortadas para obter o número desejado de tubos. Selecione o número de tubos de Neogen Solução de Lise individuais ou as tiras de 8 tubos necessárias. Coloque os tubos de Neogen Solução de Lise em um rack vazio.

   4.2 Para evitar contaminação cruzada, destampe uma tira de tubo Neogen Solução de Lise de cada vez e utilize uma nova ponteira de pipeta para cada etapa da transferência.

   4.3 Transfira as amostras enriquecidas para os tubos Neogen Solução de Lise conforme descrito abaixo:

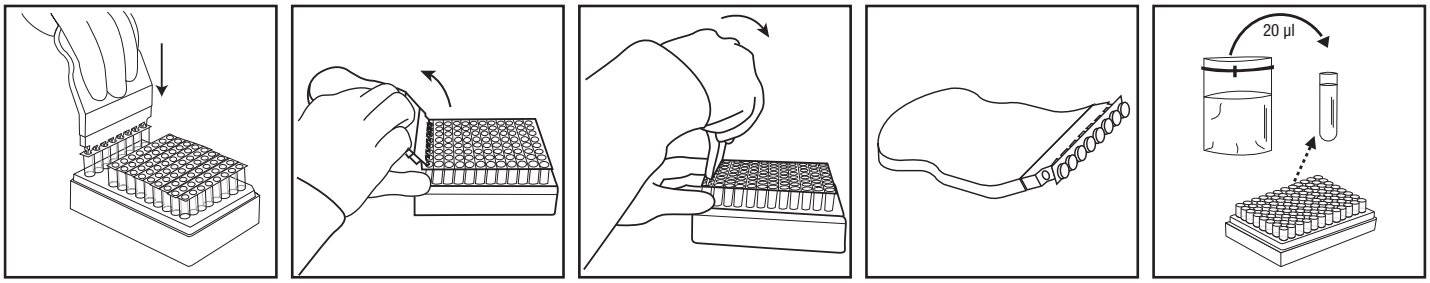
   Primeiro, transfira cada amostra enriquecida para um tubo Neogen Solução de Lise individual. **Por último**, transfira o NC.

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

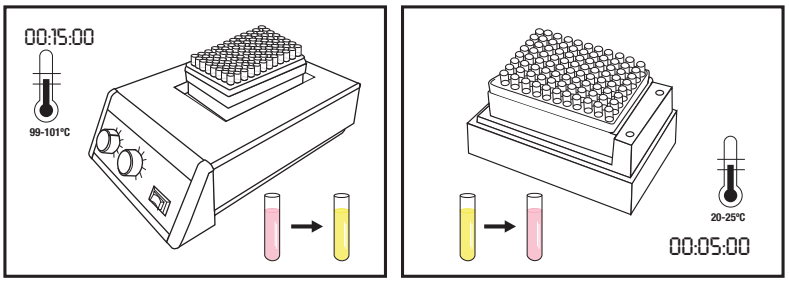
   4.5 Descarte a tampa do tubo Neogen Solução de Lise – se o lisado for mantido para novo teste, coloque as tampas em um recipiente limpo para reutilização após a lise.

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

   4.6 Transfira 20 µL de amostra em um tubo Neogen Solução de Lise, exceto se indicado de outro modo nos protocolos das tabelas 2, 3, ou 4 (por exemplo, laticínios crus ou quando as amostras com tampão neutralizante usarem 10 µL).



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



Amplificação

1. É necessário um Tubo de Reagente de Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 para cada amostra e para o NC.
   1.1 As tiras de tubos de reagentes podem ser cortadas para obter o número de tubos desejado. Selecione o número de Tubos de Reagente individuais ou de tiras de 8 tubos necessárias para Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2.
   1.2 Coloque os Tubos de Reagente Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 em uma rack vazia.
   1.3 Evite agitar os pellets reagentes da parte inferior dos tubos.
2. Selecione um tubo Neogen Controle de Reagentes e coloque-o na rack.
3. Para evitar contaminação cruzada, destampe uma tira de Tubo Reagente para Neogen Ensaio de Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 de cada vez e utilize uma nova ponteira de pipeta para cada etapa da transferência.
4. Transfira o lisado para Tubos de Reagente Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 e tubo Neogen Controle de Reagentes conforme descrito abaixo:

Primeiro, transfira cada amostra de lisado para Tubos de Reagentes individuais de Neogen Ensaio de Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 seguido do NC. **Por último**, hidrate o tubo Neogen Controle de Reagentes.

5. Use a Neogen® Ferramenta de Tampar/Destampar para Detecção Molecular – Reagente para destampar o Tubo de Reagente para Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 uma tira de cada vez. Descarte a tampa.

5.1 **Transfira 20 µL de amostra de lisado da ½ superior do líquido (evite o precipitado) do tubo de Neogen Solução de Lise para o Tubo de Reagente do Neogen Ensaio de Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 correspondente. Dispense em um ângulo que evite a agitação dos pellets. Misture pipetando gentilmente 5 vezes.**

5.2 Repita a etapa 5.1 até que a amostra de lisado individual tenha sido adicionada a um Tubo de Reagente para Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 correspondente na tira.

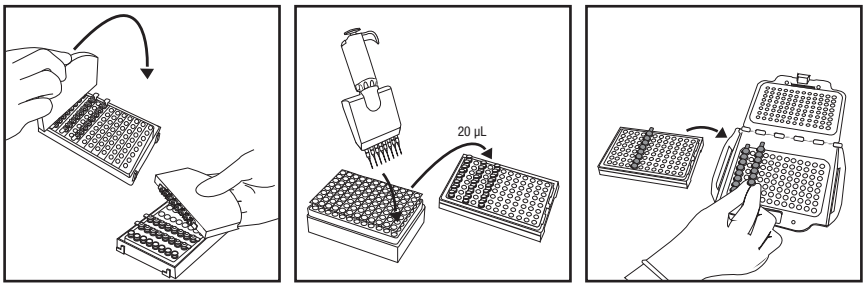
5.3 Cubra os Tubos de Reagentes para Neogen Ensaio de Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 com as tampas extras fornecidas e utilize o lado arredondado da Neogen Ferramenta de Tampar/Destampar para Detecção Molecular – Reagente para apertar com um movimento de vai e vem, garantindo que a tampa fique bem apertada.

5.4 Repita as etapas 5.1 a 5.3, conforme necessário, para o número de amostras a serem testadas.

5.5 Quando todas as amostras de lisado tiverem sido transferidas, repita as etapas de 5.1 para transferir 20 µL de lisado do NC para o Tubo Reagente de Neogen Ensaio de Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2.

5.6 Transfira **20 µL de lisado NC para um tubo Neogen Controle de Reagentes**. Dispense em um ângulo que evite a agitação dos pellets. Misture pipetando gentilmente 5 vezes.

6. Carregue os tubos tampados em uma Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular limpa e descontaminada. Feche e trave a tampa da Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular.



7. Analise e confirme a execução configurada no Software do Neogen Sistema de Detecção Molecular.
8. Clique no botão Iniciar do software e selecione o instrumento a utilizar. A tampa do instrumento selecionado abre automaticamente.
9. Posicione a Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular no Neogen Equipamento de Detecção Molecular e feche a tampa para iniciar o ensaio. Os resultados são fornecidos em 75 minutos, embora os positivos possam ser detectados ainda mais cedo.
10. Depois que o ensaio estiver concluído, remova a Neogen Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular do Neogen Equipamento de Detecção Molecular e descarte os tubos mergulhando-os em uma solução de 1–5% (v: v em água) de água sanitária ou solução equivalente por 1 hora, fora da área de preparação do ensaio.

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

Resultados e Interpretação

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

Amostras positivas presuntivas devem ser confirmadas de acordo com os procedimentos operacionais padrão de laboratório, ou seguindo o método de confirmação de referência apropriado[1, 2, 3], começando com a transferência do enriquecimento primário para caldo de enriquecimento secundário (se aplicável), seguida pelo plaqueamento e a confirmação dos isolados usando métodos bioquímicos e sorológicos adequados.

NOTA: Até mesmo uma amostra negativa não resultará em leitura zero uma vez que o sistema e os reagentes de amplificação do Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2 têm uma leitura de unidade de luz relativa (RLU) em "plano de fundo".

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

Tabela 5: Símbolos de resultado para amostras e interpretação conforme fornecidos pelo software do Neogen Sistema de Detecção Molecular.

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

Confirmação de resultados segundo o método certificado NF VALIDATION

Opção 1: Uso da norma ISO 11290[3] a partir do enriquecimento de Demi Fraser.

Opção 2: Por isolamento em Ágar PALCAM ou ágar (O&A) cromogênico formando parte do método do certificado NF VALIDATION para a detecção da *Listeria monocytogenes*. A presença de colônias características é suficiente para confirmar a presença de *Listeria monocytogenes*.

Opção 3: Utilização de sondas de ácido nucleico conforme descrito na norma EN ISO 7218[5], em colônias isoladas, ágar seletivo (consulte as Opções 1 ou 2).

Opção 4: Utilização de algum outro método certificado pelo NF VALIDATION, cujo princípio seja diferente do Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2. Deve ser usado o protocolo completo descrito para esse segundo método comprovado. Todas as etapas anteriores ao início da confirmação devem ser comuns a ambos os métodos.

Na ocorrência de resultados divergentes (positivo presuntivo com o método alternativo, não confirmado por um dos meios acima descritos) o laboratório deve seguir as etapas necessárias para garantir a validade dos resultados obtidos.

Na ocorrência de resultados divergentes (positivo presuntivo com o Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Listeria monocytogenes* 2, não confirmado por um dos meios acima descritos) o laboratório deve seguir as etapas necessárias para garantir a validade dos resultados obtidos.

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

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

1. Para armazenar um lisado tratado termicamente, tampe novamente o tubo de lise com uma tampa limpa (consulte "Lise", 4.5).
2. Armazene entre 4 e 8 °C por até 72 horas.
3. Prepare uma amostra armazenada para amplificação invertendo de 2 a 3 vezes para misturar.
4. Destampe os tubos.
5. Coloque os tubos de lisado misturados no Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular e aqueça a 100 ± 1 °C por 5 ± 1 minuto.
6. Retire a rack de tubos Neogen Solução de Lise do bloco de aquecimento e deixe esfriar no Neogen Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular por pelo menos 5 minutos e no máximo 10 minutos.

7. Continue o protocolo na seção "Amplificação", detalhada acima.

Referências:

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

Explicação dos símbolos dos rótulos de produtos

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

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

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

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

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

FS00867C

Πληροφορίες προϊόντος

Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes*

Περιγραφή του προϊόντος και σκοπός χρήσης

Η Neogen® Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* χρησιμοποιείται με το Neogen® Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης για τη γρήγορη και εξειδικευμένη ανίχνευση του *Listeria monocytogenes*, σε εμπλουτισμένα δείγματα τροφίμων και περιβαλλοντικά δείγματα. Οι Neogen Δοκιμασίες Μοριακής Ανίχνευσης χρησιμοποιούν ισοθερμικό πολλαπλασιασμό με μεσολάβηση βρόχου για τον γρήγορο πολλαπλασιασμό αλληλουχιών νουκλεϊνικών οξέων με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, σε συνδυασμό με βιοφωταύγεια για την ανίχνευση του πολλαπλασιασμού. Τα υποθετικά θετικά αποτελέσματα αναφέρονται σε πραγματικό χρόνο, ενώ τα αρνητικά αποτελέσματα εμφανίζονται μετά την ολοκλήρωση της δοκιμασίας. Τα υποθετικά θετικά αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που προτιμάτε ή όπως καθορίζεται από τους τοπικούς κανονισμούς[1, 2, 3].

Η Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* προορίζεται για χρήση σε εργαστηριακό περιβάλλον από επαγγελματίες, εκπαιδευμένους στις εργαστηριακές τεχνικές. Η Neogen δεν έχει τεκμηριώσει τη χρήση αυτού του προϊόντος σε βιομηχανίες άλλες από εκείνες των τροφίμων και ποτών. Για παράδειγμα, η Neogen δεν έχει τεκμηριώσει αυτό το προϊόν για τον έλεγχο δειγμάτων νερού, φαρμακευτικών προϊόντων, καλλυντικών, κλινικών ή κτηνιατρικών δειγμάτων. Η Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* δεν έχει αξιολογηθεί με όλα τα πιθανά πρωτόκολλα ελέγχου ή με όλα τα πιθανά στελέχη βακτηριδίων.

Όπως και με όλες τις δοκιμαστικές μεθόδους, η προέλευση, η σύνθεση και η ποιότητα του μέσου εμπλουτισμού μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Παράγοντες όπως οι μέθοδοι δειγματοληψίας, τα πρωτόκολλα ελέγχου, η προετοιμασία των δειγμάτων, ο χειρισμός και η εργαστηριακή τεχνική μπορούν επίσης να επηρεάσουν τα αποτελέσματα. Η Neogen συνιστά την αξιολόγηση της μεθόδου, συμπεριλαμβανομένου του μέσου εμπλουτισμού, στο περιβάλλον του χρήστη με τη χρήση επαρκούς αριθμού δειγμάτων με συγκεκριμένα τρόφιμα και μικροβιακές προκλήσεις ώστε να διασφαλιστεί ότι η μέθοδος πληροί τα κριτήρια του χρήστη.

Η Neogen αξιολόγησε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* με Ζωμό Demi-Fraser που περιείχε Εναμμώνιο Κιτρικός Σίδηρο και με Ζωμό Fraser που περιείχε Εναμμώνιο Κιτρικός Σίδηρο, βάσει των απαιτήσεων. Μια τυπική σύνθεση αυτού του μέσου ακολουθεί παρακάτω.

Τυπική σύνθεση Βάσης Ζωμού Demi-Fraser	**(g/L)**	**Τυπική σύνθεση Βάσης Ζωμού Fraser**	**(g/L)**
Χλωριούχο νάτριο	20 g	Χλωριούχο νάτριο	20 g
Φωσφορικό νάτριο, διβασικό, άνυδρο*	9,6 g	Φωσφορικό νάτριο, διβασικό, άνυδρο*	9,6 g
Εκχύλισμα βόειου κρέατος	5,0 g	Εκχύλισμα βόειου κρέατος	5,0 g
Παγκρεατική πέψη Καζεΐνης	5,0 g	Παγκρεατική πέψη Καζεΐνης	5,0 g
Πεπτική πέψη Ζωικού ιστού	5,0 g	Πεπτική πέψη Ζωικού ιστού	5,0 g
Εκχύλισμα Ζύμης	5,0 g	Εκχύλισμα Ζύμης	5,0 g
Χλωριούχο λίθιο	3,0 g	Χλωριούχο λίθιο	3,0 g
Φωσφορικό κάλιο, μονοβασικό	1,35 g	Φωσφορικό κάλιο, μονοβασικό	1,35 g
Εσκουλίνη	1,0 g	Εσκουλίνη	1,0 g
Υδροχλωρική ακριβλαβίνη	0,0125 g	Υδροχλωρική ακριβλαβίνη	0,025 g
Ναλιδιξικό οξύ	0,01 g	Ναλιδιξικό οξύ	0,02 g

***** Υποκατάστατο: Φωσφορικό νάτριο, διβασικό, διυδρικό 12,0 g

Συμπλήρωμα Ζωμού Fraser

(Συστατικά ανά φιαλίδιο 10 mL. Ένα φιαλίδιο προστίθεται σε ένα λίτρο βασικού θρεπτικού υλικού.)

Εναμμώνιος κιτρικός σίδηρος 0,5 g/10 mL

Τελικό pH 7,2 ± 0,2 στους 25°C

Το Neogen® Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης προορίζεται για χρήση με δείγματα που έχουν υποβληθεί σε θερμική επεξεργασία κατά τη διάρκεια του σταδίου λύσης της δοκιμασίας, το οποίο είναι σχεδιασμένο για την καταστροφή των οργανισμών που είναι παρόντες στο δείγμα. Δείγματα που δεν έχουν υποβληθεί στην κατάλληλη θερμική

επεξεργασία κατά τη διάρκεια του σταδίου λύσης της δοκιμασίας μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανός βιολογικός κίνδυνος και ΔΕΝ πρέπει να εισάγονται στο Neogen Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης.

Η Neogen Food Safety φέρει πιστοποίηση σύμφωνα με το πρότυπο του Διεθνούς Οργανισμού Τυποποίησης (ISO) 9001 για σχεδιασμό και παραγωγή.

Το κιτ ελέγχου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* περιέχει 96 δοκιμαστικά τεστ που περιγράφονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Επιμέρους στοιχεία του κιτ Neogen Δοκιμής Μοριακής Ανίχνευσης

Είδος	Ταυτοποίηση	Ποσότητα	Περιεχόμενα	Σχόλια
Neogen® Διάλυμα Λύσης (LS)	Ροζ διάλυμα σε διαφανείς δοκιμαστικούς σωλήνες	96 (12 σειρές των 8 δοκιμαστικών σωλήνων)	580 µL LS ανά δοκιμαστικό σωλήνα	Σε στατώ και έτοιμο προς χρήση
Neogen® Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* Δοκιμαστικοί Σωλήνες Αντιδραστηρίων	Κίτρινοι δοκιμαστικοί σωλήνες	96 (12 σειρές των 8 δοκιμαστικών σωλήνων)	Λυοφιλοποιημένο ειδικό μείγμα πολλαπλασιασμού και ανίχνευσης	Έτοιμο προς χρήση
Επιπλέον πώματα	Κίτρινα πώματα	96 (12 σειρές των 8 πωμάτων)		Έτοιμο προς χρήση
Neogen® Έλεγχος Αντιδραστηρίου (RC)	Διαφανείς δοκιμαστικοί σωλήνες με αρθρωτό πώμα	16 (2 σακουλάκια των 8 ατομικών δοκιμαστικών σωλήνων)	Λυοφιλοποιημένος έλεγχος DNA, μείγμα πολλαπλασιασμού και ανίχνευσης	Έτοιμο προς χρήση

Ο Αρνητικός Έλεγχος, που δεν παρέχεται στο κιτ, είναι ένα στείρο μέσο εμπλουτισμού, π.χ. Ζωμός Demi-Fraser. Μη χρησιμοποιείτε νερό ως Αρνητικό Έλεγχο.

Ασφάλεια

Ο χρήστης πρέπει να διαβάσει, να κατανοήσει και να ακολουθήσει όλες τις πληροφορίες ασφαλείας στις οδηγίες για το Neogen Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης και την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes*. Φυλάξτε τις οδηγίες ασφάλειας για μελλοντική αναφορά.

⚠ **ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ:** Υποδεικνύει μια επικίνδυνη κατάσταση, η οποία, εάν δεν αποφευχθεί, ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα θάνατο ή σοβαρό τραυματισμό ή/και υλική ζημιά.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Υποδεικνύει μια δυνητικά επικίνδυνη κατάσταση, η οποία, εάν δεν αποφευχθεί, ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα υλική ζημιά.

⚠ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Μη χρησιμοποιείτε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* για τη διάγνωση καταστάσεων σε ανθρώπους ή ζώα.

Η Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* ενδέχεται να παράξει *Listeria monocytogenes* σε επίπεδα επαρκή για την πρόκληση θνησιγένειας και θνησιμότητας σε εγκύους και άτομα σε ανοσοκαταστολή, σε περίπτωση έκθεσης.

Ο χρήστης πρέπει να εκπαιδεύσει το προσωπικό του στις τρέχουσες κατάλληλες τεχνικές ελέγχου: για παράδειγμα, Καλές Εργαστηριακές Πρακτικές, ISO/IEC 17025[4] ή ISO 7218[5].

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα που οδηγεί στην αποδέσμευση μολυσμένου προϊόντος:

- Ακολουθείτε το πρωτόκολλο και διενεργείτε τους ελέγχους ακριβώς όπως περιγράφεται στις πληροφορίες του προϊόντος.
- Φυλάσσετε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* όπως υποδεικνύεται στη συσκευασία και στις πληροφορίες προϊόντος.
- Χρησιμοποιείτε πάντοτε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* μέχρι την ημερομηνία λήξης της.
- Χρησιμοποιείτε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* για περιβαλλοντικά δείγματα που έχουν επικυρωθεί εσωτερικά ή από τρίτο μέρος.
- Χρησιμοποιείτε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* μόνο για επιφάνειες, αποστειρωτικά μέσα, πρωτόκολλα και βακτηριακά στελέχη που έχουν επικυρωθεί εσωτερικά ή από τρίτο μέρος.

- Για ένα περιβαλλοντικό δείγμα που περιέχει Ρυθμιστικό Διάλυμα Ουδετεροποίησης με αρυλ-σουλφονικό σύμπλοκο, πραγματοποιήστε αραίωση 1:2 πριν τον έλεγχο (1 μέρος δείγματος σε 1 μέρος στείρου ζωμού εμπλουτισμού). Μια άλλη επιλογή είναι να μεταφέρετε 10 µL εμπλουτισμού NB μέσα στους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης. Προϊόντα Συλλογής Δειγμάτων της Neogen® που περιέχουν Ρυθμιστικό Διάλυμα Ουδετεροποίησης με αρυλ-σουλφονικό σύμπλοκο: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G και HS2410NB2G.

Για να μειώσετε τον κίνδυνο που σχετίζεται με την έκθεση σε χημικές ουσίες και βιολογικούς κινδύνους:

- Συστήνεται έντονα το γυναικείο εργαστηριακό προσωπικό να ενημερωθεί σχετικά με τον κίνδυνο για αναπτυσσόμενα έμβρυα που προκύπτει από λοίμωξη της μητέρας μέσω έκθεσης στο *Listeria monocytogenes*.
- Διενεργείτε τον έλεγχο παθογόνων σε κατάλληλα εξοπλισμένο εργαστήριο υπό τον έλεγχο εκπαιδευμένου προσωπικού. Επωασμένα μέσα εμπλουτισμού και εξοπλισμός ή επιφάνειες που έχουν έρθει σε επαφή με επωασμένα μέσα εμπλουτισμού μπορεί να περιέχουν παθογόνα σε επίπεδα επαρκή ώστε να προκαλέσουν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία.
- Τηρείτε πάντοτε τις σύνηθες πρακτικές εργαστηριακής ασφάλειας, όπως χρήση κατάλληλης προστατευτικής ενδυμασίας και προστασίας ματιών, όταν χειρίζεστε αντιδραστήρια και μολυσμένα δείγματα.
- Αποφεύγετε την επαφή με τα περιεχόμενα των μέσων εμπλουτισμού και με τους δοκιμαστικούς σωλήνες αντιδραστηρίου μετά τον πολλαπλασιασμό.
- Απορρίπτετε τα εμπλουτισμένα δείγματα σύμφωνα με τα τρέχοντα πρότυπα της βιομηχανίας.
- Δείγματα που δεν έχουν υποβληθεί στην κατάλληλη θερμική επεξεργασία κατά τη διάρκεια του σταδίου λύσης της δοκιμασίας μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανός βιολογικός κίνδυνος και ΔΕΝ πρέπει να εισάγονται στο Neogen Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης.

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με διασταυρούμενη μόλυνση κατά την προετοιμασία της δοκιμασίας:

- Φοράτε πάντοτε γάντια (για την προστασία του χρήστη και την πρόληψη εισαγωγής νουκλεασών).

Για τη μείωση των κινδύνων που σχετίζονται με τη μόλυνση του περιβάλλοντος:

- Ακολουθείτε τα τρέχοντα πρότυπα της βιομηχανίας για την απόρριψη μολυσμένων αποβλήτων.

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με την έκθεση σε καυτά υγρά:

- Μην υπερβαίνετε τη συνιστώμενη ρύθμιση θερμοκρασίας στον θερμαντήρα.
- Μην υπερβαίνετε τον συνιστώμενο χρόνο θέρμανσης.
- Χρησιμοποιείτε ένα κατάλληλο, βαθμονομημένο θερμόμετρο για να επαληθεύσετε τη θερμοκρασία του Neogen® Ένθετου για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρος Μοριακής Ανίχνευσης (π.χ. θερμόμετρο μερικής εμβύθισης ή ψηφιακό θερμόμετρο θερμοστοιχείου, όχι θερμόμετρο ολικής εμβύθισης). Το θερμόμετρο πρέπει να τοποθετείται στην προβλεπόμενη θέση στο Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με διασταυρούμενη μόλυνση κατά την προετοιμασία της δοκιμασίας:

- Αλλάξτε γάντια πριν από την ενυδάτωση των σφαιριδίων αντιδραστηρίου.
- Συνιστάται να χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα, με φραγμό για αερολύματα (με φίλτρο), ρύγχη πιπέτας κατηγορίας μοριακής βιολογίας.
- Χρησιμοποιείτε νέο ρύγχος πιπέτας για κάθε μεταφορά δείγματος.
- Χρησιμοποιείτε Καλές Εργαστηριακές Πρακτικές για τη μεταφορά του δείγματος από τον δοκιμαστικό σωλήνα εμπλουτισμού στον δοκιμαστικό σωλήνα λύσης. Για να αποφευχθεί η μόλυνση της πιπέτας, ο χρήστης μπορεί να επιλέξει να προσθέσει ένα ενδιάμεσο βήμα μεταφοράς. Για παράδειγμα, ο χρήστης μπορεί να μεταφέρει κάθε εμπλουτισμένο δείγμα μέσα σε έναν αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα.
- Χρησιμοποιείτε σταθμό εργασίας μοριακής βιολογίας που να περιέχει μικροβιοκτόνο λυχνία, όπου είναι διαθέσιμη. Απολυμαίνετε περιοδικά τους πάγκους και τον εξοπλισμό του εργαστηρίου (πιπέτες, εργαλεία σφράγισης/αποσφράγισης κτλ.) με διάλυμα οικιακής χλωρίνης 1-5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) ή με διάλυμα απομάκρυνσης DNA.

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με ψευδώς θετικό αποτέλεσμα:

- Μην ανοίγετε ποτέ τους δοκιμαστικούς σωλήνες αντιδραστηρίου μετά τον πολλαπλασιασμό.
- Απορρίπτετε πάντοτε τους μολυσμένους δοκιμαστικούς σωλήνες μουλιάζοντάς τους σε διάλυμα οικιακής χλωρίνης ή αντίστοιχο διάλυμα 1-5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) για 1 ώρα και μακριά από την περιοχή προετοιμασίας της δοκιμασίας.
- Μην κλιβανίσετε ποτέ τους δοκιμαστικούς σωλήνες αντιδραστηρίου μετά τον πολλαπλασιασμό.

Για επιπλέον πληροφορίες συμβουλευθείτε το Φύλλο Δεδομένων Ασφαλείας και τους τοπικούς κανονισμούς σχετικά με την απόρριψη.

Εάν έχετε ερωτήσεις σχετικά με συγκεκριμένες εφαρμογές ή διαδικασίες, παρακαλούμε επισκεφθείτε την ιστοσελίδα www.neogen.com ή επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο ή διανομέα της Neogen.

Ευθύνη του χρήστη

Οι χρήστες είναι υπεύθυνοι να εξοικειωθούν με τις οδηγίες και τις πληροφορίες του προϊόντος. Επισκεφθείτε την ιστοσελίδα μας στο **www.neogen.com** ή επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο ή διανομέα της Neogen για περισσότερες πληροφορίες.

Κατά την επιλογή μίας μεθόδου ελέγχου, είναι σημαντικό να αναγνωρίζετε ότι εξωτερικοί παράγοντες, όπως μέθοδοι δειγματοληψίας, πρωτόκολλα ελέγχου, προετοιμασία και χειρισμός δειγμάτων και η εργαστηριακή τεχνική μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα.

Αποτελεί ευθύνη του χρήστη η επιλογή οποιασδήποτε μεθόδου ή προϊόντος ελέγχου, για να αξιολογήσει έναν επαρκή αριθμό δειγμάτων με κατάλληλα είδη τροφίμων και μικροβιακές προκλήσεις, ώστε η επιλεγμένη μέθοδος να ικανοποιεί τα κριτήρια του χρήστη.

Αποτελεί επίσης ευθύνη του χρήστη να καθορίσει ότι όλες οι μέθοδοι δοκιμασίας και τα αποτελέσματα ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις των πελατών και των προμηθευτών του.

Όπως και με κάθε μέθοδο ελέγχου, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τη χρήση οποιουδήποτε προϊόντος Neogen Food Safety δεν συνιστούν εγγύηση της ποιότητας των σχετικών τροφίμων ή των διαδικασιών που υποβάλλονται σε έλεγχο.

Για να βοηθήσει τους πελάτες να αξιολογήσουν τη μέθοδο για τις διάφορες μήτρες τροφίμων, η Neogen έχει αναπτύξει το κιτ Neogen® Πίνακας Ελέγχου Μοριακής Ανίχνευσης. Όταν χρειάζεται, χρησιμοποιήστε τον Πίνακα Ελέγχου (MC) για να προσδιορίσετε εάν η μήτρα έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει τα αποτελέσματα από την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes*. Ελέγξτε διάφορα δείγματα που είναι αντιπροσωπευτικά της μήτρας, δηλ. δείγματα που λαμβάνονται από διαφορετική προέλευση, κατά τη διάρκεια οποιασδήποτε περιόδου επικύρωσης όταν υιοθετείτε τη μέθοδο της Neogen, ή όταν ελέγχετε νέες ή άγνωστες μήτρες ή μήτρες που έχουν υποβληθεί σε αλλαγές στις πρώτες ύλες ή στην επεξεργασία.

Μια μήτρα μπορεί να οριστεί ως ένας τύπος προϊόντος με ενδογενείς ιδιότητες όπως σύνθεση και επεξεργασία. Οι διαφορές μεταξύ των μητρών μπορεί να είναι απλές, όπως οι επιδράσεις που προκαλούνται από διαφορές στην επεξεργασία ή στην παρουσίασή τους, για παράδειγμα, ακατέργαστο έναντι παστεριωμένου, φρέσκο έναντι αποξηραμένου κτλ.

Περιορισμός εγγυήσεων / Περιορισμένη αποκατάσταση

ΕΚΤΟΣ ΕΑΝ ΔΗΛΩΝΕΤΑΙ ΡΗΤΑ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΕΝΗΣ ΕΓΓΥΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΤΟΜΙΚΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ, Η NEOGEN ΠΑΡΑΙΤΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΡΗΤΕΣ ΚΑΙ ΕΝΝΟΟΥΜΕΝΕΣ ΕΓΓΥΗΣΕΙΣ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΑ ΑΛΛΑ ΟΧΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ, ΟΠΟΙΩΝΔΗΠΟΤΕ ΕΓΓΥΗΣΕΩΝ ΕΜΠΟΡΕΥΣΙΜΟΤΗΤΑΣ Ή ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΜΙΑ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ. Εάν οποιοδήποτε προϊόν Neogen Food Safety είναι ελαττωματικό, η Neogen ή ο εξουσιοδοτημένος διανομέας της, σύμφωνα με την κρίση τους, θα αντικαταστήσουν ή επιστρέψουν την αξία αγοράς του προϊόντος. Αυτοί είναι οι αποκλειστικοί τρόποι αποκατάστασης. Επικοινωνήστε με τον αντιπρόσωπο της Neogen ή τον εξουσιοδοτημένο διανομέα της Neogen για περαιτέρω ερωτήσεις.

Περιορισμός της ευθύνης της Neogen

Η NEOGEN ΔΕΝ ΕΥΘΥΝΕΤΑΙ ΓΙΑ ΟΠΟΙΑΔΗΠΟΤΕ ΑΠΩΛΕΙΑ Ή ΖΗΜΙΑ, ΕΙΤΕ ΑΜΕΣΗ, ΕΜΜΕΣΗ, ΕΙΔΙΚΗ, ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΗ Ή ΑΠΟΘΕΤΙΚΗ ΖΗΜΙΑ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΑ, ΑΛΛΑ ΟΧΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ, ΔΙΑΦΥΓΟΝΤΩΝ ΚΕΡΔΩΝ. Η ευθύνη της Neogen δεν υπερβαίνει σε καμία περίπτωση και υπό καμία νομική θεωρία την αξία αγοράς του προϊόντος που εικάζεται ότι είναι ελαττωματικό.

Αποθήκευση και απόρριψη

Φυλάσσετε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* στους 2-8°C. Μην καταψύχετε. Αποφεύγετε την έκθεση του κιτ στο φως κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Αφού ανοίξετε το κιτ, ελέγξτε ότι το αλουμινένιο σακουλάκι είναι άθικτο. Εάν το αλουμινένιο σακουλάκι έχει υποστεί ζημιά, μην χρησιμοποιήσετε το προϊόν. Μετά το άνοιγμα, οι αχρησιμοποίητοι δοκιμαστικοί σωλήνες αντιδραστηρίων πρέπει πάντοτε να φυλάσσονται στο επανασφραγιζόμενο σακουλάκι με το αφυγραντικό μέσο, ώστε να διατηρείται η σταθερότητα των λυοφιλοποιημένων αντιδραστηρίων. Φυλάσσετε τα επανασφραγισμένα σακουλάκια στους 2-8°C για χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο από 60 ημέρες.

Μην χρησιμοποιείτε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* μετά την ημερομηνία λήξης. Η ημερομηνία λήξης και ο αριθμός παρτίδας επισημαίνονται στην εξωτερική ετικέτα του κουτιού. Μετά τη χρήση, το μέσο εμπλουτισμού και οι δοκιμαστικοί σωλήνες της Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* μπορεί ενδεχομένως να περιέχουν παθογόνα υλικά. Μετά την ολοκλήρωση του ελέγχου, τηρείτε τα τρέχοντα βιομηχανικά πρότυπα για την απόρριψη μολυσμένων αποβλήτων. Για επιπλέον πληροφορίες συμβουλευθείτε το Φύλλο Δεδομένων Ασφαλείας και τους τοπικούς κανονισμούς σχετικά με την απόρριψη.

Οδηγίες χρήσης

Τηρείτε προσεκτικά όλες τις οδηγίες. Η μη τήρηση των οδηγιών μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβή αποτελέσματα.

Απολυμαίνετε περιοδικά τους πάγκους και τον εξοπλισμό του εργαστηρίου (πιπέτες, εργαλεία σφράγισης/αποσφράγισης κτλ.) με διάλυμα οικιακής χλωρίνης 1-5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) ή με διάλυμα απομάκρυνσης DNA.

Ο χρήστης πρέπει να ολοκληρώσει την εκπαίδευση πιστοποίησης χειριστή (OQ) για το Neogen Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης, όπως περιγράφεται στο έγγραφο «Πρωτόκολλα και οδηγίες πιστοποίησης εγκατάστασης (IQ) / πιστοποίησης λειτουργίας (OQ) για το Neogen Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης»[6].

Βλέπε την ενότητα «Ειδικές οδηγίες για επικυρωμένες μεθόδους» για τις ειδικές απαιτήσεις:

Πίνακας 3, για πρωτόκολλα εμπλουτισμού σύμφωνα με AOAC® *Official Method of Analysis℠* **2016.08** και AOAC® *Performance Tested Method℠* Πιστοποιητικό **#081501.**

Πίνακας 4 για τα πρωτόκολλα εμπλουτισμού σύμφωνα με το πιστοποιητικό NF Validation **3M 01/15-09/16**.

Εμπλουτισμός του δείγματος

Οι Πίνακες 2, 3 ή 4 παρουσιάζουν οδηγίες για τον εμπλουτισμό δειγμάτων τροφίμων και περιβαλλοντικών δειγμάτων. Αποτελεί ευθύνη του χρήστη η επικύρωση εναλλακτικών πρωτοκόλλων δειγματοληψίας ή αναλογιών αραίωσης, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι αυτή η μέθοδος ελέγχου πληροί τα κριτήρια του χρήστη.

Τρόφιμα

1. Επιτρέψτε στο μέσο εμπλουτισμού Ζωμός Demi-Fraser (περιλαμβάνει εναμμώνιο κιτρικό σίδηρο) να εξισορροπηθεί σε θερμοκρασία εργαστηριακού περιβάλλοντος.
1. Συνδυάστε άσηπτα το μέσο εμπλουτισμού και το δείγμα, σύμφωνα με τους Πίνακες 2, 3 ή 4. Για όλα τα δείγματα κρέατος και τα δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε σωματιδιακή ύλη, συνιστάται η χρήση ασκών φιλτραρίσματος.
1. Ομογενοποιήστε καλά με ανάμειξη, ομογενοποίηση ή ανάμειξη με το χέρι για 2 ± 0,2 λεπτά. Επωάστε στους 37 ± 1°C σύμφωνα με τους Πίνακες 2, 3 ή 4.
1. Για νωπά γαλακτοκομικά προϊόντα (βλ. Πίνακες 2, 3 ή 4), μεταφέρετε 0,1 mL του πρωτογενούς εμπλουτισμού σε 10 mL Ζωμό Fraser. Επωάστε στους 37 ± 1°C για 20-24 ώρες.

Περιβαλλοντικά δείγματα

Οι συσκευές συλλογής δειγμάτων μπορεί να είναι ένα σφουγγάρι ενυδατωμένο με ένα διάλυμα ουδετεροποίησης για την αδρανοποίηση της επίδρασης των απολυμαντικών. Η Neogen συνιστά τη χρήση σπόγγου κυτταρίνης χωρίς βιοκτόνα. Το διάλυμα ουδετεροποίησης μπορεί να είναι ένας ουδετεροποιητικός ζωμός Dey-Engley (D/E) ή ένας ζωμός Letheen. Συνιστάται η απολύμανση της περιοχής μετά τη δειγματοληψία.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Σε περίπτωση που επιλέξετε να χρησιμοποιήσετε Ουδετεροποιητικό Ρυθμιστικό Διάλυμα (NB) που περιέχει αρυλ-σουλφονικό σύμπλοκο ως ενυδατικό διάλυμα για τον σπόγγο, απαιτείται να πραγματοποιήσετε αραίωση 1:2 (1 μέρος δείγματος σε 1 μέρος στείρου ζωμού εμπλουτισμού) του εμπλουτισμένου περιβαλλοντικού δείγματος πριν από τον έλεγχο, έτσι ώστε να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα που θα μπορούσε να οδηγήσει σε αποδέσμευση μολυσμένου προϊόντος. Μια άλλη επιλογή είναι να μεταφέρετε 10 μL ουδετεροποιητικού ρυθμιστικού διαλύματος εμπλουτισμού μέσα στους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης.

Το προτεινόμενο μέγεθος της περιοχής δειγματοληψίας για επιβεβαίωση της παρουσίας ή απουσίας του παθογόνου στην επιφάνεια είναι τουλάχιστον 100 cm^2 (10 cm x 10 cm ή 4” x 4”). Κατά τη δειγματοληψία με χρήση σπόγγου, καλύψτε ολόκληρη την περιοχή προς δύο κατευθύνσεις (αριστερά προς δεξιά και, στη συνέχεια, επάνω και κάτω) ή συλλέξτε περιβαλλοντικά δείγματα σύμφωνα με το τρέχον πρωτόκολλο δειγματοληψίας σας ή βάσει των οδηγιών FDA BAM[1], USDA FSIS MLG[2] ή ISO 18593[7].

1. Επιτρέψτε στο μέσο εμπλουτισμού Ζωμός Demi-Fraser (περιλαμβάνει εναμμώνιο κιτρικό σίδηρο) να εξισορροπηθεί σε θερμοκρασία εργαστηριακού περιβάλλοντος.
2. Συνδυάστε άσηπτα το μέσο εμπλουτισμού και το δείγμα, σύμφωνα με τους Πίνακες 2, 3 ή 4.
3. Ομογενοποιήστε καλά με ανάμειξη, ομογενοποίηση ή ανάμειξη με το χέρι για 2 ± 0,2 λεπτά. Επωάστε στους 37 ± 1°C για 24-30 ώρες, σύμφωνα με τους Πίνακες 2, 3 ή 4.

Πίνακας 2: Γενικά πρωτόκολλα εμπλουτισμού στους 37 ± 1°C με χρήση Ζωμού Demi-Fraser και Ζωμού Fraser, βάσει των απαιτήσεων.

Πίνακας δειγμάτων	Μέγεθος δείγματος	Όγκος ζωμού εμπλουτισμού (mL)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)
Επεξεργασμένα με θερμότητα, μαγειρεμένα, αλίπαστα κρεατικά, πουλερικά, θαλασσινά και ψάρια Επεξεργασμένα με θερμότητα / παστεριωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα Λαχανικά Πολυ-τμηματικά τρόφιμα	25 g	225	24-30
Περιβαλλοντικά δείγματα[α]	1 σπόγγος	100 ή 225	24-30
	1 μάκτρο	10	24-30
Νωπά κρέατα, πουλερικά, θαλασσινά, ψάρια	25 g	475	28-32

Πίνακας δειγμάτων	Πρωτογενής εμπλουτισμός (Ζωμός Demi-Fraser)[α]			Δευτερογενής εμπλουτισμός (Ζωμός Fraser)[α]			Όγκος ανάλυσης δείγματος[β]
	Μέγεθος δείγματος	Όγκος ζωμού εμπλουτισμού (mL)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)	Μέγεθος δείγματος	Θερμοκρασία εμπλουτισμού (°C)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)	
Νωπά γαλακτοκομικά προϊόντα	25 g	225	20-24	Μεταφέρετε 0,1 mL σε 10 mL Ζωμό Fraser	37 ± 1	20-24	10 μL

(α) Ο Ζωμός Demi-Fraser και ο Ζωμός Fraser πρέπει πάντα να συμπληρώνονται με συμπλήρωμα Ζωμού Fraser (εναμμώνιος κιτρικός σίδηρος) κατά τη διάρκεια πρωτογενή ή δευτερογενή εμπλουτισμού.

(β) Όγκος δείγματος μεταφερόμενου σε δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης. Ανατρέξτε στο βήμα 4.6 της ενότητας «Λύσης».

Ειδικές οδηγίες για επικυρωμένες μεθόδους

AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2016.08

AOAC® *Performance Tested Method℠* #081501

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 081501

Στα προγράμματα του AOAC Research Institute OMA[SM] και PTM[SM], η Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* βρέθηκε ότι αποτελεί αποτελεσματική μέθοδο για την ανίχνευση του *Listeria monocytogenes*. Οι μήτρες που ελέγχθηκαν στη μελέτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Πρωτόκολλα εμπλουτισμού με χρήση Ζωμού Demi-Fraser(α) στους 37 ± 1°C σύμφωνα με AOAC OMA[SM] 2016.08 και PTM[SM] Πιστοποιητικό #081501.

Πίνακας δειγμάτων		Μέγεθος δείγματος	Όγκος ζωμού εμπλουτισμού (mL)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)
Χοτ ντογκ βόειου κρέατος, queso fresco, παγωτό βανίλια, τυρί κότατζ με 4% λιπαρά γάλακτος, πλήρες σοκολατούχο γάλα 3%, μαρούλι ρωμάνα, φρέσκο σπανάκι σε σακούλα, ψυχρά καπνιστός σολομός		25 g	225	24-30
Νωπό κοτόπουλο		25 g	475	28-32
Γαλοπούλα ντελικατέσεν		125 g	1125	24-30
Πεπόνι(β)		Ολόκληρο πεπόνι	Αρκετός όγκος προκειμένου να επιπλέει το πεπόνι	26-30
Περιβαλλοντικά δείγματα:	Ανοξείδωτος χάλυβας	1 σπόγγος	225	24-30
	Στεγανοποιημένο σκυρόδεμα	1 σπόγγος	100	24-30
	Πλαστικό(γ)	1 μάκτρο	10	24-30

Όλα τα δείγματα για την επικύρωση AOAC ομογενοποιήθηκαν με ομογενοποίηση εκτός εάν σημειώνεται άλλως.

(α) Ο Ζωμός Demi-Fraser και ο Ζωμός Fraser πρέπει πάντα να συμπληρώνονται με συμπλήρωμα Ζωμού Fraser (εναμμώνιος κιτρικός σίδηρος) κατά τη διάρκεια πρωτογενή ή δευτερογενή εμπλουτισμού.

(β) Ομογενοποιήστε το δείγμα με ανάμειξη με το χέρι.

(γ) Ομογενοποιήστε το δείγμα με αναδευτήρα.

NF VALIDATION από την AFNOR Certification

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη λήξη της επικύρωσης, παρακαλούμε ανατρέξτε στο πιστοποιητικό NF VALIDATION που διατίθεται στον ιστότοπο που αναφέρεται παραπάνω.

Μέθοδος πιστοποίησης NF VALIDATION σύμφωνα με το πρότυπο ISO 16140-2(6) σε σύγκριση με το πρότυπο ISO 11290(3)
Πεδίο εγκυρότητας: Όλα τα δείγματα ανθρώπινων τροφίμων και περιβαλλοντικά δείγματα (εκτός δειγμάτων πρωτογενούς παραγωγής)
Προετοιμασία δείγματος: Τα δείγματα πρέπει να προετοιμάζονται σύμφωνα με τα πρότυπα EN ISO 11290-1(3) και EN ISO 6887(8)
Έκδοση λογισμικού: Βλ. πιστοποιητικό

Πίνακας 4: Πρωτόκολλα εμπλουτισμού σύμφωνα με πιστοποιημένη από την NF VALIDATION μέθοδο 3M 01/15-09/16 στους 37 ± 1°C με χρήση Ζωμού Demi-Fraser και Ζωμού Fraser βάσει των απαιτήσεων.

Γενικό πρωτόκολλο	Μέγεθος δείγματος	Όγκος ζωμού εμπλουτισμού (mL)	Θερμοκρασία εμπλουτισμού (±1°C)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)	Όγκος ανάλυσης δείγματος[α]	Αποδεκτό σημείο παρέμβασης
Όλα τα δείγματα τροφίμων (εκτός νωπών κρεάτων, νωπών θαλασσινών και νωπών γαλακτοκομικών προϊόντων)	25 g	225	37	24-30	20 µL	• Ζωμός Demi-Fraser έως 72 ώρες • Διαδικασία λύματος στους -20°C • Διαδικασία λύματος στους 4°C έως 72 ώρες
Περιβαλλοντικά δείγματα	25 g, 1 μάκτρο ή 1 μαντηλάκι					

Ειδικό πρωτόκολλο	Πρωτογενής εμπλουτισμός (Ζωμός Demi-Fraser)[β]				Δευτερογενής εμπλουτισμός (Ζωμός Fraser)[β]				Αποδεκτό σημείο παρέμβασης
	Μέγεθος δείγματος	Όγκος ζωμού εμπλουτισμού (mL)	Θερμοκρασία εμπλουτισμού (±1°C)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)	Μέγεθος δείγματος	Θερμοκρασία εμπλουτισμού (±1°C)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)	Όγκος ανάλυσης δείγματος[γ]	
Νωπά κρέατα, νωπά θαλασσινά και νωπά γαλακτοκομικά προϊόντα	25 g	225	37	20-24	Μεταφέρετε 0,1 mL σε 10 mL Ζωμό Fraser	37	20-24	10 µL	• Ζωμός Fraser έως 72 ώρες • Διαδικασία λύματος στους -20°C • Διαδικασία λύματος στους 4°C έως 72 ώρες

(α) Όγκος δείγματος μεταφερόμενου σε δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης. Ανατρέξτε στο βήμα 4.6 της ενότητας «Λύσης».

(β) Ο Ζωμός Demi-Fraser και ο Ζωμός Fraser πρέπει πάντα να συμπληρώνονται με συμπλήρωμα Ζωμού Fraser (εναμμώνιος κιτρικός σίδηρος) κατά τη διάρκεια πρωτογενή ή δευτερογενή εμπλουτισμού.

(γ) Όγκος δείγματος μεταφερόμενου σε δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης. Ανατρέξτε στο βήμα 4.6 της ενότητας «Λύσης».

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Δείγματα μεγαλύτερα των 25 g δεν έχουν ελεγχθεί στη μελέτη NF Validation.

Προετοιμασία του Neogen® Δίσκου Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης

1. Βρέξτε ένα πανί με διάλυμα οικιακής χλωρίνης ή αντίστοιχο διάλυμα 1-5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) και σκουπίστε τον Neogen® Δίσκο Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης.
2. Ξεπλύνετε τον Neogen Δίσκο Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης με νερό.
3. Χρησιμοποιήστε μια πετσέτα μίας χρήσης για να στεγνώσετε τον Neogen Δίσκο Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης.
4. Διασφαλίστε ότι ο Neogen Δίσκος Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης είναι στεγνός πριν τη χρήση.

Προετοιμασία του Neogen® Ένθετου Υποδοχής Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης

Τοποθετήστε την Neogen® Υποδοχή Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης απευθείας στον εργαστηριακό πάγκο. Χρησιμοποιήστε την υποδοχή ψύξης σε εργαστηριακή θερμοκρασία περιβάλλοντος (20-25°C).

Προετοιμασία του Neogen® Ένθετου για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρος Μοριακής Ανίχνευσης

Τοποθετήστε το Neogen® Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης σε μια διπλή μονάδα υποδοχής σωλήνων ξηρής θέρμανσης. Ενεργοποιήστε τη μονάδα ξηρής θέρμανσης και ρυθμίστε τη θερμοκρασία για να επιτρέψετε στο Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης να φθάσει και να διατηρήσει θερμοκρασία 100 ± 1°C.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Ανάλογα με τη μονάδα θέρμανσης, αφήστε το Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης να φθάσει στην κατάλληλη θερμοκρασία για περίπου 30 λεπτά. Χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο, βαθμονομημένο θερμόμετρο (π.χ. θερμόμετρο μερικής εμβύθισης ή ψηφιακό θερμόμετρο θερμοστοιχείου, **όχι** θερμόμετρο ολικής εμβύθισης) τοποθετημένο στην καθορισμένη θέση, επαληθεύστε ότι το Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης βρίσκεται στους 100 ± 1°C.

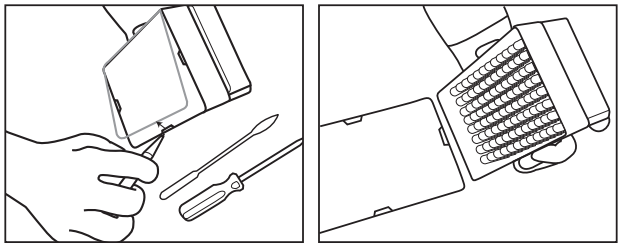
Προετοιμασία του Neogen® Οργάνου Μοριακής Ανίχνευσης

1. Εκκινήστε το Neogen® Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης και συνδεθείτε. Επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο της Neogen Food Safety ώστε να διασφαλίσετε ότι διαθέτετε την τελευταία έκδοση του λογισμικού.
2. Ενεργοποιήστε το Neogen Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης.
3. Δημιουργήστε ή επεξεργαστείτε μια διαδικασία με δεδομένα για κάθε δείγμα. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του Neogen Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης για λεπτομέρειες.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το Neogen Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης πρέπει να φθάσει σε κατάσταση Ετοιμότητας προτού εισαχθεί ο Neogen Δίσκος Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης με τους δοκιμαστικούς σωλήνες αντίδρασης. Αυτό το στάδιο θέρμανσης διαρκεί περίπου 20 λεπτά και υποδεικνύεται με ένα ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ φως στη γραμμή κατάστασης του συστήματος. Όταν το σύστημα είναι έτοιμο για να ξεκινήσει μια διαδικασία, η γραμμή κατάστασης θα γίνει ΠΡΑΣΙΝΗ.

Λύση

Αφαιρέστε τον πυθμένα του στατώ Neogen Διαλύματος Λύσης με ένα κατσαβίδι ή μια σπάτουλα πριν το τοποθετήσετε στο Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης.



1. Αφήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες διαλύματος λύσης (Neogen Διάλυμα Λύσης) να θερμανθούν αφήνοντας το στατώ σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) κατά τη διάρκεια της νύχτας (16-18 ώρες). Εναλλακτικές λύσεις για την εξισορρόπηση των δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης σε θερμοκρασία δωματίου είναι να αφήσετε τους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης επάνω στον πάγκο του εργαστηρίου για τουλάχιστον 2 ώρες, να επωάσετε τους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης σε επωαστήρα 37 ± 1°C για 1 ώρα ή να τους τοποθετήσετε σε διπλή μονάδα υποδοχής σωλήνων ξηρής θέρμανσης για 30 δευτερόλεπτα στους 100°C.
2. Αναστρέψτε τους πωματισμένους δοκιμαστικούς σωλήνες για να αναμίξετε. Προχωρήστε στο επόμενο στάδιο εντός 4 ωρών.
3. Βγάλτε τον ζωμό εμπλουτισμού από τον επωαστήρα.
4. Απαιτείται ένας δοκιμαστικός σωλήνας Neogen Διαλύματος Λύσης για κάθε δείγμα και δείγμα Αρνητικού Ελέγχου (NC) (στείρο μέσο εμπλουτισμού).
   - 4.1 Οι σειρές των δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης μπορούν να κοπούν στον επιθυμητό αριθμό δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης. Επιλέξτε τον αριθμό των μεμονωμένων δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης ή τις απαιτούμενες σειρές των 8 δοκιμαστικών σωλήνων. Τοποθετήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης σε ένα κενό στατώ.
   - 4.2 Για να αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση, αποσφραγίζετε μία σειρά δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης κάθε φορά, και χρησιμοποιείτε νέο ρύγχος πιπέτας για κάθε βήμα μεταφοράς.
   - 4.3 Μεταφέρετε τα εμπλουτισμένα δείγματα στους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης όπως περιγράφεται παρακάτω:

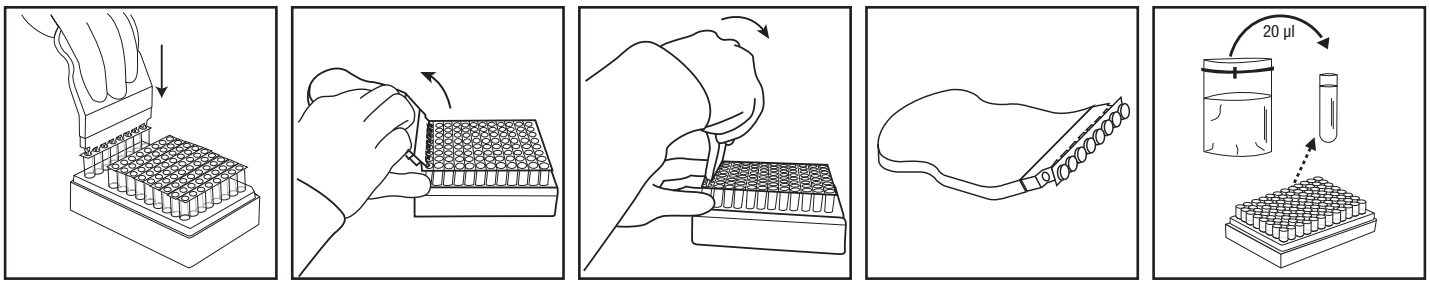
Μεταφέρετε κάθε εμπλουτισμένο δείγμα σε μεμονωμένο σωλήνα Neogen Διαλύματος Λύσης **πρώτα**. Μεταφέρετε τον NC **τελευταίο**.

4.4 Χρησιμοποιήστε το Neogen® Εργαλείο Σφράγισης / Αποσφράγισης – Λύσης Μοριακής Ανίχνευσης για να αποσφραγίσετε μία σειρά δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης – μία σειρά κάθε φορά.

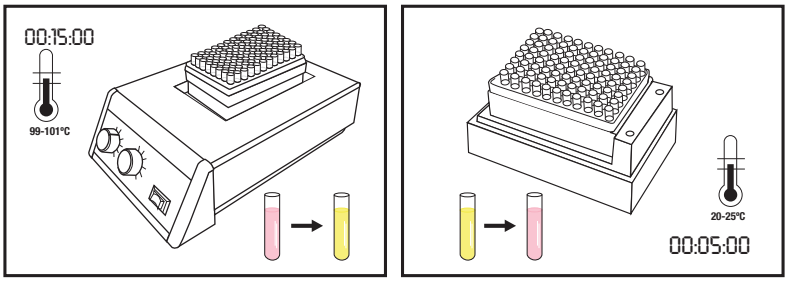
4.5 Απορρίψτε το πώμα του δοκιμαστικού σωλήνα Neogen Διαλύματος Λύσης – Εάν το λύμα πρόκειται να διατηρηθεί για επανέλεγχο, τοποθετήστε τα πώματα μέσα σε ένα καθαρό δοχείο, για εκ νέου εφαρμογή μετά τη λύση.

4.5.1 Για την επεξεργασία του διατηρημένου λύματος, βλ. Παράρτημα Α.

4.6 Μεταφέρετε 20 µL δείγματος μέσα σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Διαλύματος Λύσης, εκτός εάν αναφέρεται διαφορετικά στα Πρωτόκολλα από τους Πίνακες 2, 3 ή 4 (π.χ. νωπά γαλακτοκομικά προϊόντα ή κατά τη χρήση περιβαλλοντικών δειγμάτων με ουδετεροποιητικό ρυθμιστικό διάλυμα, χρησιμοποιείτε 10 µL).



5. Επαναλάβετε τα βήματα 4.4 έως 4.6 μέχρι το κάθε επιμέρους δείγμα να έχει προστεθεί σε έναν αντίστοιχο δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Διαλύματος Λύσης της σειράς.
6. Όταν έχουν μεταφερθεί όλα τα δείγματα, μεταφέρετε 20 µL NC (στείρο μέσο εμπλουτισμού, π.χ. Ζωμός Demi-Fraser) μέσα σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Διαλύματος Λύσης. Μην χρησιμοποιείτε νερό ως NC.
7. Επαληθεύστε ότι η θερμοκρασία του Neogen Ένθετου για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης βρίσκεται στους 100 ± 1°C.
8. Τοποθετήστε το ακάλυπτο στατώ δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης στο Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης και θερμάνετε για 15 ± 1 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της θέρμανσης, το Neogen Διάλυμα Λύσης θα αλλάξει από ροζ (ψυχρό) σε κίτρινο (θερμό).
   8.1 Δείγματα που δεν έχουν υποβληθεί στην κατάλληλη θερμική επεξεργασία κατά τη διάρκεια του σταδίου λύσης της δοκιμασίας μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανός βιολογικός κίνδυνος και ΔΕΝ πρέπει να εισάγονται στο Neogen Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης.
9. Αφαιρέστε το ακάλυπτο στατώ των δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης από το ένθετο θέρμανσης και αφήστε το να κρυώσει στο Neogen Ένθετο Υποδοχής Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης για τουλάχιστον 5 λεπτά και μέγιστο 10 λεπτά. Το Neogen Ένθετο Υποδοχής Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης, όταν χρησιμοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, πρέπει να τοποθετηθεί απευθείας επάνω στον πάγκο του εργαστηρίου. Όταν κρυώσει, το διάλυμα λύσης θα αποκτήσει ξανά ροζ χρώμα.
10. Αφαιρέστε το στατώ των δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης από το Neogen Ένθετο Υποδοχής Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης.



Πολλαπλασιασμός

1. Απαιτείται ένας δοκιμαστικός σωλήνας αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* για κάθε δείγμα και τον NC.
   1.1 Οι σειρές των δοκιμαστικών σωλήνων αντιδραστηρίων μπορούν να κοπούν στον επιθυμητό αριθμό δοκιμαστικών σωλήνων. Επιλέξτε τον απαιτούμενο αριθμό των μεμονωμένων δοκιμαστικών σωλήνων αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* ή τις απαιτούμενες σειρές των 8 δοκιμαστικών σωλήνων.

1.2 Τοποθετήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* σε ένα κενό στατώ.

1.3 Αποφύγετε να διαταράξετε τα σφαιρίδια του αντιδραστηρίου από τον πάτο των δοκιμαστικών σωλήνων.

2. Επιλέξτε 1 δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Έλεγχος Αντιδραστηρίου και τοποθετήστε τον στο στατώ.
3. Για να αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση, αποσφραγίζετε μία σειρά δοκιμαστικών σωλήνων αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* κάθε φορά, και χρησιμοποιείτε νέο ρύγχος πιπέτας για κάθε βήμα μεταφοράς.
4. Μεταφέρετε τα λύματα σε δοκιμαστικούς σωλήνες αντιδραστηρίων Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* και δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Έλεγχος Αντιδραστηρίου, όπως περιγράφεται παρακάτω:

Μεταφέρετε κάθε λύμα δείγματος στους επιμέρους δοκιμαστικούς σωλήνες αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* **πρώτα** και στη συνέχεια τον NC. Ενυδατώστε τον δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Έλεγχος Αντιδραστηρίου **τελευταίο**.

5. Χρησιμοποιήστε το Neogen® Εργαλείο Σφράγισης / Αποσφράγισης – Αντιδραστηρίου Μοριακής Ανίχνευσης για να αποσφραγίσετε τους δοκιμαστικούς σωλήνες αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* – μία σειρά δοκιμαστικού σωλήνα αντιδραστηρίου κάθε φορά. Απορρίψτε το πώμα.

5.1 **Μεταφέρετε 20 µL του λύματος δείγματος από το επάνω ½ του υγρού (αποφύγετε το ίζημα) του δοκιμαστικού σωλήνα Neogen Διαλύματος Λύσης στον αντίστοιχο δοκιμαστικό σωλήνα αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes*. Χορηγήστε υπό γωνία για να αποφύγετε να διαταράξετε τα σφαιρίδια. Αναμίξτε πιπετάροντας προσεκτικά πάνω-κάτω 5 φορές.**

5.2 Επαναλάβετε το βήμα 5.1 μέχρι το επιμέρους λύμα δείγματος να έχει προστεθεί σε έναν αντίστοιχο δοκιμαστικό σωλήνα Αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* στη σειρά.

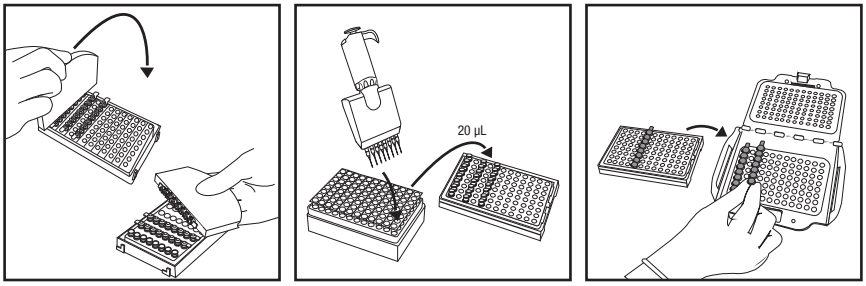
5.3 Καλύψτε τους δοκιμαστικούς σωλήνες αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* με τα παρεχόμενα επιπλέον πώματα και χρησιμοποιήστε τη στρογγυλεμένη πλευρά του Neogen Εργαλείου Σφράγισης / Αποσφράγισης – Αντιδραστηρίου Μοριακής Ανίχνευσης για να ασκήσετε πίεση με μια κίνηση εμπρός-πίσω, διασφαλίζοντας ότι το πώμα έχει εφαρμοστεί σφιχτά.

5.4 Επαναλάβετε τα βήματα 5.1 έως 5.3 όπως απαιτείται, για τον αριθμό των δειγμάτων που είναι προς έλεγχο.

5.5 Όταν έχουν μεταφερθεί όλα τα λύματα δείγματος, επαναλάβετε το βήμα 5.1 για να μεταφέρετε 20 µL του λύματος NC μέσα σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes*.

5.6 Μεταφέρετε **20 µL του <u>λύματος NC</u> μέσα σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Έλεγχος Αντιδραστηρίου**. Χορηγήστε υπό γωνία για να αποφύγετε να διαταράξετε τα σφαιρίδια. Αναμίξτε πιπετάροντας προσεκτικά πάνω-κάτω 5 φορές.

6. Φορτώστε τους σφραγισμένους δοκιμαστικούς σωλήνες σε έναν καθαρό και απολυμασμένο Neogen Δίσκο Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης. Κλείστε και ασφαλίστε το καπάκι του Neogen Δίσκου Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης.



7. Επιθεωρήστε και επιβεβαιώστε τη διαμορφωμένη διαδικασία μέσα στο λογισμικό του Neogen Συστήματος Μοριακής Ανίχνευσης.
8. Κάντε κλικ στο κουμπί Έναρξη στο λογισμικό και επιλέξτε το όργανο που θα χρησιμοποιηθεί. Το καπάκι του επιλεγμένου οργάνου ανοίγει αυτόματα.
9. Τοποθετήστε τον Neogen Δίσκο Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης μέσα στο Neogen Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης και κλείστε το καπάκι για να ξεκινήσετε τη δοκιμασία. Τα αποτελέσματα παρέχονται εντός 75 λεπτών, αν και τα θετικά μπορεί να ανιχνευθούν νωρίτερα.

10. Αφού ολοκληρωθεί η δοκιμασία, αφαιρέστε τον Neogen Δίσκο Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης από το Neogen Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης και απορρίψτε τους δοκιμαστικούς σωλήνες μουλιάζοντάς τους σε διάλυμα οικιακής χλωρίνης ή αντίστοιχο διάλυμα 1-5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) για 1 ώρα και μακριά από την περιοχή προετοιμασίας της δοκιμασίας.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Για την ελαχιστοποίηση του κινδύνου ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων λόγω διασταυρούμενης μόλυνσης, ποτέ μην ανοίγετε τους δοκιμαστικούς σωλήνες αντιδραστηρίων που περιέχουν πολλαπλασιασμένο DNA. Αυτό περιλαμβάνει τους δοκιμαστικούς σωλήνες αντιδραστηρίων Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes*, τον δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Έλεγχος Αντιδραστηρίου και τον δοκιμαστικό σωλήνα Πίνακας Ελέγχου. Απορρίπτετε πάντοτε τους σφραγισμένους δοκιμαστικούς σωλήνες αντιδραστηρίων μουλιάζοντάς τους σε διάλυμα οικιακής χλωρίνης ή αντίστοιχο διάλυμα 1-5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) για 1 ώρα και μακριά από την περιοχή προετοιμασίας της δοκιμασίας.

Αποτελέσματα και ερμηνεία

Ένας αλγόριθμος ερμηνεύει την καμπύλη παροχής φωτός που προκύπτει από την ανίχνευση του πολλαπλασιασμού των νουκλεϊνικών οξέων. Τα αποτελέσματα αναλύονται αυτόματα από το λογισμικό και κωδικοποιούνται χρωματικά με βάση το αποτέλεσμα. Ένα Θετικό ή Αρνητικό αποτέλεσμα καθορίζεται μέσω ανάλυσης ενός αριθμού μοναδικών παραμέτρων της καμπύλης. Τα υποθετικά θετικά αποτελέσματα αναφέρονται σε πραγματικό χρόνο, ενώ τα Αρνητικά και τα αποτελέσματα Προς Επιθεώρηση εμφανίζονται μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας.

Τα υποθετικά θετικά δείγματα πρέπει να επιβεβαιώνονται σύμφωνα με τις σύνηθες διαδικασίες λειτουργίας του εργαστηρίου ή ακολουθώντας την κατάλληλη επιβεβαίωση μεθόδου αναφοράς[1, 2, 3], αρχίζοντας με τη μεταφορά από τον πρωτογενή εμπλουτισμό σε δευτερογενή ζωμό εμπλουτισμού (όπου ισχύει) και στη συνέχεια επίστρωση και επιβεβαίωση των απομονώσεων χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες βιοχημικές και οροδιαγνωστικές μεθόδους.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Ακόμα και ένα αρνητικό δείγμα δεν θα δώσει μηδενική ένδειξη, καθώς το σύστημα και τα αντιδραστήρια πολλαπλασιασμού Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* έχουν μια σχετική μονάδα φωτός (RLU) «υπόβαθρου».

Στη σπάνια περίπτωση ασυνήθιστου φωτισμού, ο αλγόριθμος το επισημαίνει ως «Προς Επιθεώρηση».
Η Neogen συνιστά στον χρήστη να επαναλάβει τη δοκιμασία για όλα τα δείγματα Προς Επιθεώρηση. Εάν το αποτέλεσμα συνεχίζει να είναι Προς Επιθεώρηση, προχωρήστε στον έλεγχο επιβεβαίωσης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που προτιμάτε ή όπως καθορίζεται από τους τοπικούς κανονισμούς.

Πίνακας 5: Σύμβολα αποτελεσμάτων για δείγματα και ερμηνεία, όπως παρέχονται από το λογισμικό του Neogen Συστήματος Μοριακής Ανίχνευσης.

Τύπος υποδοχής	Σύμβολο αποτελέσματος υποδοχής	Αποτέλεσμα	Ερμηνεία
Δείγμα		Θετικό	Το δείγμα είναι υποθετικά θετικό για το στοχευόμενο παθογόνο.
Δείγμα		Αρνητικό	Το δείγμα είναι αρνητικό για το στοχευόμενο παθογόνο.
Δείγμα		Ανασταλτικό	Ο πίνακας δειγμάτων ήταν ανασταλτικός για τη δοκιμασία. Ενδέχεται να χρειάζεται εκ νέου εξέταση. Ανατρέξτε στην ενότητα «Αντιμετώπιση προβλημάτων» και τις Πληροφορίες προϊόντος του κιτ δοκιμασίας για περισσότερες πληροφορίες.
Δείγμα		Προς επιθεώρηση	Δεν ήταν δυνατός ο καθορισμός της παρουσίας ή της απουσίας του στοχευόμενου παθογόνου. Ενδέχεται να χρειάζεται εκ νέου εξέταση. Ανατρέξτε στην ενότητα «Αντιμετώπιση προβλημάτων» και τις Πληροφορίες προϊόντος του κιτ δοκιμασίας για περισσότερες πληροφορίες.
Δείγμα		Σφάλμα	Δεν ανιχνεύθηκε βιοφωταύγεια. Ενδέχεται να χρειάζεται εκ νέου εξέταση. Ανατρέξτε στην ενότητα «Αντιμετώπιση προβλημάτων» και τις Πληροφορίες προϊόντος του κιτ δοκιμασίας για περισσότερες πληροφορίες.

Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων σύμφωνα με τη μέθοδο πιστοποίησης NF VALIDATION

Επιλογή 1: Χρησιμοποιώντας το πρότυπο ISO 11290[3], ξεκινώντας από τον εμπλουτισμό Demi-Fraser.

Επιλογή 2: Με απομόνωση σε άγαρ PALCAM ή σε χρωμογόνο άγαρ (O&A) που αποτελεί μέρος μεθόδου

πιστοποίησης NF VALIDATION για την ανίχνευση *Listeria monocytogenes*. Η παρουσία χαρακτηριστικών αποικιών επαρκεί για την επιβεβαίωση της παρουσίας *Listeria monocytogenes*.

Επιλογή 3: Χρησιμοποιώντας ανιχνευτές νουκλεϊνικών οξέων, όπως περιγράφεται στο πρότυπο EN ISO 7218[5], σε απομονωμένες αποικίες, από επιλεκτικό άγαρ (βλ. Επιλογή 1 ή 2).

Επιλογή 4: Χρησιμοποιώντας οποιαδήποτε άλλη μέθοδο πιστοποίησης NF VALIDATION, η αρχή της οποίας πρέπει να διαφέρει από αυτήν της Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes*. Πρέπει να χρησιμοποιείται το πλήρες πρωτόκολλο που περιγράφεται για αυτήν τη δεύτερη μέθοδο επικύρωσης. Όλα τα βήματα πριν από την έναρξη της επιβεβαίωσης πρέπει να είναι κοινά και στις δύο μεθόδους.

Στην περίπτωση ασυμφωνίας των αποτελεσμάτων (υποθετικά θετικά με την εναλλακτική μέθοδο, που δεν έχουν επιβεβαιωθεί με έναν από τους τρόπους που περιγράφονται παραπάνω), το εργαστήριο πρέπει να ακολουθήσει τα απαραίτητα βήματα για να διασφαλίσει την εγκυρότητα του αποτελέσματος που λαμβάνεται.

Στην περίπτωση ασυμφωνίας των αποτελεσμάτων (υποθετικά θετικά με τη Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 – *Listeria monocytogenes* που δεν έχουν επιβεβαιωθεί με έναν από τους τρόπους που περιγράφονται παραπάνω), το εργαστήριο πρέπει να ακολουθήσει τα απαραίτητα βήματα για να διασφαλίσει την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται.

Εάν έχετε ερωτήσεις σχετικά με συγκεκριμένες εφαρμογές ή διαδικασίες, παρακαλούμε επισκεφθείτε την ιστοσελίδα www.neogen.com ή επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο ή διανομέα της Neogen.

Παράρτημα Α. Διακοπή πρωτοκόλλου: Αποθήκευση και επανέλεγχος θερμικά επεξεργασμένων λυμάτων.

1. Για να αποθηκεύσετε ένα θερμικά επεξεργασμένο λύμα, επαναπωματίστε το δοκιμαστικό σωλήνα λύσης με ένα καθαρό πώμα (βλ. «Λύση», 4.5).
2. Αποθηκεύστε στους 4 έως 8°C για έως 72 ώρες.
3. Προετοιμάστε ένα αποθηκευμένο δείγμα για πολλαπλασιασμό αναστρέφοντας 2-3 φορές για να αναμίξετε.
4. Αφαιρέστε το πώμα από τους δοκιμαστικούς σωλήνες.
5. Τοποθετήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες με το αναμεμιγμένο λύμα στο Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης και θερμάνετε στους 100 ± 1°C για 5 ± 1 λεπτά.
6. Αφαιρέστε το στατώ των δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης από το ένθετο θέρμανσης και αφήστε το να κρυώσει στο Neogen Ένθετο Υποδοχής Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης για τουλάχιστον 5 λεπτά και μέγιστο 10 λεπτά.
7. Συνεχίστε το πρωτόκολλο στην ενότητα «Ενίσχυση» που περιγράφεται λεπτομερώς παραπάνω.

Παραπομπές:

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

Επεξήγηση Συμβόλων ετικετών προϊόντων

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

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

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

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

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

FS00867C

NEOGEN

Informacje o produkcie

Molekularny test do wykrywania 2 — *Listeria monocytogenes*

Opis i przeznaczenie produktu

Molekularny test Neogen® do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes stosuje się razem z Systemem do Diagnostyki Molekularnej Neogen® w celu szybkiego i swoistego wykrywania bakterii Listeria monocytogenes w próbkach żywności oraz w wymazach środowiskowych. Molekularny test Neogen do wykrywania wykorzystuje metodę izotermicznej amplifikacji DNA do szybkiego namnażania specyficznych sekwencji kwasów nukleinowych z zachowaniem wysokiej swoistości i czułości, w połączeniu z pomiarem bioluminescencji w celu wykrycia produktów amplifikacji. Domniemane wyniki dodatnie pokazywane są w czasie rzeczywistym, zaś wyniki ujemne wyświetlą się po zakończeniu testu. Domniemane wyniki dodatnie wymagają potwierdzenia preferowaną metodą lub metodą wynikającą z lokalnych przepisów[1, 2, 3].

Molekularny test Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes jest przeznaczony do stosowania w środowisku laboratoryjnym przez specjalistów przeszkolonych w zakresie praktyk laboratoryjnych. Firma Neogen nie udokumentowała zastosowania tego produktu w gałęziach przemysłu innych niż żywność i napoje. Przykładowo firma Neogen nie udokumentowała zastosowania tego produktu do badania próbek wody, leków, kosmetyków, próbek klinicznych ani weterynaryjnych. Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes nie oceniono w przypadku wszystkich możliwych protokołów testowych ani w przypadku wszystkich dostępnych szczepów bakterii.

Podobnie jak w przypadku wszystkich innych metod badawczych, skład i jakość podłoża wykorzystanego podczas etapu przednamnażania mogą mieć wpływ na otrzymywane wyniki. Czynniki takie jak metody pobierania próbek, protokoły przeprowadzania badań, przygotowanie próbki, postępowanie i techniki laboratoryjne również mogą wpłynąć na wynik badania. Firma Neogen zaleca ocenienie metody wykorzystującej podłoże przednamnażające w środowisku użytkownika, stosując wystarczającą liczbę próbek konkretnej żywności oraz próbek problematycznych pod względem rozwoju drobnoustrojów, aby zapewnić, że dana metoda spełnia potrzeby użytkownika.

Firma Neogen dokonała oceny Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 —Listeria monocytogenes z wykorzystaniem bulionu pół-Frasera zawierającego cytrynian amonowo-żelazowy oraz bulionu Frasera zawierającego cytrynian amonowo-żelazowy. Standardowy skład tego podłoża przedstawiono poniżej.

Bulion pół-Frasera — standardowy skład	**(g/l)**	**Bulion Frasera — standardowy skład**	**(g/l)**
Chlorek sodu	20 g	Chlorek sodu	20 g
Fosforan sodu, dwuzasadowy, bezwodny*	9,6 g	Fosforan sodu, dwuzasadowy, bezwodny*	9,6 g
Ekstrakt wołowy	5,0 g	Ekstrakt wołowy	5,0 g
Trzustkowy hydrolizat kazeiny	5,0 g	Trzustkowy hydrolizat kazeiny	5,0 g
Hydrolizat z tkanki zwierzęcej	5,0 g	Hydrolizat z tkanki zwierzęcej	5,0 g
Ekstrakt drożdżowy	5,0 g	Ekstrakt drożdżowy	5,0 g
Chlorek litu	3,0 g	Chlorek litu	3,0 g
Fosforan potasu, jednozasadowy	1,35 g	Fosforan potasu, jednozasadowy	1,35 g
Eskulina	1,0 g	Eskulina	1,0 g
Akryflawina HCl	0,0125 g	Akryflawina HCl	0,025 g
Kwas nalidyksowy	0,01 g	Kwas nalidyksowy	0,02 g

***** Substytut: Fosforan sodu, dwuzasadowy, diwodzian 12,0 g

Suplement bulionu Frasera

(Składniki na fiolkę o pojemności 10 ml. Jedna fiolka jest dodawana do jednego litra podłoża podstawowego.)

Cytrynian amonowo-żelazowy 0,5 g/10 ml

Ostateczny odczyn pH 7,2 ± 0,2 przy 25°C

Urządzenie Neogen® do diagnostyki molekularnej należy stosować z próbkami poddanymi obróbce cieplnej na etapie lizy, której zadaniem jest zniszczenie organizmów obecnych w próbce. Próbki, które nie przeszły odpowiedniej obróbki cieplnej na etapie lizy, można uznać za potencjalne zagrożenie biologiczne i NIE należy ich umieszczać w Urządzeniu Neogen do diagnostyki molekularnej.

Firma Neogen Food Safety uzyskała certyfikat ISO (Międzynarodowej Organizacji Normalizacyjnej) 9001 dotyczący projektowania i produkcji.

Zestaw testów Molekularny test Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes zawiera 96 testów opisanych w Tabeli 1.

Tabela 1. Elementy zestawu testów Neogen Molekularny test do wykrywania

Element	Charakterystyka	Liczba sztuk	Zawartość	Komentarze
Roztwór lizujący Neogen® (LS)	Różowy roztwór w przezroczystych probówkach	96 (12 pasków z 8 probówkami)	580 µl LS na probówkę	Ustawione w statywie i gotowe do użycia
Probówki reagentowe Molekularnego testu Neogen® do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes	Żółte probówki	96 (12 pasków z 8 probówkami)	Liofilizowana swoista mieszanina do amplifikacji i wykrywania	Gotowe do użycia
Dodatkowe korki	Żółte korki	96 (12 pasków z 8 korkami)		Gotowe do użycia
Kontrola Neogen® reagenta (RC)	Przezroczyste probówki z korkiem zatrzaskowym	16 (2 woreczki po 8 oddzielnych probówek)	Liofilizowane DNA kontrolne, mieszanina do amplifikacji i wykrywania	Gotowe do użycia

Kontrola ujemna, niebędąca częścią zestawu, to jałowe podłoże przednamnażające, np. bulion pół-Frasera. Nie stosować wody jako kontroli ujemnej.

Bezpieczeństwo

Użytkownik powinien dokładnie zapoznać się ze wszystkimi informacjami dotyczącymi bezpieczeństwa zawartymi w instrukcji dotyczącej Systemu do Diagnostyki Molekularnej Neogen oraz Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes i się do nich stosować. Instrukcję bezpieczeństwa należy zachować do przyszłego wykorzystania.

⚠ **OSTRZEŻENIE:** Oznacza niebezpieczną sytuację, której skutkiem, w razie braku podjęcia środków zapobiegawczych, mogą być poważne obrażenia ciała lub śmierć i/lub uszkodzenie mienia.

WAŻNA INFORMACJA: Oznacza potencjalnie niebezpieczną sytuację, której skutkiem, w razie niepodjęcia środków zapobiegawczych, może być uszkodzenie mienia.

⚠ OSTRZEŻENIE

Nie należy stosować Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — *Listeria monocytogenes* do diagnozowania stanu zdrowotnego ludzi ani zwierząt.

Procedura badawcza Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — *Listeria monocytogenes* może wytworzyć zagrożenie bakterią *Listeria monocytogenes* na poziomie wystarczającym do spowodowania ciąży obumarłej i śmierci u kobiet w ciąży oraz osób mających obniżoną odporność w przypadku narażenia na ich działanie tej bakterii.

Obowiązkiem użytkownika jest przeszkolenie personelu w zakresie aktualnych, odpowiednich technik badań: na przykład w zakresie dobrych praktyk laboratoryjnych, ISO/IEC 17025[4], lub ISO 7218[5].

Aby zmniejszyć ryzyko związane z wynikiem fałszywie ujemnym prowadzącym do wydania zanieczyszczonego produktu:

- Należy postępować zgodnie z protokołem i wykonywać testy zgodnie z zaleceniami podanymi w Informacjach o produkcie.
- Molekularny test Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes należy przechowywać w sposób podany na opakowaniu i w informacjach o produkcie.
- Molekularny test Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes należy stosować wyłącznie przed upływem terminu ważności.
- Molekularny test Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes należy stosować w odniesieniu do próbek spożywczych i środowiskowych poddanych walidacji wewnętrznej lub przez osoby trzecie.
- Molekularny test Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes należy stosować wyłącznie w połączeniu z powierzchniami, środkami odkażającymi, protokołami i szczepami bakterii poddanymi walidacji wewnętrznej lub przez osoby trzecie.
- W przypadku próbki środowiskowej zawierającej bufor neutralizujący z kompleksem sulfonianu arylu, przed rozpoczęciem badania należy przygotować roztwór rozcieńczony w stosunku 1:2 (1 część próbki w 1 części jałowego bulionu przednamnażającego). Inną możliwością jest przeniesienie 10 µl buforu neutralizującego po etapie przednamnażania do probówek z roztworem lizującym Neogen. Produkty firmy Neogen® do pobierania próbek, które zawierają bufor neutralizujący z kompleksem sulfonianu arylu: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G i HS2410NB2G.

Aby zmniejszyć ryzyko związane z narażeniem na substancje chemiczne i zagrożenia biologiczne:

- Zaleca się poinformowanie żeńskiego personelu laboratoryjnego o ryzyku związanym z zaburzeniem rozwoju płodu na skutek infekcji u kobiet w ciąży spowodowanej kontaktem z bakteriami Listeria monocytogenes.
- Badania patogenów należy prowadzić w odpowiednio wyposażonym laboratorium pod kontrolą przeszkolonego personelu. Inkubowane podłoże przednamnażające oraz sprzęt lub powierzchnie, które mogły mieć kontakt z inkubowanym podłożem przednamnażającym, mogą zawierać patogeny na poziomie zagrażającym ludzkiemu zdrowiu.

- Należy zawsze przestrzegać standardowych laboratoryjnych praktyk bezpieczeństwa, łącznie z noszeniem odpowiedniej odzieży i okularów ochronnych przy pracy z reagentami i skażonymi próbkami.
- Należy unikać kontaktu z zawartością probówek z podłożem przednamnażającym oraz reagentem po amplifikacji.
- Przednamnożone próbki należy utylizować zgodnie z obowiązującymi normami branżowymi.
- Próbki, które nie przeszły odpowiedniej obróbki cieplnej na etapie lizy, można uznać za potencjalne zagrożenie biologiczne i NIE należy ich umieszczać w Urządzeniu Neogen do diagnostyki molekularnej.

Aby zmniejszyć ryzyko związane z zanieczyszczeniem krzyżowym podczas przygotowania testu:

- Należy zawsze nosić rękawiczki (aby chronić użytkownika i zapobiegać wprowadzaniu nukleaz).

Aby ograniczyć ryzyko związane z zanieczyszczeniem środowiska:

- Należy postępować zgodnie z bieżącymi normami branżowymi dotyczącymi utylizacji zanieczyszczonych odpadów.

Aby zmniejszyć ryzyko związane z narażeniem na gorące płyny:

- Nie przekraczać zalecanych ustawień temperatury w bloku grzewczym.
- Nie przekraczać zalecanego czasu ogrzewania.
- Stosować odpowiedni, skalibrowany termometr do potwierdzenia poprawności temperatury wkładu Neogen® do bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej (np. termometr zanurzeniowy zanurzany częściowo lub cyfrowy termometr z termoogniwem, ale nie termometr zanurzeniowy zanurzany całkowicie). Termometr należy umieścić w wyznaczonym miejscu Wkładki Neogen bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej.

WAŻNA INFORMACJA

Aby zmniejszyć ryzyko związane z zanieczyszczeniem krzyżowym podczas przygotowania testu:

- Zmienić rękawiczki przed nawodnieniem osadu reagenta.
- Zaleca się stosowanie jałowych końcówek pipet do biologii molekularnej z (filtrowaną) barierą aerozolową.
- Do każdego przeniesienia próbki używać nowej końcówki pipety.
- Przy przenoszeniu próbek z probówki przednamnażania do probówki lizującej należy przestrzegać zasad dobrej praktyki laboratoryjnej. Aby uniknąć skażenia pipetora, użytkownik może zdecydować się dodać etap transferu pośredniego. Przykładowo można przenieść przednamnożoną próbkę do jałowej probówki.
- W miarę możliwości należy używać stanowiska badawczego biologii molekularnej z lampą bakteriobójczą. Należy okresowo dezynfekować stoły i sprzęt laboratoryjny (pipety, narzędzia do zakładania/zdejmowania korków itp.) za pomocą 1–5% (obj./obj., wodnego) roztworu domowego wybielacza lub roztworu do usuwania DNA.

Aby ograniczyć ryzyko związane z wynikiem fałszywie dodatnim:

- Nie otwierać probówek reagenta po procesie amplifikacji.
- Zanieczyszczone probówki należy utylizować zanurzając je w 1–5% (obj./obj., wodnym) roztworze domowego wybielacza lub jego odpowiednika przez 1 godzinę i wynosząc poza obszar przygotowania testów.
- Nie umieszczać probówek reagenta w autoklawie po procesie amplifikacji.

Dodatkowe informacje oraz lokalne przepisy dotyczące utylizacji zawiera karta charakterystyki produktu.

W przypadku pytań dotyczących konkretnych zastosowań lub procedur należy odwiedzić stronę www.neogen.com lub skontaktować się z lokalnym przedstawicielem lub dystrybutorem firmy Neogen.

Obowiązki użytkownika

Użytkownicy są zobowiązani do zapoznania się z instrukcjami oraz informacjami o produkcie. W celu uzyskania dalszych informacji należy odwiedzić stronę internetową **neogen.com** lub skontaktować się z lokalnym przedstawicielem lub dystrybutorem firmy Neogen.

Przy wyborze metody testowania należy pamiętać, że takie czynniki zewnętrzne jak metody próbkowania, protokoły testowania, przygotowanie próbki, dalsze postępowanie i technika laboratoryjna mogą wpływać na uzyskiwane wyniki.

Obowiązkiem użytkownika przy wyborze jakiejkolwiek metody testowania lub produktu jest poddanie ocenie dostatecznej liczby próbek z właściwymi macierzami i z uwzględnieniem zagrożeń powodowanych przez mikroorganizmy, tak aby zastosowana metoda mogła spełnić oczekiwania użytkownika i ustalone przez niego kryteria.

Obowiązkiem użytkownika jest również dopilnowanie, aby zastosowane metody testowania i uzyskane wyniki spełniały wymagania klienta i dostawcy.

Podobnie jak w przypadku każdej metody testowania wyniki uzyskiwane za pomocą produktu firmy Neogen Food Safety nie stanowią gwarancji jakości testowanych macierzy ani procesów.

Aby pomóc klientom ocenić metodę różnych macierzy spożywczych, firma Neogen opracowała zestaw Kontroli Neogen® macierzy do diagnostyki molekularnej. W razie potrzeby należy użyć zestawu Kontroli macierzy (MC) do ustalenia, czy dana matryca badawcza może wpływać na wyniki Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes. Należy przetestować kilka próbek reprezentujących daną matrycę badawczą, czyli na przykład próbki pozyskane z różnych źródeł, podczas dowolnego okresu walidacji przy stosowaniu metody firmy Neogen, a także podczas testowania nowych lub nieznanych matryc albo macierzy, które zostały poddane zmianom (w zakresie procesowym lub surowcowym).

Macierz można zdefiniować jako typ produktu o nieodłącznych właściwościach, takich jak skład i proces wytwarzania. Różnice pomiędzy macierzami mogą być łatwo zauważalne, jak np. efekty spowodowane różnicami w procedurach obróbki lub prezentacji, przykładowo surowe lub pasteryzowane, świeże lub suszone itd.

Wyłączenia gwarancji / Ograniczone środki zaradcze

JEŚLI NIE ZOSTAŁO TO WYRAŹNIE OKREŚLONE W ROZDZIALE DOT. OGRANICZONEJ GWARANCJI POJEDYNCZYCH OPAKOWAŃ PRODUKTÓW, FIRMA NEOGEN WYŁĄCZA WSZELKIE GWARANCJE WYRAŹNE I DOROZUMIANE, W TYM MIĘDZY INNYMI WSZELKIE GWARANCJE ZGODNOŚCI Z PRZEZNACZENIEM I PRZYDATNOŚCI DO OKREŚLONEGO CELU. W razie wad jakiegokolwiek produktu firmy Neogen Food Safety firma Neogen lub jej autoryzowany dystrybutor wymieni taki produkt lub, wedle własnego uznania, zwróci koszty zakupu tego produktu. Są to jedyne przysługujące środki zaradcze. W przypadku dalszych pytań prosimy o kontakt z przedstawicielem firmy Neogen lub autoryzowanym dystrybutorem firmy Neogen.

Ograniczenie odpowiedzialności firmy Neogen

FIRMA NEOGEN NIE BĘDZIE ODPOWIEDZIALNA ZA JAKIEKOLWIEK SZKODY ANI STRATY, ZARÓWNO BEZPOŚREDNIE, POŚREDNIE, SZCZEGÓLNE, UBOCZNE LUB NASTĘPCZE, W TYM MIĘDZY INNYMI ZA UTRACONE ZYSKI. W żadnym wypadku odpowiedzialność firmy Neogen z mocy prawa nie może przekroczyć ceny zakupu rzekomo wadliwego produktu.

Przechowywanie i utylizacja

Molekularny test Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes należy przechowywać w temperaturze 2–8°C. Nie zamrażać. Podczas przechowywania chronić zestaw przed światłem. Po otwarciu zestawu należy sprawdzić, czy woreczek foliowy nie jest uszkodzony. Nie używać zestawu, jeżeli woreczek jest uszkodzony. Po otwarciu nieużywane probówki z reagentem należy przechowywać w woreczku wielokrotnego zamknięcia z pochłaniaczem wilgoci wewnątrz, co pozwoli zachować stabilność liofilizowanych reagentów. Ponownie zamknięte woreczki można przechowywać w temperaturze 2–8°C maksymalnie przez 60 dni.

Nie stosować Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes po upływie daty ważności. Data ważności i numer partii podano na zewnętrznej etykiecie pudełka. Po użyciu podłoże przednamnażające i probówki Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes mogą zawierać materiały patogenne. Po zakończeniu badania należy stosować się do aktualnych standardów branżowych dotyczących utylizacji zanieczyszczonych odpadów. Dodatkowe informacje oraz lokalne przepisy dotyczące utylizacji zawiera karta charakterystyki produktu.

Instrukcja użycia

Należy dokładnie przestrzegać wszystkich instrukcji. W przeciwnym razie wyniki mogą być niedokładne.

Należy okresowo dezynfekować stoły i sprzęt laboratoryjny (pipety, narzędzia do zakładania/zdejmowania korków itp.) za pomocą 1–5% (obj./obj., wodnego) roztworu domowego wybielacza lub roztworu do usuwania DNA.

Użytkownik powinien ukończyć szkolenie kwalifikacyjne dla użytkowników Systemu Neogen do diagnostyki molekularnej (OQ), tak jak opisano to w dokumencie „Instrukcje i protokoły dotyczące wymagań instalacji (IQ) / kwalifikacji operacyjnej (OQ) systemu Neogen do diagnostyki molekularnej”[(6)].

Szczegółowe wymagania opisano w części „Specjalne instrukcje dotyczące zatwierdzonych metod”:

Tabela 3 — protokoły przednamnażania według AOAC® Official Method of Analysis℠ **2016.08** oraz AOAC® Performance Tested Method℠, certyfikat nr **081501.**

Tabela 4 — protokoły przednamnażania zgodnie z certyfikatem NF Validation **3M 01/15-09/16.**

Przednamnażanie próbki

W Tabelach 2, 3 lub 4 można znaleźć wytyczne dotyczące ogólnych protokołów przednamnażania próbek spożywczych i środowiskowych. Użytkownik ma obowiązek przeprowadzić walidację alternatywnych protokołów próbkowania lub proporcji roztworów, aby sprawdzić, czy dana metoda badawcza spełnia kryteria określone przez użytkownika.

Żywność

1. Poczekać na zrównoważenie temperatury podłoża przednamnażającego w postaci bulionu pół-Frasera (zawierającego cytrynian amonowo-żelazowy) do temperatury otoczenia w laboratorium.
2. Aseptycznie połączyć podłoże do przednamnażania z próbką zgodnie z Tabelą 2, 3 lub 4. W przypadku wszystkich próbek produktów mięsnych i o wysokiej zawartości cząstek stałych zaleca się stosowanie worków z filtrem.
3. Dokładnie zhomogenizować przez zmieszanie, wytrząsanie lub mieszanie ręczne przez 2 ± 0,2 minuty. Inkubować w temperaturze 37 ± 1°C zgodnie z Tabelą 2, 3 lub 4.
4. W przypadku surowych produktów mlecznych (patrz Tabela 2, 3 lub 4) przenieść 0,1 ml głównego podłoża przednamnażającego do 10 ml bulionu Frasera. Inkubować w temperaturze 37 ± 1°C przez 20–24 godzin.

Próbki środowiskowe

Urządzenia do pobierania próbek mogą być nawadniane gąbką z użyciem roztworu neutralizującego w celu unieszkodliwienia skutków działania środków odkażających. Firma Neogen zaleca stosowanie gąbki celulozowej niezawierającej środków biobójczych. Roztworem neutralizującym może być bulion Dey-Engley (D/E) Neutralizing lub bulion z lecytyną. Po pobraniu próbek zaleca się odkażenie otoczenia.

OSTRZEŻENIE: W przypadku stosowania buforu neutralizującego z kompleksem sulfonianu arylu jako roztwór nawilżający gąbkę, przed rozpoczęciem badania należy przygotować roztwór rozcieńczony w stosunku 1:2 (1 część próbki w 1 części jałowego bulionu przednamnażającego) próbki pochodzącej z przednamnożonego środowiska, aby zmniejszyć ryzyko związane z wynikiem fałszywie ujemnym. Inną możliwością jest przeniesienie 10 µl przednamnożonego buforu neutralizującego do probówek z roztworem lizującym Neogen.

Zalecany rozmiar obszaru próbkowania do weryfikacji obecności lub braku patogenu na powierzchni wynosi co najmniej 100 cm^2 (10 cm × 10 cm lub 4” × 4”). W przypadku pobierania próbki za pomocą gąbki, należy pokryć cały obszar w dwóch kierunkach (od strony lewej do prawej, a następnie z góry do dołu) lub pobrać próbki środowiskowe zgodnie z obowiązującym protokołem próbkowania lub według wytycznych FDA BAM[(1)], USDA FSIS MLG[(2)] lub ISO 18593[(7)].

1. Poczekać na zrównoważenie temperatury podłoża przednamnażającego bulionu pół-Frasera, (zawierającego suplement - cytrynian amonowo-żelazowy) do temperatury otoczenia w laboratorium.
2. Aseptycznie połączyć podłoże do przednamnażania z próbką zgodnie z Tabelą 2, 3 lub 4.
3. Dokładnie zhomogenizować przez zmieszanie, wytrząsanie lub mieszanie ręczne przez 2 ± 0,2 minuty. Inkubować w temperaturze 37 ± 1°C przez 24–30 godzin zgodnie z Tabelą 2, 3 lub 4.

Tabela 2: Ogólne protokoły przednamnażania przy temperaturze 37 ± 1°C z wykorzystaniem bulionu pół-Frasera i bulionu Frasera.

Macierz próbki	Wielkość próbki	Objętość bulionu do przednamnażania (ml)	Czas przednamnażania (godz.)
Poddane obróbce cieplnej, gotowane i peklowane mięsa, drób, owoce morza i ryby Poddane obróbce cieplnej / pasteryzowane produkty mleczne Produkty rolne i warzywa Żywność wieloskładnikowa	25 g	225	24–30
Próbki środowiskowe[(a)]	1 gąbka	100 lub 225	24–30
	1 wacik	10	24–30
Surowe mięso, drób, owoce morza i ryby	25 g	475	28–32

Macierz próbki	Główne podłoże przednamnażające (bulion pół-Frasera)[(a)]			Dodatkowe podłoże przednamnażające (bulion Frasera)[(a)]			Objętość analizowanej próbki[(b)]
	Wielkość próbki	Objętość bulionu do przednamnażania (ml)	Czas przednamnażania (godz.)	Wielkość próbki	Temperatura przednamnażania (°C)	Czas przednamnażania (godz.)	
Surowe produkty mleczne	25 g	225	20–24	Przenieść 0,1 ml do 10 ml bulionu Frasera	37 ± 1	20–24	10 µl

(a) Podczas etapów inkubacji bulion pół-Frasera i bulion Frasera powinny być kompletne i zawierać dedykowany suplement (cytrynian amonowo-żelazowy).

(b) Objętość próbki przenoszona do probówek z roztworem lizującym Neogen. Patrz krok 4.6 w części „Liza".

Specjalne instrukcje dotyczące zatwierdzonych metod

AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2016.08

AOAC® *Performance Tested Method*℠ #081501

W programach AOAC Research Institute OMA℠ oraz PTM℠ Molekularny test Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes okazał się skuteczną metodą wykrywania bakterii Listeria monocytogenes. W Tabeli 3 przedstawiono macierze przetestowane w ramach tego badania.

Tabela 3. Protokoły przednamnażania wykorzystujące bulion pół-Frasera[(a)] w temperaturze 37 ± 1°C zgodnie z metodą AOAC OMA℠ 2016.08 oraz PTM℠, certyfikat nr 081501.

Macierz próbki		Wielkość próbki	Objętość bulionu do przednamnażania (ml)	Czas przednamnażania (godz.)
Hot dogi z wołowiną, świeży ser, lody waniliowe, twaróg o 4% zawartości tłuszczu, mleko pełnotłuste o 3% zawartości czekolady, sałata rzymska, surowy szpinak paczkowany, łosoś wędzony na zimno		25 g	225	24–30
Surowy kurczak		25 g	475	28–32
Indyk peklowany		125 g	1125	24–30
Kantalupa[(b)]		Cały melon	Objętość wystarczająca aby melon mógł się unosić na powierzchni	26–30
Próbki środowiskowe:	Stal nierdzewna	1 gąbka	225	24–30
	Zabezpieczony beton	1 gąbka	100	24–30
	Tworzywo sztuczne[(c)]	1 wacik	10	24–30

Wszystkie próbki w ramach walidacji metodą AOAC były homogenizowane poprzez wytrząsanie, o ile nie określono inaczej.

(a) Podczas etapu przednamnażania stosowane buliony pół-Frasera i Frasera powinny być zawsze kompletne i zawierać dedykowany suplement (cytrynian amonowo-żelazowy).

(b) Próbkę należy zhomogenizować poprzez ręczne mieszanie.

(c) Próbkę należy zhomogenizować poprzez wytrząsanie.

Certyfikacja NF VALIDATION instytutu AFNOR Certification

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

Dodatkowe informacje na temat końca ważności można znaleźć w certyfikacie NF VALIDATION dostępnym na wskazanej powyżej stronie internetowej.

Metoda certyfikowana według NF VALIDATION zgodnie z normą ISO 16140-2[6] w porównaniu z normą ISO 11290[3] Zakres walidacji: Wszystkie próbki produktów żywnościowych przeznaczonych dla ludzi oraz próbki środowiskowe (z wyjątkiem próbek z produkcji pierwotnej)
Przygotowanie próbki: Próbki należy przygotować zgodnie z normą EN ISO 11290-1[3] i EN ISO 6887[8]
Wersja oprogramowania: Patrz certyfikat

Tabela 4: Protokoły przednamnażania zgodnie z metodą certyfikowaną według NF VALIDATION 3M 01/15-09/16 w temperaturze 37 ± 1°C z wykorzystaniem bulionu pół-Frasera i bulionu Frasera.

Ogólny protokół	Wielkość próbki	Objętość bulionu do przednamnażania (ml)	Temperatura przednamnażania (± 1°C)	Czas przednamnażania (godz.)	Objętość analizowanej próbki[a]	Zatwierdzony moment przerwania
Wszystkie próbki spożywcze (z wyjątkiem surowych mięs, surowych owoców morza oraz surowych produktów mlecznych)	25 g	225	37	24–30	20 µl	• Bulion pół-Frasera do 72 godzin • Lizat przy temperaturze -20°C • Lizat przy temperaturze 4°C do 72 godzin
Próbki środowiskowe	25 g, 1 wymazówka lub 1 ściereczka					

Określony protokół	Główne podłoże przednamnażające (bulion pół-Frasera)[b]				Dodatkowe podłoże przednamnażające (bulion Frasera)[b]				Zatwierdzony moment przerwania
	Wielkość próbki	Objętość bulionu do przednamnażania (ml)	Temperatura przednamnażania (± 1°C)	Czas przednamnażania (godz.)	Wielkość próbki	Temperatura przednamnażania (± 1°C)	Czas przednamnażania (godz.)	Objętość analizowanej próbki[c]	
Surowe mięsa, surowe owoce morza oraz surowe produkty mleczne	25 g	225	37	20–24	Przenieść 0,1 ml do 10 ml bulionu Frasera	37	20–24	10 µl	• Bulion Frasera do 72 godzin • Lizat przy temperaturze -20°C • Lizat przy temperaturze 4°C do 72 godzin

(a) Objętość próbki przenoszona do probówek z roztworem lizującym Neogen. Patrz krok 4.6 w części „Liza".

(b) Podczas etapu przednamnażania stosowane buliony pół-Frasera i Frasera powinny być zawsze kompletne i zawierać dedykowany suplement(cytrynian amonowo-żelazowy).

(c) Objętość próbki przenoszona do probówek z roztworem lizującym Neogen. Patrz krok 4.6 w części „Liza".

UWAGA: Próbki o masie przekraczającej 25 g nie były podczas NF Validation.

Przygotowanie Tacy Neogen® urządzenia szybkiego ładowania testów do diagnostyki molekularnej

1. Zmoczyć ściereczkę 1–5% (obj./obj., wodnym) roztworem wybielacza do użytku domowego lub jego odpowiednikiem i przetrzeć nim Tacę Neogen® urządzenia szybkiego ładowania testów do diagnostyki molekularnej.
2. Spłukać wodą Tacę Neogen urządzenia szybkiego ładowania testów do diagnostyki molekularnej.
3. Osuszyć Tacę Neogen urządzenia szybkiego ładowania testów do diagnostyki molekularnej za pomocą jednorazowego ręcznika.
4. Przed rozpoczęciem użytkowania należy sprawdzić, czy Taca Neogen urządzenia szybkiego ładowania testów do diagnostyki molekularnej jest sucha.

Przygotowanie Wkładki Neogen® bloku chłodzenia do diagnostyki molekularnej

Umieścić Tacę Neogen® bloku chłodzenia do diagnostyki molekularnej bezpośrednio na stole laboratoryjnym; użyć wkładu chłodzącego w temperaturze otoczenia w laboratorium (20–25°C).

Przygotowanie Wkładki Neogen® bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej

Wkładkę Neogen® bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej należy umieścić w suchym podwójnym bloku grzewczym. Włączyć suchy blok grzewczy i ustawić temperaturę pozwalającą Wkładce Neogen bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej, osiągnąć i utrzymać temperaturę 100 ± 1°C.

UWAGA: W zależności od typu bloku grzewczego Wkładkę Neogen bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej należy zostawić na około 30 minut, by osiągnąć odpowiednią temperaturę. Używając odpowiedniego, skalibrowanego termometru (przykładowo częściowo zanurzanego termometru lub cyfrowego termometru z termoogniwem, a **nie** całkowicie zanurzanego termometru) umieszczonego w wyznaczonym miejscu, sprawdzić, czy temperatura Wkładki Neogen bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej wynosi 100 ± 1°C.

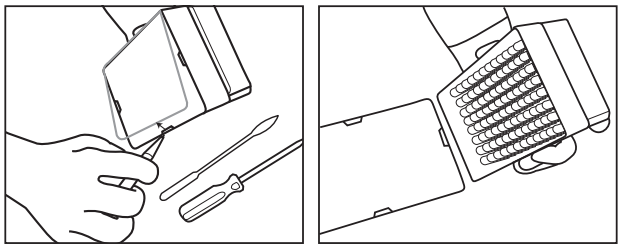
Przygotowanie Urządzenia Neogen® do diagnostyki molekularnej

1. Uruchomić oprogramowanie Systemu Neogen® do diagnostyki molekularnej i zalogować się. Skontaktować się z przedstawicielem Neogen Food Safety, aby upewnić się, że dysponują Państwo najnowszą wersją oprogramowania.
2. Włączyć Urządzenie Neogen do diagnostyki molekularnej.
3. Utworzyć lub edytować serię z danymi dla każdej próbki. Szczegółowe informacje są dostępne w instrukcji obsługi Systemu Neogen do diagnostyki molekularnej.

UWAGA: Przed włożeniem Tacy Neogen urządzenia szybkiego ładowania testów do diagnostyki molekularnej z probówkami reakcyjnymi Urządzenie Neogen do diagnostyki molekularnej musi osiągnąć stan gotowości. Etap nagrzewania trwa około 20 minut i sygnalizuje go POMARAŃCZOWA kontrolka na pasku stanu urządzenia. Kiedy urządzenie będzie gotowe do rozpoczęcia analizy, kolor paska stanu zmieni się na ZIELONY.

Liza

Za pomocą śrubokrętu lub szpatułki wyjąć dolną część stojaka z probówkami z roztworem lizującym Neogen przed umieszczeniem go we Wkładce Neogen bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej.



1. Umożliwić ogrzanie probówek z roztworem lizującym Neogen, pozostawiając stojak w temperaturze pokojowej (20–25°C) na noc (16–18 godzin). Alternatywą dla równoważenia temperatury probówek z roztworem lizującym Neogen do temperatury pokojowej jest pozostawienie probówek z roztworem lizującym Neogen na stole laboratoryjnym na co najmniej 2 godziny, inkubacja probówek z roztworem lizującym Neogen w inkubatorze nastawionym na 37 ± 1°C przez 1 godzinę lub umieszczenie ich w suchym podwójnym bloku grzewczym na 30 sekund w temperaturze 100°C.
2. Odwrócić probówki zamknięte korkiem w celu wymieszania ich zawartości. Przejść do następnego kroku w ciągu 4 godzin.
3. Wyjąć bulion przednamnażający z inkubatora.
4. Dla każdej próbki oraz próbki Kontroli ujemnej (NC) (sterylnego podłoża do przednamnażania) wymagana jest jedna probówka z roztworem lizującym Neogen.

   4.1 Taśmy z probówkami z roztworem lizującym Neogen można dociąć do żądanej liczby probówek z roztworem lizującym Neogen. Zależnie od sytuacji należy dobrać liczbę pojedynczych probówek z roztworem lizującym Neogen lub taśm złożonych z 8 probówek. Umieścić probówki z roztworem lizującym Neogen w pustym stojaku.

   4.2 Aby uniknąć zanieczyszczeń krzyżowych, należy otwierać taśmy z probówkami z roztworem lizującym Neogen pojedynczo i na każdym etapie przenoszenia stosować nową końcówkę pipety.

   4.3 Wzbogaconą próbkę należy przenieść do probówek z roztworem lizującym Neogen w opisany poniżej sposób:

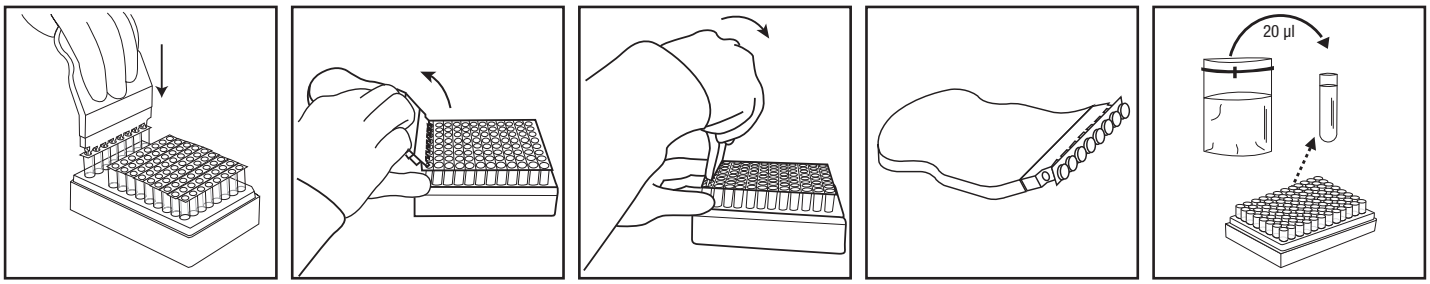
   Na początku przenieść każdą wzbogaconą próbkę do pojedynczej probówki z roztworem lizującym Neogen. **Na końcu** przenieść kontrolę negatywną NC.

   4.4 Do zdejmowania korków taśmy z probówkami z roztworem lizującym Neogen (po jednej taśmie na raz) należy wykorzystać Narzędzie Neogen® do zakładania/zdejmowania korków probówek do diagnostyki molekularnej — Liza.

   4.5 Zdjąć korek probówki z roztworem lizującym Neogen — jeśli lizat ma zostać zachowany do celów ponownego wykonania testu, umieścić korki w czystym pojemniku do ponownego założenia po wykonaniu lizy.

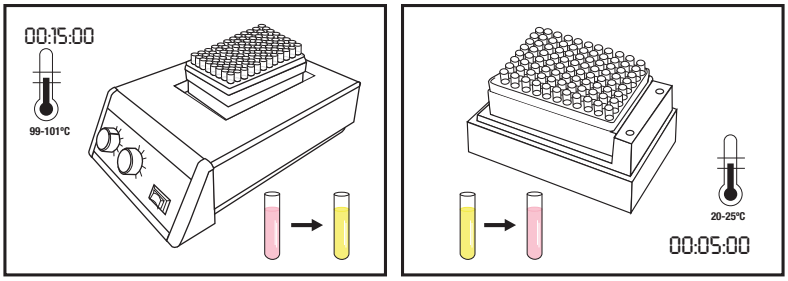
4.5.1 Odnośnie obróbki zachowanego lizatu patrz Załącznik A.

4.6 Przenieść 20 µl próbki do probówki z roztworem lizującym Neogen, jeśli nie określono inaczej w protokołach z Tabeli 2, 3 lub 4 (np. w przypadku surowych produktów mlecznych lub stosowania próbek środowiskowych z buforem neutralizującym użyć 10 µl).



5. Powtarzać kroki od 4.4 do 4.6 do momentu dodania każdej indywidualnej próbki do odpowiedniej probówki z roztworem lizującym Neogen w taśmie.
6. Po przeniesieniu wszystkich próbek przenieść 20 µl kontroli negatywnej NC (jałowe podłoże przednamnażające, np. bulion pół-Frasera) do probówki z roztworem lizującym Neogen. Nie stosować wody jako kontrolę negatywną NC.
7. Upewnić się, że temperatura Wkładki Neogen bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej wynosi 100 ± 1°C.
8. Umieścić odkryty stojak na probówki z roztworem lizującym Neogen we Wkładce Neogen bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej i ogrzewać przez 15 ± 1 min. Podczas ogrzewania roztwór lizujący Neogen zmieni barwę z różowej (chłodny) na żółtą (gorący).

   8.1 Próbki, które nie przeszły odpowiedniej obróbki cieplnej na etapie lizy, można uznać za potencjalne zagrożenie biologiczne i NIE należy ich umieszczać w Urządzeniu Neogen do diagnostyki molekularnej.
9. Wyjąć odkryty stojak z probówkami z roztworem lizującym Neogen z bloku grzewczego i umożliwić schłodzenie we wkładce Neogen bloku chłodzenia do diagnostyki molekularnej przez co najmniej 5 minut, a maksymalnie 10 minut. Wkładka Neogen bloku schładzania do diagnostyki molekularnej powinien znajdować się bezpośrednio na stole laboratoryjnym w temperaturze otoczenia (pokojowej) . Po schłodzeniu roztwór lizujący ponownie przybierze różową barwę.
10. Wyjąć stojak z probówkami z roztworem lizującym Neogen z Wkładki Neogen bloku chłodzenia do diagnostyki molekularnej.

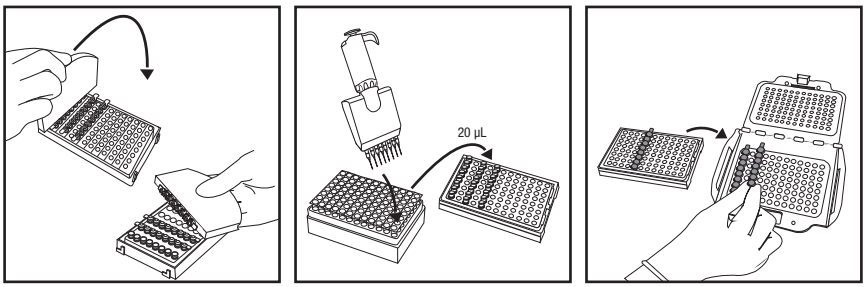


Amplifikacja

1. Dla każdej próbki oraz kontroli negatywnej NC wymagana jest jedna probówka reagentowa Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes.
   1.1 Taśmy z probówkami reagentowymi można dociąć do żądanej liczby probówek. Dobrać wymaganą liczbę pojedynczych probówek reagentowych Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes lub taśm złożonych z 8 probówek.
   1.2 Umieścić probówki reagentowe Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes w pustym stojaku.
   1.3 Nie wolno dopuścić do wstrząśnięcia granulek reagenta na dnie probówek.
2. Wybrać 1 probówkę Kontroli Neogen reagentu i umieścić ją w stojaku.
3. Aby uniknąć zanieczyszczeń krzyżowych, należy otwierać taśmy z probówkami reagentowymi Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes pojedynczo i na każdym etapie przenoszenia stosować nową końcówkę pipety.
4. Przenieść lizat do probówki reagentowej Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes oraz do probówki z Kontrolą Neogen reagentu w sposób opisany poniżej:

Przenieść **najpierw** każdą próbkę lizatu do oddzielnej probówki reagentowej Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes, a następnie przenieść kontrolę negatywną NC. **Na końcu** nawodnić probówkę Kontroli Neogen reagentu.

5. Do zdejmowania korków probówek reagentowych Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes należy wykorzystać Narzędzie Neogen® do zakładania/zdejmowania korków probówek do diagnostyki molekularnej — Reagent, po jednej taśmie na raz. Wyrzucić korek.
   5.1 **Przenieść 20 µl próbki lizatu z górnej części probówki (unikać osadu) z roztworem lizującym Neogen do odpowiedniej probówki reagentowej Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — *Listeria monocytogenes*. Pipetować pod kątem, aby nie dopuścić do wstrząśnięcia granulek. Delikatnie wymieszać, pobierając i wypuszczając roztwór pipetą 5 razy.**
   5.2 Powtarzać krok 5.1, aż wszystkie pojedyncze próbki lizatu zostaną dodane do odpowiednich probówek reagentowych Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes znajdujących się w taśmie.
   5.3 Probówki reagentowe Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes należy zamknąć załączonymi dodatkowymi korkami i za pomocą zaokrąglonej strony Narzędzia Neogen do zakładania/zdejmowania korków probówek do diagnostyki molekularnej — Reagent wywołać nacisk ruchem w przód i w tył, aby upewnić się, że korek został szczelnie nałożony.
   5.4 Kroki od 5.1 do 5.3 należy powtarzać zależnie od potrzeby dla wszystkich próbek poddawanych badaniu.
   5.5 Po przeniesieniu wszystkich próbek lizatu powtórzyć kroki w punkcie 5.1, aby przenieść 20 µl lizatu NC do probówki reagentowej Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes.
   5.6 Przenieść **20 µl <u>lizatu NC</u> do probówki Kontroli Neogen reagentu**. Pipetować pod kątem, aby nie dopuścić do wstrząśnięcia granulek. Delikatnie wymieszać, pobierając i wypuszczając roztwór pipetą 5 razy.
6. Zamknięte korkiem probówki należy umieścić na czystej i odkażonej Tacy Neogen urządzenia szybkiego ładowania testów do diagnostyki molekularnej. Zamknąć i zablokować pokrywę Tacy Neogen urządzenia szybkiego ładowania testów do diagnostyki molekularnej.



7. W oprogramowaniu Systemu Neogen do diagnostyki molekularnej sprawdzić i potwierdzić konfigurację analizy.
8. Kliknąć przycisk Start w programie i wybrać używane urządzenie. Nastąpi automatyczne otwarcie pokrywy wybranego urządzenia.
9. Aby rozpocząć analizę, należy umieścić Tacę Neogen urządzenia szybkiego ładowania testów do diagnostyki molekularnej w Urządzeniu Neogen do diagnostyki molekularnej i zamknąć pokrywę. Na wyniki trzeba poczekać 75 minut, choć wyniki dodatnie można uzyskać wcześniej.
10. Po zakończeniu testu należy wyjąć Tacę Neogen urządzenia szybkiego ładowania testów do diagnostyki molekularnej z Urządzenia Neogen do diagnostyki molekularnej i zutylizować probówki, namaczając je w 1–5% (obj./obj., wodnym) roztworze domowego wybielacza lub jego odpowiedniku przez 1 godzinę i usuwając z obszaru przygotowywania testów.

WAŻNA INFORMACJA: Aby zminimalizować ryzyko otrzymania wyników fałszywie dodatnich w związku z zanieczyszczeniem krzyżowym, nie należy otwierać probówek reagenta zawierających DNA po amplifikacji. Dotyczy to probówek reagentowych Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes, probówek Kontroli Neogen reagentu oraz probówek Kontroli macierzy. Uszczelnione probówki reagentowe należy utylizować, namaczając je w 1–5% (obj./obj., wodnym) roztworze domowego wybielacza lub jego odpowiedniku przez 1 godzinę i wynosząc poza obszar przygotowania testów.

Wyniki i interpretacja

Algorytm interpretuje krzywą strumienia świetlnego powstałego w wyniku wykrycia amplifikacji kwasu nukleinowego. Oprogramowanie prowadzi automatyczną analizę wyników oraz koduje je odpowiednimi kolorami. Wynik dodatni lub ujemny określa się przez analizę wielu określonych niepowtarzalnych parametrów krzywej. Domniemane wyniki dodatnie przekazuje się w czasie rzeczywistym, natomiast wyniki ujemne wyświetlą się po zakończeniu testu.

Domniemane wyniki dodatnie próbek należy potwierdzić zgodnie ze standardowymi procedurami operacyjnymi laboratorium lub stosując odpowiednią referencyjną metodę potwierdzającą[1,2,3], począwszy od transferu z głównego podłoża przednamnażającego do kolejnych bulionów przednamnażających (jeśli dotyczy), a następnie wyizolowanie i potwierdzenie typowych kolonii za pomocą stosownych metod biochemicznych i serologicznych.

UWAGA: Nawet próbka ujemna nie da odczytu zerowego, ponieważ system i odczynniki do amplifikacji Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes charakteryzują się swoistym poziomem tła w RLU.

W rzadkich przypadkach, przy wystąpieniu nietypowego strumienia światła wychodzącego, algorytm opisze je jako „Sprawdzić”. Firma Neogen zaleca powtórzenie testów dla wszystkich próbek oznaczonych jako „Sprawdzić”. Jeżeli utrzymuje się wynik „Sprawdzić”, należy przejść do testu potwierdzającego z zastosowaniem preferowanej metody lub zgodnie z lokalnymi przepisami.

Tabela 5: Symbole wyników dotyczące próbek oraz interpretacja zgodne z oprogramowaniem Systemu Neogen do diagnostyki molekularnej.

Rodzaj studzienki	Symbol wyniku dla studzienki	Wynik	Interpretacja wyników
Próbka		Dodatni	Domniemanie wyniku dodatniego próbki pod kątem docelowego patogenu.
Próbka		Ujemny	Wynik ujemny próbki pod kątem docelowego patogenu.
Próbka		Blokada	Macierz próbki była niedostępna dla testu. Konieczne może być powtórzenie testu. Więcej informacji można znaleźć w części Rozwiązywanie problemów oraz w Informacjach o produkcie.
Próbka		Sprawdzić	Brak możliwości oznaczenia obecności lub braku patogenu docelowego. Konieczne może być powtórzenie testu. Więcej informacji można znaleźć w części Rozwiązywanie problemów oraz w Informacjach o produkcie.
Próbka		Błąd	Nie wykryto bioluminescencji. Konieczne może być powtórzenie testu. Więcej informacji można znaleźć w części Rozwiązywanie problemów oraz w Informacjach o produkcie.

Potwierdzenie wyników zgodnie z certyfikowaną metodą NF VALIDATION

Opcja 1: Zastosowanie normy ISO 11290[3], począwszy od podłoża przednamnażającego w postaci bulionu pół-Frasera.

Opcja 2: Poprzez izolację na agarze PALCAM lub na agarze chromogennym (O&A) będącym częścią metody certyfikowanej NF VALIDATION służącej do wykrywania bakterii Listeria monocytogenes. Obecność charakterystycznych kolonii jest wystarczająca do potwierdzenia wykrycia bakterii Listeria monocytogenes.

Opcja 3: Wykorzystanie sond kwasu nukleinowego w sposób opisany w normie EN ISO 7218[5] zastosowanych na wyizolowanych koloniach z selektywnego agaru (patrz Opcja 1 lub 2).

Opcja 4: Zastosowanie innej metody zgodnie z certyfikatem NF VALIDATION, której zasada musi się różnić od Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes. Należy stosować kompletny protokół opisany dla tej drugiej metody poddanej walidacji. Wszystkie kroki poprzedzające rozpoczęcie potwierdzania muszą być wspólne dla obu metod.

W przypadku niezgodności wyników (domniemany wynik dodatni z zastosowaniem alternatywnej metody, brak potwierdzenia jedną z powyższych metod) laboratorium musi wykonać czynności niezbędne do zapewnienia ważności uzyskanych wyników.

W przypadku niezgodności wyników (domniemany wynik dodatni z zastosowaniem Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 — Listeria monocytogenes, brak potwierdzenia jedną z powyższych metod) laboratorium musi wykonać czynności niezbędne do zapewnienia ważności uzyskanych wyników.

W przypadku pytań dotyczących konkretnych zastosowań lub procedur należy odwiedzić stronę www.neogen.com lub skontaktować się z lokalnym przedstawicielem lub dystrybutorem firmy Neogen.

Załącznik A. Przerwanie protokołu: Przechowywanie i ponowne badanie lizatów poddanych obróbce cieplnej.

1. W celu przechowywania lizatu poddanego obróbce termicznej należy ponownie zamknąć probówkę lizatu czystym korkiem (patrz część „Liza", punkt 4.5).
2. Przechowywać w temp. od 4 do 8°C maksymalnie przez 72 godziny.
3. Przygotować przechowywaną próbkę do amplifikacji przez odwrócenie 2–3 razy w celu zmieszania.
4. Otworzyć probówki.
5. Umieścić wymieszane próbki lizatu we Wkładce Neogen bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej i ogrzewać w temp. 100 ± 1°C przez 5 ± 1 min.
6. Wyjąć stojak z probówkami z roztworem lizującym Neogen z bloku grzewczego i umożliwić schłodzenie we wkładce Neogen bloku chłodzenia do diagnostyki molekularnej przez co najmniej 5 minut, a maksymalnie 10 minut.
7. Kontynuować protokół od etapu Amplifikacji wyszczególnionego powyżej.

Bibliografia:

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

Objaśnienie symboli na etykiecie produktu

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

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

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

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

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

FS00867C

NEOGEN

Дата выпуска: 2024-07

Инструкции к препарату

Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*

Описание продукта и его назначение

Тест-набор «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen® используется вместе с системой молекулярной диагностики Neogen® для быстрого и точного обнаружения *Listeria monocytogenes* в обогащенных пробах пищевых продуктов и окружающей среды. В тест-наборах для молекулярного анализа Neogen используется петлевая изотермическая амплификация для быстрого расширения нуклеотидных последовательностей с высокой точностью и чувствительностью в сочетании с биолюминесценцией для выявления амплификации. Предположительно положительные результаты отображаются в реальном времени, а отрицательные результаты — по завершении анализа. Результаты, которые можно считать положительными, следует подтверждать предпочтительным для вас методом или в соответствии с местными нормативными требованиями[1, 2, 3].

Тест-набор «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen предназначен для применения в лабораторных условиях и должен использоваться специалистами, прошедшими обучение лабораторным методам работы. Компания Neogen документально не подтверждала возможность использования этого продукта в каких-либо отраслях промышленности, кроме отрасли производства продуктов питания и напитков. Например, компания Neogen не подтверждала документально возможность использования этого продукта для анализа проб воды, а также фармацевтических, косметических, клинических или ветеринарных образцов. Работа тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen не оценивалась в отношении всех возможных протоколов анализа, а также всех возможных штаммов бактерий.

Как и в случае применения любого метода анализа, на результаты исследования может повлиять источник, состав и качество обогатительной среды. На результаты исследования могут также повлиять такие факторы, как метод отбора образцов, протоколы анализа, подготовка образцов, обращение с ними, а также методика, применяемая в лаборатории. Чтобы гарантировать соответствие выбранного метода критериям пользователя, компания Neogen рекомендует оценить метод, включая обогатительную среду, непосредственно в лаборатории пользователя с применением достаточного количества образцов, конкретных пищевых продуктов, а также микробных провокационных проб.

Компания Neogen оценивала работу тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen при использовании бульона Фрейзера половинной концентрации, содержащего цитрат железа-аммония, и бульона Фрейзера, содержащего цитрат железа-аммония, по мере необходимости. Ниже приводится стандартный состав этой среды.

Стандартный состав основы бульона Фрейзера половинной концентрации	**(г/л)**	**Стандартный состав основы бульона Фрейзера**	**(г/л)**
Натрия хлорид	20 г	Натрия хлорид	20 г
Натрия фосфат, двухосновный, безводный*	9,6 г	Натрия фосфат, двухосновный, безводный*	9,6 г
Мясной экстракт	5,0 г	Мясной экстракт	5,0 г
Панкреатический гидролизат казеина	5,0 г	Панкреатический гидролизат казеина	5,0 г
Пептический перевар животной ткани	5,0 г	Пептический перевар животной ткани	5,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г	Дрожжевой экстракт	5,0 г
Лития хлорид	3,0 г	Лития хлорид	3,0 г
Калия фосфат, одноосновный	1,35 г	Калия фосфат, одноосновный	1,35 г
Эскулин	1,0 г	Эскулин	1,0 г
Акрифлавин HCl	0,0125 г	Акрифлавин HCl	0,025 г
Налидиксовая кислота	0,01 г	Налидиксовая кислота	0,02 г

***** Замена: Натрия фосфат, двухосновный, двуводный 12,0 г

Добавка к бульону Фрейзера
(Ингредиенты на флакон 10 мл. Один флакон добавляется к одному литру базовой среды.)

Цитрат железа-аммония 0,5 г/10 мл

Конечный уровень pH 7,2 ± 0,2 при 25 °C

Прибор для молекулярной диагностики Neogen® предназначен для использования в сочетании с образцами, прошедшими на этапе лизиса тепловую обработку, которая проводится с целью уничтожения присутствующих в образце организмов. Образцы, которые не прошли надлежащую тепловую обработку на этапе лизиса, могут представлять биологическую опасность. ЗАПРЕЩАЕТСЯ вставлять их в прибор для молекулярной диагностики Neogen.

Процессы разработки и производства Neogen Food Safety прошли проверку и получили сертификат ISO 9001 (Международная организация по стандартизации).

Тест-набор «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen содержит 96 тест-систем, описание которых см. в таблице 1.

Таблица 1. Компоненты тест-набора для молекулярного анализа Neogen

Элемент	Обозначение	Количество	Содержание	Комментарии
Раствор для лизиса (LS) Neogen®	Розовый раствор в прозрачных пробирках	96 (12 пластинок по 8 пробирок на каждой)	580 мкл раствора для лизиса в каждой пробирке	В штативе и готовы к использованию
Neogen® Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes* (пробирки с реактивом)	Желтые пробирки	96 (12 пластинок по 8 пробирок на каждой)	Лиофилизированная смесь для амплификации и обнаружения штаммов	Готовы к использованию
Запасные колпачки	Желтые колпачки	96 (12 пластинок по 8 колпачков на каждой)		Готовы к использованию
Neogen® Контроль реагентов (RC)	Прозрачные пробирки с откидными крышками	16 (2 пакетика по 8 пробирок в каждом)	Лиофилизированный контроль ДНК, смесь для амплификации и обнаружения штаммов	Готовы к использованию

Отрицательный контроль, не входящий в набор, представляет собой стерильную обогатительную среду, например бульон Фрейзера половинной концентрации. Не используйте в качестве отрицательного контроля воду.

Техника безопасности

Прочтите, примите к сведению и соблюдайте все правила техники безопасности, содержащиеся в инструкциях по использованию системы молекулярной диагностики Neogen и тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen. Сохраните инструкции по технике безопасности для использования в дальнейшем.

⚠ **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ!** Указывает на опасную ситуацию, которая, если ее не избежать, может привести к смерти, тяжелой травме и (или) повреждению имущества.

УВЕДОМЛЕНИЕ. Указывает на потенциально опасную ситуацию, которая, если ее не избежать, может привести к повреждению имущества.

⚠ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ!

Не используйте тест-набор «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen для диагностики заболеваний людей и животных.

При использовании методики анализа «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen возможно повышение количества *Listeria monocytogenes* до концентраций, воздействие которых может приводить к рождению мертвого плода, а также к смерти у беременных женщин и лиц с ослабленным иммунитетом.

Пользователь отвечает за обучение персонала надлежащим современным методикам анализа, например описанным в документе «Надлежащая лабораторная практика», ISO/IEC 17025[4] или ISO 7218[5].

Для снижения рисков, связанных с выпуском зараженного продукта вследствие получения ложноотрицательного результата, следуйте изложенным ниже правилам.

- Соблюдайте протокол и выполняйте процедуры анализа в строгом соответствии с инструкциями к препарату.
- Храните тест-набор «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen согласно указаниям на упаковке и в инструкции к продукту.
- Всегда используйте тест-набор «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen до истечения срока годности.
- Используйте тест-набор «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen для исследования образцов продуктов питания и окружающей среды, прошедших внутреннюю или стороннюю проверку.
- Используйте тест-набор «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen только на тех поверхностях, с теми дезинфицирующими средствами, а также в соответствии с теми протоколами и для тех штаммов бактерий, которые прошли внутреннюю или стороннюю проверку.
- Образец среды, содержащий нейтрализующий буферный раствор с арилсульфонатным комплексом, следует перед проверкой разбавить в пропорции 1 : 2 (1 часть образца на 1 часть стерильного обогатительного бульона). Альтернативный вариант — перенести 10 мкл обогатительной среды для нейтрализующего буферного раствора в пробирки с раствором для лизиса Neogen. Средства для забора проб Neogen®, которые содержат нейтрализующий буферный раствор с арилсульфонатным комплексом: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G и HS2410NB2G.

Для снижения риска, связанного с воздействием химических и биологически опасных веществ, следуйте изложенным ниже правилам.

- Настоятельно рекомендуется информировать лабораторный персонал женского пола о риске для развивающегося плода при инфицировании матери в результате контакта с *Listeria monocytogenes*.
- Выполняйте анализ на патогены в оборудованной надлежащим образом лаборатории под контролем обученного персонала. Инкубированные обогатительные среды, а также оборудование или поверхности, которые контактировали с инкубированными обогатительными средами, могут содержать патогены в количестве, достаточном для угрозы здоровью человека.
- Обязательно соблюдайте стандартные лабораторные меры обеспечения безопасности, в том числе используйте защитную одежду и средства защиты глаз при работе с реактивами и загрязненными образцами.
- Избегайте контакта с обогатительной средой и пробирками с реактивом после амплификации.
- Утилизируйте обогащенные образцы в соответствии с действующими отраслевыми стандартами.
- Образцы, которые не прошли надлежащую тепловую обработку на этапе лизиса, могут представлять биологическую опасность. ЗАПРЕЩАЕТСЯ вставлять их в прибор для молекулярной диагностики Neogen.

Для снижения рисков, связанных с перекрестным загрязнением при подготовке образцов для диагностики, следуйте изложенным ниже правилам.

- Обязательно надевайте перчатки (для защиты пользователя и во избежание введения нуклеаз).

Для снижения рисков, связанных с загрязнением окружающей среды, придерживайтесь перечисленных ниже рекомендаций.

- Утилизируйте зараженные отходы в соответствии с действующими отраслевыми стандартами.

Для снижения рисков, связанных с воздействием горячих жидкостей, следуйте приведенным далее правилам.

- Не превышайте рекомендованную температуру в нагревателе.
- Не превышайте рекомендованную продолжительность нагрева.
- Для проверки температуры внутреннего нагревательного блока для молекулярной диагностики Neogen® следует использовать подходящий откалиброванный термометр (например, термометр частичного погружения или термопарный цифровой термометр, но не термометр полного погружения.) Термометр следует вставить в специально отведенное место на внутреннем нагревательном блоке для молекулярной диагностики Neogen.

УВЕДОМЛЕНИЕ

Для снижения рисков, связанных с перекрестным загрязнением при подготовке образцов для диагностики, следуйте изложенным ниже правилам.

- Перед смачиванием осадка реагента меняйте перчатки.
- Рекомендуется использовать стерильные аэрозоль-устойчивые (фильтрующие) наконечники для пипеток, применяемые в молекулярной биологии.
- Для переноса каждого образца используйте пипетку с новым наконечником.
- При переносе образца из обогатительной среды в пробирку с раствором для лизиса придерживайтесь

свода правил «Надлежащие лабораторные практики» (Good Laboratory Practices). Во избежание загрязнения микродозатора можно добавить промежуточный этап переноса. Например, пользователь может переносить каждый обогащенный образец в стерильную пробирку.
- По возможности следует использовать установки для работ в области молекулярной биологии, оборудованные бактерицидными лампами. Периодически проводите дезинфекцию лабораторных столов и оборудования (пипеток, инструментов для запечатывания и распечатывания пробирок и т. д.) с помощью раствора бытового отбеливателя (1–5 % в объемном отношении с водой) или раствора для удаления ДНК.

Для снижения рисков, связанных с ложноположительными результатами, необходимо соблюдать следующие правила.
- Ни в коем случае не открывайте пробирки после амплификации.
- Всегда утилизируйте загрязненные пробирки путем погружения в раствор бытового отбеливателя (1–5 % в объемном соотношении с водой) или аналогичный раствор на 1 час вдали от зоны подготовки материалов для анализа.
- Ни в коем случае не подвергайте пробирки с реактивом автоклавной обработке после амплификации.

Дополнительную информацию и местные нормативные требования в отношении утилизации отходов см. в паспортах безопасности.

Если у вас возникли вопросы по конкретным способам применения или процедурам, посетите наш веб-сайт по адресу www.neogen.com или обратитесь к местному представителю или дистрибьютору компании Neogen.

Ответственность пользователей

Пользователи обязаны ознакомиться с информацией и инструкциями к препарату. Для получения более подробной информации посетите наш веб-сайт по адресу **www.neogen.com** либо свяжитесь с местным представителем или дистрибьютором Neogen.

При выборе метода исследования важно понимать, что на результаты исследования могут влиять внешние факторы, например метод забора проб, протокол исследования, подготовка проб к исследованию, способы обработки проб во время исследования, а также используемое оборудование.

За выбор метода исследования и исследуемого продукта отвечает пользователь, который должен на основании исследования достаточного количества образцов с помощью надлежащих матриц и микробных провокационных проб определить, отвечает ли выбранный метод исследования необходимым ему критериям.

Пользователь также обязан установить, что выбранный им метод анализа, а также полученные результаты отвечают требованиям его клиентов или поставщиков.

Результаты, полученные с помощью продукта Neogen Food Safety (как и при использовании любого другого метода исследований), не гарантируют качество матриц или технологических процессов, подвергавшихся исследованиям.

Чтобы помочь клиентам оценить метод применительно к различным матрицам пищевых продуктов, компания Neogen разработала набор «Контроль матрицы для молекулярной диагностики Neogen®». При необходимости используйте контроль матрицы (МС), чтобы определить, может ли матрица повлиять на результаты анализа с использованием тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen. При внедрении в практику метода Neogen или анализе новых или неизвестных матриц либо матриц, материалы или методы обработки которых подверглись изменениям, проведите выборочный анализ нескольких образцов, характерных для матрицы, т. е. образцов различного происхождения (на любом этапе проверки).

Матрицу можно определить как тип продукта с характерными свойствами, такими как состав и метод обработки. Различия между матрицами могут быть обусловлены просто различиями в их обработке или состоянии (например, сырые или пастеризованные, свежие или высушенные и т. д.).

Ограничение гарантий и средств правовой защиты

ЕСЛИ ИНОЕ ЯВНО НЕ УКАЗАНО В РАЗДЕЛЕ ОБ ОГРАНИЧЕННОЙ ГАРАНТИИ НА ИНДИВИДУАЛЬНОЙ УПАКОВКЕ ПРОДУКТА, NEOGEN НЕ ПРИЗНАЕТ ПРЯМЫЕ ИЛИ КОСВЕННЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА, ВКЛЮЧАЯ, ПОМИМО ПРОЧЕГО, ГАРАНТИИ ТОВАРНОЙ ПРИГОДНОСТИ ИЛИ ПРИГОДНОСТИ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ОПРЕДЕЛЕННЫХ ЦЕЛЯХ. В случае обнаружения в изделии компании Neogen Food Safety дефектов компания Neogen или уполномоченный ею дистрибьютор обязуются по своему усмотрению заменить это изделие или возместить его стоимость. Это единственный способ правовой защиты для вас. По любым дополнительным вопросам обращайтесь к представителю или официальному дилеру Neogen.

Ограничение ответственности компании Neogen

КОМПАНИЯ NEOGEN НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА УЩЕРБ ИЛИ ПОВРЕЖДЕНИЯ, ЯВЛЯЮЩИЕСЯ ПРЯМЫМИ, НЕПРЯМЫМИ, ФАКТИЧЕСКИМИ, СЛУЧАЙНЫМИ ИЛИ КОСВЕННЫМИ, ВКЛЮЧАЯ, ПОМИМО ПРОЧЕГО, УПУЩЕННУЮ ПРИБЫЛЬ. Ответственность компании Neogen ни при каких обстоятельствах и несмотря ни на какие требования не может превышать стоимость изделия.

Хранение и утилизация

Хранить тест-набор «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen при температуре 2–8 °C. Не замораживать. Хранить вдали от воздействия прямых солнечных лучей. После открытия комплекта убедитесь в том, что пакет из фольги не поврежден. Если пакет поврежден, не используйте продукт. Открытые неиспользуемые пробирки с реактивом следует хранить в повторно герметизируемом пакете с влагопоглотителем. Это обеспечивает стабильность лиофилизированных реактивов. Повторно герметизированные пакеты можно хранить при температуре 2–8 °C не более 60 дней.

Не используйте тест-набор «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen по истечении срока годности. Дата истечения срока годности и номер партии указаны на этикетке на наружной поверхности коробки. После применения обогатительная среда и пробирки для проведения анализа с использованием тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen могут содержать патогенные материалы. После завершения анализа следуйте действующим отраслевым стандартам по утилизации зараженных отходов. Дополнительную информацию и местные нормативные требования в отношении утилизации отходов см. в паспортах безопасности.

Инструкции по применению

Строго соблюдайте все инструкции. В противном случае результаты могут быть неточными.

Периодически проводите дезинфекцию лабораторных столов и оборудования (пипеток, инструментов для запечатывания и распечатывания пробирок и т. д.) раствором бытового отбеливателя (1–5 % в объемном соотношении с водой) или раствором для удаления ДНК.

Пользователь должен пройти квалификационное обучение для операторов (OQ) применительно к системе молекулярной диагностики Neogen, как описано в документе «Установочная квалификация (IQ)/рабочая квалификация (OQ): протоколы и инструкции для системы молекулярной диагностики Neogen»[(6)].

Особые требования см. в разделе «Особые инструкции к утвержденным методам»:

таблица 3, «Протоколы обогащения по официальной методике анализа AOAC® *Official Method of Analysis℠* **2016.08** и согласно сертификату AOAC® *Performance Tested Method℠* **№ 081501»;**

таблица 4, «Протоколы обогащения согласно сертификату NF Validation **3M 01/15-09/16**».

Обогащение проб

В таблицах 2, 3 и 4 содержатся инструкции по обогащению проб пищевых продуктов и окружающей среды. За проверку альтернативных протоколов отбора образцов и пропорций разведения для обеспечения соответствия этого метода анализа критериям пользователя отвечает сам пользователь.

Пищевые продукты

1. Доведите обогащающую среду — бульон Фрейзера половинной концентрации (содержит цитрат железа-аммония) — до комнатной температуры.
2. Асептически объедините обогащающую среду и образец в соответствии с таблицами 2, 3 или 4. При анализе любого вида мяса и проб высокодисперсных материалов рекомендуется использовать мешочные фильтры.
3. Тщательно гомогенизируйте материал путем измельчения, растирания или ручного перемешивания в течение 2 ± 0,2 мин. Инкубируйте при 37 ± 1 °C согласно табл. 2, 3 или 4.
4. При анализе сырых молочных продуктов (см. табл. 2, 3 или 4) перенесите 0,1 мл первичной обогатительной среды в 10 мл бульона Фрейзера. Инкубируйте при температуре 37 ± 1 °C в течение 20–24 часов.

Пробы окружающей среды

Забор проб возможен с помощью губки, смоченной нейтрализующим раствором для инактивации дезинфицирующих средств. Компания Neogen рекомендует использовать губку из целлюлозы, не содержащей биоцидов. В качестве нейтрализующего раствора можно использовать нейтрализующий бульон по Ди-Ингли (D/E) или летиновый бульон. После забора пробы рекомендуется продезинфицировать зону ее забора.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ! Если вы решите использовать в качестве гидратирующего раствора для губки нейтрализующий буфер (NB), содержащий арилсульфонатный комплекс, необходимо до анализа развести обогащенный образец окружающей среды в пропорции 1 : 2 (1 часть образца на 1 часть стерильной среды обогащения), чтобы снизить риски, связанные с получением ложноотрицательного результата, которое приведет к выпуску загрязненного продукта. Альтернативный вариант — перенести 10 мкл обогатительной среды для нейтрализующего буферного раствора в пробирки с раствором для лизиса Neogen.

Рекомендуемый размер зоны отбора проб для проверки присутствия либо отсутствия патогена на поверхности — не менее 100 см^2 (10 см x 10 см или 4 дюйма x 4 дюйма). При отборе проб с помощью губки охватывайте всю зону, перемещая губку в двух направлениях (горизонтальном, а затем вертикальном), или берите пробы окружающей среды согласно действующему протоколу отбора проб или согласно рекомендациям FDA BAM[1], USDA FSIS MLG[2] либо ISO 18593[7].

1. Доведите обогащающую среду — бульон Фрейзера половинной концентрации (содержит цитрат железа-аммония) — до комнатной температуры.
2. Асептически объедините обогащающую среду и образец в соответствии с таблицами 2, 3 или 4.
3. Тщательно гомогенизируйте материал путем измельчения, растирания или ручного перемешивания в течение 2 ± 0,2 мин. Инкубируйте при 37 ± 1 °C в течение 24–30 часов согласно табл. 2, 3 или 4.

Таблица 2. Общие протоколы обогащения при 37 ± 1 °C с использованием бульона Фрейзера половинной концентрации и бульона Фрейзера по мере необходимости

Матрица образца	Объем образца	Объем среды для обогащения (мл)	Время обогащения (ч)
Термически обработанные, приготовленные, консервированные мясные продукты, птица, морепродукты и рыба Термически обработанные/ пастеризованные молочные продукты Сельскохозяйственные продукты и овощи Многокомпонентные пищевые продукты	25 г	225	24–30
Пробы окружающей среды[a]	1 губка	100 или 225	24–30
	1 мазок	10	24–30
Сырые мясо, птица, морепродукты, рыба	25 г	475	28–32

Матрица образца	Первичная обогатительная среда (бульон Фрейзера половинной концентрации)[a]			Вторичная обогатительная среда (бульон Фрейзера)[a]			Анализируемый объем пробы[b]
	Объем образца	Объем среды для обогащения (мл)	Время обогащения (ч)	Объем образца	Температура обогащения (°C)	Время обогащения (ч)	
Сырые молочные продукты	25 г	225	20–24	Перенесите 0,1 мл в 10 мл бульона Фрейзера	37 ± 1	20–24	10 мкл

(a) Бульон Фрейзера половинной концентрации или бульон Фрейзера следует всегда дополнять добавкой к бульону Фрейзера (цитратом железа-аммония) при первичном или вторичном обогащении.

(b) Объем образца, переносимый в пробирки с раствором для лизиса Neogen. См. этап 4.6 в разделе о лизисе.

Особые инструкции к утвержденным методам

Официальная методика анализа **AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2016.08**

Проверенная на эффективность методика **AOAC® *Performance Tested Method℠* № 081501**

В исследованиях, проведенных исследовательским институтом AOAC (Ассоциация химиков-аналитиков, работающих в государственных организациях) в рамках программ OMA℠ и PTM℠, методика анализа с использованием тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen была признана эффективной методикой обнаружения *Listeria monocytogenes.* Тестируемые во время исследования матрицы показаны в таблице 3.

Таблица 3. Протоколы обогащения с использованием бульона Фрейзера половинной концентрации[a] при 37 ± 1 °C согласно AOAC OMA℠ 2016.08 и сертификату PTM℠ Certificate № 081501.

Матрица образца		Объем образца	Объем среды для обогащения (мл)	Время обогащения (ч)
Говяжьи сосиски, творожный сыр, ванильное мороженое, творог 4 % жирности, цельное шоколадное молоко 3 %, салат ромэн, сырой шпинат в пакетах, семга холодного копчения		25 г	225	24–30
Сырая курица		25 г	475	28–32
Нарезка из индейки		125 г	1125	24–30
Канталуп[b]		Целая дыня	Объем, достаточный для того, чтобы дыня плавала	26–30
Пробы окружающей среды:	Нержавеющая сталь	1 губка	225	24–30
	Гидроизолированный бетон	1 губка	100	24–30
	Пластмасса[c]	1 мазок	10	24–30

Все образцы, предназначенные для валидации AOAC, гомогенизировались путем растирания, если не указано иное.

(a) Бульон Фрейзера половинной концентрации или бульон Фрейзера следует всегда дополнять добавкой к бульону Фрейзера (цитратом железа-аммония) при первичном или вторичном обогащении.

(b) Гомогенизируйте образец путем ручного перемешивания.

(c) Гомогенизируйте образец путем вихревого перемешивания.

NF VALIDATION от AFNOR Certification

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

Более подробную информацию о сроке действия см. в сертификате NF VALIDATION, который доступен на указанном выше веб-сайте.

Сертифицированная NF VALIDATION методика, соответствующая стандарту ISO 16140-2[6], по сравнению со стандартом ISO 11290[3]
Объект валидации: все пищевые продукты, предназначенные для человека, и образцы окружающей среды (исключая образцы первичной продукции)
Приготовление проб: пробы следует готовить в соответствии со стандартами EN ISO 11290-1[3] и EN ISO 6887[8]
Версия программного обеспечения: см. сертификат

Таблица 4. Протоколы обогащения по сертифицированной NF VALIDATION методике 3M 01/15-09/16 при 37 ± 1 °C с использованием бульона Фрейзера половинной концентрации и бульона Фрейзера по мере необходимости

Общий протокол	Объем образца	Объем среды для обогащения (мл)	Температура обогащения (±1 °C)	Время обогащения (ч)	Анализируемый объем пробы[a]	Допустимая точка прерывания
Все образцы пищевых продуктов (исключая сырое мясо, сырые морепродукты и сырые молочные продукты)	25 г	225	37	24–30	20 мкл	• Бульон Фрейзера половинной концентрации до 72 часов • Лизат при –20 °C • Лизат при 4 °C до 72 часов
Пробы окружающей среды	25 г, 1 мазок или 1 смыв					

Специальный протокол	Первичная обогатительная среда (бульон Фрейзера половинной концентрации)[b]				Вторичная обогатительная среда (бульон Фрейзера)[b]				Допустимая точка прерывания
	Объем образца	Объем среды для обогащения (мл)	Температура обогащения (±1 °C)	Время обогащения (ч)	Объем образца	Температура обогащения (±1 °C)	Время обогащения (ч)	Анализируемый объем образца[c]	
Сырое мясо, сырые морепродукты и сырые молочные продукты	25 г	225	37	20–24	Перенесите 0,1 мл в 10 мл бульона Фрейзера	37	20–24	10 мкл	• Бульон Фрейзера до 72 часов • Лизат при –20 °C • Лизат при 4 °C до 72 часов

(a) Объем образца, переносимый в пробирки с раствором для лизиса Neogen. См. этап 4.6 в разделе о лизисе.

(b) Бульон Фрейзера половинной концентрации или бульон Фрейзера следует всегда дополнять добавкой к бульону Фрейзера (цитратом железа-аммония) при первичном или вторичном обогащении.

(c) Объем образца, переносимый в пробирки с раствором для лизиса Neogen. См. этап 4.6 в разделе о лизисе.

ПРИМЕЧАНИЕ. Пробы объемом более 25 г не тестировались в валидационном исследовании NF.

Подготовка лотка быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen®

1. Смочите кусок ткани в растворе бытового отбеливателя 1–5 % (в объемном соотношении с водой) или аналогичном растворе и протрите им лоток быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen®.
2. Ополосните водой лоток быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen.
3. Вытрите лоток быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen досуха одноразовым полотенцем.
4. Перед использованием лотка быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen убедитесь в том, что он сухой.

Подготовка блока «Neogen® Молекулярная диагностика. Охладительный блок (вставной)»

Поместите блок «Neogen Молекулярная диагностика. Охладительный блок» прямо на лабораторный стол; используйте охладительный блок при комнатной температуре (20–25 °C).

Подготовка внутреннего нагревательного блока для молекулярной диагностики Neogen®

Поместите внутренний нагревательный блок для молекулярной диагностики Neogen® в сухое двухблочное нагревательное устройство. Включите сухое нагревательное устройство и установите температуру таким образом, чтобы температура внутреннего нагревательного блока для молекулярной диагностики Neogen достигла постоянного значения 100 ± 1 °C.

ПРИМЕЧАНИЕ. Внутренний нагревательный блок для молекулярной диагностики Neogen достигает нужной температуры примерно за 30 минут (в зависимости от типа нагревательного устройства). Используя подходящий откалиброванный термометр (например, термометр частичного погружения или термопарный цифровой термометр, но **не** термометр полного погружения), размещенный в указанном месте, убедитесь в том, что температура внутреннего нагревательного блока для молекулярной диагностики Neogen составляет 100 ± 1 °C.

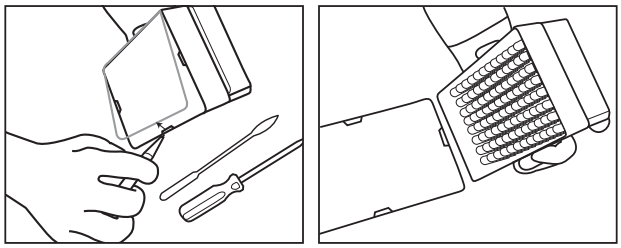
Подготовка прибора для молекулярной диагностики Neogen®

1. Запустите программу «Система молекулярной диагностики Neogen®» и войдите в систему. Чтобы убедиться в наличии наиболее свежей версии программного обеспечения, обратитесь к представителю Neogen Food Safety.
2. Включите прибор для молекулярной диагностики Neogen.
3. Создайте или отредактируйте цикл анализа с данными для каждого образца. Подробную информацию см. в руководстве пользователя прибора для молекулярной диагностики Neogen.

ПРИМЕЧАНИЕ. Прежде чем вставлять лоток быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen с реакционными пробирками в прибор для молекулярной диагностики Neogen, убедитесь в том, что прибор достиг состояния готовности. Данная стадия нагрева занимает около 20 минут и обозначается ОРАНЖЕВЫМ светом в строке состояния прибора. Когда прибор будет готов к запуску цикла, цвет панели состояния изменится на ЗЕЛЕНЫЙ.

Лизис

Извлеките нижнюю часть штатива для пробирок с раствором для лизиса Neogen с помощью отвертки или лопаточки, прежде чем помещать его во внутренний нагревательный блок для молекулярной диагностики Neogen.



1. Пробирки с раствором для лизиса (раствором для лизиса Neogen) должны нагреться: для этого оставьте штатив при комнатной температуре (20–25 °C) на ночь (16–18 часов). Альтернативный способ довести пробирки с раствором для лизиса Neogen до температуры окружающей среды: поместить пробирки с раствором для лизиса Neogen на лабораторный стол минимум на 2 часа, оставить их для инкубации в инкубаторе при температуре 37 ± 1 °C в течение 1 часа или поместить их на 30 секунд в сухое двухблочное нагревательное устройство при температуре 100 °C.
2. Переверните запечатанные пробирки для смешивания содержимого. Перейдите к следующему шагу через 4 ч.
3. Извлеките обогатительный бульон из инкубатора.
4. На каждый образец, а также образец для отрицательного контроля (NC) (в стерильной обогатительной среде) требуется одна пробирка с раствором для лизиса Neogen.

   4.1 Для получения необходимого количества пробирок пластинки с пробирками с раствором для лизиса Neogen можно разрезать. Выберите необходимое количество отдельных пробирок или пластинок по 8 пробирок с раствором для лизиса Neogen. Поместите пробирки с раствором для лизиса Neogen на пустой штатив.

   4.2 Во избежание перекрестного загрязнения распечатывайте пластинки с пробирками с раствором для лизиса Neogen по одной за раз и для каждого этапа переноса используйте новый наконечник для пипетки.

   4.3 Перенесите обогащенные пробы в пробирки с раствором для лизиса Neogen, как описано ниже.

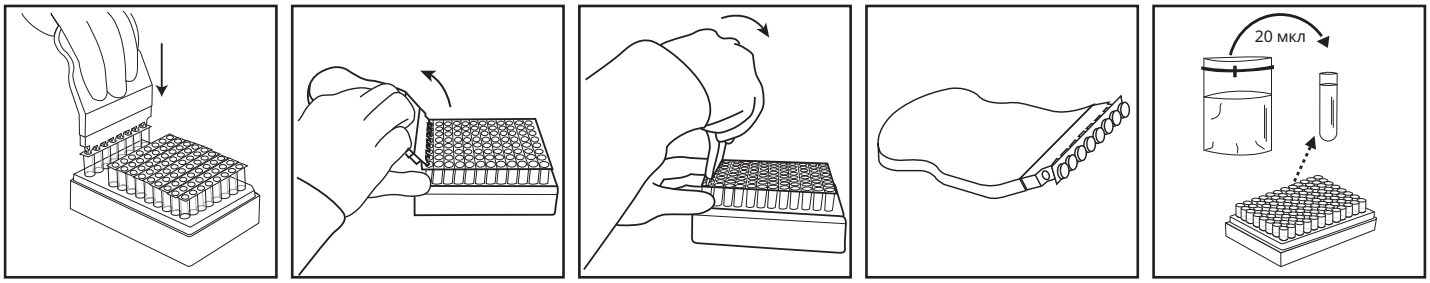
   Сначала перенесите каждый обогащенный образец в отдельную пробирку с раствором для лизиса Neogen. Образцы для отрицательного контроля переливайте **в последнюю очередь**.

   4.4 Распечатайте пробирки с раствором для лизиса Neogen с помощью инструмента «Молекулярная диагностика Neogen®. Инструмент для запечатывания/распечатывания пробирок (лизис)»; пластинки с пробирками следует распечатывать по одной.

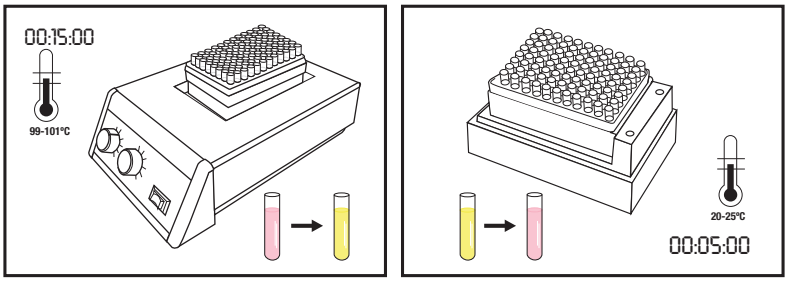
   4.5 Удалите в отходы колпачок от пробирки с раствором для лизиса Neogen; если лизат необходимо сохранить для повторного тестирования, поместите колпачки в чистый контейнер для повторного использования после лизиса.

   4.5.1 Процедура обработки сохраненного лизата описана в приложении A.

   4.6 Перенесите 20 мкл образца в пробирку с раствором для лизиса Neogen, если иное не указано в протоколах из табл. 2, 3 или 4 (напр., для сырых молочных продуктов или при анализе проб окружающей среды без нейтрализующего буфера используйте 10 мкл).



5. Повторяйте шаги от 4.4 до 4.6 до тех пор, пока каждая отдельная проба не будет перелита в соответствующую пробирку с раствором для лизиса Neogen на пластинке.
6. После переноса всех образцов перенесите в пробирку с раствором для лизиса Neogen 20 мкл обогатительной среды для отрицательного контроля (стерильной обогатительной среды, например бульона Фрейзера половинной концентрации). Не используйте в качестве отрицательного контроля воду.
7. Убедитесь в том, что температура внутреннего нагревательного блока для молекулярной диагностики Neogen составляет 100 ± 1 °C.
8. Поместите штатив с открытыми пробирками для лизиса Neogen во внутренний нагревательный блок для молекулярной диагностики Neogen и нагревайте в течение 15 ± 1 мин. Во время нагрева цвет раствора для лизиса Neogen изменится с розового (в холодном состоянии) на желтый (в горячем состоянии).
   8.1 Образцы, которые не прошли надлежащую тепловую обработку на этапе лизиса, могут представлять биологическую опасность. ЗАПРЕЩАЕТСЯ вставлять их в прибор для молекулярной диагностики Neogen.
9. Извлеките открытый штатив с пробирками с раствором для лизиса Neogen из нагревательного блока и поместите его для охлаждения в блок «Молекулярная диагностика Neogen. Охладительный блок (вставной)» на период от 5 до 10 минут. Блок «Молекулярная диагностика Neogen. Охладительный блок (вставной)», используемый при комнатной температуре, должен находиться непосредственно на лабораторном столе. После охлаждения цвет раствора для лизиса снова станет розовым.
10. Извлеките штатив с пробирками для лизиса Neogen из блока «Молекулярная диагностика Neogen. Охладительный блок (вставной)».



Амплификация

1. На каждую пробу, а также отрицательный контроль (NC) требуется одна пробирка с реактивом из тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen.
   1.1 Для получения необходимого количества пробирок пластинки с пробирками с реактивом можно разрезать. Возьмите необходимое количество отдельных пробирок или пластинок по 8 пробирок с реактивом из тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen.
   1.2 Поместите пробирки с реактивом из тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen на пустой штатив.
   1.3 Не встряхивайте осадок от реагента, который может образоваться на дне пробирок.
2. Возьмите 1 пробирку Neogen «Контроль реагентов» и поместите ее на штатив.
3. Во избежание перекрестного загрязнения распечатывайте пластинки с пробирками с реагентом из тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen по одной и для каждого этапа переноса используйте новый наконечник для пипетки.
4. Перенесите лизат в пробирки с реактивом тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen и пробирку Neogen «Контроль реагентов», как описано ниже.

Перенесите лизат каждого образца в отдельные пробирки с реактивом тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen **в первую очередь**, а затем — отрицательные контроли (NC). Смочите пробирку Neogen «Контроль реагентов» **в последнюю очередь**.

5. Распечатайте пробирки с реактивом тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen с помощью инструмента «Neogen® Молекулярная диагностика. Инструмент для запечатывания/распечатывания пробирок (Реагент)»; пластинки с пробирками с реактивом следует распечатывать по одной. Удалите колпачок в отходы.

   5.1 **Перенесите 20 мкл лизата образца из верхней ½ части жидкости в пробирке с раствором для лизиса Neogen (не допуская попадания осадка) в соответствующую пробирку с реактивом тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen. Переливать лизат в пробирку следует под наклоном, чтобы не поднять осадок. Перемешайте лизат в пробирке: для этого 5 раз осторожно наберите жидкость в пипетку и выпустите ее обратно.**

   5.2 Повторяйте этап 5.1 до тех пор, пока лизат каждого образца не будет перелит в соответствующую пробирку с реактивом тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen на пластинке.

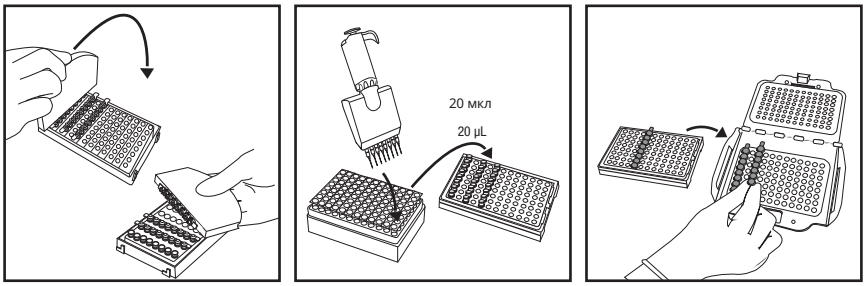
   5.3 Закройте пробирки с реактивом тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen запасными колпачками, входящими в комплект поставки, и при этом надавливайте на колпачки скругленной стороной инструмента «Neogen Молекулярная диагностика. Инструмент для запечатывания/распечатывания пробирок (Реагент)», совершая движения вперед-назад, чтобы обеспечить плотную посадку колпачков.

   5.4 Повторите этапы 5.1–5.3 столько раз, сколько проб необходимо исследовать.

   5.5 После переноса лизатов всех образцов повторите действия начиная с этапа 5.1, чтобы перенести 20 мкл лизата отрицательного контроля (NC) в пробирку с реактивом тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen.

   5.6 Перенесите **20 мкл <u>лизата отрицательного контроля (NC)</u> в пробирку Neogen «Контроль реагентов»**. Переливать лизат в пробирку следует под наклоном, чтобы не поднять осадок. Перемешайте лизат в пробирке: для этого 5 раз осторожно наберите жидкость в пипетку и выпустите ее обратно.

6. Загрузите запечатанные пробирки в чистый продезинфицированный лоток быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen. Закройте и зафиксируйте крышку лотка быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen.



7. Проверьте и подтвердите настроенный цикл анализа в программе «Система молекулярной диагностики Neogen».
8. Нажмите кнопку «Пуск» в программном обеспечении и выберите инструмент для использования. Крышка выбранного прибора откроется автоматически.
9. Поместите лоток быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen в прибор для молекулярной диагностики Neogen и закройте крышку, чтобы запустить анализ. Результаты появятся в течение 75 минут. Положительные результаты могут появиться раньше.
10. По завершении анализа извлеките лоток быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen из прибора для молекулярной диагностики Neogen и утилизируйте пробирки, поместив их в раствор бытового отбеливателя (1–5 % в объемном отношении с водой) или аналогичный раствор на 1 час вдали от области подготовки образцов для анализа.

УВЕДОМЛЕНИЕ. Для минимизации риска получения ложноположительных результатов вследствие перекрестного загрязнения ни в коем случае не открывайте пробирки с реактивом, содержащие амплифицированную ДНК. Это касается пробирок с реактивом тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen, пробирок Neogen «Контроль реагентов» и пробирок контроля матрицы. Всегда утилизируйте герметично закрытые пробирки путем погружения в раствор бытового отбеливателя 1–5 % (в объемном соотношении с водой) или аналогичный раствор на 1 час вдали от зоны подготовки материалов для анализа.

Результаты диагностики и их интерпретация

Специальный алгоритм анализирует кривую светоотдачи, выводимую в результате обнаружения амплификации нуклеотидных последовательностей. Программное обеспечение автоматически анализирует полученные данные и снабжает их цветовыми кодами. Положительный или отрицательный результат определяется путем анализа ряда уникальных параметров кривой. Предположительно положительные результаты отображаются в реальном времени, а отрицательные результаты и данные, требующие изучения, — по окончании анализа.

Предположительно положительные результаты следует подтверждать по стандартным лабораторным технологиям или подходящим стандартным методом[1, 2, 3]; начать необходимо с переноса образцов из первичной обогатительной среды во вторичную (если применимо) с последующим посевом на чашках Петри и проверкой изолятов с использованием надлежащих биохимических, микроскопических и серологических методов.

ПРИМЕЧАНИЕ. Результаты анализа не могут быть нулевыми даже в случае исследования отрицательного образца, поскольку система и амплификационные реактивы из тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen обеспечивают выдачу «фоновых» показаний в относительных световых единицах (RLU).

В редких случаях получения необычных световых данных алгоритм заносит соответствующие результаты в категорию информации, требующей изучения. Компания Neogen рекомендует проводить повторный анализ образцов, требующих изучения. Если результат анализа не меняется, проверьте его предпочтительным для вас методом или в соответствии с местными нормативными требованиями.

Таблица 5. Символы для обозначения результатов анализа проб в программном обеспечении системы молекулярной диагностики Neogen и их интерпретация

Тип лунки	Обозначение результата для лунки	Результат	Интерпретация
Проба		Положительный	Проба предположительно положительна по целевому патогену.
Проба		Отрицательный	Проба предположительно отрицательна по целевому патогену.
Проба		Ингибировано	Матрица образца оказала ингибирующее действие на реакцию в ходе анализа. Возможно, необходим повторный анализ. Подробнее см. в разделе о поиске и устранении неполадок, а также в инструкциях к препарату.
Проба		Требуется проверка	Неопределенный результат в отношении присутствия либо отсутствие целевого патогена. Возможно, необходим повторный анализ. Подробнее см. в разделе о поиске и устранении неполадок, а также в инструкциях к препарату.
Проба		Ошибка	Биолюминесценция не обнаружена. Возможно, необходим повторный анализ. Подробнее см. в разделе о поиске и устранении неполадок, а также в инструкциях к препарату.

Подтверждение результатов в соответствии с методом, получившим сертификат NF VALIDATION

Вариант 1. Используя стандарт ISO 11290[3], начиная с обогащения бульоном Фрейзера половинной концентрации.

Вариант 2. Путем выделения агара PALCAM или хромогенного (O&A) агара в рамках сертифицированной NF VALIDATION методики обнаружения *Listeria monocytogenes*. Для подтверждения присутствия *Listeria monocytogenes* достаточно установить присутствие характерных колоний.

Вариант 3. С помощью зондов на основе нуклеиновых кислот, как описано в стандарте EN ISO 7218[5], на изолированных колониях, из селективного агара (см. варианты 1 или 2).

Вариант 4. Любым другим методом, сертифицированным NF VALIDATION, принцип которого должен отличаться от принципа работы тест-набора «Молекулярный анализ 2 - *Listeria monocytogenes*» Neogen. Используйте полный протокол, описанный для второго валидированного метода. Все этапы до начала подтверждения должны быть одинаковыми для обоих методов.

В случае несоответствующих результатов (предположительно положительных с использованием альтернативного метода, не подтвержденных одним из способов, описанных выше) лаборатория должна принять необходимые меры, чтобы обеспечить достоверность полученных результатов.

В случае расхождения результатов (получения при использовании тест-набора «Молекулярный анализ 2 -

Listeria monocytogenes» Neogen предположительно положительных результатов, не подтвержденных одним из способов, описанных выше) лаборатория должна принять необходимые меры для обеспечения достоверности результатов анализа.

Если у вас возникли вопросы по конкретным способам применения или процедурам, посетите наш веб-сайт по адресу www.neogen.com или обратитесь к местному представителю или дистрибьютору компании Neogen.

Приложение A. Прерывание выполнения протокола. Хранение и повторный анализ лизатов, подвергшихся термообработке.

1. Для хранения лизатов, подвергшихся термообработке, снова запечатайте пробирку с раствором для лизиса чистым колпачком (см. раздел «Лизис», 4.5).
2. Отправьте образец на хранение при температуре от 4 до 8 °C на период до 72 часов.
3. Подготовьте сохраненный образец для амплификации, перевернув пробирку 2–3 раза для перемешивания.
4. Распечатайте пробирки.
5. Поместите пробирки со смешанным лизатом во внутренний нагревательный блок для молекулярной диагностики Neogen и подогрейте до температуры 100 ± 1 °C в течение 5 ± 1 минуты.
6. Извлеките штатив с пробирками с раствором для лизиса Neogen из нагревательного блока и поместите его для охлаждения в блок «Молекулярная диагностика Neogen. Охладительный блок (вставной)» на период от 5 до 10 минут.
7. Продолжите выполнение протокола в соответствии с разделом «Амплификация», как описано выше.

Ссылки.

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

Пояснения к символам на этикетках

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

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

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

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

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

FS00867C

Yayınlanma Tarihi: 2024-07

Ürün Talimatları

Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2

Ürün Tanımı ve Kullanım Amacı

Neogen® Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2, zenginleştirilmiş gıda ve çevre numunelerinde *Listeria monocytogenes*'in hızlı ve spesifik tespiti için Neogen® Moleküler Tayin Sistemi ile kullanılır. Neogen Moleküler Tayin Testlerinde, nükleik asit dizgelerinin yüksek özgüllük ve duyarlılıkla hızla amplifiye edilmesi için döngü aracılı izotermal amplifikasyonun yanı sıra amplifikasyonun tespit edilmesi amacıyla biyoluminesans kullanılır. Negatif sonuçlar test tamamlandıktan sonra gösterilirken, olası pozitif sonuçlar gerçek zamanlı olarak bildirilir. Olası pozitif sonuçlar, tercih edilen yöntem kullanılarak veya yerel düzenlemelerde belirtildiği şekilde doğrulanmalıdır[1, 2, 3].

Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 ürünü, laboratuvar ortamında, laboratuvar teknikleri konusunda eğitim almış profesyonellerin kullanımına yöneliktir. Neogen, bu ürünü yiyecek veya içecek endüstrileri dışında kullanım için tescil ettirmemiştir. Örneğin Neogen bu ürünü su, farmasötik ürünler, kozmetik malzemeler, klinik veya veterinerlik amaçlı numunelerin testlerinde kullanım için tescil ettirmemiştir. Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 olası tüm test protokolleri veya mümkün olan tüm bakteri suşları ile değerlendirilmemiştir.

Tüm test yöntemlerinde olduğu gibi, zenginleştirme ortamının kaynağı, formülasyonu ve kalitesi sonuçları etkileyebilir. Numune alma yöntemleri, test protokolleri, numune hazırlama, taşıma ve laboratuvar tekniği gibi faktörler de sonuçları etkileyebilir. Neogen, yöntemin kullanıcının ölçütlerini karşıladığından emin olmak için belirli gıdalar ve mikrobiyal zorluklarla yeterli sayıda numune kullanılarak kullanıcının ortamında zenginleştirme ortamı dahil olmak üzere yöntemin değerlendirilmesini önerir.

Neogen, Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2'yi Amonyum Ferrik Sitrat içeren Half Fraser Broth ve Amonyum Ferrik Sitrat içeren Fraser Broth ile gerektiği şekilde değerlendirmiştir. Bu ortamın tipik bir formülasyonu aşağıda verilmiştir.

Toz Half Fraser Broth Tipik Formülü	(g/L)	Toz Fraser Broth Tipik Formülü	(g/L)
Sodyum Klorür	20 g	Sodyum Klorür	20 g
Sodyum Fosfat, dibazik, susuz*	9,6 g	Sodyum Fosfat, dibazik, susuz*	9,6 g
Dana Eti Özütü	5,0 g	Dana Eti Özütü	5,0 g
Kazeinin Pankreatik Dijesti	5,0 g	Kazeinin Pankreatik Dijesti	5,0 g
Hayvan Dokusunun Peptik Dijesti	5,0 g	Hayvan Dokusunun Peptik Dijesti	5,0 g
Maya Özütü	5,0 g	Maya Özütü	5,0 g
Lityum Klorür	3,0 g	Lityum Klorür	3,0 g
Potasyum Fosfat, monobazik	1,35 g	Potasyum Fosfat, monobazik	1,35 g
Eskulin	1,0 g	Eskulin	1,0 g
Akriflavin HCl	0,0125 g	Akriflavin HCl	0,025 g
Nalidiksik Asit	0,01 g	Nalidiksik Asit	0,02 g

***** Ökame: Sodyum Fosfat, dibazik, dihidrat 12,0 g

Fraser Broth Supplementi

(10 mL flakon başına içerik. Bir flakon bir litre bazal ortama eklenir.)

Amonyum Ferrik Sitrat 0,5 g/10 mL

Nihai pH 7,2±0,2, 25°C'de

Neogen® Moleküler Tayin Cihazı, numune içinde var olan organizmaları yok etmek için tasarlanmış lizis test aşaması sırasında ısıl işlemden geçen numuneler ile kullanım için tasarlanmıştır. Lizis test aşaması sırasında doğru şekilde ısıl işleme tabi tutulmayan numuneler, olası bir biyolojik tehlike olarak düşünülebilir ve Neogen Moleküler Tayin Cihazı'na YERLEŞTİRİLMEMELİDİR.

Neogen Gıda Güvenliği, ISO (Uluslararası Standardizasyon Teşkilatı) 9001 tasarım ve üretim sertifikasına sahiptir.

Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 test kiti, Tablo 1'de açıklanmış olduğu gibi 96 test içerir.

Tablo 1. Neogen Moleküler Tayin Testi Kit Bile□enleri

Malzeme	Tanım	Miktar	□çindekiler	Yorumlar
Neogen® Lizis Solüsyonu (LS)	□effaf tüplerde pembe solüsyon	96 (8 tüplük 12 □erit)	Tüp ba□ına 580 µL LS	Raflı ve kullanıma hazır
Neogen® Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 Reaktif Tüpleri	Sarı tüpler	96 (8 tüplük 12 □erit)	Liyofilize spesifik amplifikasyon ve tespit karı□ımı	Kullanıma hazır
□lave kapaklar	Sarı kapaklar	96 (8 kapaklık 12 □erit)		Kullanıma hazır
Neogen® Reaktif Kontrolü (RC)	□effaf üstten kapatmalı tüpler	16 (8 ayrı tüp içeren 2 po□et)	Liyofilize kontrol DNA'sı, amplifikasyon ve tespit karı□ımı	Kullanıma hazır

Kitle birlikte sunulmayan Negatif Kontrol, Half Fraser Broth gibi steril bir zenginle□tirme ortamıdır. Negatif Kontrol olarak su kullanmayın.

Güvenlik

Kullanıcı, Neogen Moleküler Tayin Sistemi ve Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 ile ilgili talimatlarda yer alan tüm güvenlik bilgilerini okumalı, anlamalı ve bunlara uymalıdır. Güvenlik talimatlarını ileride ba□vurmak üzere saklayın.

⚠ **UYARI:** Önlenmemesi halinde ölüm ya da ciddi yaralanma ve/veya mal zararı ile sonuçlanabilecek tehlikeli bir durumu gösterir.

B□LD□R□M: Kaçınılmaması halinde maddi zarar ile sonuçlanabilen olası tehlikeli bir durumu gösterir.

⚠ UYARI

Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2'yi insanların veya hayvanların sa□lık durumlarını tanılamak amacıyla kullanmayın.

Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 yöntemi, maruz kalındı□ında ölü do□umlara ve gebe kadınlarda ve ba□ı□ıklık yetmezli□i olan ki□ilerde ölüme neden olmaya yetebilecek düzeylerde *Listeria monocytogenes* üretebilir.

Kullanıcı, personelini geçerli ve do□ru test teknikleri konusunda e□itmelidir; örne□in, □yi Laboratuvar Uygulamaları, ISO/IEC 17025[4] veya ISO 7218[5].

Kontamine ürünün açı□a çıkmasına yol açan yanlı□ bir negatif sonuçla ili□kili riskleri azaltmak için:

- Tam olarak ürün talimatlarında belirtildi□i □ekilde protokolü uygulayın ve testleri gerçekle□tirin.
- Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2'yi ambalaj üzerinde ve ürün talimatlarında belirtildi□i □ekilde saklayın.
- Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2'yi mutlaka son kullanma tarihinden önce kullanın.
- Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2'yi kurum içinde veya üçüncü bir tarafça onaylanmı□ gıda ve çevre numuneleri ile kullanın.
- Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2'yi sadece kurum içinde veya üçüncü bir tarafça onaylanmı□ yüzeyler, sanitizerler, protokoller ve bakteri su□ları için kullanın.
- Aril sülfonat kompleksiyle birlikte Nötrle□tirici Tampon içeren çevresel bir numune için test etmeden önce 1:2 oranında bir dilüsyon gerçekle□tirin (1 ölçek steril zenginle□tirme sıvı besiyeri içine 1 ölçek numune). Ba□ka bir seçenek ise Neogen Lizis Solüsyonu tüplerine 10 µL NB zenginle□tirme aktarmaktır. Aril sülfonat kompleksli Nötrle□tirici Tampon içeren Neogen® Numune Toplama ürünleri: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G ve HS2410NB2G.

Kimyasallara ve biyolojik tehlikelere maruz kalma ile ili□kili riskleri azaltmak için:

- Kadın laboratuvar personelinin, fetüs geli□iminde annenin *Listeria monocytogenes*'e maruziyeti sonucunda meydana gelen enfeksiyondan kaynaklanan risk konusunda bilgilendirilmesi kesinlikle önerilir.
- Patojen testini do□ru donanıma sahip bir laboratuvarda, e□itimli personelin kontrolü altında gerçekle□tirin. □nkübe edilmi□ zenginle□tirme ortamı ve inkübe edilmi□ zenginle□tirme ortamıyla temas etmi□ ekipman veya yüzeyler, insan sa□lı□ı için risk olu□turmaya yetecek düzeylerde patojenler içerebilir.
- Reaktifler ve kontamine olmu□ numuneler ile çalı□ırken, uygun koruyucu kıyafet ve gözlük kullanımı dahil olmak üzere, daima standart laboratuvar güvenlik uygulamalarını izleyin.
- Amplifikasyon sonrasında zenginle□tirme ortamları ve reaktif tüplerinin içeri□i ile temastan kaçının.
- Zenginle□tirilmi□ numuneleri, geçerli endüstri standartlarına göre imha edin.
- Lizis test a□aması sırasında do□ru □ekilde ısıl i□leme tabi tutulmayan numuneler, olası bir biyolojik tehlike olarak dü□ünülebilir ve Neogen Moleküler Tayin Cihazı'na YERLE□T□R□LMEMEL□D□R.

Testi hazırlarken çapraz kontaminasyonla ili□kili riskleri azaltmak için:

- Daima eldiven takın (kullanıcıyı korumak ve nükleazların giri□ini önlemek için).

Çevresel kontaminasyonla ili□kili riskleri azaltmak için:

- Kontamine atıkların atılması ile ilgili geçerli endüstri standartlarına uyun.

Sıcak sıvılara maruz kalınmasıyla ili□kili riskleri azaltmak için:

- Isıtıcıdaki önerilen sıcaklık ayarını a□mayın.
- Önerilen ısıtma süresini a□mayın.
- Neogen® Moleküler Tayin Isıtma Blo□u Ek Parçası sıcaklı□ını do□rulamak için uygun ve kalibre edilmi□ bir termometre kullanın (örne□in tamamen daldırma tipi termometre de□il, kısmi daldırma tipi termometre veya dijital sıcaklık sensörlü termometre.) Termometre, Neogen Moleküler Tayin Isıtma Blo□u Ek Parçası'nda belirlenmi□ olan konuma yerle□tirilmelidir.

B□LD□R□M

Testi hazırlarken çapraz kontaminasyonla ili□kili riskleri azaltmak için:

- Reaktif pellet hidrasyonundan önce eldivenleri de□i□tirin.
- Steril, aerosol bariyerli (filtreli), moleküler biyoloji sınıfı pipet uçlarının kullanılması tavsiye edilir.
- Her numune aktarımı için yeni bir pipet ucu kullanın.
- Numunenin zenginle□tirilmi□ besiyerinden lizis tüpüne aktarılması için □yi Laboratuvar Uygulamalarını kullanın. Pipetör kontaminasyonunu önlemek için kullanıcı ara bir aktarım adımı eklemeyi seçebilir. Örne□in kullanıcı zenginle□tirilmi□ her numuneyi steril bir tüpe aktarabilir.
- Mevcutsa germisidal lamba içeren bir moleküler biyoloji çalı□ma tezgahı kullanın. Laboratuvar tezgahlarını ve ekipmanını (pipetler, kapak takma/kapak sökme araçları vb.) %1-5'lik (suda v:v) bir çama□ır suyu çözeltisi veya DNA uzakla□tırma çözeltisi ile periyodik olarak dekontamine edin.

Yanlı□ pozitif sonuçlarla ili□kili riskleri azaltmak için:

- Amplifikasyon sonrasında reaktif tüplerini asla açmayın.
- Kontamine olmu□ tüpleri, her zaman %1-5'lik (suda v:v) bir çama□ır suyu solüsyonunda veya e□de□er bir solüsyonda 1 saat süreyle bekleterek ve test hazırlık alanından uzakta imha edin.
- Amplifikasyon sonrasında reaktif tüplerine asla otoklav uygulamayın.

Ek bilgiler ve ürünün imha edilmesi ile ilgili yerel düzenlemeler için Güvenlik Veri Formu'na bakın.

Belirli uygulamalar veya prosedürler hakkında sorularınız varsa www.neogen.com adresindeki web sitemizi ziyaret edin veya yerel Neogen temsilcisi ya da distribütörü ile ileti□im kurun.

Kullanıcının Sorumlulu□u

Kullanıcılar ürün talimatları ve bilgileri hakkında bilgi edinmekle yükümlüdür. Daha fazla bilgi için **www.neogen.com** adresindeki web sitemizi ziyaret edin veya yerel Neogen temsilcinizle ya da da□ıtımcınızla ileti□ime geçin.

Bir test yöntemi seçilirken, numune alma yöntemleri, test protokolleri, numunenin hazırlanması, i□lem yapılması ve laboratuvar tekni□i gibi dı□ faktörlerin sonuçları etkileyebilece□i bilinmelidir.

Seçilen test yönteminin kullanıcının kriterlerini kar□ıladı□ı konusunda kullanıcıyı tatmin edecek uygun matrisler ve mikrobiyal zorluklarla yeterli sayıda numuneyi de□erlendirmek üzere herhangi bir test yönteminin seçilmesi kullanıcının sorumlulu□undadır.

Tüm test yöntemlerinin ve sonuçlarının mü□teri ve tedarikçi gereksinimlerini kar□ılamasını sa□lamak yine kullanıcının sorumlulu□undadır.

Tüm test yöntemlerinde oldu□u gibi, herhangi bir Neogen Gıda Güvenli□i ürününün kullanılmasından elde edilen sonuçlar test edilen matrislerin veya süreçlerin kalitesi konusunda bir garanti olu□turmaz.

Çe□itli gıda matrislerine yönelik olarak yöntemin de□erlendirilmesinde mü□terilere yardımcı olmak için Neogen, Neogen® Moleküler Tayin Matris Kontrolü kitini geli□tirmi□tir. Gerekti□inde, matrisin Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 sonuçlarını etkileyip etkileyemedi□ini belirlemek üzere Matris Kontrolü (MC) kullanın. Neogen yönteminin adapte edildi□i ya da yeni veya bilinmeyen matrislerin ya da ham maddesi veya prosesi de□i□en matrislerin test edildi□i herhangi bir validasyon döneminde, matrisi temsil eden birkaç numuneyi, yani farklı kaynaktan alınan numuneleri test edin.

Matris; bile□im ve proses gibi yapısal özellikleri olan bir ürün türü olarak tanımlanabilir. Matrisler arasındaki farklılıklar, proseslerindeki veya sunumlarındaki farklılıkların neden oldu□u etkiler kadar basit olabilir (ör. pastörize ve ham, kuru ve taze vb.).

Garantilerin Sınırlandırılması/Sınırlı Çözüm

NEOGEN, HER B□R ÜRÜN AMBALAJININ ÜZER□NDEK□ SINIRLI GARANT□ KISMINDA AÇIKÇA BEL□RT□LENLER HAR□C□NDE, PAZARLANAB□L□RL□K VEYA BEL□RL□ B□R KULLANIMA UYGUNLUK GARANT□LER□ DAH□L ANCAK BUNLARLA SINIRLI OLMAMAK ÜZERE HERHANG□ B□R AÇIK VEYA ZIMN□ GARANT□Y□ KABUL ETMEMEKTED□R. Herhangi bir Neogen Gıda Güvenlik Ürünü'nün kusurlu olması durumunda, Neogen veya yetkili da□ıtımcısı, tercihine göre ürünü de□i□tirecek veya ürün satı□ tutarını iade edecektir. Tarafınıza münhasır çözümler bunlardır. Di□er her türlü sorunuz için lütfen Neogen temsilciniz veya yetkili Neogen distribütörünüz ile ileti□im kurun.

Neogen'in Sınırlı Sorumlulu□u

NEOGEN DO□RUDAN, DOLAYLI, ÖZEL, ARIZ□ VEYA NET□CE KAB□L□NDEN DO□MU□, KAYBED□LM□□ KAZANÇLAR DAH□L ANCAK BUNUNLA SINIRLI OLMAMAK ÜZERE HERHANG□ B□R KAYIP VEYA ZARARDAN SORUMLU OLMAYACAKTIR. Hiçbir durumda Neogen'in herhangi bir hukuk kuramı altındaki sorumlulu□u, kusurlu oldu□u iddia edilen ürünün satı□ fiyatını a□amaz.

Saklama ve Atma

Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 ürününü 2-8°C'de saklayın. Dondurmayın. Saklama sırasında kiti ı□ıktan uzak tutun. Kiti açtıktan sonra, folyo po□etin zarar görmemi□ oldu□unu teyit edin. Po□et zarar görmü□se kullanmayın. Açıldıktan sonra, kullanılmayan reaktif tüplerinin, liyofilize reaktiflerin stabilitesini sürdürmek amacıyla, içinde nem çekici ile a□zı tekrar kapatılabilir po□et içinde saklanması gerekir. Yeniden kapatılmı□ po□etleri 60 günden uzun olmamak kaydıyla 2-8°C sıcaklıkta saklayın.

Son kullanma tarihi geçen Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2'yi kullanmayın. Son kullanma tarihi ve lot numarası kutunun dı□ yüzündeki etikette belirtilmi□tir. Kullanım sonrasında, zenginle□tirme ortamı ve Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 tüpleri, potansiyel olarak patojenik materyaller içerebilir. Test tamamlandı□ında, kontamine atı□ın imha edilmesi için geçerli endüstri standartlarına uyun. Ek bilgiler ve ürünün imha edilmesi ile ilgili yerel düzenlemeler için Güvenlik Veri Formu'na bakın.

Kullanım Talimatları

Tüm talimatlara dikkatle uyun. Bu uyarının dikkate alınmaması hatalı sonuçlara neden olabilir.

Laboratuvar tezgahlarını ve ekipmanını (pipetler, kapak takma/kapak sökme araçları vb.) %1-5'lik (suda v:v) bir çama□ır suyu çözeltisi veya DNA uzakla□tırma çözeltisi ile periyodik olarak dekontamine edin.

Kullanıcı, "Neogen Moleküler Tayin Sistemi için Kurulum Yeterlili□i (IQ) / Çalı□ma Yeterlili□i (OQ) Protokolleri ve Talimatlar" belgesinde[6] açıklanan □ekilde Neogen Moleküler Tayin Sistemi operatör yeterlili□i (OQ) e□itimini tamamlamalıdır.

Özel gereksinimler için "Valide edilmi□ yöntemler için özel talimatlar" bölümüne bakın:

AOAC® *Official Method of Analysis℠* **2016.08** ve AOAC® *Performance Tested Method℠* Certificate **#081501**'e göre zenginle□tirme protokolleri için Tablo 3.

NF Validation sertifikası **3M 01/15-09/16**'ya göre zenginle□tirme protokolleri için Tablo 4.

Numune Zenginle□tirme

Tablo 2, 3 veya 4, gıda ve çevresel numunelerin zenginle□tirilmesine yönelik rehberlik sunar. Bu test yönteminin kullanıcı kriterlerini kar□ılamasını sa□lamak üzere alternatif numune alma protokollerinin veya dilüsyon oranlarının valide edilmesi kullanıcının sorumlulu□undadır.

Gıdalar

1. Half Fraser Broth zenginle□tirme ortamının (amonyum ferrik sitrat içerir) laboratuvar ortam sıcaklı□ında dengeye gelmesini sa□layın.
2. Aseptik olarak zenginle□tirme ortamını ve numuneyi Tablo 2, 3 veya 4'e göre birle□tirin. Tüm et ve yüksek oranda partikül içeren numuneler için filtre torbalarının kullanılması önerilir.
3. 2±0,2 dakika boyunca harmanlayarak, sindirerek veya elle karı□tırarak homojenize edin. Tablo 2, 3 veya 4'e göre 37±1°C'de inkübe edin.
4. Ham süt ürünleri için (bkz. Tablo 2, 3 veya 4), birincil zenginle□tirmeden 0,1 mL'yi 10 mL Fraser Broth'a aktarın. 20-24 saat boyunca 37±1°C'de inkübe edin.

Çevresel numuneler

Numune toplama cihazlarına, sanitizerlerin etkilerini devre dı□ı bırakmak için nötrle□tirici çözelti ile spançla hidratlama uygulanabilir. Neogen, biyosit içermeyen bir selüloz spancın kullanılmasını önermektedir. Nötrle□tirici çözelti, Dey-Engley (D/E) Nötrle□tirici Sıvı Besiyeri veya Letheen Sıvı Besiyeri olabilir. Numune alma sonrasında alanın sanitize edilmesi önerilir.

UYARI: Spanç için hidratlayıcı çözelti olarak aril sülfonat kompleksi içeren Nötrle□tirici Tampon (NB) kullanmayı seçtiyseniz, kontamine ürünün açı□a çıkmasına yol açan yanlı□ negatif bir sonuçla ili□kili riskleri azaltmak amacıyla, test öncesi zenginle□tirilmi□ çevresel numune için 1:2 oranında dilüsyon (1 ölçek steril zenginle□tirme sıvı besiyeri içine 1 ölçek numune) gerçekle□tirilmesi gereklidir. Ba□ka bir seçenek ise Neogen Lizis Solüsyonu tüplerine 10 µL nötrle□tirici tampon zenginle□tirme aktarmaktır.

Yüzeyde patojenin varlı□ını veya yoklu□unu do□rulamak için numune alma alanının önerilen boyutu en az 100 cm^2'dir (10 cm x 10 cm veya 4" x 4"). Bir spanç ile numune alınırken, alanın tamamını iki yönde (soldan sa□a, ardından yukarıya ve a□a□ıya) kapsayın veya çevresel numuneleri geçerli numune alma protokolünüze ya da FDA BAM[1], USDA FSIS MLG[2] veya ISO 18593[7] kılavuzlarına göre alın.

1. Half Fraser Broth zenginle□tirme ortamının (amonyum ferrik sitrat içerir) laboratuvar ortam sıcaklı□ında dengeye gelmesini sa□layın.
2. Aseptik olarak zenginle□tirme ortamını ve numuneyi Tablo 2, 3 veya 4'e göre birle□tirin.

3. 2±0,2 dakika boyunca harmanlayarak, sindirerek veya elle karıştırarak homojenize edin. Tablo 2, 3 veya 4'e göre 24-30 saat boyunca 37±1°C'de inkübe edin.

Tablo 2: 37±1°C'de Half Fraser Broth ve gerektiğinde Fraser Broth kullanılarak genel zenginleştirme protokolleri.

Numune Matrisi	Numune Boyutu	Zenginleştirme Besiyerinin Hacmi (mL)	Zenginleştirme Süresi (saat)
Isıl işlem görmüş, pişirilmiş, kürlenmiş etler, kümes hayvanları, deniz ürünleri ve balık Isıl işlem görmüş/ pastörize edilmiş süt ürünleri Tarım ürünleri ve sebzeler Çok bileşenli gıdalar	25 g	225	24-30
Çevresel numuneler[a]	1 spanç	100 veya 225	24-30
	1 svab	10	24-30
Ham et, kümes hayvanları, deniz ürünleri, balık	25 g	475	28-32

Numune Matrisi	Birincil Zenginleştirme (Half Fraser Broth)[a]			İkincil Zenginleştirme (Fraser Broth)[a]			Numune Analiz Hacmi[b]
	Numune Boyutu	Zenginleştirme Besiyerinin Hacmi (mL)	Zenginleştirme Süresi (saat)	Numune Boyutu	Zenginleştirme Sıcaklığı (°C)	Zenginleştirme Süresi (saat)	
Ham süt ürünleri	25 g	225	20-24	0,1 mL'yi 10 mL Fraser Broth'a aktarın	37±1	20-24	10 µL

(a) Half Fraser ve Fraser Broth birincil veya ikincil zenginleştirme sırasında daima Fraser Broth supplementi (amonyum ferrik sitrat) ile desteklenmelidir.

(b) Neogen Lizis Solüsyonu tüplerine aktarılan numune hacmi. Lizis bölümü Adım 4.6'ya bakın.

Valide Edilmiş Yöntemler için Özel Talimatlar

AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2016.08

AOAC® *Performance Tested Method*℠ #081501

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 081501

AOAC Research Institute OMA℠ ve PTM℠ programlarında, Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2'nin *Listeria monocytogenes* tespitinde etkili bir yöntem olduğu bulunmuştur. Çalışmada test edilen matrisler Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. AOAC OMA℠ 2016.08 ve PTM℠ Certificate #081501'e göre 37±1°C'de Half Fraser Broth[a] kullanılan zenginle□tirme protokolleri.

Numune Matrisi		Numune Boyutu	Zenginle□tirme Besiyerinin Hacmi (mL)	Zenginle□tirme Süresi (saat)
Dana eti sosisler, queso fresco (Meksika'ya özgü taze peynir/lor peyniri), vanilyalı dondurma, %4 süt ya□lı çökelek peyniri, %3 çikolatalı tam ya□lı süt, marul, po□ette çi□ ıspanak, so□uk füme somon		25 g	225	24-30
Ham piliç		25 g	475	28-32
□arküteri hindi		125 g	1125	24-30
Kantalup kavunu[b]		Bütün kavun	Kavunun yüzmesini sa□lamak için yeterli hacim	26-30
Çevresel numuneler:	Paslanmaz çelik	1 spanç	225	24-30
	Yalıtımlı beton	1 spanç	100	24-30
	Plastik[c]	1 svab	10	24-30

AOAC validasyonuna yönelik tüm numuneler, aksi belirtilmedikçe sindirme yoluyla homojenize edilmi□tir.

(a) Half Fraser ve Fraser Broth birincil veya ikincil zenginle□tirme sırasında daima Fraser Broth supplementi (amonyum ferrik sitrat) ile desteklenmelidir.

(b) Numuneyi elle karı□tırma yoluyla homojenize edin.

(c) Numuneyi vorteksleme yoluyla homojenize edin.

AFNOR Certification ile NF VALIDATION

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

Validasyonun biti□ tarihi ve geçerlili□i ile ilgili daha fazla bilgi için lütfen yukarıda bahsi geçen web sitesindeki NF VALIDATION sertifikasına bakın.

ISO 11290[3] ile kıyaslandı□ında ISO 16140-2[6] uyarınca NF VALIDATION sertifikalı yöntem
Validasyonun kapsamı: Tüm insan yiyece□i numuneleri ve çevresel numuneler (birincil üretim numuneleri hariç)
Numune hazırlama: Numuneler EN ISO 11290-1[3] ve EN ISO 6887[8]'e uygun □ekilde hazırlanmalıdır
Yazılım sürümü: Sertifikaya bakın

Tablo 4: 37±1°C'de gerekti□i □ekilde Half Fraser Broth ve Fraser Broth kullanılan NF VALIDATION sertifikalı yöntem Neogen 01/15-09/16'ya göre zenginle□tirme protokolleri.

Genel Protokol	Numune Boyutu	Zenginle□tirme Besiyerinin Hacmi (mL)	Zenginle□tirme Sıcaklı□ı (±1°C)	Zenginle□tirme Süresi (saat)	Numune Analiz Hacmi[a]	Kabul Edilen Kesinti Noktası
Tüm yiyecek numuneleri (ham etler, ham deniz ürünleri ve ham süt ürünleri hariç)	25 g	225	37	24-30	20 µL	• 72 saate kadar Half Fraser Broth • -20°C'de lizat • 4°C'de 72 saate kadar lizat
Çevresel numuneler	25 g, 1 svab veya 1 tek kullanımlık havlu					

Spesifik Protokol	Birincil Zenginle□tirme (Half Fraser Broth)[b]				□kincil Zenginle□tirme (Fraser Broth)[b]				Kabul Edilen Kesinti Noktası
	Numune Boyutu	Zenginle□tirme Besiyerinin Hacmi (mL)	Zenginle□tirme Sıcaklı□ı (±1°C)	Zenginle□tirme Süresi (saat)	Numune Boyutu	Zenginle□tirme Sıcaklı□ı (±1°C)	Zenginle□tirme Süresi (saat)	Numune Analiz Hacmi[c]	
Ham etler, ham deniz ürünleri ve ham süt ürünleri	25 g	225	37	20-24	0,1 mL'yi 10 mL Fraser Broth'a aktarın	37	20-24	10 µL	• 72 saate kadar Fraser Broth • -20°C'de lizat • 4°C'de 72 saate kadar lizat

(a) Neogen Lizis Solüsyonu tüplerine aktarılan numune hacmi. Lizis bölümü Adım 4.6'ya bakın.

(b) Half Fraser ve Fraser Broth birincil veya ikincil zenginle□tirme sırasında daima Fraser Broth supplementi (amonyum ferrik sitrat) ile desteklenmelidir.

(c) Neogen Lizis Solüsyonu tüplerine aktarılan numune hacmi. Lizis bölümü Adım 4.6'ya bakın.

NOT: 25 g'dan büyük numuneler NF validation çalı□masında test edilmemi□tir.

Neogen® Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi'nin Hazırlanması

1. Bir bezi %1-5 (suda v:v) çama□ır suyu solüsyonuyla veya e□de□er bir solüsyonla ıslatın ve Neogen® Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi'ni silin.
2. Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi'ni su ile durulayın.
3. Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi'ni kurulamak için tek kullanımlık bir havlu kullanın.
4. Kullanmadan önce, Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi'nin kuru oldu□undan emin olun.

Neogen® Moleküler Tayin So□utma Blo□u Ek Parçası'nın Hazırlanması

Neogen® Moleküler Tayin So□utma Blo□u'nu do□rudan laboratuvar tezgahına koyun; So□utma blo□unu laboratuvar ortam sıcaklı□ında (20-25°C) kullanın.

Neogen® Moleküler Tayin Isıtma Blo□u Ek Parçası'nın Hazırlanması

Neogen® Moleküler Tayin Isıtma Blo□u Ek Parçası'nı kuru, çift bloklu bir ısıtma ünitesine yerle□tirin. Kuru bloklu ısıtma ünitesini çalı□tırın ve Neogen Moleküler Tayin Isıtma Blo□u Ek Parçası'nın 100±1°C'lik bir sıcaklı□a ula□masını ve bu sıcaklı□ı korumasını sa□lamak için sıcaklı□ı ayarlayın.

NOT: Isıtma ünitesine ba□lı olarak, Neogen Moleküler Tayin Isıtma Blo□u Ek Parçası'nın istenen sıcaklı□a ula□ması için yakla□ık 30 dakika bekleyin. Belirlenen yere yerle□tirilmi□ uygun, kalibre edilmi□ bir termometre (ör. tamamen daldırmalı termometre **de□il**, kısmi daldırmalı termometre veya dijital sıcaklık sensörlü termometre) kullanarak Neogen Moleküler Tayin Isıtma Blo□u Ek Parçası'nın 100±1°C'de oldu□unu do□rulayın.

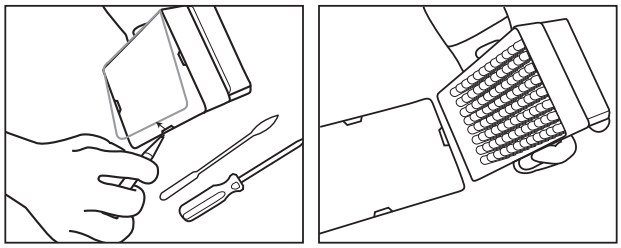
Neogen® Moleküler Tayin Cihazı'nın Hazırlanması

1. Neogen® Moleküler Tayin Sistemi Yazılımını ba□latın ve giri□ yapın. Yazılımın en güncel sürümüne sahip oldu□unuzdan emin olmak için Neogen Food Safety temsilcisiyle temas kurun.
2. Neogen Moleküler Tayin Cihazı'nı çalı□tırın.
3. Her bir numunenin verisiyle bir test olu□turun veya düzenleyin. Ayrıntılar için bkz. Neogen Moleküler Tayin Sistemi Kullanım Kılavuzu.

NOT: Reaksiyon tüpleri ile birlikte Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi yerle□tirilmeden önce, Neogen Moleküler Tayin Cihazı Hazır Duruma gelmelidir. Bu ısınma a□aması yakla□ık 20 dakika sürer ve cihazın durum çubu□unda TURUNCU bir ı□ıkla gösterilir. Cihaz bir çalı□mayı ba□latmaya hazır oldu□unda, durum çubu□u YE□□L renge döner.

Lizis

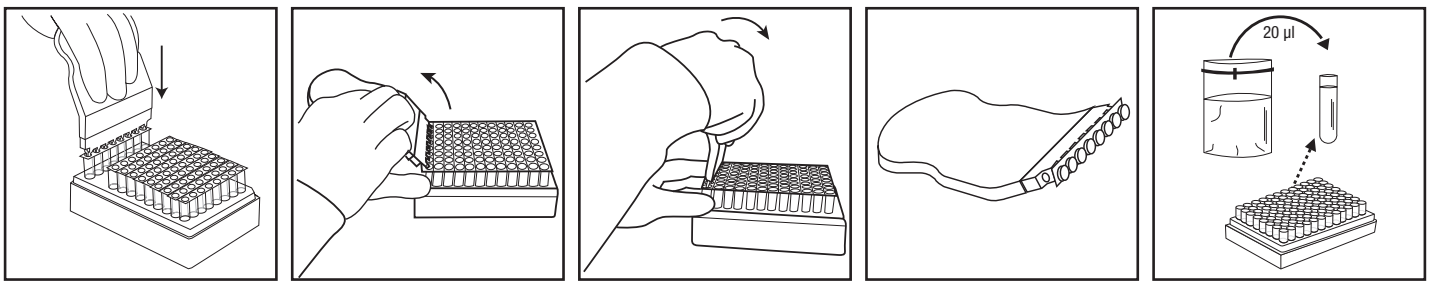
Neogen Lizis Solüsyonu Rafının alt kısmını Neogen Moleküler Tayin Isıtma Blo□u Ek Parçası'na yerle□tirmeden önce tornavida veya spatula ile sökün.



1. Rafı bir gece boyunca (16-18 saat) oda sıcaklı□ında (20-25°C) bekleterek lizis solüsyonu (Neogen Lizis Solüsyonu) tüplerinin ısınmasını sa□layın. Neogen Lizis Solüsyonu tüplerini oda sıcaklı□ına getirmek için alternatifler, Neogen Lizis Solüsyonu tüplerini en az 2 saat laboratuvar tezgahında bekletmek, Neogen Lizis Solüsyonu tüplerini inkübatörde 1 saat boyunca 37±1°C'de inkübe etmek veya kuru çift bloklu bir ısıtıcıya 100°C'de 30 saniyeli□ine yerle□tirmektir.
2. Karı□tırmak için kapaklı tüpleri ters çevirin. 4 saat içinde sıradaki adıma geçin.
3. Zenginle□tirme besiyerini inkübatörden çıkarın.
4. Her numune ve Negatif Kontrol (NC) numunesi (steril zenginle□tirme ortamı) için bir Neogen Lizis Solüsyonu tüpü gereklidir.
   4.1 Neogen Lizis Solüsyonu tüp □eritleri, istenen Neogen Lizis Solüsyonu tüp sayısı kadar kesilebilir. □htiyaç duyulan sayıda ayrı Neogen Lizis Solüsyonu tüpü veya 8 tüplük □eritler seçin. Neogen Lizis Solüsyonu tüplerini bo□ bir rafa koyun.
   4.2 Çapraz kontaminasyonu önlemek için Neogen Lizis Solüsyonu tüp □eritlerinin kapaklarını teker teker açın ve her aktarım a□aması için yeni bir pipet ucu kullanın.
   4.3 A□a□ıda açıklandı□ı gibi, zenginle□tirilmi□ numuneleri Neogen Lizis Solüsyonu Tüpleri'ne aktarın:

   □**lk olarak**, her bir zenginle□tirilmi□ numuneyi ayrı bir Neogen Lizis Solüsyonu tüpüne aktarın. **Son olarak** NC'yi aktarın.

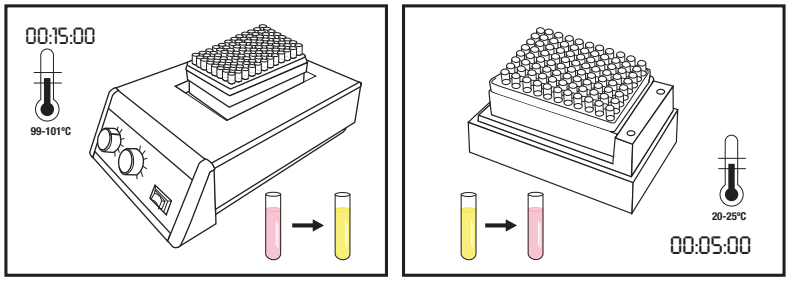
   4.4 Tek seferde bir □erit üzerinde çalı□arak, Neogen Lizis Solüsyonu tüp □eridinin kapa□ını sökmek için Neogen® Moleküler Tayin Kapak Takma / Kapak Sökme Aracı - Lizis'i kullanın.
   4.5 Neogen Lizis Solüsyonu tüp kapa□ını atın - lizat tekrar test edilmek üzere tutulacaksa lizisten sonra tekrar uygulama için kapakları temiz bir kaba koyun.
      4.5.1 Elde bulunan lizatın i□lenmesi için Ek A'ya bakın.
   4.6 Neogen Lizis Solüsyonu tüpüne, Tablo 2, 3 veya 4'teki Protokollerde aksi belirtilmedikçe 20 µL numune aktarın (ör. ham süt ürünleri veya çevresel numuneleri nötrle□tirici tamponla kullanırken 10 µL kullanın).



5. Her bir ayrı numune □eritteki ilgili Neogen Lizis Solüsyonu tüpüne eklenene kadar 4.4 ila 4.6 adımlarını tekrarlayın.
6. Tüm numuneler aktarıldı□ında, 20 µL NC'yi (Half Fraser Broth gibi steril zenginle□tirme ortamı) bir Neogen Lizis

Solüsyonu tüpüne aktarın. NC olarak su kullanmayın.

7. Neogen Moleküler Tayin Isıtma Blo□u Ek Parçası sıcaklı□ının 100±1°C'de oldu□unu do□rulayın.
8. Üstü açık Neogen Lizis Solüsyonu tüpleri rafını Neogen Moleküler Tayin Isıtma Blo□u Ek Parçası'na yerle□tirin ve 15±1 dakika boyunca ısıtın. Isıtma boyunca, Neogen Lizis Solüsyonunun rengi pembeden (so□uk) sarıya (sıcak) dönecektir.
   8.1 Lizis test a□aması sırasında do□ru □ekilde ısıl i□leme tabi tutulmayan numuneler, olası bir biyolojik tehlike olarak dü□ünülebilir ve Neogen Moleküler Tayin Cihazı'na YERLE□T□R□LMEMEL□D□R.
9. Üstü açık Neogen Lizis Solüsyonu tüplerinin rafını ısıtma blo□undan çıkarın ve Neogen Moleküler Tayin So□utma Blo□u Ek Parçası'nda en az 5, en fazla 10 dakika so□umasını bekleyin. Ortam sıcaklı□ında kullanılan Neogen Moleküler So□utma Blo□u Ek Parçası, laboratuvar tezgahına do□rudan yerle□tirilmelidir. So□udu□unda, lizis solüsyonunun rengi tekrar pembeye dönecektir.
10. Neogen Lizis Solüsyonu tüp rafını Neogen Moleküler Tayin So□utma Blo□u Ek Parçası'ndan çıkarın.



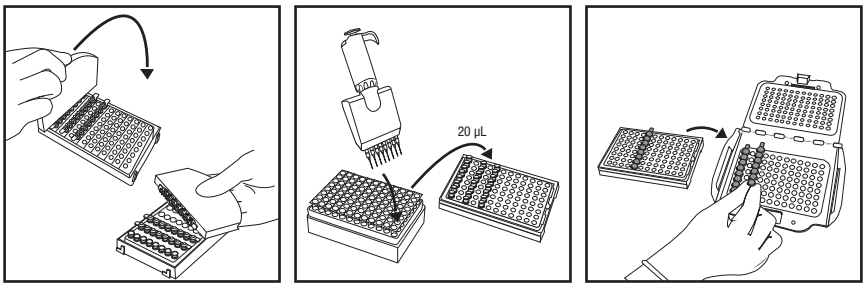
Amplifikasyon

1. Her bir numune ve NC için bir Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 Reaktif Tüpü gereklidir.
   1.1 Reaktif tüpü □eritleri istenen tüp sayısı kadar kesilebilir. Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 Reaktif Tüpleri veya gereken 8'li tüp □eritlerinin sayısını seçin.
   1.2 Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 Reaktif Tüplerini bo□ bir rafa yerle□tirin.
   1.3 Tüplerin dip tarafındaki reaktif pelletlerini karı□tırmaktan kaçının.
2. 1 adet Neogen Reaktif Kontrolü tüpü seçin ve rafa yerle□tirin.
3. Çapraz kontaminasyonu önlemek için tek seferde yalnızca bir Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 Reaktif Tüpü □erit kapa□ını açın ve her aktarım a□aması için yeni bir pipet ucu kullanın.
4. Lizatı Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 Reaktif Tüpü ile Neogen Reaktif Kontrolü tüpüne a□a□ıda açıklanan □ekilde aktarın:

Her bir numune lizatını **önce** her bir Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 Reaktif Tüpüne, ardından NC'ye aktarın. Neogen Reaktif Kontrolü tüpünü **en son** hidratlayın.

5. Neogen® Moleküler Tayin Kapak Takma / Kapak Sökme Aracı - Reaktif'i kullanarak, Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 Reaktif Tüplerinin kapa□ını, tek seferde tek Reaktif tüpü □eridi olacak □ekilde çıkarın. Kapa□ı atın.
   5.1 **20 µL Numune lizatını, Neogen Lizis Solüsyonu tüpündeki sıvının ½'lik üst kısmından (çökeltiyi önleyerek) ilgili Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 Reaktif Tüpüne aktarın. Pelletlerin karı□masını önlemek için açılı olarak dökün. Yukarı ve a□a□ı 5 kez pipetleyerek nazikçe karı□tırın.**
   5.2 □eritte kar□ılık gelen Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 Reaktif Tüpüne tek Numune lizatı eklenene kadar adım 5.1'i tekrarlayın.
   5.3 Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 Reaktif Tüplerini, tedarik edilen ilave kapaklar ile kapatın ve kapa□ın sıkı bir □ekilde kapatıldı□ından emin olmak amacıyla, ileri geri hareketle basınç uygulamak üzere Neogen Moleküler Tayin Kapak Takma / Kapak Sökme Aracı - Reaktif'in yuvarlak tarafını kullanın.
   5.4 Test edilecek numune sayısı için 5.1 ila 5.3 adımlarını gerekti□i □ekilde tekrar edin.
   5.5 Tüm numune lizatları aktarıldı□ında, adım 5.1'i tekrarlayarak 20 µL NC lizatı bir Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 Reaktif Tüpüne aktarın.
   5.6 **20 µL NC lizatı bir Neogen Reaktif Kontrolü tüpüne** aktarın. Pelletlerin karı□masını önlemek için açılı olarak dökün. Yukarı ve a□a□ı 5 kez pipetleyerek nazikçe karı□tırın.

6. Kapağı takılmış olan tüpleri temiz ve dekontamine edilmiş bir Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi'ne yükleyin. Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi kapağını kapatın ve mandalını kilitleyin.



7. Neogen Moleküler Tayin Sistemi Yazılımında yapılandırılmış çalışmayı gözden geçirin ve onaylayın.
8. Yazılımdaki Start (Başlat) düğmesine tıklayın ve kullanılacak cihazı seçin. Seçilen cihazın kapağı otomatik olarak açılır.
9. Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi'ni Neogen Moleküler Tayin Cihazı'na yerleştirin ve testi başlatmak üzere kapağı kapatın. Pozitif sonuçlar daha önce tespit edilebilmekle beraber, sonuçlar 75 dakika içinde elde edilir.
10. Test tamamlandıktan sonra, Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi'ni Neogen Moleküler Tayin Cihazı'ndan çıkarın ve tüpleri 1 saat boyunca %1-5'lik (suda v:v) çamaşır suyu solüsyonuna veya eşdeğer bir solüsyona daldırarak test hazırlık alanından uzakta imha edin.

BİLDİRİM: Çapraz kontaminasyondan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçların elde edilmesi riskini en aza indirmek için amplifiye edilmiş DNA'yı içeren reaktif tüplerini hiçbir zaman açmayın. Buna Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 Reaktif Tüpleri, Neogen Reaktif Kontrolü ve Matris Kontrol Tüpleri dahildir. Ağzı sızdırmaz bir şekilde kapatılmış reaktif tüplerini her zaman %1-5'lik (suda v:v) bir çamaşır suyu solüsyonunda veya eşdeğer bir solüsyonda 1 saat süreyle bekleterek ve test hazırlık alanından uzakta imha edin.

Sonuçlar ve Yorumlama

Bir algoritma, nükleik asit amplifikasyonu tayininden kaynaklanan ışık çıkışı eğrisini yorumlar. Sonuçlar yazılım tarafından otomatik olarak analiz edilir ve sonuca göre renk kodlamasına tabi tutulur. Benzersiz eğri parametreleri sayısı analiz edilerek Pozitif veya Negatif bir sonuç belirlenir. Negatif sonuçlar ve Kontrol sonuçları çalışma tamamlandıktan sonra gösterilirken, olası pozitif sonuçlar gerçek zamanlı olarak bildirilir.

Olası pozitif numuneler, birincil zenginleştirmeden ikincil zenginleştirme besiyerine (varsa) aktarılması, ardından kaplama ve uygun biyokimyasal ve serolojik yöntemler kullanılarak izolatların onaylanması gibi işlemlerle başlayarak standart laboratuvar prosedürlerine veya uygun referans doğrulama yöntemine[1, 2, 3] uygun şekilde doğrulanmalıdır.

NOT: Sistem ve Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 amplifikasyon reaktifleri bir "arka plan" başıl ışık birimine (RLU) sahip olduğu için negatif bir numune bile sıfır okuma sonucu vermeyecektir.

Nadir olarak olağan dışı ışık çıkışı durumunda, algoritma bu durumu "Kontrol" olarak etiketler. Neogen, tüm Kontrol numuneleri için kullanıcının testi tekrarlamasını önerir. Kontrol sonucu almaya devam ederseniz tercih ettiğiniz yöntemi kullanarak veya yerel düzenlemeler ile belirlendiği şekilde, doğrulama testine geçin.

Tablo 5: Neogen Moleküler Tayin Sistemi Yazılımı tarafından sağlanan numuneler için sonuç sembolleri ve yorumlama.

Yuva Tipi	Yuva Sonucu Sembolü	Sonuç	Yorumlama
Numune	+	Pozitif	Numune hedef patojen için olası pozitiftir.
Numune	−	Negatif	Numune hedef patojen için negatiftir.
Numune	⊘	İnhibe olmuş	Numune matrisi testi inhibe edici. Tekrar test etmek gerekebilir. Daha fazla bilgi için sorun giderme bölümüne ve tayin kiti Ürün Talimatlarına bakın.
Numune	?	Kontrol	Hedef patojenin varlığı veya yokluğu belirsiz. Tekrar test etmek gerekebilir. Daha fazla bilgi için sorun giderme bölümüne ve tayin kiti Ürün Talimatlarına bakın.
Numune	⊘	Hata	Biyoluminesans tespit edilmedi. Tekrar test etmek gerekebilir. Daha fazla bilgi için sorun giderme bölümüne ve tayin kiti Ürün Talimatlarına bakın.

NF VALIDATION Sertifikalı Yönteme göre Sonuçların Do□rulanması

1. seçenek: Half Fraser zenginle□tirmesinden ba□layarak ISO 11290[3] standardının kullanılması.

2. seçenek: *Listeria monocytogenes*'in tespiti için NF VAL□DASYON yönteminin bir parçası olarak onaylanmı□ PALCAM agar veya kromojenik agar (O&A) üzerinde izolasyon yoluyla. Karakteristik kolonilerin varlı□ı *Listeria monocytogenes* varlı□ının onaylanması için yeterlidir.

3. seçenek: Seçici agardan izole edilmi□ kolonilerde uygulanan, EN ISO 7218[5] standardında tarif edilen □ekilde nükleik asit problarını kullanma (bkz. 1. veya 2. seçenek).

4. seçenek: Prensibi Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 ürününden farklı olması gereken ba□ka bir NF VALIDATION onaylı yöntemi kullanarak. Bu ikinci do□rulanmı□ yöntem için açıklanan tüm protokol kullanılmalıdır. Do□rulamaya ba□lamadan önceki tüm adımlar her iki yöntemde de ortak olmalıdır.

Uyumsuz sonuçlar halinde (alternatif yöntem ile olası pozitif, yukarıda tanımlanan yöntemlerden biri ile do□rulanmamı□) laboratuvar, elde edilen sonucun geçerlili□ini do□rulamak için gerekli adımları izlemelidir.

Uyumsuz sonuçlar halinde (Neogen Moleküler Tayin Testi *Listeria monocytogenes*-2 ile olası pozitif, yukarıda tanımlanan yöntemlerden biri ile do□rulanmamı□) laboratuvar, elde edilen sonucun geçerlili□ini do□rulamak için gerekli adımları izlemelidir.

Belirli uygulamalar veya prosedürler hakkında sorularınız varsa www.neogen.com adresindeki web sitemizi ziyaret edin veya yerel Neogen temsilcisi ya da distribütörü ile ileti□im kurun.

Ek A. Protokol Kesintisi: Isıl i□lem görmü□ lizatların saklanması ve yeniden test edilmesi.

1. Isıl i□lem görmü□ lizatı saklamak için lizis tüpünü temiz bir kapakla kapatın (bkz. “Lizis”, 4.5).
2. 72 saate kadar 4-8°C sıcaklıkta saklayın.
3. Saklanan numuneyi, karı□tırmak üzere 2-3 kez ters yüz ederek amplifikasyon için hazırlayın.
4. Tüplerin kapaklarını çıkarın.
5. Karı□tırılan lizat tüplerini Neogen Moleküler Tayin Isıtma Blo□u Ek Parçası üzerine yerle□tirin ve 5±1 dakika 100±1°C’de ısıtın.
6. Neogen Lizis Solüsyonu tüplerinin rafını ısıtma blo□undan çıkarın ve Neogen Moleküler Tayin So□utma Blo□u Ek Parçası’nda en az 5, en fazla 10 dakika so□umasını bekleyin.
7. Protokole, yukarıda detayları verilen ‘Amplifikasyon’ bölümünden devam edin.

Referanslar:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Ürün Etiketi Sembollerinin Açıklaması

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

FS00867C

NEOGEN

発行日：2024-01

製品情報

病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*

製品の概要および用途

Neogen®病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*は、Neogen®病原菌自動検出システムを用いて前培養した食品・環境検体中の*リステリア・モノサイトゲネス*を迅速かつ特異的に検出するために使用します。Neogen 病原菌検出アッセイは、増幅した菌を検出するために、高い特異性と感度で核酸配列を迅速に増幅する遺伝子等温増幅法と、生物発光を組み合わせています。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、別の望ましい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[1,2,3]。

Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*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。たとえば、Neogenは、本製品を水、医薬品、化粧品、臨床または動物検体の検査に使用することについては検証しておりません。Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*は、可能性のあるすべての検査プロトコル、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、増菌ブロスのメーカーや組成、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、検体の準備、取り扱い、および検査手技などの要因も結果に影響する場合もあります。Neogenは、検査方法がお客様の基準を確実に満たすように、お客様の環境において、特定の食品および菌株を用いて十分な数の検体で、増菌ブロスを含む検査方法を評価することをお勧めします。

NeogenはNeogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*を、必要に応じてクエン酸鉄アンモニウムを含有するデミフレーザーブロスおよびクエン酸鉄アンモニウムを含有するフレーザーブロスを用いて評価しました。このブロスの典型的な組成は以下の通りです。

デミフレーザーブロスベースの典型的な組成	(g/L)	フレーザーブロスベースの典型的な組成	(g/L)
塩化ナトリウム	20 g	塩化ナトリウム	20 g
無水二塩基性リン酸ナトリウム*	9.6 g	無水二塩基性リン酸ナトリウム*	9.6 g
牛肉エキス	5.0 g	牛肉エキス	5.0 g
カゼイン膵臓消化物	5.0 g	カゼイン膵臓消化物	5.0 g
動物組織ペプシン消化物	5.0 g	動物組織ペプシン消化物	5.0 g
酵母エキス	5.0 g	酵母エキス	5.0 g
塩化リチウム	3.0 g	塩化リチウム	3.0 g
一塩基性リン酸カリウム	1.35 g	一塩基性リン酸カリウム	1.35 g
エスクリン	1.0 g	エスクリン	1.0 g
塩酸アクリフラビン	0.0125 g	塩酸アクリフラビン	0.025 g
ナリジクス酸	0.01 g	ナリジクス酸	0.02 g

***** 代用物：二塩基性リン酸ナトリウム二水和物　12.0 g

フレーザーブロス添加剤

（10 mLバイアル当たりの成分。基本ブロス1 Lに対し1バイアルを追加）

クエン酸鉄アンモニウム　0.5 g/10 mL

最終pH　25°Cで7.2 ± 0.2

Neogen®病原菌自動検出システムの装置は、アッセイのライシスステップ中に加熱処理を行った検体を測定することを目的としており、検体中に存在する微生物を溶菌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加熱処理を行っていない試料液は、潜在的バイオハザードとみなされる可能性がありますので、Neogen 病原菌自動検出システムの装置内には入れないでください。

Neogen食品衛生管理製品部門は、設計と製造についてISO（国際標準化機構）9001認証を取得しています。

Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*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	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検査分（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 - *リステリア・モノサイトゲネス用*試薬チューブ	黄色のチューブ	96検査分（8連チューブ12セット）	凍結乾燥済み特異的増幅試薬および検出試薬	調整済み
予備キャップ	黄色のキャップ	96検体分（8連キャップ12セット）		調整済み
Neogen® リージェントコントロール (RC)	フリップトップ式クリアチューブ	16検査分（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（キットには付属しません）は、デミフレーザーブロスなどの滅菌済増菌ブロスです。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 - *リステリア・モノサイトゲネス用*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、今後参照できるように、この安全性指示を保管しておいてください。

⚠ **警告：** 警告は、それを避けなければ死亡または重篤な傷害ないし物的損害が発生しうる危険な状況を示します。

注記： 回避しないと、物的損害が起こり得る危険な状況を示します。

⚠ 警告

Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*は、ヒトまたは動物の病態診断に使用しないでください。

Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*を用いた方法により、暴露されると妊婦の死産または死亡ならびに免疫不全状態の人の死亡を十分引き起こすレベルの*リステリア・モノサイトゲネス*が生じることがあります。

検査実施担当者に適切な検査技術を身につけるように指導してください（例：GLP、ISO/IEC 17025[4]、ISO 7218[5]）。

汚染製品の出荷につながる偽陰性結果に伴う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 - *リステリア・モノサイトゲネス用*は、外箱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 - *リステリア・モノサイトゲネス用*は、必ず有効期限までに使用してください。
- Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*は、社内検証または第三者による検証が行われた食品検体および環境検体に使用してください。
- Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*は、社内検証または第三者による検証が行われた表面、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を含む環境検体については、試験前に1:2の希釈（検体1に対して滅菌増菌ブロス1）を行ってください。別の方法としては、中和緩衝前増菌ブロス10 µLをNeogen ライシスチューブに滴下します。Neogen®検体採取製品のうち、アリルスルホン酸塩添加中和緩衝液を含む製品は以下の通りです。RS96010NB、RS9604NB、SSL10NB、SSL10NB2G、HS10NB、HS10NB2G、HS2410NB2G。

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：

- *リステリア・モノサイトゲネス*への暴露による母体回旋により発育中の胎児へのリスクが生じることを検査室の女性スタッフに伝えることを強く推奨します。
- 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。培養済み増菌ブロスおよび培養済み増菌ブロス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。
- 増菌後のブロスや、増幅後の試薬チューブ内容物には触れないでください。
- 現行の業界基準に従って、増菌された検体を廃棄してください。
- 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可能性がありますので、Neogen 病原菌自動検出システムの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混入防止のため）。

環境汚染に伴う危険を回避するために：

- 汚染廃棄物の廃棄は現行の業界基準に従ってください。

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。
- 適切な校正済みの温度計を使用して、Neogen® 病原菌検出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 病原菌検出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。
- 滅菌済みのエアロゾルバリア材（フィルター付）、分子生物学グレードのピペットチップを使用してください。
- 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ブロスからライシスチューブに移してください。ピペッターの汚染を回避するため、中間的な移注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分注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。検査室の作業台および備品（ピペット、キャップ / デキャップツール等）は、水で1～5% (v/v) に希釈した家庭用漂白液またはDNA除去用液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：

- 増幅後の試薬チューブは絶対に開けないでください。
- 汚染されたチューブは、常に、水で1～5% (v/v) に希釈した家庭用漂白液または同等品に1時間浸漬した後、アッセイの準備作業領域から隔離して、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でください。

廃棄に関する詳細および行政の規制については、安全データシートをご参照ください。

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 (www.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、使用前に製品説明書および製品情報を熟知していただく責任があります。詳細につきましては、当社ウェブサイト **www.neogen.com** をご覧いただくか、担当のNeogen販売担当者または販売店にお問い合わせください。

検査方法を選択する際には、検体採取方法、検査プロトコル、検体の準備、取り扱い、および検査手技などの外的要因が結果に影響する可能性があることを認識することが重要です。

検査方法または製品を選択する際に、適切なマトリックスおよび菌株を用いて十分数の検体を評価して、選択した試験方法がお客様の基準を満たすことをお客様の責任でご確認ください。

また、検査方法および結果が取引先または供給業者の要件を満たしているかについても、事前にお客様の責任でご確認ください。

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用いて得られた結果は、検査を実施した食品マトリックスまたは工程の品質を保証するものではありません。

各種食品マトリックスの検査方法の評価にご利用いただくため、NeogenではNeogen® 病原菌検出マトリックスコントロールをご用意しました。必要に応じて、マトリックスコントロール (MC) を使用し、基質がNeogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*の検査結果に影響を及ぼすかどうかをご確認ください。Neogenの検査法を採用する場合、または新規や由来の不明なマトリックス、あるいは原材料を加工したマトリックスや加工工程が変更されたマトリックスを検査する場合は、検証期間中に、マトリックスの標準となる複数の検体（由来の異なる検体）をご確認ください。

マトリックスは、成分や加工状態など固有の特性を備える製品の種類として定義されます。基質間の違いは、加工や外観（例：生か滅菌済みか、新鮮か乾物か、等）の違いに起因する作用と同じように単純な場合があります。

保証の範囲／賠償の制限

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、製品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、いかなる種類の保証も負いかねます。Neogen食品衛生管理製品部門の製品に欠陥があった場合、Neogenまたは指定販売店で交換あるいは製品購入価格の払い戻しをいたします。対応は上記のみとさせていただきます。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の保証責任範囲

NEOGENは、直接的、間接的、特殊なもの、偶発的または必然的であるかを問わず、利益損失を含むがこれに限定されないあらゆる損失または損害に対しての責任を負わないものとします。いかなる場合も、いかなる法的理論の下でも、Neogenの保証責任範囲は、欠陥と申し立てられた製品の購入金額を超えないものとします。

保管と廃棄

Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*は2～8°Cで保管し、冷凍しないでください。冷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。

Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*は必ず使用期限までに使用してください。使用期限とロット番号は箱の外側のラベルに記載しています。使用後、増菌ブロスおよびNeogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*には病原性の物質が含まれている可能性があります。検査終了後は、汚染廃棄物に関する現行の業界基準に従って廃棄してください。廃棄に関する詳細および行政の規制については、安全データシートをご参照ください。

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。

検査室の作業台および備品（ピペット、キャップ / デキャップツール等）は、水で1～5% (v/v) に希釈した家庭用漂白液またはDNA除去用液を使用して定期的に除染してください。

ユーザーは、「Neogen 病原菌自動検出システムの設置資格 (IQ)／操作資格 (OQ) プロトコルと手順」[6]に記載のとおり、Neogen®病原菌自動検出システムのオペレーター資格 (OQ) トレーニングを受講する必要があります。

具体的な要件については、「バリデート済みメソッドに関する具体的な指示」の項を参照してください：

表3. AOAC® *Official Method of Analysis℠* **2016.08**およびAOAC® *Performance Tested Method℠* Certificate **#081501**に従う前増菌プロトコル。

表4. NF Validation認定証**3M 01/15-09/16**に従う前増菌プロトコル。

検体の増菌

表2、3、4に、食品および環境検体の増菌に関するガイダンスを示います。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、別の採取プロトコルまたは希釈率で事前にご確認いただき、お客様の責任で使用の可否をご判断ください。

食品

1. デミフレーザーブロス前増菌ブロス（クエン酸鉄アンモニウムを含む）を検査室の周囲の温度と平衡させてください。
2. 表2、3、4に従って、前増菌ブロスと検体を無菌的に混合します。すべての肉検体および微粒子を多く含む検体に関しては、フィルター付きホモジナイザーバッグの使用を推奨します。
3. ブレンダー、混合装置またはハンドミキサーで2 ± 0.2分ホモジナイズします。表2、3、4に従って、37 ± 1°Cで培養します。
4. 生の乳製品については（表2、3、4を参照）、一次前増菌物0.1 mLを10 mLのフレーザーブロスに移します。37 ± 1°Cで20～24時間培養します。

環境検体

殺菌剤の効果を不活性化するために、検体採取装置として、中和溶液を染み込ませたスポンジを使用できます。Neogenは、殺生物剤不使用のセルローススポンジを使用することを推奨します。中和溶液には、デイエングレイ (D/E) 中和ブロスまたはリージンブロスを使用できます。採取後は、作業領域を殺菌することを推奨します。

警告：アリルスルホン酸複合体をスポンジの水和溶液として含む中和バッファーの使用を選択する場合には、汚染された製品の出庫につながる偽陰性の伴うリスクを回避するために、検査を行う前に増菌環境検体の1：2の希釈液（検体1に対し滅菌増菌ブロス1）を行う必要があります。別の方法としては、中和緩衝液増菌ブロス10 µLをNeogenライシスチューブに移します。

表面上の病原体の有無を確認するための検体採取部分の推奨サイズは、100 cm^2（10 cm x 10 cmまたは4” x 4”）です。スポンジで検体採取する場合には、採取部分全体をスポンジで2方向に拭くか（左から右、次に上向きから下向きに）、検査室の現行のプロトコルまたはFDA BAM[1]、USDA FSIS MLG[2]またはISO 18593[7]に従って環境検体を採取します。

1. デミフレーザーブロス前増菌ブロス（クエン酸鉄アンモニウムを含む）を検査室の周囲の温度と平衡させてください。
2. 表2、3、4に従って、前増菌ブロスと検体を無菌的に混合します。
3. ブレンダー、混合装置またはハンドミキサーで2 ± 0.2分ホモジナイズします。表2、3、4に従って、37 ± 1°Cで24～30時間培養します。

表2: 必要に応じてデミフレーザーブロスおよびフレーザーブロスを使用して37 ± 1°Cで実施する一般前増菌プロトコル。

検体マトリックス	検体量	前増菌ブロス量 (mL)	前増菌時間（時間）
熱処理済み、調理済みまたは塩漬けした肉、鶏肉、魚介類 熱処理済み/低温殺菌済み乳製品 果実および野菜 多成分食品	25 g	225	24～30
環境検体[a]	スポンジ1個	100または225	24～30
	スワブ1本	10	24～30
生の肉、鶏肉、魚介類	25 g	475	28～32

検体マトリックス	一次前増菌（デミフレーザーブロス）[a]			二次前増菌（フレーザーブロス添加剤）[a]			検体の分析量[b]
	検体量	前増菌ブロス量 (mL)	前増菌時間（時間）	検体量	前増菌温度 (°C)	前増菌時間（時間）	
生の乳製品	25 g	225	20～24	0.1 mLを10 mLのフレーザーブロスに移す	37±1	20～24	10 µL

(a) 一次または二次前増菌中に、デミフレーザーブロスおよびフレーザーブロスに必ずフレーザーブロス添加剤（クエン酸鉄アンモニウム）を添加します。

(b) Neogenライシスチューブに移す検体量。ライシスセクションのステップ4.6を参照。

バリデート済みメソッドに関する具体的な指示

AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2016.08

AOAC® *Performance Tested Method*℠ #081501

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 081501

AOAC Research Institute OMA℠およびPTM℠プログラムにおいて、Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*は、*リステリア・モノサイトゲネス*の検出に有効な方法であることが確認されています。上記試験において検査の対象となったマトリックスを表3に掲載します。

表3. AOAC OMA℠ 2016.08およびPTM℠ Certificate #081501に従い、デミフレーザーブロス[a]を使用し37 ± 1°Cで実施する前増菌プロトコル。

検体マトリックス		検体量	前増菌ブロス量 (mL)	前増菌時間（時間）
ビーフホットドッグ、ケソ・フレスコ、バニラアイスクリーム、乳脂肪4%のカッテージチーズ、3%のチョコレート入り全乳、ロメインレタス、袋入り生ホウレンソウ、冷燻サーモン		25 g	225	24～30
生鶏肉		25 g	475	28～32
ターキー総菜		125 g	1125	24～30
マスクメロン[b]		ホールメロン	メロンが浮かぶ十分な量	26～30
環境検体：	ステンレススチール	スポンジ1個	225	24～30
	密封コンクリート	スポンジ1個	100	24～30
	プラスチック[c]	スワブ1本	10	24～30

特に記載がない限り、AOACバリデーションに使用した検体はすべてストマッキングによりホモジナイズしました。

(a) 一次または二次前増菌中に、デミフレーザーブロスおよびフレーザーブロスに必ずフレーザーブロス添加剤（クエン酸鉄アンモニウム）を添加します。

(b) ハンドミキサーで検体をホモジナイズします。

(c) ボルテックスにかけて検体をホモジナイズします。

AFNOR CertificationによるNF Validation

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

有効性の終了についての詳細は、上記のウェブサイト上で入手できるNF Validation認定証を参照してください。

NF VALIDATIONにより認証された方法は、ISO 11290[3]ではなくISO 16140-2[6]に準拠しています
バリデーションの適応範囲：すべての人用食品検体および環境検体（一次生産サンプルを除く）
検体の準備：検体はEN ISO 11290-1[3]およびEN ISO 6887[8]に従って調製してください
ソフトウェアバージョン：認定証を参照してください

表4：NF VALIDATIONにより認証されたメソッド3M 01/15-09/16（必要に応じてデミフレーザーブロスおよびフレーザー ブロスを使用して37 ± 1°Cで実施）に従う前増筋プロトコル。

一般プロトコル	検体量	前増菌ブロス量 (mL)	前増菌温度 (±1°C)	前増菌時間（時間）	検体の分析量[a]	許容される中断ポイント
すべての食品サンプル（生肉、生の魚介類、生の乳製品を除く）	25 g	225	37	24～30	20 µL	• デミフレーザーブロス、最長72時間 • -20°Cでライセート • 4°Cで最長72時間ライセート
環境検体	25 gスワブ1本またはワイプ1枚					

具体的なプロトコル	一次前増菌（デミフレーザーブロス）[b]				二次前増菌（デミフレーザーブロス）[b]				許容される中断ポイント
	検体量	前増菌ブロス量 (mL)	前増菌温度 (±1°C)	前増菌時間 (時間)	検体量	前増菌温度 (±1°C)	前増菌時間 (時間)	検体の分析量[c]	
生肉、生の魚介類、生の乳製品	25 g	225	37	20～24	0.1 mL を10 mL のフレーザーブロスに滴下	37	20～24	10 µL	• フレーザーブロス、最長72時間 • -20°Cでライセート • 4°Cで最長72時間ライセート

(a) Neogenライシスチューブに移す検体量。ライシスセクションのステップ4.6を参照。

(b) 一次または二次前増菌中に、デミフレーザーブロスおよびフレーザーブロスに必ずフレーザーブロス添加剤（クエン酸鉄アンモニウム）を添加します。

(c) Neogenライシス液チューブに移す検体量。ライシスセクションのステップ4.6を参照。

注： 25 gを超える検体は、NF VALIDATION検査で評価されていません。

Neogen® 病原菌検出スピードローダートレイ

1. 水で1～5% (v/v) に希釈した家庭用漂白液または同等の溶液で湿らせた布を使ってNeogen® 病原菌検出スピードローダートレイを拭きます。
2. 水でNeogen 病原菌検出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でNeogen 病原菌検出スピードローダートレイを拭きます。
4. 使用前に、Neogen 病原菌検出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。

Neogen® 病原菌検出チルブロックインサート

Neogen®病原菌検出チルブロックを検査室の作業台に直に置きます。チルブロックは検査室の室温（20～25°C）で使用します。

Neogen® 病原菌検出ヒートブロックインサート

Neogen® 病原菌検出ヒートブロックインサートをドライダブルブロックインサート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 病原菌検出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っては、Neogen 病原菌検出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。適切な校正済みの温度計（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 病原菌検出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。

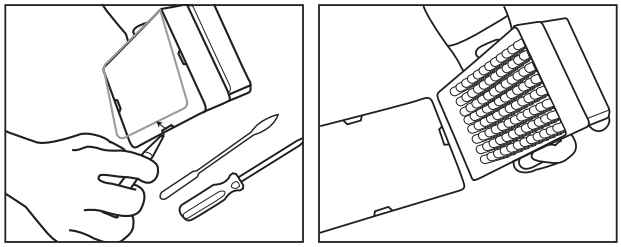
Neogen®病原菌自動検出システム用の準備

1. Neogen®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食品衛生管理製品の営業担当者までお問い合わせください。
2. Neogen 病原菌自動検出システムの装置の電源を入れます。
3. 各検体のデータを含む検出結果を作成または編集します。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 病原菌自動検出システムは、反応チューブと共にNeogen 病原菌検出スピードローダートレイを入れる前に、スタンバイ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、この間、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

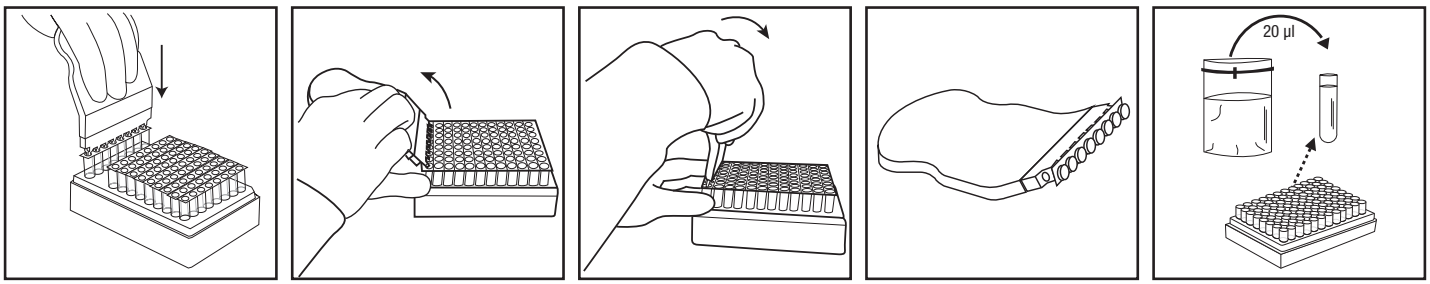
Neogen 病原菌検出ヒートブロックインサートに入れる前に、ドライバーまたはスパーテルでNeogenライシスチューブラックの底部をドライバーまたはヘラで取り外します。



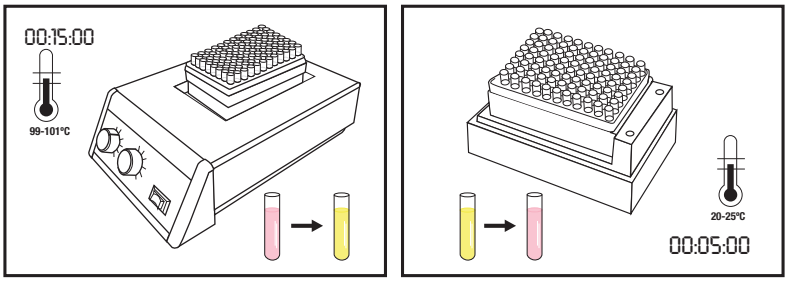
1. ライシス（Neogenライシス液）チューブは、ラックに入れ室温（20～25°C）で一晩（16-18時間）静置し、室温まで暖めます。Neogenライシスチューブを室温に戻す別の方法としては、Neogenライシスチューブを作業台の上に2時間以上静置するか、Neogenライシスチューブを37 ± 1°Cのインキュベータ内で1時間保温するか、Neogenライシスチューブをドライダブルブロックヒーターに入れて100°Cで30秒間加熱します。
2. キャップを閉めた状態のライシスチューブを反転させて中の液を混合させます。4時間以内に次のステップに進みます。
3. インキュベータから前増菌ブロスを取り出します。
4. 各検体および陰性コントロール (NC) 検体（滅菌前増菌ブロス）ごとに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Neogenライシスチューブ数分にカットすることができます。各Neogenライシスチューブ数または8連チューブのストリップ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、移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。
   4.3 以下に記載のとおり、前増菌した検液をNeogenライシスチューブに移します。

まず、前増菌した各検体を各Neogenライシスチューブに移します。**最後に**NCを移します。

   4.4 Neogen® 病原菌検出キャップ／デキャップツール －ライシスを使用し、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。ライセート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はめます。
      4.5.1 保存したライセートの処理については、付録Aを参照してください。
   4.6 プロトコルの表2、3、4に他の規定がない限り、検体20 µLをNeogenライシスチューブに移します（生の乳製品の場合、または環境検体を中和緩衝液とともに使用する場合などには10 µLを滴下します）。



5. すべての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4.4～4.6を繰り返します。
6. すべての検体を移注したら、20 µLのNC（デミフレーザーブロスなどの滅菌前増菌ブロス）をNeogenライシスチューブに移します。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 病原菌検出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. Neogen 病原菌検出ヒートブロックインサート内にカバーを外したNeogenライシスチューブラックを入れて、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。
   8.1 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可能性がありますので、Neogen 病原菌自動検出システムの装置内には入れないでください。
9. ヒートブロックからカバーを外したNeogenライシスチューブラックを取り出し、Neogen 病原菌検出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。室温で使用したNeogen 病原菌検出チルブロックインサートは検査室の作業台の上に直に置いてください。冷却されると、ライシス液はピンク色に戻ります。
10. Neogen 病原菌検出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。

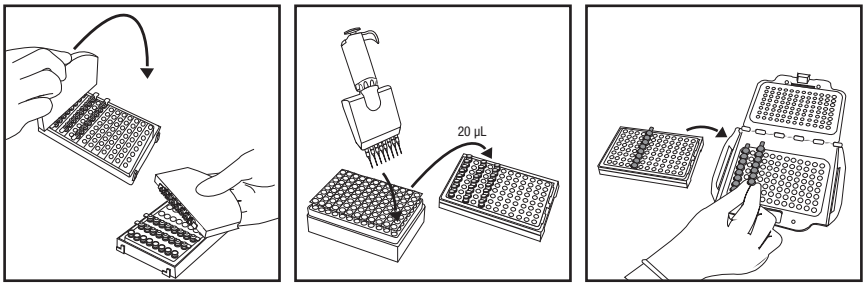


増幅

1. 検体およびNCのそれぞれにつきNeogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*の試薬チューブ1本が必要です。
   1.1 試薬チューブのストリップは、必要な数に合わせて切り離すことができます。各Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*の試薬チューブの数または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 - *リステリア・モノサイトゲネス用*の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 リージェント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 - *リステリア・モノサイトゲネス用*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、移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、ライセートをNeogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*の試薬チューブおよびNeogen リージェントコントロールチューブに移してください。

   Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*の試薬チューブのそれぞれに**まず**検体ライセートを移し、次にNCを移します。**最後に**Neogen リージェントコントロールチューブを水和します。

5. Neogen®病原菌検出キャップ／デキャップツール ― 試薬用を使用して、Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*の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 **検体ライセート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 - *リステリア・モノサイトゲネス用*の試薬チューブに移します。ペレットが撹拌されないよう、一定の角度で分注します。ピペット操作で5回静かに混合します。**
   5.2 すべての検体ライセートをストリップ内の対応するNeogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*の試薬チューブに添加するまで、ステップ5.1を繰り返します。
   5.3 Neogen秒劇筋検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*の試薬チューブに同梱の予備キャップで蓋をし、Neogen 病原菌検出キャップ／デキャップツール ― 試薬用の丸い側を使用して前後に圧をかけ、キャップをしっかりと締めます。
   5.4 検査する全検体について、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を移した後、ステップ5.1～5.1を繰り返してNCライシス20 µLをNeogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*の試薬チューブに移します。
   5.6 **Neogen リージェントコントロールチューブにNCライセート 20 µL**を移します。ペレットが撹拌されないよう、一定の角度で分注します。ピペット操作で5回静かに混合します。
6. 清潔な、殺菌済みNeogen 病原菌検出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 病原菌検出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. Neogen®病原菌自動検出システム用ソフトウェアで設定した検査内容を確認します。
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。選択した装置の蓋が自動的に開きます。
9. Neogen 病原菌自動検出システムの装置内にNeogen 病原菌検出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75分以内に表示されますが、陽性の場合はさらに短時間で検出されることがあります。

10. アッセイ終了後、Neogen 病原菌検出スピードローダートレイをNeogen 病原菌自動検出システムの装置から取り出し、チューブは水で1～5% (v/v) に希釈した家庭用漂白液または同等の溶液に1時間浸漬した後、アッセイの準備作業領域から隔離して、廃棄してください。

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 - *リステリア・モノサイトゲネス用*の試薬、Neogen リージェントコントロールチューブ、マトリックスコントロールチューブが含まれます。密封されたチューブは、必ず水で1～5% (v/v) に希釈した家庭用漂白液または同等の溶液に1時間浸漬した後、アッセイの準備作業領域から隔離して、廃棄してください。

結果と解釈

核酸が増幅された菌の検出によって得られた光出力曲線がアルゴリズムによって解釈されます。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、多数の固有の曲線パラメータを解析することで決定されます。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Inspect（検証が必要な結果）の場合は、その検査が完了した後に表示されます。

陽性と推定される検体は、検査室の標準作業手順または適切な参照法[1, 2, 3]に従って確認する必要があります。まず、一次前増菌物を二次前増菌ブロスに移し（該当する場合）、プレート接種したのち、適切な生化学的、血清学的手法を使用して単離菌を確認してください。

注：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 - *リステリア・モノサイトゲネス用*の増幅試薬は「バックグラウンド」相対発光量 (RLU) を有することから、陰性検体でも結果はゼロとなりません。

異常な光出力がみられるなどの稀なケースについては、アルゴリズムにより「再検査してください」と表示されます。Neogen社は、「再検査」検体についてはアッセイを再度行うことを推奨します。その結果が再度再検査であった場合は、別の望ましい方法または行政の規制によって指定された通りに確認検査を行ってください。

表5：Neogen®病原菌自動検出システムソフトウェアが示す検体の結果の記号および解釈。

ウェルタイプ	ウェルの結果の記号	結果	判定
検体		陽性	検体は標的病原体について陽性と推定されます。
検体		陰性	検体は標的病原体について陰性と推定されます。
検体		阻害	検体マトリックスがアッセイを阻害しました。再検査が必要な場合があります。詳細については、トラブルシューティングセクションおよびアッセイキット製品情報を参照してください。
検体		検証が必要	標的病原体の有無が確定できませんでした。再検査が必要な場合があります。詳細については、トラブルシューティングセクションおよびアッセイキット製品情報を参照してください。
検体		エラー	生物発光が検出されませんでした。再検査が必要な場合があります。詳細については、トラブルシューティングセクションおよびアッセイキット製品情報を参照してください。

NF VALIDATIONにより認証された方法に基づく結果の確認

オプション1：ISO 11290[3]基準を使用し、デミフレーザーブロスによる前増殖から始める

オプション2：NF VALIDATION認証*リステリア・モノサイトゲネス*検出法の一部として、(O&A) PALCAM寒天培地法または発色性寒天培地で単離する、特徴的なコロニーが存在すれば、*リステリア・モノサイトゲネス*の存在の確認に十分です。

オプション3：EN ISO 7218[5]基準に記載の通りに、選択寒天培地から単離したコロニーに対し核酸プローブを使用する（オプション1または2を参照）。

オプション4：NF VALIDATIONで認証済みのその他の方法を使用。この場合、Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*とは原理が異なる必要があります。この第2のバリデート済みの方法について記述した完全なプロトコルを必ず使用すること。確認開始に先行するすべてのステップが、両方の方法に共通している必要があります。

結果が一致しない場合（この代替法で陽性と推定されたが、上記の方法のひとつでは確認されない場合）、検査室は必要な手順に従って得られた結果の有効性を確認してください。

結果が一致しない場合（Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *リステリア・モノサイトゲネス用*で陽性と推定されたが、上記の方法のひとつでは確認されない場合）、検査室は必要な手順に従って得られた結果の有効性を確認してください。

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 (www.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。

付録A. プロトコルの中断：加熱処理済みライシスの保管と再検査。

1. 加熱処理済みライセートを保管する場合、ライシスチューブに清潔なキャップをはめます（「ライシス」セクション、4.5を参照）。
2. 4～8°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 病原菌検出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外し、Neogen 病原菌検出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 Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

製品ラベル記号の説明

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

FS00867C

NEOGEN

发布日期:2024-01

产品信息

单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*

产品说明及预期用途

Neogen® 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*旨在与 Neogen® 分子检测系统一起使用,用于快速、专一地检测增菌后的食品和环境样品中的*单核细胞增生李斯特菌*。Neogen 分子检测分析试剂盒采用环介导等温扩增技术来快速扩增核酸序列,其具有特异性强、灵敏度高的特点,并结合生物发光特性来检测扩增反应。假定阳性结果将实时报告,阴性结果则在分析完成后显示。应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, 3]。

Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*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,对于将此产品用于检测水、药品、化妆品、临床或家畜样品,Neogen 尚未有资料可证。尚未针对所有可能的检测方案或针对所有可能的细菌类型评估 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*。

正如所有检测方法一样,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、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微生物激发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 根据需要,使用含有柠檬酸铁铵的半 Fraser 肉汤和含有柠檬酸铁铵的 Fraser 肉汤对 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*进行了评估。该培养基的典型配方如下。

半 Fraser 肉汤基础典型配方	(g/L)	Fraser 肉汤基础典型配方	(g/L)
氯化钠	20 g	氯化钠	20 g
无水磷酸氢二钠*	9.6 g	无水磷酸氢二钠*	9.6 g
牛肉提取物	5.0 g	牛肉提取物	5.0 g
酪蛋白胰酶消化物	5.0 g	酪蛋白胰酶消化物	5.0 g
动物组织胃消化物	5.0 g	动物组织胃消化物	5.0 g
酵母提取物	5.0 g	酵母提取物	5.0 g
氯化锂	3.0 g	氯化锂	3.0 g
磷酸二氢钾	1.35 g	磷酸二氢钾	1.35 g
七叶苷	1.0 g	七叶苷	1.0 g
盐酸吖啶黄	0.0125 g	盐酸吖啶黄	0.025 g
萘啶酸	0.01 g	萘啶酸	0.02 g

***** 替代物:磷酸氢二钠二水合物 12.0 g

Fraser 肉汤补充物

(10 mL 瓶所含成分。将一瓶添加到一升基础培养基中。)

柠檬酸铁铵 0.5g/10mL

最终 pH 值 7.2 ± 0.2 @ 25°C

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微生物。未在分析裂解步骤中经过适当热处理的样品可能会被视为具有潜在生物危害性,不应将其插入 Neogen 分子检测仪器。

Neogen 食品安全部的产品设计和生产已获得 ISO (国际标准化组织) 9001 认证。

Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*检测试剂盒包含 96 次测试,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,粉红溶液	96 (12 排,每排 8 管)	每管 580 µL 裂解溶液	已上架,即开即用
Neogen® 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*试剂管	黄色管	96 (12 排,每排 8 管)	特定扩增和检测试剂的冻干样	即开即用
额外的盖	黄色盖	96 (12 排,每排 8 个盖)		即开即用
Neogen® 试剂对照 (RC)	透明翻盖管	16 (2 袋,每袋 8 管)	DNA、扩增和检测试剂的冻干对照品	即开即用

阴性对照采用的是无菌增菌培养基 (如半 Fraser 肉汤),未在检测试剂盒中提供。请勿将水用作阴性对照。

安全

用户应该阅读、理解并遵守 Neogen 分子检测系统和 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌* 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 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*。

Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*方法可能会产生*单核细胞增生李斯特菌*，其水平足以让孕妇和免疫功能低下者在接触后出现死产和死亡。

用户必须就当前适用的检测技术对其人员进行培训，例如：优良实验室规范、ISO/IEC 17025[4] 或 ISO 7218[5]。

为了降低与假阴性结果相关的风险，避免释放出受污染产品，请注意以下事项：

- 遵守操作流程并按照产品信息中提供的方法执行检测。
- 按照包装和产品信息中的指示储存 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*。
- 始终在过期日期之前使用 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*。
- 将 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*用于经内部或第三方验证的食品和环境样品。
- 仅将 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*用于经内部或第三方验证的表面、消毒剂、方案和菌株。
- 对于含有中和缓冲液和芳基磺酸酯复合物的环境样品，应在检测前按 1:2 的比例进行稀释（1 份样品对 1 份无菌增菌肉汤）。另一种选择是将 10 µL 中和缓冲培养液转移至 Neogen 裂解溶液管内。含有中和缓冲液和芳基磺酸酯复合物的 Neogen® 采样产品包括：RS96010NB、RS9604NB、SSL10NB、SSL10NB2G、HS10NB、HS10NB2G 和 HS2410NB2G。

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：

- 孕妇接触*单核细胞增生李斯特菌*后，会发生感染，导致发育中的胎儿面临死亡风险，强烈建议将该事实告知实验室内的所有女性工作人员。
- 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护眼装置。
- 避免接触增菌培养基和扩增后试剂管的内容物。
- 根据现行行业标准对经过增菌的样品进行废弃处理。
- 未在分析裂解步骤中经过适当热处理的样品可能会被视为具有潜在生物危害性，不应将其插入 Neogen 分子检测仪器。

为了在准备分析时降低与交叉污染相关的风险，请注意以下事项：

- 始终戴手套（保护用户和防止引入核酸酶）。

为了降低与环境污染相关的风险，请注意以下事项：

- 请根据现行行业标准弃置受污染的废弃物。

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® 分子检测加热模块的温度（例如，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 分子检测加热模块中的指定位置。

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。
- 建议使用无菌的、带气溶胶屏障（带滤芯）的分子生物级移液吸头。
- 每次转移样品时使用新的吸头。
- 将样品从增菌培养基转移至裂解管时遵循实验室良好操作规范。为了避免移液管污染，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。
- 使用配有杀菌灯的分子生物工作站（如可行）。使用 1-5%（与水的体积比）家用漂白溶液或 DNA 去除溶液定期净化实验室工作台和设备（移液管、开盖器等）。

为了降低与假阳性结果相关的风险，请注意以下事项：

- 请勿在扩增后打开试剂管。
- 处理受污染的试管时，应先将其放在浓度为 1-5%（与水的体积比）的家用漂白溶液或同类溶液中浸泡 1 小时，且始终远离分析准备区。
- 请勿在扩增后对试剂管进行高压灭菌。

请参考“安全数据表”了解其它信息和当地的弃置法规。

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 www.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
用户有责任熟悉产品信息和说明。请访问我们的网站 **www.neogen.com** 或联系您当地的 Neogen 代表或经销商，以了解更多信息。

选择检测方法时，务必认识到各种外部因素（如取样方法、检测方案、样品制备、处理和实验室技术）都可能会影响结果。

用户在选择检测方法或产品时，应自行负责选用合适的基质和微生物激发试验对足够多的样品进行评估，以确保所选择的检测方法达到用户的标准。

检测方法及结果能否满足客户及供应商的要求也由用户负责。

同所有检测方法一样，使用任何 Neogen 食品安全部产品所得到的结果并不能保证受检基质或程序的质量。

为帮助客户评估各种食品基质方法，Neogen 开发了 Neogen® 分子检测基质对照试剂盒。需要时，可以使用基质对照 (MC) 来确定基质是否会影响 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*的结果。在采用 Neogen 方法或在检测新的或未知基质或者原材料或工艺发生变更的基质的任何验证期间，应对若干典型的基质样品进行检测，即通过不同来源获取的样品。

基质可定义为一种具备内源特性（如化学成分或工艺）的产品。基质间的差异是因加工或外观的不同而导致的差异，例如原样和经过巴氏消毒处理之间的差异以及新鲜和干燥之间的差异。

有限保证/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，否则，NEOGEN 将不提供任何明示或默示保证，包括但不限于适销性或特定用途适用性保证。如果证明任何 Neogen 食品安全部产品存在缺陷，Neogen 或其授权经销商可以自行决定是提供换货，还是对产品进行退款。如有任何疑问，请联系 Neogen 代表或 Neogen 授权经销商。

Neogen 责任限制
对于任何损失或损害，无论是直接、间接、特殊、偶然或非直接原因造成的损害，NEOGEN 概不承担任何责任，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会超过产品的购买价格。

储存和弃置
请将 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*储存在 2-8°C 环境下。请勿冷冻。避光储存试剂盒。打开试剂盒后，应检查铝箔袋是否破损。如果铝箔袋破损，请勿使用。打开之后，未使用的试剂管应始终储存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储存在 2-8°C 温度下，但储存时间不能超过 60 天。

请勿使用过期的 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*。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 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*试管可能含有致病物质。完成检测后，应遵照当前的行业标准弃置受污染的废弃物。请参考“安全数据表”了解其它信息和当地的弃置法规。

使用说明
请仔细遵循所有说明。否则，可能会导致结果不准确。

使用 1-5%（与水的体积比）家用漂白溶液或 DNA 去除溶液定期净化实验室工作台和设备（移液管、开盖器等）。

用户应当遵照“针对 Neogen 分子检测系统的安装合格 (IQ)/操作合格 (OQ) 方案和说明”文档[6]中的规定接受 Neogen 分子检测系统操作员资格验证 (OQ) 培训。

请参见“验证方法具体说明”部分，了解特定要求：

表 3 - 遵照 AOAC® *Official Method of Analysis*℠ **2016.08** 和 AOAC® *Performance Tested Method*℠ 证书 **#081501** 实施的增菌方案。

表 4 - 遵照 NF Validation 证书 **3M 01/15-09/16** 实施的增菌方案。

样品增菌
表 2、表 3 或表 4 提供了针对食品和环境样品的增菌指导。用户有责任验证备用取样方案或者稀释率，以确保本检测方法符合用户的标准。

食品
1. 让半 Fraser 肉汤增菌培养基（含有柠檬酸铁铵）平衡至实验室环境温度。
2. 根据表 2、表 3 或表 4，在无菌条件下混合增菌培养基和样品。对于所有肉类和微粒样品，建议使用过滤袋。
3. 通过混合、均质操作或手动混合 2 ± 0.2 分钟，实现彻底均质。根据表 2、表 3 或表 4，在 37 ± 1°C 温度下培养。
4. 对于原奶制品（请参见表 2、表 3 或表 4），请将 0.1 mL 一步增菌物转移至 10 mL Fraser 肉汤中。在 37 ± 1°C 环境下培养 20-24 小时。

环境样品
样品采集工具可以是用中和溶液水化过（此过程可消除消毒剂的作用）的海绵。Neogen 建议使用不含生物杀菌剂的纤维素海绵。中和溶液可使用 Dey-Engley (D/E) 中和肉汤或李氏肉汤。建议取样后对取样区进行消毒。

警告：如果您选择使用含芳基磺酸酯复合物的中和缓冲液 (NB) 作为海绵的水化溶液，则必须在检测之前按 1:2 的比例（1 份样品对 1 份无菌增菌肉汤）稀释增菌的环境样品，以降低导致受污染产品释放的假阴性结果的相关风险。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。

用于验证表面是否存在致病菌的取样区域的建议尺寸至少为 100 cm^2（10 cm x 10 cm 或 4" x 4"）。当用海绵取样时，从两个方向（从左到右，然后从上到下）覆盖整个区域，或按照您当前的取样方案或根据 FDA BAM(1)、USDA FSIS MLG(2) 或 ISO 18593(7) 指导方针收集环境样品。

1. 让半 Fraser 肉汤增菌培养基（含有柠檬酸铁铵）平衡至实验室环境温度。
2. 根据表 2、表 3 或表 4，在无菌条件下混合增菌培养基和样品。
3. 通过混合、均质操作或手动混合 2 ± 0.2 分钟，实现彻底均质。根据表 2、表 3 或表 4，在 37 ± 1°C 温度下培养 24-30 小时。

表 2： 根据需要，在 37 ± 1°C 温度下使用半 Fraser 肉汤和 Fraser 肉汤实施的一般增菌方案。

样品基质	样品大小	增菌肉汤量 (mL)	增菌时间 (小时)
经过热加工、烹饪、熏制的肉类、家禽、海鲜和鱼类 经过热加工/巴氏杀菌的奶制品 农产品和蔬菜 含多种成分的食品	25 g	225	24-30
环境样品(a)	1 块海绵	100 或 225	24-30
	1 支采样棒	10	24-30
生的肉类、家禽、海鲜、鱼类	25 g	475	28-32

样品基质	初步增菌（半 Fraser 肉汤）(a)			二次增菌（Fraser 肉汤）(a)			样品分析量(b)
	样品大小	增菌肉汤量 (mL)	增菌时间 (小时)	样品大小	增菌温度 (°C)	增菌时间 (小时)	
原奶制品	25 g	225	20-24	将 0.1 mL 转移至 10 mL Fraser 肉汤	37 ± 1	20-24	10 µL

(a) 初步或二次增菌过程中，应始终使用含 Fraser 肉汤补充物（柠檬酸铁铵）的半 Fraser 肉汤和 Fraser 肉汤。

(b) 转移到 Neogen 裂解溶液管的样品体积。请参阅“裂解”部分的步骤 4.6。

验证方法具体说明

AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2016.08

AOAC® *Performance Tested Method℠* #081501

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 081501

AOAC 研究所 OMA℠ 和 PTM℠ 计划显示，Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*是一种有效的*单核细胞增生李斯特菌*检测方法。研究中检测的基质显示在表 3 中。

表 3. 根据 AOAC OMA℠ 2016.08 和 PTM℠ 证书 #081501，在 37 ± 1°C 温度下使用半 Fraser 肉汤[a]实施的增菌方案。

样品基质		样品大小	增菌肉汤量 (mL)	增菌时间 (小时)
牛肉热狗、墨西哥起司、香草冰淇淋、4% 乳脂白干酪、3% 巧克力全脂牛奶、长叶莴苣、袋装生菠菜、冷熏鲑鱼		25 g	225	24-30
生鸡肉		25 g	475	28-32
火鸡熟食		125 g	1125	24-30
哈密瓜[b]		整个瓜	足以让瓜浮起的量	26-30
环境样品：	不锈钢	1 块海绵	225	24-30
	密封混凝土	1 块海绵	100	24-30
	塑料[c]	1 支采样棒	10	24-30

用于 AOAC 验证的所有样品均进行了均质处理，除非另有说明。

(a) 初步或二次增菌过程中，应始终使用含 Fraser 肉汤补充物（柠檬酸铁铵）的半 Fraser 肉汤和 Fraser 肉汤。

(b) 通过手动混合对样品进行均质处理。

(c) 通过涡旋方式对样品进行均质处理。

AFNOR Certification 认证的 NF Validation

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
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。

符合 ISO 16140-2[6] 的 NF VALIDATION 认证方法（与 ISO 11290[3] 相比）
验证范围：所有人类食品和环境样品（初级生产样品除外）
样品制备：遵照 EN ISO 11290-1[3] 和 EN ISO 6887[8] 制备样品
软件版本：参见证书

表 4： 根据需要，按照 NF VALIDATION 认证方法 3M 01/15-09/16 在 37 ± 1°C 温度下使用半 Fraser 肉汤和 Fraser 肉汤实施的增菌方案。

一般方案	样品大小	增菌肉汤量 (mL)	增菌温度 (±1°C)	增菌时间 (小时)	样品分析量[a]	接受的中断点
所有食品样品（生肉、生海鲜和原奶制品除外）	25 g	225	37	24-30	20 µL	• 半 Fraser 肉汤，最多 72 小时 • 裂解液 @ -20°C • 裂解液 @ 4°C，最多 72 小时
环境样品	25 g，1 支采样棒或 1 个拭子					

专用方案	初步增菌(半 Fraser 肉汤)[b]				二次增菌(Fraser 肉汤)[b]				接受的中断点
	样品大小	增菌肉汤量(mL)	增菌温度(±1°C)	增菌时间(小时)	样品大小	增菌温度(±1°C)	增菌时间(小时)	样品分析量[c]	
生肉、生海鲜和原奶制品	25 g	225	37	20-24	将 0.1 mL 转移至 10 mL Fraser 肉汤	37	20-24	10 µL	• Fraser 肉汤,最多 72 小时 • 裂解液 @ -20°C • 裂解液 @ 4°C,最多 72 小时

(a) 转移到 Neogen 裂解溶液管的样品体积。请参阅“裂解”部分的步骤 4.6。

(b) 初步或二次增菌过程中,应始终使用含 Fraser 肉汤补充物(柠檬酸铁铵)的半 Fraser 肉汤和 Fraser 肉汤。

(c) 转移到 Neogen 裂解溶液管的样品体积。请参阅“裂解”部分的步骤 4.6。

注释: 多于 25 g 的样品尚未在 NF VALIDATION 研究中进行检测。

Neogen® 分子检测快速转移托盘的准备工作

1. 将一块干布用 1-5%(与水的体积比)家用漂白溶液或同类溶液浸湿,用来擦拭 Neogen® 分子检测快速转移托盘。
2. 用清水清洗 Neogen 分子检测快速转移托盘。
3. 使用一次性纸巾擦干 Neogen 分子检测快速转移托盘。
4. 使用前确保 Neogen 分子检测快速转移托盘保持干燥。

Neogen® 分子检测冷却架的准备工作

将 Neogen® 分子检测冷却模块直接放在实验室工作台上;在实验室环境温度 (20-25°C) 下使用冷却模块。

Neogen® 分子检测加热模块的准备工作

将 Neogen® 分子检测加热模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 分子检测加热模块达到并保持 100 ± 1°C。

注释: 根据不同的加热器,允许 Neogen 分子检测加热模块在大约 30 分钟后达到工作温度。使用放在指定位置的、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 分子检测加热模块的温度是否达到 100 ± 1°C。

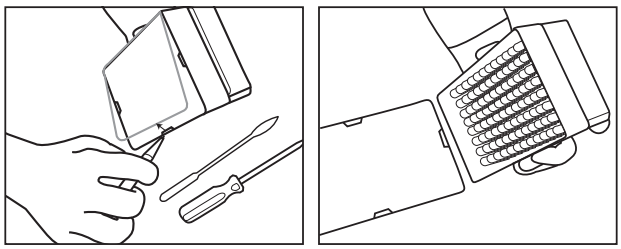
Neogen® 分子检测仪器的准备工作

1. 启动 Neogen® 分子检测系统软件并登录。请联系您的 Neogen 食品安全部代表,确保您使用的是最新版的软件。
2. 打开 Neogen 分子检测仪器。
3. 利用每个样品的数据为其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。

注释: 插入带反应管的 Neogen 分子检测快速转移托盘前,Neogen 分子检测仪器必须处于就绪状态。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

请用螺丝刀或抹刀移除 Neogen 裂解溶液管架的底部,然后再将其置于 Neogen 分子检测加热模块中。

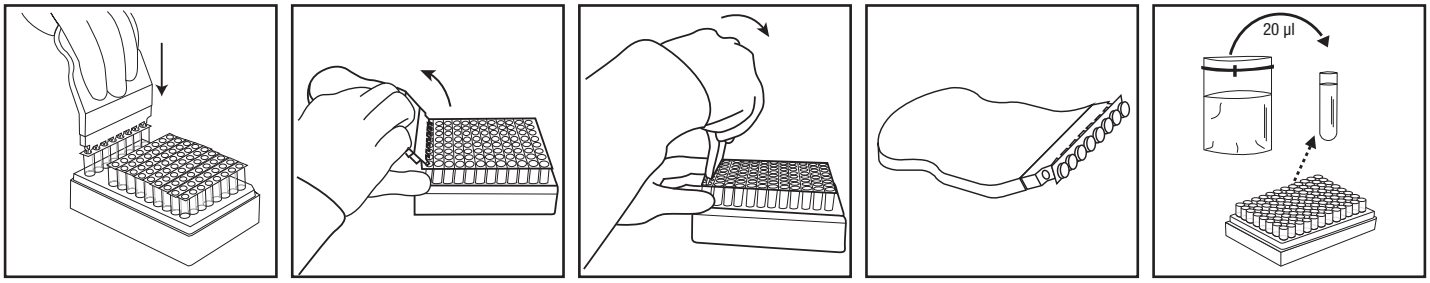


1. 将管架置于室温 (20-25°C) 环境下一整夜(16-18 小时),让裂解溶液(Neogen 裂解溶液)管预热。使 Neogen 裂解溶液管平衡到室温的另一种方法是将 Neogen 裂解溶液管放在实验室工作台上至少 2 小时、在 37 ± 1°C 培养设备中培养 Neogen 裂解溶液管 1 小时,或将其置于双干燥块加热器中在 100°C 下持续加热 30 秒。
2. 倒置封盖的裂解溶液管,使其混合均匀。在 4 小时内继续执行下一步。

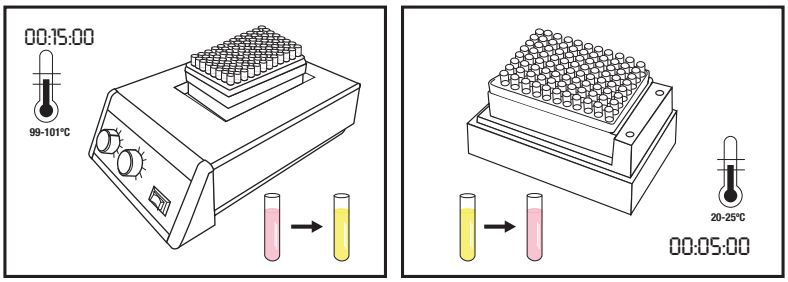
3. 从培养设备中取出增菌肉汤。
4. 每个样品和每个阴性对照 (NC) 样品（无菌增菌培养基）都需要一支 Neogen 裂解溶液管。
   4.1 可以根据所需的 Neogen 裂解溶液管的数量，对 Neogen 裂解溶液联排管进行切割。选择所需数量的 Neogen 裂解溶液管或 8 联排管。将 Neogen 裂解溶液管放入空管架中。
   4.2 为了避免交叉污染，请一次仅打开一排 Neogen 裂解溶液管的管盖，并且每次转移溶液时使用新的移液管吸头。
   4.3 按如下所述将经过增菌的样品转移到 Neogen 裂解溶液管：

首先将每个经过增菌的样品转移到单个 Neogen 裂解溶液管中。**最后**转移 NC。

   4.4 使用 Neogen® 分子检测开盖器 - Lysis 打开 Neogen 裂解溶液联排管的管盖，一次仅打开一排。
   4.5 丢弃 Neogen 裂解溶液管的管盖 – 如果要保留裂解液以重新检测，请将管盖放入干净的容器中，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 将 20 µL 样品转移到 Neogen 裂解溶液管内，除非方案的表 2、表 3 或表 4 中另有说明（例如原奶制品，或使用含中和缓冲液的环境样品时，使用 10 µL）。



5. 重复步骤 4.4 至 4.6，直到将所有样品添加到联排管对应的 Neogen 裂解溶液管为止。
6. 当转移完所有样品后，将 20 µL NC（无菌增菌培养基，如半 Fraser 肉汤）转移到一支 Neogen 裂解溶液管中。请勿将水用作 NC。
7. 检验 Neogen 分子检测加热模块的温度是否达到了 100 ± 1°C。
8. 将未加盖的 Neogen 裂解溶液管架放入 Neogen 分子检测加热模块中加热 15 ± 1 分钟。加热期间，Neogen 裂解溶液将从粉红色（冷）变为黄色（热）。
   8.1 未在分析裂解步骤中经过适当热处理的样品可能会被视为具有潜在生物危害性，不应将其插入 Neogen 分子检测仪器。
9. 从加热模块中取出未加盖的 Neogen 裂解溶液管架，将其放入 Neogen 分子检测冷却架中冷却至少 5 分钟，最长 10 分钟。在环境温度下使用的 Neogen 分子冷却架应直接置于实验室工作台上。冷却后，裂解溶液将恢复为粉红色。
10. 从 Neogen 分子检测冷却架上移除 Neogen 裂解溶液管架。



扩增

1. 每个样品和每个 NC 都需要一支 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*试剂管。
   1.1 根据所需的管数，对试剂联排管进行切割。选择所需数量的 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*试剂管或 8 联排管。
   1.2 将 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*试剂管放入空管架中。
   1.3 请勿将试剂小球搅离管底。
2. 选择一支 Neogen 试剂对照管并放入管架。
3. 为了避免交叉污染，请一次仅打开一排 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*试剂管的管盖，并且每次转移溶液时使用新的移液管吸头。

4. 按如下所述将裂解液分别转移到 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*试剂管和 Neogen 试剂对照管：

首先将各个样品裂解液转移到单个 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*试剂管，然后再转移 NC。**最后**对 Neogen 试剂对照管进行水化。

5. 使用 Neogen® 分子检测开盖器 - Reagent 打开 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*试剂管的管盖，一次仅打开一排。丢弃管盖。

   5.1 **将 Neogen 裂解溶液管液体上部 ½ 层的 20 µL 样品裂解液（避免沉淀）转移到对应的 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*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，直到将所有样品裂解液添加到联排管对应的 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*试剂管为止。

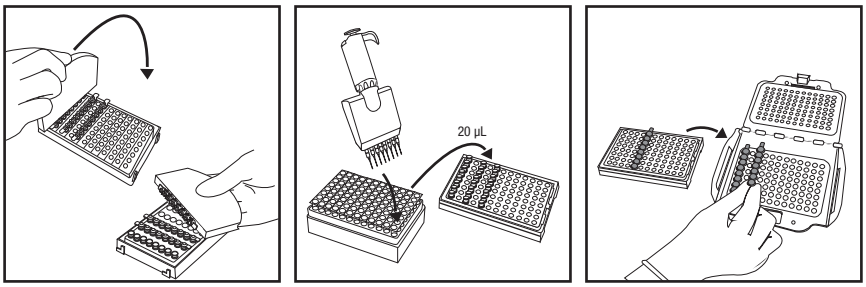
   5.3 使用额外的盖盖住 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*试剂管，并使用 Neogen 分子检测开盖器 - Reagent 较圆的一侧以前后移动的方式加压，以确保将盖子盖紧。

   5.4 根据需要对待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后，重复步骤 5.1，以将 20 µL NC 裂解液转移到 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*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. 将加盖的试管放入干净且经过净化处理的 Neogen 分子检测快速转移托盘中。合上并锁定 Neogen 分子检测快速转移托盘盖。



7. 在 Neogen 分子检测系统软件中查看和确认配置的检测。
8. 在软件中单击“启动”按钮并选择要使用的仪器。所选仪器的盖会自动打开。
9. 将 Neogen 分子检测快速转移托盘放入 Neogen 分子检测仪器并合上盖子，以启动分析。结果将在 75 分钟内提供，但阳性结果可以更快检测到。
10. 分析完成后，从 Neogen 分子检测仪器中取出 Neogen 分子检测快速转移托盘，通过将试管浸入 1-5%（与水的体积比）家用漂白溶液或同类溶液 1 小时并使其远离分析准备区，对试管进行废弃处理。

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 的试剂管。这包括 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*试剂管、Neogen 试剂对照和基质对照管。对密封的试剂管进行废弃处理时，应始终将其放入浓度为 1-5%（与水的体积比）的家用漂白溶液或同类溶液中浸泡 1 小时，并确保其远离分析准备区。

结果和说明

软件会使用一种算法对来自核酸扩增检测的光输出曲线进行解读。软件会自动分析结果并根据不同结果用不同颜色进行标记。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。“假定阳性”结果实时报告，“阴性”和“检查”结果则在检测完成后显示。

假定阳性样品应当遵循实验室标准操作规程或正确的参考方法进行确认[1, 2, 3]，应首先将初步的增菌培养液转移到二次增菌肉汤（如适用），然后进行后续的平板培养，并利用正确的生化和血清方法对分离菌进行确认。

注释：因为系统和 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*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出现读数为零的情况。

在极少数情况下，当存在异常光输出时，算法会显示“检查”标记。Neogen 建议用户对所有“检查”样品重新进行分析。如果结果仍为“检查”，请使用您喜欢的方法或按照当地法规指定的方法进行确认试验。

表 5: Neogen 分子检测系统软件提供的样品和判读结果符号。

孔类型	孔结果符号	结果	判读
样品		阳性	样品是目标致病菌的假定阳性样品。
样品		阴性	样品是目标致病菌的阴性样品。
样品		抑制	样品基质对分析有抑制作用。可能需要重新检测。有关更多信息，请参阅故障排除部分和分析试剂盒产品信息。
样品		检查	不确定目标致病菌是否存在。可能需要重新检测。有关更多信息，请参阅故障排除部分和分析试剂盒产品信息。
样品		错误	未检测到生物发光。可能需要重新检测。有关更多信息，请参阅故障排除部分和分析试剂盒产品信息。

依照 NF VALIDATION 认证方法确认结果

选项 1: 采用 ISO 11290[3] 标准，从半 Fraser 肉汤增菌液开始 。

选项 2: 作为 NF VALIDATION 认证方法的组成部分，通过在 PALCAM 琼脂或显色琼脂 (O&A) 上执行分离操作，对*单核细胞增生李斯特菌*进行检测。存在具有明显特征的菌落即证明存在*单核细胞增生李斯特菌*。

选项 3: 按照 EN ISO 7218[5] 标准所述，使用核酸探针对选择性琼脂中的隔离菌落执行操作（请参阅选项 1 或 2）。

选项 4: 可以使用任何其他 NF VALIDATION 认证方法，原理必须与 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*不同。在执行此第二种验证方法时，必须遵循所述的完整方案。两个方法在开始确认前的所有步骤必须是相同的。

如果出现结果不一致（替代方法的结果为假定阳性，且并未通过上述其中一种方法予以确认），则实验室必须执行必要的步骤来确保所获得结果的有效性。

如果出现结果不一致（使用 Neogen 单核细胞增生李斯特菌分子检测分析 2 - *单核细胞增生李斯特菌*得出的结果为假定阳性，且并未通过上述其中一种方法予以确认），则实验室必须执行必要的步骤来确保所获得结果的有效性。

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 www.neogen.com，也可与您当地的 Neogen 代表或经销商联系以获得帮助。

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，应使用干净的盖子为裂解溶液管重新封盖（请参阅 4.5“裂解”）。
2. 在 4 - 8°C 温度下最多储存 72 小时。
3. 取出储存的样品以准备用于扩增，将其倒置 2-3 次进行混合。
4. 打开管盖。
5. 将混合后的裂解液管置于 Neogen 分子检测加热模块中并在 100 ± 1°C 温度下加热 5 ± 1 分钟。
6. 从加热模块中取出 Neogen 裂解溶液管架，将其放入 Neogen 分子检测冷却架中冷却至少 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 Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

产品标签符号说明

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

FS00867C

NEOGEN

發佈日期：2024-01

產品資訊

分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*

產品描述及擬定用途

Neogen® 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*旨在與 Neogen® 分子檢測系統一起使用，用於快速、專門檢測增菌後的食品和環境樣品中的*單增李斯特菌*。Neogen 分子檢測套組採用環狀恆溫擴增技術來快速擴增核酸序列，其具有特異性強、靈敏度高的特點，並結合生物發光特性來檢測擴增反應。假定陽性結果將即時報告，陰性結果則在分析完成後顯示。應使用您喜歡的方法或按照當地法規指定的方法確認假定陽性結果[1, 2, 3]。

Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*專供受過實驗室技術訓練的專業人員在實驗室環境下使用。對於在食品或飲料以外的行業中使用此產品，Neogen 尚未有資料可證。例如，對於將此產品用於檢測水、藥品、化妝品、臨床或動物檢體，Neogen 尚未有資料可證。尚未針對所有可能的檢測方案或針對所有可能的細菌類型評估 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*。

正如所有檢測方法一樣，增菌培養基的來源、配方和品質都可能會影響結果。取樣方法、檢測方案、樣品製備、處理和實驗室技術等因素都可能會影響結果。Neogen 建議在使用者環境中利用充足數量的樣品以及特定的食品和微生物試驗對包括增菌培養基在內的方法進行評估，確保相應的方法符合使用者的標準。

Neogen 根據需要，使用含有檸檬酸鐵銨的 Demi-Fraser 培養液和含有檸檬酸鐵銨的 Fraser 培養液對 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*進行了評估。該培養基的典型配方如下。

Demi-Fraser 培養液基礎典型配方	(g/L)	Fraser 培養液基礎典型配方	(g/L)
氯化鈉	20 g	氯化鈉	20 g
無水磷酸氫二鈉*	9.6 g	無水磷酸氫二鈉*	9.6 g
牛肉提取物	5.0 g	牛肉提取物	5.0 g
酪蛋白胰酶消化物	5.0 g	酪蛋白胰酶消化物	5.0 g
動物組織胃消化物	5.0 g	動物組織胃消化物	5.0 g
酵母提取物	5.0 g	酵母提取物	5.0 g
氯化鋰	3.0 g	氯化鋰	3.0 g
磷酸二氫鉀	1.35 g	磷酸二氫鉀	1.35 g
七葉苷	1.0 g	七葉苷	1.0 g
鹽酸吖啶黃	0.0125 g	鹽酸吖啶黃	0.025 g
萘啶酸	0.01 g	萘啶酸	0.02 g

***** 替代物：磷酸氫二鈉二水合物　　12.0 g

Fraser 培養液補充物

（10 mL 瓶所含成分。將一瓶添加到一公升基礎培養基中。）

檸檬酸鐵銨　　0.5g/10mL

最終 pH 值　　7.2 ± 0.2 於 25°C

Neogen® 分子檢測設備專用於在分析裂解步驟中經過熱處理的樣品，該步驟旨在破壞樣品中存在的微生物。未在分析裂解步驟中經過適當熱處理的樣品可能會被視為具有潛在生物危害性，不應將其插入 Neogen 分子檢測設備。

Neogen 食品安全部的產品設計與生產已獲得 ISO（國際標準組織）9001 認證。

Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*檢測套組包含 96 個測試，如表 1 所述。

表 1. Neogen 分子檢測套組構成

項目	標識	數量	內容物	備註
Neogen® 裂解溶液 (LS)	透明管，粉紅溶液	96（12 排，每排 8 管）	每管 580 µL 裂解溶液	已上架，即開即用
Neogen® 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*試劑試管	黃色管	96（12 排，每排 8 管）	特定擴增和檢測試劑的凍乾物	即開即用
額外的蓋子	黃色蓋子	96（12 排，每排 8 個蓋子）		即開即用
Neogen® 試劑控制組 (RC)	透明翻蓋管	16（2 袋，每袋 8 管）	DNA、擴增和檢測試劑的凍乾控制品	即開即用

陰性控制組採用的是無菌增菌培養基（如：Demi-Fraser 培養液），未在套組中提供。請勿將水用作陰性控制組。

安全

使用者應該閱讀、理解並遵守 Neogen 分子檢測系統和 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*說明中的所有安全資訊。妥善保存安全說明書，以備日後查閱。

⚠**警告：** 表示危險狀況，如果不注意避免，可能造成死亡或嚴重的人身傷害和/或財產損失。

注意事項： 表示潛在的危險狀況，如果不注意避免，可能導致財產損失。

⚠ 警告

請勿在人類或動物的各種診斷中使用 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*。

Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*方法可能會產生*單增李斯特菌*，其水平足以讓孕婦和免疫功能低下者在接觸後出現死胎和死亡。

使用者必須就目前適用的檢測技術對其人員進行訓練，例如：優良實驗室操作、ISO/IEC 17025[4] 或 ISO 7218[5]。

為了降低與偽陰性結果相關之風險，避免釋放出受污染產品，請注意以下事項：

- 遵循方案並按照產品資訊中提供的方法執行檢測。
- 按照包裝與產品資訊中的指示儲存 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*。
- 始終在過期日期之前使用 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*。
- 將 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*用於經內部或第三方驗證的食品與環境樣品。
- 僅將 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*用於經內部或第三方驗證的表面、消毒劑、方案和菌株。
- 對於含有中和緩衝液和芳基磺酸酯複合物的環境樣品，應在檢測前按 1:2 的比例進行稀釋（1 份樣品對 1 份無菌增菌培養液）。另一種選擇是將 10 µL 中和緩衝培養液轉移至 Neogen 裂解溶液管內。含有中和緩衝液和芳基磺酸酯複合物的 Neogen® 採樣產品包括：RS96010NB、RS9604NB、SSL10NB、SSL10NB2G、HS10NB、HS10NB2G 和 HS2410NB2G。

為了降低與化學品和生物危害暴露相關之風險，請注意以下事項：

- 孕婦接觸*單增李斯特菌*後，會發生感染，導致發育中的胎兒面臨死亡風險，強烈建議將該事實告知實驗室內的所有女性工作人員。
- 在訓練有素的工作人員的控制下，於妥善配備的實驗室中執行致病菌檢測。增菌培養基以及接觸過增菌培養基的設備或表面可能含有致病菌，足以對人體健康造成風險。
- 始終遵守標準實驗室安全規範，包括在處理試劑和受污染樣品時穿戴適當的防護服和護眼裝置。
- 避免接觸增菌培養基和擴增後試劑管的內容物。
- 根據現行行業標準對經過增菌的樣品進行廢棄處理。
- 未在分析裂解步驟中經過適當熱處理的樣品可能會被視為具有潛在生物危害性，不應將其插入 Neogen 分子檢測設備。

為了在準備分析時降低與交叉污染相關之風險，請注意以下事項：

- 始終戴手套（保護使用者和防止引入核酸酶）。

為了降低與環境污染相關之風險，請注意以下事項：

- 請根據現行行業標準棄置受污染的廢棄物。

為了降低與高溫液體暴露相關之風險，請注意以下事項：

- 不要超出建議的加熱器溫度設定。
- 不要超出建議的加熱時間。
- 使用正確的經過校準的溫度計檢驗 Neogen® 分子檢測加熱模塊的溫度（例如，局浸溫度計或熱電偶數位溫度計，而非全浸溫度計）。溫度計必須放置於 Neogen 分子檢測加熱模塊中的指定位置。

注意事項

為了在準備分析時降低與交叉污染相關之風險，請注意以下事項：

- 在進行試劑小球水化之前更換手套。
- 建議使用無菌的、帶氣溶膠屏障（帶濾芯）的分子生物級移液吸頭。
- 每次轉移樣品時使用新的吸頭。
- 將樣品從增菌培養基轉移至裂解管時遵循優良實驗室操作。為了避免移液管污染，使用者可以選擇增加一個中間轉移步驟。例如，使用者可以將每個經過增菌的樣品轉移至無菌管中。
- 使用配有殺菌燈的分子生物工作臺（如可行）。使用 1-5%（與水的體積比）家用漂白溶液或 DNA 去除溶液定期淨化實驗室工作臺和設備（移液管、開蓋器等）。

為了降低與偽陽性結果相關之風險，請注意以下事項：

- 請勿在擴增後打開試劑試管。
- 處理受污染的試管時，應先將其放在濃度為 1-5%（與水的體積比）的家用漂白溶液或同類溶液中浸泡 1 小時，且始終遠離分析準備區。
- 請勿在擴增後對試劑試管進行高壓滅菌。

請參考「安全資料表」了解其它資訊和當地的棄置法規。

如果您對於特定的應用程式或程序存有疑問，請造訪我們的網站 www.neogen.com，也可與您當地的 Neogen 代表或經銷商聯絡以獲得幫助。

使用者責任
使用者有責任熟悉產品資訊和說明。請造訪我們的網站 **www.neogen.com** 或聯絡您當地的 Neogen 代表或經銷商，以了解更多資訊。

採用檢測方法時，務必認識到各種外部要素（如取樣方法、檢測方案、樣品製備、處理和實驗室技術）都可能會影響結果。

使用者在選擇檢測方法或產品時，應自行負責選用合適的基質和微生物試驗對足夠多的樣品進行評估，以確保所選擇的檢測方法達到使用者的標準。

使用者也應自行負責確定任何檢測方法和結果符合其客戶和供應商的要求。

同所有檢測方法一樣，使用任何 Neogen 食品安全部產品所得到的結果並不能保證受檢基質或程序的品質。

為協助客戶評估各種食品基質方法，Neogen 開發了 Neogen® 分子檢測基質控制套組。需要時，可以使用基質控制組 (MC) 來確定基質是否會影響 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*的結果。在採用 Neogen 方法或在檢測新的或未知基質或者原材料或工藝發生變更的基質的任何驗證期間，應對若干典型的基質樣品進行檢測，即透過不同來源獲取的樣品。

基質可定義為一種具備內在屬性（如組成或加工）的產品。基質間的差異是因加工或外觀的不同而導致的差異，例如原樣和經過巴氏消毒處理之間的差異以及新鮮和乾燥之間的差異。

有限擔保/有限補救措施
除非各個產品包裝的有限擔保部分明確聲明，否則，NEOGEN 將不提供任何明示或暗示擔保，包括但不限於適銷性或特定用途適用性擔保。如果證明任何 Neogen 食品安全部產品存在缺陷，Neogen 或其授權經銷商可以自行決定是提供換貨，還是對產品進行退款。如有任何问题，请联系您的纽勤销售代表或授权经销商。

Neogen 責任限制
對於任何損失或損害，無論是直接、間接、特殊、偶然或非直接原因造成的損害，NEOGEN 概不承擔任何責任，包括但不限於利潤損失。根據法律理論，Neogen 對所謂存在缺陷的產品的賠付不會超過產品的購買價格。

儲存和棄置
請將 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*儲存在 2-8°C 環境下。請勿冷凍。避光儲存套組。打開套組後，應檢查鋁箔袋是否破損。如果鋁箔袋破損，請勿使用。打開之後，未使用的試劑試管應始終儲存在內部帶有乾燥劑的可重新密封鋁箔袋中，以保持凍乾試劑的穩定性。將重新密封的鋁箔袋儲存在 2-8°C 溫度下，但儲存時間不能超過 60 天。

請勿使用過期的 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*。過期日期和批號註明在包裝箱外側的標籤上。使用之後，增菌培養基和 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*試管可能含有致病物質。完成檢測後，應遵照現行的行業標準棄置受污染的廢棄物。請參考「安全資料表」了解其它資訊和當地的棄置法規。

操作指引
請仔細遵循所有指引。否則，可能會導致結果不準確。

使用 1-5%（與水的體積比）家用漂白溶液或 DNA 去除溶液定期淨化實驗室工作臺和設備（移液管、開蓋器等）。

使用者應當遵照「針對 Neogen 分子檢測系統的安裝合格 (IQ)/操作合格 (OQ) 方案和說明」文件[6]中的規定接受 Neogen 分子檢測系統操作員資格驗證 (OQ) 訓練。

請參見「驗證方法具體說明」部分，了解特定要求：

表 3 - 遵照 AOAC® *Official Method of Analysis℠* **2016.08** 和 AOAC® *Performance Tested Method℠* 證書 **#081501** 實施的增菌方案。

表 4 - 遵照 NF Validation 證書 **3M 01/15-09/16** 實施的增菌方案。

樣品增菌
表 2、表 3 或表 4 提供了針對食品與環境樣品的增菌指導。使用者有責任驗證替代取樣方案或者稀釋率，以確保本檢測方法符合使用者的標準。

食品
1. 讓 Demi-Fraser 培養液增菌培養基（含有檸檬酸鐵銨）平衡至實驗室環境溫度。
2. 根據表 2、表 3 或表 4，在無菌條件下混合增菌培養基和樣品。對於所有肉類和微粒樣品，建議使用過濾袋。
3. 透過混合、均質操作或手動混合 2 ± 0.2 分鐘，實現徹底均質。根據表 2、表 3 或表 4，在 37 ± 1°C 溫度下培養。
4. 對於生乳製品（請參見表 2、表 3 或表 4），請將 0.1 mL 初步增菌物轉移至 10 mL Fraser 培養液中。在 37 ± 1°C 環境下培養 20-24 小時。

環境樣品
樣品採集工具可以是用中和溶液水化過（此過程可消除消毒劑的作用）的海綿。Neogen 建議使用不含生物殺菌劑的纖維素海綿。中和溶液可使用 Dey-Engley (D/E) 中和培養液或 Letheen 培養液。建議取樣後對取樣區進行消毒。

警告：如果您選擇使用含芳基磺酸酯複合物的中和緩衝液 (NB) 作為海綿的水化溶液，則必須在檢測之前按 1:2 的比例 (1 份樣品對 1 份無菌增菌培養液) 稀釋增菌的環境樣品，以降低導致受污染產品釋放的偽陰性結果之相關風險。另一種選擇是將 10 µL 的中和緩衝培養液轉移至 Neogen 裂解溶液管內。

用於驗證表面是否存在病原體的取樣區域的建議尺寸至少為 100 cm^2 (10 cm x 10 cm 或 4" x 4")。當用海綿取樣時，從兩個方向 (從左到右，然後從上到下) 覆蓋整個區域，或按照您目前的取樣方案或根據 FDA BAM[1]、USDA FSIS MLG[2] 或 ISO 18593[7] 指導方針收集環境樣品。

1. 讓 Demi-Fraser 培養液增菌培養基 (含有檸檬酸鐵銨) 平衡至實驗室環境溫度。
2. 根據表 2、表 3 或表 4，在無菌條件下混合增菌培養基和樣品。
3. 透過混合、均質操作或手動混合 2 ± 0.2 分鐘，實現徹底均質。根據表 2、表 3 或表 4，在 37 ± 1°C 溫度下培養 24-30 小時。

表 2： 根據需要，在 37 ± 1°C 溫度下使用 Demi-Fraser 培養液和 Fraser 培養液實施的一般增菌方案。

樣品基質	樣品大小	增菌培養液量 (mL)	增菌時間 (小時)
經過熱加工、烹飪、燻製的肉類、家禽、海鮮和魚類 經過熱加工/巴氏殺菌的乳製品 農產品和蔬菜 含多種成分的食品	25 g	225	24-30
環境樣品[a]	1 塊海綿	100 或 225	24-30
	1 支採樣棒	10	24-30
生的肉類、家禽、海鮮、魚類	25 g	475	28-32

樣品基質	初步增菌 (Demi-Fraser 培養液)[a]			二次增菌 (Fraser 培養液)[a]			樣品分析量[b]
	樣品大小	增菌培養液量 (mL)	增菌時間 (小時)	樣品大小	增菌溫度 (°C)	增菌時間 (小時)	
生乳製品	25 g	225	20-24	將 0.1 mL 轉移至 10 mL Fraser 培養液	37 ± 1	20-24	10 µL

(a) 初步或二次增菌過程中，應始終使用 Fraser 培養液補充物 (檸檬酸鐵銨) 對 Demi-Fraser 培養液和 Fraser 培養液進行增補。

(b) 轉移到 Neogen 裂解溶液管的樣品體積。請參閱「裂解」部分的步驟 4.6。

驗證方法具體說明

AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2016.08

AOAC® *Performance Tested Method℠* #081501

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 081501

AOAC 研究所 OMA℠ 和 PTM℠ 計劃顯示，Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*是一種有效的*單增李斯特菌*檢測方法。研究中檢測的基質顯示在表 3 中。

表 3. 根據 AOAC OMA℠ 2016.08 和 PTM℠ 證書 #081501，在 37 ± 1°C 溫度下使用 Demi-Fraser 培養液[a] 實施的增菌方案。

樣品基質		樣品大小	增菌培養液量 (mL)	增菌時間 (小時)
牛肉熱狗、墨西哥起司、香草霜淇淋、4% 乳脂白乾酪、3% 巧克力全脂牛奶、長葉萵苣、袋裝生菠菜、冷燻鮭魚		25 g	225	24-30
生雞肉		25 g	475	28-32
火雞熟食		125 g	1125	24-30
哈密瓜[b]		整個瓜	足以讓瓜浮起的量	26-30
環境樣品	不銹鋼	1 塊海綿	225	24-30
	密封混凝土	1 塊海綿	100	24-30
	塑膠[c]	1 支採樣棒	10	24-30

用於 AOAC 驗證的所有樣品均進行了均質處理，除非另有說明。

(a) 初步或二次增菌過程中，應始終使用 Fraser 培養液補充物（檸檬酸鐵銨）對 Demi-Fraser 培養液和 Fraser 培養液進行增補。

(b) 透過手動混合對樣品進行均質處理。

(c) 透過渦旋震盪方式對樣品進行均質處理。

AFNOR Certification 認證的 NF Validation

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

有關有效性截止日期的詳細資訊，請參閱上述網站中提供的 NF VALIDATION 證書。

符合 ISO 16140-2[6] 的 NF VALIDATION 認證方法（與 ISO 11290[3] 相比）
驗證範圍：所有人類食品與環境樣品（初級生產樣品除外）
樣品製備：遵照 EN ISO 11290-1[3] 和 EN ISO 6887[8] 製備樣品
軟體版本：參見證書

表 4： 根據需要，按照 NF VALIDATION 認證方法 3M 01/15-09/16 在 37 ± 1°C 溫度下使用 Demi-Fraser 培養液和 Fraser 培養液實施的增菌方案。

一般方案	樣品大小	增菌培養液量 (mL)	培養溫度 (±1°C)	增菌時間 (小時)	樣品分析量[a]	接受的中斷點
所有食品樣品（生肉、生海鮮和生乳製品除外）	25 g	225	37	24-30	20 µL	• Demi-Fraser 培養液，最多 72 小時 • 裂解液於 -20°C • 裂解液於 4°C，最多 72 小時
環境樣品	25 g，1 支採樣棒或 1 個拭子					

專用方案	初步增菌 (Demi-Fraser 培養液)[b]				二次增菌 (Fraser 培養液)[b]				接受的中斷點
	樣品大小	增菌培養液量 (mL)	培養溫度 (±1°C)	增菌時間 (小時)	樣品大小	培養溫度 (±1°C)	增菌時間 (小時)	樣品分析量[c]	
生肉、生海鮮和生乳製品	25 g	225	37	20-24	將 0.1 mL 轉移至 10 mL Fraser 培養液	37	20-24	10 µL	• Fraser 培養液，最多 72 小時 • 裂解液於 -20°C • 裂解液於 4°C，最多 72 小時

(a) 轉移到 Neogen 裂解溶液管的樣品體積。請參閱「裂解」部分的步驟 4.6。

(b) 初步或二次增菌過程中，應始終使用 Fraser 培養液補充物 (檸檬酸鐵銨) 對 Demi-Fraser 培養液和 Fraser 培養液進行增補。

(c) 轉移到 Neogen 裂解溶液管的樣品體積。請參閱「裂解」部分的步驟 4.6。

備註： 多於 25 g 的樣品尚未在 NF VALIDATION 研究中進行檢測。

Neogen® 分子檢測托盤的準備工作

1. 將一塊布用 1-5% (與水的體積比) 家用漂白溶液或同類溶液浸濕，用來擦拭 Neogen® 分子檢測托盤。
2. 用清水清洗 Neogen 分子檢測托盤。
3. 使用一次性紙巾擦乾 Neogen 分子檢測托盤。
4. 使用前確保 Neogen 分子檢測托盤保持乾燥。

Neogen® 分子檢測冷卻模塊的準備工作

將 Neogen® 分子檢測冷卻模塊直接放在實驗室工作臺上；在實驗室環境溫度 (20-25°C) 下使用冷卻模塊。

Neogen® 分子檢測加熱模塊的準備工作

將 Neogen® 分子檢測加熱模塊放入雙乾燥模塊加熱器中。開啟乾燥模塊加熱裝置並設定溫度，使 Neogen 分子檢測加熱模塊達到並保持 100 ± 1°C。

備註： 根據不同的加熱裝置，允許 Neogen 分子檢測加熱模塊在大約 30 分鐘後達到工作溫度。使用放在指定位置的、正確的、經過校準的溫度計 (如局浸溫度計或熱電偶數位溫度計，而**非**全浸溫度計) 檢驗 Neogen 分子檢測加熱模塊的溫度是否達到 100 ± 1°C。

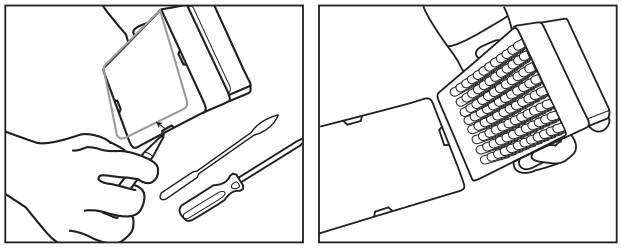
Neogen® 分子檢測設備的準備工作

1. 啟動 Neogen® 分子檢測系統軟體並登入。請聯絡您的 Neogen 食品安全部代表，確保您使用的是最新版的軟體。
2. 打開 Neogen 分子檢測設備。
3. 利用每個樣品的資料為其建立或編輯一次運行檢測。請參考「Neogen 分子檢測系統使用者手冊」了解詳細資訊。

備註： 將反應管插入 Neogen 分子檢測托盤前，Neogen 分子檢測設備必須處於就緒狀態。此加熱步驟大概需要 20 分鐘，由設備狀態列中的一個「橙色」燈進行指示。當儀器準備好啟動檢測時，狀態列將變為「綠色」。

裂解

請用螺絲刀或抹刀移除 Neogen 裂解溶液管架的底部，然後再將其置於 Neogen 分子檢測加熱模塊中。

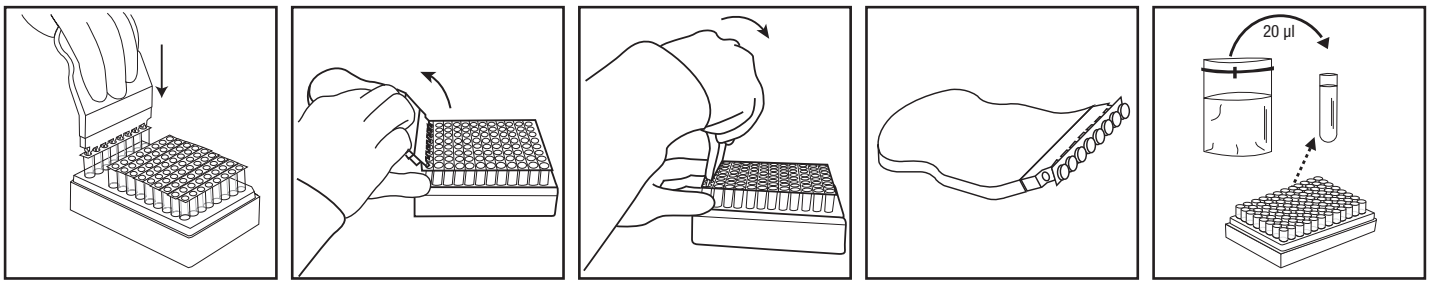


1. 將管架置於室溫 (20-25°C) 環境下一整夜 (16-18 小時)，讓裂解溶液 (Neogen 裂解溶液) 管回溫。使 Neogen 裂解溶液管平衡到室溫的另一種方法是將 Neogen 裂解溶液管放在實驗室工作臺上至少 2 小時、在 37 ± 1°C 培養設備中培養 Neogen 裂解溶液管 1 小時，或將其置於雙乾燥模塊加熱裝置中在 100°C 下持續加熱 30 秒。

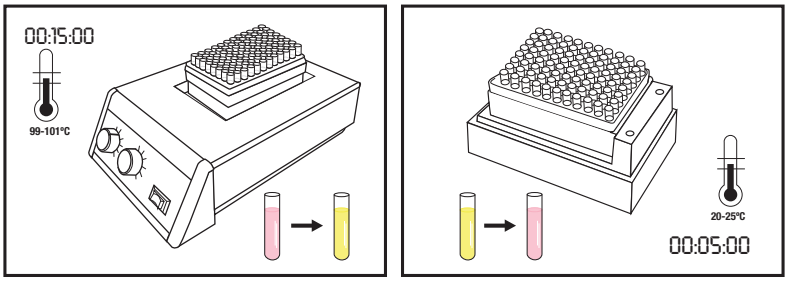
2. 倒置封蓋的裂解溶液管，使其混合均勻。在 4 小時內繼續執行下一步。
3. 從培養設備中取出增菌培養液。
4. 每個樣品和每個陰性控制組 (NC) 樣品 (無菌增菌培養基) 都需要一支 Neogen 裂解溶液管。
   4.1 可以根據所需的 Neogen 裂解溶液管的數量，對 Neogen 裂解溶液聯排管進行切割。選擇所需數量的 Neogen 裂解溶液管或 8 聯排管。將 Neogen 裂解溶液管放入空管架中。
   4.2 為了避免交叉污染，請一次僅打開一排 Neogen 裂解溶液管的管蓋，並且每次轉移溶液時使用新的移液管吸頭。
   4.3 按如下所述將經過增菌的樣品轉移到 Neogen 裂解溶液管：

首先將每個經過增菌的樣品轉移到單個 Neogen 裂解溶液管中。**最後**轉移 NC。

   4.4 使用 Neogen® 分子檢測上蓋/開蓋工具 - Lysis 打開 Neogen 裂解溶液聯排管的管蓋，一次僅打開一排。
   4.5 丟棄 Neogen 裂解溶液管的管蓋 – 如果要保留裂解液以重新檢測，請將管蓋放入乾淨的容器中，以備裂解後重新使用。
      4.5.1 如需處理保留的裂解液，請參閱附錄 A。
   4.6 將 20 µL 樣品轉移到 Neogen 裂解溶液管內，除非方案的表 2、表 3 或表 4 中另有說明 (例如生乳製品，或使用含中和緩衝液的環境樣品時，使用 10 µL)。



5. 重複步驟 4.4 至 4.6，直到將所有樣品添加到聯排管對應的 Neogen 裂解溶液管為止。
6. 當轉移完所有樣品後，將 20 µL Nc (無菌增菌培養基，如 Demi-Fraser 培養液) 轉移到一支 Neogen 裂解溶液管中。請勿將水用作 NC。
7. 檢驗 Neogen 分子檢測加熱模塊的溫度是否達到了 100 ± 1°C。
8. 將未加蓋的 Neogen 裂解溶液管架放入 Neogen 分子檢測加熱模塊中加熱 15 ± 1 分鐘。加熱期間，Neogen 裂解溶液將從粉紅色 (冷) 變為黃色 (熱)。
   8.1 未在分析裂解步驟中經過適當熱處理的樣品可能會被視為具有潛在生物危害性，不應將其插入 Neogen 分子檢測設備。
9. 從加熱模塊中取出未加蓋的 Neogen 裂解溶液管架，將其放入 Neogen 分子檢測冷卻模塊中冷卻至少 5 分鐘，最長 10 分鐘。在環境溫度下使用的 Neogen 分子冷卻模塊應直接置於實驗室工作臺上。冷卻後，裂解溶液將恢復為粉紅色。
10. 從 Neogen 分子檢測冷卻模塊上移除 Neogen 裂解溶液管架。

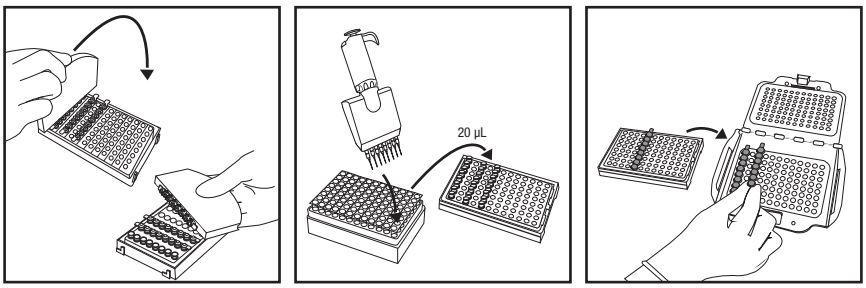


擴增

1. 每個樣品和每個 NC 都需要一支 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*試劑試管。
   1.1 根據所需的管數，對試劑聯排管進行切割。選擇所需數量的 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*試劑試管或 8 聯排管。
   1.2 將 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*試劑試管放入空管架中。
   1.3 請勿將試劑小球攪離管底。
2. 選擇 1 支 Neogen 試劑控制組管並放入管架。
3. 為了避免交叉污染，請一次僅打開一排 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*試劑試管的管蓋，並且每次轉移溶液時使用新的移液管吸頭。
4. 按如下所述將裂解液分別轉移到 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*試劑試管和 Neogen 試劑控制組管：

   首先將各個樣品裂解液轉移到單個 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*試劑試管，然後再轉移 NC。**最後**對 Neogen 試劑控制組管進行水化。

5. 使用 Neogen® 分子檢測上蓋/開蓋工具 - Reagent 打開 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*試劑試管的管蓋，一次僅打開一排。丟棄管蓋。
   5.1 **將 Neogen 裂解溶液管液體上部 ½ 層的 20 µL 樣品裂解液（避免沉澱）轉移到對應的 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*試劑試管。成角度注入，以避免攪動小球。輕輕地上下吸動 5 次，以充分混合。**
   5.2 重複步驟 5.1，直到將所有樣品裂解液添加到聯排管對應的 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*試劑試管為止。
   5.3 使用額外的蓋蓋住 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*試劑試管，並使用 Neogen 分子檢測上蓋/開蓋工具 - Reagent 較圓的一側以前後移動的方式加壓，以確保將蓋子蓋緊。
   5.4 根據需要對待檢測的樣品重複步驟 5.1 到 5.3。
   5.5 當轉移完所有樣品裂解液後，重複步驟 5.1，以將 20 µL NC 裂解液轉移到 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*試劑試管。
   5.6 **將 20 µL NC 裂解液轉移至 Neogen 試劑控制組管**。成角度注入，以避免攪動小球。輕輕地上下吸動 5 次，以充分混合。
6. 將加蓋的試管放入乾淨且經過淨化處理的 Neogen 分子檢測托盤中。合上並鎖定 Neogen 分子檢測托盤蓋。



7. 在 Neogen 分子檢測系統軟體中查看和確認配置的檢測。
8. 在軟體中按一下「啟動」按鈕並選擇要使用的儀器。所選儀器的蓋會自動打開。
9. 將 Neogen 分子檢測托盤放入 Neogen 分子檢測設備並合上蓋子，以啟動分析。結果將在 75 分鐘內提供，但陽性結果可以更快檢測到。
10. 分析完成後，從 Neogen 分子檢測設備中取出 Neogen 分子檢測托盤，透過將試管浸入 1-5%（與水的體積比）家用漂白溶液或同類溶液 1 小時並使其遠離分析準備區，對試管進行廢棄處理。

注意事項：為了將因為交叉污染而導致的偽陽性結果風險降至最低，請勿打開包含擴增的 DNA 的試劑管。這包括 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*試劑試管、Neogen 試劑控制組和基質控制組管。對密封的試劑管進行廢棄處理時，應始終將其放入濃度為 1-5%（與水的體積比）的家用漂白溶液或同類溶液中浸泡 1 小時，並確保其遠離分析準備區。

結果和說明

軟體會使用一種演算法對來自核酸擴增檢測的光輸出曲線進行解讀。軟體會自動分析結果並根據不同結果用不同顏色進行標記。透過分析一系列獨一無二的曲線參數可以確定陽性結果或陰性結果。「假定陽性」結果即時報告，「陰性」和「檢查」結果則在檢測完成後顯示。

假定陽性樣品應當遵循實驗室標準操作規程或正確的參考方法進行確認[1, 2, 3]，應首先將初步的增菌培養液轉移到二次增菌培養液（如適用），然後進行後續的平板培養，並利用正確的生化和血清方法對分離菌進行確認。

備註：因為系統和 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*擴增試劑帶有「背景」相對光單位 (RLU) 讀數，即使陰性樣品也不會出現讀數為零的情況。

在極少數情況下，當存在異常光輸出時，演算法會顯示「檢查」標記。Neogen 建議使用者對所有「檢查」樣品重新進行分析。如果結果仍為「檢查」，請使用您喜歡的方法或按照當地法規指定的方法進行確認試驗。

表 5: Neogen 分子檢測系統軟體提供的樣品和判讀結果符號。

孔類型	孔結果符號	結果	判讀
樣品		陽性	樣品是目標病原體的假定陽性樣品。
樣品		陰性	樣品是目標病原體的陰性樣品。
樣品		抑制	樣品基質對分析有抑制作用。可能需要重新檢測。有關更多資訊，請參閱疑難排解部分和檢測套組產品資訊。
樣品		檢查	不確定目標病原體是否存在。可能需要重新檢測。有關更多資訊，請參閱疑難排解部分和檢測套組產品資訊。
樣品		錯誤	未檢測到生物發光。可能需要重新檢測。有關更多資訊，請參閱疑難排解部分和檢測套組產品資訊。

依照 NF VALIDATION 認證方法確認結果

選項 1: 採用 ISO 11290[3] 標準，從 Demi-Fraser 培養液增菌液開始。

選項 2: 作為 NF VALIDATION 認證方法的組成部分，透過在 PALCAM 瓊脂或顯色瓊脂 (O&A) 上執行分離操作，對*單增李斯特菌*進行檢測。存在具有明顯特徵的菌落即證明存在*單增李斯特菌*。

選項 3: 按照 EN ISO 7218[5] 標準所述，使用核酸探針對選擇性瓊脂中的隔離菌落執行操作（請參閱選項 1 或 2）。

選項 4: 可以使用任何其他 NF VALIDATION 認證方法，原理必須與 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*不同。在執行此第二種驗證方法時，必須遵循所述的完整方案。兩個方法在開始確認前的所有步驟必須是相同的。

如果出現結果不一致（替代方法的結果為假定陽性，且並未透過上述其中一種方法予以確認），則實驗室必須執行必要的步驟來確保所獲得結果的有效性。

如果出現結果不一致（使用 Neogen 分子檢測套組 2 - *單增李斯特菌*得出的結果為假定陽性，且並未透過上述其中一種方法予以確認），則實驗室必須執行必要的步驟來確保所獲得結果的有效性。

如果您對於特定的應用程式或程序存有疑問，請造訪我們的網站 www.neogen.com，也可與您當地的 Neogen 代表或經銷商聯絡以獲得幫助。

附錄 A. 方案中斷：儲存並重新檢測熱處理後的裂解液。

1. 如需儲存熱處理後的裂解液，應使用乾淨的蓋子為裂解溶液管重新封蓋（請參閱 4.5「裂解」）。
2. 在 4 - 8°C 溫度下最多儲存 72 小時。
3. 取出儲存的樣品以準備用於擴增，將其倒置 2-3 次進行混合。
4. 打開管蓋。
5. 將混合後的裂解液管置於 Neogen 分子檢測加熱模塊中並在 100 ± 1°C 溫度下加熱 5 ± 1 分鐘。
6. 從加熱模塊中取出 Neogen 裂解溶液管架，將其放入 Neogen 分子檢測冷卻模塊中冷卻至少 5 分鐘，最長 10 分鐘。
7. 繼續執行上文詳述的「擴增」部分的方案。

參考資料：

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

產品標籤符號說明

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

FS00867C

NEOGEN

วันที่ออก: 2024-07

คำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์

ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส*

รายละเอียดผลิตภัณฑ์และวัตถุประสงค์การใช้งาน

ชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส*ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen® จะนำมาใช้กับระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® สำหรับการตรวจหาเชื้อ *ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* อย่างรวดเร็วและเฉพาะเจาะจงในตัวอย่างอาหารที่ได้รับการเลี้ยงเชื้อ และในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ใช้การเพิ่มขยายยีนแบบลูปที่อุณหภูมิเดียว (Loop-mediated isothermal amplification) เพื่อเพิ่มลำดับกรดนิวคลีอิกด้วยวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงและความไวสูง ผสานกับการเรืองแสงทางชีวภาพเพื่อตรวจจับการเพิ่มขยายจำนวน ผลการทดสอบเบื้องต้นที่เป็นบวกจะได้รับการรายงานในทันที ขณะที่ผลการทดสอบที่เป็นลบจะแสดงผลภายหลังจากที่การทดสอบดังกล่าวเสร็จสมบูรณ์แล้ว ผลการทดสอบเบื้องต้นที่เป็นบวกควรได้รับการยืนยันโดยใช้วิธีการที่ท่านเห็นสมควรหรือตามที่ระบุไว้ในระเบียบข้อบังคับต่าง ๆ ในท้องถิ่น[1, 2, 3]

ชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส*ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ออกแบบมาให้ใช้ในสภาพแวดล้อมห้องปฏิบัติการโดยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ผ่านการอบรมเทคนิคการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ Neogen ยังไม่ได้จัดทำเอกสารเกี่ยวกับการใช้ผลิตภัณฑ์นี้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ นอกจากอุตสาหกรรมอาหารหรือเครื่องดื่ม ตัวอย่างเช่น Neogen ยังไม่ได้ออกเอกสารเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์นี้สำหรับการทดสอบตัวอย่างน้ำ ตัวอย่างยา ตัวอย่างเครื่องสำอาง ตัวอย่างทางคลินิก หรือตัวอย่างด้านสัตวแพทย์ศาสตร์ ชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส*ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ยังไม่ได้รับการประเมินกับระเบียบการทดสอบที่เป็นไปได้ทั้งหมด หรือกับสายพันธุ์แบคทีเรียที่เป็นไปได้ทั้งหมด

เช่นเดียวกับวิธีทดสอบทั่วๆ ไป แหล่งที่มา สูตร และคุณภาพของอาหารสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อสามารถส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบที่ได้
นอกจากนี้ ปัจจัยต่างๆ เช่น วิธีการสุ่มเก็บตัวอย่าง วิธีการทดสอบ การเตรียมตัวอย่าง การจัดการและเทคนิคที่ใช้ในห้องปฏิบัติการอาจส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบที่ได้ด้วยเช่นกัน Neogen ขอแนะนำให้ประเมินวิธีการทดสอบ รวมทั้งอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อในสภาพแวดล้อมของผู้ใช้โดยใช้จำนวนตัวอย่างที่เพียงพอกับอาหารแต่ละชนิดและสภาวะที่มีความท้าทายกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีการดังกล่าวเป็นไปตามเกณฑ์ของผู้ใช้

Neogen ได้ประเมินชุดทดสอบ*เชื้อลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส*ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen - ด้วยเดมิเฟรเซอร์บรอทที่มีเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรต และ เฟรเซอร์บรอทที่มีเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรตตามที่จำเป็น สูตรทั่วไปของอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ มีดังต่อไปนี้

สูตรทั่วไปของเดมิเฟรเซอร์บรอทเบส	(กรัมต่อลิตร)	สูตรทั่วไปของเฟรเซอร์บรอทเบส	(กรัมต่อลิตร)
โซเดียมคลอไรด์	20 ก.	โซเดียมคลอไรด์	20 ก.
ไดโซเดียมฟอสเฟต ปราศจากน้ำ*	9.6 ก.	ไดโซเดียมฟอสเฟต ปราศจากน้ำ*	9.6 ก.
สารสกัดจากเนื้อ	5.0 ก.	สารสกัดจากเนื้อ	5.0 ก.
เคซีนย่อยจากตับอ่อน	5.0 ก.	เคซีนย่อยจากตับอ่อน	5.0 ก.
เนื้อสัตว์ย่อย	5.0 ก.	เนื้อสัตว์ย่อย	5.0 ก.
สารสกัดยีสต์	5.0 ก.	สารสกัดยีสต์	5.0 ก.
ลิเธียมคลอไรด์	3.0 ก.	ลิเธียมคลอไรด์	3.0 ก.
สารโมโนเบสิกโพแทสเซียมฟอสเฟต	1.35 ก.	สารโมโนเบสิกโพแทสเซียมฟอสเฟต	1.35 ก.
เอสคูลิน	1.0 ก.	เอสคูลิน	1.0 ก.
อะคริฟลาวินไฮโดรคลอไรด์	0.0125 ก.	อะคริฟลาวินไฮโดรคลอไรด์	0.025 ก.
กรดนาลิดิซิก	0.01 ก.	กรดนาลิดิซิก	0.02 ก.

***** ทดแทน: ไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต ไดไฮเดรต 12.0 ก.

ซัพพลีเม้นท์สำหรับเฟรเซอร์บรอท
(ส่วนผสมต่อขวดบรรจุสารละลาย 10 มล. เพิ่มขวดบรรจุสารละลายหนึ่งขวดต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเบส 1 ลิตร)

เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรต 0.5 ก./10 มล.

pH สุดท้าย 7.2 ± 0.2 ที่ 25°C

เครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® มีจุดมุ่งหมายในการใช้กับตัวอย่างที่ได้ผ่านกระบวนการให้ความร้อนในระหว่างขั้นตอนการไลซีสของการทดสอบ ซึ่งได้รับการออกแบบมาเพื่อทำลายเชื้อที่มีในตัวอย่าง ตัวอย่างซึ่งไม่ได้รับความร้อนอย่างเหมาะสมในระหว่างขั้นตอนการไลซีสของชุดทดสอบอาจถือว่าเป็นสารที่อาจมีอันตรายทางชีวภาพ และไม่ควรใส่เข้าไปในเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

Neogen Food Safety ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO (องค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน) 9001 ด้านการออกแบบและการผลิต

ชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส*ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen มีทั้งหมด 96 หลอดทดสอบตามที่อธิบายไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

รายการ	การคัดแยก	จำนวน	สิ่งที่บรรจุภายใน	ความคิดเห็น
หลอดสารละลายไลซีส Neogen® (LS)	สารละลายสีชมพูในหลอดใส	96 หลอด (12 แถว แถวละ 8 หลอด)	ปริมาณ 580 ไมโครลิตรต่อหลอด	บรรจุอยู่ในที่วางและพร้อมใช้งาน
หลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส*ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen®	หลอดสีเหลือง	96 หลอด (12 แถว แถวละ 8 หลอด)	ส่วนผสมสำหรับการเพิ่มขยายและการตรวจหาเชื้อโรคแบบเฉพาะเจาะจงที่ทำไลโอฟิไลซ์แล้ว	พร้อมใช้งาน
ฝาสำรอง	ฝาสีเหลือง	96 ฝา (12 แถว แถวละ 8 ฝา)		พร้อมใช้งาน
Neogen® รีเอเจนต์คอนโทรล (RC)	หลอดใสชนิดเปิดฝาด้านบน	16 หลอด (2 ถุง ถุงละ 8 หลอด)	ส่วนผสมที่ทำไลโอฟิไลซ์สำหรับควบคุม DNA การเพิ่มขยายและการตรวจหา	พร้อมใช้งาน

ชุดควบคุมผลลบหรือ Negative Control เป็นอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อที่ปลอดเชื้อ เช่น เดมิเฟรเซอร์บรอท ห้ามใช้น้ำเป็นชุดควบคุมผลลบ

ความปลอดภัย

ผู้ใช้ควรอ่าน ทำความเข้าใจ และปฏิบัติตามข้อมูลความปลอดภัยทั้งหมดในคำแนะนำการใช้งานระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen และ Neogen ชุดทดสอบ เชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส*ระดับโมเลกุล 2 เก็บคำแนะนำด้านความปลอดภัยนี้ไว้สำหรับใช้อ้างอิงในอนาคต

⚠ **คำเตือน:** บ่งชี้ว่า เป็นสถานการณ์ที่เป็นอันตราย ซึ่งหากไม่มีการหลีกเลี่ยง อาจก่อให้เกิดการเสียชีวิตหรือการบาดเจ็บรุนแรงและ/หรือความเสียหายต่อทรัพย์สินได้

ข้อสังเกต: ระบุสถานการณ์ที่อาจเป็นอันตราย หากไม่หลีกเลี่ยง อาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อทรัพย์สิน

⚠ คำเตือน

ห้ามใช้ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส*ในการวินิจฉัยโรคในมนุษย์ หรือสัตว์

วิธีการของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส*อาจสร้าง*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส*ในระดับที่จะทำให้ทารกในหญิงตั้งครรภ์และผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องเสียชีวิตได้ หากได้รับสาร

ผู้ใช้งานต้องทำการฝึกอบรมบุคลากรเกี่ยวกับเทคนิคการทดสอบที่เหมาะสมในปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น หลักปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการที่ดี, ISO/IEC 17025[4] หรือ ISO 7218[5]

เพื่อลดความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับผลลบปลอม ซึ่งนำไปสู่การปล่อยผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนไปขาย ให้ปฏิบัติดังนี้:

- ปฏิบัติตามระเบียบการและดำเนินการทดสอบดังที่ระบุไว้อย่างชัดเจนในคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์
- เก็บชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ตามที่ระบุไว้บนบรรจุภัณฑ์และในคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์
- ใช้ชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ก่อนวันหมดอายุเสมอ
- ใช้ชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen สำหรับตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมและตัวอย่างอาหารที่ผ่านการตรวจสอบภายในหรือโดยบุคคลที่สามแล้วเท่านั้น
- ใช้ชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen เฉพาะกับพื้นผิว สารฆ่าเชื้อ วิธีการและสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผ่านการตรวจสอบภายในหรือโดยบุคคลที่สามแล้วเท่านั้น
- สำหรับตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมที่มีบัฟเฟอร์สำหรับทำให้เป็นกลางโดยมีสารประกอบเชิงซ้อนของเอริลซัลโฟเนตอยู่ด้วย ให้ทำการเจือจางด้วยอัตราส่วน 1:2 ก่อนที่จะทดสอบ (เติมตัวอย่าง 1 ส่วนลงในอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 ส่วน) อีกหนึ่งตัวเลือกคือ ถ่ายบัฟเฟอร์สำหรับทำให้เป็นกลางที่มีการเพิ่มเชื้อปริมาณ 10 ไมโครลิตร เข้าไปยังหลอดสารละลายไลซีส Neogen ชุดตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของ Neogen® ซึ่งประกอบด้วยบัฟเฟอร์สำหรับทำให้เป็นกลางโดยมีสารเชิงซ้อนของเอริลซัลโฟเนตมีดังนี้: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G and HS2410NB2G.

เพื่อลดความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการสัมผัสสารเคมีหรือสารอันตรายทางชีวภาพ ให้ปฏิบัติดังนี้:

- ขอแนะนำอย่างยิ่งให้เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพศหญิงทราบถึงความเสี่ยงต่อการเจริญเติบโตของทารกในครรภ์ ซึ่งเป็นผลมาจากการติดเชื้อของมารดาจากการสัมผัส*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส*
- ให้ทำการทดสอบเชื้อก่อโรคในห้องปฏิบัติการที่มีอุปกรณ์อย่างเหมาะสมภายใต้การควบคุมของบุคลากรที่ได้รับการอบรม อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อที่บ่มแล้ว หรือพื้นผิวที่มีการสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อหลังเพิ่มจำนวนเชื้อที่บ่มแล้ว อาจจะมีเชื้อโรคในระดับเพียงพอที่จะก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์ได้
- ปฏิบัติตามแนวปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการมาตรฐานทุกครั้งโดยรวมถึงการสวมเครื่องแต่งกายเพื่อป้องกันและอุปกรณ์ปกป้องดวงตาในขณะที่ปฏิบัติงานกับรีเอเจนต์และตัวอย่างที่มีการปนเปื้อน
- หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับอาหารหลังบ่มเพิ่มจำนวนเชื้อและหลอดบรรจุรีเอเจนต์ภายหลังการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ
- กำจัดตัวอย่างหลังเพิ่มจำนวนเชื้อตามมาตรฐานอุตสาหกรรมปัจจุบัน
- ตัวอย่างซึ่งไม่ได้รับความร้อนอย่างเหมาะสมในระหว่างขั้นตอนการไลซีสของชุดทดสอบอาจถือว่าเป็นสารที่อาจมีอันตรายทางชีวภาพและไม่ควรใส่เข้าไปในเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

เพื่อลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนข้ามขณะเตรียมชุดทดสอบ ให้ปฏิบัติดังนี้:

- สวมถุงมือตลอดเวลา (เพื่อปกป้องผู้ใช้งานและป้องกันการเกิดนิวคลีเอส)

ควรปฏิบัติดังนี้เพื่อลดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม:

- ปฏิบัติตามมาตรฐานการกำจัดทิ้งตามข้อกำหนดอุตสาหกรรมในปัจจุบันสำหรับของเสียที่ปนเปื้อน

เพื่อเป็นการลดความเสี่ยงอันเกิดจากการสัมผัสโดนของเหลวร้อน ให้ปฏิบัติดังนี้:

- ห้ามตั้งเครื่องทำความร้อนอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่แนะนำไว้
- ห้ามทำความร้อนเกินเวลาที่แนะนำ
- ใช้เทอร์โมมิเตอร์ที่ได้รับการสอบเทียบตามมาตรฐานและเหมาะสม เพื่อยืนยันอุณหภูมิของของฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen® (เช่น เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มบางส่วน หรือเทอร์โมมิเตอร์แบบดิจิทัล ที่ไม่ใช่เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มทั้งหมด) จะต้องวางเทอร์โมมิเตอร์ในบริเวณที่กำหนดไว้ของฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen

ข้อสังเกต

เพื่อลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนข้ามขณะเตรียมชุดทดสอบ ให้ปฏิบัติดังนี้:

- เปลี่ยนถุงมือก่อนขั้นตอนการผสมสารละลายกับเม็ดรีเอเจนต์
- แนะนำให้ใช้ปิเปตต์ทิประดับชีววิทยาโมเลกุลชนิดที่มีตัวกั้นละอองอากาศ (ชนิดมีตัวกรอง) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- ใช้ปิเปตต์ทิปอันใหม่สำหรับการถ่ายตัวอย่างในแต่ละครั้ง
- ใช้แนวปฏิบัติที่ดีสำหรับห้องปฏิบัติการ เพื่อถ่ายโอนตัวอย่างจากอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อที่บ่มแล้วไปยังหลอดสายละลายไลซีส เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนในขั้นตอนการปิเปตต์ ผู้ใช้อาจเพิ่มขั้นตอนในระหว่างการถ่ายตัวอย่างสารละลาย ตัวอย่างเช่น ผู้ใช้อาจถ่ายโอนแต่ละตัวอย่างอาหารที่เพิ่มจำนวนเชื้อใส่เข้าไปในหลอดที่ฆ่าเชื้อแล้ว
- ปฏิบัติการทดสอบทางชีววิทยาโมเลกุลบนโต๊ะที่มีหลอดไฟฆ่าเชื้อหากทำได้ ลดการปนเปื้อนบนโต๊ะปฏิบัติงานและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ (ปิเปต เครื่องมือเปิด/ปิดฝา ฯลฯ) อย่างสม่ำเสมอด้วยน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (ผสมกับน้ำตามอัตราส่วน) หรือสารละลายกำจัดดีเอ็นเอ

เพื่อลดความเสี่ยงจากผลบวกปลอม ให้ปฏิบัติดังนี้

- ห้ามเปิดหลอดรีเอเจนต์ภายหลังการเพิ่มขยายจำนวนเชื้อ
- กำจัดหลอดทดลองที่ปนเปื้อนแล้วเสมอ โดยแช่ในน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนหรือเทียบเท่า ที่มีความเข้มข้น 1-5% (ผสมกับน้ำตามอัตราส่วน) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและให้อยู่ห่างจากพื้นที่จัดเตรียมชุดทดสอบทุกครั้ง
- ห้ามนึ่งฆ่าเชื้อหลอดรีเอเจนต์ภายหลังการเพิ่มขยายจำนวน

ศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมในเอกสารข้อมูลความปลอดภัยและระเบียบข้อบังคับการกำจัดทิ้งในประเทศ

หากท่านมีข้อสงสัยเกี่ยวกับการใช้งานหรือวิธีการที่เฉพาะเจาะจงใด ๆ โปรดเยี่ยมชมเว็บไซต์ของเราที่ www.neogen.com หรือติดต่อตัวแทนจำหน่ายหรือผู้จัดจำหน่ายของบริษัท Neogen ในท้องถิ่นของท่าน

ความรับผิดชอบของผู้ใช้

ผู้ใช้จะต้องทำความเข้าใจเกี่ยวกับคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์และข้อมูลเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ หากต้องการข้อมูลเพิ่มเติม สามารถเยี่ยมชมเว็บไซต์ของเราได้ที่ **www.neogen.com** หรือติดต่อตัวแทนหรือผู้จัดจำหน่าย Neogen ในพื้นที่ของท่าน

การเลือกวิธีทดสอบ จะต้องศึกษาปัจจัยภายนอกต่างๆ ที่อาจส่งผลต่อผลการทดสอบ เช่น วิธีการสุ่มตัวอย่าง ระเบียบวิธีการทดสอบ วิธีการเตรียมตัวอย่าง การจัดการควบคุม และเทคนิคของห้องปฏิบัติการที่อาจกระทบต่อผลการทดสอบได้

ผู้ใช้งานเป็นผู้รับผิดชอบในการประเมินความเหมาะสมสำหรับการเลือกวิธีการทดสอบหรือชนิดผลิตภัณฑ์ เพื่อประเมินจำนวนเมทริกซ์ที่เหมาะสมกับความสามารถในการเหลือรอดของจุลินทรีย์ เพื่อให้ผู้ใช้แน่ใจว่าวิธีการทดสอบที่เลือกนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ของผู้ใช้เอง

นอกจากนี้ ผู้ใช้จะต้องรับผิดชอบในการเลือกวิธีการทดสอบและผลลัพธ์ที่ได้ให้เป็นไปตามข้อกำหนดของลูกค้าและของซัพพลายเออร์

เช่นเดียวกับวิธีการทดสอบอื่น ๆ ผลการทดสอบที่ได้จากการใช้ผลิตภัณฑ์ Neogen Food Safety ใดก็ตาม ไม่ได้รับประกันถึงคุณภาพของเมทริกซ์หรือขั้นตอนที่ใช้ทดสอบ

Neogen ได้พัฒนาชุดน้ำยาควบคุมเพื่อทดสอบผลของส่วนประกอบในตัวอย่างแต่ละประเภท โดยวิธี Neogen® เพื่อช่วยให้ลูกค้าประเมินวิธีการสำหรับเมทริกซ์ต่างๆ ของอาหารได้ เมื่อจำเป็น ให้ใช้ชุดน้ำยาควบคุมเพื่อทดสอบผลของส่วนประกอบในตัวอย่างแต่ละประเภท (MC) เพื่อทดสอบว่าเมทริกซ์นั้นสามารถส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* หรือไม่ ทดสอบตัวอย่างหลาย ๆ ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของเมทริกซ์นั้น ๆ เช่น ตัวอย่างที่ได้จากแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกัน ตัวอย่างที่ได้ในระหว่างการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบต่าง ๆ เมื่อนำวิธีการของ Neogen มาใช้ หรือเมื่อทำการทดสอบเมทริกซ์ใหม่หรือที่ไม่รู้จักหรือเมทริกซ์ที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบหรือการแปรรูป

สามารถให้คำจำกัดความของเมทริกซ์ได้ว่า เป็นชนิดของผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติที่มาที่แตกต่างกัน เช่น องค์ประกอบหลักและกระบวนการแปรรูปที่ต่างกัน ความแตกต่างระหว่างเมทริกซ์ต่าง ๆ อาจจะเป็นเพียงผลที่เกิดจากความแตกต่างในกระบวนการแปรรูปหรือสภาพลักษณะของเมทริกซ์ เช่น ดิบกับผ่านการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอไรซ์ สดกับแห้ง ฯลฯ

เงื่อนไขการรับประกัน/การชดเชยแบบจำกัด

เว้นแต่จะระบุอย่างชัดแจ้งในข้อจำกัดการรับผิดเกี่ยวกับบรรจุภัณฑ์ของสินค้าแต่ละประเภท นีโอเจนขอสงวนสิทธิ์ในการรับประกันใดๆ ไม่ว่าโดยชัดแจ้งหรือโดยปริยาย ซึ่งรวมถึงแต่ไม่จำกัดเพียง การรับประกันใดๆ ในความสามารถในการค้าขายได้ (Merchantability) หรือ การใช้สอยสินค้าให้สมประโยชน์ตามความมุ่งหมายเฉพาะ (Fitness) หากสินค้าใดๆ ของนีโอเจน มีข้อบกพร่องในความปลอดภัยเกี่ยวกับอาหาร นีโอเจนหรือตัวแทนจัดจำหน่ายที่ได้รับอนุญาตจากนีโอเจนจะเลือกว่าจะเปลี่ยนสินค้าทดแทนหรือคืนเงินค่าสินค้า ซึ่งเป็นการเยียวยาเฉพาะตัวแก่ลูกค้าหากมีคำถามเพิ่มเติม กรุณาติดต่อตัวแทนของนีโอเจนหรือตัวแทนจัดจำหน่ายที่ได้รับอนุญาตจากนีโอเจน

ขอบเขตความรับผิดชอบของ Neogen

NEOGEN จะไม่รับผิดชอบต่อการสูญเสียหรือความเสียหายใดๆ ทั้งโดยตรง โดยอ้อม ความเสียหายจำเพาะ ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการผิดสัญญา หรือที่เป็นผลสืบเนื่อง รวมถึงแต่ไม่จำกัดเพียงการสูญเสียผลกำไร ความรับผิดชอบของทาง Neogen ในทางกฎหมายจะต้องไม่เกินราคาของผลิตภัณฑ์ที่เสียหายหรือบกพร่องไม่ว่ากรณีใดๆ ก็ตาม

การเก็บรักษาและการกำจัด

เก็บชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C อย่าแช่แข็ง เก็บชุดอุปกรณ์ให้พ้นแสงในระหว่างการเก็บรักษา หลังจากเปิดชุดอุปกรณ์แล้ว ให้ตรวจสอบว่าถุงฟอยล์ไม่ชำรุดเสียหาย หากถุงฟอยล์ชำรุดเสียหาย ห้ามใช้ผลิตภัณฑ์นั้น หลังจากเปิดแล้ว ควรเก็บรักษาหลอดรีเอเจนต์ที่ยังไม่ได้ใช้ไว้ในถุงที่ซีลปิดซ้ำได้โดยมีสารดูดความชื้นใส่อยู่ภายใน เพื่อให้รีเอเจนต์ที่ทำไลโอฟิไลซ์แล้วอยู่ในสภาวะคงตัว เก็บรักษาถุงที่ซีลปิดซ้ำแล้วไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C เป็นเวลาไม่เกิน 60 วัน

ห้ามใช้ชุดทดสอบ เชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส*ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ที่เลยวันหมดอายุแล้ว วันหมดอายุและหมายเลขล็อตจะแสดงไว้บนฉลากด้านนอกของกล่อง หลังใช้งาน อาหารเพิ่มจำนวนเชื้อและหลอดของชุดทดสอบ เชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส*ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen อาจมีสารจากเชื้อก่อให้เกิดโรคอยู่ เมื่อการทดสอบเสร็จสมบูรณ์แล้ว ให้ปฏิบัติตามมาตรฐานอุตสาหกรรมในปัจจุบันสำหรับการกำจัดและทิ้งขยะปนเปื้อน ศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมในเอกสารข้อมูลความปลอดภัยและระเบียบข้อบังคับการกำจัดทิ้งในประเทศ

คำแนะนำการใช้งาน

ปฏิบัติตามคำแนะนำทั้งหมดอย่างละเอียดรอบคอบ หากไม่ปฏิบัติเช่นนั้น อาจให้ผลที่ไม่ถูกต้องแม่นยำได้

ลดการปนเปื้อนบนโต๊ะปฏิบัติงานและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ (ปิเปต เครื่องมือเปิด/ปิดฝา ฯลฯ) อย่างสม่ำเสมอด้วยน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (ผสมกับน้ำตามอัตราส่วน) หรือสารละลายกำจัดดีเอ็นเอ

ผู้ใช้ควรผ่านการฝึกอบรมคุณสมบัติสำหรับผู้ปฏิบัติงาน (OQ) ระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ตามที่ระบุในเอกสาร “แนวทางและระเบียบการด้านคุณสมบัติการติดตั้ง (IQ) / คุณสมบัติการปฏิบัติการ (OQ) สำหรับระบบการทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen”[6]

ดูในส่วน “คำแนะนำเฉพาะสำหรับวิธีที่ผ่านการตรวจสอบแล้ว” สำหรับข้อกำหนดเฉพาะ:

ตารางที่ 3 สำหรับระเบียบการเพิ่มจำนวนเชื้อตามมาตรฐาน AOAC® *Official Method of Analysis℠* **2016.08** และ AOAC® *Performance Tested Method℠* Certificate **#081501**

ตารางที่ 4 สำหรับระเบียบการเพิ่มจำนวนเชื้อตามใบรับรองของ NF Validation **3M 01/15-09/16**

การเพิ่มจำนวนเชื้อในตัวอย่าง

ตารางที่ 2, 3 หรือ 4 แสดงคำแนะนำสำหรับการเพิ่มปริมาณเชื้อในตัวอย่างอาหาร และตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม ผู้ใช้มีหน้าที่รับผิดชอบในการพิสูจน์ยืนยันระเบียบการสุ่มตัวอย่างหรืออัตราส่วนการเจือจางแบบอื่นเพื่อให้มั่นใจว่าวิธีการทดสอบนี้สอดคล้องกับเกณฑ์ของผู้ใช้งานเอง

อาหาร

1. ให้อาหารสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อเดมิเฟรเซอร์บรอท (รวมถึงเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรต) ปรับสมดุลกับอุณหภูมิห้องปฏิบัติการโดยรอบ
2. ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้ากับตัวอย่างในลักษณะปลอดเชื้อโดยเป็นไปตามตารางที่ 2, 3 หรือ 4 สำหรับตัวอย่างประเภทเนื้อสัตว์และตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นอนุภาคขนาดเล็กทั้งหมด แนะนำให้ใช้ถุงที่มีตัวกรอง
3. ผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดีด้วยวิธีการปั่นผสม การเขย่า หรือ การผสมด้วยมือเป็นระยะเวลา 2 ± 0.2 นาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 1°C ตามตารางที่ 2, 3 หรือ 4
4. สำหรับผลิตภัณฑ์นมดิบ (ดูตารางที่ 2, 3 หรือ 4) ถ่ายตัวอย่างจากการเพิ่มจำนวนเชื้อขั้นต้น 0.1 มล. ไปยังเฟรเซอร์บรอท 10 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 ถึง 1°C เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง

ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม

อุปกรณ์เก็บตัวอย่างอาจเป็นฟองน้ำชุบสารละลายที่ทำให้เป็นกลางเพื่อยับยั้งฤทธิ์ของสารฆ่าเชื้อ Neogen แนะนำให้ใช้ฟองน้ำเซลลูโลสที่ไม่มีไบโอไซด์ สารละลายที่ทำให้เป็นกลางอาจเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นกลาง Dey-Engley (D/E) หรืออาหารเลี้ยงเชื้อเลทีนบรอท ควรทำการฆ่าเชื้อในพื้นที่หลังจากการเก็บตัวอย่าง

คำเตือน: หากคุณเลือกที่จะใช้บัฟเฟอร์สำหรับทำให้เป็นกลาง (NB) ซึ่งประกอบด้วยสารเชิงซ้อนของเอริลซัลโฟเนตเป็นสารละลายเพื่อทำให้ฟองน้ำชุ่มชื้น ต้องทำการเจือจางตัวอย่างหลังเพิ่มจำนวนเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:2 (ตัวอย่าง 1 ส่วนในอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 ส่วน) ก่อนการทดสอบเพื่อที่จะลดความเสี่ยงอันเกี่ยวข้องกับผลลบปลอมซึ่งนำไปสู่การปล่อยผลิตภัณฑ์ที่ปนเปื้อนออกสู่ภายนอกได้ อีกหนึ่งตัวเลือกคือถ่ายบัฟเฟอร์สำหรับทำให้เป็นกลางที่มีการเพิ่มเชื้อปริมาณ 10 ไมโครลิตรเข้าไปยังหลอดสารละลายไลซีส Neogen

ขนาดพื้นที่เก็บตัวอย่างที่แนะนำเพื่อตรวจสอบยืนยันการมีอยู่หรือการไม่มีอยู่ของเชื้อก่อโรคบนพื้นผิวคือขนาดอย่างน้อย 100 cm^2 (10 ซม. x 10 ซม. หรือ 4” x 4”) เมื่อทำการเก็บตัวอย่างด้วยฟองน้ำ ให้ครอบคลุมพื้นที่โดยรวมทั้งสองทิศทาง (กล่าวคือ จากซ้ายไปขวา และจากบนลงล่าง) หรือเก็บตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมตามขั้นตอนการเก็บตัวอย่างปัจจุบันของคุณ หรือตามมาตรฐาน FDA BAM[1], USDA FSIS MLG[2] หรือแนวทางตามมาตรฐาน ISO 18593[7]

1. ให้อาหารสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อเดมิเฟรเซอร์บรอท (รวมถึงเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรต) ปรับสมดุลกับอุณหภูมิห้องปฏิบัติการโดยรอบ
2. ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้ากับตัวอย่างในลักษณะปลอดเชื้อโดยเป็นไปตามตารางที่ 2, 3 หรือ 4
3. ผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดีด้วยวิธีการปั่นผสม การเขย่า หรือ การผสมด้วยมือเป็นระยะเวลา 2 ± 0.2 นาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 1°C

เป็นเวลา 24-30 ชั่วโมงตามตารางที่ 2, 3 หรือ 4

ตาราง 2: ระเบียบการของอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อทั่วไปที่ 37 ± 1 °C โดยใช้เดมิเฟรเซอร์บรอทและเฟรเซอร์บรอทตามที่จำเป็น

เมทริกซ์ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ (มล.)	เวลาการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)
เนื้อสัตว์ สัตว์ปีก อาหารทะเล และปลาที่ผ่านความร้อน ปรุงสุก ผลิตภัณฑ์นมที่ผ่านความร้อน / พาสเจอร์ไรส์ ผลผลิตและผัก อาหารหลายองค์ประกอบ	25 ก.	225	24-30
ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม[a]	ฟองน้ำ 1 ชิ้น	100 หรือ 225	24-30
	ไม้สวอปป้ายเก็บตัวอย่าง 1 อัน	10	24-30
เนื้อสัตว์ดิบ สัตว์ปีก อาหารทะเล เนื้อปลา	25 ก.	475	28-32

เมทริกซ์ตัวอย่าง	การเพิ่มจำนวนเชื้อขั้นต้น (เดมิเฟรเซอร์บรอทเบส)[ก]			การเพิ่มจำนวนเชื้อที่สอง (เฟรเซอร์บรอท)[ก]			ปริมาตรการวิเคราะห์ตัวอย่าง[ข]
	ขนาดตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ (มล.)	เวลาการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)	ขนาดตัวอย่าง	อุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (°C)	เวลาการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)	
ผลิตภัณฑ์นมดิบ	25 ก.	225	20-24	ถ่ายเฟรเซอร์บรอท 0.1 มล. ไปยัง 10 มล	37 ± 1	20-24	10 ไมโครลิตร

(ก) เดมิเฟรเซอร์และเฟรเซอร์บรอทควรเสริมด้วยซัพพลีเม้นท์สำหรับเฟรเซอร์บรอท (เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรต) ในระหว่างการเพิ่มจำนวนเชื้อปฐมภูมิหรือทุติยภูมิ

(ข) ปริมาตรตัวอย่างที่นำไปใส่ไว้ในหลอดสารละลายไลซิส Neogen โปรดดูในขั้นตอนที่ 4.6 ในหัวข้อไลซิส

คำแนะนำเฉพาะสำหรับวิธีที่ผ่านการตรวจสอบแล้ว

AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2016.08

AOAC® *Performance Tested Method℠* #081501

จากโครงการ OMA℠ และ PTM℠ ของสถาบันวิจัย AOAC Research Institute พบว่าชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* เมทริกซ์ที่ได้รับการทดสอบในการศึกษาดังกล่าวแสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ระเบียบการเพิ่มจำนวนเชื้อโดยใช้เดมิเฟรเซอร์บรอท[ก] ที่ 37 ± 1 °C อิงตามใบรับรอง AOAC OMA℠ 2016.08 และ PTM℠ หมายเลข 081501

เมทริกซ์ตัวอย่าง		ขนาดตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ (มล.)	เวลาการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)
ฮอทดอกเนื้อ เควโซเฟรสโก ไอศกรีมวานิลลา คอทเทจชีสไขมัน 4% นมสด ช็อกโกแลต 3% ผักกาดโรเมน ผักโขมสดบรรจุถุง แซลมอนรมควันเย็น		25 ก.	225	24-30
เนื้อไก่ดิบ		25 ก.	475	28-32
ไก่งวงสำเร็จรูป		125 ก.	1125	24-30
แคนตาลูป[ข]		เมลอนทั้งลูก	ปริมาณมากพอที่จะทำให้เมลอนลอย	26-30
ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม	เหล็กสแตนเลส	ฟองน้ำ 1 ชิ้น	225	24-30
	คอนกรีตแบบปิดผนึก	ฟองน้ำ 1 ชิ้น	100	24-30
	พลาสติก[ค]	ไม้สวอปป้ายเก็บตัวอย่าง 1 อัน	10	24-30

ตัวอย่างทั้งหมดในการตรวจสอบความถูกต้องของ AOAC จะต้องถูกผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการเขย่า เว้นแต่จะระบุไว้เป็นอย่างอื่น

(ก) เดมิเฟรเซอร์และเฟรเซอร์บรอทควรเสริมด้วยซัพพลีเม้นท์สำหรับเฟรเซอร์บรอท (เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรต) ในระหว่างการเพิ่มจำนวนเชื้อขั้นต้นหรือขั้นที่สอง

(ข) ทำให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกันด้วยการผสมด้วยมือ

(ค) ทำให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกวน

NF VALIDATION โดย AFNOR Certification

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

หากต้องการข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับการสิ้นสุดการบังคับใช้ของผลจากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ โปรดอ่านเอกสารรับรองของ NF VALIDATION ที่พร้อมให้ใช้งานได้ตามเว็บไซต์ที่ระบุไว้ข้างต้น

วิธีการที่ได้รับการรับรองมาตรฐานของ NF VALIDATION ตามมาตรฐาน ISO 16140-2[6] เมื่อเปรียบเทียบกับ ISO 11290[3]
ขอบเขตการตรวจสอบ: อาหารมนุษย์และตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมทั้งหมด (ไม่รวมตัวอย่างการผลิตขั้นต้น)
การเตรียมตัวอย่าง: เตรียมตัวอย่างตาม EN ISO 11290-1[3] และ EN ISO 6887[8]
เวอร์ชันซอฟต์แวร์: ดูใบรับรอง

ตารางที่ 4: ระเบียบการเพิ่มจำนวนเชื้อตามการรับรองของ NF VALIDATION ตามวิธี 3M 01/15-09/16 และ 37 ± 1°C โดยใช้เดมิเฟรเซอร์บรอทและเฟรเซอร์บรอทตามที่จำเป็น

ระเบียบการทั่วไป	ขนาดตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ (มล.)	อุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (±1°C)	เวลาการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)	ปริมาตรการวิเคราะห์ตัวอย่าง (ไมโครลิตร)(ก)	จุดหยุดชะงักที่ยอมรับ
ตัวอย่างอาหารทั้งหมด (ยกเว้นเนื้อสัตว์ดิบ อาหารทะเลดิบ และผลิตภัณฑ์นมดิบ	25 ก.	225	37	24-30	20 ไมโครลิตร	• เดมิเฟรเซอร์บรอทสูงสุด 72 ชั่วโมง • ไลเซท ที่ -20°C • ไลเซท ที่ 4°C สูงสุดถึง 72 ชั่วโมง
ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม	25 ก., ไม้สวอปป้ายเก็บตัวอย่าง 1 อัน หรือการเช็ดถู 1 ครั้ง					

ระเบียบการเฉพาะ	การเพิ่มจำนวนเชื้อขั้นต้น(เดมิเฟรเซอร์บรอท)(ข)				การเพิ่มจำนวนเชื้อขั้นที่สอง(เดมิเฟรเซอร์บรอท)(ข)				จุดหยุดชะงักที่ยอมรับ
	ขนาดตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ (มล.)	อุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (±1°C)	เวลาการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)	ขนาดตัวอย่าง	อุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (±1°C)	เวลาการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)	ปริมาตรการวิเคราะห์ตัวอย่าง(ค)	
ยกเว้นเนื้อสัตว์ดิบ อาหารทะเลดิบ และผลิตภัณฑ์นมดิบ	25 ก.	225	37	20-24	ถ่ายเฟรเซอร์บรอท 0.1 มล. ไปยัง 10 มล	37	20-24	10 ไมโครลิตร	• เฟรเซอร์บรอทสูงสุด 72 ชั่วโมง • ไลเซท ที่ -20°C • ไลเซท ที่ 4°C สูงสุดถึง 72 ชั่วโมง

(ก) ปริมาตรตัวอย่างที่นำไปใส่ไว้ในหลอดสารละลายไลซิส Neogen โปรดดูในขั้นตอนที่ 4.6 ในหัวข้อไลซิส

(ข) เดมิเฟรเซอร์และเฟรเซอร์บรอทควรเสริมด้วยซัพพลีเม้นท์สำหรับเฟรเซอร์บรอท (เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรต) ในระหว่างการเพิ่มจำนวนเชื้อขั้นต้นหรือขั้นที่สอง

(ค) ปริมาตรตัวอย่างที่นำไปใส่ไว้ในหลอดสารละลายไลซิส Neogen โปรดดูในขั้นตอนที่ 4.6 ในหัวข้อไลซิส

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่มีปริมาณมากกว่า 25 กรัมไม่ได้นำมาทดสอบในการศึกษาของ NF VALIDATION

การเตรียมถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen®

1. ชุบผ้าในน้ำยาฟอกขาว 1-5% (ผสมกับน้ำตามอัตราส่วน) และเช็ดถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen®
2. ใช้น้ำล้างถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen นี้
3. ใช้กระดาษเช็ดมือแบบใช้แล้วทิ้งเช็ดถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ให้แห้ง
4. ตรวจสอบให้แน่ใจว่าถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen แห้งสนิทก่อนใช้งาน

การเตรียมชิลบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen®

ชิลบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® ไว้บนโต๊ะของห้องปฏิบัติการ ใช้ชิลบล็อคในอุณหภูมิห้องปฏิบัติการโดยรอบ (20-25°C)

การเตรียมฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen®

วางฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen® ในเครื่องทำความร้อนบล็อกคู่แบบแห้ง เปิดเครื่องทำความร้อนบล็อคแบบแห้งและตั้งอุณหภูมิเพื่อให้ฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen มีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึง 100 ± 1°C

หมายเหตุ: ให้ฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen มีอุณหภูมิตามที่กำหนดโดยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการทำงานของเครื่องทำความร้อน ใช้เทอร์โมมิเตอร์ที่ได้รับการสอบเทียบอย่างเหมาะสม (เช่น เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มบางส่วน เทอร์โมมิเตอร์แบบดิจิตอล **ที่ไม่ใช่**เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มทั้งหมด) วางไว้ในบริเวณที่กำหนด ตรวจสอบให้อุณหภูมิของฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen อยู่ที่ 100 ± 1°C

การเตรียมเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen®

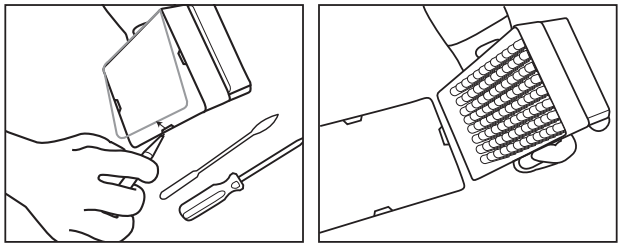
1. เริ่มต้นการใช้งานซอฟต์แวร์ระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® แล้วลงชื่อเข้าสู่ระบบ ติดต่อตัวแทนของ Neogen Food Safety ของคุณเพื่อให้แน่ใจว่าคุณมีซอฟต์แวร์เวอร์ชันที่อัปเดตล่าสุด

2. เปิดเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen
3. สร้างหรือแก้ไขชุดการทดสอบที่มีข้อมูลสำหรับแต่ละตัวอย่าง ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในคู่มือการใช้งานระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

หมายเหตุ: ต้องรอให้เครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen มีสถานะพร้อมใช้ ก่อนที่จะใส่ถาดใส่หลอดทดสอบเข้าเครื่องทดสอบเชื้อระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ขั้นตอนของการทำความร้อนนี้ใช้เวลาประมาณ 20 นาที และบ่งชี้ด้วยไฟสีส้มบนแถบบอกสถานะของเครื่อง เมื่อเครื่องมือพร้อมที่จะเริ่มต้นการทำงาน แถบบอกสถานะดังกล่าวจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว

การไลซีส

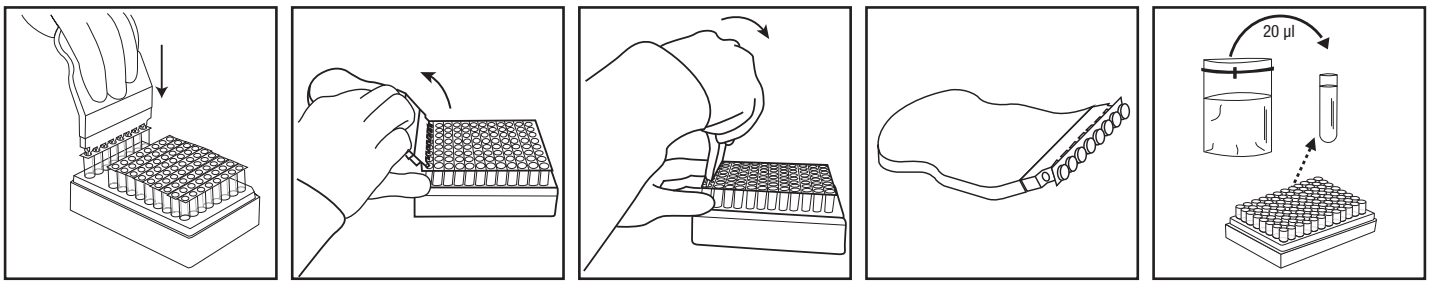
ใช้ไขควงไขหรือไม้พายถอดด้านล่างของที่วางสารละลายไลซีส Neogen ออก ก่อนวางลงบนฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen



1. รอให้หลอดสารละลายไลซีส (สารละลายไลซีส Neogen) อุ่นขึ้นโดยตั้งที่วางที่ระดับอุณหภูมิห้อง (20-25°C) นานข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) ทางเลือกอื่นๆ นอกเหนือจากการวางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ไว้ในอุณหภูมิห้องได้แก่ การวางไว้บนโต๊ะของห้องปฏิบัติการอย่างน้อย 2 ชั่วโมง การนำหลอดสารละลายไลซีส Neogen ไปบ่มในที่ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 1°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือวางหลอดสารละลายไลซีสบนเครื่องทำความร้อนแบบแห้งเป็นเวลา 30 วินาทีที่อุณหภูมิ 100°C
2. พลิกหลอดสารละลายไลซีสที่ปิดฝาอยู่ เพื่อผสมให้เข้ากัน ดำเนินการต่อในขั้นถัดไปภายใน 4 ชั่วโมง
3. นำอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อออกจากตู้บ่มเชื้อ
4. ตัวอย่างแต่ละชนิดและตัวอย่างชุดควบคุมผลลบ (NC) (อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อ) จะต้องใช้หลอดสารละลายไลซีส Neogen หนึ่งหลอดต่อหนึ่งตัวอย่าง
   4.1 แถวของหลอดสารละลายไลซีส Neogen สามารถตัดออกเพื่อให้มีจำนวนหลอดสารละลายไลซีส Neogen ตามที่ต้องการได้ เลือกจำนวนหลอดสารละลายไลซีส Neogen แต่ละหลอดหรือแถวที่มี 8 หลอด ตามความจำเป็น วางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ลงในที่วางที่ว่างอยู่
   4.2 เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนข้าม ให้เปิดฝาของหลอดสารละลายไลซีส Neogen ทั้งแถวในครั้งเดียว และใช้ปิเปตทิปอันใหม่สำหรับถ่ายตัวอย่างในแต่ละขั้นตอน
   4.3 ถ่ายตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนเชื้อแล้วไปยังหลอดสารละลายไลซีส Neogen ตามคำอธิบายด้านล่างนี้:

   ถ่ายตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนเชื้อแต่ละตัวอย่างลงไปในหลอดสารละลายไลซีส Neogen แต่ละหลอด **เป็นอันดับแรก** ถ่าย NC **เป็นอันดับสุดท้าย**

   4.4 ใช้อุปกรณ์เปิด/ปิดฝาหลอดสารละลายไลซีสโดยวิธี Neogen® ในการเปิดฝาหลอดสารละลายไลซีส Neogen ทีละแถว
   4.5 ทิ้งฝาหลอดสารละลายไลซีส Neogen – หากจะเก็บไลเซตเอาไว้เพื่อทดสอบซ้ำ ให้วางฝาในภาชนะที่สะอาดเพื่อนำกลับมาใช้ซ้ำ
      4.5.1 หากต้องการดูข้อมูลเกี่ยวกับการดำเนินการกับไลเซตที่เก็บไว้ โปรดดูภาคผนวก A
   4.6 ถ่ายตัวอย่างในปริมาณ 20 ไมโครลิตร ไปยังหลอดสารละลายไลซิส Neogen เว้นแต่ระบุไว้เป็นอย่างอื่นในตารางแสดงระเบียบการจากตางรางที่ 2, 3, หรือ 4 (เช่น ผลิตภัณฑ์นมดิบ หรือเมื่อใช้ตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่มีการทำให้เป็นกลางโดยใช้บัฟเฟอร์ 10 ไมโครลิตร)



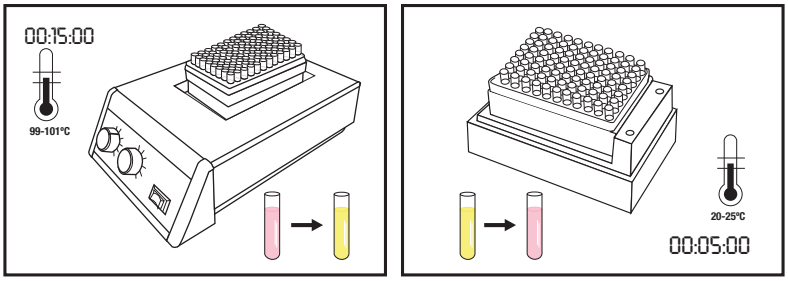
5. ทำซ้ำขั้นตอน 4.4 ถึง 4.6 จนกระทั่งเติมตัวอย่างแต่ละตัวอย่างลงในหลอดสารละลายไลซีส Neogen ในแถวดังกล่าวเสร็จสิ้น
6. เมื่อถ่ายตัวอย่างทั้งหมดเสร็จแล้ว ให้ถ่าย NC (อาหารเพิ่มจำนวนเชื้อที่ปลอดเชื้อ เช่น เดมิเฟรเซอร์บรอท) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดสารละลายไลซีส Neogen ห้ามใช้น้ำเป็น NC
7. ตรวจสอบว่าอุณหภูมิของ ของฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen อยู่ที่ 100 ± 1°C

8. วางที่วางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ที่ไม่มีฝาปิด ลงในฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen และเพิ่มความร้อนเป็นเวลา 15 ± 1 นาที ระหว่างการการให้ความร้อน สารละลายในหลอดทดสอบไลซีส Neogen จะเปลี่ยนจากสีชมพู (เย็น) เป็นเหลือง (ร้อน)

   8.1 ตัวอย่างซึ่งไม่ได้รับการอุ่นร้อนอย่างเหมาะสมในระหว่างขั้นตอนการไลซีสของชุดทดสอบ อาจถือว่าเป็นสารที่อาจมีอันตรายทางชีวภาพ และไม่ควรใส่เข้าไปในเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

9. นำที่วางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ที่ไม่ได้ปิดฝาออกจากฮีทบล็อคและปล่อยให้เย็นลงในชิลบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen อย่างน้อย 5 นาทีแต่ไม่เกิน 10 นาที การใช้งานชิลบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ให้วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยควรวางลงบนโต๊ะปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการโดยตรง เมื่อเย็นลงแล้ว สารละลายไลซีสก็จะเปลี่ยนกลับเป็นสีชมพู

10. นำเอาที่วางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ออกจาก ชิลบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen



การเพิ่มขยาย

1. หลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen หนึ่งหลอดสำหรับตัวอย่างแต่ละชนิดและ NC

   1.1 สามารถตัดแถวของหลอดสำหรับตัวอย่าง เพื่อให้มีจำนวนหลอดตามที่ต้องการได้ เลือกจำนวนหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen แต่ละหลอด หรือแถวที่มี 8 หลอด ตามต้องการ

   1.2 วางหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ลงในที่วางที่ยังว่างอยู่

   1.3 หลีกเลี่ยงการรบกวนเม็ดรีเอเจนต์ที่ก้นหลอด

2. เลือกหลอด Neogen รีเอเจนต์คอนโทรลหนึ่งหลอดแล้ววางลงในที่วาง

3. เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนข้าม ให้เปิดฝาของหลอดรีเอเจนต์ของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* ทั้งแถวในครั้งเดียว และใช้ปิเปตทิปอันใหม่สำหรับถ่ายตัวอย่างในแต่ละขั้นตอน

4. ถ่ายไลเซตไปยังหลอดรีเอเจนต์และหลอด Neogen รีเอเจนต์คอนโทรลของชุดทดสอบเชื้อ *ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ตามคำอธิบายด้านล่าง:

   ถ่ายไลเซตของแต่ละตัวอย่างไปยังหลอดรีเอเจ้นท์ของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* แต่ละชุด**ก่อน** แล้วจึงถ่าย NC เติมสารละลายลงในหลอด Neogen รีเอเจ้นท์คอนโทรลเป็น **ลำดับสุดท้าย**

5. ใช้เครื่องมือเปิด/ปิดฝารีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® ในการเปิดหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ทีละแถวรีเอเจนต์ ทิ้งฝาปิด

   5.1 **ถ่ายไลเซตของตัวอย่างปริมาณ 20 ไมโครลิตร จากด้านบน ½ ของของเหลว (หลีกเลี่ยงตะกอน) ในหลอดสารละลายไลซีส Neogen เข้าไปในหลอดรีเอเจนต์ของ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* ปล่อยสารละลายด้านข้างหลอด เพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนเม็ดรีเอเจนต์ที่ก้นหลอด ผสมโดยใช้ปิเปต ดูดขึ้นและลงเบาๆ 5 ครั้ง**

   5.2 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 5.1 จนกว่าจะเติมแต่ละไลเซตตัวอย่างลงไปในหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบ เชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส*ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ในแถวนั้น

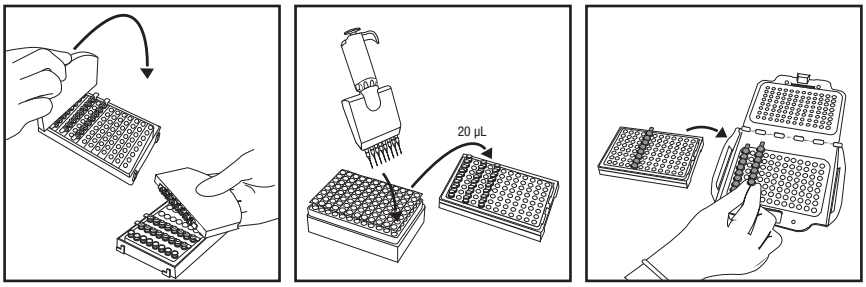
   5.3 ปิดหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ด้วยฝาอีกอันที่ให้มา และใช้ด้านมนของเครื่องมือเปิด/ปิดฝาหลอดทดสอบ โดยวิธี Neogen กดซ้ำไปซ้ำมาเพื่อให้แน่ใจว่าฝาปิดสนิท

   5.4 ทำซ้ำขั้นตอน 5.1 ถึง 5.3 ตามความจำเป็นสำหรับจำนวนตัวอย่างที่จะทดสอบ

   5.5 เมื่อถ่ายไลเซตตัวอย่างทั้งหมดแล้ว ให้ทำซ้ำขั้นตอนที่ 5.1 เพื่อถ่ายไลเซต NC ปริมาณ 20 ไมโครลิตร เข้าไปในหลอดรีเอเจนต์ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส*

   5.6 ถ่าย**ไลเซต NC ปริมาณ 20 ไมโครลิตร เข้าไปในหลอด Neogen รีเอเจนท์คอนโทรล** ปล่อยสารละลายด้านข้างหลอด เพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนเม็ดรีเอเจนต์ที่ก้นหลอด ผสมโดยใช้ปิเปต ดูดขึ้นและลงเบาๆ 5 ครั้ง

6. บรรจุหลอดที่ปิดฝาแล้วลงในถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ที่สะอาดและขจัดการปนเปื้อนแล้ว ปิดและล็อคฝาถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen



7. พิจารณาทบทวนและยืนยันการดำเนินการที่กำหนดค่าไว้ในซอฟต์แวร์ระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen
8. คลิกปุ่ม Start ในซอฟต์แวร์ แล้วเลือกเครื่องมือที่จะใช้ทดสอบ ฝาปิดของอุปกรณ์ที่เลือกจะเปิดโดยอัตโนมัติ
9. ใส่ถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ในเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen แล้วปิดฝาเพื่อเริ่มต้นการทดสอบ ระบบจะให้ผลการทดสอบภายในเวลา 75 นาที แม้ว่าผลที่เป็นบวกอาจจะตรวจวัดได้เร็วกว่านั้นก็ตาม
10. หลังจากการทดสอบเสร็จสมบูรณ์แล้ว ให้นำถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ออกจากเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen แล้วกำจัดหลอดเหล่านั้นทิ้งโดยแช่ในน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือน หรือเทียบเท่า ที่มีความเข้มข้น 1-5% (ในน้ำที่มีปริมาตรเท่ากัน) นาน 1 ชั่วโมง และปฏิบัติให้ห่างจากพื้นที่จัดเตรียมชุดทดสอบ

ข้อสังเกต: เพื่อลดความเสี่ยงในการได้ผลบวกปลอมอันเนื่องมาจากการปนเปื้อนข้าม ห้ามเปิดหลอดรีเอเจนต์ซึ่งบรรจุ DNA ที่เพิ่มขยายแล้ว ซึ่งรวมถึงหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen, หลอด Neogen รีเอเจ้นต์คอนโทรล และหลอดเมทริกซ์คอนโทรล Neogen กำจัดทิ้งหลอดรีเอเจนต์ที่ปิดฝาแล้วทุกครั้งโดยล้างในสารซักฟอกในครัวเรือนความเข้มข้น 1-5% (ต่อปริมาตรน้ำ) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และห่างจากบริเวณเตรียมการทดสอบ

ผลการทดสอบและการแปลความหมาย

อัลกอริธึมจะแปลความหมายเส้นโค้งของแสงที่ส่งออกมาอันเป็นผลมาจากการตรวจพบการเพิ่มขยายของกรดนิวคลีอิก ซอฟต์แวร์จะวิเคราะห์ผลการทดสอบนี้โดยอัตโนมัติและจะมีการเข้ารหัสสีตามผลที่ได้ดังกล่าว ผลการทดสอบที่ให้ค่าเป็นบวกหรือลบจะพิจารณาตัดสินโดยการวิเคราะห์พารามิเตอร์ของเส้นโค้งที่มีลักษณะเฉพาะตัวจำนวนหนึ่ง ผลการทดสอบเบื้องต้นที่เป็นบวกจะได้รับการรายงานในทันที ขณะที่ผลการทดสอบที่เป็นลบและผลที่น่าสงสัยจะแสดงผลภายหลังการทดสอบเสร็จสมบูรณ์แล้ว

ตัวอย่างที่ให้ผลบวกเบื้องต้นควรได้รับการยืนยันตามขั้นตอนการปฏิบัติการตามมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ หรือโดยปฏิบัติตามการยืนยันวิธีการอ้างอิงที่เหมาะสม[1,2,3] ที่เริ่มต้นด้วยการถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต้นไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวขั้นที่สอง (หากมี) ตามด้วยการเลี้ยงเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อและการยืนยันการแยกเชื้อโดยใช้วิธีการทางชีวเคมีและและเซรุ่มวิทยาที่เหมาะสม

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบค่าแสงที่อ่านได้ก็ไม่ได้มีค่าเป็นศูนย์ เนื่องจากระบบและรีเอเจนต์ในการเพิ่มขยายสำหรับชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen จะมี “ค่าพื้นหลัง” ในหน่วยแสงสัมพัทธ์ (RLU)

ในบางครั้งอาจพบว่าแสงที่ได้จากปฏิกิริยานั้นมีลักษณะผิดปกติ อัลกอริธึมดังกล่าวจะถูกตีความออกมาว่าเป็น “ผลที่น่าสงสัย” บริษัท Neogen แนะนำให้ผู้ใช้ทำการทดสอบซ้ำสำหรับตัวอย่างที่ให้ผลที่น่าสงสัย หากผลการทดสอบยังคงเป็นที่น่าสงสัย ให้ทำการทดสอบเพื่อยืนยัน โดยใช้วิธีการตามที่ต้องการหรือตามที่ระบุโดยหน่วยงานกฎระเบียบในประเทศ

ตารางที่ 5: สัญลักษณ์ผลลัพธ์สำหรับตัวอย่างและการตีความตามที่กำหนดโดยซอฟต์แวร์ระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

ประเภทของหลุมทดสอบ	สัญลักษณ์ผลการตรวจที่ได้จากหลุมทดสอบ	ผลการตรวจ	การแปลผลการตรวจวิเคราะห์
ตัวอย่าง		บวก	ตัวอย่างนี้ในเบื้องต้นให้ผลเป็นบวกสำหรับเชื้อก่อโรคเป้าหมาย
ตัวอย่าง		ลบ	ตัวอย่างนี้ให้ผลเป็นลบสำหรับเชื้อก่อโรคเป้าหมาย
ตัวอย่าง		ถูกยับยั้ง	เมทริกซ์ตัวอย่างนี้มีลักษณะยับยั้งต่อการตรวจวิเคราะห์ อาจจำเป็นต้องทำการทดสอบซ้ำ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดดูในส่วนหัวข้อการแก้ไขปัญหาและคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์ของชุดทดสอบ
ตัวอย่าง		ตรวจสอบ	มีความคลุมเครือไม่แน่ชัดเกี่ยวกับการมีอยู่หรือไม่มีอยู่ของเชื้อก่อโรคเป้าหมาย อาจจำเป็นต้องทำการทดสอบซ้ำ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดดูในส่วนหัวข้อการแก้ไขปัญหาและคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์ของชุดทดสอบ
ตัวอย่าง		ข้อผิดพลาด	ไม่ตรวจพบการเรืองแสงทางชีวภาพ อาจจำเป็นต้องทำการทดสอบซ้ำ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดดูในส่วนหัวข้อการแก้ไขปัญหาและคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์ของชุดทดสอบ

การตรวจสอบยืนยันผลการทดสอบตามวิธีที่ได้รับการรับรองของ NF VALIDATION

ตัวเลือกที่ 1: การใช้มาตรฐาน ISO 11290[3] ที่เริ่มต้นตั้งแต่การใช้อาหารเพิ่มจำนวนเชื้อเดมิเฟรเซอร์

ตัวเลือกที่ 2: โดยการแยกบนวุ้น PALCAM หรือบนวุ้น Chromogenic Agar (O&A) ที่สร้างขึ้นเป็นส่วนหนึ่งของวิธีการรับรอง NF VALIDATION เพื่อการตรวจหา*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* การปรากฏของลักษณะโคโลนีสามารถยืนยันการมีอยู่ของ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส*ได้

ตัวเลือกที่ 3: การใช้โพรบวัดกรดนิวคลีอิกดังที่อธิบายไว้ในมาตรฐาน EN ISO 7218[5] ซึ่งดำเนินการบนโคโลนีที่ได้แยกเชื้อจากวุ้นที่เลือก (ดูตัวเลือกที่ 1 หรือ 2)

ตัวเลือกที่ 4: สำหรับการใช้วิธีการอื่นใดที่ได้รับการรับรองจาก NF VALIDATION หลักการของวิธีการทดสอบจะต้องแตกต่างจากหลักการของชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen จะต้องใช้ระเบียบการแบบครบถ้วนสมบูรณ์ที่อธิบายไว้สำหรับวิธีการที่สองที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้นี้ ขั้นตอนทั้งหมดก่อนการเริ่มต้นการยืนยันจะต้องเหมือนกันกับทั้งสองวิธีการ

กรณีผลการทดสอบไม่สอดคล้อง (ผลการทดสอบเบื้องต้นที่เป็นบวกในการทดสอบด้วยวิธีการอื่นยังไม่ได้รับการยืนยันจากหนึ่งในเครื่องมือที่อธิบายไว้ข้างต้น) ห้องปฏิบัติการจะต้องปฏิบัติตามขั้นตอนที่จำเป็นเพื่อตรวจสอบว่าผลการทดสอบที่ได้รับถูกต้อง

กรณีผลการทดสอบไม่สอดคล้อง (ผลการทดสอบเบื้องต้นที่เป็นบวกด้วยการใช้ชุดทดสอบเชื้อ*ลิสทิเรีย โมโนไซโตจิเนส* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ที่ยังไม่ได้รับการยืนยันจากหนึ่งในเครื่องมือที่อธิบายไว้ข้างต้น ห้องปฏิบัติการจะต้องปฏิบัติตามขั้นตอนที่จำเป็นเพื่อตรวจสอบว่าผลการทดสอบที่ได้รับถูกต้อง

หากท่านมีข้อสงสัยเกี่ยวกับการใช้งานหรือวิธีการที่เฉพาะเจาะจงใด ๆ โปรดเยี่ยมชมเว็บไซต์ของเราที่ www.neogen.com หรือติดต่อตัวแทนจำหน่ายหรือผู้จัดจำหน่ายของบริษัท Neogen ในท้องถิ่นของท่าน

ภาคผนวก A การหยุดการทดสอบชั่วคราว: การเก็บรักษาและการนำไลเซตมาทดสอบซ้ำ

1. หากต้องการเก็บไลเซตที่ผ่านความร้อนมาแล้ว ให้ปิดฝาหลอดสารละลายไลซิสด้วยฝาที่สะอาด (โปรดดู “ไลซิส”, 4.5)
2. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ถึง 8°C ไม่เกิน 72 ชั่วโมง
3. เตรียมตัวอย่างที่เก็บไว้ โดยพลิกหลอดสารละลายไลซิสไปมา 2-3 ครั้งเพื่อผสมตัวอย่างให้เข้ากัน
4. เปิดฝาหลอด
5. ใส่หลอดไลเซตที่ผสมตัวอย่างเข้ากันแล้วลงในฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen และให้ความร้อนที่ 100 ± 1°C เป็นเวลา 5 ± 1 นาที
6. นำที่วางหลอดสารละลายไลซิส Neogen ออกจากฮีทบล็อคและปล่อยให้เย็นในชิลบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen อย่างน้อย 5 นาทีแต่ไม่เกิน 10 นาที
7. ดำเนินการทดสอบขั้นต่อไปในส่วนการเพิ่มขยายจำนวนตามรายละเอียดข้างต้น

เอกสารอ้างอิง:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

คำอธิบายสัญลักษณ์ป้ายผลิตภัณฑ์

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

FS00867C

NEOGEN

발행일: 2024-07

제품 설명서

Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스*

제품 설명 및 용도

Neogen® Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스*는 Neogen® Molecular Detection System을 사용하여 증균된 식품 및 환경 시료에서 *리스테리아 모노사이토제네스*를 신속하고 명확하게 검출합니다. Neogen 분자 검출 키트는 높은 특이성과 민감도로 핵산 염기 서열을 빠르게 증폭시키기 위해, 생체발광 검출이 결합된 LAMP 등온 증폭 방식을 사용합니다. 추정 양성 결과는 실시간으로 보고되는 반면, 음성 결과는 시험이 완료된 후 표시됩니다. 추정 양성 결과는 원하는 방법을 사용하거나 현지 규정에 지정된 대로 확정되어야 합니다[1, 2, 3].

Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스*는 실험 기법에 대해 적절한 교육을 받은 전문가들이 실험실 환경에서 사용하도록 고안되었습니다. Neogen은 식품이나 음료가 아닌 다른 산업에서의 이 제품 사용을 문서화하지 않았습니다. 즉, Neogen은 용수, 약품, 화장품, 임상 또는 수의학 시료 시험에 대해서는 이 제품을 문서화하지 않았습니다. Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스*는 가능한 모든 시험 프로토콜 또는 가능한 모든 박테리아 종에 평가되지는 않았습니다.

모든 시험 방법처럼 증균 배지의 원료, 제조법 및 특성은 결과에 영향을 미칠 수 있습니다. 시료 추출 방법, 검사 계획서, 시료 준비, 조작 및 실험 기법 또한 결과에 영향을 미칠 수 있습니다. Neogen은 충분한 수의 특정 식품과 미생물 유발 시험을 이용하여 사용자의 환경에서 사용자의 기준을 충족하는지 확인하기 위해 증균 배지를 포함한 해당 방법의 평가를 권장합니다.

Neogen은 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스*를 Ferric Ammonium Citrate을 함유하는 Demi Fraser Broth와 Ferric Ammonium Citrate을 함유하는 Fraser Broth를 이용하여 평가하였습니다. 해당 배지의 일반적인 구성은 다음과 같습니다.

Demi Fraser Broth Base 성분표	(g/L)	Fraser Broth Base의 성분표	(g/L)
Sodium Chloride	20g	Sodium Chloride	20g
Sodium Phosphate, dibasic, anhydrous*	9.6g	Sodium Phosphate, dibasic, anhydrous*	9.6g
Beef Extract	5.0g	Beef Extract	5.0g
Pancreatic Digest of Casein	5.0g	Pancreatic Digest of Casein	5.0g
Peptic Digest of Animal Tissue	5.0g	Peptic Digest of Animal Tissue	5.0g
Yeast Extract	5.0g	Yeast Extract	5.0g
Lithium Chloride	3.0g	Lithium Chloride	3.0g
Potassium Phosphate, monobasic	1.35g	Potassium Phosphate, monobasic	1.35g
Esculin	1.0g	Esculin	1.0g
Acriflavin HCl	0.0125g	Acriflavin HCl	0.025g
Nalidixic Acid	0.01g	Nalidixic Acid	0.02g

* 대체: Sodium Phosphate, dibasic, dihydrate 12.0g

Fraser Broth Supplement

(10mL 바이얼당 성분. 기본 배지 1리터에 바이얼 1개를 추가합니다.)

Ferric Ammonium Citrate 0.5g/10mL

최종 pH 25°C에서 7.2 ± 0.2

Neogen® Molecular Detection 장비는 시료에 있는 유기체를 파괴하기 위한 Lysis 단계 중에 열처리를 거친 시료와 함께 사용하기 위한 것입니다. Lysis 단계 동안 적절하게 열처리가 되지 않은 시료는 잠재적인 생물학적 위험으로 간주되므로 Neogen Molecular Detection 장비에 절대로 삽입하지 마십시오.

Neogen Food Safety는 설계 및 제조에 관한 ISO(International Organization for Standardization) 9001 인증을 받았습니다.

Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스* 시험 키트에는 표 1에 설명된 바와 같이 96회 시험분이 포함되어 있습니다.

표 1. Neogen Molecular Detection Assay 키트 구성요소

항목	ID	수량	목차	설명
Neogen® Lysis Solution(LS)	투명한 튜브의 분홍색 용액	96개(8개들이 튜브 12개 스트립)	튜브당 580µL의 LS	랙에 꽂혀 있고 바로 사용 가능함
Neogen® Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이트제네스* Reagent 튜브	노란색 튜브	96개(8개들이 튜브 12개 스트립)	동결 건조된 특정 증폭 및 검출 혼합물	바로 사용 가능함
예비 캡	노란색 캡	96개(8개들이 캡 12개 스트립)		바로 사용 가능함
Neogen® Reagent 컨트롤 (RC)	투명 플립톱 튜브	16개(8개들이 개별 튜브 2개 파우치)	동결 건조된 컨트롤 DNA, 증폭 및 검출 혼합물	바로 사용 가능함

키트에 제공되지 않은 음성 대조군은 멸균 증균 배지(예: Demi Fraser Broth)입니다. 물을 음성 대조군으로 사용하지 마십시오.

안전

사용자는 Neogen Molecular Detection System 및 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스*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.

주의: 피하지 못할 경우 재산상의 피해를 초래할 수 있는 잠재적으로 위험한 상황을 의미합니다.

⚠ 경고

인간 또는 동물의 상태를 진단하는 데 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스*를 사용해서는 안 됩니다.

Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스*법은, 노출되는 경우 임산부 및 면역이 저하된 여성에게서 사산 및 사망을 초래할 수 있는 수준으로 *리스테리아 모노사이토제네스*를 생성할 수 있습니다.

사용자는 반드시 적절한 최신 시험 기법의 적용에 있어 담당 직원의 교육을 실시해야 합니다. 예: 우수 실험실 기준, ISO/IEC 17025[4] 또는 ISO 7218[5].

오염된 제품의 출고를 초래하는 위음성 결과와 관련된 위험을 줄이려면:

- 프로토콜을 준수하고 제품 설명서에 명시된 대로 정확하게 시험을 수행하십시오.
- Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스*를 보관할 때는 포장 및 제품 설명서에 명시된 바를 따릅니다.
- Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스*는 유효 기간까지만 사용해야 합니다.
- Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스*는 내부 또는 제3자가 검증한 식품 및 환경 시료와 함께 사용하십시오.
- Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스*는 내부적으로 또는 제3자가 검증한 표면, 살균제, 프로토콜 및 박테리아 종만 사용하십시오.
- 아릴설포네이트 화합물이 포함된 Neutralizing Buffer를 함유하는 환경 시료의 경우 시험하기 전에 1:2로 희석하십시오(시료 1을 동량의 멸균 증균액 1에 넣음). NB 증균액 10µL를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮기는 방법도 있습니다. 아릴설포네이트 화합물과 함께 Neutralizing Buffer를 함유하는 Neogen® 시료 채취 제품: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G 및 HS2410NB2G.

화학물질 및 생물학적 유해 물질 노출 관련 위험을 줄이려면:

- 여성 실험연구원에게 *리스테리아 모노사이토제네스* 노출로 감염된 산모의 경우 태아 발달 위험이 발생할 수 있음을 알리는 것을 권장합니다.
- 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 식중독균이 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 시료는 현행 업계 표준에 따라 폐기하십시오.
- Lysis 단계 동안 적절하게 열처리가 되지 않은 시료는 잠재적인 생물학적 위험으로 간주되므로 Neogen Molecular Detection 장비에 절대로 삽입하지 마십시오.

시험을 준비하는 동안 교차 오염과 관련된 위험을 줄이려면:

- (사용자를 보호하고 뉴클레아제의 침투를 막기 위해) 항상 장갑을 착용해야 합니다.

환경 오염과 관련된 위험을 줄이려면:

- 현행 산업 표준에 따라 오염 폐기물을 폐기하십시오.

뜨거운 액체에 노출된 경우 가능한 위험을 줄이려면:

- 권장 가열 온도를 초과하지 마십시오.
- 권장 가열 시간을 초과하지 마십시오.
- 적절하게 교정된 온도계를 사용하여 Neogen® Molecular Detection 히팅 블록 인서트 온도를 확인하십시오(예: 부분 침지 온도계 또는 디지털 열전대 온도계. 전체 침지 온도계는 사용해서는 안 됩니다). 온도계는 반드시 Neogen Molecular Detection 히팅 블록 인서트의 지정된 장소에 놓아야 합니다.

주의

시험을 준비하는 동안 교차 오염과 관련된 위험을 줄이려면:

- Reagent 펠릿 수화 전에 장갑을 교체하십시오.
- 미세입자를 차단하는 (필터 사용) 멸균된 분자 생물학 등급의 피펫 팁을 이용하는 것이 좋습니다.
- 각 시료 이동 시 새 피펫 팁을 사용하십시오.
- 우수 실험실 관리기준을 적용하여 증균된 시료를 Lysis 튜브로 옮기십시오. 피펫 오염을 방지하려면 중간 분주 단계를 추가해야 할 수도 있습니다. 예를 들어 사용자는 증균된 각 시료를 멸균 튜브로 옮길 수 있습니다.
- 해당되는 경우 살균 램프가 있는 분자생물학 워크스테이션을 사용하십시오. 주기적으로 1~5%(v:v 물)의 가정용 표백 용액 또는 DNA 제거 용액으로 실험실 벤치와 장비(피펫, 캡/디캡 도구 등)의 오염을 제거하십시오.

위양성 결과가 발생할 위험을 줄이려면:

- 증폭 후에는 절대 Reagent 튜브를 열지 마십시오.
- 오염된 튜브는 항상 1~5%(v:v 물)의 가정용 표백제 용액 또는 유사 용액에 1시간 동안 담가 두었다가 키트 준비 구역과 멀리 떨어진 위치에 폐기합니다.
- 증폭 후 Reagent 튜브는 절대 오토클레이브하지 마십시오.

폐기에 대한 추가 정보 및 현지 규정은 안전보건자료(SDS)를 참조하십시오.

구체적인 용도나 절차에 대하여 궁금한 점이 있으면 당사 웹사이트(www.neogen.com)를 방문하거나 현지 Neogen 또는 판매업체로 문의하십시오.

사용자의 책임

사용자는 제품 설명서와 정보를 숙지할 책임이 있습니다. 보다 자세한 정보는 당사의 웹사이트 **www.neogen.com**를 참고하거나 현지 Neogen이나 영업 대리점으로 문의하십시오.

시험 방법을 선택할 때, 시료 추출 방법, 시험 프로토콜, 시료 준비, 취급, 실험 기법과 같은 외적 요인이 결과에 영향을 미칠 수 있음을 인식하는 것이 중요합니다.

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 사용자는 모든 시험 방법 및 결과가 고객 및 공급자의 요구사항을 충족하는지 판단할 책임이 있습니다.

다른 시험 방법과 마찬가지로 Neogen Food Safety 제품을 사용하여 얻은 결과가 시험된 매트릭스나 프로세스의 품질을 보장하는 것은 아닙니다.

Neogen에서는 다양한 식품 매트릭스 방법 평가에 도움을 드리기 위해 Neogen® Molecular Detection Matrix Control 키트를 개발했습니다. 필요한 경우 매트릭스 컨트롤(MC)을 이용하여 매트릭스가 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스*의 결과에 영향을 미칠 수 있는지 확인할 수 있습니다. 매트릭스를 대표하는 여러 시료를 시험하십시오(예: Neogen 시험법을 적용하거나 신규 혹은 미지의 매트릭스 또는 원료나 공정의 변화가 있었던 매트릭스들을 검사하는 유효성 검증기간 동안 다양한 곳에서 채취한 시료).

매트릭스는 조성과 가공과 같은 내재적 특징을 포함한 제품의 종류로 정의할 수 있습니다. 매트릭스 간의 차이점은 매트릭스의 처리 방법 또는 모양(예: 비살균 vs. 저온 살균, 생제품 vs. 건조제품 등)이 미치는 영향처럼 간단합니다.

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. 추가 질문이 있으면 Neogen 담당자 또는 Neogen 공인 대리점에 문의하십시오.

Neogen 책임의 제한

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 Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스*를 2~8°C에서 보관하십시오. 냉동하지 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 Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스*는 사용하지 마십시오. 유효기한과 품목 번호는 상자의 외부 라벨에 기입되어 있습니다. 사용하고 난 증균 배지와 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스* 튜브에는 잠재적으로 병원성 물질이 들어 있을 수 있습니다. 시험이 완료되면 현재 업계 표준에 따라 오염 폐기물을 폐기하십시오. 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 1~5%(v:v 물)의 가정용 표백 용액 또는 DNA 제거 용액으로 실험실 벤치와 장비(피펫, 캡/디캡 도구 등)의 오염을 제거하십시오.

사용자는 "설치 적격성 평가(IQ)/작동 적격성 평가(OQ) 프로토콜 및 Neogen Molecular Detection System 지침" 문서[6]에 명시된 대로 Neogen Molecular Detection System 작업자 적격성 평가(OQ) 교육을 완료해야 합니다.

특정 요건에 관해서는 "유효성 검증 방법 관련 상세 설명" 섹션을 참조하십시오:

표 3. AOAC® *Official Method of Analysis℠* **2016.08** 및 AOAC® *Performance Tested Method℠* 증명서 **#081501**에 따른 증균 프로토콜.

표 4. NF Validation 인증서 **3M 01/15-09/16**에 따른 증균 프로토콜.

시료 증균

표 2, 3, 4는 식품 및 환경 시료용 일반 증균 프로토콜에 대한 안내입니다. 다른 시료 추출 프로토콜 또는 희석 비율을 검증하여 이 시험 방법이 사용자의 기준을 충족하도록 하는 것은 사용자의 책임입니다.

식품

1. Demi Fraser Broth 증균 배지(ferric ammonium citrate 함유)를 주변 실험실 온도로 평형시킵니다.
2. 표 2, 3 또는 4에 따라 증균 배지와 시료를 무균 방식으로 혼합합니다. 모든 육류 및 입자가 매우 미세한 시료에 대해서는 필터 백을 사용하는 것이 좋습니다.
3. 2 ± 0.2분간 혼합, 스토마킹 또는 손으로 혼합하여 완전히 균질화합니다. 표 2, 3, 4에 따라 37 ± 1°C에서 배양합니다.
4. 생유제품(표 2, 3 또는 4 참조)의 경우, 1차 증균액 0.1mL를 Fraser Broth 10mL로 옮깁니다. 37 ± 1°C에서 20~24시간 동안 배양합니다.

환경 시료

시료 수집 장치는 살균제 효과를 비활성화하는 중화 용액으로 수화한 스폰지일 수 있습니다. Neogen은 살균제가 없는 셀룰로오스 스폰지의 사용을 권장합니다. 중화 용액은 Dey-Engley(D/E) Neutralizing Broth 또는 Letheen Broth일 수 있습니다. 시료 추출 후 그 구역을 살균하는 것이 좋습니다.

경고: 스폰지용 수화 용액으로 아릴설포네이트 화합물을 함유하는 Neutralizing Buffer(NB)를 사용하기로 선택하는 경우, 오염된 제품 출고를 초래하는 위음성 결과와 관련된 위험을 줄이려면 시험 전에 증균된 환경 시료를 1:2로 희석해야 합니다(시료 1을 동량의 멸균 증균 배지 1에 넣음). Neutralizing Buffer 증균액 10µL를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮기는 방법도 있습니다.

표면의 식중독균 유무를 확인하기 위한 시료 추출 영역의 권장 크기는 적어도 100cm²(10cm x 10cm 또는 4” x 4”)입니다. 스폰지로 시료를 추출하는 경우, 두 방향(왼쪽에서 오른쪽, 이어서 위쪽에서 아래쪽)으로 전체 영역을 덮거나, 현재의 시료 추출 프로토콜, 혹은 FDA BAM[1], USDA FSIS MLG[2] 또는 ISO 18593[7] 가이드라인에 따라 환경 시료를 채취합니다.

1. Demi Fraser Broth 증균 배지(ferric ammonium citrate 함유)를 주변 실험실 온도로 평형시킵니다.
2. 표 2, 3 또는 4에 따라 증균 배지와 시료를 무균 방식으로 혼합합니다.
3. 2 ± 0.2분간 혼합, 스토마킹 또는 손으로 혼합하여 완전히 균질화합니다. 표 2, 3 또는 4에 따라 24~30시간 동안 37 ± 1°C에서 배양합니다.

표 2: 필요에 따라 Demi-Fraser Broth 및 Fraser-Broth를 사용한 37 ± 1°C에서의 일반 증균 프로토콜.

시료 매트릭스	시료량	증균 배양액량 (mL)	증균 시간 (hr)
열처리, 조리, 절임 육류, 가금류, 해산물 및 생선 열처리/살균한 유제품 농산물 및 채소 다성분 식품	25g	225	24~30
환경 시료[a]	스폰지 1개	100 또는 225	24~30
	면봉 1개	10	24~30
생고기, 가금류, 해산물, 생선	25g	475	28~32

시료 매트릭스	1차 증균(Demi-Fraser Broth)[a]			2차 증균 (Fraser Broth)[a]			시료 분석량[b]
	시료량	증균 배양액량 (mL)	증균 시간 (hr)	시료량	증균 온도(°C)	증균 시간 (hr)	
생유제품	25g	225	20~24	0.1mL를 Fraser Broth 10mL로 옮기기	37 ± 1	20~24	10µL

(a) Demi-Fraser 및 Fraser Broth는 1차 또는 2차 증균 중에는 항상 Fraser Broth 보충제(ferric ammonium citrate)를 보충해야 합니다.

(b) Neogen Lysis Solution 튜브로 옮긴 시료의 양. Lysis 섹션의 4.6단계 참조.

검증 방법 관련 상세 설명

AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2016.08

AOAC® *Performance Tested Method℠* #081501

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 081501

AOAC Research Institute OMA℠ 및 PTM℠ 프로그램에서 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스*는 *리스테리아 모노사이토제네스*의 검출에 효과적인 방법이라는 사실이 밝혀졌습니다. 이 연구에서 실험된 매트릭스는 표 3에 나와 있습니다.

표 3. AOAC OMA℠ 2016.08 및 PTM℠ 인증서 #081501에 따라 Demi-Fraser Broth[a]를 37 ± 1°C에서 사용한 증균 프로토콜.

시료 매트릭스		시료량	증균 배양액량(mL)	증균 시간(hr)
쇠고기 핫도그, 퀘소 프레스코, 바닐라 아이스크림, 유지방 4% 코티지 치즈, 3% 초콜릿 우유, 로메인 상추, 봉지에 담은 생시금치, 냉장 훈제 연어		25g	225	24~30
생닭고기		25g	475	28~32
델리 칠면조		125g	1125	24~30
캔틸로프[b]		멜론 (통째로)	멜론이 뜰 정도의 양	26~30
표면 오염	스테인리스 스틸	스폰지 1개	225	24~30
	포장된 콘크리트	스폰지 1개	100	24~30
	플라스틱[c]	면봉 1개	10	24~30

AOAC 유효성 검증에 쓰인 시료는 모두, 별도로 정하지 않는 한 스토마킹으로 균질화하였습니다.

(a) Demi-Fraser 및 Fraser Broth는 1차 또는 2차 증균 중에는 항상 Fraser Broth 보충제(ferric ammonium citrate)를 보충해야 합니다.

(b) 손으로 혼합하여 시료를 균질화합니다.

(c) Vortex하여 시료를 균질화합니다.

AFNOR Certification에 의한 NF VALIDATION

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

유효 기간과 관련한 상세 정보는 상기에 명시한 웹 사이트에 있는 NF VALIDATION 인증서를 참고하십시오.

ISO 11290[3] 대비 ISO 16140-2[6]에 준하는 NF VALIDATION 인증 방법
검증의 범위: 모든 식품 및 환경 시료(1차 생산 시료 제외)
시료 준비: 시료는 EN ISO 11290-1[3] 및 EN ISO 6887[8]에 따라 준비해야 합니다.
소프트웨어 버전: 인증서 참고

표 4: NF VALIDATION 인증 방법 3M 01/15-09/16에 준하여 필요에 따라 37 ± 1°C에서 Demi-Fraser Broth Fraser Broth를 사용한 증균 프로토콜.

일반 프로토콜	시료량	증균 배양액량 (mL)	증균 온도 (±1°C)	증균 시간 (hr)	시료분석량[a]	허용 중단 지점
모든 식품 시료(생고기, 생해산물, 생유제품 제외)	25g	225	37	24~30	20µL	• Demi-Fraser Broth를 최대 72시간 • Lysate를 -20°C에서 • Lysate를 4°C에서최대 72시간
환경 시료	25g, 면봉 1개, 또는 와이프 1개					

특별 프로토콜	1차 증균(Demi-Fraser Broth)[b]				2차 증균(Fraser Broth)[b]				허용 중단 지점
	시료량	증균 배양액량 (mL)	증균 온도 (±1°C)	증균 시간 (hr)	시료량	증균 온도 (±1°C)	증균 시간 (hr)	시료분석량[c]	
모든 생고기, 생해산물, 생유제품 제외	25g	225	37	20~24	0.1mL를 Fraser Broth 10mL로 옮기기	37	20~24	10µL	• Fraser Broth를 최대 72시간 • Lysate를 -20°C에서 • Lysate를 4°C에서최대 72시간

(a) Neogen Lysis Solution 튜브로 옮긴 시료의 양. Lysis 섹션의 4.6단계 참조.

(b) Demi-Fraser 및 Fraser Broth는 1차 또는 2차 증균 중에는 항상 Fraser Broth Supplement(ferric ammonium citrate)를 보충해야 합니다.

(c) Neogen Lysis Solution 튜브로 옮긴 시료의 양. Lysis 섹션의 4.6단계 참조.

참고: 25g을 초과하는 시료는 NF Validation 연구에서 시험되지 않았습니다.

Neogen® Molecular Detection 스피드 로더 트레이 준비

1. 1~5%(v:v 물) 가정용 표백 용액을 천에 적셔 Neogen® Molecular Detection 스피드 로더 트레이를 닦습니다.
2. 물로 Neogen Molecular Detection 스피드 로더 트레이를 헹굽니다.
3. 1회용 타월을 사용하여 Neogen Molecular Detection 스피드 로더 트레이를 닦아서 말립니다.
4. 사용하기 전에 Neogen Molecular Detection 스피드 로더 트레이가 마른 상태인지 확인하십시오.

Neogen® Molecular Detection 냉각 블록 인서트 준비

Neogen® Molecular Detection 냉각 블록을 실험실 벤치에 직접 놓습니다. 냉각 블록을 주변 실험실 온도(20~25°C)에서 사용합니다.

Neogen® Molecular Detection 히팅 블록 인서트 준비

건조 이중 블록 히터 장치에 Neogen® Molecular Detection 히팅 블록 인서트를 놓습니다. 건조 블록 히터 장치를 켜고 Neogen Molecular Detection 히팅 블록 인서트가 100 ± 1°C를 유지할 수 있도록 합니다.

참고: 히터 장치에 따라, Neogen Molecular Detection 히팅 블록 인서트가 온도에 도달하는 데 약 30분이 걸릴 수 있습니다. 적절한 교정된 온도계(예: 부분 침지 온도계 또는 디지털 열전대 온도계. 전체 침지 온도계는 사용해서는 **안 됩니다**)를 지정된 위치에 놓아 Neogen Molecular Detection 히팅 블록 인서트의 온도가 100 ± 1°C인지 확인합니다.

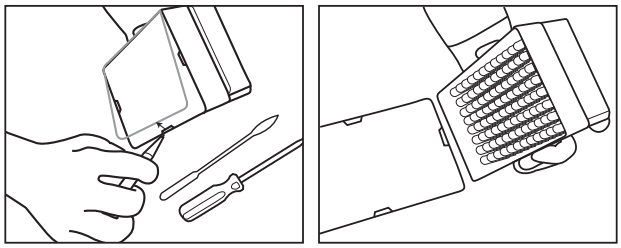
Neogen® Molecular Detection 장비 준비

1. Neogen® Molecular Detection System 소프트웨어를 실행하고 로그인합니다. Neogen Food Safety 담당자에게 문의하여 이 소프트웨어가 최신 버전인지 확인하십시오.
2. Neogen Molecular Detection 장비를 켭니다.
3. 각 시료에 대한 데이터를 포함하는 실행을 만들거나 편집합니다. 자세한 내용은 Neogen Molecular Detection System 사용 설명서를 참조하십시오.

참고: 반응 튜브를 포함한 Neogen Molecular Detection 스피드 로더 트레이를 삽입하기 전에 Neogen Molecular Detection 장비가 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

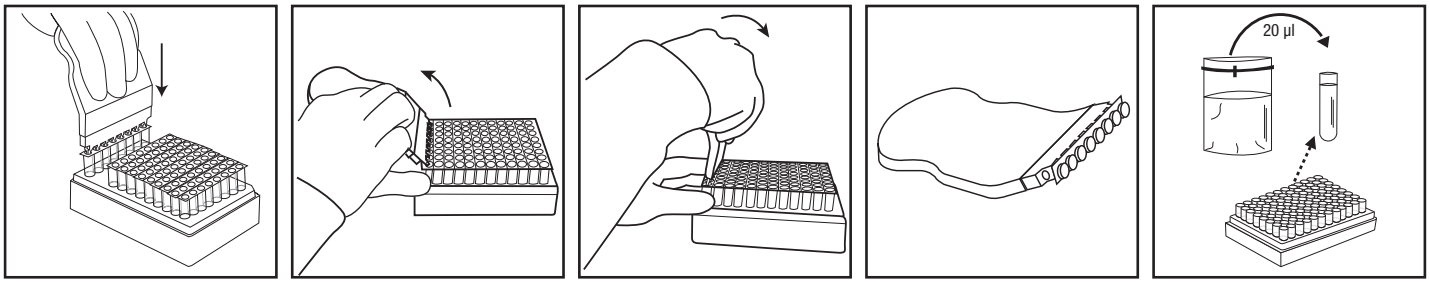
Neogen Molecular Detection 히팅 블록 인서트에 부착하기 전에 스크루드라이버나 스패튤라로 Neogen Lysis Solution 랙의 하단을 제거합니다.



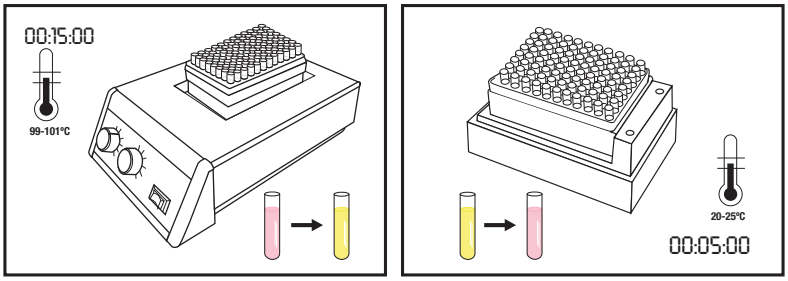
1. 랙을 실온(20~25°C)에서 하룻밤 동안(16~18시간) 두어 Lysis 용액(Neogen Lysis Solution) 튜브를 예열합니다. Neogen Lysis Solution 튜브를 실온으로 평형시키는 또 다른 방법은 최소 2시간 동안 실험실 벤치에 Neogen Lysis Solution 튜브를 두거나, 37 ± 1°C 배양기에 1시간 동안 Neogen Lysis Solution 튜브를 배양하거나 100°C의 건조한 이중 블록 히터에 30초간 두는 것입니다.
2. 캡을 씌운 튜브를 뒤집어 섞습니다. 4시간 이내에 다음 단계를 진행하십시오.
3. 배양기에서 증균 배양액을 꺼냅니다.
4. 각 시료와 음성 대조군(NC) 시료(멸균 증균 배지)마다 Neogen Lysis Solution 튜브 1개가 필요합니다.
   - 4.1 Neogen Lysis Solution 튜브 스트립을 원하는 Neogen Lysis Solution 튜브 수만큼 자를 수 있습니다. 필요한 개별 Neogen Lysis Solution 튜브 또는 8개들이 튜브 스트립 수를 선택합니다. Neogen Lysis Solution 튜브를 빈 랙에 놓습니다.
   - 4.2 교차 오염을 방지하기 위해 한 번에 한 줄씩 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® Molecular Detection 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 lysate를 그대로 둘 경우 캡을 깨끗한 용기에 두어 용해 후 다시 사용할 수 있도록 합니다.
     - 4.5.1 보존된 Lysate 처리에 대해서는 부록 A를 참조하십시오.
   - 4.6 표 2, 3 또는 4의 프로토콜에 별도로 기재되어 있지 않은 한 시료 20µL를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮깁니다 (예: 생유제품이거나 환경 시료를 neutralizing buffer와 같이 사용할 경우, 10µL를 사용하십시오).



5. 각 시료가 스트립의 해당 Neogen Lysis Solution 튜브에 모두 추가될 때까지 4.4~4.6단계를 반복합니다.
6. 모든 시료를 옮겼을 때 NC(멸균 증균 배지, 예: Demi Fraser Broth) 20µL를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮깁니다. 물을 NC로 사용하지 마십시오.
7. Neogen Molecular Detection 히팅 블록 인서트의 온도가 100 ± 1°C인지 확인합니다.
8. 덮개를 씌우지 않은 Neogen Lysis Solution 튜브의 랙을 Neogen Molecular Detection 히팅 블록 인서트에 놓고 15 ± 1분 동안 가열합니다. 가열 중 Neogen Lysis Solution 용액은 분홍색(차가움)에서 노란색(뜨거움)으로 바뀝니다.
   8.1 용해 단계 동안 적절하게 열처리가 되지 않은 시료는 잠재적인 생물학적 위험으로 간주되어 Neogen Molecular Detection 장비에 절대로 삽입하지 마십시오.
9. 덮개를 씌우지 않은 Neogen Lysis Solution 튜브의 랙을 히팅 블록에서 제거하고 Neogen Molecular Detection 냉각 블록 인서트에 최소 5분, 최대 10분 냉각시킵니다. 상온에서 사용하는 Neogen Molecular 냉각 블록 인서트는 바로 실험실 벤치에 놓아야 합니다. 식으면 Lysis Solution이 분홍색으로 다시 바뀝니다.
10. Neogen Lysis Solution 튜브의 랙을 Neogen Molecular Detection 냉각 블록 인서트에서 제거합니다.



증폭

1. 각 시료와 NC를 위해 1개의 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스* Reagent 튜브가 필요합니다.
   1.1 Reagent 튜브 스트립을 원하는 튜브 개수로 자를 수 있습니다. 개별 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스* Reagent 튜브 또는 필요한 8개들이 튜브 스트립 수를 선택합니다.
   1.2 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스* Reagent 튜브를 빈 랙에 놓습니다.
   1.3 튜브 맨 아래 시약 알갱이를 휘젓지 마십시오.
2. Neogen Reagent 컨트롤 튜브를 1개 선택하고 랙에 놓습니다.
3. 교차 오염을 방지하기 위해 한 번에 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스* 튜브 스트립 1개의 캡을 벗기고 각 분주 단계마다 새 피펫 팁을 사용합니다.
4. 아래 설명된 대로 lysate를 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스* Reagent 튜브 및 Neogen Reagent 컨트롤 튜브로 옮깁니다:

   각 시료 Lysate를 개별 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스* Reagent 튜브로 **먼저** 옮긴 뒤 NC를 옮기십시오. **마지막**에 Neogen Reagent 컨트롤 튜브를 수화합니다.

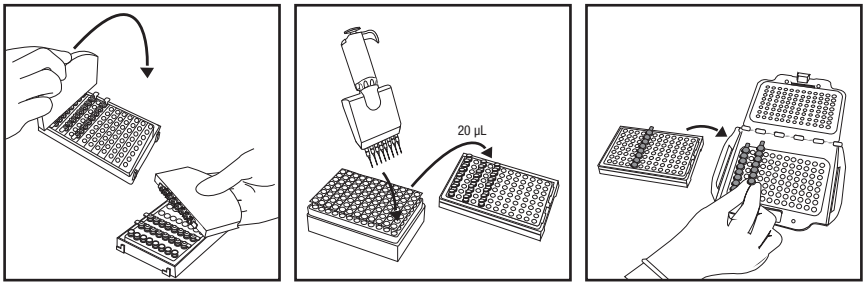
5. Neogen® Molecular Detection Cap/Decap Tool-Reagent를 사용하여 한 번에 Reagent 튜브 스트립 하나씩 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스* Reagent 튜브의 캡을 벗깁니다. 캡을 버리십시오.
   5.1 **Neogen Lysis Solution 튜브에서 용액의 상부 ½에서 시료 Lysate 20µL를 침전되지 않도록 하여 해당 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스* Reagent 튜브로 옮깁니다. 알갱이가 휘저어져 섞이지 않도록 기울여 붓습니다. 위아래로 가볍게 5번을 피펫팅하여 섞습니다.**
   5.2 개별 시료 Lysate가 스트립의 해당 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스* Reagent 튜브에 추가될 때까지 5.1단계를 반복합니다.
   5.3 제공된 여분의 캡으로 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스* Reagent 튜브를 덮고, Neogen Molecular Detection Reagent Cap/Decap Tool의 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 Lysate를 옮긴 후 5.1단계를 반복하여 NC Lysate 20µL를 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스* Reagent 튜브로 옮깁니다.

5.6 **NC Lysate 20µL**를 **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 Molecular Detection 스피드 로더 트레이에 내려놓습니다. Neogen Molecular Detection 스피드 로더 트레이 뚜껑을 닫고 걸쇠로 잠급니다.



7. Neogen Molecular Detection System 소프트웨어에서 구성된 실행을 검토하고 확인합니다.
8. 소프트웨어에서 시작 버튼을 클릭하고 사용할 기기를 선택합니다. 선택한 기기의 뚜껑이 자동으로 열립니다.
9. Neogen Molecular Detection 스피드 로더 트레이를 Neogen Molecular Detection 장비에 놓고 뚜껑을 닫으면 시험이 시작됩니다. 결과는 75분 이내에 제공되지만 양성 여부는 더 일찍 검출할 수 있습니다.
10. 시험이 완료되었으면 Neogen Molecular Detection 장비에서 Neogen Molecular Detection 스피드 로더 트레이를 꺼내고 1~5% (v:v 물)의 가정용 표백제 용액 또는 유사 용액에 1시간 동안 담갔다가 분석 준비 영역에서 떨어진 곳에 폐기하십시오.

주의: 교차 오염으로 인한 위양성의 위험을 최소화하려면 증폭된 DNA를 함유한 Reagent 튜브를 절대 열지 마십시오. 여기에는 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스* Reagent, Neogen Reagent 컨트롤 및 매트릭스 컨트롤 튜브가 포함됩니다. 밀봉된 Reagent 튜브는 1~5%(v:v 물)의 가정용 표백제 용액 또는 유사 용액에 1시간 동안 담가 두었다가 키트 준비 구역과 멀리 떨어진 위치에 폐기합니다.

결과 및 해석

알고리즘은 핵산 증폭을 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.

양성으로 추정되는 시료는 1차 증균액에서 2차 증균액(적용 가능한 경우)으로 이전하는 것에서 시작하여 이후 적절한 생화학적 및 혈청학적 방법으로 분리균 확인 및 플레이팅을 실시하는 등 실험실 표준 운영 절차 또는 적절한 참고 방법 확인[1, 2, 3]을 통해 확인해야 합니다.

참고: 시스템과 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스* 증폭 시약은 "배경" RLU를 가지므로 음성 시료도 0을 기록값으로 제공하지 않습니다.

이례적인 빛 출력이 나타나는 경우, 알고리즘은 이를 "검사(Inspect)"로 분류합니다. Neogen은 모든 검사 시료에 대해 분석을 반복하는 것을 권장합니다. 결과가 계속 검사인 경우, 기본 설정한 방법을 사용하거나 현지 규정에 따라 확정 시험을 진행하십시오.

표 5: Neogen Molecular Detection System 소프트웨어에서 제공하는 시료 및 해석에 대한 결과 기호.

웰 유형	웰 결과 기호	결과	해석
시료	⊕	양성	시료는 대상 식중독균에 대해 양성으로 추정됩니다.
시료	⊖	음성	시료는 대상 식중독균에 대해 음성입니다.
시료	⊘	저해	시료 매트릭스가 시험에 대해 저해를 일으켰습니다. 재시험이 필요할 수 있습니다. 자세한 내용은 문제 해결 섹션과 시험 키트 제품 설명서를 참조하십시오.
시료	?	검사	대상 식중독균의 존재 여부를 확인할 수 없습니다. 재시험이 필요할 수 있습니다. 자세한 내용은 문제 해결 섹션과 시험 키트 제품 설명서를 참조하십시오.
시료	⊘	오류	감지된 생체발광이 없습니다. 재시험이 필요할 수 있습니다. 자세한 내용은 문제 해결 섹션과 시험 키트 제품 설명서를 참조하십시오.

NF VALIDATION 인증 방법에 따른 결과 확정

방법 1: Demi Fraser 증균액부터 ISO 11290[3] 표준 사용.

방법 2: *리스테리아 모노사이토제네스*를 검출하는 NF VALIDATION 인증 방법의 일부를 형성하는 PALCAM 한천 또는 발색한천 (O&A) 의 분리. 특징적 집락의 존재로 *리스테리아 모노사이토제네스*의 존재를 확인할 수 있습니다.

방법 3: 분리된 집락에 수행된 EN ISO 7218[5] 표준에 명시된 대로 핵산 프로브 사용(방법 1 또는 2 참조).

방법 4: Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스*와 다른 원리인 기타 NF VALIDATION 인증 방법 사용. 해당 2차 검증 방법에 대해 설명된 전체 프로토콜을 사용해야 합니다. 두 가지 방법에서 확인 시작 전의 모든 단계가 반드시 동일해야 합니다.

결과가 불일치하는 경우(대체 방식 사용 시 추정 양성, 상기 방법 중 한 가지로 확인 불가), 실험실은 필요 단계를 따라 취득한 결과의 유효성을 확인해야 합니다.

결과가 불일치하는 경우(Neogen Molecular Detection Assay 2 - *리스테리아 모노사이토제네스* 사용 시 추정 양성, 상기 방법 중 한 가지로 확인 불가), 실험실은 필요 단계를 따라 취득한 결과의 유효성을 확인해야 합니다.

구체적인 용도나 절차에 대하여 궁금한 점이 있으면 당사 웹사이트(www.neogen.com)를 방문하거나 현지 Neogen 또는 판매업체로 문의하십시오.

부록 A. 시험 계획서 중단: 열처리된 Lysate 보관 및 재시험.

1. 열처리된 lysate를 보관하려면 깨끗한 캡으로 용해 튜브를 다시 씌웁니다("Lysis" 4.5 참조).
2. 4~8°C에서 최대 72시간 동안 보관합니다.
3. 2~3번 뒤집어서 혼합하여 보관된 시료를 증폭하도록 준비합니다.
4. 튜브의 캡을 벗깁니다.
5. Neogen Molecular Detection 히팅 블록 인서트에 혼합된 Lysate 튜브를 놓고 100 ± 1°C에서 5 ± 1분간 가열합니다.
6. Neogen Lysis Solution 튜브의 랙을 히팅 블록에서 제거하고 Neogen Molecular Detection 냉각 블록 인서트에 최소 5분, 최대 10분 냉각시킵니다.
7. 위에서 상세히 설명한 '증폭' 섹션의 프로토콜을 계속합니다.

참고자료:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

제품 라벨 기호 설명

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

FS00867C

Tanggal Penerbitan: 2024-07

Petunjuk Produk

Deteksi Molekuler untuk pengujian *Listeria monocytogenes 2*

Deskripsi Produk dan Maksud Penggunaan

Deteksi Molekuler Neogen® untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 digunakan dengan Sistem Deteksi Molekuler Neogen® untuk mendeteksi *Listeria monocytogenes* secara cepat dan spesifik dalam sampel makanan dan lingkungan yang diperkaya. Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian menggunakan amplifikasi isotermal termediasi loop untuk secara cepat menguatkan rangkaian asam nukleat dengan kekhususan dan kepekaan tinggi, dikombinasikan dengan bioluminesensi untuk mendeteksi amplifikasi. Hasil yang dianggap positif dilaporkan secara aktual, sedangkan hasil yang negatif akan ditampilkan setelah pengujian selesai. Hasil yang diduga positif harus dikonfirmasi menggunakan metode pilihan atau yang sesuai dengan peraturan setempat[1, 2, 3].

Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 ditujukan untuk penggunaan di lingkungan laboratorium oleh tenaga profesional yang terlatih dalam teknik laboratorium. Neogen tidak mendokumentasikan penggunaan produk ini dalam industri selain makanan atau minuman. Contohnya, Neogen belum mendokumentasikan produk ini untuk menguji sampel air, farmasi, kosmetik, klinis, atau veterinari. Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 belum dievaluasi dengan semua protokol pengujian, atau dengan semua strain bakteri yang mungkin ada.

Seperti semua metode uji, sumber, formulasi dan kualitas medium pengayaan bisa memengaruhi hasil. Faktor seperti metode pengambilan sampel, protokol pengujian, persiapan sampel, penanganan, dan teknik laboratorium juga dapat memengaruhi hasil. Neogen merekomendasikan untuk melakukan evaluasi metode, termasuk medium pengayaan, dalam lingkungan pengguna dengan menggunakan sejumlah sampel yang memadai dengan uji makanan dan mikroba tertentu untuk memastikan bahwa metode memenuhi kriteria pengguna.

Neogen telah mengevaluasi Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 menggunakan Larutan/Media Cair Demi-Fraser yang mengandung Amonium Besi Sitrat dan Larutan/Media Cair Fraser yang mengandung Amonium Besi Sitrat yang diperlukan. Formulasi khas dari medium ini adalah sebagai berikut.

Formula Khas Larutan/Media Cair Dasar Demi-Fraser	**(g/L)**	**Formula Khas Larutan/Media Cair Dasar Fraser**	**(g/L)**
Natrium Klorida	20 g	Natrium Klorida	20 g
Natrium Fosfat, dibasa, anhidrat *	9,6 g	Natrium Fosfat, dibasa, anhidrat *	9,6 g
Ekstrak Daging Sapi	5,0 g	Ekstrak Daging Sapi	5,0 g
Kasein Hasil Pencernaan Pankreatik	5,0 g	Kasein Hasil Pencernaan Pankreatik	5,0 g
Jaringan Hewan Hasil Pencernaan Peptik	5,0 g	Jaringan Hewan Hasil Pencernaan Peptik	5,0 g
Ekstrak Ragi	5,0 g	Ekstrak Ragi	5,0 g
Litium Klorida	3,0 g	Litium Klorida	3,0 g
Potasium Fosfat, monobasic	1,35 g	Potasium Fosfat, monobasic	1,35 g
Esculin	1,0 g	Esculin	1,0 g
Acriflavin HCl	0,0125 g	Acriflavin HCl	0,025 g
Asam Nalidiksat	0,01 g	Asam Nalidiksat	0,02 g

***** Pengganti: Natrium Fosfat, dibasa, dihidrat 12,0 g

Suplemen Larutan/Media Cair Fraser

(Bahan per botol 10 mL. Satu botol ditambahkan ke satu liter medium basal.)

Amonium Besi Sitrat 0,5 g/10 mL

pH akhir 7,2 ± 0,2 pada suhu 25°C

Instrumen Deteksi Molekuler Neogen® bertujuan untuk digunakan pada sampel yang telah dipanaskan selama tahap pengujian lisis, yang dirancang untuk mematikan organisme yang ada di dalam sampel tersebut. Sampel yang belum dipanaskan dengan benar selama tahap pengujian lisis dapat dianggap sebagai potensi bahaya biologis dan TIDAK BOLEH dimasukkan ke dalam Instrumen Deteksi Molekuler Neogen.

Penguji Keamanan Makanan Neogen sesuai dengan sertifikasi ISO (International Organization for Standardization) 9001 dalam hal desain dan manufaktur.

Kit uji Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 berisi 96 tes, yang diuraikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Komponen Kit Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian

Alat	Identifikasi	Jumlah	Isi	Komentar
Larutan Lisis Neogen® (LS)	Larutan merah muda dalam tabung transparan	96 (12 strip kali 8 tabung)	580 µL LS per tabung	Tersusun dalam rak dan siap digunakan
Tabung Reagen Deteksi Molekuler Neogen® untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2	Tabung kuning	96 (12 strip kali 8 tabung)	Campuran amplifikasi dan deteksi spesifik terliofilisasi	Siap digunakan
Kapsul tambahan	Tutup kuning	96 (12 strip kali 8 kapsul)		Siap digunakan
Kontrol Reagen Neogen® (RC)	Tabung flip-top transparan	16 (2 kantung dari 8 tabung tersendiri)	Campuran kontrol DNA, amplifikasi, dan deteksi terliofilisasi	Siap digunakan

Kontrol Negatif, yang tidak disediakan dalam kit, merupakan medium pengayaan steril, yaitu Larutan/Media Cair Demi-Fraser. Jangan gunakan air sebagai Kontrol Negatif.

Keselamatan

Pengguna harus membaca, memahami, dan mematuhi semua informasi keselamatan dalam petunjuk untuk Sistem Deteksi Molekuler Neogen dan Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2. Simpanlah petunjuk keselamatan tersebut untuk referensi pada masa mendatang.

⚠ **PERINGATAN:** Menandakan situasi berbahaya, yang, apabila tidak dihindari, dapat menyebabkan kematian atau cedera serius dan/atau kerusakan harta benda.

PERHATIAN: Menandakan situasi yang berpotensi bahaya yang, apabila tidak dihindari, dapat menyebabkan kerusakan harta benda.

⚠ PERINGATAN

Jangan gunakan Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 untuk mendiagnosis kondisi manusia atau hewan.

Metode Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 dapat menghasilkan jumlah *Listeria monocytogenes* yang cukup untuk menyebabkan bayi lahir mati dan kematian pada wanita hamil, serta sistem imun yang terganggu, apabila terpapar.

Pengguna harus melatih personelnya mengenai penggunaan teknik pengujian yang tepat dan terkini; contohnya, Praktik Laboratorium yang Baik, ISO/IEC 17025[4], atau ISO 7218[5].

Untuk memperkecil risiko dalam kaitannya dengan hasil negatif palsu yang dapat menyebabkan pelepasan produk yang terkontaminasi:

- Patuhi protokol dan lakukan pengujian dengan tepat seperti yang tercantum dalam petunjuk produk.
- Simpan Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 sesuai yang tercantum pada kemasan dan petunjuk produk.
- Selalu gunakan Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 sebelum tanggal kedaluwarsa.
- Gunakan Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 untuk sampel makanan dan lingkungan yang telah divalidasi secara internal atau oleh pihak ketiga.
- Gunakan Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 hanya untuk permukaan, sanitiser, protokol, dan strain bakteri yang telah divalidasi secara internal atau oleh pihak ketiga.
- Untuk sampel lingkungan yang berisi Penyangga Penetral dengan kompleks aril sulfonat, lakukan pelarutan 1:2 sebelum pengujian (1 bagian sampel dilarutkan dengan 1 bagian larutan/media cair pengayaan steril). Opsi lain adalah dengan memindahkan 10 µL pengayaan NB ke dalam tabung Larutan Lisis Neogen. Produk Pengumpulan Sampel Neogen® yang berisi Penyangga Penetral dengan senyawa aril sulfonat: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G, dan HS2410NB2G.

Untuk memperkecil risiko dalam kaitannya dengan paparan terhadap bahan kimia dan bahaya biologis:

- Sangat disarankan agar staf laboratorium wanita diberi tahu tentang risiko terhadap perkembangan janin pada ibu yang terinfeksi melalui paparan *Listeria monocytogenes*.
- Lakukan pengujian patogen di laboratorium yang memiliki peralatan lengkap di bawah kontrol personel yang telah terlatih. Media dan perlengkapan pengayaan terinkubasi atau permukaan yang telah bersentuhan dengan media pengayaan terinkubasi dapat mengandung patogen pada tingkat yang cukup untuk menimbulkan risiko bagi kesehatan manusia.

- Selalu patuhi praktik keselamatan standar laboratorium, termasuk memakai peralatan pelindung yang benar dan pelindung mata saat menangani reagen dan sampel yang terkontaminasi.
- Hindari kontak dengan isi media pengayaan dan tabung reagen setelah amplifikasi.
- Buang sampel yang telah diperkaya sesuai dengan standar industri yang berlaku saat ini.
- Sampel yang belum dipanaskan dengan benar selama tahap pengujian lisis dapat dianggap sebagai potensi bahaya biologis dan TIDAK BOLEH dimasukkan ke dalam Instrumen Deteksi Molekuler Neogen.

Untuk memperkecil risiko dalam kaitannya dengan kontaminasi silang saat persiapan pengujian:

- Selalu gunakan sarung tangan (untuk melindungi pengguna dan mencegah timbulnya nuklease).

Untuk memperkecil risiko dalam kaitannya dengan pencemaran lingkungan:

- Patuhi standar industri pembuangan limbah terkontaminasi yang berlaku saat ini.

Untuk memperkecil risiko dalam kaitannya dengan paparan terhadap cairan panas:

- Jangan mengatur suhu pada alat pemanas melebihi batas yang direkomendasikan.
- Jangan melebihi waktu pemanasan yang direkomendasikan.
- Gunakan termometer yang dikalibrasi dan sesuai untuk memverifikasi suhu Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen® (misalnya, termometer yang dimasukkan sebagian atau termometer digital ganda, bukan termometer yang dimasukkan keseluruhan.) Termometer harus ditempatkan pada lokasi yang ditentukan dalam Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen.

PERHATIAN

Untuk memperkecil risiko dalam kaitannya dengan kontaminasi silang saat persiapan pengujian:

- Ganti sarung tangan sebelum hidrasi pelet reagen.
- Dianjurkan menggunakan ujung pipet halang aerosol ujung runcing (berfilter) dengan derajat molekuler biologi yang steril.
- Gunakan ujung pipet yang baru setiap kali memindahkan sampel.
- Gunakan Praktik Laboratorium yang Baik untuk memindahkan sampel dari tabung pengayaan ke tabung lisis. Untuk mencegah kontaminasi pipet, pengguna dapat memilih menambahkan langkah perantara dalam proses pemindahan. Misalnya, pengguna dapat memindahkan setiap sampel yang diperkaya ke dalam tabung steril.
- Gunakan stasiun kerja biologi molekuler yang memiliki lampu germisida, jika tersedia. Secara berkala, bersihkan kontaminasi pada meja dan peralatan laboratorium (pipet, alat pembuka/penutup, dsb.) dengan larutan pemutih rumah tangga 1-5% (v:v dalam air) atau larutan penghilang DNA.

Untuk memperkecil risiko dalam kaitannya dengan hasil yang positif salah:

- Jangan sekali-kali membuka tabung reagen setelah amplifikasi.
- Buang tabung yang terkontaminasi dengan merendamnya ke dalam larutan pemutih rumah tangga 1-5% (v:v dalam air) atau larutan sejenis lainnya selama 1 jam dan jauhkan dari tempat persiapan pengujian.
- Jangan sterilkan tabung reagen dengan autoklaf setelah amplifikasi.

Baca Lembar Data Keselamatan untuk informasi lain dan peraturan setempat tentang pembuangan.

Apabila Anda memiliki pertanyaan yang spesifik tentang penerapan atau prosedur, silakan kunjungi situs web kami di www.neogen.com atau hubungi perwakilan atau distributor Neogen setempat.

Tanggung Jawab Pengguna

Pengguna wajib memahami petunjuk produk dan informasi. Kunjungi situs web kami di **www.neogen.com** atau hubungi perwakilan atau distributor Neogen setempat untuk mendapatkan informasi selengkapnya.

Saat memilih metode pengujian, Anda wajib mengetahui bahwa faktor eksternal, seperti metode pengambilan sampel, protokol pengujian, penyiapan sampel, penanganan, dan teknik laboratorium, dapat memengaruhi hasil pengujian.

Pengguna bertanggung jawab memilih metode atau produk pengujian untuk mengevaluasi sejumlah sampel yang memadai dengan matriks dan ketentuan mikrobial yang tepat untuk memastikan bahwa metode pengujian memenuhi kriteria pengguna.

Pengguna juga wajib menentukan bahwa semua metode dan hasil pengujian memenuhi persyaratan pelanggan dan pemasok.

Seperti halnya semua metode pengujian, hasil yang diperoleh dari penggunaan produk Neogen Food Safety apa pun bukan merupakan jaminan kualitas terhadap matriks atau proses yang diuji.

Untuk membantu pelanggan mengevaluasi metode untuk berbagai matriks makanan, Neogen telah mengembangkan kit Kontrol Matriks Deteksi Molekuler Neogen®. Jika diperlukan, gunakan Kontrol Matriks (MC) untuk menentukan apakah matriks memengaruhi hasil Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2. Uji beberapa sampel, yang mewakili matriks, yaitu sampel yang diperoleh dari sumber yang berbeda, selama periode validasi mana pun bila mengadopsi metode Neogen atau bila menguji matriks baru atau tidak dikenal atau matriks yang sudah mengalami perubahan bahan mentah atau perubahan proses.

Matriks dapat didefinisikan sebagai suatu tipe produk dengan properti intrinsik seperti komposisi dan proses. Perbedaan antara matriks bisa sama sederhananya dengan dampak yang ditimbulkan karena perbedaan tersebut dalam pemrosesan atau penyajiannya, misalnya mentah vs. dipasteurisasi; segar vs. dikeringkan, dll.

Batasan Garansi/Penggantian Terbatas

KECUALI SEBAGAIMANA YANG DITENTUKAN DI BAGIAN JAMINAN TERBATAS UNTUK SETIAP KEMASAN PRODUK, NEOGEN TIDAK BERTANGGUNG JAWAB TERHADAP SEMUA GARANSI SECARA TERSURAT MAUPUN TERSIRAT, TERMASUK TETAPI TIDAK TERBATAS PADA, JAMINAN KELAYAKAN JUAL ATAU KESESUAIAN UNTUK PENGGUNAAN TERTENTU. Apabila ada Produk Neogen Food Safety yang cacat, Neogen atau distributor resminya, sesuai kebijakannya, akan mengganti atau mengembalikan uang senilai harga pembelian produk. Hal-hal yang disebutkan di atas merupakan sarana pemulihan hak yang tersedia bagi Anda. Silakan hubungi perwakilan Neogen Anda atau distributor resmi Neogen untuk pertanyaan lebih lanjut.

Batasan Pertanggungjawaban Neogen

NEOGEN TIDAK BERTANGGUNG JAWAB ATAS SEGALA BENTUK KEHILANGAN ATAU KERUSAKAN, BAIK KERUSAKAN SECARA LANGSUNG, TIDAK LANGSUNG, KHUSUS, INSIDENTAL, MAUPUN KONSEKUENSIAL, TERMASUK TETAPI TIDAK TERBATAS PADA HILANGNYA KEUNTUNGAN. Bagaimanapun juga, sesuai teori hukum mana pun, Neogen tidak akan memberikan penggantian melebihi harga pembelian produk yang diduga cacat.

Penyimpanan dan Pembuangan

Simpan Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 pada suhu 2-8°C. Jangan dibekukan. Jauhkan kit dari cahaya selama penyimpanan. Setelah membuka kit, periksa apakah kantung foil masih utuh. Jangan digunakan jika kantung tersebut rusak. Setelah dibuka, tabung reagen yang tidak digunakan harus selalu disimpan dalam kantung yang dapat direkatkan kembali dan diberi desikan untuk menjaga stabilitas reagen terliofilisasi. Simpan kantong yang telah dibuka pada suhu 2-8°C, selama tidak lebih dari 60 hari.

Jangan gunakan Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 setelah tanggal kedaluwarsa. Tanggal kedaluwarsa dan nomor lot tercantum pada label di bagian luar kotak. Setelah penggunaan, medium pengayaan dan tabung Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 berpotensi mengandung bahan patogen. Setelah pengujian selesai, patuhi standar industri pembuangan limbah yang terkontaminasi yang berlaku saat ini. Baca Lembar Data Keselamatan untuk informasi lain dan peraturan setempat tentang pembuangan.

Petunjuk Penggunaan

Patuhi semua petunjuk dengan saksama. Karena jika tidak, hasilnya mungkin tidak akurat.

Secara berkala, bersihkan kontaminasi pada meja dan peralatan laboratorium (pipet, alat pembuka/penutup, dsb.) dengan larutan pemutih rumah tangga 1-5% (v:v dalam air) atau larutan penghilang DNA.

Pengguna harus menyelesaikan pelatihan kualifikasi operator (OQ) Sistem Deteksi Molekuler Neogen, sebagaimana dijelaskan dalam dokumen “Protokol dan Petunjuk Kualifikasi Pemasangan (IQ)/Kualifikasi Operasional (OQ) untuk Sistem Deteksi Molekuler Neogen”[6].

Baca Bagian “Instruksi Spesifik untuk metode tervalidasi” untuk persyaratan spesifik:

Tabel 3 untuk protokol pengayaan berdasarkan AOAC® *Official Method of Analysis*℠ **2016.08** dan Sertifikat AOAC® *Performance Tested Method*℠ **#081501.**

Tabel 4 untuk protokol pengayaan berdasarkan sertifikat NF Validation **3M 01/15-09/16.**

Pengayaan Sampel

Tabel 2, 3, atau 4 berisi panduan pengayaan sampel makanan dan lingkungan. Pengguna bertanggung jawab memvalidasi protokol pengambilan sampel atau rasio pengenceran alternatif guna memastikan metode pengujian ini memenuhi kriteria pengguna.

Makanan

1. Biarkan medium pengayaan Larutan/Media Cair Demi-Fraser (termasuk amonium besi sitrat) menyesuaikan dengan suhu dalam laboratorium.
2. Campurkan sampel dan media pengayaan secara aseptis sesuai Tabel 2, 3, atau 4. Untuk semua sampel daging dan yang mengandung banyak partikel, disarankan untuk menggunakan kantong filter.
3. Campurkan secara menyeluruh menggunakan blender, stomacher, atau dicampur secara manual selama 2 ± 0,2 menit. Inkubasi pada suhu 37 ± 1°C sebagaimana tercantum pada Tabel 2, 3, atau 4.
4. Untuk produk-produk susu mentah (lihat Tabel 2, 3, atau 4), pindahkan 0,1 mL pengayaan primer ke dalam 10 mL Larutan/Media Cair Fraser. Inkubasi pada suhu 37 ± 1°C selama 20-24 jam.

Sampel lingkungan

Alat pengumpulan sampel dapat menggunakan spons yang dibasahi dengan larutan yang menetralkan untuk menonaktifkan efek dari sanitiser. Neogen merekomendasikan penggunaan spons selulosa bebas biosida. Larutan penetral dapat berupa Kaldu Penetral Dey-Engley (D/E) atau Kaldu Letheen. Direkomendasikan untuk membersihkan area setelah pengambilan sampel.

PERINGATAN: Apabila Anda memilih menggunakan Penyangga Penetral (NB) yang mengandung kompleks aril sulfonat sebagai larutan hidrasi untuk spons, diperlukan pelarutan 1:2 (1 bagian sampel dilarutkan dengan 1 bagian larutan/media cair pengayaan steril) pada sampel lingkungan yang diperkaya sebelum pengujian untuk memperkecil risiko dalam kaitannya dengan hasil negatif palsu yang dapat menyebabkan pelepasan produk yang terkontaminasi. Opsi lain adalah dengan memindahkan 10 µL pengayaan penyangga penetral ke dalam tabung Larutan Lisis Neogen.

Ukuran area pengambilan sampel yang direkomendasikan untuk memverifikasi ada tidaknya patogen pada permukaan yaitu minimal 100 cm^2 (10 cm x 10 cm atau 4" x 4"). Saat mengambil sampel menggunakan spons, jangkaulah seluruh area dengan dua gerakan (kiri ke kanan lalu naik turun) atau kumpulkan sampel lingkungan dengan mengikuti protokol pengambilan sampel yang berlaku saat ini atau sesuai pedoman FDA BAM[1], USDA FSIS MLG[2], atau ISO 18593[7].

1. Biarkan medium pengayaan Larutan/Media Cair Demi-Fraser (termasuk amonium besi sitrat) menyesuaikan dengan suhu dalam laboratorium.
2. Campurkan sampel dan media pengayaan secara aseptis sesuai Tabel 2, 3, atau 4.
3. Campurkan secara menyeluruh menggunakan blender, stomacher, atau dicampur secara manual selama 2 ± 0,2 menit. Inkubasi pada suhu 37 ± 1°C selama 24-30 jam sebagaimana tercantum pada Tabel 2, 3, atau 4.

Tabel 2: Protokol pengayaan umum pada suhu 37 ± 1°C menggunakan Larutan/Media Cair Demi-Fraser dan Larutan/Media Cair Fraser sesuai keperluan.

Matriks Sampel	Ukuran Sampel	Volume Larutan/ Media Cair Pengayaan (mL)	Waktu Pengayaan (jam)
Daging, unggas, makanan laut, dan ikan yang diolah dengan suhu panas, dimasak, maupun diawetkan Produk susu yang diolah dengan suhu panas/dipasteurisasi Hasil panen dan sayuran Makanan multi-komponen	25 g	225	24-30
Sampel lingkungan[a]	1 spons	100 atau 225	24-30
	1 swab	10	24-30
Daging, unggas, makanan laut, dan ikan mentah	25 g	475	28-32

Matriks Sampel	Pengayaan Primer (Larutan/Media Cair Demi-Fraser)[a]			Pengayaan Sekunder (Larutan/Media Cair Fraser)[a]			Volume Analisis Sampel[b]
	Ukuran Sampel	Volume Larutan/ Media Cair Pengayaan (mL)	Waktu Pengayaan (jam)	Ukuran Sampel	Suhu Pengayaan (°C)	Waktu Pengayaan (jam)	
Produk susu mentah	25 g	225	20-24	Pindahkan 0,1 mL ke dalam 10 mL Larutan/ Media Cair Fraser	37 ± 1	20-24	10 µL

(a) Larutan/Media Cair Demi-Fraser dan Fraser harus selalu disuplemen dengan suplemen Larutan/Media Cair Fraser (amonium besi sitrat) selama pengayaan primer maupun sekunder.

(b) Volume sampel yang dipindahkan ke tabung Larutan Lisis Neogen. Lihat langkah 4.6 pada bagian Lisis.

Instruksi Spesifik untuk Metode Tervalidasi

AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2016.08

AOAC® *Performance Tested Method℠* #081501

Dalam program AOAC Research Institute OMA℠ dan PTM℠, Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 diketahui sebagai metode yang efektif untuk mendeteksi *Listeria monocytogenes.* Matriks yang diuji dalam kajian ditunjukkan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Protokol pengayaan yang menggunakan Larutan/Media Cair Demi-Fraser[a] pada suhu 37 ± 1°C menurut AOAC OMA℠ 2016.08 dan Sertifikat PTM℠ #081501.

Matriks Sampel		Ukuran Sampel	Volume Larutan/ Media Cair Pengayaan (mL)	Waktu Pengayaan (jam)
Hot dog daging sapi, queso fresco, es krim vanila, keju cottage dengan susu berlemak 4%, susu murni cokelat 3%, selada romaine, bayam mentah dalam kemasan, salmon asap dingin		25 g	225	24-30
Ayam mentah		25 g	475	28-32
Daging kalkun		125 g	1125	24-30
Blewah[b]		Melon utuh	Volume yang cukup untuk mengapungkan melon	26-30
Sampel lingkungan:	Besi tahan karat	1 spons	225	24-30
	Beton non-ekspos	1 spons	100	24-30
	Plastik[c]	1 swab	10	24-30

Seluruh sampel validasi AOAC dicampurkan menggunakan stomacher kecuali ada ketentuan lainnya.

(a) Larutan/Media Cair Demi-Fraser dan Fraser harus selalu disuplemen dengan suplemen Larutan/Media Cair Fraser (amonium besi sitrat) selama pengayaan primer maupun sekunder.

(b) Mencampurkan sampel secara manual.

(c) Mencampurkan sampel menggunakan vortex.

Známka NF Validation udlená organizací AFNOR Certification

3M 01/15-09/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

Untuk informasi selengkapnya mengenai berakhirnya masa berlaku, lihat sertifikat NF VALIDATION dengan mengunjungi situs web di atas.

Metode dengan sertifikasi NF VALIDATION yang memenuhi ISO 16140-2[6] dibandingkan dengan ISO 11290[3]
Ruang lingkup validasi: Semua sampel makanan manusia dan sampel lingkungan (tidak termasuk sampel produksi primer)
Persiapan sampel: Sampel harus disiapkan sesuai dengan EN ISO 11290-1[3] dan EN ISO 6887[8]
Versi perangkat lunak: Lihat sertifikat

Tabel 4: Protokol pengayaan sesuai metode dengan sertifikasi NF VALIDATION method 3M 01/15-09/16 pada suhu 37 ± 1°C menggunakan Larutan/Media Cair Demi-Fraser dan Larutan/Media Cair Fraser sesuai keperluan.

Protokol Umum	Ukuran Sampel	Volume Larutan/ Media Cair Pengayaan (mL)	Suhu Pengayaan (± 1°C)	Waktu Pengayaan (jam)	Volume Analisis Sampel[a]	Titik Interupsi yang Diterima
Semua sampel makanan (kecuali daging mentah, makanan laut mentah, dan produk susu mentah	25 g	225	37	24-30	20 µL	• Larutan/Media Cair Demi-Fraser hingga 72 jam • Lisat pada suhu -20°C • Lisat pada suhu 4°C hingga 72 jam
Sampel lingkungan	25 g, 1 swab, atau 1 seka					

Protokol Khusus	Pengayaan Primer (Larutan/Media Cair Demi-Fraser)[b]				Pengayaan Sekunder (Larutan/Media Cair Fraser)[b]				Titik Interupsi yang Diterima
	Ukuran Sampel	Volume Larutan/ Media Cair Pengayaan (mL)	Suhu Pengayaan (± 1°C)	Waktu Pengayaan (jam)	Ukuran Sampel	Suhu Pengayaan (± 1°C)	Waktu Pengayaan (jam)	Volume Analisis Sampel[c]	
Daging mentah, makanan laut mentah, dan produk susu mentah	25 g	225	37	20-24	Pindahkan 0,1 mL ke dalam 10 mL Larutan/ Media Cair Fraser	37	20-24	10 µL	• Larutan/ Media Cair Fraser hingga 72 jam • Lisat pada suhu -20°C • Lisat pada suhu 4°C hingga 72 jam

(a) Volume sampel yang dipindahkan ke tabung Larutan Lisis Neogen. Lihat langkah 4.6 pada bagian Lisis.

(b) Larutan/Media Cair Demi-Fraser dan Fraser harus selalu disuplemen dengan suplemen Larutan/Media Cair Fraser (amonium besi sitrat) selama pengayaan primer maupun sekunder.

(c) Volume sampel yang dipindahkan ke tabung Larutan Lisis Neogen. Lihat langkah 4.6 pada bagian Lisis.

CATATAN: Pengujian sampel berukuran lebih dari 25 g belum dilakukan dalam studi NF validation.

Persiapan Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen®

1. Basahi kain dengan larutan pemutih rumah tangga 1-5% (v:v dalam air) atau larutan sejenis lainnya dan seka Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen®.
2. Bilas Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen dengan air.
3. Gunakan handuk sekali pakai untuk menyeka Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen hingga kering.
4. Pastikan Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen dalam kondisi kering sebelum digunakan.

Persiapan Sisipan Blok Pendingin Deteksi Molekuler Neogen®

Tempatkan Sisipan Blok Pendingin Deteksi Molekuler Neogen® di meja laboratorium; Gunakan blok pendingin di laboratorium dengan suhu ruangan laboratorium (20-25°C).

Persiapan Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen®

Letakkan Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen® dalam unit pemanas blok ganda kering. Nyalakan unit pemanas blok kering dan atur suhu agar Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen dapat mencapai dan mempertahankan suhu 100 ± 1°C.

CATATAN: Tergantung pada unit pemanas, tunggu selama sekitar 30 menit hingga Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen mencapai suhu yang diinginkan. Gunakan termometer yang dikalibrasi dan sesuai (misalnya, termometer yang dimasukkan sebagian atau termometer digital ganda, **bukan** termometer yang dimasukkan keseluruhan) yang diletakkan di lokasi yang ditentukan, lakukan verifikasi bahwa Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen berada pada 100 ± 1°C.

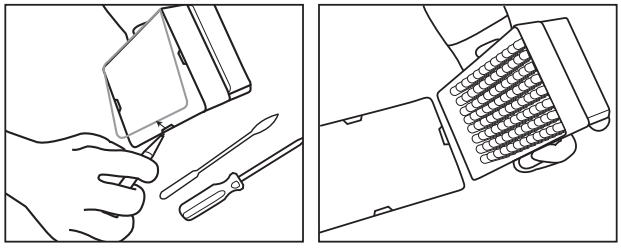
Persiapan Instrumen Deteksi Molekuler Neogen®

1. Buka Perangkat Lunak Sistem Deteksi Molekuler Neogen® kemudian login. Hubungi perwakilan Neogen Food Safety Anda guna memastikan Anda memiliki versi perangkat lunak paling mutakhir.
2. Nyalakan Instrumen Deteksi Molekuler Neogen.
3. Buat atau edit proses dengan data untuk setiap sampel. Baca Panduan Pengguna Sistem Deteksi Molekuler Neogen untuk keterangan lengkap.

CATATAN: Instrumen Deteksi Molekuler Neogen harus berada pada Status Siaga sebelum Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen dimasukkan dengan tabung reaksi. Tahap pemanasan ini memerlukan waktu sekitar 20 menit dan ditandai dengan nyala lampu ORANYE pada bilah status instrumen. Setelah instrumen siap digunakan, bilah status akan berubah menjadi HIJAU.

Lisis

Lepaskan bagian bawah Rak Larutan Lisis Neogen dengan obeng sebelum meletakkannya dalam Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen.



1. Panaskan tabung Larutan Lisis (Larutan Lisis Neogen) dengan cara menyetel rak pada suhu ruangan (20-25°C) selama satu malam (16-18 jam). Cara lain yang dapat digunakan untuk menyeimbangkan tabung Larutan Lisis Neogen pada suhu kamar adalah dengan meletakkan tabung Larutan Lisis Neogen di meja laboratorium sedikitnya selama 2 jam, inkubasi tabung Larutan Lisis Neogen dalam inkubator 37 ± 1°C selama 1 jam, atau meletakkannya di dalam pemanas blok ganda kering selama 30 detik pada suhu 100°C.
2. Balikkan tabung dalam kondisi tertutup agar isinya tercampur. Lanjutkan ke langkah berikutnya dalam waktu 4 jam.
3. Buang larutan/media cair pengayaan dari inkubator.
4. Satu tabung Larutan Lisis Neogen dibutuhkan untuk setiap sampel dan sampel Kontrol Negatif (NC) (media pengayaan steril).
   - 4.1 Strip tabung Larutan Lisis Neogen dapat dipotong sesuai jumlah tabung Larutan Lisis Neogen yang diinginkan. Pilih jumlah tabung Larutan Lisis Neogen atau strip 8 tabung yang diperlukan. Letakkan tabung Larutan Lisis Neogen pada rak kosong.
   - 4.2 Untuk mencegah kontaminasi silang, buka tutup satu strip tabung Larutan Lisis Neogen satu per satu dan gunakan ujung pipet baru untuk setiap tahap pemindahan.

4.3 Pindahkan sampel yang diperkaya ke Tabung Larutan Lisis Neogen sesuai petunjuk di bawah ini:

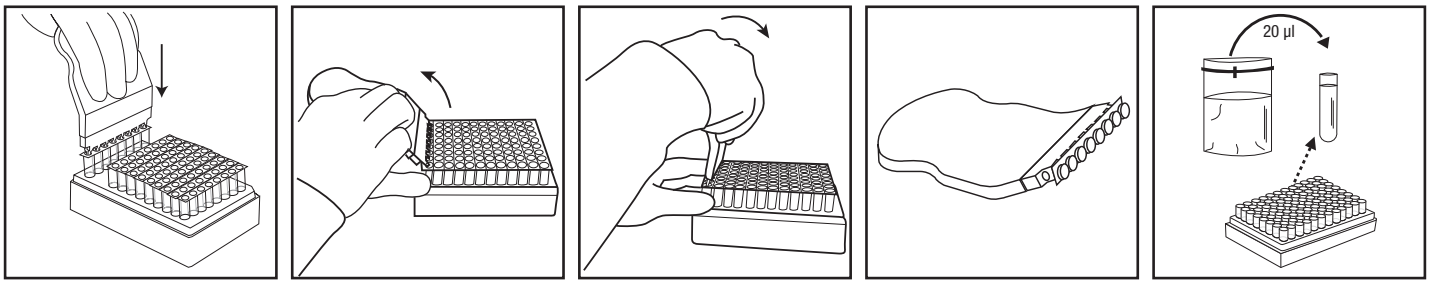
Pindahkan setiap sampel yang diperkaya ke tabung Larutan Lisis Neogen tersendiri **terlebih dahulu**. Pindahkan NC **paling akhir**.

4.4 Gunakan Alat Penutup/Pembuka Deteksi Molekuler Neogen®-Lisis untuk membuka setrip tabung Larutan Lisis Neogen satu per satu.

4.5 Buang penutup tabung Larutan Lisis Neogen – jika lisat akan disimpan untuk pengujian ulang, letakkan penutup ke dalam wadah bersih untuk penggunaan ulang setelah lisis.

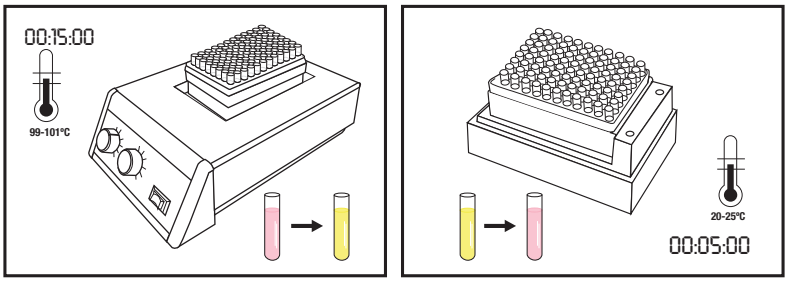
4.5.1 Untuk memproses lisat yang disimpan, lihat Apendiks A.

4.6 Pindahkan 20 µL sampel ke dalam tabung Larutan Lisis Neogen kecuali ada ketentuan lainnya dalam Protokol pada Tabel 2, 3, atau 4 (mis., produk susu mentah atau ketika memakai sampel lingkungan yang menggunakan 10 µL penyangga penetral).



5. Ulangi langkah 4.4 sampai 4.6 hingga setiap sampel telah ditambahkan ke dalam tabung Larutan Lisis Neogen yang sesuai dalam strip.
6. Setelah selesai memindahkan semua sampel, pindahkan 20 µL NC (media pengayaan steril, mis., Larutan/Media Cair Demi-Fraser) ke dalam tabung Larutan Lisis Neogen. Jangan gunakan air sebagai NC.
7. Pastikan bahwa suhu Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen berada pada 100 ± 1°C.
8. Letakkan rak tabung Larutan Lisis Neogen yang tidak tertutup di dalam Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen lalu panaskan selama 15 ± 1 menit. Selama pemanasan, Larutan Lisis Neogen akan berubah dari merah muda (dingin) menjadi kuning (panas).

   8.1 Sampel yang belum dipanaskan dengan benar selama tahap pengujian lisis dapat dianggap sebagai potensi bahaya biologis dan TIDAK BOLEH dimasukkan ke dalam Instrumen Deteksi Molekuler Neogen.
9. Keluarkan rak tidak tertutup berisi tabung Larutan Lisis Neogen dari blok pemanasan dan biarkan hingga dingin dalam Sisipan Blok Pendingin Deteksi Molekuler Neogen selama 5 sampai 10 menit. Sisipan Blok Pendingin Molekuler Neogen, yang digunakan pada suhu ruangan harus diletakkan langsung di meja laboratorium. Ketika dingin, larutan lisis akan kembali berwarna merah muda.
10. Keluarkan rak tabung Larutan Lisis Neogen dari Sisipan Blok Pendingin Deteksi Molekuler Neogen.

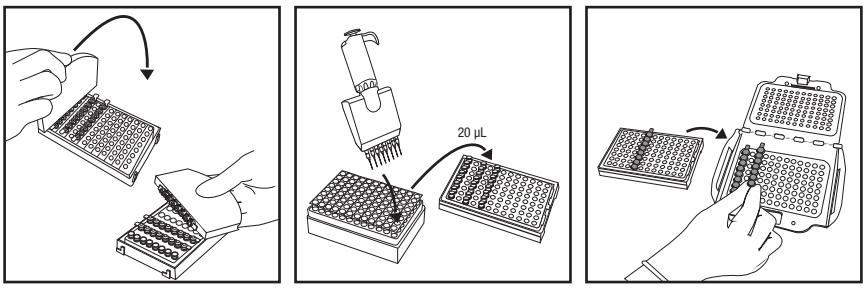


Amplifikasi

1. Satu Tabung Reagen Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 diperlukan untuk setiap sampel dan NC.
   1.1 Setrip tabung reagen dapat dipotong sesuai jumlah tabung yang diinginkan. Pilih jumlah Tabung Reagen Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 atau strip 8 tabung yang dibutuhkan.
   1.2 Letakkan Tabung Reagen Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 di rak yang kosong.
   1.3 Jangan sampai mengguncang pelet reagen di bagian bawah tabung.
2. Pilih 1 tabung Kontrol Reagen Neogen lalu letakkan di rak.
3. Untuk menghindari kontaminasi silang, buka tutup strip Tabung Reagen Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 satu demi satu dan gunakan ujung pipet baru untuk setiap tahap pemindahan.
4. Pindahkan lisat ke Tabung Reagen Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes 2* dan tabung Kontrol Reagen Neogen sebagaimana dijelaskan di bawah ini:

Pindahkan setiap sampel lisat ke setiap Tabung Reagen Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 **terlebih dahulu**, diikuti dengan NC. Basahi tabung Kontrol Reagen Neogen **paling akhir**.

5. Gunakan Alat Penutup/Pembuka Deteksi Molekuler Neogen® - Reagen untuk membuka Tabung Reagen Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 strip demi strip. Buang penutup.
   5.1 **Pindahkan 20 µL Sampel lisat dari ½ atas cairan (hindari pengendapan) dalam Tabung Larutan Lisis Neogen ke dalam Tabung Reagen Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 terkait. Semprotkan dengan kemiringan tertentu sehingga tidak mengganggu pelet. Campurkan dengan cara menyedot dan menyemprotkan perlahan-lahan sebanyak 5 kali.**
   5.2 Ulangi langkah 5.1 sampai setiap Sampel lisat telah ditambahkan ke Tabung Reagen Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 dalam strip.
   5.3 Tutup Tabung Reagen Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 dengan tutup tambahan yang tersedia dan gunakan sisi bulat pada Alat Penutup/Pembuka Deteksi Molekuler Neogen - Reagen untuk memberikan tekanan dengan bergerak maju-mundur guna memastikan bahwa tutup sudah terpasang rapat.
   5.4 Ulangi langkah 5.1 hingga 5.3 sesuai kebutuhan, sesuai jumlah sampel yang akan diuji.
   5.5 Setelah semua sampel lisat dipindahkan, ulangi langkah 5.1 untuk memindahkan 20 µL lisat NC ke dalam Tabung Reagen Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2.
   5.6 Pindahkan **20 µL lisat NC ke dalam tabung Kontrol Reagen Neogen**. Semprotkan dengan kemiringan tertentu sehingga tidak mengganggu pelet. Campurkan dengan cara menyedot dan menyemprotkan perlahan-lahan sebanyak 5 kali.
6. Masukkan tabung tertutup ke dalam Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen yang bersih dan yang telah didekontaminasi. Tutup dan segel tutup Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen.



7. Periksa dan konfirmasi proses yang telah dikonfigurasi di Perangkat Lunak Sistem Deteksi Molekuler Neogen.
8. Klik tombol Start di perangkat lunak dan pilih instrumen yang akan digunakan. Tutup instrumen yang dipilih akan membuka secara otomatis.
9. Masukkan Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen ke Instrumen Deteksi Molekuler Neogen dan tutup dengan rapat untuk memulai pengujian. Hasilnya akan ditampilkan setelah 75 menit, meskipun hasil positif dapat terdeteksi lebih cepat.
10. Setelah pengujian selesai, keluarkan Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen dari Instrumen Deteksi Molekuler Neogen dan buang tabung dengan merendamnya ke dalam larutan pemutih rumah tangga 1-5% (v:v dalam air) atau larutan sejenisnya selama 1 jam dan jauhkan dari area persiapan pengujian.

PERHATIAN: Untuk meminimalkan risiko munculnya hasil positif palsu karena kontaminasi silang, jangan membuka tabung reagen yang berisi DNA hasil amplifikasi. Ini termasuk Tabung Reagen Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2, tabung Kontrol Reagen Neogen, dan tabung Kontrol Matriks. Buang tabung reagen yang tersegel dengan merendamnya ke dalam larutan pemutih rumah tangga 1-5% (v:v dalam air) atau larutan sejenisnya selama 1 jam dan jauhkan dari tempat persiapan pengujian.

Hasil dan Interpretasi

Terdapat suatu algoritme yang menginterpretasikan kurva keluaran cahaya yang dihasilkan dari deteksi amplifikasi asam nukleat. Hasil dianalisis secara otomatis oleh perangkat lunak dan diberi kode warna berdasarkan hasil tersebut. Hasil yang Positif atau Negatif ditentukan dari analisis sejumlah parameter kurva khusus. Hasil yang dianggap positif dilaporkan secara aktual sedangkan hasil Negatif dan Perlu Pemeriksaan akan ditampilkan setelah pengujian selesai.

Sampel yang dianggap positif harus dikonfirmasi sesuai dengan standar prosedur pengoperasian laboratorium atau dengan mematuhi konfirmasi metode rujukan yang sesuai[1, 2, 3], dimulai dengan pemindahan dari pengayaan primer ke larutan/media cair pengayaan sekunder (jika tersedia), dilanjutkan dengan pengusapan dan konfirmasi isolat menggunakan metode biokimia dan serologi yang sesuai.

CATATAN: Sampel yang negatif tidak akan memberikan hasil pembacaan nihil karena sistem dan reagen amplifikasi Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2 memiliki pembacaan unit cahaya relatif (RLU) "latar belakang".

Meskipun jarang terjadi, jika output cahaya tidak normal, algoritme akan memberi label "Perlu Pemeriksaan". Neogen menyarankan pengguna mengulang pengujian untuk sampel yang berstatus Perlu Pemeriksaan. Jika hasil tetap menunjukkan label Perlu Pemeriksaan, lanjutkan ke pengujian konfirmasi menggunakan metode yang Anda pilih atau sebagaimana ditentukan oleh peraturan setempat.

Tabel 5: Simbol hasil untuk sampel dan interpretasi sebagaimana disediakan oleh Perangkat Lunak Sistem Deteksi Molekuler Neogen.

Tipe Bagus	Simbol Hasil Bagus	Hasil	Interpretasi
Sampel		Positif	Sampel dianggap positif mengandung patogen target.
Sampel		Negatif	Sampel negatif mengandung patogen target.
Sampel		Dihambat	Matriks sampel menghambat pengujian. Mungkin diperlukan pengujian ulang. Lihat bagian pemecahan masalah dan Petunjuk Produk kit pengujian untuk informasi selengkapnya.
Sampel		Perlu Pemeriksaan	Ada atau tidaknya patogen target tidak dapat ditentukan. Mungkin diperlukan pengujian ulang. Lihat bagian pemecahan masalah dan Petunjuk Produk kit pengujian untuk informasi selengkapnya.
Sampel		Kesalahan	Tidak ada bioluminesensi yang terdeteksi. Mungkin diperlukan pengujian ulang. Lihat bagian pemecahan masalah dan Petunjuk Produk kit pengujian untuk informasi selengkapnya.

Konfirmasi Hasil Sesuai dengan Metode Bersertifikasi NF VALIDATION

Opsi 1: Menggunakan standar ISO 11290[3] yang dimulai dari pengayaan Demi-Fraser

Opsi 2: Mengisolasi agar PALCAM atau agar kromogenik (O&A) yang membentuk bagian dari metode bersertifikat NF VALIDATION untuk pendeteksian *Listeria monocytogenes*. Kehadiran koloni khas cukup untuk memastikan keberadaan *Listeria monocytogenes*.

Opsi 3: Menggunakan probe asam nukleat sebagaimana dijelaskan dalam standar EN ISO 7218[5] yang dilakukan pada koloni terisolasi dari agar tertentu (lihat Opsi 1 atau 2).

Opsi 4: Menggunakan metode bersertifikasi NF VALIDATION lainnya, yang prinsipnya harus berbeda dari Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2. Protokol lengkap yang dijelaskan untuk metode tervalidasi kedua harus dipakai. Semua langkah sebelum konfirmasi dimulai harus sama pada kedua metode.

Dalam hal terjadi hasil yang tidak sesuai (dianggap positif oleh metode alternatif, yang tidak dikonfirmasi oleh salah satu cara yang diuraikan di atas), laboratorium harus mengikuti langkah-langkah yang diperlukan untuk memastikan keabsahan hasil yang diperoleh.

Dalam hal terjadi hasil yang tidak sesuai (dianggap positif dengan Deteksi Molekuler Neogen untuk Pengujian *Listeria monocytogenes* 2, yang tidak dikonfirmasi oleh salah satu cara yang diuraikan di atas, laboratorium harus mengikuti langkah-langkah yang diperlukan untuk memastikan keabsahan hasil yang diperoleh.

Apabila Anda memiliki pertanyaan yang spesifik tentang penerapan atau prosedur, silakan kunjungi situs web kami di www.neogen.com atau hubungi perwakilan atau distributor Neogen setempat.

Apendiks A. Interupsi Protokol: Penyimpanan dan pengujian ulang lisat yang dipanaskan.

1. Untuk menyimpan lisat yang dipanaskan, tutup kembali tabung lisis dengan penutup bersih (lihat bagian “Lisis”, 4.5).
2. Simpan pada suhu 4 hingga 8°C sampai 72 jam.
3. Siapkan sampel yang disimpan untuk amplifikasi dengan membalik 2-3 kali agar tercampur.
4. Lepas penutup tabung.
5. Letakkan tabung lisat campuran pada Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen dan panaskan pada suhu 100 ± 1°C selama 5 ± 1 menit.
6. Keluarkan rak berisi tabung Larutan Lisis Neogen dari blok pemanasan dan biarkan hingga dingin dalam Sisipan Blok Pendingin Deteksi Molekuler Neogen selama 5 sampai 10 menit.
7. Lanjutkan protokol pada bagian 'Amplifikasi' yang dijelaskan di atas.

Referensi:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. NF EN ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Penjelasan Simbol Label Produk

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.
The Dairy School
Auchincruive
Ayr, KA6 5HU
Scotland, UK

Neogen Ireland, Ltd.
Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.
Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Neogen Corporation
620 Lesher Place Lansing, MI 48912 USA
www.neogen.com

FS00867C

dZ **Requester:** Kristin Wincek **Creator:** deZinnia_33022 **File Name:** FS00867B.indd **Structure #:** N/A **Date:** 01/31/23	**Printed Colors – Front:** C M Y K PMS 6160 **Printed Colors – Back:** C M Y K PMS 6160 **Match Colors:**
Scale: 1 Inch	**This artwork has been created as requested by Neogen. Neogen is responsible for the artwork AS APPROVED and assumes full responsibility for its correctness.**