











-  (EN) **Molecular Detection Assay 2 - *Salmonella***
-  (FR) **Kit de détection moléculaire *Salmonella* version 2**
-  (DE) **Molekulare Detektion 2 - *Salmonellen* Nachweis**
-  (ES) **Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella***
-  (PT) **Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 2**
-  (PL) **Molekularny test do wykrywania 2 - *Salmonella***
-  (JA) **分子検出アッセイ2 - サルモネラ属菌**
-  (ZH) **沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌(Simplified)**
-  (TH) **ชุดทดสอบเชื้อซาลโมเนลล่าระดับโมเลกุล 2**
-  (KO) **Molecular Detection Assay 2 - *살모넬라***

2

Product Instructions

Neogen® Molecular Detection Assay 2 - *Salmonella*

Product Description and Intended Use

The Neogen® Molecular Detection Assay 2 - *Salmonella* is used with the Neogen® Molecular Detection System for the rapid and specific detection of *Salmonella* in enriched food, feed and food process environmental samples.

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

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

As with all test methods, the source, formulation and quality of enrichment medium can influence the results. Factors such as sampling methods, testing protocols, sample preparation, 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 - *Salmonella* with Buffered Peptone Water (BPW) ISO.

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 - *Salmonella* test kit contains 96 tests, described in Table 1.

Table 1. Neogen Molecular Detection Assay Kit components

Item	Identification	Quantity	Contents	Comments
Neogen® Lysis Solution (LS)	Pink solution in clear tubes	96 (12 strips of 8 tubes)	580 µL of LS per tube	Racked and ready to use
Neogen® Molecular Detection Assay 2 - <i>Salmonella</i> Reagent Tubes	Green tubes	96 (12 strips of 8 tubes)	Lyophilized specific amplification and detection mix	Ready to use
Extra caps	Green 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 (NC), not provided in the kit, is a sterile enrichment medium, e.g., BPW ISO. Do not use water as a NC.

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 - *Salmonella*. 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 - *Salmonella* in the diagnosis of conditions in humans or animals.

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

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

- Follow the protocol and perform the tests exactly as stated in the product instructions.
- Store the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Salmonella* as indicated on the package and in the product instructions.
- Always use the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Salmonella* by the expiration date.
- Use the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Salmonella* with food, feed and food process environmental samples that have been validated internally or by a third party.
- Use the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Salmonella* only with surfaces, sanitizers, protocols and bacterial strains that have been validated internally or by a third party.
- For an environmental sample containing neutralizing buffer 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 neutralizing buffer enrichment into the Neogen Lysis Solution tubes. Neogen® Sample Handling 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:

- 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 tubes post amplification.
- Always dispose of the contaminated tubes by soaking in a 1-5% (v:v in water) household bleach 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, laboratory technique and the sample itself may influence results.

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

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

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

To help customers evaluate the 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 - *Salmonella* 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. You must promptly notify Neogen within sixty days of discovery of any suspected defects in a product and return it to Neogen. Please contact your Neogen representative or authorized Neogen distributor for any further questions.

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 - *Salmonella* 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 - *Salmonella* 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 - *Salmonella* tubes can potentially contain pathogenic materials. When testing is complete, follow current industry standards for the disposal of contaminated waste. Consult the Safety Data Sheet for additional information and local regulations for disposal.

Instructions for Use

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

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

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

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

Table 3 for enrichment protocols according to AOAC® *Official Method of Analysis*SM **2016.01** and AOAC® *Performance Tested*SM Certificate #091501.

Table 4 for enrichment protocols according to NF VALIDATION certificate **3M 01/16 -11/16**.

Sample Enrichment

Tables 2, 3 or 4 present guidance for general enrichment protocols for food, feed 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 BPW ISO enrichment medium to equilibrate to ambient laboratory temperature or $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ depending upon matrices tested. See Tables 2, 3 or 4.
2. Aseptically combine the enrichment medium and sample.
3. Homogenize thoroughly by blending, stomaching, or hand mixing for 2 ± 0.2 minutes or until all lumps are completely dissolved and the enrichment suspension is homogeneous⁽¹⁰⁻¹⁵⁾.
 - a. For all meat and highly particulate samples, the use of filter bags is recommended.
 - b. For matrices which swell in water and are highly viscous (e.g., cereals, starches), it is suggested to make further dilutions ($> 1:10$) until viscosity is suitably reduced or add sterile 1% (w/v) alpha-amylase to BPW (ISO)⁽¹⁰⁻¹³⁾.
 - c. For large sample sizes of milk powder and cereals, add the sample slowly to the liquid with frequent mixing to avoid clumps.
4. Incubate as outlined in the appropriate protocol table (see Tables 2, 3 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 Lethen Broth. It is recommended to sanitize the area after sampling.

WARNING: Should you select to use neutralizing buffer 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 18593:2018⁽⁷⁾ guidelines.

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

1. Pre-warm BPW ISO enrichment medium to $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ depending upon matrices tested. See Tables 2, 3 or 4.
2. Aseptically combine the enrichment medium and sample. Homogenize thoroughly by blending, stomaching, or hand mixing for 2 ± 0.2 minutes. Incubate as outlined in the appropriate protocol table. See Tables 2, 3 or 4.

Table 2. General enrichment protocols.

Sample Matrix	Sample Size	Enrichment Broth Volume	Enrichment Temperature (± 1°C)	Enrichment Time (hours)	Sample Analysis Volume (µL) ^(a)
Protocol 1 Processed food products (excluding egg powders, and products specified in the other protocols) ^(b)	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-26	20
Protocol 2 Raw and unprocessed foods, egg powders, animal feed, and environmental samples ^(c)	25 g	225 mL BPW ISO (pre-warmed)	41.5	18-26	20
Protocol 3 Powdered dairy products (includes infant formula, soy based infant formula)	25 g	225 mL BPW ISO	37	20-26	20
Protocol 4 Cocoa based products (powder, chocolates, confectionaries, etc.)	25 g	225 mL of sterile 100 g/L non-fat dry milk with 0.002% brilliant green dye ^(d,e,f)	37	24-30	20
Protocol 5 Other including: spices, aromatic herbs, concentrates, instant teas and coffees, bouillon cubes	25 g	235 mL 2X BPW ISO with 0.5% K ₂ SO ₃ + 240 mL of sterile 100 g/L non-fat dry milk ^(d,g,h)	37	24-30	10
Protocol 6 Walnuts or nut mixes containing walnuts (this protocol is appropriate for other nuts including pecans, almonds, pistachios, cashews, chestnuts, macadamia nuts, Brazil nuts, soy nuts and peanuts)	25 g	225 mL of sterile 100 g/L non-fat dry milk ^(d)	37	18-24	20

(a) Volume of sample transferred to Lysis Solution tubes. Refer to step 4.7 of Lysis section.

(b) Examples of products to be tested with Protocol 1: ready to use meals, deli salads, custard.

(c) Examples of products to be tested with Protocol 2: raw meats, frozen vegetables, all cheeses, fermented milk, raw salad (lettuce, Batavia).

(d) Non-fat UHT milk can be substituted for non-fat dry milk.

(e) 0.45 mL of 1% aqueous brilliant green dye solution per 225 mL non-fat milk, resulting in a final concentration of 0.002% (0.02 g/L) brilliant green dye.

(f) To prepare sterile non-fat dry milk, suspend 100 g dehydrated non-fat dry milk in 1 L of distilled or purified water. Swirl until dissolved. Autoclave for 15 minutes at 121°C. Store at 2-30°C⁽⁸⁾.

(g) 5 g of K₂SO₃ per 1000 mL BPW ISO, resulting in a final concentration of 0.5% K₂SO₃.

(h) 240 mL 100 g/L sterile non-fat dry milk must be added to sterilized 235 mL 2X BPW ISO with 0.5% K₂SO₃.

If using an optional secondary enrichment step, e.g. Rappaport Vassiliadis Medium, it is required to perform a 1:2 dilution (1 part sample enrichment into 1 part sterile enrichment broth) or simply transfer 10 µL of the secondary enrichment to the Neogen Lysis Solution tubes. If using Tetrathionate (TT) Broth, transfer 20 µL of the secondary enrichment to the Neogen Lysis Solution tubes, and do not vortex TT enrichment or pipette from the bottom of enrichment tube to avoid transfer of any precipitate.

Specific Instructions for Validated Methods
AOAC® Official Methods of AnalysisSM 2016.01
AOAC® Performance TestedSM Certificate #091501



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

Table 3. Enrichment protocols according to AOAC OMASM 2016.01 and AOAC PTMSM Certificate #091501. Volume of sample transferred to Neogen Lysis Solution tubes is 20 µL.

Sample Matrix	Sample Size	Enrichment Broth Volume	Enrichment Temperature (± 1°C)	Enrichment Time (hours)	
Raw ground beef	25 g	225 mL BPW ISO (pre-warmed)	41.5	10-24	
	325 g	975 mL BPW ISO (pre-warmed)			
Raw ground chicken	25 g	225 mL BPW ISO (pre-warmed)	41.5	10-24	
	325 g	975 mL BPW ISO (pre-warmed)	41.5	14-24	
Cooked breaded chicken	325 g	2,925 mL BPW ISO	37	18-24	
Dry dog food	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-24	
	375 g	1,500 mL BPW ISO			
Black pepper, Raw whole shrimp, Raw bagged spinach, Pasteurized processed American cheese	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-24	
Chicken carcass rinse	30 mL	30 mL BPW ISO (pre-warmed)	41.5	18-24	
Chicken carcass sponge	1 sponge	50 mL BPW ISO (pre-warmed)	41.5	18-24	
Instant non-fat dry milk	25 g	225 mL BPW ISO	37	20-24	
Cocoa powder	25 g	225 mL BPW ISO	37	24-28	
Pasteurized liquid whole egg	100 mL	900 mL BPW ISO	37	18-24	
Spent sprout irrigation water	375 mL	3,375 mL BPW ISO	37	18-24	
Creamy peanut butter	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-24	
	375 g	3,375 mL BPW ISO			
Dried cannabis flower, dried hemp flower ⁽⁴⁾	10 g	90 BPW-ISO	41.5	28-32	
Environmental	Sealed concrete	1 sponge	225 mL BPW ISO (pre-warmed)	41.5	18-24
	Stainless steel	1 swab	10 mL BPW ISO (pre-warmed)	41.5	18-24
	Sealed ceramic tile	1 sponge	50 mL BPW ISO (pre-warmed)	41.5	18-24

Sample Matrix	Sample Size	Enrichment Broth Volume	Enrichment Temperature (± 1°C)	Enrichment Time (hours)	Secondary Enrichment Medium (mL)	Secondary Enrichment Temperature (±1°C)	Secondary Enrichment Time (hours)
Raw shrimp, head on	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-24	R-V R10: 0.1 mL into 10 mL ^(a)	41.5	4-24

(a) Transfer 10 µL of enriched sample to Lysis Solution tubes. Refer to step 4.7 of Lysis section.



**3M 01/16 -11/16
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⁽⁷⁾ in comparison to ISO 6579⁽³⁾.

Scope of the validation: All human food products, production environmental samples (including primary production samples), pet food and animal feed, by performing validation assays on a broad range of foods.

Sample preparation: Samples should be prepared according to EN ISO 6579⁽³⁾ and EN ISO 6887⁽¹⁰⁻¹⁵⁾.

Software version: See certificate.

Table 4. Enrichment protocols according to NF VALIDATION certified method 3M 01/16 -11/16.

Protocol	Sample size	Enrichment broth volume	Enrichment temperature (+1°C)	Enrichment Time (hours)	Sample Analysis Volume (µL) ^(a)
Protocol 1: <ul style="list-style-type: none"> Broad range processed food products, (excluding egg powder, processed fruits and vegetables and products specified in the other protocols) All fish and raw seafood products Pet food and animal feed Primary production (non-fecal) 	25 g	225 mL BPW ISO	37	18 - 26	20
Protocol 2: <ul style="list-style-type: none"> Broad range of raw and unprocessed food (excluding raw fish and raw seafood, and products specified in the other protocols) Egg powders All fruits and vegetables Food production environment samples 	25 g or 1 wipe or 1 swab	225 mL pre-warmed BPW ISO	41.5	18 - 26	20
Protocol 3: <ul style="list-style-type: none"> Powdered dairy products 	25 g	225 mL BPW ISO	37	20 - 26	20
Protocol 4: <ul style="list-style-type: none"> Cocoa based products containing more than 20% cocoa 	25 g	225 mL non-fat UHT milk + 0.002% Brilliant green	37	24 - 30	20
Protocol 5: <ul style="list-style-type: none"> Spices, aromatic herbs, concentrates, teas, coffees, culinary preparation 	25 g	235 mL 2 x BPW ISO + K ₂ SO ₃ 0.5% + 240 mL of non-fat UHT milk	37	24 - 30	10
Protocol 6: <ul style="list-style-type: none"> Raw meat 	25 g	225 mL pre-warmed BPW ISO	41.5	10 - 24	20



Protocol 7: • Primary production (fecal)	1 boot sock	100 mL Tetrathionate broth	37	22 - 24	20
	25 g	225 mL Tetrathionate broth			
Protocol 8: • Infant formula, infant cereals, dairy powders without probiotics ^(b)	375 g	3375 mL pre-warmed BPW ISO	37	20 - 26	20
Protocol 9: • Infant formula, infant cereals, dairy powders with probiotics ^(b)	375 g	3375 mL pre-warmed BPW ISO + vancomycin (10 mg/L)	37	20 - 26	20

(a) Volume of sample transferred to Lysis Solution tubes. Refer to Step 4.7 of **Lysis** section.

(b) For large sample sizes of powders and cereals, add the sample slowly to the liquid with frequent mixing to avoid clumps.

NOTES:

- Samples larger than 25 g have not been tested except in protocol 8 and 9 in the NF VALIDATION study.
- The short protocols of detection are sensitive to conditions of incubation. It is required to follow the conditions of temperature indicated in the technical specification. User must verify that pre-warming of the enrichment broth reaches the temperature required prior to incubation. The time of preparation of the samples, delay between the end of the step of pre-warming of the enrichment broth and the beginning of the step of incubation of the food sample, should not exceed 45 minutes. Using a ventilated incubator for incubation is recommended.
- **For transfer of sample from Tetrathionate (TT) Broth enrichments to Neogen Lysis Tube, do not vortex TT enrichment or pipette from the bottom of enrichment tube to avoid transfer of any precipitate. Transferring of precipitate can lead to invalid results.**
- The recommended protocol interruption points are after enrichment or after sample lysis. Enrichment broth or sample lysate can be stored at 2-8°C for up to 72 hours. After removing the enrichment broth from storage, resume testing from Step 1 in the **Lysis** section. After removing the sample lysate from storage, resume testing from Step 8 in the **Lysis** section.

Preparation of the Neogen® Molecular Detection Speed Loader Tray

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

Preparation of the Neogen® Molecular Detection Chill Block Insert

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

Preparation of the Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert

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

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

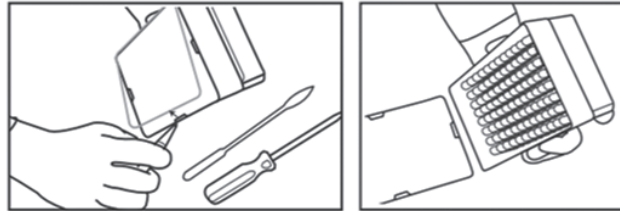
Preparation of the Neogen® Molecular Detection Instrument

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

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

Lysis

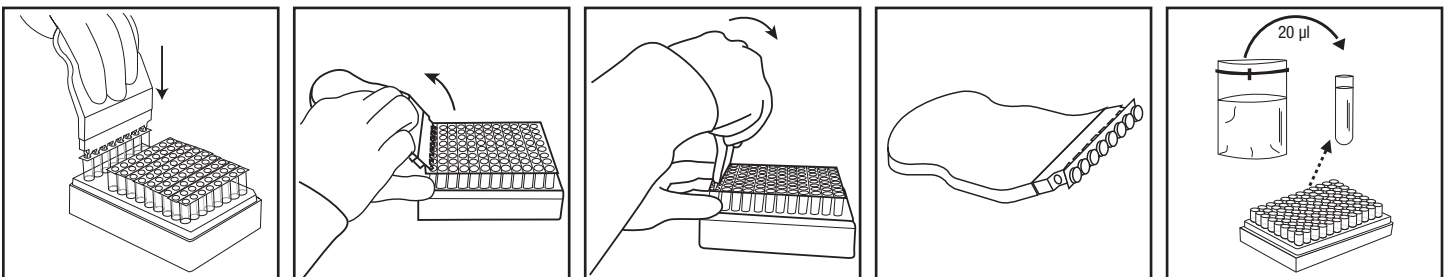
Remove the bottom of Neogen Lysis Solution Rack with a screwdriver or spatula before placing in in the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert.



1. Allow the 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 ± 1°C.
2. Invert the capped tubes to mix. Proceed to next step within 4 hours.
3. Remove the enrichment broth from the incubator.
4. One Neogen Lysis Solution tube is required for each sample and 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 sample to Neogen Lysis Solution tubes as described below:

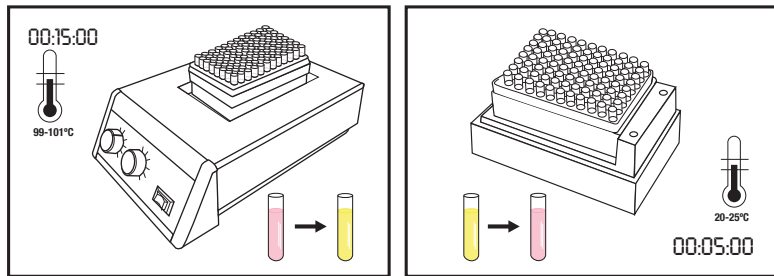
Transfer each enriched sample into an individual Neogen Lysis Solution tube **first**. Transfer the NC **last**.

- 4.4 Use the Neogen® Molecular Detection Cap/Decap Tool-Lysis to decap one Neogen Lysis Solution tube strip - one strip at a time.
- 4.5 Discard the Neogen Lysis Solution tube cap – If lysate will be retained for retest, place the caps into a clean container for re-application after lysis.
 - 4.5.1 For processing of retained lysate, see Appendix A.
- 4.6 Agitate the enrichment bag before collecting the sample from the filtered side when working with viscous samples.
- 4.7 Transfer 20 µL of sample into a Neogen Lysis Solution tube unless otherwise indicated in the protocol table (example protocol 5 and secondary enrichment in RVS or when using environmental samples with neutralizing buffer).



5. Repeat step 4.4 to 4.7 until each individual sample has been added to a corresponding Neogen Lysis Solution tube in the strip.

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

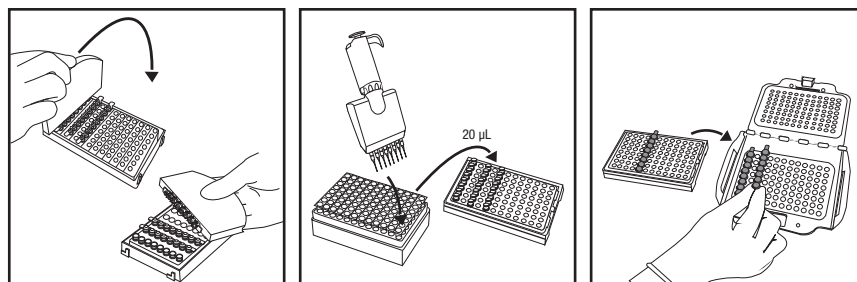


Amplification

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

Transfer each sample lysate into individual 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 - *Salmonella* Reagent Tube – one tube strip at a time. Discard cap.
 - 5.1 **Transfer 20 μL of sample lysate from the upper 1/2 of the liquid (avoid precipitate) in the Neogen Lysis Solution tube into corresponding Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Salmonella* 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 - *Salmonella* Reagent Tube in the strip.
 - 5.3 Cover the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Salmonella* Reagent Tubes with the provided extra caps and use the rounded side of the Neogen Molecular Detection Cap/Decap Tool-Reagent to apply pressure in a back and forth motion ensuring that the cap is tightly applied.
 - 5.4 Repeat steps 5.1 to 5.3 as needed, for the number of samples to be tested.
 - 5.5 When all sample lysates have been transferred, repeat steps 5.1 and 5.3 to transfer 20 μL of NC lysate into a Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Salmonella* 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 Software.
8. Click the Start button in the software and select instrument for use. The selected instrument's lid automatically opens.
9. Place the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray into the Neogen Molecular Detection Instrument and close the lid to start the assay. Results are provided within 60 minutes, although positives may be detected sooner.
10. After the assay is complete, remove the Neogen Molecular Detection Speed Loader Tray from the Neogen Molecular Detection Instrument and dispose of the tubes by soaking in a 1-5% (v:v in water) household bleach solution for 1 hour and away from the assay preparation area.

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






Results and Interpretation

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

Presumptive positive 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 Neogen BPW ISO enrichment to secondary enrichment broth(s), 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 - *Salmonella* 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.

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

In the context of the NF VALIDATION, all samples identified as positive by the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Salmonella* must be confirmed by one of the following tests:

Option 1: Using the ISO 6579⁽³⁾ standard starting from the buffered peptone water⁽³⁾ enrichment.

Option 2: Implementing a confirmation method consisting of the following: Transfer 0.1 mL of the BPW ISO⁽³⁾ enrichment or Tetra Thionate broth enrichments (primary production samples) into 10 mL of RVS broth. Incubate for 24 ± 3 hours at 41.5°C. Streak onto Xylose Lysine Deoxycholate (XLD)⁽³⁾ agar or onto a chromogenic agar specific for *Salmonella*. Perform a latex agglutination using Oxoid *Salmonella* latex test directly on isolated colonies.

Option 3: Using nucleic acid probes as described in the EN ISO 7218⁽⁵⁾ standard, performed on isolated colonies, from XLD or chromogenic agar (see Options 1 or 2). This test must not be performed using the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Salmonella*.

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

In the event of discordant results (presumptive positive with the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Salmonella*, non-confirmed by one of the means described above, and in particular for the latex agglutination test), 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** section, 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 Analytical Manual. Chapter 5: *Salmonella*., Section C-24. November 2018 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 4.10. Isolation and identification of *Salmonella* from meat, poultry, pasteurized egg, and siluriformes (fish) products and carcass and environmental sponges. Effective Date: 2 January 2019.
3. ISO 6579-1. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 18593. Microbiology of the food chain – Horizontal methods for surface sampling.
8. US Food and Drug Administration – *Bacteriological Analytical Manual*, Medium M111: Nonfat Dry Milk (Reconstituted). January 2011.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain - part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
10. ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
11. ISO 6887-2:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products.
12. ISO 6887-3:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products.
13. ISO 6887-4:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
14. ISO 6887-5:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
15. ISO 6887-6:2013. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage.

Explanation of Symbols

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.

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

Neogen Ireland, Ltd.

Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland



Neogen Corporation

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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00869A

Instructions relatives au produit

Kit de détection moléculaire *Salmonella* Neogen® version 2

Description et utilisation du produit

Le Kit de détection moléculaire *Salmonella* Neogen® version 2 est utilisé avec le système de détection moléculaire Neogen® pour la détection rapide et spécifique après enrichissement des *Salmonella* dans des aliments enrichis, des aliments pour animaux et des échantillons environnementaux d'aliments transformés.

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'analyse. 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 *Salmonella* 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 de produits pharmaceutiques, cosmétiques, cliniques ou vétérinaires. Le Kit de détection moléculaire *Salmonella* Neogen version 2 n'a pas été évalué en utilisant tous les produits et processus de transformation alimentaire, tous les protocoles de test ou toutes les souches bactériennes possibles.

Comme avec toutes les méthodes de test, la source, la formulation et la qualité du milieu d'enrichissement peuvent influencer les résultats. Des facteurs tels que les méthodes d'échantillonnage, les protocoles de test, la préparation des échantillons, 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 alimentaires et microbiennes déterminés pour répondre aux critères de l'utilisateur.

Neogen a évalué le Kit de détection moléculaire *Salmonella* Neogen version 2 avec eau peptonée tamponnée ISO.

L'instrument de détection moléculaire Neogen® est conçu pour être utilisé avec des échantillons traités thermiquement pendant l'étape de lyse de l'analyse, 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 *Salmonella* Neogen version 2 contient 96 tests, décrits dans le tableau 1.

Tableau 1. Composants du Kit de détection moléculaire Neogen

Élément	Identification	Quantité	Table des matières	Commentaires
Solution de lyse (LS) Neogen®	Solution rose en tubes transparents	96 (12 barrettes de 8 tubes)	580 µL de LS par tube	Placé sur portoir et prêt à l'emploi
Tubes de réactif du Kit de détection moléculaire <i>Salmonella</i> Neogen® version 2	Tubes verts	96 (12 barrettes de 8 tubes)	Mélange spécifique lyophilisé pour l'amplification et la détection	Prêts à l'emploi
Bouchons supplémentaires	Bouchons verts	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)	DNA témoin lyophilisé, mélange pour l'amplification et la détection	Prêts à l'emploi

Le témoin négatif (NC), non fourni dans le kit, est un milieu d'enrichissement stérile, par exemple BPW ISO. Ne pas utiliser d'eau comme NC.

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 *Salmonella* 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 *Salmonella* Neogen version 2 pour diagnostiquer des pathologies chez les humains ou les animaux.

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

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

- Se conformer au protocole et effectuer les tests en suivant exactement les instructions relatives au produit.
- Conserver le Kit de détection moléculaire *Salmonella* Neogen version 2 conformément aux indications sur l'emballage et aux instructions relatives au produit.
- Toujours utiliser le Kit de détection moléculaire *Salmonella* Neogen version 2 avant la date de péremption.
- Utiliser le Kit de détection moléculaire *Salmonella* Neogen version 2 avec les échantillons d'aliments, d'aliments pour animaux et des échantillons environnementaux de transformation alimentaire qui ont été validés en interne ou par une tierce partie.
- N'utiliser le Kit de détection moléculaire *Salmonella* Neogen version 2 qu'avec 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 la manipulation 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 :

- Effectuer les analyses bactériologiques dans un laboratoire correctement équipé et sous la supervision de professionnels qualifiés. Les milieux d'enrichissement incubés et les équipements 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 biologie moléculaire, stériles et munies d'embouts à filtre.
- Utiliser une nouvelle pipette pour chaque transfert d'échantillon.
- Utiliser les bonnes pratiques de laboratoire pour transférer l'échantillon de l'enrichissement vers le tube de lyse. Pour éviter toute contamination des pipettes, l'utilisateur peut choisir d'ajouter une étape de transfert intermédiaire. Par exemple, l'utilisateur peut transférer chaque échantillon enrichi dans un tube stérile.
- Utiliser un poste de travail de biologie moléculaire disposant si possible d'une lampe germicide. Décontaminer régulièrement les plans de travail et le matériel du laboratoire (pipettes, outils d'ouverture/de fermeture, etc.) avec une solution de 1-5 % d'eau de Javel (v:v dans de l'eau) ou avec une solution pour l'élimination du DNA.

Afin de réduire les risques associés à un faux positif :

- Ne jamais ouvrir les tubes après amplification.
- Toujours éliminer les tubes contaminés en les faisant tremper dans une solution d'eau de Javel à 1-5 % (v:v dans l'eau) 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 www.neogen.com pour obtenir davantage d'informations ou contacter votre représentant ou distributeur Neogen.

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

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

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

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

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 *Salmonella* 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. Tout défaut supposé du produit devra être notifié à Neogen dans un délai de soixante jours et le produit renvoyé au fournisseur. 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 *Salmonella* 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 *Salmonella* 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 *Salmonella* 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 1-5 % d'eau de Javel (v:v dans de l'eau) ou avec une solution pour l'élimination du DNA.

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

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

Voir le tableau 3 pour les protocoles d'enrichissement selon l'AOAC® *Official Method of Analysis*SM 2016.01 et l'AOAC® *Performance Tested*SM Certificat n° 091501.

Voir le tableau 4 pour les protocoles d'enrichissement selon la méthode de certification NF VALIDATION 3M 01/16-11/16.

Enrichissement de l'échantillon

Les tableaux 2, 3 et 4 fournissent des indications pour les protocoles généraux d'enrichissement des échantillons d'aliments, d'aliments pour animaux 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. Préchauffer le milieu d'enrichissement BPW ISO pour l'amener à une température de $41,5 \pm 1$ °C selon les matrices testées. Voir les tableaux 2, 3 ou 4.
2. Mélanger de manière aseptique le milieu d'enrichissement et l'échantillon.
3. Homogénéiser soigneusement par homogénéisation mécanique, homogénéisation péristaltique ou mélange manuel pendant $2 \pm 0,2$ minutes ou jusqu'à dissolution complète des agrégats et homogénéité de la suspension d'enrichissement⁽¹⁰⁻¹⁵⁾.
 - a. Pour tous les échantillons de viande et à forte teneur en particules, il est recommandé d'utiliser des sacs avec filtre.
 - b. Pour les matrices qui gonflent dans l'eau et très visqueuses (p. ex., les céréales, les féculents), il est suggéré de procéder à des dilutions supplémentaires (> 1:10) jusqu'à réduction convenable de la viscosité ou d'ajouter de l'alpha-amylase stérile à 1 % (w/v) à la BPW (ISO)⁽¹⁰⁻¹³⁾.
 - c. Pour les échantillons de lait en poudre et de céréales de grande taille, ajouter lentement l'échantillon au liquide en mélangeant fréquemment pour éviter les grumeaux.
4. Incuber comme précisé sur le tableau du protocole approprié (voir les tableaux 2, 3 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 Lethee. Il est recommandé de désinfecter la zone après l'échantillonnage.

AVERTISSEMENT : si vous choisissez d'utiliser un tampon neutralisant 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 libérer du produit contaminé. Une autre option consiste à transférer 10 µL de l'enrichissement du tampon neutralisant dans les tubes de solution de lyse Neogen.

La taille minimale recommandée pour la zone d'échantillonnage destinée à vérifier l'absence ou la présence du pathogène à la surface est de 100 cm² (10 cm x 10 cm ou 4 po x 4 po). Lors de l'échantillonnage avec une éponge, couvrez toutes la zone dans les deux directions (de gauche à droite puis de haut en bas) ou prélevez des échantillons environnementaux en suivant votre protocole d'échantillonnage actuel ou selon les directives de la FDA BAM⁽¹⁾, USDA FSIS MLG⁽²⁾ ou ISO 18593:2018⁽⁷⁾.

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.

1. Préchauffer le milieu d'enrichissement BPW ISO à 41,5 ± 1 °C selon les matrices testées. Voir les tableaux 2, 3 ou 4.
2. Mélanger de manière aseptique le milieu d'enrichissement et l'échantillon. Homogénéiser soigneusement par homogénéisation mécanique, homogénéisation péristaltique ou mélange manuel pendant 2 ± 0,2 minutes. Incuber comme précisé sur le tableau du protocole approprié. Voir les tableaux 2, 3 ou 4.

Tableau 2. Protocoles d'enrichissement généraux.

Matrice de l'échantillon	Taille de l'échantillon	Volume du bouillon d'enrichissement	Température d'enrichissement (± 1 °C)	Durée d'enrichissement (h)	Volume d'échantillon d'analyse (µL) ^(a)
Protocole 1 Produits alimentaires transformés (à l'exception des poudres d'œuf et des produits spécifiés dans d'autres protocoles) ^(b)	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18-26	20
Protocole 2 Aliments crus et non transformés, poudres d'œufs, aliments pour animaux et échantillons environnementaux ^(c)	25 g	225 mL de BPW ISO (préchauffée)	41,5	18-26	20
Protocole 3 Produits laitiers en poudre (dont le lait maternisé et le lait maternisé à base de soja)	25 g	225 mL de BPW ISO	37	20-26	20
Protocole 4 Produits à base de cacao (en poudre, chocolats, confiseries, etc.)	25 g	225 mL de lait écrémé en poudre stérile à 100 g/L avec 0,002 % de coloration vert vif ^(d,e,f)	37	24-30	20
Protocole 5 Autres, dont : épices, herbes aromatiques, concentrés, thé et café instantanés, bouillon en cube	25 g	235 mL 2X BPW ISO avec 0,5 % K ₂ SO ₃ + 240 mL de lait écrémé en poudre stérile à 100 g/L ^(d,g,h)	37	24-30	10
Protocole 6 Noix ou mélanges de fruits à coque contenant des noix (ce protocole s'applique aux autres fruits à coque, y compris aux noix de pécan, amandes, pistaches, noix de cajou, châtaignes, noix macadamia, noix du Brésil, graine de soja et cacahuète)	25 g	225 mL de lait écrémé en poudre stérile à 100 g/L ^(d)	37	18-24	20

(a) Volume d'échantillon transféré dans les tubes de solution de lyse. Consulter l'étape 4.7 de la section Lyse.

(b) Exemples de produits à tester avec le protocole 1 : repas préparés, salades préparées, crème pâtissière.

(c) Exemples de produits à tester avec le protocole 2 : viandes crues, légumes surgelés, tous les fromages, lait fermenté, salade crue (laitue, batavia).

(d) Le lait écrémé UHT peut remplacer le lait écrémé en poudre.

- (e) 0,45 mL de coloration aqueuse vert vif à 1 % pour 225 mL de lait écrémé, pour obtenir une concentration de 0,002 % (0,02 g/L) de coloration vert vif.
- (f) Pour préparer le lait écrémé en poudre stérile, réaliser une suspension de 100 g de lait écrémé en poudre déshydraté dans 1 L d'eau distillée ou purifiée. Agiter jusqu'à dissolution. Passer à l'autoclave pendant 15 minutes à 121 °C. Conserver entre 2 et 30 °C⁽⁸⁾.
- (g) 5 g de K₂SO₃ pour 1 000 mL de BPW ISO, pour obtenir une concentration finale de 0,5 % K₂SO₃.
- (h) 240 mL de lait écrémé en poudre stérile à 100 g/L ajouté à 235 mL 2X de BPW ISO stérilisée avec 0,5 % K₂SO₃.

Si une deuxième étape d'enrichissement facultative est utilisée, par exemple du milieu Rappaport Vassiliadis, il est nécessaire d'effectuer une dilution 1:2 (1 volume d'enrichissement de l'échantillon dans 1 volume de bouillon d'enrichissement stérile) ou de transférer simplement 10 µL de l'enrichissement secondaire dans les tubes de solution de lyse Neogen. Si du bouillon de tétrathionate (TT) est utilisé, transférer 20 µL de l'enrichissement secondaire dans des tubes de solution de lyse Neogen et ne pas passer au vortex l'enrichissement TT et ne pas pipeter au fond du tube d'enrichissement pour éviter de transférer le précipité.

Instructions spécifiques pour méthodes validées

AOAC® *Official Methods of Analysis*SM 2016.01

AOAC® *Performance Tested*SM certificat n°091501



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

Tableau 3. Protocoles d'enrichissement selon l'étude OMASM 2016.01 de l'AOAC et le certificat PTMSM de l'AOAC n° 091501. Le volume d'échantillon transféré dans les tubes de solution de lyse Neogen est de 20 µL.

Matrice de l'échantillon	Taille de l'échantillon	Volume du bouillon d'enrichissement	Température d'enrichissement (± 1 °C)	Durée d'enrichissement (h)
Bœuf cru haché	25 g	225 mL de BPW ISO (préchauffée)	41,5	10-24
	325 g	975 mL de BPW ISO (préchauffée)		
Poulet cru haché	25 g	225 mL de BPW ISO (préchauffée)	41,5	10-24
	325 g	975 mL de BPW ISO (préchauffée)	41,5	14-24
Poulet pané cuit	325 g	2 925 mL de BPW ISO	37	18-24
Aliments secs pour chien	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18-24
	375 g	1 500 mL de BPW ISO		
Poivre noir, crevette entière crue, épinard cru en sachet, fromage américain transformé pasteurisé	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18-24
Rinçage de carcasse de poulet	30 mL	30 mL de BPW ISO (préchauffée)	41,5	18-24
Éponge passée sur une carcasse de poulet	1 éponge	50 mL de BPW ISO (préchauffée)	41,5	18-24
Lait écrémé en poudre instantané	25 g	225 mL de BPW ISO	37	20-24



Poudre de cacao	25 g	225 mL de BPW ISO	37	24-28	
Œuf entier liquide pasteurisé	100 mL	900 mL de BPW ISO	37	18-24	
Eau d'irrigation de chou utilisé	375 mL	3 375 mL de BPW ISO	37	18-24	
Beurre de cacahuète crémeux	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18-24	
	375 g	3 375 mL de BPW ISO			
Fleur de cannabis séchée, fleur de chanvre séchée ⁽⁴⁾	10 g	90 BPW-ISO	41.5	28-32	
Environnemental	Béton verni	1 éponge	225 mL de BPW ISO (préchauffée)	41,5	18-24
	Acier inoxydable	1 tampon	10 mL de BPW ISO (préchauffée)	41,5	18-24
	Carreau de céramique verni	1 éponge	50 mL de BPW ISO (préchauffée)	41,5	18-24

Matrice de l'échantillon	Taille de l'échantillon	Volume du bouillon d'enrichissement	Température d'enrichissement (± 1 °C)	Durée d'enrichissement (h)	Milieu d'enrichissement secondaire (mL)	Température de l'enrichissement secondaire (± 1 °C)	Durée d'enrichissement secondaire (h)
Crevette crue, avec la tête	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18-24	R-V R10 : 0,1 mL dans 10 mL ^(a)	41,5	4-24

(a) Transférer 10 μ L d'échantillon enrichi dans des tubes de solution de lyse. Consulter l'étape 4.7 de la section Lyse.

MÉTHODE CERTIFIÉE PAR AFNOR CERTIFICATION



3M 01/16 -11/16 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⁽⁷⁾ par rapport à la norme ISO 6579⁽³⁾.

Portée de la validation : tous les produits alimentaires destinés aux humains, les échantillons environnementaux de production (dont les échantillons de production primaire), les aliments pour animaux domestiques et d'élevage, par dosage de validation sur de nombreux aliments.

Préparation de l'échantillon : les échantillons doivent être préparés conformément aux normes EN ISO 6579⁽³⁾ et EN ISO 6887⁽¹⁰⁻¹⁵⁾.

Version de logiciel : voir le certificat.

Tableau 4. Protocoles d'enrichissement selon la méthode de certification NF VALIDATION 3M 01/16-11/16.

Protocole	Taille de l'échantillon	Volume du bouillon d'enrichissement	Température d'enrichissement (+1 °C)	Durée d'enrichissement (h)	Volume d'échantillon d'analyse (µL) ^(a)
Protocole 1 : <ul style="list-style-type: none"> • Nombreux produits alimentaires transformés (à l'exception de la poudre d'œuf, des fruits et légumes transformés et des produits indiqués dans les autres protocoles) • Tous les produits de poisson et de fruits de mer crus • Aliments pour animaux domestiques et d'élevage • Production primaire (non fécale) 	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18-26	20
Protocole 2 : <ul style="list-style-type: none"> • Nombreux aliments crus et non transformés (à l'exception des poissons crus et des fruits de mer crus, et des produits indiqués dans les autres protocoles) • Poudre d'œuf • Tous les fruits et légumes • Échantillons environnementaux de la production alimentaire 	25 g ou 1 lingette ou 1 tampon	225 mL de BPW ISO préchauffée	41,5	18-26	20
Protocole 3 : <ul style="list-style-type: none"> • Produits laitiers en poudre 	25 g	225 mL de BPW ISO	37	20-26	20
Protocole 4 : <ul style="list-style-type: none"> • Produits à base de cacao contenant plus de 20 % de cacao 	25 g	225 mL de lait écrémé UHT + 0,002 % de vert vif	37	24-30	20
Protocole 5 : <ul style="list-style-type: none"> • Épices, herbes aromatiques, concentrés, thés, cafés, préparations culinaires 	25 g	235 mL de 2 x BPW ISO + K ₂ SO ₃ 0,5 % + 240 mL de lait écrémé UHT	37	24-30	10
Protocole 6 : <ul style="list-style-type: none"> • Viande crue 	25 g	225 mL de BPW ISO préchauffée	41,5	10-24	20
Protocole 7 : <ul style="list-style-type: none"> • Production primaire (fécale) 	1 pédisac	100 mL en bouillon de tétrathionate	37	22-24	20
	25 g	225 mL de bouillon de tétrathionate			
Protocole 8 : <ul style="list-style-type: none"> • Préparations pour nourrissons, céréales pour nourrissons, lait en poudre sans probiotiques^(b) 	375 g	3375 mL de BPW ISO préchauffée	37	20-26	20



Protocole 9 : • Préparations pour nourrissons, céréales pour nourrissons, lait en poudre avec probiotiques ^(b)	375 g	3375 mL de BPW ISO préchauffée + vancomycine (10 mg/L)	37	20-26	20
---	-------	--	----	-------	----

- (a) Volume d'échantillon transféré dans les tubes de solution de lyse. Consulter l'étape 4.7 de la section **Lyse**.
- (b) Pour les échantillons de poudres et de céréales de plus grande taille, ajouter lentement l'échantillon au liquide en mélangeant fréquemment pour éviter les grumeaux.

REMARQUES :

- Les échantillons supérieurs à 25 g n'ont pas été analysés dans le cadre de l'étude NF VALIDATION sauf dans le protocole 8 et 9.
- Les protocoles de détection courts sont sensibles aux conditions d'incubation. Il est nécessaire de suivre les conditions de température indiquées dans les caractéristiques techniques. L'utilisateur doit vérifier que le préchauffage du bouillon d'enrichissement atteint la température requise avant l'incubation. La durée de préparation des échantillons, le délai entre la fin de l'étape de préchauffage du bouillon d'enrichissement et le début de l'étape d'incubation de l'échantillon alimentaire ne doivent pas dépasser 45 minutes. Il est recommandé d'utiliser un incubateur ventilé durant l'incubation.
- **Pour transférer l'échantillon des enrichissements du bouillon de tétrathionate (TT) vers des tubes de lyse Neogen, ne passer pas au vortex l'enrichissement TT et ne pas pipeter au fond du tube d'enrichissement pour éviter de transférer le précipitat. Le transfert du précipitat peut entraîner des résultats non valides.**
- Les points d'interruption du protocole recommandés se situent après l'enrichissement ou après la lyse de l'échantillon. Le bouillon d'enrichissement ou le lysat de l'échantillon peut être conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant une durée maximale de 72 heures. Après avoir retiré le bouillon d'enrichissement de son lieu de conservation, reprendre l'analyse à partir de l'étape 1 de la section **Lyse**. Après avoir retiré le lysat de l'échantillon de son lieu de conservation, reprendre l'analyse à partir de l'étape 8 de la section **Lyse**.

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

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

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

Poser le support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen® sur le plan de travail du laboratoire. Utiliser le bloc refroidissant à la température ambiante du laboratoire (20 et 25 °C).

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

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

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

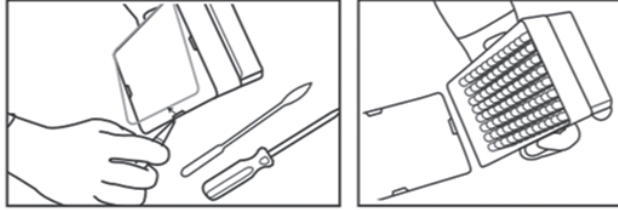
Préparation de l'instrument de détection moléculaire Neogen®

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

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

Lyse

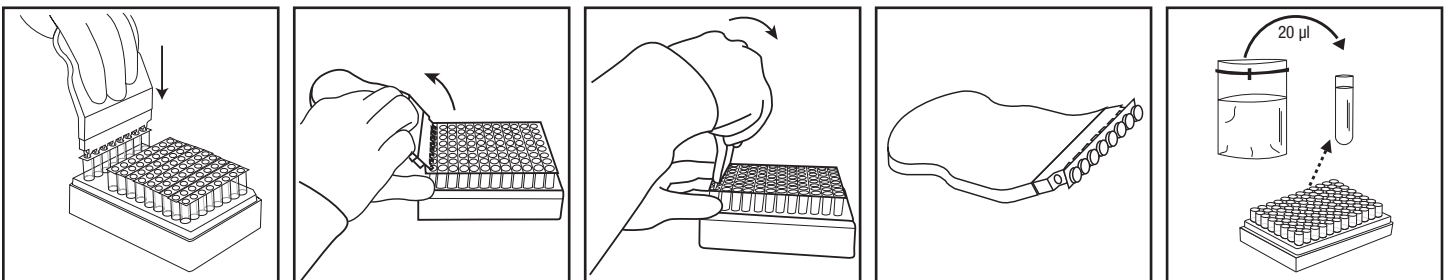
Retirer le portoir pour tubes de solution de lyse Neogen avec un tournevis ou une spatule avant de le placer dans le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen.



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 ± 1 °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 l'échantillon 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 l'échantillon enrichi dans les tubes de solution de lyse Neogen comme indiqué ci-dessous :

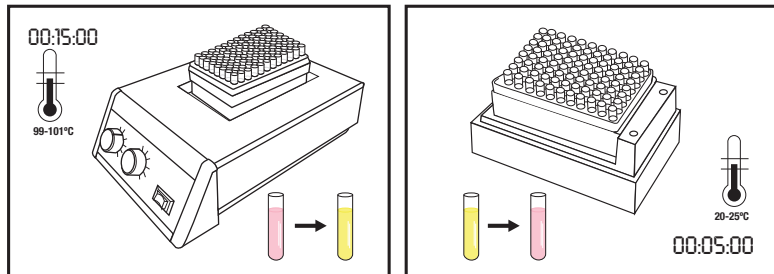
Transférer tout **d'abord** chaque échantillon enrichi dans des tubes de solution de lyse Neogen individuels.
Transférer le NC en **dernier**.

- 4.4 Ouvrir les barrettes de tubes de solution de lyse Neogen une à une à l'aide de l'outil d'ouverture/fermeture pour système de détection moléculaire Neogen® - Lyse.
- 4.5 Jeter le bouchon du tube de solution de lyse Neogen. Si le lysat doit être soumis à un nouveau test, placer les bouchons dans un récipient propre pour réapplication après la lyse.
 - 4.5.1 Pour le traitement du lysat conservé, voir l'annexe A.
- 4.6 Agiter la poche d'enrichissement avant de recueillir l'échantillon à partir du côté filtré lors du travail avec des échantillons visqueux.
- 4.7 Transférer 20 µL d'échantillon dans un tube de solution de lyse Neogen, sauf indication contraire dans le tableau du protocole (exemple : protocole 5 et enrichissement secondaire dans de la RVS ou, lors de l'utilisation d'échantillons environnementaux, avec du tampon neutralisant).



5. Répéter les étapes 4.4 et 4.7 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. BPW) 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. Utilisé à température ambiante, le support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen 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.



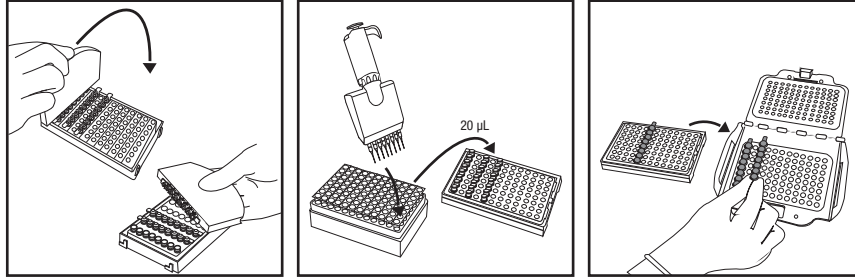
Amplification

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 5: *Salmonella*., Section C-24. November 2018 Version.
 - 1.1 Les barrettes de tubes peuvent être coupées de manière à obtenir le nombre de tubes souhaité. Sélectionner le nombre de tubes de réactif du Kit de détection moléculaire *Salmonella* Neogen version 2 ou de barrettes de 8 tubes nécessaire.
 - 1.2 Placer les tubes de réactif dans un portoir vide.
 - 1.3 Éviter d'agiter les pastilles réactives se trouvant au fond des tubes.
2. Sélectionner un tube de contrôle de réactif et le placer dans le portoir.
3. Pour éviter toute contamination croisée, ouvrir une barrette de tubes de réactif à la fois et utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque étape de transfert.
4. Transférer chaque lysat dans un tube de réactif du Kit de détection moléculaire *Salmonella* Neogen version 2 et dans un tube de contrôle de réactif Neogen comme décrit ci-dessous :

Transférer chaque lysat d'échantillon dans des tubes de réactif individuels **en premier**, puis dans le NC. Hydrater le tube de contrôle de réactif Neogen **en dernier**.

5. Ouvrir les tubes de réactif du Kit de détection moléculaire *Salmonella* Neogen version 2 un à un à l'aide de l'outil d'ouverture/fermeture pour système de détection moléculaire Neogen® - Réactif. Jeter le bouchon.
 - 5.1 **Transférer 20 µL de lysat d'échantillon prélevé au niveau de la moitié supérieure du liquide (éviter le précipité) dans le tube de solution de lyse Neogen du Kit de détection moléculaire *Salmonella* Neogen version 2. Incliner la pipette pour ne pas agiter les pastilles. Mélanger en effectuant 5 cycles d'aspiration/de refoulement avec la pipette.**
 - 5.2 Répéter l'étape 5.1 jusqu'à ce que chaque lysat d'échantillon individuel ait été ajouté au tube de réactif du Kit de détection moléculaire *Salmonella* Neogen version 2 correspondant dans la barrette.
 - 5.3 Placer la capsule supplémentaire prévue à cet effet sur les tubes de réactif du Kit de détection moléculaire *Salmonella* 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 la capsule est fermement insérée sur le tube.
 - 5.4 Répéter les étapes 5.1 à 5.3 pour tous les échantillons à analyser.
 - 5.5 Lorsque tous les lysats d'échantillons ont été transférés, répéter les étapes 5.1 et 5.3 afin de transférer 20 µL de lysat de NC dans un tube de réactif du Kit de détection moléculaire *Salmonella* 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 agiter les pastilles. Mélanger en effectuant 5 cycles d'aspiration/de refoulement avec la pipette.

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



7. Examiner et confirmer l'analyse configurée sur le logiciel 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'analyse. Les résultats sont obtenus en 60 minutes ; toutefois, les résultats positifs peuvent être détectés plus tôt.
10. Une fois l'analyse terminée, retirer le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen de l'instrument de détection moléculaire Neogen et tremper les tubes dans une solution d'eau de Javel à 1-5 % (v:v dans de l'eau) 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 du DNA amplifié. Ceci comprend les tubes de réactif du Kit de détection moléculaire *Salmonella* Neogen version 2, les tubes de contrôle de réactif Neogen, le réactif et les tubes de contrôle de matrice Neogen. Toujours éliminer les tubes de réactif fermés en les trempant dans une solution d'eau de Javel à 1-5 % (v:v dans de l'eau) pendant 1 heure, à l'écart de la zone de préparation des analyses.






Résultats et interprétation

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

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 inhibée pour le dosage. Un second test peut être nécessaire. Consultez la section de dépannage et les instructions relatives au produit du kit de détection pour obtenir plus de renseignements.
Échantillon		Inspection	La présence ou l'absence du pathogène cible est indéterminée. Un second test peut être nécessaire. Consultez 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. Consultez 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

Dans le cadre de la NF VALIDATION, tous les échantillons identifiés comme positifs par le Kit de détection moléculaire *Salmonella* Neogen version 2 doivent être confirmés par l'un des tests suivants :

Option 1 : utilisation de la norme ISO 6579⁽³⁾ en commençant par l'enrichissement en eau peptonée tamponnée⁽³⁾.

Option 2 : mise en place d'une méthode de confirmation consistant à effectuer les étapes suivantes : transférer 0,1 mL de l'enrichissement en BPW ISO⁽³⁾ ou l'enrichissement en bouillon au tétrathionate (échantillons de production primaires) dans 10 mL de bouillon RVS. Incuber pendant 24 ± 3 heures à 41,5 °C. Étaler en série sur de la gélose Xylose-Lysine-Désoxycholate (XLD)⁽³⁾ ou sur de la gélose chromogène spécifique à *Salmonella*. Effectuer une agglutination au latex à l'aide de l'Oxoid *Salmonella* Latex Test directement sur des colonies isolées.

Option 3 : utilisation de sondes nucléiques tel que décrit dans la norme EN ISO 7218⁽⁵⁾, à partir de colonies isolées provenant de gélose XLD ou chromogène (voir option 1 ou 2). Ce test ne doit pas être effectué à l'aide du Kit de détection moléculaire *Salmonella* Neogen version 2.

Option 4 : utilisation de n'importe quelle autre méthode de certification NF VALIDATION, dont le principe doit être différent du Kit de détection moléculaire *Salmonella* 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 le kit de détection moléculaire *Salmonella* Neogen version 2, non confirmé par l'un des moyens décrits ci-dessus, et en particulier pour le test d'agglutination au latex), 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 la section **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 Analytical Manual. Chapter 5: *Salmonella*., Section C-24. November 2018 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 4.10. Isolation and identification of *Salmonella* from meat, poultry, pasteurized egg, and siluriformes (fish) products and carcass and environmental sponges. Date d'entrée en vigueur : 2 janvier 2019.
3. ISO 6579-1. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. Contacter un représentant de Neogen Sécurité Alimentaire pour obtenir un exemplaire de ce document.
7. ISO 18593. Microbiology of the food chain – Horizontal methods for surface sampling.
8. US Food and Drug Administration – *Bacteriological Analytical Manual*, Medium M111: Nonfat Dry Milk (Reconstituted). January 2011.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain - part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
10. ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
11. ISO 6887-2:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products.
12. ISO 6887-3:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products.
13. ISO 6887-4:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
14. ISO 6887-5:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
15. ISO 6887-6:2013. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage.

Explication des symboles

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.

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

Neogen Ireland, Ltd.

Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland



Neogen Corporation

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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00869A

Gebrauchsanweisungen

Neogen® Molekulare Detektion 2 - *Salmonellen* Nachweis

Produktbeschreibung und Verwendungszweck

Der Neogen® Molekulare Detektion 2 – *Salmonellen* Nachweis wird in Verbindung mit dem Neogen® Molekularen Detektionssystem für den schnellen und spezifischen Nachweis von *Salmonellen* in angereicherten Proben aus Lebens- und Futtermitteln sowie Umgebungen der Lebensmittelverarbeitung verwendet.

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

Wie bei allen Testverfahren können die Ergebnisse durch die Quelle, Zusammensetzung und Qualität des Anreicherungsmediums beeinflusst werden. Faktoren wie Probennahme, Testprotokolle, Probenaufbereitung, 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 – *Salmonellen* Nachweis evaluiert mit gepuffertem Peptonwasser (BPW) ISO.

Das Neogen® Molekulare Detektion – Gerät ist für die Verwendung mit Proben bestimmt, die während der Assay-Lyse wärmebehandelt wurden, wodurch die in der Probe vorhandenen Organismen zerstört werden sollen. Proben, die während der Lyse nicht ordnungsgemäß wärmebehandelt wurden, stellen möglicherweise ein biologisches Risiko dar und sollten NICHT in das Neogen 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 – *Salmonellen* Nachweis enthält 96 Testverfahren, die in Tabelle 1 beschrieben werden.

Tabelle 1. Komponenten des Neogen Molekularen Detektionsnachweises

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

Die Negativkontrolle (NC), nicht im Kit enthalten, ist ein steriles Anreicherungsmedium, z. B. BPW ISO. Als NC kein Wasser verwenden.

Sicherheit

Der Anwender muss sämtliche in der Gebrauchsanleitung des Neogen Molekularen Detektionssystems und des Neogen Molekularen Detektion 2 – *Salmonellen Nachweises* 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 – *Salmonellen Nachweis* nicht zur Diagnose von Erkrankungen bei Menschen oder Tieren einsetzen.

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 Molekularen Detektion 2 – *Salmonellen Nachweis* wie auf der Packung und in der Gebrauchsanweisung beschrieben.
- Verwenden Sie den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Salmonellen Nachweis* stets vor Ablauf des Verfalldatums.
- Verwenden Sie den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Salmonellen Nachweis* mit Lebensmittel-, Futter- und Lebensmittelverfahrensproben, die entweder intern oder von einem Dritten evaluiert worden sind.
- Verwenden Sie den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Salmonellen Nachweis* nur mit Oberflächen, Desinfektionsmitteln, Protokollen und Bakterienstämmen, 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 in die Neogen Lyselösungsgefäße übertragen. Neogen® Produkte zur Probenhandhabung, 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:

- 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 Industriestandards 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 des Reagenzpellets die Handschuhe.
- Es wird empfohlen, sterile, hochreine Pipettenspitzen mit Feuchtigkeitsschutz (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 Gefäße niemals nach der Amplifikation.
- Kontaminierte Gefäße immer aus dem Nachweis-Vorbereitungsbereich entfernen, in 1–5%iger (v:v in Wasser) Haushaltsbleichmittellösung für 1 Stunde 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 Probennahme, Testprotokoll, Probenaufbereitung, Handhabung, Labortechnik und die Probe selbst die Ergebnisse beeinflussen können.

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

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 Produkten von Neogen Food Safety erhaltenen Ergebnisse keine Garantie für die Qualität der untersuchten Matrizen oder Prozesse dar.

Als Unterstützung von Kunden bei der Validierung der Methode für verschiedene Lebensmittel-Matrizes 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 – *Salmonellen Nachweis* zu beeinträchtigen. Testen Sie mehrere für die Matrix repräsentative Proben, d. h. Proben unterschiedlicher Herkunft, während einer Validierungsphase, wenn die Methode von Neogen zum Einsatz kommt oder beim Testen neuer oder unbekannter Matrizen oder Matrizen, 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 Matrizen 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. Sie sind verpflichtet, Neogen umgehend innerhalb von sechzig Tagen, nachdem die mutmaßlichen Defekte am Produkt festgestellt wurden, darüber zu informieren und das Produkt an Neogen zurückzusenden. Bei weiteren Fragen wenden Sie sich bitte an den Neogen-Verkaufsvertreter 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 die Neogen Molekulare Detektion 2 – *Salmonellen Nachweis* bei 2–8 °C. Nicht einfrieren. Lichtgeschützt lagern. Vergewissern Sie sich nach dem Öffnen des Sets, dass der Folienbeutel unbeschädigt ist. Verwenden Sie das Set keinesfalls bei beschädigtem Beutel. Nach dem Öffnen sollten nicht verwendete Reagenzgefäße gemeinsam mit dem Trockenmittel stets im wiederverschließbaren Beutel verwahrt werden, um die Stabilität der lyophilisierten Reagenzien sicherzustellen. Wieder verschlossene Beutel können maximal 60 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden.

Verwenden Sie den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Salmonellen 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 Molekularen Detektion 2 – *Salmonellen 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.

Bedienungsanleitung

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

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

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

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

Für Anreicherungsprotokolle gemäß AOAC® *Official Method of Analysis*SM **2016.01** und AOAC® *Performance Tested*SM Zertifikat Nr. **091501** in Tabelle 3.

Für Anreicherungsprotokolle gemäß NF VALIDATION-Zertifikat **3M 01/16-11/16** in Tabelle 4.

Probenanreicherung

Tabelle 2, 3 oder 4 enthalten Richtlinien zu allgemeinen Anreicherungsprotokollen 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 Anreicherungsmedium BPW ISO, je nach getesteter Matrix, auf die Raumtemperatur des Labors oder $41,5 \pm 1$ °C aufwärmen. Siehe die Tabellen 2, 3 bzw. 4.
2. Vereinen Sie das Anreicherungsmedium und die Probe gemäß einem aseptischen Verfahren.
3. Homogenisieren Sie gründlich durch Verschneiden, Vermischung oder mischen von Hand für $2 \pm 0,2$ Minuten oder bis alle Klumpen vollständig aufgelöst und die Anreicherungssuspension homogen ist⁽¹⁰⁻¹⁵⁾.
 - a. Bei der Handhabung von Fleisch- und partikelreichen Proben wird die Verwendung von Filterbeuteln empfohlen.
 - b. Für Matrices, die in Wasser aufquellen und hochviskös sind (z. B. Zerealien, Stärken), wird empfohlen, weitere Verdünnungen vorzunehmen ($> 1:10$), bis die Viskosität ausreichend verringert ist, oder geben Sie sterile 1 %ige (w/v) Alpha-Amylase zum BPW (ISO)⁽¹⁰⁻¹³⁾.
 - c. Große Milchpulver- und Zerealien-Proben sollten unter regelmäßigem Rühren langsam zur Flüssigkeit gegeben werden, um eine Verklumpung zu vermeiden.
4. Inkubieren Sie wie in der entsprechenden Protokolltabelle beschrieben (siehe Tabellen 2, 3 oder 4).

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 Lethen-Bouillon handeln. Der Bereich muss nach der Probenahme desinfiziert werden.

WARNUNG: Sollten Sie einen Neutralisationspuffer 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 Lyselösungsgefäße übertragen.

Die empfohlene Größe des Probenbereichs, mit dem die Anwesenheit oder Abwesenheit des Pathogens auf der Oberfläche überprüft werden soll, liegt bei mindestens 100 cm² (10 cm x 10 cm oder 4" x 4"). Decken Sie bei der Probenahme 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 FDA BAM⁽¹⁾, USDA FSIS MLG⁽²⁾ oder ISO 18593:2018⁽⁷⁾ Richtlinien.

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

1. Anreicherungsmedium BPW ISO je nach getesteten Matrizen auf 41,5 ± 1 °C erwärmen. Siehe die Tabellen 2, 3 bzw. 4.
2. Vereinen Sie das Anreicherungsmedium und die Probe gemäß einem aseptischen Verfahren. Homogenisieren Sie gründlich durch Verschneiden, Vermischung oder mischen von Hand für 2 ± 0,2 Minuten. Inkubieren Sie wie in der entsprechenden Protokolltabelle beschrieben. Siehe die Tabellen 2, 3 bzw. 4.

Tabelle 2. Allgemeine Anreicherungsprotokolle.

Probenmatrix	Probengröße	Anreicherungsbouillonvolumen	Anreicherungstemperatur (±1 °C)	Anreicherungszeit (Stunden)	Probenanalysevolumen (µl) ^(a)
Protokoll 1 Verarbeitete Lebensmittelprodukte (außer Eipulver und Produkte, die in anderen Protokolle angegeben sind) ^(b)	25 g	225 ml BPW ISO	37	18–26	20
Protokoll 2 Roh und unverarbeitete Lebensmittel, Eipulver, Tiernahrung und Umgebungsproben ^(c)	25 g	225 ml BPW ISO (vorgewärmt)	41,5	18–26	20
Protokoll 3 Pulverisierte Milchprodukte (einschließlich Säuglingsnahrung, Säuglingsnahrung auf Sojabasis)	25 g	225 ml BPW ISO	37	20–26	20
Protokoll 4 Produkte auf Kakaobasis (Pulver, Schokolade, Süßwaren usw.)	25 g	225 ml sterile 100 g/l fettfreie Trockenmilch mit 0,002 % brillantgrünem Farbmittel ^(d,e,f)	37	24–30	20
Protokoll 5 Sonstige wie: Gewürze, aromatische Kräuter, Konzentrate, Instanttees und -kaffees, Bouillonwürfel	25 g	235 ml 2X BPW ISO mit 0,5 % K ₂ SO ₃ + 240 ml sterile 100 g/l fettfreie Trockenmilch ^(d,g,h)	37	24–30	10
Protokoll 6 Walnüsse oder Nussmischungen, die Walnüsse enthalten (dieses Protokoll ist auch für andere Nüsse wie Pekannüsse, Mandeln, Pistazien, Cashewnüsse, Esskastanien, Macadamianüsse, Paranüsse, Sojanüsse und Erdnüsse anwendbar)	25 g	225 ml sterile 100 g/l fettfreie Trockenmilch ^(d)	37	18–24	20

(a) Volumen der Probe, das in Lyselösungsgefäße übertragen wird. Siehe Schritt 4.7 im Abschnitt Lyse.

(b) Beispiele für Produkte, die mit Protokoll 1 getestet werden: Fertiggerichte, Feinkostsalate, Eiercreme.

(c) Beispiele für Produkte, die mit Protokoll 2 getestet werden: rohes Fleisch, gefrorenes Gemüse, alle Käsesorten, fermentierte Milch, roher Salat (Kopfsalat, Bataviasalat).

- (d) Fettfreie UHT-Milch kann durch fettfreie Trockenmilch ersetzt werden.
- (e) 0,45 ml 1 % wässrige brillantgrün Farbstofflösung pro 225 ml fettfreie Milch, was eine Endkonzentration von 0,002 % (0,02 g/l) brillantgrüner Farbe.
- (f) Um sterile, fettfreie Milch vorzubereiten, 100 g dehydrierte, fettfreie Trockenmilch in 1 l destilliertem oder gereinigtem Wasser lösen. Umrühren, bis alles aufgelöst ist. Bei 121 °C für 15 Minute autoklavieren. Bei 2–30 °C⁽⁸⁾ lagern.
- (g) 5 g K₂SO₃ pro 1000 ml BPW ISO, was zu einer Konzentration von 0,5 % K₂SO₃ führt.
- (h) 240 ml 100 g/l sterile, fettfreie Trockenmilch muss zu 235 ml sterilisierter 2X BPW ISO mit 0,5 % K₂SO₃ hinzugefügt werden.

Wird ein optionaler, sekundärer Anreicherungs-schritt eingesetzt, z. B. Rappaport Vassiliadis-Medium, muss eine 1:2-Verdünnung (1 Teil Probenanreicherung in 1 Teil sterile Anreicherungsbouillon) durchgeführt oder 10 µl sekundäre Anreicherung in die Neogen Lyselösungsgefäße übertragen werden. Wird Tetrathionat- (TT) Bouillon verwendet, übertragen Sie 20 µl der sekundären Anreicherung in die Neogen Lyselösungsgefäße und verwirbeln oder pipettieren Sie nicht aus dem unteren Bereich des Anreicherungsgefäßes, um die Übertragung von Ablagerungen zu vermeiden.

Spezifische Anweisungen für validierte Verfahren

AOAC® Official Methods of AnalysisSM 2016.01

AOAC® Performance TestedSM Zertifikat Nr. 091501



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

Tabelle 3. Anreicherungsprotokolle gemäß AOAC OMASM 2016.01 und AOAC PTMSM Zertifikat Nr. 091501. Volumen der Probe, das in Neogen Lyselösungsgefäße übertragen wird, beträgt 20 µl.

Probenmatrix	Probengröße	Anreicherungs- bouillonvolumen	Anreicherungstem- peratur (±1 °C)	Anreicherungszeit (Stunden)
Rohes Hackfleisch	25 g	225 ml BPW ISO (vorgewärmt)	41,5	10–24
	325 g	975 ml BPW ISO (vorgewärmt)		
Rohes Geflügelhackfleisch	25 g	225 ml BPW ISO (vorgewärmt)	41,5	10–24
	325 g	975 ml BPW ISO (vorgewärmt)	41,5	14–24
Paniertes Hähnchen	325 g	2.925 ml BPW ISO	37	18–24
Hundetrockenfutter	25 g	225 ml BPW ISO	37	18–24
	375 g	1.500 ml BPW ISO		
Schwarzer Pfeffer, rohe ganze Garnelen, roher Beutelspinat, pasteurisierter verarbeiteter amerikanischer Käse	25 g	225 ml BPW ISO	37	18–24
Hühnerkörperspülung	30 ml	30 ml BPW ISO (vorgewärmt)	41,5	18–24
Hühnerkörperschwamm	1 Schwamm	50 ml BPW ISO (vorgewärmt)	41,5	18–24
Fettfreie Fertigtrockenmilch	25 g	225 ml BPW ISO	37	20–24
Kakaopulver	25 g	225 ml BPW ISO	37	24–28
Pasteurisiertes flüssiges Vollei	100 ml	900 ml BPW ISO	37	18–24
Verbrauchtes Bewässerungswasser für Sprossen	375 ml	3.375 ml BPW ISO	37	18–24

Cremige Erdnussbutter	25 g	225 ml BPW ISO	37	18–24	
	375 g	3.375 ml BPW ISO			
Getrocknete Cannabisblüten, getrocknete Hanfblüten ⁽⁴⁾	10 g	90 BPW-ISO	41,5	28–32	
Umwelt	Versiegelter Beton	1 Schwamm	225 ml BPW ISO (vorgewärmt)	41,5	18–24
	Edelstahl	1 Tupfer	10 ml BPW ISO (vorgewärmt)	41,5	18–24
	Versiegelte Keramikfliese	1 Schwamm	50 ml BPW ISO (vorgewärmt)	41,5	18–24

Probenmatrix	Probengröße	Anreicherungs- bouillonvolumen	Anreicherungs- temperatur (±1 °C)	Anreiche- rungszeit (Stunden)	Sekundäres Anreicherungs- medium (ml)	Sekundäre Anreiche- rungstempere- tur (±1 °C)	Sekundäre Anreiche- rungszeit (Stunden)
Rohe Garnele	25 g	225 ml BPW ISO	37	18–24	R-V R10: 0,1 ml in 10 ml ^(a)	41,5	4–24

(a) 10 µl angereicherte Probe in die Lyselösungsgefäße übertragen. Siehe Schritt 4.7 im Abschnitt Lyse.

NF VALIDATION gemäß AFNOR Certification



3M 01/16 – 11/16
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. Mit NF VALIDATION zertifizierte Methode in Übereinstimmung mit der ISO 16140-2⁽⁷⁾ im Vergleich zur ISO 6579⁽³⁾.

Einsatzgebiet der Validierung: Alle humanen Nahrungsprodukte, Umgebungsproben aus der Fertigung (einschließlich Primärproduktionsproben), Haustiernahrung und Tiernahrung, indem Validationsnachweise an einer Vielzahl von Nahrungsmitteln durchgeführt werden.

Probenvorbereitung: Die Proben müssen gemäß EN ISO 6579⁽³⁾ und EN ISO 6887⁽¹⁰⁻¹⁵⁾ vorbereitet werden.

Softwareversion: Siehe Zertifikat.

Tabelle 4. Anreicherungsprotokolle gemäß NF VALIDATION-zertifizierter Methode 3M 01/16 – 11/16.

Protokoll	Probengröße	Anreicherungs- bouillonvolumen	Anreiche- rungstempe- ratur (+1 °C)	Anreiche- rungszeit (Stunden)	Probenana- lysevolumen (µl) ^(a)
Protokoll 1: <ul style="list-style-type: none"> • Vielzahl von verarbeiteten Nahrungsprodukten (ausgenommen Eipulver, verarbeitetes Obst und Gemüse und in den anderen Protokollen angegebene Produkte) • Alle Fischprodukte und Produkte aus rohen Meeresfrüchten • Haustiernahrung und Tiernahrung • Primärproduktion (nicht-fäkal) 	25 g	225 ml BPW ISO	37	18–26	20
Protokoll 2: <ul style="list-style-type: none"> • Vielzahl von rohen und unverarbeiteten Nahrungsmitteln (ausgenommen roher Fisch und rohe Meeresfrüchte, und in den anderen Protokollen angegebene Produkte) • Eipulver • Alle Obst- und Gemüsesorten • Umweltproben auf der Nahrungsmittelfertigung 	25 g oder 1 Tuch oder 1 Tupfer	225 ml BPW ISO (vorgewärmt)	41,5	18–26	20
Protokoll 3: <ul style="list-style-type: none"> • Pulverisierte Milchprodukte 	25 g	225 ml BPW ISO	37	20–26	20
Protokoll 4: <ul style="list-style-type: none"> • Kakaobasierte Produkte mit mehr als 20 % Kakao 	25 g	225 ml fettfreie UHT-Milch + 0,002 % Brillantgrün	37	24–30	20
Protokoll 5: <ul style="list-style-type: none"> • Gewürze, aromatische Kräuter, Konzentrate, Tees, Kaffees, Küchenhilfen 	25 g	235 ml 2 x BPW ISO + K ₂ SO ₃ 0,5 % + 240 ml fettfreie UHT-Milch	37	24–30	10
Protokoll 6: <ul style="list-style-type: none"> • Rohes Fleisch 	25 g	225 ml BPW ISO (vorgewärmt)	41,5	10–24	20
Protokoll 7: <ul style="list-style-type: none"> • Primärproduktion (fäkal) 	1 Probensocke	100 ml in Tetrathionatbouillon	37	22–24	20
	25 g	225 ml Tetrathionatbouillon			
Protokoll 8: <ul style="list-style-type: none"> • Säuglingsfertignahrung, Zerealien für Kleinkinder, Milchpulver ohne Probiotika^(b) 	375 g	3375 ml BPW ISO (vorgewärmt)	37	20–26	20
Protokoll 9: <ul style="list-style-type: none"> • Säuglingsfertignahrung, Zerealien für Kleinkinder, Milchpulver mit Probiotika^(b) 	375 g	3375 ml BPW ISO (vorgewärmt) + Vancomycin (10 mg/l)	37	20–26	20

(a) Volumen der Probe, das in Lyselösungsgefäße übertragen wird. Siehe Schritt 4.7 im Abschnitt **Lyse**.

(b) Große Pulver- und Zerealien-Proben sollten unter regelmäßigem Rühren und langsam zur Flüssigkeit gegeben werden, um eine Verklumpung zu vermeiden.

HINWEISE:

- Proben über 25 g wurden nicht getestet, außer in Protokoll 8 und 9 der NF VALIDATION-Studie.
- Die kurzen Protokolle der Detektion reagieren empfindlich auf Bedingungen der Inkubation. Die Temperaturbedingungen, die in den technischen Angaben angegeben sind, müssen befolgt werden. Der Benutzer muss verifizieren, dass die Vorwärmung der Anreicherungsbouillon die erforderliche Temperatur vor der Inkubation erreicht. Die Vorbereitungszeit der Proben, Verzögerung zwischen dem Ende des Schritts zur Vorwärmung der Anreicherungsbouillon und dem Beginn des Schritts zur Inkubation der Lebensmittelprobe, darf 45 Minuten nicht überschreiten. Die Verwendung eines belüfteten Inkubators zur Inkubation wird empfohlen.
- **Zur Übertragung der Probe Tetrathionat- (TT) Bouillonanreicherungen in das Neogen Lysegefäß die TT-Anreicherung nicht verwirbeln oder aus dem unteren Bereich des Anreicherungsgefäßes pipettieren, um die Übertragung von Ablagerungen zu vermeiden. Die Übertragung von Ablagerungen kann zu ungültigen Ergebnissen führen.**
- Die empfohlenen Protokoll-Unterbrechungspunkte sind nach Anreicherung oder nach Probenlyse. Die Anreicherungsbouillon bzw. das Probenlysat kann bis zu 72 Stunden bei 2–8 °C gelagert werden. Fahren Sie mit dem Testen ab Schritt 1 im Abschnitt **Lyse** fort, nachdem Sie die Anreicherungsbouillon aus der Lagerung genommen haben. Fahren Sie mit dem Testen ab Schritt 8 im Abschnitt **Lyse** fort, nachdem Sie das Probenlysat aus der Lagerung genommen haben.

Vorbereitung der Neogen® Molekulare Detektion – Beladehilfe

1. Befeuchten Sie ein Tuch oder ein Einwegtuch mit einer 1–5%igen Haushaltsbleichmittellösung (v:v in Wasser) und wischen Sie die Neogen® Molekulare Detektion – Beladehilfe ab.
2. Spülen Sie die Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe mit Wasser ab.
3. Trocknen Sie die Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe mit einem Einmalhandtuch.
4. Vergewissern Sie sich, dass die Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe vor dem Gebrauch trocken ist.

Vorbereitung des Neogen® Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatzes

Stellen Sie den Neogen® Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz direkt auf die Laborbank. Verwenden Sie den Block 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 Trocken-Blockheizgerät ein und stellen Sie die Temperatur für den Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz auf 100 ± 1 °C ein.

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

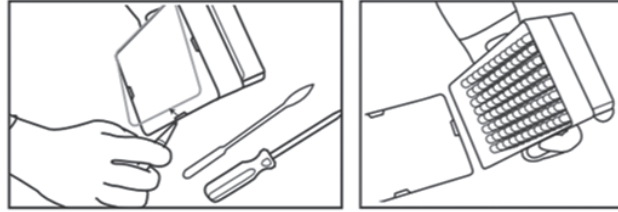
Vorbereitung des Neogen® Molekulare Detektion – Geräts

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

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

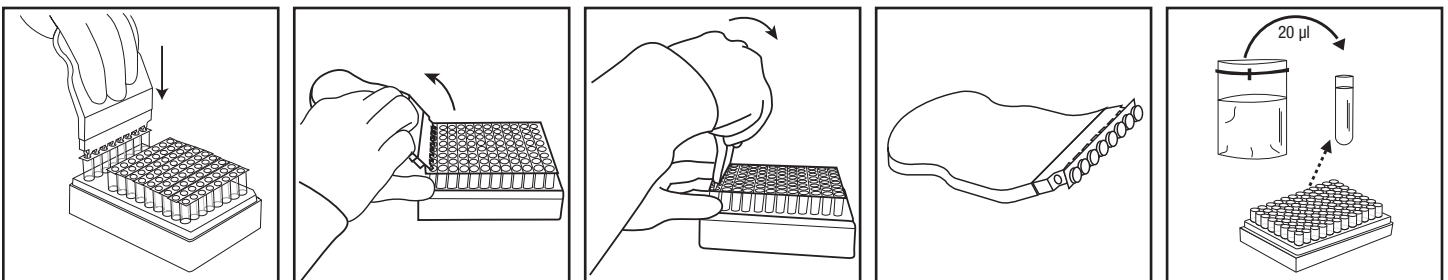
Lyse

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



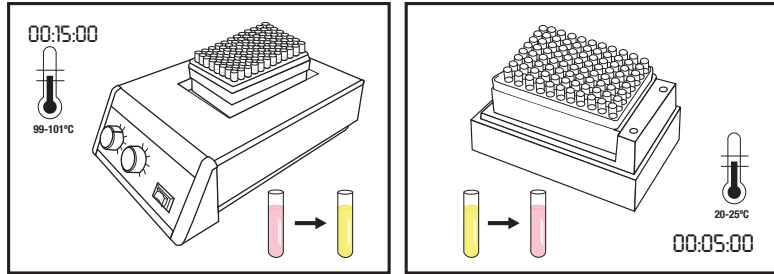
1. Lassen Sie die Neogen Lyselösung im Gefäß über Nacht (16–18 Stunden) bei Raumtemperatur (20–25 °C) aufwärmen. Um die Neogen Lyselösungsgefäße auf Raumtemperatur zu erwärmen, können Sie sie für mindestens 2 Stunden auf die Laborbank stellen, für 1 Stunde bei 37 ± 1 °C inkubieren oder sie für 30 Sekunden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

Übertragen Sie **zuerst** die angereicherten Proben jeweils einzeln in ein Neogen Lyselösungsgefäß. Übertragen Sie die NC **zuletzt**.
 - 4.4 Öffnen Sie jeden Neogen Streifen mit Lyselösungsgefäßen einzeln mit dem Neogen® Molekulare Detektion – Cap/Decap-Werkzeug – Lyse.
 - 4.5 Entsorgen Sie die Kappen der Neogen Lyselösungsgefäße. Wenn noch Lysat für weitere Tests übrig bleibt, bewahren Sie die Kappen in einem sauberen Container auf, um sie nach der Lyse wieder aufzusetzen.
 - 4.5.1 Informationen zur Verarbeitung von nicht verwendetem Lysat finden Sie in Anhang A.
 - 4.6 Schütteln Sie den Anreicherungsbeutel, bevor Sie die Probe von der gefilterten Seite entnehmen, wenn Sie mit zähflüssigen Proben arbeiten.
 - 4.7 Übertragen Sie 20 µl Probe in ein Neogen-Lyselösungsgefäß, sofern nicht anderweitig in der Protokolltabelle angegeben (wie Protokoll 5 und Sekundäranreicherung in RVS oder wenn Sie Umgebungsproben mit Neutralisierungspuffer verwenden).



5. Wiederholen Sie Schritt 4.4 bis 4.7, bis jede einzelne Probe in ein zugeordnetes Neogen Lyselösungsgefäß im Streifen gegeben wurde.
6. Sobald Sie alle Proben übertragen haben, übertragen Sie 20 µl der Negativkontrolle (steriles Anreicherungsmedium, z. B. gepuffertes Peptonwasser BPW) in ein Neogen Lyselösungsgefäß. Als 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 Lyselösungsgefäßen in den Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz und erwärmen Sie ihn 15 Minuten ± 1 Minute 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 Detektion – Gerät eingesetzt werden.
9. Nehmen Sie den Träger ohne Deckel mit den Neogen Lyselösungsgefäßen aus dem Heizblockeinsatz und 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 Lyselösungsgefäßen aus dem Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz.



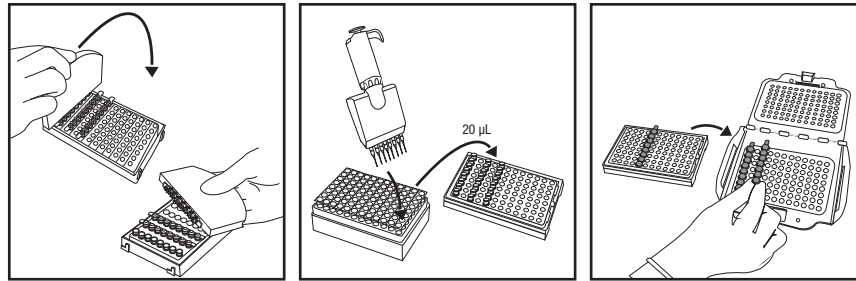
Amplifikation

1. Für jede Probe und ihre Negativkontrolle ist ein Neogen Molekulare Detektion 2 – *Salmonellen Nachweis*-Reagenzgefäß erforderlich.
 - 1.1 Die Gefäßstreifen können auf die gewünschte Anzahl der Gefäße zurechtgeschnitten werden. Wählen Sie die Anzahl der erforderlichen Reagenzgefäße für den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Salmonellen Nachweis* oder den 8er Gefäßstreifen.
 - 1.2 Setzen Sie die Gefäße mit Reagenzkontrolle in einen leeren Gefäßträger.
 - 1.3 Vermeiden Sie es, die Reagenzkügelchen im unteren Teil der Gefäße aufzurühren.
2. Wählen Sie ein Gefäß mit Reagenzkontrolle und stellen Sie es in den Gefäßträger.
3. Um eine Kreuzkontamination zu vermeiden, öffnen Sie jeweils nur einen Gefäßstreifen mit Reagenzkontrolle und verwenden Sie bei jeder einzelnen Übertragung eine neue Pipette.
4. Übertragen Sie wie unten beschrieben die einzelnen Lysate in ein Reagenzgefäß für den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Salmonellen Nachweis* und ein Gefäß mit Neogen Reagenzkontrolle:

Übertragen Sie jedes Probenlysat **zuerst** in die einzelnen Reagenzgefäße und danach die NC. Hydrieren Sie das Gefäß mit Neogen Reagenzkontrolle **als letztes**.

5. Öffnen Sie die Reagenzgefäße für den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Salmonellen Nachweis* mit dem Neogen® Molekulare Detektion – Cap/Decap-Werkzeug – Reagenz, und zwar immer nur einen Streifen auf einmal. Entsorgen Sie die Kappe.
 - 5.1 **Übertragen Sie 20 µl des Probenlysats aus der oberen Hälfte der Flüssigkeit (Ablagerungen vermeiden) im Neogen Lyselösungsgefäß in das entsprechende Reagenzgefäß für den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Salmonellen Nachweis*. Pipettieren Sie schräg in die Gefäße, um ein Aufrühren der Kügelchen zu vermeiden. Mischen Sie anschließend den Gefäßinhalt, indem Sie ihn 5 Mal vorsichtig 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 – *Salmonellen Nachweis* im Streifen hinzugefügt haben.
 - 5.3 Verschließen Sie die Reagenzgefäße für den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Salmonellen 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 die Schritte 5.1 und 5.3, um 20 µl des NC-Lysats in ein Reagenzgefäß für den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Salmonellen 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 vorsichtig 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 Testdurchlaufs 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 60 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) einweichen.

HINWEIS: Um das Risiko eines falsch positiven Ergebnisses infolge einer Kreuzkontamination zu minimieren, öffnen Sie niemals Reagenzgefäße, die amplifizierte DNS enthalten. Dies betrifft Reagenzien für den Neogen Molekulare Detektion 2 – *Salmonellen Nachweis* sowie Gefäße mit Neogen Reagenzkontrolle und Neogen 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) einweichen.






Auslegung der Ergebnisse

Die durch die Detektion der Nukleinsäureamplifikation entstehende Lichtkurve wird anhand eines Algorithmus ausgewertet. Die Ergebnisse werden automatisch von der Software analysiert und je nach Ergebnis farbcodiert. Ein positives oder negatives Ergebnis wird durch die Analyse einer bestimmten Anzahl an eindeutigen Kurvenparametern bestimmt. Die 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 mit Neogen BPW ISO in die Zweitanreicherungsbouillon, 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 der Neogen Molekularen Detektions 2 – *Salmonellen Nachweis* über einen „Hintergrund“ verfügen, 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.

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		Gehemmt	Die Probenmatrix hat den Nachweis gehemmt. Ein neuer Test ist erforderlich. Weitere Informationen finden Sie im Problemlösungsabschnitt und der Gebrauchsanweisung des Testkits.
Probe		Zu überprüfen	Das Vorhandensein oder Fehlen des Zielpathogens war nicht ermittelbar. Ein neuer Test ist erforderlich. Weitere Informationen finden Sie im Problemlösungsabschnitt und der Gebrauchsanweisung des Testkits.
Probe		Fehler	Keine Biolumineszenz festgestellt. Ein neuer Test ist erforderlich. Weitere Informationen finden Sie im Problemlösungsabschnitt und der Gebrauchsanweisung des Testkits.

Bestätigung der Ergebnisse anhand der zertifizierten NF VALIDATION-Methode

Alle im Rahmen der NF VALIDATION vom Neogen Molekulare Detektion 2 – *Salmonellen Nachweis* als positiv identifizierte Proben müssen durch einen der nachfolgenden Tests bestätigt werden:

Option 1: Nach ISO 6579⁽³⁾ standardmäßig mit Anreicherung von gepuffertem Peptonwasser⁽³⁾.

Option 2: Durchführung eines Bestätigungsverfahrens mit Folgendem: Übertragen Sie 0,1 ml BPW ISO⁽³⁾ Anreicherungs- oder Tetrathionatbouillon (Primärproduktionsproben) in 10 ml RVS-Bouillon. Inkubieren Sie für 24 ± 3 Stunden bei 41,5 °C. Streichen Sie auf Xyloxylysindeoxycholat (XLD)⁽³⁾-Agar oder ein chromogenes Agar speziell für *Salmonellen*. Führen Sie eine Latexagglutination mithilfe von Oxoid *Salmonellen*-Latextest direkt auf den isolierten Kolonien durch.

Option 3: Verwenden Sie die in der Norm EN ISO 7218⁽⁵⁾ beschriebenen Nukleinsäure-Sonden, die auf den isolierten Kolonien des ausgeführt werden, von XLD oder chromogenem Agar (siehe Optionen 1 oder 2). Dieser Test darf nicht mit der Neogen Molekulare Detektion 2 – *Salmonellen Nachweis* durchgeführt werden.

Option 4: Beim Verwenden einer anderen zertifizierten NF VALIDATION-Methode muss sich das grundsätzliche Verfahren von dem Neogen Molekulare Detektion 2 – *Salmonellen 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 Neogen Molekulare Detektion 2 – *Salmonellen Nachweis*, unbestätigten Ergebnissen eines der zuvor genannten Verfahren und insbesondere für die Latexpartikel-Agglutination) muss das Labor die erforderlichen Maßnahmen befolgen, um die Richtigkeit der erhaltenden 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 saubere Kappe auf das Lysegefäß (siehe Lyse, Abschnitt 4.5).
2. Lagern Sie sie bis zu 72 Stunden bei 4 bis 8 °C.
3. Bereiten Sie eine gelagerte Probe zur Amplifikation vor, indem Sie sie zum Mischen 2 bis 3 Mal umdrehen.
4. Entkappen Sie die Gefäße.
5. Setzen Sie die gemischten Lysatgefäße in den Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz und erwärmen Sie sie 5 Minuten \pm 1 Minute lang bei 100 ± 1 °C.
6. Nehmen Sie den Träger mit den Neogen Lyselösungsgefäßen 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 Analytical Manual. Chapter 5: *Salmonella*., Section C-24. November 2018 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 4.10. Isolation and identification of *Salmonella* from meat, poultry, pasteurized egg, and siluriformes (fish) products and carcass and environmental sponges. Effective Date: 2 January 2019.
3. ISO 6579-1. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. Eine Kopie dieses Dokuments erhalten Sie über Ihren Neogen Food Safety-Repräsentanten.
7. ISO 18593. Microbiology of the food chain – Horizontal methods for surface sampling.
8. US Food and Drug Administration – *Bacteriological Analytical Manual*, Medium M111: Nonfat Dry Milk (Reconstituted). January 2011.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain - part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
10. ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
11. ISO 6887-2:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products.
12. ISO 6887-3:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products.
13. ISO 6887-4:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
14. ISO 6887-5:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
15. ISO 6887-6:2013. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage.

Erklärung der Symbole

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.

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

Neogen Ireland, Ltd.

Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland



Neogen Corporation

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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00869A

Instrucciones del Producto

Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* Neogen®

Descripción del producto y uso previsto

El Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* Neogen® se usa junto con el Sistema de Detección Molecular Neogen® para la detección rápida y específica de *Salmonella* en muestras enriquecidas ambientales de procesos alimentarios, alimentos y alimento para animales.

Los Ensayos de Detección Molecular Neogen® usan amplificación isotérmica tipo LAMP (por sus siglas en inglés) para amplificar rápidamente las secuencias de ácido nucleico 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 *Salmonella* 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 clínicas, veterinarias, cosméticas o farmacéuticas. El Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* Neogen no ha sido evaluado con todos los productos alimenticios ni todos los procesos alimenticios, tampoco con todos los protocolos de evaluación ni con todas las cepas de bacterias posibles.

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

Neogen ha evaluado el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* Neogen con Agua Peptonada Tamponada (BTW) ISO.

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

Neogen Food Safety 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 *Salmonella* Neogen contiene 96 pruebas, que se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Componentes del kit para el Ensayo 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 bastidor y lista para usar
Tubos de reactivos para el Ensayo de Detección Molecular 2 para <i>Salmonella</i> Neogen®	Tubos verdes	96 (12 tiras de 8 tubos)	Mezcla de detección y amplificación específica liofilizada	Listas para usar
Tapas adicionales	Tapas verdes	96 (12 tiras de 8 tapas)		Listas para usar
Control de Reactivos Neogen® (RC)	Tubos transparentes con tapa de bisagra	16 (2 bolsas de 8 tubos individuales)	Mezcla de detección y amplificación de control liofilizado de ADN	Listas para usar

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

Seguridad

El usuario debe leer, comprender y proceder con toda la información de seguridad incluida en las instrucciones para el Sistema de Detección Molecular Neogen y el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* 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, y/o daños materiales.

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

⚠ ADVERTENCIA

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

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

Para reducir los riesgos asociados con un resultado falso negativo que 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 *Salmonella* Neogen como se indica en el embalaje y en las instrucciones del producto.
- Siempre use el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* Neogen antes de su fecha de vencimiento.
- Use el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* Neogen con muestras enriquecidas ambientales de procesos alimentarios, alimentos y alimento para animales que hayan sido validadas internamente o por un tercero.
- Use el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* Neogen solo con superficies, desinfectantes, protocolos y cepas de bacterias que hayan sido validadas internamente o por un tercero.
- En el caso de muestras ambientales que contengan una solución amortiguadora neutralizante con un complejo de aril sulfonato, prepare una dilución en una proporción de 1:2 (1 parte de muestra en 1 parte de caldo de enriquecimiento estéril) antes de realizar la prueba. Otra opción es transferir 10 µL de la muestra de la solución amortiguadora neutralizante enriquecida a los tubos de Solución de Lisis Neogen. Productos de manejo de muestras Neogen® que incluyen una solución amortiguadora neutralizante con el complejo aril sulfonato: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G y HS2410NB2G.

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

- Realice las pruebas de patógenos en un laboratorio debidamente equipado, bajo la supervisión de personal capacitado. El medio de enriquecimiento incubado y el equipo o las superficies que hayan entrado en contacto con el medio de enriquecimiento podrían contener patógenos en niveles suficientes para provocar un riesgo para la salud humana.
- Siempre proceda de acuerdo con las prácticas estándar de seguridad del laboratorio. Eso incluye usar la ropa de protección adecuada y protección para los ojos al manipular reactivos y muestras contaminadas.
- Evite el contacto con el contenido del medio de enriquecimiento y de los tubos de reactivos después de la amplificación.
- Deseche las muestras enriquecidas conforme a los estándares de la industria vigentes.
- 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:

- Siga las normas de la industria vigentes para la eliminación de desechos 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.
- Use un termómetro calibrado adecuado para verificar la temperatura del Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen® (p. ej., un termómetro de inmersión parcial o un termómetro digital termopar, no un termómetro de inmersión total). El termómetro debe colocarse en la ubicación designada en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen.

ATENCIÓN

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

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

Para reducir los riesgos relacionados con un resultado falso positivo:

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

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

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

Responsabilidad del usuario

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

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

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

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

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

Para ayudar a los clientes a evaluar el método de varias matrices, Neogen ha desarrollado el kit de Control de Matriz para Detección Molecular Neogen®. Cuando sea necesario, utilice el Control de Matriz (MC) para determinar si la matriz puede afectar los resultados del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* 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 o al analizar matrices nuevas o desconocidas, o matrices que hayan sido sometidas a cambios en el proceso o la materia prima.

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

Limitación de garantía/Recurso limitado

SALVO LO EXPRESAMENTE ESTIPULADO EN UNA SECCIÓN DE GARANTÍA LIMITADA O EN EL EMBALAJE DE UN PRODUCTO ESPECÍFICO, NEOGEN RENUNCIA A TODAS LAS GARANTÍAS EXPRESAS Y TÁCITAS INCLUIDA, ENTRE OTRAS, CUALQUIER GARANTÍA DE COMERCIABILIDAD O IDONEIDAD PARA UN USO EN PARTICULAR. Si un producto de Neogen Food Safety es defectuoso, Neogen o su distribuidor autorizado reemplazará el producto o reembolsará el precio de compra del producto, a su elección. Estos son sus recursos exclusivos. Deberá notificar inmediatamente a Neogen en un lapso de sesenta días a partir del descubrimiento de cualquier sospecha de defecto en un producto y devolver dicho producto a Neogen. Póngase en contacto con su representante de Neogen o distribuidor autorizado de Neogen si tuviera cualquier otra pregunta.

Limitación de responsabilidad de Neogen

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

Almacenamiento y desecho

Almacene el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* Neogen 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 *Salmonella* 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 usarlos, el medio de enriquecimiento y los tubos del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* Neogen podrían contener materiales patógenos. Una vez terminada la prueba, proceda de acuerdo con los estándares actuales de la industria para el desecho de residuos contaminados. Consulte la Hoja de Datos de Seguridad para obtener más información y conocer las normativas locales para el desecho de materiales.

Instrucciones de uso

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

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

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

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

Tabla 3 para los protocolos de enriquecimiento según el AOAC® *Official Method of Analysis*SM 2016.01 y el Certificado AOAC® *Performance Tested*SM n.º 091501.

Tabla 4 para los protocolos de enriquecimiento según el Certificado NF VALIDATION 3M 01/16 -11/16.

Enriquecimiento de la muestra

En las Tablas 2, 3 o 4 se presenta una guía para los protocolos generales de enriquecimiento de muestras de alimentos, alimento para animales y ambientales.

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

Alimentos

1. Permita que el medio de enriquecimiento (BPW ISO) alcance un equilibrio en la temperatura ambiente del laboratorio o a $41,5 \pm 1$ °C según la matriz analizada. Consulte las Tablas 2, 3 o 4.
2. Combine el medio de enriquecimiento y la muestra de forma aséptica.
3. Homogenice completamente en homogeneizador peristáltico o licuadora, o bien mezcle la preparación manualmente durante $2 \pm 0,2$ minutos o hasta que los grumos se disuelvan por completo y la suspensión de enriquecimiento se vea homogénea⁽¹⁰⁻¹⁵⁾.
 - a. Para todas las muestras con alto contenido de partículas y carne, se recomienda utilizar bolsas con filtro.
 - b. Para matrices que aumentan de tamaño en agua y son altamente viscosas (p. ej.: cereales o almidón), se sugiere hacer diluciones adicionales (>1:10) hasta que la viscosidad se reduzca adecuadamente o agregar alfa-amilasa estéril al 1 % (p/v) al medio de enriquecimiento (BPW ISO)⁽¹⁰⁻¹³⁾.
 - c. Para muestras grandes de leche en polvo y cereales, agregue la muestra al líquido lentamente y mezcle con frecuencia para evitar grumos.
4. Incube como se indica en la tabla del protocolo correspondiente (consulte las tablas 2, 3 o 4).

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 libre de biocidas. La solución neutralizante puede ser el caldo neutralizante Dey-Engley (D/E) o el caldo Lethéen. Se recomienda desinfectar el área después de la toma de muestras.

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

El tamaño del área de muestra recomendado para verificar la presencia o ausencia del patógeno en la superficie es de al menos 100 cm² (10 cm x 10 cm o 4" x 4"). Cuando se toma la muestra con una esponja, cubra toda el área en dos direcciones (de izquierda a derecha y de arriba a abajo), o tome las muestras ambientales de acuerdo con su protocolo actual para la toma de muestras o según las directrices de FDA BAM⁽¹⁾, USDA FSIS MLG⁽²⁾ o ISO 18593:2018⁽⁷⁾.

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

1. Caliente previamente el medio de enriquecimiento BPW ISO a 41,5 °C ± 1 °C según la matriz analizada. Consulte las Tablas 2, 3 o 4.
2. Combine el medio de enriquecimiento y la muestra de forma aséptica. Homogenice completamente en homogeneizador peristáltico o licuadora, o bien mezcle la preparación manualmente durante 2 ± 0,2 minutos. Incube como se indica en la tabla del protocolo que corresponda. Consulte las Tablas 2, 3 o 4.

Tabla 2. Protocolos generales de enriquecimiento.

Matriz de muestra	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Volumen de análisis de la muestra (µL) ^(a)
Protocolo 1 Productos alimentarios procesados (con excepción de polvos de huevo y otros productos especificados en otros protocolos) ^(b)	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18-26	20
Protocolo 2 Alimentos crudos y no procesados, polvos de huevo, alimentos para animales y muestras ambientales ^(c)	25 g	225 mL de BPW ISO (precalentada)	41,5	18-26	20
Protocolo 3 Productos lácteos en polvo (incluida la leche maternizada instantánea y la leche maternizada a base de soya)	25 g	225 mL de BPW ISO	37	20-26	20
Protocolo 4 Productos a base de cacao (cacao en polvo, chocolates, productos de confitería, etc.)	25 g	225 mL de leche descremada en polvo estéril (100 g/L) con 0,002% de tintura verde brillante ^(d,e,f)	37	24-30	20
Protocolo 5 Otros incluyen: especias, hierbas aromáticas, concentrados, tés y cafés instantáneos, spices, aromatic herbs, concentrates, instant teas and coffees, cubos de caldo	25 g	235 mL 2X BPW ISO con 0,5% K ₂ SO ₃ + 240 mL de leche descremada en polvo estéril (100 g/L) ^(d,g,h)	37	24-30	10

Protocolo 6 Nueces o mezclas de frutos secos con nueces (este protocolo es apropiado para otros frutos secos tales como nueces pecanas, almendras, pistachos, castañas de cajú y castañas)	25 g	225 mL de leche descremada en polvo estéril (100 g/L) ^(d)	37	18-24	20
--	------	--	----	-------	----

- (a) Volumen de muestra transferido a los tubos de Solución de Lisis. Consulte el paso 4.7 de la sección Lisis.
- (b) Ejemplos de productos que se deben analizar con el Protocolo 1: comidas listas para usar, ensaladas delicatessen, natilla.
- (c) Ejemplos de productos que se deben analizar con el Protocolo 2: carnes crudas, vegetales congelados, leche fermentada, salada cruda (lechuga, Batavia).
- (d) La leche descremada UHT puede substituirse por leche descremada en polvo.
- (e) 0,45 mL de 1% de solución colorante acuosa verde brillante por 225 mL de leche descremada, lo que dará como resultado una concentración final de 0,002% (0,02 g/L) de solución colorante verde brillante.
- (f) Para preparar leche descremada en polvo estéril, suspenda 100 g de leche descremada en polvo deshidratada en 1 L de agua destilada o purificada. Agitar hasta que se disuelva. Autoclave por 15 minutos a 121 °C. Almacene a 2 °C y 30 °C⁽⁸⁾.
- (g) 5 g de K₂SO₃ por 1000 mL BPW ISO, lo que dará como resultado una concentración final de 0,5% K₂SO₃.
- (h) Deberá añadirse 240 mL 100 g/L de leche descremada en polvo estéril a 235 mL 2X BPW ISO esterilizado con 0,5% K₂SO₃.

Si se usa un paso de enriquecimiento secundario opcional, por ejemplo Rappaport Vassiliadis Medium, se requiere realizar una disolución de 1:2 (1 parte de enriquecimiento en 1 parte de caldo de enriquecimiento estéril) o simplemente transferir 10 µL del enriquecimiento secundario a los tubos de Solución Lysis Neogen. Si se utiliza Caldo de Tetrionato (TT), transfiera 20 µL del enriquecimiento secundario a los tubos de Solución Lysis Neogen, y no utilice un agitador eléctrico para enriquecimiento TT ni utilice una pipeta desde el fondo del tubo de enriquecimiento para evitar transferir algún precipitado.

Instrucciones específicas para métodos validados

AOAC® Official Methods of AnalysisSM 2016.01

AOAC® Performance TestedSM Certificate #091501



En los programas OMASM y PTMSM de AOAC Research Institute, se descubrió que el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* Neogen era un método efectivo para la detección de *Salmonella*. Las matrices evaluadas en el estudio se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Protocolos de enriquecimiento de acuerdo con el certificado #091501 de AOAC OMASM 2016.01 y AOAC PTMSM. El volumen de muestra transferido a los tubos de Solución de Lisis Neogen es de 20 µL.

Matriz de muestra	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)
Carne molida cruda	25 g	225 mL de BPW ISO (precalentada)	41,5	10-24
	325 g	975 mL de BPW ISO (precalentada)		
Carne de ave molida cruda	25 g	225 mL de BPW ISO (precalentada)	41,5	10-24
	325 g	975 mL de BPW ISO (precalentada)	41,5	14-24
Carne de ave cocida congelada	325 g	2925 mL de BPW ISO	37	18-24

Alimento para perros seco	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18-24	
	375 g	1500 mL de BPW ISO			
Pimienta negra, camarón entero crudo, espinaca cruda empaquetada, queso americano procesado pasteurizado	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18-24	
Enjuague de carcasa de ave	30 mL	30 mL de BPW ISO (precalentada)	41,5	18-24	
Esponja de carcasa de ave	1 esponja	50 mL de BPW ISO (precalentada)	41,5	18-24	
Leche descremada en polvo instantánea	25 g	225 mL de BPW ISO	37	20-24	
Cacao en polvo	25 g	225 mL de BPW ISO	37	24-28	
Huevo entero líquido pasteurizado	100 mL	900 mL de BPW ISO	37	18-24	
Agua de irrigación de brotes	375 mL	3375 mL de BPW ISO	37	18-24	
Mantequilla de maní cremosa	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18-24	
	375 g	3375 mL de BPW ISO			
Flor de cannabis seca, planta de cannabis seca ⁽⁴⁾	10 g	90 BPW-ISO	41.5	28-32	
Ambiental	Hormigón sellado	1 esponja	225 mL de BPW ISO (precalentada)	41,5	18-24
	Acero inoxidable	1 hisopo	10 mL de BPW ISO (precalentada)	41,5	18-24
	Mosaico de cerámica sellado	1 esponja	50 mL de BPW ISO (precalentada)	41,5	18-24

Matriz de muestra	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Medio de enriquecimiento secundario (mL)	Temperatura de enriquecimiento secundaria (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento secundario (horas)
Camarón crudo con cabeza	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18-24	R-V R10: 0.1 mL en 10 mL ^(a)	41,5	4-24

(a) Transfiera 10 µL de la muestra enriquecida a los tubos de Solución de Lisis. Consulte el paso 4.7 de la sección Lisis.



3M 01/16 -11/16
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⁽⁷⁾ comparada con la norma ISO 6579⁽³⁾.

Alcance de la validación: todos los productos de alimentos para humanos, las muestras ambientales de producción (incluidas las muestras de producción primaria) y los productos alimentarios para animales y mascotas mediante ensayos de validación de alimentos de alto alcance.

Preparación de la muestra: las muestras se deben preparar según las normas EN ISO 6579⁽³⁾ y EN ISO 6887⁽¹⁰⁻¹⁵⁾.

Versión de Software: consulte el certificado.

Tabla 4. Protocolos de enriquecimiento según el Certificado NF VALIDATION 3M 01/16 -11/16.

Protocolo	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento	Temperatura de enriquecimiento (+1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Volumen de análisis de la muestra (µL) ^(a)
Protocolo 1: <ul style="list-style-type: none"> Amplio rango de alimentos procesados (no se incluyen el huevo en polvo, las frutas y las verduras procesadas y productos especificados en otros protocolos) Todos los pescados y mariscos crudos Comida para mascota y alimento para animales Producción primaria (no fecal) 	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18-26	20
Protocolo 2: <ul style="list-style-type: none"> Amplio rango de alimentos no procesados (no se incluyen el pescado crudo y los mariscos crudos, y los productos especificados en otros protocolos) Huevo en polvo Todas las frutas y vegetales Muestras ambientales de la producción de alimentos 	25 g o 1 toallita o 1 hisopo	225 mL de BPW ISO precalentado	41,5	18-26	20
Protocolo 3: <ul style="list-style-type: none"> Productos lácteos en polvo 	25 g	225 mL de BPW ISO	37	20-26	20
Protocolo 4: <ul style="list-style-type: none"> Productos a base de cacao que contengan más del 20% de cacao 	25 g	225 mL de leche descremada UHT + 0,002 % verde brillante	37	24-30	20
Protocolo 5: <ul style="list-style-type: none"> Especias, hierbas aromáticas, concentrados, té, cafés, preparaciones culinarias 	25 g	235 mL 2 x BPW ISO + K ₂ SO ₃ 0,5 % + 240 mL de leche descremada UHT	37	24-30	10

Protocolo 6: • Carne cruda	25 g	225 mL de BPW ISO precalentado	41,5	10-24	20
Protocolo 7: • Producción primaria (fecal)	1 hisopado de botas	100 mL en caldo de Tetrionato	37	22-24	20
	25 g	225 mL de caldo de Tetrionato			
Protocolo 8: • Leche maternizada, cereales para bebés, productos lácteos en polvo sin probióticos ^(b)	375 g	3375 mL de BPW ISO precalentado	37	20-26	20
Protocolo 9: • Leche maternizada, cereales para bebés, productos lácteos en polvo con probióticos ^(b)	375 g	3375 mL de BPW ISO precalentado + vancomicina (10 mg/L)	37	20-26	20

- (a) Volumen de muestra transferido a los tubos de Solución de Lisis. Consulte el paso 4.7 de la sección **Lisis**.
- (b) Para muestras grandes de productos en polvo y cereales, agregue la muestra al líquido y mezcle con frecuencia para evitar grumos.

NOTAS:

- Las muestras de más de 25 g no han sido sometidas a prueba, excepto en los protocolos 8 y 9 en el estudio de NF VALIDATION.
- Estos protocolos de enriquecimiento breve son sensibles a las condiciones de incubación. Se requiere cumplir con las condiciones de temperatura que se indican en las especificaciones técnicas. El usuario deberá verificar que el precalentamiento del caldo de enriquecimiento alcance la temperatura requerida antes de la incubación. El tiempo de preparación de las muestras, la demora entre el final del paso de precalentamiento del caldo de enriquecimiento y el comienzo del paso de incubación de la muestra de alimento, no debe superar los 45 minutos. Se recomienda utilizar una incubadora ventilada durante la incubación.
- **Para la transferencia de los caldos de enriquecimiento de Tetrionato (TT) a los tubos de Solución Lysis Neogen, no utilice un agitador eléctrico ni utilice una pipeta desde el fondo del tubo de enriquecimiento para evitar transferir algún precipitado. La transferencia de algún precipitado puede resultar en la obtención de resultados inválidos.**
- Los puntos de interrupción del protocolo recomendados corresponden a después del enriquecimiento o después de la lisis de las muestras. El caldo de enriquecimiento o el lisado de muestra se puede almacenar a 2 °C y 8 °C por hasta 72 horas. Después de extraer el caldo de enriquecimiento del almacenamiento, retome la prueba desde el Paso 1 en la sección **Lisis**. Después de extraer el lisado de muestra del almacenamiento, retome la prueba desde el Paso 8 en la sección **Lisis**.

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

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

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

Coloque el Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen® directamente sobre la mesa del laboratorio. Use el bloque a temperatura ambiente del laboratorio (entre 20 °C y 25 °C).

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

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

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

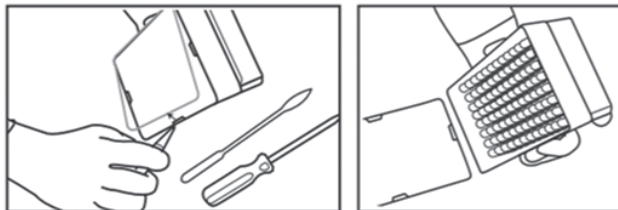
Preparación del Equipo de Detección Molecular Neogen®

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

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

Lisis

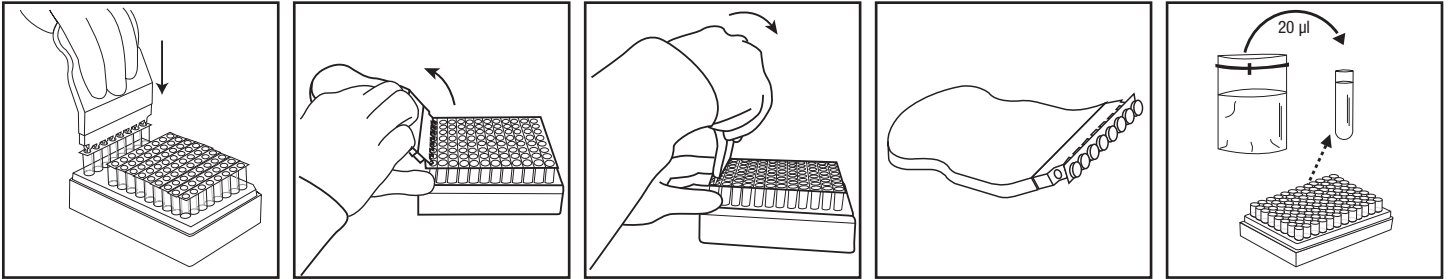
Retire la parte inferior de la Gradilla para Solución de Lisis de Neogen con un destornillador o una espátula antes de colocarla en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen.



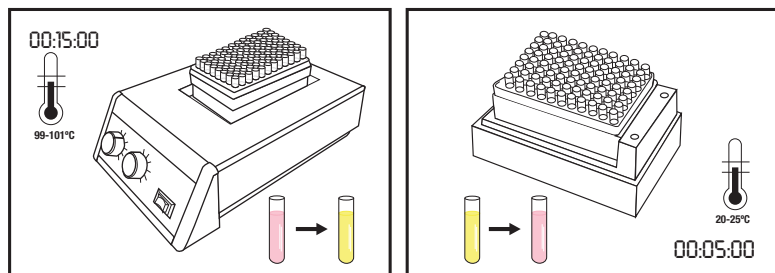
1. Permita que los tubos de Solución de Lisis Neogen se calienten colocando la gradilla a temperatura ambiente (20 °C y 25 °C) durante la noche (16 y 18 horas). Las alternativas para que los tubos de Solución de Lisis Neogen alcancen temperatura ambiente son colocar los tubos de Solución de Lisis Neogen sobre la mesa de laboratorio durante por lo menos 2 horas, incubar los tubos de Solución de Lisis Neogen en una incubadora a 37 °C ± 1 °C durante 1 hora o colocarlos en una unidad de calentamiento de dos bloques seca durante 30 segundos a 100 °C ± 1 °C.
2. Invierta los tubos tapados para mezclarlos. Proceda con el paso siguiente dentro de 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 la muestra NC (medio de enriquecimiento estéril).
 - 4.1 Las tiras de tubos de Solución de Lisis Neogen pueden cortarse para obtener la cantidad deseada de tubos 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 tubo de Solución de Lisis Neogen por vez y use una nueva punta de pipeta para cada paso de transferencia.
 - 4.3 Transfiera la muestra enriquecida a los tubos de Solución de Lisis Neogen como se describe a continuación:

Transfiera cada muestra enriquecida a un tubo de Solución de Lisis Neogen individual **primero**. Transfiera el NC **al final**.
 - 4.4 Utilice la Herramienta para Encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular – Lisis Neogen® para destapar una tira de tubos de Solución de Lisis Neogen, una tira por vez.
 - 4.5 Deseche la tapa del tubo de Solución de Lisis Neogen; si se conservara el lisado para una repetición de prueba, coloque las tapas en un envase limpio para su reutilización luego de la lisis.
 - 4.5.1 Para ver cómo procesar el lisado conservado, consulte el Apéndice A.
 - 4.6 Cuando trabaje con muestras viscosas, agite la bolsa de enriquecimiento antes de recolectar la muestra del lado filtrado.

4.7 Transfiera los 20 µL de muestra a un tubo de Solución de Lisis Neogen a menos que se indique lo contrario en la tabla de protocolos (por ejemplo, el protocolo 5 y el enriquecimiento secundario en RVS o cuando se utilizan muestras ambientales con una solución amortiguadora).



5. Repita los pasos 4.4 al 4.7 hasta que cada muestra individual se haya agregado al correspondiente tubo de Solución de Lisis Neogen de la tira.
6. Cuando se hayan transferido todas las muestras, transfiera 20 µL del NC (medio de enriquecimiento estéril, por ejemplo, BPW) a un tubo de Solución de Lisis Neogen. No use agua como un NC.
7. Verifique que la temperatura del Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen sea de 100 °C ± 1 °C.
8. Coloque la gradilla descubierta de tubos de Solución de Lisis Neogen en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen y caliente durante 15 ± 1 minutos. Durante el calentamiento, la Solución de Lisis Neogen cambiará de rosado (frío) a amarillo (caliente).
 - 8.1. Las muestras que no se hayan tratado debidamente con calor durante el paso de lisis del ensayo pueden considerarse un posible riesgo biológico y NO deben introducirse en el Equipo de Detección Molecular Neogen.
9. Retire la gradilla descubierta de tubos de Solución de Lisis Neogen del bloque de calentamiento y deje que se enfríe en la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen al menos durante 5 minutos y por un máximo de 10 minutos. Cuando se usa el Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen a temperatura ambiente, debe colocarse directamente sobre la mesa del laboratorio. Cuando esté fría, la solución de lisis volverá a tomar 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.

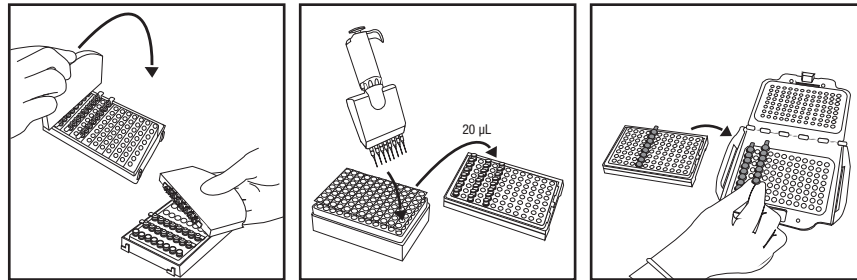


Amplificación

1. Se necesita un Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 de para *Salmonella* Neogen por cada muestra y el NC.
 - 1.1 Las tiras de tubos pueden cortarse para obtener la cantidad de tubos deseada. Seleccione la cantidad de Tubos de Reactivos del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* Neogen o tiras de 8 tubos según sea necesario.
 - 1.2 Coloque los tubos de reactivo en una gradilla vacía.
 - 1.3 Evite mover las perlas de reactivo en el fondo de los tubos.
2. Seleccione un tubo de Control de Reactivos y colóquelo en la gradilla.
3. Para evitar la contaminación cruzada, destape una tira de tubo de reactivo por vez y use una nueva punta de pipeta para cada paso de transferencia.
4. Transfiera cada uno de los lisados a un Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* 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 **primero** y luego al NC. Hidrate el Tubo de Control de Reactivos Neogen **al final**.

5. Use la Herramienta para Encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular – Reactivo Neogen® para destapar el Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* 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 que corresponde al Tubo de Reactivo del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* Neogen. Aplique en un ángulo que permita evitar que se muevan los gránulos. Mezcle pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.**
 - 5.2 Repita el paso 5.1 hasta que se haya añadido una muestra individual del lisado a un Tubo de Reactivos del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* Neogen en la tira.
 - 5.3 Cubra los Tubos de Reactivos del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* 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 los pasos 5.1 a 5.3 para transferir 20 µL de lisado NC a un Tubo de Reactivo del Ensayo Detección Molecular 2 para *Salmonella* Neogen.
 - 5.6 Transfiera **20 µL del lisado NC a un tubo de Control de Reactivos Neogen.** Aplique en un ángulo que permita evitar que se muevan los gránulos. Mezcle pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.
6. Cargue los tubos tapados en una Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen limpia y descontaminada. Cierre y trabe la tapa de la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen.



7. Revise y confirme la corrida configurada en el Software de Detección Molecular Neogen.
8. Haga clic en el botón de inicio del software y seleccione el equipo que usará. La tapa del equipo seleccionado se abrirá automáticamente.
9. Coloque la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen en el Equipo de Detección Molecular Neogen y cierre la tapa para comenzar con el ensayo. Obtendrá los resultados al cabo de 60 minutos, aunque los positivos pueden detectarse antes.
10. Una vez terminado el ensayo, retire la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen del Equipo de Detección Molecular Neogen y deseche los tubos sumergiéndolos en una solución de cloro de uso doméstico del 1% al 5% (v:v en agua) durante 1 hora y lejos del área en que se prepara el ensayo.

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






Resultados e interpretación

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

Las muestras con resultados presuntivos positivos deben ser confirmadas de acuerdo con los procedimientos operativos estándar del laboratorio o mediante la confirmación del método de referencia apropiado^(1,2,3), comenzando con la transferencia del caldo de enriquecimiento primario Neogen BPW ISO al secundario, seguido del subsiguiente sembrado en placa y la confirmación de aislados, utilizando métodos bioquímicos y serológicos apropiados.

NOTA: Incluso una muestra negativa no arrojará una lectura de cero, ya que los reactivos de amplificación del Ensayo Detección Molecular 2 para *Salmonella* Neogen contienen un nivel basal de unidades relativas de luz.

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.

Tipo de Pocillo	Símbolo del resultado del pocillo	Resultado	Interpretación
Muestra		Positivo	Se presume que la muestra dio positivo para el patógeno estudiado.
Muestra		Negativo	Se presume que la muestra dio negativo para el patógeno estudiado.
Muestra		Inhibido	La matriz de muestra fue inhibitoria al ensay. Puede que se requiera un nuevo estudio. Consulte la sección de solución de problemas y las Instrucciones del Producto del kit de ensayos para obtener más información.
Muestra		Inspeccionar	Es indeterminada la presencia o ausencia del patógeno estudiado. Puede que se requiera un nuevo estudio. Consulte la sección de solución de problemas y las Instrucciones del Producto del kit de ensayos para obtener más información.
Muestra		Error	No se detectó bioluminiscencia. Puede que se requiera un nuevo estudio. Consulte la sección de solución de problemas y las Instrucciones del Producto del kit de ensayos para obtener más información.

Confirmación de los resultados según el Método Certificado de NF VALIDATION

En el contexto de NF VALIDATION, todas las muestras identificadas como positivas por el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* Neogen deben ser confirmadas mediante una de las siguientes pruebas:

Opción 1: uso de la norma ISO 6579⁽³⁾ a partir del enriquecimiento de agua peptonada tamponada⁽³⁾.

Opción 2: mediante la implementación de un método de confirmación compuesto por lo siguiente: Transfiera 0,1 mL del enriquecimiento BPW ISO⁽³⁾ o los caldos de enriquecimiento de Tetatrionato (muestras de producción primaria) en 10 mL de caldo RVS. Incubar por 24 ± 3 horas a $41,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Realice un rayado en agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)⁽³⁾ o en un agar cromogénico específico para *Salmonella*. Realice una aglutinación de látex con usando la prueba de látex Oxoid *Salmonella* directamente en las colonias aisladas.

Opción 3: mediante el uso de sondas de ácido nucleico tal como se describen en la norma EN ISO 7218⁽⁵⁾, realizado sobre colonias aisladas de XLD o agar cromogénico (consulte las Opciones 1 o 2). Esta prueba no debe realizarse mediante el uso de Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* Neogen.

Opción 4: mediante el uso de cualquier otro método certificado NF VALIDATION, cuyo principio debe ser diferente al Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* 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 Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* Neogen no confirmados por alguno de los medios descritos anteriormente y, en particular, la prueba de aglutinación de látex), 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 con calor

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

Referencias:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 5: *Salmonella*., Section C-24. November 2018 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 4.10. Isolation and identification of *Salmonella* from meat, poultry, pasteurized egg, and siluriformes (fish) products and carcass and environmental sponges. Effective Date: 2 January 2019.
3. ISO 6579-1. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. Póngase en contacto con su representante de Neogen Food Safety para obtener una copia de este documento.
7. ISO 18593. Microbiology of the food chain – Horizontal methods for surface sampling.
8. US Food and Drug Administration – *Bacteriological Analytical Manual*, Medium M111: Nonfat Dry Milk (Reconstituted). January 2011.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain - part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
10. ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
11. ISO 6887-2:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products.
12. ISO 6887-3:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products.
13. ISO 6887-4:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
14. ISO 6887-5:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
15. ISO 6887-6:2013. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage.

Explicación de los símbolos

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.

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

Neogen Ireland, Ltd.

Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland



Neogen Corporation

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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00869A

Instruções do produto

Neogen® Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 2

Descrição e uso recomendado do produto

O Neogen® Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 2 é usado com o Neogen® Sistema de Detecção Molecular para a detecção rápida e específica de *Salmonella* em alimentos enriquecidos e amostras ambientais de processos de rações e alimentos.

Os Neogen® Ensaio para Detecção Molecular utilizam 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 aparentes resultados positivos devem ser confirmados por meio do seu método preferido ou conforme especificado pelos regulamentos locais^(1,2,3).

O Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 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 farmacêuticas, de cosméticos, clínicas ou veterinárias. O Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 2 não foi avaliado com todos os possíveis produtos, processos alimentícios e protocolos de teste nem com todas as linhagens de bactérias possíveis.

Como acontece em todos os métodos de teste, a fonte, a formulação e a qualidade do meio de enriquecimento podem influenciar os resultados. Fatores como métodos de amostragem, protocolos de teste, preparação de amostras, manuseio e técnica de laboratório também podem influenciar os resultados. A Neogen recomenda a avaliação do método, incluindo o 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 *Salmonella* 2 com Água Peptonada Tamponada (BPW) ISO.

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 *Salmonella* 2 contém 96 testes, descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes do kit Neogen Ensaio para Detecção Molecular

Item	Identificação	Quantidade	Conteúdo	Comentários
Neogen® Solução de Lise (LS)	Solução rosa em tubos transparentes	96 (12 tiras de 8 tubos)	580 µL de LS por tubo	Armazenada na rack e pronta para uso
Tubos reagentes para Neogen® Ensaio para Detecção Molecular de <i>Salmonella</i> 2	Tubos verdes	96 (12 tiras de 8 tubos)	Mistura de detecção e amplificação específica liofilizada	Pronto para uso
Tampas adicionais	Tampas verdes	96 (12 tiras de 8 tampas)		Pronto para uso
Neogen® Controle de Reagentes (RC)	Tubos transparentes com tampa articulada	16 (2 sacos de 8 tubos individuais)	Mistura liofilizada de DNA de controle, para amplificação e detecção	Pronto para uso

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

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 *Salmonella* 2. Guarde as instruções sobre segurança para consulta posterior.

⚠ ADVERTENCIA: indica uma situação de perigo que, se não evitada, pode resultar em morte ou lesões 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 *Salmonella* 2 no diagnóstico de problemas de saúde em humanos ou animais.

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

Para reduzir os riscos associados a um resultado falso-negativo que leve 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 *Salmonella* 2 conforme indicado na embalagem e nas instruções do produto.
- Sempre use o Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 2 antes do vencimento.
- Use o Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 2 com alimentos e amostras ambientais de processos de rações e alimentos que tenham sido aprovados internamente ou por um terceiro.
- Utilize o Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 2 somente com superfícies, desinfetantes, protocolos e linhagens de bactérias que tenham sido aprovados internamente ou por um terceiro.
- Para uma amostra ambiental que contém um tampão neutralizador com complexo de sulfonato de arila, faça uma diluição de 1:2 antes de testar (1 parte da amostra em 1 parte do caldo de enriquecimento estéril). Outra opção é transferir 10 µL do enriquecimento do tampão neutralizante para os tubos de Neogen Solução de Lise. Produtos Neogen® Manipulação de Amostras que incluem tampão neutralizador com complexo de sulfonato de arila: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G e HS2410NB2G.

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

- Execute testes de agentes patogênicos em um laboratório adequadamente equipado, sob o controle de pessoal bem treinado. O meio de enriquecimento incubado e equipamentos ou superfícies que tenham entrado em contato com o meio de enriquecimento incubado podem conter patógenos em níveis suficientes para apresentar riscos à saúde humana.
- Sempre adote as práticas de segurança padrão em laboratórios, como usar trajes de proteção adequados e óculos de proteção ao manipular reagentes e amostras contaminadas.
- Evite o contato com o conteúdo do meio de enriquecimento e dos tubos de reagentes após a amplificação.
- Descarte amostras enriquecidas de acordo com 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 associados à 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 de inserção 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 grau 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 os tubos após a amplificação.
- Sempre descarte os tubos contaminados mergulhando-os em uma solução de água sanitária de 1–5% (v:v em água) por 1 hora, longe da área de preparação de ensaio.
- Nunca submeta os tubos de reagentes a autoclave após a amplificação.

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

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

Responsabilidade do usuário

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

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

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

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

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

Para ajudar os clientes a avaliar o método para diversas matrizes de alimentos, a Neogen desenvolveu o kit Neogen® Controle de Matriz para Detecção Molecular. Quando necessário, utilize o Controle de Matriz (MC) para determinar se a matriz pode influenciar os resultados do Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 2. Teste diversas amostras representativas da matriz, isto é, amostras obtidas a partir de diferentes origens, durante qualquer período de validação quando adotar o método da Neogen, 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 processo. As diferenças entre matrizes podem ser tão simples quanto os efeitos causados pelas diferenças em seu processamento ou apresentação; por exemplo, cru vs. pasteurizado, fresco vs. desidratado, etc.

Limitação de garantias/recurso limitado

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

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 *Salmonella* 2 a 2–8 °C. Não congele. Mantenha o kit fora do alcance da luz durante o armazenamento. Após abrir o kit, verifique se a embalagem protetora de alumínio não está danificada. Se a embalagem estiver danificada, não utilize. Após a abertura, os tubos de reagentes não utilizados devem sempre ser armazenados na embalagem resselável, juntamente com o dessecante para manter a estabilidade dos reagentes liofilizados. Armazene as embalagens resseladas a 2–8 °C por, no máximo, 60 dias.

Não utilize o Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 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 *Salmonella* 2 podem conter materiais patogênicos. Quando o teste for concluído, siga os regulamentos-padrão da indústria vigentes para descarte de resíduos contaminados. Consulte a Ficha de Dados de Segurança para obter informações adicionais e informações sobre os regulamentos locais para descarte.

Instruções de uso

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

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 (OQ) do Sistema de Detecção Molecular Neogen, conforme descrito no documento “Protocolos e Instruções de Qualificação de Instalação (IQ)/Qualificação Operacional (OQ) 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 Certificado N° 091501 de AOAC® *Official Method of Analysis*SM 2016.01 e AOAC® *Performance Tested*SM.

Tabela 4 para protocolos de enriquecimento conforme o certificado NF VALIDATION 3M 01/16 -11/16.

Enriquecimento de amostra

As Tabelas 2, 3 e 4 oferecem diretrizes sobre protocolos gerais de enriquecimento para alimentos, ração e amostras ambientais.

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

Alimentos

1. Deixe que o meio de enriquecimento BPW ISO equilibre a temperatura ambiente do laboratório ou 41,5 ± 1 °C dependendo das matrizes testadas. Consulte as Tabelas 2, 3 ou 4.
2. Combine, de forma asséptica, o meio de enriquecimento e a amostra.
3. Homogenize totalmente por mistura, esmagamento ou mistura manual por 2 ± 0,2 minutos ou até que todos os grumos estejam completamente dissolvidos e a suspensão de enriquecimento esteja homogênea⁽¹⁰⁻¹⁵⁾.
 - a. Para carnes e amostras altamente particuladas, recomenda-se o uso de sacos de amostra com filtro.
 - b. Para matrizes que incham na água ou que são muito viscosas (por exemplo, cereais e amidos), recomenda-se fazer mais diluições (> 1:10) até viscosidade diminuir consideravelmente ou adicionar 1% alfa-amilase estéril (w/v) à BPW (ISO)⁽¹⁰⁻¹³⁾.
 - c. Para amostras grandes de leite em pó e cereais, adicione aos poucos a amostra ao líquido enquanto os mistura para não empelotar.
4. Realize a incubação conforme a descrição na tabela do protocolo padrão (consulte 2, 3 ou 4).

Amostras ambientais

Os dispositivos de coleta de amostra podem ser uma esponja hidratada com uma solução neutralizante para desativar os efeitos dos desinfetantes. A Neogen recomenda o uso de uma esponja de celulose livre de biocidas. A solução neutralizante pode ser caldo neutralizante Dey-Engley (D/E) ou Caldo Lethen. Recomenda-se desinfetar a área após a amostragem.

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

O tamanho recomendado da área de amostragem para confirmar a presença ou ausência do patógeno na superfície é de, no mínimo, 100 cm² (10 cm x 10 cm ou 4” x 4”). Caso a amostragem seja realizada com uma esponja, toda a área deve ser coberta em duas direções (esquerda e direita, depois para cima e para baixo) ou as amostras ambientais devem ser coletadas em conformidade com o protocolo de amostragem vigente ou de acordo com as diretrizes BAM⁽¹⁾, USDA FSIS MLG⁽²⁾ ou ISO 18593:2018⁽⁷⁾ da FDA.

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

1. Preequeça o meio de enriquecimento BPW ISO a $41,5 \pm 1$ °C dependendo das matrizes testadas. Consulte as Tabelas 2, 3 ou 4.
2. Combine, de forma asséptica, o meio de enriquecimento e a amostra. Homogenize totalmente por mistura, esmagamento ou mistura manual por $2 \pm 0,2$ minutos. Realize a incubação conforme a descrição na tabela do protocolo padrão. Consulte as Tabelas 2, 3 ou 4.

Tabela 2. Protocolos gerais de enriquecimento.

Matriz de Amostra	Tamanho da Amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento	Temperatura de Enriquecimento (± 1 °C)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Volume da Análise de Amostra (μL) ^(a)
Protocolo 1 Produtos alimentícios processados (com exceção de ovos em pó e produtos especificados nos outros protocolos) ^(b)	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18–26	20
Protocolo 2 Alimentos crus e não processados, ovos em pó, ração e amostras ambientais ^(c)	25 g	225 mL de BPW ISO (preaquecido)	41,5	18–26	20
Protocolo 3 Laticínios em pó (incluindo fórmula infantil e fórmula infantil à base de soja)	25 g	225 mL de BPW ISO	37	20–26	20
Protocolo 4 Produtos à base de cacau (chocolate em pó, produtos para confeitaria, etc.)	25 g	225 mL de 100 g/L de leite em pó desnatado estéril com 0,002% de corante verde brilhante ^(d,e,f)	37	24–30	20
Protocolo 5 Outros incluem: especiarias, ervas aromáticas, concentrados, chás e cafés instantâneos, temperos prontos em tabletes	25 g	235 mL 2X BPW ISO com 0,5% K_2SO_3 + 240 mL de 100 g/L de leite em pó desnatado estéril ^(d,g,h)	37	24–30	10
Protocolo 6 Nozes ou misturas de frutos secos contendo nozes (esse protocolo é apropriado para outros frutos secos, incluindo pecã, amêndoa, pistache, castanha-de-caju, castanha-portuguesa, macadâmia, castanha-do-pará, soja e amendoim)	25 g	225 mL de 100 g/L de leite em pó desnatado estéril ^(d)	37	18–24	20

(a) Volume de amostra transferido para tubos de Solução de Lise. Consulte a etapa 4.7 da seção Lise.

(b) Exemplos de produtos para serem testados com o Protocolo 1: refeições prontas, saladas gourmet, cremes.

(c) Exemplos de produtos para serem testados com o Protocolo 2: carnes cruas, vegetais congelados, todos os tipos de queijo, leite fermentado, salada crua (alface, do tipo batávia).

(d) Leite UHT desnatado pode ser substituído por leite em pó desnatado.

(e) 0,45 mL de 1% de solução de corante verde brilhante por 225 mL de leite desnatado, resultando em uma concentração final de 0,002% (0,02 g/L) de corante verde brilhante.

(f) Para preparar leite em pó desnatado estéril, realize uma suspensão de 100 g de leite em pó desnatado estéril em 1 L de água destilada ou purificada. Gire até dissolver. Coloque em autoclave por 15 minutos a 121 °C. Armazene a 2-30 °C⁽⁸⁾.

(g) 5 g de K_2SO_3 por 1.000 mL de BPW ISO, resultando em uma concentração final de 0,5% K_2SO_3 .

(h) 240 mL de 100 g/L de leite em pó desnatado estéril deve ser acrescentado em 235 mL 2X de BPW ISO estéril com 0,5% K_2SO_3 .

Caso seja utilizada uma etapa de enriquecimento secundária opcional, por exemplo, Rappaport Vassiliadis Medium, é necessário realizar uma diluição de 1:2 (1 parte de amostra de enriquecimento em 1 parte de caldo de enriquecimento estéril) ou simplesmente transfira 10 µL do segundo enriquecimento para os tubos de Neogen Solução de Lise. Caso seja utilizado Caldo Tetrionato (TT), transfira 20 µL do enriquecimento secundário para os tubos de Neogen Solução de Lise e não efetue agitação em vórtice de enriquecimento TT ou aplicação em pipeta do fundo do tubo de enriquecimento para evitar a transferência de qualquer precipitado.

Instruções específicas para métodos comprovados

AOAC® Official Methods of AnalysisSM 2016.01

Certificado N. 091501 do AOAC® Performance TestedSM



Nos programas OMASM e PTMSM do Instituto de Pesquisa AOAC, o Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 2 foi constatado como um método eficiente para a detecção de *Salmonella*. As matrizes testadas no estudo são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Protocolos de enriquecimento de acordo com o Certificado N. 091501 OMASM 2016.01 e PTMSM do AOAC. O volume de amostra transferido para tubos de Neogen Solução de Lise é de 20 µL.

Matriz de Amostra	Tamanho da Amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento	Temperatura de Enriquecimento (± 1 °C)	Tempo de Enriquecimento (horas)
Carne moída crua	25 g	225 mL de BPW ISO (preaquecido)	41,5	10–24
	325 g	975 mL de BPW ISO (preaquecido)		
Carne de frango moída crua	25 g	225 mL de BPW ISO (preaquecido)	41,5	10–24
	325 g	975 mL de BPW ISO (preaquecido)	41,5	14–24
Carne de frango empanada cozida	325 g	2925 mL de BPW ISO	37	18–24
Ração seca para cães	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18–24
	375 g	1500 mL de BPW ISO		
Pimenta-do-reino, camarão inteiro cru, espinafre ensacado cru, queijo americano processado pasteurizado	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18–24
Lavagem de carcaça de frango	30 mL	30 mL de BPW ISO (preaquecido)	41,5	18–24
Escovação de carcaça de frango com esponja	1 esponja	50 mL de BPW ISO (preaquecido)	41,5	18–24
Leite em pó desnatado instantâneo	25 g	225 mL de BPW ISO	37	20–24
Cacau em pó	25 g	225 mL de BPW ISO	37	24–28
Ovo integral líquido pasteurizado	100 mL	900 mL de BPW ISO	37	18–24
Água usada na irrigação de brotos	375 mL	3375 mL de BPW ISO	37	18–24
Creme de manteiga de amendoim	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18–24
	375 g	3375 mL de BPW ISO		
Flor de cannabis seca, flor de cânhamo seca ⁽⁴⁾	10 g	90 BPW-ISO	41.5	28-32

Ambiental	Concreto selado	1 esponja	225 mL de BPW ISO (preaquecido)	41,5	18-24
	Aço inoxidável	1 swab	10 mL de BPW ISO (preaquecido)	41,5	18-24
	Azulejo de cerâmica selado	1 esponja	50 mL de BPW ISO (preaquecido)	41,5	18-24

Matriz de Amostra	Tamanho da Amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento	Temperatura de Enriquecimento (± 1 °C)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Meio de Enriquecimento Secundário (mL)	Temperatura de Enriquecimento Secundário (± 1 °C)	Tempo de Enriquecimento Secundário (horas)
Camarão cru, com cabeça	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18-24	R-V R10: 0,1 mL em 10 mL ^(a)	41,5	4-24

(a) Transfira 10 μ L da amostra enriquecida para tubos de Solução de Lise. Consulte a etapa 4.7 da seção Lise.

NF VALIDATION da AFNOR Certification



3M 01/16 - 11/16
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 a ISO 16140-2⁽⁷⁾ em comparação com a ISO 6579⁽³⁾.

Escopo da validação: Todos os produtos alimentícios para consumo humano, amostras ambientais de produção (incluindo amostras de produção primárias), ração para animais de estimação e alimentação animal, por meio de testes de comprovação em uma grande variedade de alimentos.

Preparo da amostra: As amostras devem ser preparadas de acordo com a EN ISO 6579⁽³⁾ e a EN ISO 6887⁽¹⁰⁻¹⁵⁾.

Versão do software: Consulte o certificado.

Tabela 4. Protocolos de enriquecimento conforme o método certificado NF VALIDATION 3M 01/16 -11/16.

Protocolo	Tamanho da Amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento	Temperatura de Enriquecimento (+1 °C)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Volume da Análise de Amostra (µL) ^(a)
Protocolo 1: <ul style="list-style-type: none"> Grande variedade de produtos alimentícios processados (com exceção de ovos em pó, frutas e vegetais processados e produtos especificados nos outros protocolos) Todos os tipos de peixes e frutos do mar Ração para animais de estimação e alimentação animal Produção primária (não fecal) 	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18–26	20
Protocolo 2: <ul style="list-style-type: none"> Grande variedade de alimentos crus e não processados (com exceção de peixes e frutos do mar crus e produtos especificados nos outros protocolos) Ovos em pó Todos os tipos de frutas e vegetais, Amostras ambientais da produção de alimentos 	25 g ou 1 wipe ou 1 swab	225 mL de BPW ISO (preaquecido)	41,5	18–26	20
Protocolo 3: <ul style="list-style-type: none"> Laticínios em pó 	25 g	225 mL de BPW ISO	37	20–26	20
Protocolo 4: <ul style="list-style-type: none"> Produtos à base de cacau contendo mais de 20% de cacau 	25 g	225 mL de leite UHT desnatado + 0,002% de corante verde brilhante	37	24–30	20
Protocolo 5: <ul style="list-style-type: none"> Especiarias, ervas aromáticas, concentrados, chás, cafés, preparação culinária 	25 g	235 mL de 2 x BPW ISO + K ₂ SO ₃ 0,5% + 240 mL de leite UHT desnatado	37	24–30	10
Protocolo 6: <ul style="list-style-type: none"> Carnes cruas 	25 g	225 mL de BPW ISO (preaquecido)	41,5	10–24	20
Protocolo 7: <ul style="list-style-type: none"> Produção primária (fecal) 	1 meia cano alto	100 mL em Caldo tetrionato	37	22–24	20
	25 g	225 mL em Caldo tetrionato			
Protocolo 8: <ul style="list-style-type: none"> Fórmula infantil, cereais infantis, laticínios em pó sem probióticos^(b) 	375 g	3375 mL de BPW ISO (preaquecido)	37	20–26	20
Protocolo 9: <ul style="list-style-type: none"> Fórmula infantil, cereais infantis, laticínios em pó com probióticos^(b) 	375 g	3375 mL de BPW ISO (preaquecido) + vancomicina (10 mg/L)	37	20–26	20

(a) Volume de amostra transferido para tubos de Solução de Lise. Consulte a etapa 4.7 da seção **Lise**.

(b) Para amostras grandes de leite em pó e cereais, adicione aos poucos a amostra ao líquido enquanto os mistura para não empelotar.

NOTAS:

- Amostras mais pesadas que 25 g não foram testadas, exceto no protocolo 8 e 9, no estudo NF VALIDATION.
- Os protocolos curtos de detecção são sensíveis a condições de incubação. É necessário seguir as condições de temperatura indicadas na especificação técnica. O usuário deve se certificar de que o preaquecimento do caldo de enriquecimento alcance a temperatura necessária antes da incubação. O tempo de preparação das amostras, o atraso entre o término da etapa de preaquecimento do caldo de enriquecimento e o início da etapa de incubação da amostra de alimento não devem ultrapassar 45 minutos. É recomendado o uso de uma incubadora ventilada para a incubação.
- **Para realizar a transferência da amostra de enriquecimentos de Caldo Tetrionato (TT) para o Neogen Tubo de Lise, não agite com vórtice o enriquecimento TT nem aspire com pipeta o fundo do tubo de enriquecimento para evitar a transferência de qualquer precipitado. A transferência de precipitado pode gerar resultados inválidos.**
- Os pontos de interrupção de protocolo recomendados ocorrem após o enriquecimento ou a lise da amostra. Os caldos de enriquecimento ou lisados de amostra podem ser armazenados a 2–8 °C por até 72 horas. Após a remoção do caldo de enriquecimento do armazenamento, continue o teste a partir da Etapa 1, na seção **Lise**. Após a remoção do lisado de amostra do armazenamento, continue o teste a partir da Etapa 8, na seção **Lise**.

Preparo da Neogen® Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular

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

Preparação do Neogen® Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular

Coloque o Neogen® Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular diretamente sobre a bancada do laboratório. Utilize o bloco na 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.

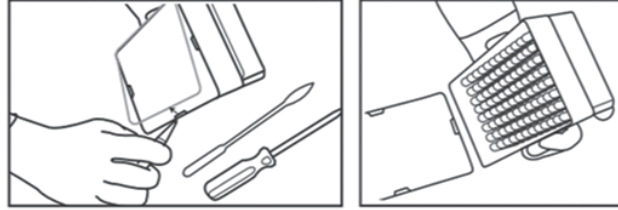
Preparo do Neogen® Equipamento de Detecção Molecular

1. Inicie o Neogen® Software de 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.

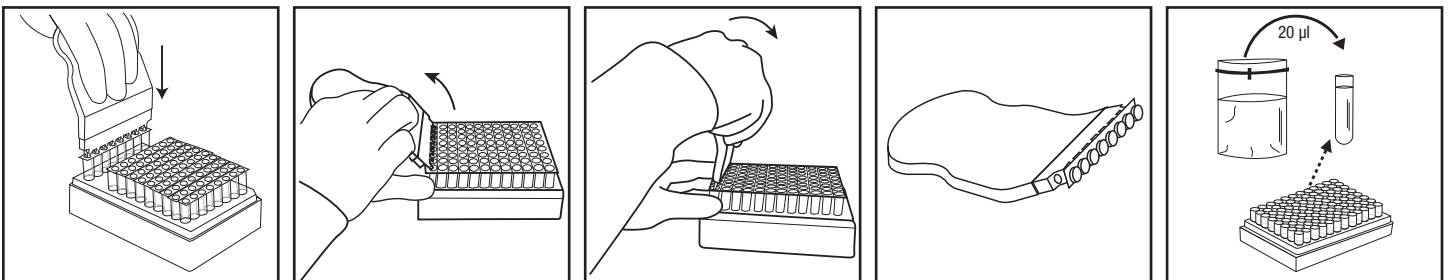
Lise

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.



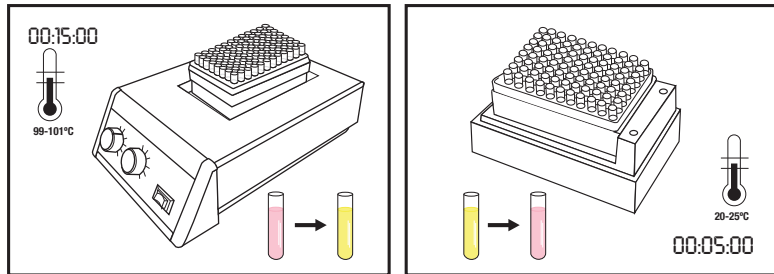
1. Deixe que os tubos de Neogen Solução de Lise cheguem à temperatura ambiente, 20–25 °C, deixando as racks fora de refrigeração de um dia para o outro (16–18 horas). A alternativa para equilibrar os tubos Neogen Solução de Lise à temperatura ambiente é posicioná-los na bancada do laboratório durante 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 ± 1 °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 Neogen Solução de Lise é necessário para cada amostra e amostra do 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 uma rack vazia.
 - 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 a amostra enriquecida 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 Agite a bolsa de enriquecimento antes de coletar a amostra do lado filtrado ao trabalhar com amostras viscosas.
 - 4.7 Transfira 20 µL de amostra em um tubo Neogen Solução de Lise, exceto se indicado de outro modo na tabela do protocolo (por exemplo, protocolo 5 e enriquecimento secundário em RVS na utilização de amostras secundárias com tampão neutralizador).



5. Repita da etapa 4.4 à 4.7 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, BPW) para um tubo Neogen Solução de Lise. Não use água como um NC.
7. Verifique se a temperatura do Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular está a 100 ± 1 °C.

8. Coloque 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 forma adequada durante a etapa de lise do ensaio podem ser consideradas um risco biológico potencial e NÃO devem ser inseridas no Neogen Equipamento de Detecção Molecular.
9. Retire 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 a rack de tubos Neogen Solução de Lise do Neogen Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular.



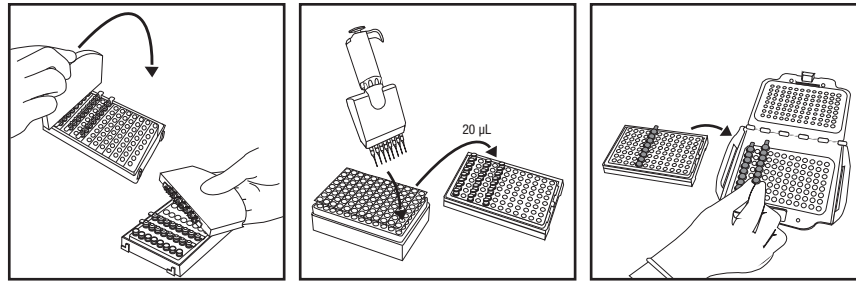
Amplificação

1. É necessário um Tubo de Reagente de Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 2 para cada amostra e para o NC.
 - 1.1 As tiras de tubos podem ser cortadas para obter o número de tubos desejado. Selecione o número de Tubos de Reagente individuais ou de tiras de 8 tubos individuais necessárias para Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 2.
 - 1.2 Coloque os Tubos de Reagente em uma rack vazia.
 - 1.3 Evite agitar os reagentes precipitados da parte inferior dos tubos.
2. Selecione um tubo Controle de Reagentes e coloque-o na rack.
3. Para evitar contaminação cruzada, destampe uma tira de Tubo de Reagente de cada vez e utilize uma nova ponteira de pipeta para cada etapa da transferência.
4. Transfira cada um dos lisados a um Tubo Reagente para Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 2 e tubo Neogen Controle de Reagentes conforme descrito abaixo:

Transfira cada amostra de lisado em tubos de Reagente individuais **primeiro** e, em seguida, o NC. **Por último**, hidrate o tubo Neogen Controle de Reagentes.

5. Use a Neogen® Ferramenta de Tampar/Destampar para Detecção Molecular - Reagente para destampar o Tubo de Reagente para Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 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) no tubo de Neogen Solução de Lise para o Tubo de Reagente para Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 2 correspondente. Dispense em um ângulo que evite a agitação dos pellets. Misture pipetando cuidadosamente 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 *Salmonella* 2 correspondente na tira.
 - 5.3 Cubra os Tubos de Reagentes para Neogen Ensaio para Molecular de *Salmonella* 2 com a tampa extra fornecida 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 a 5.3 para transferir 20 µL de lisado do NC para o Tubo de Reagente para Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 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 cuidadosamente 5 vezes.

- 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.



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

AVISO: para minimizar o risco de falso-positivos por contaminação cruzada, nunca abra tubos de reagentes que contenham DNA amplificado. Isto inclui o Tubo de Reagente para Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 2, o Neogen Controle de Reagentes e o Neogen 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 através da análise de diversos parâmetros exclusivos das curvas. Resultados positivos presuntivos são relatados em tempo real, enquanto resultados negativos e resultados de inspeção serão exibidos após a conclusão da execução.

As aparentes amostras positivas 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 Neogen BPW ISO para o(s) caldo(s) de enriquecimento secundário, seguida do plaqueamento subsequente e a confirmação de 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 *Salmonella* 2 tenham uma leitura de unidade de luz relativa (RLU) em "plano de fundo".

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

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

Confirmação de resultados segundo o método certificado NF VALIDATION

No contexto do NF VALIDATION, todas as amostras identificadas como positivas pelo Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 2 devem ser confirmadas por um dos testes seguintes:

Opção 1: Uso da norma ISO 6579⁽³⁾ a partir do enriquecimento de água peptonada tamponada⁽³⁾.

Opção 2: Implementação de um método de confirmação que consista em: Transfira 0,1 mL do enriquecimento BPW ISO⁽³⁾ ou enriquecimentos de Caldo Tetracionato (amostras de produção primárias) para 10 mL de caldo RVS. Incube por 24 ± 3 horas a 41,5 °C. Distribua em ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD)⁽³⁾ ou em ágar cromogênico específico para *Salmonella*. Realize uma aglutinação em látex usando o teste Oxoid *Salmonella* diretamente em colônias isoladas.

Opção 3: Utilização de sondas de ácido nucleico conforme descritas na norma EN ISO 7218⁽⁵⁾, em colônias isoladas, de XLD ou ágar cromogênico (consulte as Opções 1 ou 2). Esse teste não deve ser realizado com um Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 2.

Opção 4: Utilização de algum outro método certificado pelo NF VALIDATION, cujo princípio seja diferente do Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 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 Neogen Ensaio para Detecção Molecular de *Salmonella* 2, não confirmados por um dos métodos acima descritos, em particular para o teste de aglutinação em látex), 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 refaça o teste de lisados tratados termicamente

1. Para armazenar um lisado tratado termicamente, tampe novamente o tubo de lise com uma tampa limpa (consulte a seção **Lise**, 4.5).
2. Armazene 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 minutos.
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 Analytical Manual. Chapter 5: *Salmonella*., Section C-24. November 2018 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 4.10. Isolation and identification of *Salmonella* from meat, poultry, pasteurized egg, and siluriformes (fish) products and carcass and environmental sponges. Effective Date: 2 January 2019.
3. ISO 6579-1. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. Contate seu representante da Neogen Food Safety para obter uma cópia deste documento.
7. ISO 18593. Microbiology of the food chain – Horizontal methods for surface sampling.
8. US Food and Drug Administration – *Bacteriological Analytical Manual*, Medium M111: Nonfat Dry Milk (Reconstituted). January 2011.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain - part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
10. ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
11. ISO 6887-2:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products.
12. ISO 6887-3:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products.
13. ISO 6887-4:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
14. ISO 6887-5:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
15. ISO 6887-6:2013. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage.

Explicação dos símbolos

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.

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

Neogen Ireland, Ltd.

Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland



Neogen Corporation

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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00869A

Informacje o produkcie

Molekularny test Neogen® do wykrywania 2 – *Salmonella*

Opis i przeznaczenie produktu

Molekularny test Neogen® do wykrywania 2 – *Salmonella* stosuje się razem z Systemem Neogen® do diagnostyki molekularnej w celu szybkiego i swoistego wykrywania bakterii *Salmonella* w próbkach pochodzących z przednamnożonego pokarmu, paszy oraz środowiska przetwarzania żywności.

Molekularny test Neogen® do wykrywania wykorzystuje metodę pętlowej amplifikacji izotermicznej do szybkiego namnażania sekwencji kwasów nukleinowych z zachowaniem wysokiej swoistości i czułości, w połączeniu z bioluminescencją do wykrywania amplifikacji. Domniemane wyniki dodatnie przekazuje się 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 – *Salmonella* 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 leków, kosmetyków, próbek klinicznych ani weterynaryjnych. Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella* nie oceniono w przypadku wszystkich możliwych produktów spożywczych, procesów przetwarzania żywności, protokołów testowych ani w przypadku wszystkich dostępnych szczepów bakterii.

Podobnie jak w przypadku wszystkich metod testowych, pochodzenie, skład i jakość podłoża przednamnażającego może 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 ocenę metody wykorzystującej podłoża przednamnażające w środowisku użytkownika przy zastosowaniu wystarczającej liczby próbek konkretnej żywności oraz próbek problematycznych pod względem rozwoju drobnoustrojów w celu zapewnienia, że dana metoda spełnia potrzeby użytkownika.

Firma Neogen dokonała oceny Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella* z zastosowaniem buforowanej wody peptonowej wg (BPW) wg ISO.

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 została wyróżniona certyfikatem ISO (ang. International Organization for Standardization — Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna) 9001 w zakresie projektowania i wytwarzania.

Zestaw testów Molekularny test Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella* zawiera 96 testów opisanych w tabeli 1.

Tabela 1. Elementy zestawu testów Molekularny test Neogen do wykrywania

Element	Charakterystyka	Liczba sztuk	Zawartość	Komentarze
Roztwór lizujący Neogen® (LS)	Różowy roztwór w przezroczystych próbkach	96 (12 taśm z 8 próbkami)	580 µl LS na próbkę	Ustawione w statywie i gotowe do użytku
Probówki reagentowe Molekularnego testu Neogen® do wykrywania 2 – <i>Salmonella</i>	Zielone probówki	96 (12 taśm z 8 próbkami)	Liofilizowana swoista mieszanina do amplifikacji i wykrywania	Gotowe do użycia
Dodatkowe korki	Zielone korki	96 (12 taśm z 8 korkami)		Gotowe do użycia
Kontrola Neogen® reagenta (RC)	Przezroczyste probówki z korkiem zatraskowym	16 (2 woreczki po 8 oddzielnych próbek)	Liofilizowane DNA kontrolne, mieszanina do amplifikacji i wykrywania	Gotowe do użycia

Kontrola ujemna (NC), niebędąca częścią zestawu, to jałowe podłoża przednamnażające, np. BPW wg ISO. Nie stosować wody jako NC.

Bezpieczeństwo

Użytkownik powinien dokładnie zapoznać się ze wszystkimi informacjami dotyczącymi bezpieczeństwa zawartymi w instrukcji dotyczącej Systemu Neogen do diagnostyki molekularnej oraz Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella* 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

Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella* nie należy stosować do diagnozowania stanu zdrowotnego ludzi ani zwierząt.

Obowiązkiem użytkownika jest przeszkolenie personelu w zakresie aktualnych, odpowiednich technik badań: na przykład w zakresie dobrych praktyk laboratoryjnych, norm 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 – *Salmonella* należy przechowywać w sposób podany na opakowaniu i w Informacjach o produkcie.
- Molekularny test Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella* należy stosować wyłącznie przed upływem terminu ważności.
- Molekularny test Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella* należy stosować w odniesieniu do próbek żywności, paszy i środowiska przetwarzania żywności poddanych walidacji wewnętrznej lub przez osoby trzecie.
- Molekularny test Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella* należy stosować wyłącznie w połączeniu z powierzchniami, środkami odkażającymi, protokołami i szczepami bakterii poddanych 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 przednamnażającego buforu neutralizującego do probówek z roztworem lizującym Neogen. Produkty firmy Neogen® do postępowania z próbkami, 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:

- Badania patogenów należy prowadzić w odpowiednio wyposażonym laboratorium pod kontrolą przeszkolonego personelu. Inkubowane podłoże do przednamnażania oraz sprzęt lub powierzchnie, które mogły mieć kontakt z inkubowanym podłożem do przednamnażania, 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.
- Probki, które nie przeszły odpowiedniej obróbki cieplnej na etapie lizy, można uznać za potencjalne zagrożenie biologiczne i NIE należy ich umieszczać w Urzędzeniu 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 Wkładki Neogen® 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 próbek reagentowych.
- Zaleca się stosowanie jałowych końcówek pipet do biologii molekularnej z (filtrowaną) barierą aerozoloną.
- Do przeniesienia każdej próbki używać nowej końcówki pipety.
- Przy przenoszeniu przednamnożonych próbek do próbówki 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 próbówki.
- 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 próbek po procesie amplifikacji.
- Zanieczyszczone próbki należy utylizować, namaczając je w 1–5% (obj./obj., wodnym) roztworze domowego wybielacza przez 1 godzinę i wynosząc poza obszar przygotowania testów.
- Nie umieszczać próbek reagentowych 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 dotyczącymi produktu. W celu uzyskania dalszych informacji należy odwiedzić stronę internetową www.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, technika laboratoryjna oraz sama próbka mogą wpływać na uzyskiwane wyniki.

Obowiązkiem użytkownika przy wyborze jakiegokolwiek 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 dla różnych typów 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 macierz może wpływać na wyniki Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella*. Należy przetestować kilka próbek reprezentatywnych dla danej macierzy, czyli na przykład próbki pozyskane z różnych źródeł, podczas dowolnego okresu walidacji przy stosowaniu metody firmy Neogen, a także podczas testowania nowych lub nieznanymi macierzy 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

JESLI 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 ciągu 60 dni od wykrycia jakiegokolwiek podejrzanego wady produktu należy niezwłocznie powiadomić firmę Neogen oraz zwrócić produkt. W przypadku dalszych pytań prosimy o kontakt z przedstawicielem Neogen lub autoryzowanym dystrybutorem 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 – *Salmonella* 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 próbki reagentowe 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 – *Salmonella* po upływie daty ważności. Termin ważności i numer partii podano na zewnętrznej etykiecie pudełka. Po użyciu podłoże przednamnażające i próbki Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella* 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*SM 2016.01 oraz AOAC® *Performance Tested*SM, certyfikat nr 091501.

Tabela 4 – protokoły przednamnażania zgodnie z certyfikatem NF VALIDATION 3M 01/16 -11/16.

Przednamnażanie próbki

W tabelach 2, 3 lub 4 można znaleźć wytyczne dotyczące ogólnych protokołów przednamnażania próbek żywności, paszy i próbek 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. Począć na zrównoważenie temperatury podłoża przednamnażającego BPW wg ISO do temperatury otoczenia w laboratorium lub $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ w zależności od badanych macierzy. Patrz tabele 2, 3 lub 4.
2. Połączyć w warunkach aseptycznych podłoże przednamnażające i próbkę.
3. Dokładnie zhomogenizować przez zmieszanie, wytrząsanie lub mieszanie ręczne przez $2 \pm 0,2$ minuty lub do czasu całkowitego rozpuszczenia wszystkich grudek i uzyskania homogenicznej zawiesiny podłoża przednamnażającego⁽¹⁰⁻¹⁵⁾.
 - a. W przypadku wszystkich próbek produktów mięsnych lub innych o wysokiej zawartości cząstek stałych zaleca się stosowanie worków z filtrem.
 - b. W przypadku macierzy zwiększających swoją objętość pod wpływem wody i wykazujących dużą lepkość (np. płatki śniadaniowe, skrobia), zaleca się zastosować dodatkowe rozcieńczenia ($> 1:10$) do momentu, aż lepkość wystarczająco spadnie lub dodać sterylny 1% roztwór (wagowo/objętościowo) alfa-amylazy do podłoża BPW (ISO)⁽¹⁰⁻¹³⁾.
 - c. W przypadku dużych próbek mleka w proszku i płatków śniadaniowych materiałów należy powoli wprowadzać do płynu, często go mieszając, by nie powstawały grudy.
4. Inkubować zgodnie z opisem w odpowiedniej tabeli z protokołem (patrz tabele 2, 3 i 4).

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 neutralizujący Dey-Engley (D/E) lub bulion z lecytyną. Po pobraniu próbek zaleca się odkażenie otoczenia.

OSTRZEŻENIE: Gdy bufor neutralizujący z kompleksem sulfonianu aryłu ma zostać użyty jako roztwór nawilżający gąbkę, przed rozpoczęciem badania należy przygotować roztwór rozcieńczony w stosunku 1:2 (1 część próbki w 1 części jałowego bulionu przednamnażającego) przednamnażonej próbki środowiskowej, aby zmniejszyć ryzyko związane z wynikiem fałszywie ujemnym prowadzącym do wydania zanieczyszczonego produktu. Inną możliwością jest przeniesienie 10 µl przednamnażającego buforu neutralizującego do probówek z roztworem lizującym Neogen.

Zalecany rozmiar obszaru próbkowania do weryfikacji obecności lub braku patogenu na powierzchni wynosi co najmniej 100 cm² (10 cm x 10 cm lub 4" x 4"). W przypadku próbkowania 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 18593:2018⁽⁷⁾.

Użytkownik ma obowiązek przeprowadzić walidację alternatywnych protokołów próbkowania lub proporcji roztworów, aby sprawdzić, czy dana metoda badawcza spełnia kryteria określone przez użytkownika.

1. Wstępnie ogrzać podłoże do przednamnażania BPW wg ISO do temperatury 41,5 ± 1°C w zależności od badanych macierzy. Patrz tabele 2, 3 lub 4.
2. Połączyć w warunkach aseptycznych podłoże przednamnażające i próbkę. Dokładnie zhomogenizować przez zmieszanie, wytrząsanie lub mieszanie ręczne przez 2 ± 0,2 minuty. Inkubować zgodnie z opisem w odpowiedniej tabeli z protokołem. Patrz tabele 2, 3 lub 4.

Tabela 2. Ogólne protokoły przednamnażania.

Macierz próbki	Wielkość próbki	Objętość bulionu przednamnażającego	Temperatura przednamnażania (± 1°C)	Czas przednamnażania (godz.)	Objętość analizowanej próbki (µl) ^(a)
Protokół 1 Przetworzone produkty spożywcze (z wyjątkiem proszków jajecznych oraz produktów określonych w innych protokołach) ^(b)	25 g	225 ml BPW wg ISO	37	18–26	20
Protokół 2 Surowa i nieprzetworzona żywność, proszki jajeczne, pasza dla zwierząt oraz próbki środowiskowe ^(c)	25 g	225 ml BPW wg ISO (wstępnie ogrzanego)	41,5	18–26	20
Protokół 3 Sproszkowane produkty mleczne (włącznie z pokarmem dla niemowląt i sojowym pokarmem dla niemowląt)	25 g	225 ml BPW wg ISO	37	20–26	20
Protokół 4 Produkty kakaowe (proszek, czekolady, wyroby cukiernicze itp.)	25 g	225 ml sterylnego odtłuszczonego mleka w proszku 100 g/l z 0,002% zieleni brylantynowej ^(d,e,f)	37	24–30	20
Protokół 5 Pozostałe produkty, takie jak: przyprawy, zioła aromatyczne, koncentraty, herbaty i kawy rozpuszczalne, kostki rosołowe	25 g	235 ml 2X BPW wg ISO z 0,5% roztworem K ₂ SO ₃ + 240 ml sterylnego odtłuszczonego mleka w proszku 100 g/l ^(d,g,h)	37	24–30	10

<p>Protokół 6 Orzechy włoskie lub mieszanki orzechów zawierające orzechy włoskie (ten protokół jest odpowiedni dla innych orzechów, w tym orzechów pekan, migdałów, pistacji, orzechów nerkowca, kasztanów, orzechów makadamia, orzechów brazylijskich, orzeszków sojowych oraz orzeszków ziemnych)</p>	25 g	225 ml sterylnego odtłuszczonego mleka w proszku 100 g/l ^(d)	37	18–24	20
--	------	---	----	-------	----

- (a) Objętość próbki przenoszona do probówek z roztworem lizującym. Patrz krok 4.7 w części Liza.
- (b) Przykłady produktów badanych za pomocą protokołu 1: posiłki gotowe do spożycia, sałatki, sos angielski.
- (c) Przykłady produktów badanych za pomocą protokołu 2: surowe mięso, mrożone warzywa, wszystkie sery, sfermentowane mleko, surowa sałatka (sałata, Batavia).
- (d) Odtłuszczone mleko w proszku można zastąpić odtłuszczonego mlekiem UHT.
- (e) 0,45 ml 1% wodnego roztworu zieleni brylantynowej na 225 ml odtłuszczonego mleka, co skutkuje uzyskaniem roztworu zieleni brylantynowej o stężeniu końcowym 0,002% (0,02 g/l).
- (f) Aby przygotować sterylne odtłuszczone mleko w proszku, należy zawiesić 100 g odwodnionego odtłuszczonego mleka w proszku w 1 l wody destylowanej lub oczyszczonej. Mieszać do momentu rozpuszczenia. Umieścić w autoklawie na 15 minut w temperaturze 121°C. Przechowywać w temperaturze 2–30°C⁽⁸⁾.
- (g) 5 g K₂SO₃ na 1000 ml BPW wg ISO, co skutkuje uzyskaniem roztworu K₂SO₃ o stężeniu końcowym 0,5%.
- (h) 240 ml sterylnego odtłuszczonego mleka w proszku 100 g/l należy dodać do 235 ml 2X BPW wg ISO z roztworem 0,5% K₂SO₃.

W przypadku stosowania opcjonalnego etapu przednamnażania dodatkowego, np. z użyciem podłoża Rappaport Vassiliadis, należy wykonać rozcieńczenie w stosunku 1:2 (1 część przednamnażanej próbki w 1 części sterylnego bulionu przednamnażającego) lub po prostu przenieść 10 µl podłoża do przednamnażania dodatkowego do probówek z roztworem lizującym Neogen. W przypadku stosowania bulionu tetratianowego (TT) należy przenieść 20 µl podłoża do przednamnażania dodatkowego do probówek z roztworem lizującym Neogen, przy czym nie wolno wytrząsać podłoża do przednamnażania TT ani pipetować z dna probówki do przednamnażania, aby uniknąć przeniesienia osadów.

Specjalne instrukcje dotyczące zatwierdzonych metod

AOAC® Official Methods of AnalysisSM 2016.01

Certyfikat AOAC® Performance TestedSM nr #091501



W programach AOAC Research Institute OMASM oraz PTMSM Molekularny test Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella* okazał się skuteczną metodą wykrywania bakterii *Salmonella*. W Tabeli 3 przedstawiono macierze przetestowane w ramach tego badania.

Tabela 3. Protokoły przednamnażania zgodnie z metodą AOAC OMASM 2016.01 oraz AOAC PTMSM, certyfikat nr 091501. Objętość próbki przenoszona do probówek z roztworem lizującym Neogen wynosi 20 µl.

Macierz próbki		Wielkość próbki	Objętość bulionu przednamnażającego	Temperatura przednamnażania (± 1°C)	Czas przednamnażania (godz.)
Surowa mielona wołowina		25 g	225 ml BPW wg ISO (wstępnie ogrzanego)	41,5	10–24
		325 g	975 ml BPW wg ISO (wstępnie ogrzanego)		
Surowy mielony kurczak		25 g	225 ml BPW wg ISO (wstępnie ogrzanego)	41,5	10–24
		325 g	975 ml BPW wg ISO (wstępnie ogrzanego)	41,5	14–24
Smażony kurczak panierowany		325 g	2925 ml BPW wg ISO	37	18–24
Sucha karma dla psów		25 g	225 ml BPW wg ISO	37	18–24
		375 g	1500 ml BPW wg ISO		
Pieprz czarny, surowa cała krewetka, pakowany surowy szpinak, pasteryzowany przetworzony ser amerykański		25 g	225 ml BPW wg ISO	37	18–24
Płukanka z tusz kurczaka		30 ml	30 ml BPW wg ISO (wstępnie ogrzanego)	41,5	18–24
Gąbka do wymazów z tusz kurczaka		1 gąbka	50 ml BPW wg ISO (wstępnie ogrzanego)	41,5	18–24
Błyskawiczne odtłuszczone mleko w proszku		25 g	225 ml BPW wg ISO	37	20–24
Kakao w proszku		25 g	225 ml BPW wg ISO	37	24–28
Pasteryzowane całe jaja w płynie		100 ml	900 ml BPW wg ISO	37	18–24
Woda irygacyjna po kiełkowaniu		375 ml	3375 ml BPW wg ISO	37	18–24
Kremowe masło orzechowe		25 g	225 ml BPW wg ISO	37	18–24
		375 g	3375 ml BPW wg ISO		
Dried cannabis flower, dried hemp flower ⁽⁴⁾		10 g	90 BPW-ISO	41,5	28-32
Środowiskowe	Zabezpieczony beton	1 gąbka	225 ml BPW wg ISO (wstępnie ogrzanego)	41,5	18–24
	Stal nierdzewna	1 wacik	10 ml BPW wg ISO (wstępnie ogrzanego)	41,5	18–24
	Zabezpieczona płytka ceramiczna	1 gąbka	50 ml BPW wg ISO (wstępnie ogrzanego)	41,5	18–24

Macierz próbki	Wielkość próbki	Objętość bulionu przednamnażającego	Temperatura przednamnażania (± 1°C)	Czas przednamnażania (godz.)	Podłoże do przednamnażania dodatkowego (ml)	Temperatura przednamnażania dodatkowego (± 1°C)	Czas przednamnażania dodatkowego (godz.)
Surowa krewetka, z głową	25 g	225 ml BPW wg ISO	37	18–24	R-V R10: 0,1 ml w 10 ml ^(a)	41,5	4–24

(a) Przenieść 10 µl przednamnożonej próbki do probówek z roztworem lizującym. Patrz krok 4.7 w części Liza.



3M 01/16 -11/16
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⁽⁷⁾ w porównaniu do normy ISO 6579⁽³⁾.

Zakres walidacji: Wszystkie produkty żywnościowe przeznaczone dla ludzi, próbki ze środowiska produkcyjnego (włącznie z próbkami z produkcji pierwotnej), karma i pasza dla zwierząt przez wykonanie testów walidacyjnych na szerokiej gamie produktów spożywczych.

Przygotowanie próbki: Próbki należy przygotować zgodnie z normami EN ISO 6579⁽³⁾ oraz EN ISO 6887⁽¹⁰⁻¹⁵⁾.

Wersja oprogramowania: Patrz certyfikat.

Tabela 4. Protokoły przednamnażania zgodnie z metodą certyfikowaną według NF VALIDATION 3M 01/16 -11/16.

Protokół	Wielkość próbki	Objętość bulionu przednamnażającego	Temperatura przednamnażania (+1°C)	Czas przednamnażania (godz.)	Objętość analizowanej próbki (µl) ^(a)
Protokół 1: <ul style="list-style-type: none"> Szeroka gama przetworzonych produktów spożywczych (z wyłączeniem proszku jajecznego, przetwarzanych warzyw i owoców oraz produktów określonych w innych protokołach) Wszystkie ryby i surowe owoce morza Karma i pasza dla zwierząt Produkcja pierwotna (bez odchodów) 	25 g	225 ml BPW wg ISO	37	18–26	20
Protokół 2: <ul style="list-style-type: none"> Szeroka gama surowej i nieprzetworzonej żywności (z wyłączeniem surowych ryb i surowych owoców morza, a także produktów określonych w innych protokołach) Proszki jajeczne Wszystkie owoce i warzywa Próbki środowiskowe z produkcji żywności 	25 g, 1 szmatka lub 1 wacik	225 ml wstępnie ograniczonego podłoża BPW wg ISO	41,5	18–26	20
Protokół 3: <ul style="list-style-type: none"> Sproszkowane produkty mleczne 	25 g	225 ml BPW wg ISO	37	20–26	20
Protokół 4: <ul style="list-style-type: none"> Produkty kakaowe zawierające ponad 20% kakao 	25 g	225 ml w odtłuszczonej mleku UHT + 0,002% zieleni brylantynowej	37	24–30	20

Protokół 5: • Przyprawy, zioła aromatyczne, koncentraty, herbaty, kawy, dodatki kulinarne	25 g	235 ml 2 x BPW ISO + K ₂ SO ₃ 0,5% + 240 ml odtłuszczonego mleka UHT	37	24–30	10
Protokół 6: • Mięso surowe	25 g	225 ml wstępnie ogrzanego podłoża BPW wg ISO	41,5	10–24	20
Protokół 7: • Produkcja pierwotna (z odchodami)	1 zestaw okładzin na buty	100 ml w bulionie tetratationianowym	37	22–24	20
	25 g	225 ml bulionu tetratationianowego			
Protokół 8: • Pokarm dla niemowląt, płatki śniadaniowe dla niemowląt, sproszkowane produkty mleczne bez probiotyków ^(b)	375 g	3375 ml wstępnie ogrzanego podłoża BPW wg ISO	37	20–26	20
Protokół 9: • Pokarm dla niemowląt, płatki śniadaniowe dla niemowląt, sproszkowane produkty mleczne z probiotykami ^(b)	375 g	3375 ml wstępnie ogrzanego podłoża BPW wg ISO + wankomycyna (10 mg/l)	37	20–26	20

(a) Objętość próbki przenoszona do probówek z roztworem lizującym. Patrz krok 4.7 w części **Liza**.

(b) W przypadku dużych próbek produktów w proszku i płatków śniadaniowych materiał należy powoli wprowadzać do płynu, często go mieszając, by nie powstawały grudy.

UWAGI:

- Próbkę o wielkości przekraczającej 25 g nie były badane w badaniu według NF VALIDATION z wyjątkiem protokołu 8 i 9.
- Krótkie protokoły detekcji są wrażliwe na warunki inkubacji. Należy stosować się do warunków temperaturowych określonych w specyfikacji technicznej. Obowiązkiem użytkownika jest skontrolowanie, czy po wstępnym ogrzaniu bulion przednamnażający osiągnie temperaturę wymaganą przed inkubacją. Czas przygotowywania próbek, czyli opóźnienie między końcem etapu wstępnego ogrzewania bulionu przednamnażającego a początkiem etapu inkubacji próbki żywności, nie powinien przekroczyć 45 minut. Podczas inkubacji zaleca się stosowanie wentylowanego inkubatora.
- **Podczas przenoszenia próbki z przednamnażającego bulionu tetratationianowego (TT) do probówek z roztworem lizującym Neogen nie wolno wytrząsać podłoża do przednamnażania TT ani pipetować z dna probówki do przednamnażania, aby uniknąć przeniesienia osadów. Przeniesienie osadu może skutkować uzyskaniem nieprawidłowych wyników.**
- Zalecane momenty przerwania protokołu występują po etapie przednamnażania lub przed lizą próbki. Bulion z przednamnażoną próbką lub próbkę lizatu można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 72 godziny. Po wyjęciu bulionu przednamnażającego z przechowywania należy wznowić testy od kroku 1 części **Liza**. Po wyjęciu próbki lizatu z przechowywania należy wznowić testy od kroku 8 części **Liza**.

Przygotowanie Tacy Neogen® urządzenia szybkiego ładowania testów do diagnostyki molekularnej

1. Zmoczyć szmatkę lub jednorazowy ręcznik 1–5% (obj./obj., wodnym) roztworem wybielacza do użytku domowego 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

Wkładkę Neogen® bloku chłodzenia do diagnostyki molekularnej należy umieścić bezpośrednio na blacie laboratoryjnym. Stosować blok 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 osiągnęła 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 $100 \pm 1^\circ\text{C}$.

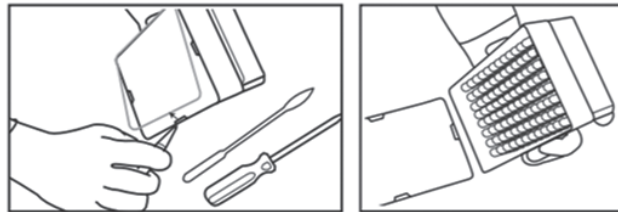
Przygotowanie Urządzenia Neogen® do diagnostyki molekularnej

1. Uruchomić oprogramowanie 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 próbkami 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.

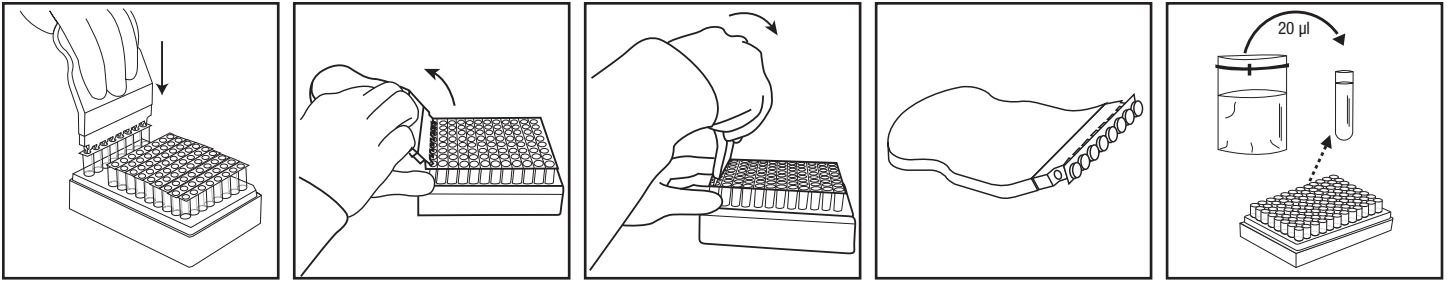
Liza

Za pomocą śrubokrętu lub szpatułki wyjąć dolną część stojaka z próbkami z roztworem lizującym Neogen przed umieszczeniem go we Wkładce Neogen bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej.

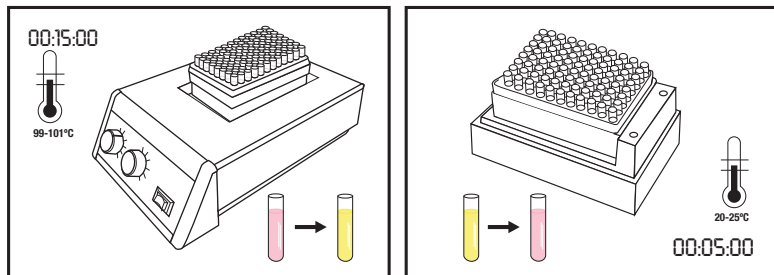


1. Umożliwić ogrzanie próbek z roztworem lizującym Neogen, pozostawiając stojak w temperaturze pokojowej ($20\text{--}25^\circ\text{C}$) na noc (16–18 godzin). Alternatywą dla równoważenia temperatury próbek z roztworem lizującym Neogen do temperatury pokojowej jest pozostawienie próbek z roztworem lizującym Neogen na stole laboratoryjnym na co najmniej 2 godziny, inkubacja próbek z roztworem lizującym Neogen w inkubatorze nastawionym na $37 \pm 1^\circ\text{C}$ przez 1 godzinę lub umieszczenie ich w suchym podwójnym bloku grzewczym na 30 sekund w temperaturze $100 \pm 1^\circ\text{C}$.
2. Odwrócić próbki 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 NC (sterylnego podłoża przednamnażającego) wymagana jest jedna próbka z roztworem lizującym Neogen.
 - 4.1 Taśmy z próbkami z roztworem lizującym Neogen można dociąć do żądanej liczby próbek z roztworem lizującym Neogen. Zależnie od sytuacji należy dobrać liczbę pojedynczych próbek z roztworem lizującym Neogen lub taśm złożonych z 8 próbek. Umieścić próbki z roztworem lizującym Neogen w pustym stojaku.
 - 4.2 Aby uniknąć zanieczyszczeń krzyżowych, należy otwierać taśmy z próbkami z roztworem lizującym Neogen pojedynczo i na każdym etapie przenoszenia stosować nową końcówkę pipety.
 - 4.3 Przednamnożoną próbkę należy przenieść do próbek z roztworem lizującym Neogen w opisany poniżej sposób:

Najpierw przenieść każdą przednamnożoną próbkę do pojedynczej próbki z roztworem lizującym Neogen.
Na końcu przenieść NC.
 - 4.4 Do zdejmowania korków taśmy z próbkami z roztworem lizującym Neogen (po jednej taśmie na raz) należy wykorzystać Narzędzie Neogen® do zakładania/zdejmowania korków próbek do diagnostyki molekularnej – Liza.
 - 4.5 Zdjąć korek próbki z roztworem lizującym Neogen – jeśli lizat będzie zachowany do celów ponownego wykonania testu, umieścić korki w czystym pojemniku do ponownego założenia po wykonaniu lizy.
 - 4.5.1 Odnośnie postępowania z lizatem patrz Załącznik A.
 - 4.6 W przypadku lepkich próbek przed pobraniem próbki od strony przefiltrowanej wymieszać torbę do przednamnażania.
 - 4.7 Przenieść 20 μl próbki do próbki z roztworem lizującym Neogen, jeśli nie określono inaczej w tabeli z protokołami (przykładowy protokół 5 oraz przednamnażanie dodatkowe w RVS lub w przypadku stosowania próbek środowiskowych z buforem neutralizującym).



5. Powtarzać kroki od 4.4 do 4.7 do momentu dodania każdej indywidualnej próbki do odpowiedniej probówki z roztworem lizującym Neogen w taśmie.
6. Po przeniesieniu wszystkich próbek przenieść 20 µl NC (jałowe podłoże przednamnażające, np. BPW) do probówki z roztworem lizującym Neogen. Nie stosować wody jako NC.
7. Upewnić się, że temperatura Wkładki Neogen bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej wynosi $100 \pm 1^\circ\text{C}$.
8. Umieścić odkryty stojak na probówce 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 Urzędzeniu 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 chłodzenia do diagnostyki molekularnej, stosowana w temperaturze otoczenia, powinna znajdować się bezpośrednio na stole laboratoryjnym. 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.



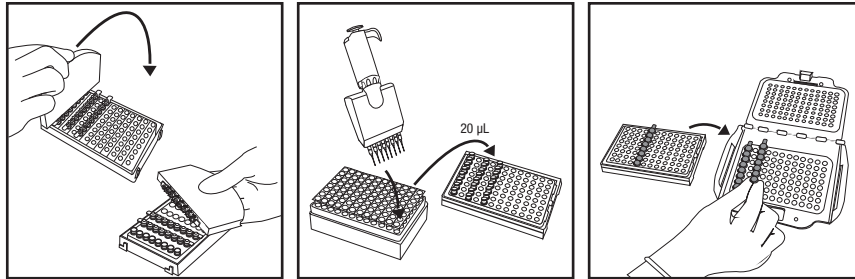
Amplifikacja

1. Dla każdej próbki oraz NC wymagana jest jedna probówka reagentowa Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella*.
 - 1.1 Taśmy z probówkami można dociąć do pożądanej liczby probówek. Dobrać wymaganą liczbę pojedynczych probówek reagentowych Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella* lub taśm złożonych z 8 probówek.
 - 1.2 Probówki reagentowe należy umieścić na pustym stojaku.
 - 1.3 Nie wolno dopuścić do wstrząśnięcia granulek reagentowych na dnie probówek.
2. Wybrać jedną probówkę Kontroli reagenta i umieścić ją w stojaku.
3. Aby uniknąć zanieczyszczeń krzyżowych, należy otwierać taśmy z probówkami reagentowymi pojedynczo i na każdym etapie przenoszenia stosować nową końcówkę pipety.
4. Przenieść poszczególne lizaty do probówki reagentowej Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella* oraz do probówki Kontroli Neogen reagenta w sposób opisany poniżej:

Najpierw przenieść poszczególne próbki lizatu do osobnych probówek reagentowych, a następnie przenieść próbkę NC. **Na końcu** nawodnić probówkę Kontroli Neogen reagenta.

5. Do zdejmowania korków probówek reagentowych Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella* 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 1/2 płynu (unikać osadu) w probówce z roztworem lizującym Neogen do odpowiedniej probówki reagentowej Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella*. 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 – *Salmonella* znajdujących się w taśmie.
- 5.3 Probówki reagentowe Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella* 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 od 5.1 do 5.3, aby przenieść 20 µl lizatu NC do probówki reagentowej Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella*.
- 5.6 Przenieść **20 µl lizatu NC do probówki Kontroli Neogen reagenta**. 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 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 60 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 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 reagentowych zawierających DNA po amplifikacji. Dotyczy to probówek reagentowych Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella*, probówek Kontroli Neogen reagenta, probówek reagentowych oraz probówek Kontroli Neogen macierzy. Zanieczyszczone uszczelnione probówki reagentowe należy utylizować, namaczając je w 1–5% (obj./obj.; wodnym) roztworze domowego wybielacza 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), rozpoczynając od transferu z głównego podłoża przednamnażającego Neogen BPW wg ISO do drugorzędowych bulionów przednamnażających, a następnie izolując i potwierdzając izolaty 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 – *Salmonella* 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.

Typ 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

W kontekście walidacji NF VALIDATION wszystkie próbki określone jako dodatnie w badaniu Molekularnym testem Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella* należy potwierdzić, wykonując jeden z następujących testów:

Opcja 1: Zastosowanie normy ISO 6579⁽³⁾, począwszy od podłoża przednamnażającego w postaci buforowanej wody peptonowej⁽³⁾.

Opcja 2: Wdrożenie metody potwierdzającej, która polega na wykonaniu następujących czynności: Przenieść 0,1 ml podłoża przednamnażającego BPW wg ISO⁽³⁾ lub tetracionianowych bulionów przednamnażających (próbki produkcji pierwotnej) do 10 ml bulionu RVS. Inkubować przez 24 ± 3 godziny w temperaturze 41,5°C. Umieścić na agarze XLD (ksyloza, lizyna, deoksyholan)⁽³⁾ lub na agarze chromogenicznym specyficznym dla bakterii *Salmonella*. Wykonać aglutynację lateksową za pomocą testu lateksowego Oxoid *Salmonella* bezpośrednio na wyizolowanych koloniach.

Opcja 3: Wykorzystanie sond kwasu nukleinowego w sposób opisany w normie EN ISO 7218⁽⁵⁾ zastosowanych na wyizolowanych koloniach z agaru XLD lub chromatycznego (patrz opcja 1 lub 2). Tego badania nie można wykonywać za pomocą Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella*.

Opcja 4: Zastosowanie innej metody zgodnie z certyfikatem NF VALIDATION, której zasada musi się różnić od Molekularnego testu Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella*. 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 w badaniu Molekularnym testem Neogen do wykrywania 2 – *Salmonella*, brak potwierdzenia jedną z powyższych metod, a w szczególności w przypadku testu aglutynacji lateksowej) 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 próbkę 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 próbkę.
5. Umieścić mieszane 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 próbkami 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 Analytical Manual. Chapter 5: *Salmonella*., Section C-24. November 2018 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 4.10. Isolation and identification of *Salmonella* from meat, poultry, pasteurized egg, and siluriformes (fish) products and carcass and environmental sponges. Effective Date: 2 January 2019.
3. ISO 6579-1. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. Skontaktować się z przedstawicielem firmy Neogen Food Safety, aby uzyskać egzemplarz tego dokumentu.
7. ISO 18593. Microbiology of the food chain – Horizontal methods for surface sampling.
8. US Food and Drug Administration – *Bacteriological Analytical Manual*, Medium M111: Nonfat Dry Milk (Reconstituted). January 2011.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain - part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
10. ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
11. ISO 6887-2:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products.
12. ISO 6887-3:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products.
13. ISO 6887-4:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
14. ISO 6887-5:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
15. ISO 6887-6:2013. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage.

Objaśnienie symboli
info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.

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

Neogen Ireland, Ltd.

Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland



Neogen Corporation

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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00869A



製品情報

Neogen® 分子検出アッセイ2 - サルモネラ

製品の概要および用途

Neogen®分子検出アッセイ2 - サルモネラは、Neogen®分子検出システムを用いて前培養した食品、飼料および食品・飼料製造工程環境検体中のサルモネラ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LAMP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、任意の別の方法または行政の規制によって指定された通りに確認する必要があります^(1,2,3)。

Neogen分子検出アッセイ2 - サルモネラは、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いません。たとえば、Neogenは、本製品を医薬品、化粧品、臨床または動物診断検体の検査で使用することについて検証していません。Neogen分子検出アッセイ2 - サルモネラは、可能性のあるすべての食品や食品製造工程、検査プロトコル、あるいはすべての菌株について評価されたわけではありません。

すべての検査法と同様に、前増菌培地のメーカーや組成、品質などの要因が結果に影響する場合があります。採取方法、検査プロトコル、検体の調製、取り扱い、および検査手技などの要因が結果に影響する場合があります。Neogenは、検査方法がお客様の基準を確実に満たすことを確認するために、お客様の環境において、特定の食品および微生物負荷生菌保存効力テスト(チャレンジテスト)を用いて十分な数の検体で、前増菌培地を含む検査方法を評価することをお勧めします。

Neogenは、緩衝ペプトン水 (BPW) ISOを用いてNeogen病原菌検出アッセイ2 - サルモネラを評価しました。

Neogen®分子検出装置は、アッセイのライシスステップ中に熱処理を行った検体を測定することを目的としており、検体中に存在する微生物を破壊するように設計されています。アッセイのライシスステップ中に適切な熱処理を行っていない検体は、潜在的バイオハザードとみなされる可能性がありますので、Neogen分子検出装置には入れないでください。

Neogen食品安全性部門は、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分子検出アッセイ2 - サルモネラ検査キットは、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®ライシス溶液 (LS)	クリアチューブに入ったピンク色の溶液	96検体分 (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、調製済み
Neogen®分子検出アッセイ2 - サルモネラ試薬チューブ	緑のチューブ	96検体分 (8連チューブ12セット)	凍結乾燥特異的増幅試薬および検出試薬	調製済み
予備キャップ	緑のキャップ	96検体分 (8連キャップ12セット)		調製済み
Neogen®試薬コントロール (RC)	フリップトップ式クリアチューブ	16検体分 (チューブ8本入り2パウチ)	凍結乾燥コントロールDNA、増幅試薬および検出試薬	調製済み

陰性コントロール (NC) (キットには付属しません) は、BPW ISOなどの滅菌済前増菌培地です。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分子検出システムおよびNeogen分子検出アッセイ2 - サルモネラ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: 回避できない場合、物的損害が起り得る危険な状況を示します。

▲ 警告

Neogen分子検出アッセイ2 - サルモネラは、ヒトまたは動物の病態診断に使用しないでください。

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⁾または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検査を行ってください。
- Neogen分子検出アッセイ2 - サルモネラは、外箱表示および製品情報に記載のとおり保管してください。
- Neogen分子検出アッセイ2 - サルモネラは、有効期限までに必ず使用してください。
- Neogen病原菌検出アッセイ2 - サルモネラは、社内または第三者による検証を行った食品、飼料、食品加工環境検体に使用してください。
- Neogen分子検出アッセイ2 - サルモネラは、社内または第三者による検証を行った表面、殺菌剤、プロトコル、菌株のみに使用してください。
- アリルスルホン酸塩添加中和緩衝液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 Neogenライシスチューブに滴下します。アリルスルホン酸複合体含有中和緩衝液を含む製品は、Neogen®検体処理製品:RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2Gおよび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:

- 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病原菌検査を行ってください。培養済み前増菌培地および培養済み前増菌培地と接触する機器または接触面には、人体に有害となりうる量の病原菌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。
- 前増菌後の培地や、増幅後の試薬チューブ内容物には触れないでください。
- 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考えられる可能性がありますので、Neogen分子検出装置内には入れないでください。

アッセイ準備中の交差汚染に伴う危険を回避するために:

- 手袋を必ず着用してください(ユーザー保護と遺伝子の混入を避けるため)。

環境汚染に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。
- 適切な較正済みの温度計を使用して、Neogen®分子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分子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の使用を推奨します。
- 検体ごとに新しいピペットチップを使用してください。
- GLP(医薬品安全性試験実施基準)に従って検体を前増菌ブロスからライシスチューブに移してください。ピペットの汚染を回避するため、中間的な滴下ステップを追加することもできます。例えば、前増菌された各検体を滅菌チューブに滴下することができます。
- 利用可能な場合は、殺菌灯が装備された分子生物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)に希釈したの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)に希釈したの家庭用漂白液に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。
- 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)をご覧ください。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、お近くのNeogen販売担当者または販売店までお問い合わせください。

検査方法を選択する際には、採取方法、検査プロトコル、検体の準備、取り扱い、検査手技、検体自体などの外的要因が結果に影響す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、適切な基質および微生物負荷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顧客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食品安全性製品を用いて得られた結果は、検査を実施した食品基質または工程の品質を保証するものではありません。

各種食品基質の検査方法の評価にご利用いただくため、NeogenではNeogen®分子検出基質コントロールキットをご用意しました。必要に応じて、基質コントロール (MC) を使用し、基質がNeogen分子検出アッセイ2 - サルモネラの検査結果に影響を及ぼすかどうかを判定してください。Neogenの検査法を採用する場合、または新規や由来の不明な基質、あるいは原材料または工程が変更された基質基質を検査する場合は、バリデーション期間中に、基質を代表する複数の検体 (由来の異なる検体) を検査してください。

基質は、成分や加工など固有の特性を備える製品の種類と定義できます。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、商品性または特定の目的への適合性に関する保証を含むがこれに限定されない、いかなる種類の保証も負いかねます。Neogen食品安全性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。製品の欠陥が疑われる場合は、判明した時点から60日以内に速やかにNeogenに通知し、製品をNeogenに返品する必要があります。ご不明な点がございましたら、Neogenの担当者またはNeogenの正規代理店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する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 - サルモネラは2~8°Cで保管し、冷凍しないでください。暗所で保管してください。キット開封後は、ホイルパウチが破損していないことを確認してください。パウチが破損している場合は、使用しないでください。開封後、使用しない試薬チューブは、凍結乾燥試薬の安定性を保つため、乾燥剤と共に再密閉可能なパウチ内に必ず保管してください。再密閉したパウチは2~8°Cで60日間保存することができます。

Neogen分子検出アッセイ2 - サルモネラは使用期限までに必ず使用してください。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分子検出アッセイ2 - サルモネラ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) に希釈したの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分子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分子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、「バリデーション済みの方法」の項を参照してください。

表3. AOAC® *Official Method of Analysis*SM **2016.01** および AOAC® *Performance Tested*SM 認定証#**091501** に従う前増菌プロトコル。

表4. NF VALIDATION 認定証**3M 01/16 -11/16** に従う前増菌プロトコル。

検体の前増菌

表2、3、4には、食品、飼料および環境検体の一般増菌プロトコルのガイドラインを示しています。

この検査法がお客様の基準に合致するかを確かめるため、別の採取プロトコルまたは希釈率でバリデーションしていただき、お客様の責任で使用する可否をご判断ください。

食品

- BPW ISO増菌培地を、試験済み基質に従って検査室周囲温度または41.5 ± 1°Cに平衡させます。表2、3、4をご覧ください。
- 増菌培地と検体を無菌的に混合します。
- ブレンダー、混合器またはハンドミキサーで2 ± 0.2分間、またはすべての塊が完全に分解するまで十分にホモジナイズし、前増菌懸濁液を均質にします⁽¹⁰⁻¹⁵⁾。
 - 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、フィルターバッグの使用を推奨します。
 - 水中で膨張し、高粘度の基質（シリアル、でんぷんなど）は、粘度が適切に低下するまでさらに希釈を行うか（1:10以上）、BPS (ISO)⁽¹⁰⁻¹³⁾に滅菌蒸留水で溶解した1% (w/v) αアミラーゼを追加します。
 - 検体量が大きい粉ミルクおよびシリアルに関しては、塊を崩すため良くかき混ぜながら、検体を液体にゆっくり追加します。
- 適切なプロトコル表の概要に従って培養します（表2、3、4を参照）。

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、殺菌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、Dey-Engley (D/E) 中和プロスまたはリージンプ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緩衝液の使用を選択する場合には、汚染された製品の在庫につながる偽陰性の伴う危険を回避するために、検査を行う前に増菌環境検体の1:2の希釈液（検体1に対し滅菌増菌プロス1）を行う必要があります。別の方法としては、中和緩衝前増菌プロス10 µL Neogenライシチューブに滴下します。

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 cm² (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を2方向に拭くか（左から右、次に上向きから下向きに）、検査室現行のプロトコルまたはFDA BAM⁽¹⁾、USDA FSIS MLG⁽²⁾またはISO 18593:2018⁽⁷⁾に従って環境検体を採取します。

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バリデートしていただき、お客様の責任で使用の可否をご判断ください。

- BPW ISO前増菌培地を検査する基質によっては41.5 ± 1°Cにあらかじめ加熱します。表2、3、4をご覧ください。
- 増菌培地と検体を無菌的に混合します。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。適切なプロトコル表の概要に従って培養します。表2、3、4をご覧ください。

表2. 一般的な前増菌プロトコル。

検体基質	検体量	前増菌プロス量	増菌温度 (± 1°C)	前増菌時間 (時間)	検体の分析量 (µL) ^(a)
プロトコル 1 食品製品（エッグパウダーおよび他のプロトコルで規定されている製品を除く） ^(b)	25 g	225 mL BPW ISO	37	18~26	20
プロトコル 2 生および未処理の食品、エッグパウダー、動物飼料および環境検体 ^(c)	25 g	225 mL BPW ISO (加温済み)	41.5	18~26	20
プロトコル 3 パウダーにした乳製品（乳児用調製粉乳、大豆ベースの乳児用乳児用調製粉乳を含む）	25 g	225 mL BPW ISO	37	20~26	20
プロトコル 4 ココアベースの製品（パウダー、チョコレート、菓子類など）	25 g	プリリアントグリーン色素を0.002%含む滅菌した100 g/Lの無脂肪粉ミルク225 mL ^(d,e,f)	37	24~30	20
プロトコル 5 その他: スパイス、芳香ハーブ、濃厚飼料、インスタントの茶およびコーヒー、固形ブイヨンなど	25 g	0.5% K ₂ SO ₃ を含む2X BPW ISO 235 mL + 滅菌した100 g/Lの粉ミルク240 mL ^(d,g,h)	37	24~30	10
プロトコル 6 クルミ、またはクルミを含むミックスナッツ（このプロトコルは、ピーカンナッツ、アーモンド、ピスタチオ、カシューナッツ、栗、マカデミアナッツ、ブラジルナッツおよびピーナッツなどの他ナッツ類にも有効）	25 g	滅菌した100 g/Lの無脂肪粉ミルク225 mL ^(d)	37	18~24	20

- (a) ライシス溶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4.7を参照。
- (b) プロトコル1で検査する製品の例：調整済みの料理、デリのサラダ、カスタード。
- (c) プロトコル2で検査する製品の例：生肉、冷凍野菜、すべてのチーズ、発酵乳、生サラダ(レタス、バタビアレタス)。
- (d) 無脂肪UHT乳は無脂肪粉ミルクの代用となります。
- (e) 無脂肪乳225 mLあたり1%水性ブリリアントグリーン色素溶液0.45 mLで、ブリリアントグリーン色素の最終濃度が0.002% (0.02 g/L) となります。
- (f) 滅菌無脂肪粉ミルクを調製するには、100 gの無水無脂肪粉ミルク1 gを1 Lの蒸留水または精製水に懸濁させます。溶解するまで渦巻状に攪拌します。121°Cのオートクレーブで15分処理します。2~30°Cで保存します⁽⁸⁾。
- (g) 1000 mLのBPW ISOあたり5 gのK₂SO₃で、K₂SO₃で、最終濃度が0.5%となります。
- (h) 滅菌した0.5% K₂SO₃を含む滅菌した2X BPW ISO 235 mLに、100 g/Lの無脂肪粉ミルク240 mLを添加する必要があります。オプションの二次前増菌ステップを使用する場合には(Rappaport Vassiliadis培地など)、1:2の希釈(前増菌検体1に対し滅菌前増菌プロス1)を行うか、単に二次増菌検体10 µLをNeogenライシス溶液チューブに移すことが必要となります。テトラチオネート(TT)プロスを使用する場合には、二次前増菌検体20 µLをNeogenライシス溶液チューブに移しますが、このとき沈殿物をチューブに移さないようにTT前増菌検体をホルテックスにかけたり前増菌検体チューブの底からピペットで吸い上げたりしないでください。

バリデートされた方法に関する具体的な指示
AOAC® Official Methods of AnalysisSM 2016.01
AOAC® Performance TestedSM 認定証#091501



AOAC Research Institute OMASMおよびPTMSMプログラムにおいて、Neogen分子検出アッセイ2 - サルモネラは、サルモネラ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基質を表3に掲載します。

表3. AOAC OMASM 2016.01およびAOAC PTMSM 認定証#091501に基づく増菌プロトコル。Neogenライシス溶液チューブに移す検体量は20 µLです。

検体基質	検体量	前増菌プロス量	増菌温度 (± 1°C)	前増菌時間(時間)
生の牛ひき肉	25 g	225 mL BPW ISO (加温済み)	41.5	10~24
	325 g	975 mL BPW ISO (加温済み)		
生ひきチキン	25 g	225 mL BPW ISO (加温済み)	41.5	10~24
	325 g	975 mL BPW ISO (加温済み)	41.5	14~24
調理済みチキンカツ	325 g	2,925 mL BPW ISO	37	18~24
ドライドッグフード	25 g	225 mL BPW ISO	37	18~24
	375 g	1,500 mL BPW ISO		
黒コショウ、生のエビ全体、包装された生のハウレンソウ、低温殺菌した米国産チーズ	25 g	225 mL BPW ISO	37	18~24
チキン洗浄液	30 mL	30 mL BPW ISO (加温済み)	41.5	18~24
チキンスポンジ	スポンジ1個	50 mL BPW ISO (加温済み)	41.5	18~24
インスタント無脂肪粉ミルク	25 g	225 mL BPW ISO	37	20~24
ココアパウダー	25 g	225 mL BPW ISO	37	24~28
低温殺菌液状全卵	100 mL	900 mL BPW ISO	37	18~24
使用済みスプラウト灌漑用水	375 mL	3,375 mL BPW ISO	37	18~24
クリーム状ピーナツバター	25 g	225 mL BPW ISO	37	18~24
	375 g	3,375 mL BPW ISO		

乾燥大麻の花、乾燥麻の花 ⁽⁴⁾		10 g	90 BPW-ISO	41.5	28~32
検査器具	密封コンクリート	スポンジ1個	225 mL BPW ISO (加温済み)	41.5	18~24
	ステンレススチール	スワブ1本	10 mL BPW ISO (加温済み)	41.5	18~24
	密封セラミックタイル	スポンジ1個	50 mL BPW ISO (加温済み)	41.5	18~24

検体基質	検体量	前増菌プロ ス量	増菌温度 (±1°C)	前増菌時間 (時間)	二次前増菌培 地 (mL)	二次前増菌温 度 (±1°C)	二次前増菌時間 (時間)
生のエビ、頭 付き	25 g	225 mL BPW ISO	37	18~24	R-V R10: 0.1 mLを10 mL へ ^(a)	41.5	4~24

(a) 10 µLの前増菌検体をライシス溶液チューブに移す。ライシスセクションのステップ4.7を参照。

AFNOR CertificationによるNF VALIDATION



3M 01/16 -11/16
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認証を参照してください。

NF VALIDATIONにより認証された方法は、ISO 6579⁽³⁾よりもISO 16140-2⁽⁷⁾に準拠しています。

バリデーションの範囲: ヒト用食品製品、製造環境検体 (一次製造検体を含みます)、ペットフードおよび動物飼料。広範囲の植物のバリデーションアッセイの実施によります。

検体の調製: EN ISO 6579⁽³⁾およびEN ISO 6887⁽¹⁰⁻¹⁵⁾に従って検体を調製してください。

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 認定法3M 01/16 -11/16に従う前増菌プロトコル。

プロトコル	検体量	前増菌プロス量	増菌温度 (+1°C)	前増菌時間 (時間)	検体の分析量 (μL) ^(a)
プロトコル 1: ● 広範囲の加工食物製品 (エッグパウダー、加工した果物および野菜、他のプロトコルで規定される製品を除く) ● すべての魚および生のシーフード製品 ● ペットフードおよび動物飼料 ● 一次生産 (非糞便)	25 g	BPW ISO 225 mL	37	18~26	20
プロトコル 2: ● 広範囲の生および未加工食品 (鮮魚および生のシーフード、他のプロトコルで規定される製品を除く) ● エッグパウダー ● すべての果物および野菜 ● 食品生産環境検体	25 gまたは ワイプ1枚または スワブ1本	加温済みBPW ISO 225 mL	41.5	18~26	20
プロトコル 3: ● パウダーにした乳製品	25 g	BPW ISO 225 mL	37	20~26	20
プロトコル 4: ● ココア20%超を含むココアベースの製品	25 g	無脂肪UHT乳 225 mL + プリリアントグリーン 0.002%	37	24~30	20
プロトコル 5: ● スパイス、芳香ハーブ、濃厚飼料、茶、コーヒー、刻んだ食品	25 g	2 x BPW ISO 235 mL + K ₂ SO ₃ 0.5% + 無脂肪UHT乳 240 mL	37	24~30	10
プロトコル 6: ● 生肉	25 g	加温済みBPW ISO 225 mL	41.5	10~24	20
プロトコル 7: ● 一次生産 (糞便)	ブーツ拭き取り検体1本	テトラリオネートブロスに100 mL	37	22~24	20
	25 g	テトラリオネートブロスに225 mL			
プロトコル 8: ● 乳児用調製粉乳、乳児用シリアル、プロバイオティクス抜きパウダー状乳製品 ^(b)	375 g	加温済みBPW ISO 3375 mL	37	20~26	20
プロトコル 9: ● 乳児用調製粉乳、乳児用シリアル、プロバイオティクス入りパウダー状乳製品 ^(b)	375 g	加温済みBPW ISO 3375 mL + バンコマイシン (10 mg/L)	37	20~26	20

(a) ライシス溶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4.7を参照。

(b) 検体量が大きい粉ミルクおよびシリアルに関しては、塊を崩すため良くかき混ぜながら、検体を液体にゆっくり追加します。

注記:

- 25 g以上の検体は、プロトコル8および9以外のNF VALIDATION検査で評価されていません。
- 短い検出プロトコルは培養条件の影響を受けやすくなります。技術規格に示されている温度条件に従う必要があります。ユーザーは前増菌プロスの加温が培養前に必要な温度に達していることを確認しなければなりません。検体調製の時間、前増菌プロスの加温ステップ終了と食品検体の培養ステップの開始との時間差が45分を超えないようにしてください。培養中は、換気装置つき培養器を使用することを推奨します。
- テトラチオネート (TT) ブロス前培養検体をNeogenライシスチューブに移す場合には、沈殿物をチューブに移さないようにTT前増菌検体をボルテックスにかけたり前増菌検体チューブの底からピペットで吸い上げたりしないでください。沈殿物を移すと、結果が無効になることがあります。
- 推奨されるプロトコル中断ポイントは、前増菌後または検体ライシス後です。前増菌プロスまたは検体ライセートは、2-8°Cで最大72時間保管することができます。前増菌プロスを保管場所から取り出したら、ライシスセクションのステップ1から再開してください。検体ライシスを保管場所から取り出したら、ライシスセクションのステップ8から再開してください。

Neogen®分子検出スピードローダートレイの準備

1. 水で1～5% (v/v) に希釈したの家庭用漂白液で湿らせた布か使い捨て用タオルを使って、Neogen分子検出スピードローダートレイを拭きます。
2. 水でNeogen分子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等で、Neogen分子検出スピードローダートレイを拭きます。
4. 使用前に、Neogen分子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®分子検出チルブロックインサートの準備

Neogen® 分子検出チルブロックインサートを作業台の上に直に置きます。ブロックは検査室の室温 (20～25°C) で使用します。

Neogen®分子検出ヒートブロックインサートブロックインサートの準備

Neogen® 分子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分子検出ヒートブロックインサートブロックインサートが設定温度に達したら、温度を維持します。

注:使用するヒーターユニットによっては、Neogen分子検出ヒートブロックインサートを約30分かけて設定温度に到達させます。適切な較正済みの温度計 (例: 浸線付温度計またはデジタル熱電対温度計。全浸没温度計は使用しないこと) を指定の部位に設置し、Neogen分子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。

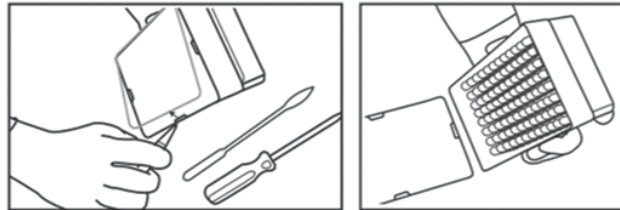
Neogen®分子検出装置の準備

1. Neogen®病原菌検出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食品安全性門の営業担当者までお問い合わせください。
2. Neogen分子検出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分子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分子検出装置自動検出システム用は、反応チューブと共にNeogen分子検出スピードローダートレイを入れる前に、待機状態になっている必要があります。この加熱ステップには約20分かかり、装置のステータスバーがオレンジ色に点灯します。装置の準備ができると、ステータスバーは緑色に変わります。

ライシス

Neogen分子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クルでNeogenライシスチューブラックの底部を取り外します。



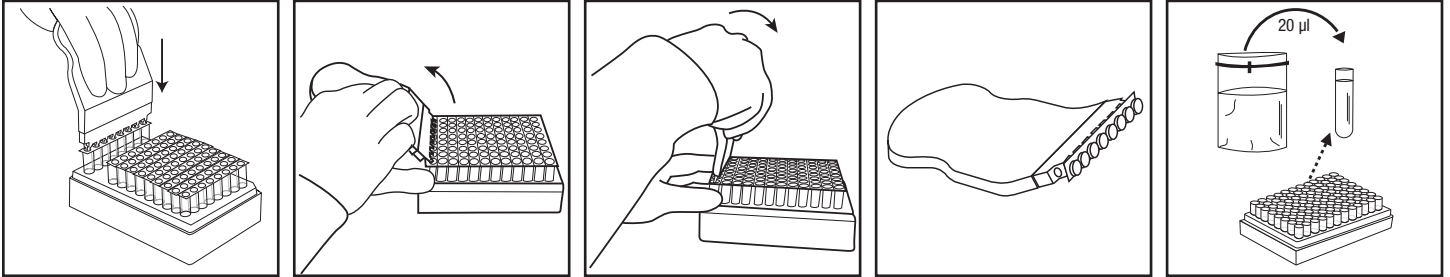
1. Neogenライシスチューブは、ラックに一晩 (16～18時間) 静置して、室温 (20～25°C) に戻します。Neogenライシスチューブを室温に戻す別の方法としては、Neogenライシスチューブを作業台の上に2時間以上静置するか、Neogenライシスチューブを37 ± 1°Cの培養器内で1時間保温するか、Neogenライシスチューブをドライダブルブロックヒーターに入れて100 ± 1°Cで30秒間加熱します。
2. キャップを閉めた状態のライシスチューブを反転させて中の液を混合させます。4時間以内に次のステップに進みます。
3. 培養器から前増菌ブロスを取り出します。
4. 検体およびNC検体 (滅菌増菌ブロス) のそれぞれにつきNeogenライシスチューブ1本が必要です。
 - 4.1 Neogenライシスチューブのストリップは、必要な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ライシスチューブまたは8連チューブのストリップの数を選択してください。Neogenライシスチューブを空のラックに置きます。
 - 4.2 交差汚染を回避するため、Neogenライシスチューブのキャップは一度に1ストリップずつ外し、滴下ステップごとに新しいピペットチップを使用してください。
 - 4.3 以下に記載のとおり、前増菌した検体をNeogenライシスチューブに滴下します:

最初に、増菌した各検体を各Neogenライシスチューブに滴下します。**最後に**NCを滴下します。

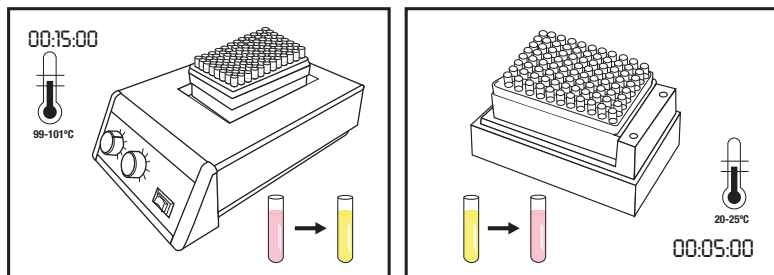
- 4.4 Neogen®分子検出キャップ/デキャップツール - 溶解、Neogenライシスチューブのキャップを一度に1ストリップずつ外します。
- 4.5 Neogenライシスチューブのキャップを廃棄します。ライセートを再検査用に保存する場合は、キャップを清潔な容器に入れておき、ライシス後に再度キャップを嵌めます。
 - 4.5.1 保存したライセートの処理については、付録Aを参照してください。

4.6 粘性検体を扱う場合には、ろ過側から採取する前に、前増菌バッグを撈拌します。

4.7 プロトコル表に他の規定がない限り、検体20 µLをNeogenライシス溶液チューブに移します(プロトコル5およびRVS中でのび二次前増菌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)。



5. 各検体が、ストリップの対応するNeogenライシスチューブに添加されるまでステップ4.4～4.7を繰り返します。
6. すべての検体を移したら、NC(ネガティブコントロール用滅菌増菌ブロス、例:BPW) 20 µLをNeogenライシスチューブに滴下します。水は陰性コントロールとして使用しないでください。
7. Neogen分子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分子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分子検出装置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ライシスチューブブラックを取り出し、Neogen分子検出ヒート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。室温で使用されたNeogen分子検出ヒートブロックインサートは、作業台の上に直に置いてください。冷却されると、ライシス溶液はピンク色に戻ります。
10. Neogen分子検出ヒートブロックインサートからNeogenライシスチューブブラックを取り出します。



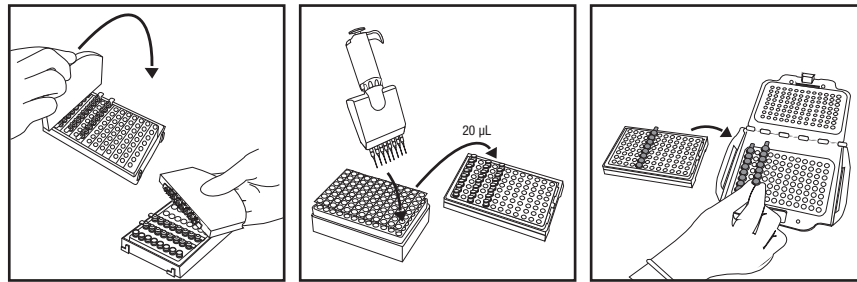
増幅

1. 検体およびNCのそれぞれにつきNeogen分子検出アッセイ2 - サルモネラ試薬チューブ1本が必要です。
 - 1.1 チューブのストリップは、必要な数に合わせてカットできます。各Neogen分子検出アッセイ2 - サルモネラ試薬チューブまたは8連チューブのストリップの数を選択してください。
 - 1.2 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撈拌しないでください。
2. 試薬コントロールチューブを1本選択して、ラックに置きます。
3. 交差汚染を回避するため、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、滴下ステップごとに新しいピペットチップを使用してください。
4. 下記のように、各ライセートをNeogen分子検出アッセイ2 - サルモネラ試薬チューブおよびNeogen試薬コントロールチューブに滴下してください:

最初に各検体ライセートを個々の試薬チューブに移し、次にNCを移します。**最後に**Neogen試薬コントロールチューブを水和します。

5. Neogen®分子検出キャップ/デキャップツール - 試薬用を使用して、Neogen分子検出アッセイ2 - サルモネラ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(沈殿物は避けてください)から取り、対応するNeogen分子検出アッセイ2 - サルモネラ試薬チューブに分注します。ペレットが撈拌されないよう、一定の角度で分注します。ピペット操作で5回で静かに混合します。

- 5.2 個々の検体ライセートをストリップ内の対応するNeogen分子検出アッセイ2 - サルモネラ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分子検出アッセイ2 - サルモネラ試薬チューブに同梱の予備キャップで蓋をし、Neogen分子検出キャップ/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 検査する検体数について、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液を滴下したら、ステップ5.1～5.3を繰り返してNCライセート20 μ LをNeogen分子検出アッセイ2 - サルモネラ試薬チューブに滴下します。
- 5.6 **Neogen試薬コントロールチューブにNCライセート20 μ Lを滴下します。**ペレットが攪拌されないよう、一定の角度で分注します。ピペット操作で5回で静かに混合します。
6. 清潔な、殺菌済みNeogen分子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分子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病原菌検出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。選択された装置の蓋が自動的に開きます。
9. Neogen分子検出装置にNeogen分子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60分ほどで判定されますが、陽性の場合にはこれより早く検出されます。
10. アッセイ終了後、Neogen分子検出スピードローダートレイをNeogen分子検出装置から取り出し、チューブを水で1～5% (v/v) に希釈した家庭用漂白液に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分子検出アッセイ2 - サルモネラ試薬、Neogen試薬コントロール、Neogen基質コントロールチューブが含まれます。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

アルゴリズムが核酸増幅の結果より得られた光出力曲線を解釈します。結果はソフトウェアが自動的に解析し、結果に応じて色分けされます。陽性または陰性の結果は、それぞれが持つ固有の曲線パラメータを解析することにより特定されます。結果が陽性と推定される場合はリアルタイムでレポートされますが、陰性および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書、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Neogen BPW ISO前増菌検体を二次前増菌プロスに移し、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: 陰性検体がシステムとして0を返さない場合でも、Neogen分子検出アッセイ2 - サルモネラ増幅試薬は「バックグラウンド」相対発光量 (RLU) を有します。

異常な光出力がみられるなどの稀なケースについては、アルゴリズムがこれを「再検査してください」と表示します。Neogen社はお客様に、「再検査」検体に対して検査を再度行うことを推奨します。その結果が続いて再検査であった場合は、任意の別の方法または行政の規制によって指定されたとおりに確認検査を行ってください。

ウェルタイプ	ウェルの結果の記号	結果	判定
検体		陽性	検体な標的病原体について陽性と推定されます。
検体		陰性	検体な標的病原体について陰性と推定されます。
検体		阻害	検体基質がアッセイを阻害しました。差異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。差異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。差異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

NF VALIDATIONに照らしてNeogen病原菌検出アッセイ2 - サルモネラにより陽性と特定される検体はすべて、以下の検査のうちの一つにより確認する必要があります：

オプション1: 緩衝ペプトン水⁽³⁾前増菌から始めて、ISO 6579⁽³⁾基準を使用する。

オプション2: 以下で構成される確認方法を実施します: BPW ISO⁽³⁾前増菌検体0.1 mLテトラチオネートブロス前増菌検体(一次生産検体)を10 mLのRVSブロスに移します。41.5°Cで24 ± 3時間培養します。サルモネラに特異的なキシロース・リジン・デソキシコール酸 (XLD)⁽³⁾カンテン培地または色素生成カンテン培地にストリーキングします。単離したコロニーに対し直接Oxoidサルモネララテックス検査によりラテックス凝集を行います。

オプション3: EN ISO 7218⁽⁵⁾基準に記載されている通り、核酸プローブを使用して、XLDまたは色素生成カンテン培地から単離したコロニーに対して検査を実施します(オプション1または2を参照)。この検査はNeogen分子検出アッセイ2 - サルモネラを使用して実施しないでください。

オプション4: Neogen病原菌検出アッセイ2 - サルモネラとは原理が異なる必要があるNF VALIDATIONで認証済みのその他方法を使用します。この第2のバリデート済みの方法について記述されている完全なプロトコルを必ず使用してください。確認開始に先立つステップはすべて、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 (Neogen病原菌検出アッセイ2 - サルモネラで陽性と推定されたものの、上記の方法、特にラテックス凝集検査では確認できなかった場合) は、検査室は必要なステップに従って、得られた結果の有効性を確認しなければなりません。

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: 加熱処理済みライセートの保存と再検査

1. 加熱処理済みライセートを保存するには、ライシチューブに清潔なキャップを嵌めます(ライシスセクション、4.5を参照)。
2. 4~8°Cで最大72時間保管します。
3. 保存された検体を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. 混合したライシチューブをNeogen分子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ライシチューブラックを外し、Neogen分子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続けます。

参考文献:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 5: *Salmonella*., Section C-24. November 2018 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 4.10. Isolation and identification of *Salmonella* from meat, poultry, pasteurized egg, and siluriformes (fish) products and carcass and environmental sponges. Effective Date: 2 January 2019.
3. ISO 6579-1. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.この文書のコピーが必要な場合には、Neogen食品安全性担当者にご連絡ください。
7. ISO 18593. Microbiology of the food chain – Horizontal methods for surface sampling.
8. US Food and Drug Administration – *Bacteriological Analytical Manual*, Medium M111: Nonfat Dry Milk (Reconstituted). January 2011.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain - part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
10. ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
11. ISO 6887-2:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products.
12. ISO 6887-3:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products.
13. ISO 6887-4:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
14. ISO 6887-5:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
15. ISO 6887-6:2013. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage.

記号の説明

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.

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

Neogen Ireland, Ltd.

Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland



Neogen Corporation

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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00869A

Neogen® 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌

产品说明及预期用途

Neogen® 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌与 Neogen® 分子检测系统一起使用, 用于快速、专门检测增菌后的食品、饲料和食品加工环境样品中的沙门氏菌。

Neogen® 分子检测分析采用环介导等温扩增技术来快速扩增具有高特异性和高敏感性的核酸序列, 结合使用生物发光特性来检测扩增反应。将实时报告假定阳性结果, 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 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏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制药、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食品产品、食品加工、检测方案或针对所有可能的细菌类型评估 Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌。

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 已通过缓冲蛋白胍水 (BPW) ISO 对 Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌进行了评估。

Neogen® 分子检测仪器专用于在分析裂解步骤中经过热处理的样品, 该步骤旨在破坏样品中存在的微生物。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 Food Safety 产品的设计和和生产已经获得 ISO (国际标准化组织) 9001 认证。

Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌检测试剂盒包含 96 个检测反应管, 如表 1 所述。

表 1. Neogen 沙门氏菌分子检测分析试剂盒构成

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® 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌试剂反应管	绿色管	96 (12 排, 每排 8 管)	特定扩增和检测试剂的冻干样	即开即用
附加盖	绿色盖子	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 (NC) 采用的是无菌增菌培养基 (如 BPW-ISO), 未在检测试剂盒中提供。请勿将水用作 NC。

安全

用户应该阅读、理解并遵守 Neogen 分子检测系统和 Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏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 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌。

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。
- 请按照包装和产品信息中的指示储存 Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌。
- 始终在过期日期之前使用 Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌。
- 将 Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌用于经内部或第三方验证的食品、饲料和食品加工环境样品。
- 仅将 Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏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 的中和缓冲液转移至 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:

- 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反应管的内容物。
- 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) 的分子生物级移液管吸头。
- 每次转移样品时使用新的吸头。
- 将样品从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:

- 扩增后切勿打开试管。
- 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) 的家用漂白溶液中浸泡 1 个小时, 且始终远离分析准备区。
- 请勿在扩增后对试剂反应管进行高压灭菌。

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、实验室技术和样品本身) 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。

检测方法及其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 Food Safety 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 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌的结果。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, 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的产品 (如化学成分或工艺)。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 Food Safety 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。这是向您提供的唯一补救方案。您必须在发现产品存在任何可疑缺陷的 60 天内立即通知 Neogen, 并将该产品退还给 Neogen。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 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌储存在 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, 未使用的试剂反应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 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌。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 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌可能含有致病物质。完成检测后, 应遵照现行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*SM 2016.01 和 AOAC[®] *Performance Tested*SM 证书 #091501 实施的增菌方案。

表 4: 遵照 NF Validation 证书 3M 01/16-11/16 实施的增菌方案。

样品增菌

表 2、3 或 4 提供了针对食品、饲料和环境样品的一般增菌方案指导。

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. 根据测试的基质, 让 BPW ISO 增菌培养基平衡至实验室环境温度或 $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ 。见表 2、3 或 4。
2. 在无菌环境下将增菌培养基和样品进行混合。
3. 通过混合、均质操作或手动混合 2 ± 0.2 分钟或直到所有块状物完全溶解且浓缩悬浮液均匀, 实现彻底均质⁽¹⁰⁻¹⁵⁾。
 - a. 对于所有肉类和微粒样品, 建议使用过滤袋。
 - b. 对于会在水中膨胀且粘度很高的基质 (例如谷类、淀粉), 建议进行进一步的稀释 ($> 1:10$), 直至粘度适当下降, 或将无菌的 1% (w/v) α -淀粉酶加入 BPW (ISO)⁽¹⁰⁻¹³⁾。
 - c. 对于大量奶粉和谷类样品, 请将样品慢慢加入液体中并多次混合, 以避免出现结块。
4. 按照适用方案表所述进行培养 (请参见表 2、表 3 或表 4)。

环境样品

样品采集工具可以用中和溶液水化过 (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病原体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, 向两个方向 (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 18593:2018⁽⁷⁾ 指导方针收集环境样品。

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。

1. 根据测试的基质, 将 BPW ISO 增菌培养基预热到 $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ 。见表 2、3 或 4。
2. 在无菌环境下将增菌培养基和样品进行混合。通过混合、均质操作或手动混合 2 ± 0.2 分钟实现彻底均质。按照适用方案表所述进行培养。见表 2、3 或 4。

表 2. 一般增菌方案。

样品基质	样品大小	增菌肉汤量	增菌温度 (±1°C)	增菌时间 (小时)	样品分析量 (μL) ^(a)
方案 1 加工食品 (不包括蛋粉以及其他方案中规定的产品) ^(b)	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-26	20
方案 2 生的和未加工的食物、蛋粉、动物饲料以及环境样品 ^(c)	25 g	225 mL BPW ISO (预热)	41.5	18-26	20
方案 3 粉状乳制品 (包括婴儿配方奶粉、大豆原料婴儿配方奶粉)	25 g	225 mL BPW ISO	37	20-26	20
方案 4 可可原料产品 (粉末、巧克力、糖果等)	25 g	225 mL 无菌 100 g/L 脱脂奶粉, 含 0.002% 亮绿色染料 ^(d,e,f)	37	24-30	20
方案 5 其他, 包括: 调味料、草本香料植物、浓缩液、速溶茶和咖啡、肉汤块	25 g	235 mL 2X BPW ISO, 含 0.5% K ₂ SO ₃ + 240 mL 无菌 100 g/L 脱脂奶粉 ^(d,g,h)	37	24-30	10
方案 6 核桃或含有核桃的坚果食品 (该方案适用于其他坚果, 包括山核桃、杏仁、开心果、腰果、栗子、澳洲坚果、巴西坚果、大豆坚果和花生)	25 g	225 mL 无菌 100 g/L 脱脂奶粉 ^(d)	37	18-24	20

(a) 转移到裂解液管的样品体积。请参阅“裂解”部分的步骤 4.7。

(b) 将使用方案 1 测试的产品示例: 即食食品、熟食沙拉、奶油冻。

(c) 将使用方案 2 测试的产品示例: 生肉、冷冻蔬菜、所有奶酪、发酵牛奶、生食沙拉 (巴达维亚生菜)。

(d) 脱脂超高温灭菌牛奶可以替代脱脂奶粉。

(e) 每 225 mL 脱脂牛奶中加入 0.45 mL 的 1% 亮绿染料水溶液, 得到最终浓度为 0.002% (0.02 g/L) 的亮绿染料。

(f) 要制备无菌脱脂奶粉, 将 100g 脱水脱脂奶粉悬浮在 1 L 蒸馏水或净化水中。晃动直到溶解。在 121°C 下高压灭菌 15 分钟。在 2-30°C^(g) 下储存。

(g) 在每 1000 mL BPW ISO 中加入 5 g 的 K₂SO₃, 得到最终浓度为 0.5% 的 K₂SO₃。

(h) 必须将 240 mL 100 g/L 无菌脱脂奶粉添加到含 0.5% K₂SO₃ 的 235 mL 2X BPW ISO 无菌溶液中。

如果使用可选的二次增菌步骤, 例如 Rappaport Vassiliadis 培养基, 则需要进行 1:2 稀释 (将 1 份样品增菌成 1 份无菌增菌肉汤) 或直接将 10 μL 二次增菌转移到 Neogen 裂解液管中。如果使用连四硫酸盐 (TT) 肉汤, 则将 20 μL 的二次增菌转移到 Neogen 裂解液管中, 不要振荡 TT 增菌或从增菌管底部移液, 以免转移任何沉淀物。

验证方法具体说明

AOAC® *Official Methods of Analysis*SM 2016.01

AOAC® *Performance Tested*SM 证书 #091501



AOAC 研究所 OMASM 和 PTMSM 计划显示, Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌是一种有效的沙门氏菌检测方法。研究中检测的基质显示在表 3 中。

表 3. 遵照 AOAC OMASM 2016.01 和 AOAC PTMSM 证书 #091501 实施的增菌方案。转移到 Neogen 裂解液管的样品体积为 20 μL。

样品基质		样品大小	增菌肉汤量	增菌温度 (±1°C)	增菌时间(小时)
生的碎牛肉	25 g	225 mL BPW ISO (预热)	41.5	10-24	
	325 g	975 mL BPW ISO (预热)			
生的碎鸡肉	25 g	225 mL BPW ISO (预热)	41.5	10-24	
	325 g	975 mL BPW ISO (预热)	41.5	14-24	
烹制炸鸡排	325 g	2,925 mL BPW ISO	37	18-24	
干狗粮	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-24	
	375 g	1,500 mL BPW ISO			
黑胡椒、生全虾、生袋装菠菜、巴氏杀菌加工美国干酪	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-24	
鸡胴体冲洗	30 mL	30 mL BPW ISO (预热)	41.5	18-24	
鸡胴体海绵	1 块海绵	50 mL BPW ISO (预热)	41.5	18-24	
速溶脱脂奶粉	25 g	225 mL BPW ISO	37	20-24	
可可粉	25 g	225 mL BPW ISO	37	24-28	
巴氏杀菌全蛋液	100 mL	900 mL BPW ISO	37	18-24	
发芽灌溉水	375 mL	3,375 mL BPW ISO	37	18-24	
奶油花生酱	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-24	
	375 g	3,375 mL BPW ISO			
干燥的大麻花、干燥的汉麻花 ⁽⁴⁾	10 g	90 BPW-ISO	41.5	28-32	
环境的	密封混凝土	1 块海绵	225 mL BPW ISO (预热)	41.5	18-24
	不锈钢	1 采样棒	10 mL BPW ISO (预热)	41.5	18-24
	密封瓷砖	1 块海绵	50 mL BPW ISO (预热)	41.5	18-24

样品基质	样品大小	增菌肉汤量	增菌温度 (±1°C)	增菌时间 (小时)	二次增菌培养基 (mL)	二次增菌温度 (±1°C)	二次增菌时间 (小时)
带头生虾	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-24	R-V R10:0.1 mL 加入 10 mL ^(a)	41.5	4-24

(a) 将 10 μL 增菌样品转移到裂解液管。请参阅“裂解”部分的步骤 4.7。



3M 01/16 -11/16
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⁽⁷⁾ 的 NF VALIDATION 认证方法 (与 ISO 6579⁽³⁾ 相比)。

验证范围: 所有人类食品、生产环境样品 (包括初级生产样品)、宠物食品和动物饲料, 通过对各种食品执行验证分析。

样品制备: 应遵照 EN ISO 6579⁽³⁾ 和 EN ISO 6887⁽¹⁰⁻¹⁵⁾ 制备样品。

软件版本: 参见证书。

表 4. 遵照 NF VALIDATION 认证方法 3M 01/16-11/16 实施的增菌方案。

方案	样品大小	增菌肉汤量	增菌温度 (+1°C)	增菌时间 (小时)	样品分析量 (μL) ^(a)
方案 1: <ul style="list-style-type: none"> 各种加工食品 (不包括蛋粉、加工水果和蔬菜以及其他方案中规定的产品) 所有鱼类和生海鲜产品 宠物食品和动物饲料 初级生产 (非粪便) 	25 g	225 mL BPW ISO	37	18 - 26	20
方案 2: <ul style="list-style-type: none"> 各种生食品和未加工食品 (不包括生鱼肉和生海鲜, 以及其他方案中规定的产品) 蛋粉 所有水果和蔬菜 食品生产环境样品 	25 g 或 1 拭子 或 1 采样棒	225 mL, 预热 BPW ISO	41.5	18 - 26	20
方案 3: <ul style="list-style-type: none"> 粉状乳制品 	25 g	225 mL BPW ISO	37	20 - 26	20
方案 4: <ul style="list-style-type: none"> 可可含量超过 20% 的可可原料产品 	25 g	225 mL 超高温灭 菌脱脂奶 + 0.002% 亮绿色	37	24 - 30	20
方案 5: <ul style="list-style-type: none"> 调味料、草本香料植物、浓缩液、茶、咖啡、烹饪制品 	25 g	235 mL 2 x BPW ISO + K ₂ SO ₃ 0.5% + 240 mL 超高温灭 菌脱脂奶	37	24 - 30	10
方案 6: <ul style="list-style-type: none"> 生肉 	25 g	225 mL, 预热 BPW ISO	41.5	10 - 24	20
方案 7: <ul style="list-style-type: none"> 初级生产 (粪便) 	1 条长筒袜	100 mL, 在连四硫 酸盐肉汤中	37	22 - 24	20
	25 g	225 mL 连四硫酸 盐肉汤			
方案 8: <ul style="list-style-type: none"> 不含益生菌的婴儿配方奶粉、婴儿谷物、奶粉^(b) 	375 g	3375 mL 预热 BPW ISO	37	20 - 26	20
方案 9: <ul style="list-style-type: none"> 含益生菌的婴儿配方奶粉、婴儿谷物、奶粉^(b) 	375 g	3375 mL 预热 BPW ISO + 万古霉素 (10 mg/L)	37	20 - 26	20

(a) 转移到裂解液管的样品体积。请参阅裂解部分的步骤 4.7。

(b) 对于大量粉末和谷类样品, 请将样品慢慢加入液体中并多次混合, 以避免出现结块。

注释:

- 多于 25 g 的样品尚未在 NF VALIDATION 研究中进行检测 (方案 8 和 9 除外)。
- 短时检测方案对培养条件敏感。必须遵循技术规范中规定的温度条件。用户必须验证增菌肉汤的预热达到规定温度, 然后再开始培养。样品制备时间、增菌肉汤预热步骤结束至食品样品培养步骤开始之间的延迟不得超过 45 分钟。培养期间, 建议使用通风良好的培养设备。
- **对于从连四硫酸盐 (TT) 肉汤增菌向 Neogen 裂解液管的转移, 不要振荡 TT 增菌或从增菌管底部移液, 以免转移任何沉淀物。转移沉淀物可能导致结果无效。**
- 推荐的方案中断点为增菌后或样品裂解后。增菌肉汤或样品裂解液可在 2-8°C 下储存最长 72 小时。从储存处取出增菌肉汤后, 应从裂解部分的步骤 1 重新开始检测。从储存处取出样品裂解液后, 应从裂解部分的步骤 8 重新开始检测。

Neogen® 分子检测快速转移托盘的准备工作

1. 将一块干布或一次性纸巾用 1-5% (与水的体积比) 家用漂白溶液浸湿, 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® 分子检测冷却架直接置于实验室工作台上。在实验室环境温度 (20-25°C) 下使用模块。

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。

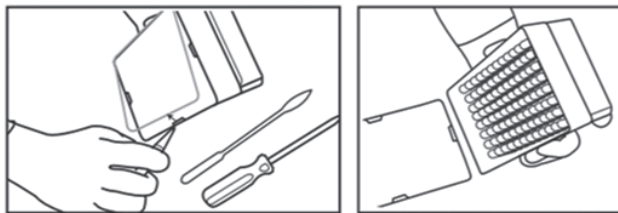
Neogen® 分子检测仪器的准备工作

1. 启动 Neogen® 分子检测软件并登录。请联系您的 Neogen Food Safety 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 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 ± 1°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 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。选择所需数量的单个 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。

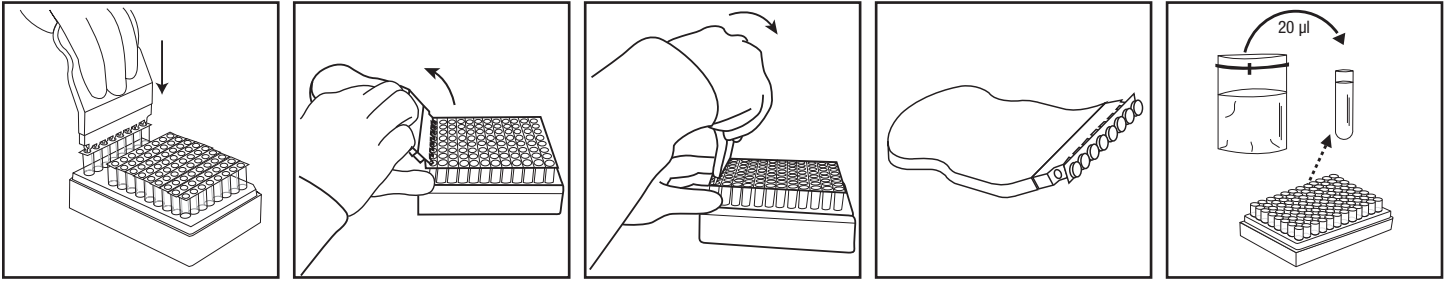
- 4.4 使用 Neogen® 分子检测开盖器 - Lysis 打开 Neogen 裂解溶液联排管的管盖, 一次仅打开一排。

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。

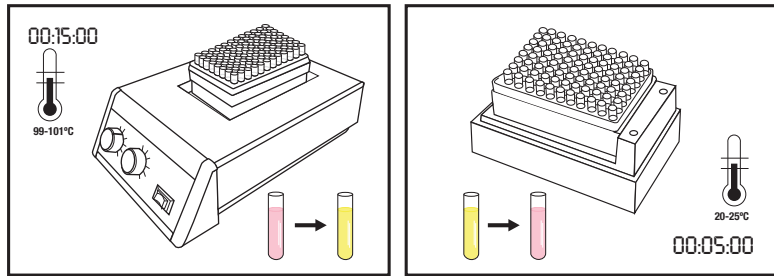
4.5.1 如需处理保留的裂解液, 请参阅附录 A。

4.6 处理粘性样品时, 在从过滤侧采集样品之前, 先鼓起增菌袋。

4.7 将 20 μ L 样品转移到 Neogen 裂解溶液管内, 除非方案表中另有说明 (示例方案 5 和 RVS 中的二次增菌, 或使用含中和缓冲液的环境样品时)。



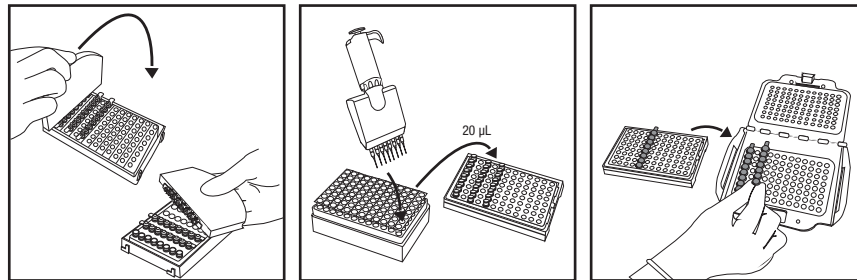
5. 重复步骤 4.4 至 4.7, 直到将所有样品添加到联排管对应的 Neogen 裂解溶液管为止。
6. 当转移完所有样品后, 将 20 μ L 的 NC (无菌增菌培养基, 如 BPW) 转移到一支 Neogen 裂解溶液管中。请勿将水用作 NC。
7. 检验 Neogen 分子检测加热模块的温度是否达到了 $100 \pm 1^\circ\text{C}$ 。
8. 将未加盖的 Neogen 裂解溶液管架放入 Neogen 分子检测加热模块中加热 15 ± 1 分钟。加热期间, Neogen 裂解溶液将从粉红色 (冷) 变为黄色 (热)。
- 8.1. 未在分析裂解步骤中经过适当热处理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。如果 Neogen 分子检测冷却架在环境温度下使用, 则应将其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 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌试剂反应管。
 - 1.1 根据所需的试管数, 对联排管进行切割。选择所需数量的单个 Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌试剂反应管或 8 联排管。
 - 1.2 将试剂反应管放入空管架中。
 - 1.3 请勿将试剂小球搅离管底。
 2. 选择一支试剂对照管并放入管架。
 3. 为避免交叉污染, 请一次仅打开一排试剂反应管的管盖, 并且每次转移溶液时使用新的移液管吸头。
 4. 按如下所述将相应的裂解液分别转移到 Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌试剂反应管和 Neogen 试剂对照管:

先将每个样品裂解液转移到单个试剂反应管中, 然后转移到 NC 中。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 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌试剂反应管的管盖，一次仅打开一排。丢弃管盖。
 - 5.1 将 Neogen 裂解溶液管液体上部 1/2 层的 20 μL 样品裂解液(避免沉淀) 转移到对应的 Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌试剂反应管。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 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌试剂反应管为止。
 - 5.3 使用附加盖盖住 Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌试剂反应管并使用 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 到 5.3 以将 20 μL NC 裂解液转移到 Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌试剂反应管。
 - 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. 将盖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 60 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 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 的试剂反应管。这包括 Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌试剂反应管、Neogen 试剂对照和 Neogen 基质对照管。对密封的试剂反应管进行废弃处理时，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。将实时报告假定阳性结果，阴性结果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 Neogen BPW ISO 增菌培养液转移到二次增菌肉汤，然后进行后续的培养，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 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌扩增试剂带有“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。

孔类型	孔结果符号	结果	判读
样品		阳性	样品是目标病原体的假定阳性样品。
样品		阴性	样品是目标病原体的阴性样品。
样品		抑制	样品基质对分析有抑制作用。可能需要重新测试。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	不确定目标病原体是否存在。可能需要重新测试。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。可能需要重新测试。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

在 NF VALIDATION 背景下,必须通过以下其中一种检测对 Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌鉴定的所有阳性样品进行确认:

选项 1:采用 ISO 6579⁽³⁾ 标准,从缓冲蛋白胨水⁽³⁾ 增菌液开始。

选项 2:实施包含以下内容的确认方法:将 0.1 mL BPW ISO⁽³⁾ 增菌液或连四硫酸盐肉汤增菌液(初级生产样品)转移到 10 mL RVS 肉汤中。在 41.5°C 下培养 24 ± 3 小时。在木糖赖氨酸脱氧胆酸盐 (XLD)⁽³⁾ 琼脂或沙门氏菌专用显色琼脂上划线培养。用琼脂沙门氏菌乳胶直接对隔离的菌落执行乳胶凝集试验。

选项 3:按照 EN ISO 7218⁽⁵⁾ 标准所述,使用核酸探针针对 XLD 或显色琼脂中的隔离菌落执行操作(请参阅选项 1 或 2)。此测试不得使用 Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌执行。

选项 4:可以使用任何其他 NF VALIDATION 认证方法,原理必须与 Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌不同。在执行第二个验证方法时,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(采用 Neogen 沙门氏菌分子检测分析 2 - 沙门氏菌的结果为假定阳性,且并未通过上述其中一种方法予以确认,尤其是乳胶凝集试验),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液管重新盖上盖子(请参阅 4.5 裂解部分)。
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. 美国食品药品监督管理局微生物分析手册。第 5 章:沙门氏菌, 第 C-24 节。2018 年 11 月版。
2. 美国农业部 (USDA) FSIS 微生物实验室指南 4.10。从肉、家禽、巴氏杀菌蛋、鲶形目 (鱼类) 产品以及胴体和环境海绵中分离和鉴定沙门氏菌。生效日期:2019 年 1 月 2 日。
3. ISO 6579-1。食物链微生物 - 沙门氏菌检测、计数和血清学分型的水平方法 - 第 1 部分: 沙门氏菌属的检测。
4. ISO/IEC 17025。用于检验和校准实验室能力的一般要求。
5. ISO 7218。食品和动物饲料微生物 - 微生物检验用一般要求和指南。
6. 针对 Neogen 分子检测系统的 Neogen 安装合格 (IQ)/操作合格 (OQ) 方案和说明。请联系您的 Neogen Food Safety 代表, 以获取本文档的副本。
7. ISO 18593。食物链微生物 - 表面采样的水平方法。
8. 美国食品药品监督管理局 - 微生物分析手册, 介质 M111:脱脂奶粉 (复原)。2011 年 1 月。
9. ISO 16140-2:2016。食物链微生物 - 第 2 部分: 对照参考方法验证替代 (专有) 方法的方案。
10. ISO 6887-1:2017。食物链微生物 - 用于微生物检验的检测样品、初始混悬液和十倍稀释液的制备 - 第 1 部分:制备初始悬浮液和十倍稀释液的一般规则。
11. ISO 6887-2:2017。食物链微生物 - 用于微生物检验的检测样品、初始混悬液和十倍稀释液的制备 - 第 2 部分:制备肉和肉制品的专门规则。
12. ISO 6887-3:2017。食物链微生物 - 用于微生物检验的检测样品、初始混悬液和十倍稀释液的制备 - 第 3 部分:制备鱼和鱼产品的专门规则。
13. ISO 6887-4:2017。食物链微生物 - 用于微生物检验的检测样品、初始混悬液和十倍稀释液的制备 - 第 4 部分:制备其他产品的专门规则。
14. ISO 6887-5:2017。食物链微生物 - 用于微生物检验的检测样品、初始混悬液和十倍稀释液的制备 - 第 5 部分:制备奶和奶制品的专门规则。
15. ISO 6887-6:2013。食物链微生物 - 用于微生物检验的检测样品、初始混悬液和十倍稀释液的制备 - 第 6 部分:制备在初级生产阶段取得的样品的专门规则。

符号说明

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.

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

Neogen Ireland, Ltd.

Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland



Neogen Corporation

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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00869A



คำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์

ชุดทดสอบเชื้อซาลโมเนลล่าระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen®

รายละเอียดผลิตภัณฑ์และวัตถุประสงค์การใช้งาน

ชุดทดสอบเชื้อซาลโมเนลล่าระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen® จะนำมาใช้กับระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® สำหรับการตรวจหาเชื้อ ซาลโมเนลล่าอย่างรวดเร็วและเฉพาะเจาะจงในตัวอย่างอาหารที่ได้รับการเลี้ยงเชื้อ อาหารสัตว์ และในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมกระบวนการแปรรูปอาหาร

ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® ใช้การเพิ่มขยายยีนแบบลูปที่อุณหภูมิเดียว (Loop-mediated isothermal amplification) เพื่อเพิ่มลำดับกรดนิวคลีอิกด้วยวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงและความไวสูงผสานกับการเรืองแสงทางชีวภาพเพื่อตรวจจับการเพิ่มขยายจำนวน ผลการทดสอบเบื้องต้นที่เป็นบวกจะได้รับการรายงานในทันที ขณะที่ผลการทดสอบที่เป็นลบจะแสดงผลภายหลังจากที่การทดสอบดังกล่าวเสร็จสมบูรณ์แล้ว ผลการทดสอบเบื้องต้นที่เป็นบวกควรได้รับการยืนยันโดยใช้วิธีการที่ท่านเห็นสมควรหรือตามที่ระบุไว้ในระเบียบข้อบังคับต่าง ๆ ในท้องถิ่น^(1, 2, 3)

ชุดทดสอบ เชื้อซาลโมเนลล่าระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ออกแบบมาให้ใช้ในสภาพแวดล้อมห้องปฏิบัติการโดยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ผ่านการอบรมเทคนิคการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ Neogen ยังไม่ได้จัดทำเอกสารเกี่ยวกับการใช้ผลิตภัณฑ์นี้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ นอกจากอุตสาหกรรมอาหารหรือเครื่องดื่ม ตัวอย่างเช่น Neogen ยังไม่ได้ออกเอกสารเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์นี้สำหรับการทดสอบตัวอย่างยา ตัวอย่างเครื่องสำอาง ตัวอย่างทางคลินิก หรือตัวอย่างเกี่ยวกับสัตว์ ชุดทดสอบ เชื้อซาลโมเนลล่าระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ยังไม่ได้รับการประเมินกับผลิตภัณฑ์อาหาร การแปรรูปอาหาร ระเบียบการทดสอบที่เป็นไปได้ทั้งหมดหรือกับสายพันธุ์แบคทีเรียที่เป็นไปได้ทั้งหมด

แหล่งที่มา สูตร และคุณภาพของอาหารสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อสามารถส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบที่ได้เช่นเดียวกับวิธีการทดสอบอื่นๆ นอกจากนี้ ปัจจัยต่างๆ เช่น วิธีการสุ่มเก็บตัวอย่าง ระเบียบการทดสอบ การเตรียมตัวอย่าง การจัดการและเทคนิคที่ใช้ในห้องปฏิบัติการอาจส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบที่ได้ด้วยเช่นกัน Neogen ขอแนะนำให้ประเมินวิธีการทดสอบรวมทั้งอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อในสภาพแวดล้อมของผู้ใช้โดยใช้จำนวนตัวอย่างที่เพียงพอกับอาหารแต่ละชนิดและสถานะที่มีความท้าทายกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีการดังกล่าวเป็นไปตามเกณฑ์ของผู้ใช้

Neogen ได้ประเมินชุดทดสอบ เชื้อซาลโมเนลล่าระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ด้วยบัพเฟอร์เปปโตโนวอร์เตอร์ (BPW) ISO

เครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® มีจุดมุ่งหมายในการใช้กับตัวอย่างที่ได้ผ่านกระบวนการให้ความร้อนในระหว่างขั้นตอนการไลซิสของการทดสอบซึ่งได้รับการออกแบบมาเพื่อทำลายเชื้อที่มีในตัวอย่าง ตัวอย่างซึ่งไม่ได้รับความร้อนอย่างเหมาะสมในระหว่างขั้นตอนการไลซิสของชุดทดสอบอาจถือว่าเป็นสารที่อาจมีอันตรายทางชีวภาพ และไม่ควรรีเสเข้าไปในเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

Neogen Food Safety ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO (องค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน) 9001 ด้านการออกแบบและการผลิต

ชุดทดสอบ เชื้อซาลโมเนลล่าระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen มีทั้งหมด 96 หลอดทดสอบตามที่อธิบายไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

รายการ	ลักษณะ	จำนวน	สิ่งที่บรรจุ	ความคิดเห็น
สารละลายไลซิส Neogen® (LS)	สารละลายสีชมพูในหลอดใส	96 หลอด (12 แถว แถวละ 8 หลอด)	LS ปริมาณ 580 µL ต่อหลอด	บรรจุอยู่ในที่วางและพร้อมใช้งาน
หลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อซาลโมเนลล่าระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen®	หลอดสีเขียว	96 หลอด (12 แถว แถวละ 8 หลอด)	ส่วนผสมสำหรับการเพิ่มขยายและการตรวจหาเชื้อโรคแบบเฉพาะเจาะจงที่หาแห่งแยกเชิงแล้ว	พร้อมใช้งาน
ฝาสารอง	ฝาเขียว	96 ฝา (12 แถว แถวละ 8 ฝา)		พร้อมใช้งาน
Neogen® รีเอเจนต์คอนโทรล (RC)	หลอดใสชนิดเปิดฝาดานบน	16 หลอด (2 ฝูง ฝูงละ 8 หลอด)	ส่วนผสมที่ทำไลโอฟีไลซ์สำหรับควบคุม DNA การเพิ่มขยายและการตรวจหา	พร้อมใช้งาน

ชุดควบคุมผลลบหรือ Negative Control (NC) เป็นอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อที่ปลอดภัย เช่น BPW ISO ไม่ได้รวมอยู่ในชุดอุปกรณ์ ห้ามใช้น้ำเป็น NC

ความปลอดภัย

ผู้ใช้ควรอ่าน ทำความเข้าใจ และปฏิบัติตามข้อมูลความปลอดภัยทั้งหมดในคำแนะนำการใช้งานระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen และ Neogen ชุดทดสอบ เชื้อซาลโมเนลล่าระดับโมเลกุล 2 เก็บคำแนะนำด้านความปลอดภัยนี้ไว้สำหรับใช้อ้างอิงในอนาคต

⚠ **คำเตือน:** บ่งชี้ว่าเป็นสถานการณ์ที่เป็นอันตราย ซึ่งหากไม่มีการหลีกเลี่ยง อาจก่อให้เกิดการเสียชีวิตหรือการบาดเจ็บรุนแรงและ/หรือความเสียหายต่อทรัพย์สินได้

⚠ **ข้อสังเกต:** ระบุสถานการณ์ที่อาจเป็นอันตราย หากไม่หลีกเลี่ยง อาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อทรัพย์สิน

▲ คำเตือน

ห้ามใช้ชุดทดสอบ เชื้อซาลโมเนลลาระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ในการวินิจฉัยโรคในมนุษย์หรือสัตว์

ผู้ใช้งานต้องทำการฝึกอบรมบุคลากรเกี่ยวกับเทคนิคการทดสอบที่เหมาะสมในปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น หลักปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการที่ดี, ISO/IEC 17025⁽⁴⁾หรือ ISO 7218⁽⁵⁾

เพื่อลดความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับผลปลอมซึ่งนำไปสู่การปล่อยผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนไปขาย ให้ปฏิบัติดังนี้:

- ปฏิบัติตามระเบียบการและดำเนินการทดสอบดังที่ระบุไว้อย่างชัดเจนในคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์
- เก็บชุดทดสอบ เชื้อซาลโมเนลลาระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ตามที่ระบุไว้บนบรรจุภัณฑ์และในคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์
- ใช้ชุดทดสอบ เชื้อซาลโมเนลลาระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ก่อนวันหมดอายุเสมอ
- ใช้ชุดทดสอบ เชื้อซาลโมเนลลาระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen กับตัวอย่างอาหารและตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตอาหารซึ่งได้รับการพิสูจน์ยืนยันเป็นการภายในหรือโดยหน่วยงานภายนอกแล้ว
- ใช้ชุดทดสอบ เชื้อซาลโมเนลลาระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen เฉพาะกับพื้นผิว สารฆ่าเชื้อ วิธีการและสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผ่านการตรวจสอบภายในหรือโดยบุคคลที่สามแล้วเท่านั้น
- สำหรับตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมที่มีบัพเฟอร์สำหรับทำให้เป็นกลางโดยมีสารประกอบเชิงซ้อนของเอริทริลโพลีเนออยู่ด้วย ให้ทำการเจือจางตัวอย่างอัตราส่วน 1:2 ก่อนที่จะทดสอบ (เติมตัวอย่าง 1 ส่วนลงในอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 ส่วน) อีกหนึ่งตัวเลือกคือถ่ายบัพเฟอร์ที่เป็นกลางที่มีการเพิ่มเชื้อปริมาณ 10 µL เข้าไปยังหลอดสารละลายไลซีส Neogen ผลิตภัณฑ์ควบคุมตัวอย่างของ Neogen® ซึ่งประกอบด้วยบัพเฟอร์สำหรับทำให้เป็นกลางโดยมีสารเชิงซ้อนของเอริทริลโพลีเนอมีดังนี้: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G และ HS2410NB2G

เพื่อลดความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการสัมผัสสารเคมีหรือสารอันตรายทางชีวภาพ ให้ปฏิบัติดังนี้:

- ให้ทำการทดสอบเชื้อก่อโรคในห้องปฏิบัติการที่มีอุปกรณ์อย่างเหมาะสมภายใต้การควบคุมของบุคลากรที่ได้รับการอบรม อาหารเพิ่มจำนวนเชื้อที่บ่มแล้ว และอุปกรณ์หรือพื้นผิวที่มีการสัมผัสกับอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อที่บ่มแล้ว อาจจะมีเชื้อโรคในระดับเพียงพอที่จะก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์ได้
- ปฏิบัติตามแนวปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการมาตรฐานทุกครั้งโดยรวมถึงการสวมเครื่องแต่งกายเพื่อป้องกันและอุปกรณ์ปกป้องดวงตาในขณะที่ปฏิบัติงานกับรีเอเจนต์และตัวอย่างที่มีการปนเปื้อน
- หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับอาหารหลังบ่มเพิ่มจำนวนเชื้อและหลอดบรรจุรีเอเจนต์ภายหลังการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ
- กำจัดตัวอย่างหลังเพิ่มจำนวนเชื้อตามมาตรฐานอุตสาหกรรมปัจจุบัน
- ตัวอย่างซึ่งไม่ได้รับความร้อนอย่างเหมาะสมในระหว่างขั้นตอนการไลซีสของชุดทดสอบอาจถือว่าเป็นสารที่อาจมีอันตรายทางชีวภาพและไม่ควรใส่เข้าไปในเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

เพื่อลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนข้ามขณะเตรียมชุดทดสอบ ให้ปฏิบัติดังนี้:

- สวมถุงมือตลอดเวลา (เพื่อปกป้องผู้ใช้งานและป้องกันการเกิดนิวคลีเอส)

ควรปฏิบัติดังนี้เพื่อลดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม:

- ปฏิบัติตามมาตรฐานการกำจัดทิ้งตามข้อกำหนดอุตสาหกรรมในปัจจุบันสำหรับของเสียที่ปนเปื้อน

เพื่อเป็นการลดความเสี่ยงอันเกิดจากการสัมผัสโดนของเหลวร้อน ให้ปฏิบัติดังนี้:

- ห้ามใช้อุณหภูมิสูงกว่าที่แนะนำไว้บนเครื่องทำความร้อน
- ห้ามใช้เวลาทำความร้อนเกินที่แนะนำ
- ใช้เทอร์โมมิเตอร์ที่ได้รับการสอบเทียบตามมาตรฐานและเหมาะสม เพื่อยืนยันอุณหภูมิของของสีทบลีคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen® (เช่น เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มบางส่วน หรือเทอร์โมมิเตอร์แบบดิจิทัล ที่ไม่ใช่เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มทั้งหมด) จะต้องวางเทอร์โมมิเตอร์ในบริเวณที่กำหนดไว้ของสีทบลีคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen

ข้อสังเกต

เพื่อลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนข้ามขณะเตรียมชุดทดสอบ ให้ปฏิบัติดังนี้:

- เปลี่ยนถุงมือก่อนขั้นตอนการผสมสารละลายกับเม็ทรีเอเจนต์
- แนะนำให้ใช้ปิเปตที่ระดับชีววิทยาโมเลกุลชนิดที่มีตัวกั้นละอองอากาศ (ชนิดกรองแล้ว) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- ใช้ปิเปตที่อ่อนใหม่สำหรับการถ่ายตัวอย่างในแต่ละครั้ง
- ใช้แนวปฏิบัติที่ดีสำหรับห้องปฏิบัติการเพื่อถ่ายตัวอย่างจากอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อที่บ่มแล้วไปยังหลอดสายละลายไลซีส เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนในขั้นตอนการปิเปต ผู้ใช้อาจเพิ่มขั้นตอนระหว่างกลางของการถ่ายตัวอย่างสารละลาย ตัวอย่างเช่น ผู้ใช้ถ่ายถ่ายแต่ละตัวอย่างอาหารที่เพิ่มจำนวนเชื้อแต่ละตัวอย่างใส่เข้าไปในหลอดที่ฆ่าเชื้อแล้ว
- ปฏิบัติการทดสอบทางชีววิทยาโมเลกุลบนโต๊ะที่มีหลอดไฟฟ้าเชื้อหากทำได้ ลดการปนเปื้อนบนโต๊ะปฏิบัติงานและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ (ปิเปต เครื่องมือเปิดปิดฝา ฯลฯ) อย่างสม่ำเสมอด้วยน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (ผสมกับน้ำตามอัตราส่วน) หรือสารละลายกำจัดดีเอ็นเอ

เพื่อลดความเสี่ยงจากผลบวกที่เป็นเท็จ ให้ปฏิบัติดังนี้

- ห้ามเปิดหลอดทดลองภายหลังการเพิ่มขยายจำนวนเชื้อ
- กำจัดหลอดทดลองที่ปนเปื้อนแล้วเสมอ โดยแช่ในน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (ผสมกับน้ำตามอัตราส่วน) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและให้อยู่ห่างจากพื้นที่จัดเตรียมชุดทดสอบทุกครั้ง
- ห้ามนิ่งฆ่าเชื้อหลอดรีเอเจนต์ภายหลังการเพิ่มขยายจำนวน

ศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมในเอกสารข้อมูลความปลอดภัยและระเบียบข้อบังคับการกำจัดทิ้งในประเทศ

หากท่านมีข้อสงสัยเกี่ยวกับการใช้งานหรือกรรมวิธีที่เฉพาะเจาะจงใดๆ โปรดเยี่ยมชมเว็บไซต์ของเราที่ www.neogen.com หรือติดต่อตัวแทนจำหน่ายหรือผู้จัดจำหน่ายของบริษัท Neogen ในท้องถิ่นของท่าน

ความรับผิดชอบของผู้ใช้

ผู้ใช้งานจะต้องทำความเข้าใจเกี่ยวกับคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์และข้อมูลเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ หากต้องการข้อมูลเพิ่มเติม สามารถเยี่ยมชมเว็บไซต์ของเรา www.neogen.com หรือติดต่อตัวแทน Neogen ในพื้นที่ของท่าน

เมื่อเลือกวิธีทดสอบ การคำนึงถึงปัจจัยภายนอกนั้นเป็นสิ่งสำคัญ เช่น วิธีการสุ่มตัวอย่าง วิธีการทดสอบ วิธีการเตรียมตัวอย่าง การจัดการควบคุม เทคนิคของห้องปฏิบัติการรวมถึงตัวอย่างเองที่อาจส่งผลกระทบต่อผลลัพธ์ได้

ผู้ใช้เป็นผู้รับผิดชอบในการเลือกวิธีการทดสอบหรือวิธีการเลือกตัวอย่าง เพื่อประเมินจำนวนตัวอย่างที่เพียงพอ โดยใช้เมทริกซ์และการตรวจสอบความสามารถในการทำละลายจุลินทรีย์ที่เหมาะสม เพื่อให้ผู้ใช้แน่ใจว่าวิธีการทดสอบที่เลือกนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ของผู้ใช้เอง

นอกจากนี้ ผู้ใช้จะต้องรับผิดชอบในการเลือกวิธีการทดสอบและผลลัพธ์ที่ได้ให้เป็นไปตามข้อกำหนดของลูกค้าและของผู้จัดส่งสินค้า

เช่นเดียวกับวิธีการทดสอบอื่นๆ ผลการทดสอบที่ได้จากการใช้ผลิตภัณฑ์ Neogen Food Safety ใดก็ตาม ไม่ได้รับประกันถึงคุณภาพของเมทริกซ์หรือขั้นตอนที่ใช้ทดสอบ

Neogen ได้พัฒนาชุดน้ำยาควบคุมเพื่อทดสอบผลของส่วนประกอบในตัวอย่างแต่ละประเภท โดยวิธี Neogen® เพื่อช่วยให้ลูกค้าประเมินวิธีการสำหรับเมทริกซ์ต่างๆ ของอาหารได้ เมื่อจำเป็น ให้ใช้ชุดน้ำยาควบคุมเพื่อทดสอบผลของส่วนประกอบในตัวอย่างแต่ละประเภท (MC) เพื่อทดสอบว่าเมทริกซ์นั้นสามารถส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบของชุดทดสอบ ชื่อ *ซาลโมเนลลา* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen หรือไม่ทดสอบตัวอย่างหลายๆ ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของเมทริกซ์นั้นๆ เช่น ตัวอย่างที่ได้จากแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกัน ตัวอย่างที่ได้ในระหว่างการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบต่างๆ เมื่อนำวิธีการของ Neogen มาใช้ หรือเมื่อทำการทดสอบเมทริกซ์ใหม่หรือที่ไม่รู้จัก หรือเมทริกซ์ที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบหรือการแปรรูป

สามารถให้คำจำกัดความของเมทริกซ์ได้ว่า เป็นชนิดของผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติที่ต่างกัน เช่น องค์ประกอบหลักและกระบวนการแปรรูปที่ต่างกัน ความแตกต่างระหว่างเมทริกซ์ต่าง ๆ อาจจะเป็นเพียงผลที่เกิดจากความแตกต่างในกระบวนการแปรรูปหรือสภาพลักษณะของเมทริกซ์ เช่น ดิบกับผ่านการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ สดกับแห้ง ฯลฯ

เงื่อนไขการรับประกัน/การชดเชยแบบจำกัด

NEOGEN ปฏิเสธการรับประกันทั้งหมดทั้งอย่างชัดแจ้งและโดยนัย รวมถึงแต่ไม่จำกัดเพียงการรับประกันใดๆ ถึงความสามารถในการจำหน่าย หรือความเหมาะสมสำหรับการใช้งานโดยเฉพาะ เว้นแต่จะได้อธิบายไว้อย่างชัดแจ้งในส่วนการรับประกันแบบจำกัดว่าด้วยบรรจุภัณฑ์ของผลิตภัณฑ์แต่ละชิ้น หากผลิตภัณฑ์ Neogen Food Safety ใดๆ มีตำหนิบกพร่อง บริษัท Neogen หรือผู้จัดจำหน่ายที่ได้รับอนุญาตของบริษัทจะใช้ดุลยพินิจของตนในการพิจารณาเปลี่ยนแทนผลิตภัณฑ์หรือคืนเงินค่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าว และถือเป็นการชดเชยเพียงอย่างเดียวเท่านั้น หากสงสัยว่ามีข้อบกพร่องหรือความเสียหายกับสินค้า ท่านต้องแจ้ง Neogen ภายใน 60 วันหลังจากที่พบ และทำการคืนสินค้าที่เสียหายให้ทาง Neogen โปรดโทรติดต่อแผนกบริการลูกค้า (1-800-328-1671 ในสหรัฐอเมริกา) หรือตัวแทน Neogen Food Safety เพื่อขอสิทธิ์ส่งคืนผลิตภัณฑ์ โปรดติดต่อตัวแทน Neogen ของคุณหรือผู้จัดจำหน่าย Neogen ที่ได้รับอนุญาตหากมีคำถามเพิ่มเติม

ขอบเขตความรับผิดชอบของ Neogen

NEOGEN จะไม่รับผิดชอบต่อการสูญเสียหรือความเสียหายใดๆ ทั้งโดยตรง โดยอ้อม ความเสียหายจำเพาะ ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการผิดสัญญาหรือที่เป็นผลสืบเนื่อง รวมถึงแต่ไม่จำกัดเพียงการสูญเสียผลกำไร ความรับผิดชอบของทาง Neogen ในทางกฎหมายจะต้องไม่เกินมูลค่าของผลิตภัณฑ์ที่เสียหายหรือบกพร่องไม่ว่ากรณีใดๆ ก็ตาม

การเก็บรักษาและการกำจัด

เก็บชุดทดสอบ ชื่อ *ซาลโมเนลลา* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C อย่าแช่แข็ง เก็บชุดอุปกรณ์ให้พ้นแสงในระหว่างการเก็บรักษา หลังจากเปิดชุดอุปกรณ์แล้ว ให้ตรวจสอบว่าถุงฟอยล์ไม่ชำรุดเสียหาย หากถุงฟอยล์ชำรุดเสียหาย ห้ามใช้ผลิตภัณฑ์นั้น หลังจากเปิดแล้ว ควรเก็บรักษาหลอดรีเอเจนต์ที่ยังไม่ได้ใช้ไว้ในถุงที่ซีลปิดซ้ำได้โดยมีสารดูดความชื้นในตู้เย็นเพื่อให้รีเอเจนต์ที่ทำแห้งเยือกแข็งแล้วอยู่ในสภาวะคงตัว เก็บรักษาถุงที่ซีลปิดซ้ำแล้วไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C เป็นเวลาไม่เกิน 60 วัน

ห้ามใช้ชุดทดสอบ ชื่อ *ซาลโมเนลลา* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ที่เลยวันหมดอายุแล้ว วันหมดอายุและหมายเลขล็อตจะแสดงไว้บนฉลากด้านนอกของกล่อง หลังใช้งาน อาหารเพิ่มจำนวนเชื้อและหลอดของชุดทดสอบ ชื่อ *ซาลโมเนลลา* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen อาจมีสารจากเชื้อก่อโรคร้าย เมื่อการทดสอบเสร็จสมบูรณ์แล้ว ให้ปฏิบัติตามมาตรฐานอุตสาหกรรมในปัจจุบันสำหรับการกำจัดและทิ้งขยะปนเปื้อน ศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมในเอกสารข้อมูลความปลอดภัยและระเบียบข้อบังคับการกำจัดทิ้งในประเทศ

คำแนะนำการใช้งาน

ปฏิบัติตามคำแนะนำทั้งหมดอย่างละเอียดรอบคอบ หากไม่ปฏิบัติเช่นนั้น อาจให้ผลที่ไม่ถูกต้องแม่นยำได้

ลดการปนเปื้อนบนโต๊ะปฏิบัติงานและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ (ปิเปต เครื่องมือเปิด/ปิดฝา ฯลฯ) อย่างสม่ำเสมอด้วยน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (ผสมกับน้ำตามอัตราส่วน) หรือสารละลายกำจัดดีเอ็นเอ

ผู้ใช้งานควรผ่านการฝึกอบรมคุณสมบัติสำหรับผู้ปฏิบัติงาน (OQ) ระบบทดสอบเชื้อก่อโรครดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ตามที่ระบุในเอกสาร "แนวทางและระเบียบการด้านคุณสมบัติการติดตั้ง (IQ) / คุณสมบัติการปฏิบัติการ (OQ) สำหรับระบบการทดสอบเชื้อก่อโรครดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen"⁽⁶⁾

ดูในส่วน "คำแนะนำเฉพาะสำหรับวิธีการที่ได้รับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี" สำหรับข้อกำหนดเฉพาะ:

ตารางที่ 3 สำหรับระเบียบการเพิ่มจำนวนเชื้อตามมาตรฐาน AOAC® *Official Method of Analysis*SM 2016.01 และตามใบรับรอง AOAC® *Performance Tested*SM Certificate #091501

ตารางที่ 4 สำหรับระเบียบการเพิ่มจำนวนเชื้อตามใบรับรองของ NF VALIDATION 3M 01/16 -11/16

การเพิ่มจำนวนเชื้อในตัวอย่าง

ตารางที่ 2, 3 หรือ 4 แสดงคำแนะนำสำหรับระเบียบการทั่วไปในการเพิ่มปริมาณเชื้อในตัวอย่างอาหาร อาหารสัตว์ และตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม

ผู้ใช้งานมีหน้าที่รับผิดชอบในการตรวจสอบระเบียบการสุ่มตัวอย่างหรืออัตราส่วนการเจือจางแบบอื่นว่าใช้ได้ เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีการทดสอบนี้

สอดคล้องกับเกณฑ์ของผู้ใช้งาน

อาหาร

1. ให้อาหารเพิ่มจำนวนเชื้อ BPW ISO ปรับสมดุลเข้ากับอุณหภูมิโดยรอบในห้องปฏิบัติการ หรืออุณหภูมิระดับ $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ ซึ่งขึ้นอยู่กับเมทริกซ์ที่ทดสอบ โปรดดูตาราง 2, 3 หรือ 4
2. ผสมอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อกับตัวอย่างเข้าด้วยกันโดยใช้วิธีการแบบปลอดเชื้อ
3. ผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดีด้วยวิธีการปั่นผสม การเขย่า หรือ การผสมด้วยมือเป็นระยะเวลา 2 ± 0.2 นาที หรือ จนกว่าทุกอย่าง ก่อนจะละลาย จนหมดและสารแขวนลอยของสารอาหารมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน⁽¹⁰⁻¹⁵⁾
 - a. สำหรับตัวอย่างประเภทเนื้อสัตว์ทั้งหมดที่มีลักษณะเป็นละอองอนุภาคขนาดเล็ก แนะนำให้ใช้ถุงกรอง
 - b. สำหรับเมทริกซ์ต่างๆ ที่จะบวมในน้ำและมีความหนืดสูง (เช่น ธัญพืช แป้งต่างๆ) แนะนำว่าให้เจือจางเพิ่ม ($> 1:10$) จนกว่าความหนืดจะลดลงในระดับที่เหมาะสมหรือเพิ่มแอลฟาอะไมเลสปลอดเชื้อ 1% โดยมวล/ปริมาตรลงใน BPW (ISO)⁽¹⁰⁻¹³⁾
 - c. สำหรับตัวอย่างนมผงและธัญพืชที่มีปริมาณมาก ค่อยๆ เติมตัวอย่างลงในของเหลวโดยคนบ่อยๆ เพื่อไม่ให้จับตัวกันเป็นก้อน
4. บ่มเชื้อไว้ดังที่อธิบายไว้ในตารางวิธีการที่เกี่ยวข้อง (ดูตาราง 2 3 หรือ 4)

ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม

อุปกรณ์เก็บตัวอย่างอาจเป็นฟองน้ำซบสารละลายที่ทำให้เป็นกลางเพื่อยับยั้งฤทธิ์ของสารฆ่าเชื้อ Neogen แนะนำให้ใช้ฟองน้ำเซลลูโลสที่ไม่มีไบโอไซด์ สารละลายที่ทำให้เป็นกลางอาจเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นกลาง Dey-Engley (D/E) หรืออาหารเลี้ยงเชื้อ Lethen ควรทำการฆ่าเชื้อในพื้นที่หลังจากการเก็บตัวอย่าง

คำเตือน: หากคุณเลือกที่จะใช้บัฟเฟอร์สำหรับทำให้เป็นกลาง (NB) ซึ่งประกอบด้วยสารเชิงซ้อนของเอริลซิลโฟเนตเป็นสารละลายเพื่อทำให้ฟองน้ำชุ่มชื้น ต้องทำการเจือจางตัวอย่างหลังเพิ่มจำนวนเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:2 (ตัวอย่าง 1 ส่วนในอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 ส่วน) ก่อนการทดสอบเพื่อที่จะลดความเสี่ยงอันเกี่ยวของกับผลลบที่เป็นเท็จซึ่งนำไปสู่การปล่อยผลิตภัณฑ์ปนเปื้อนออกสู่ภายนอกได้ อีกหนึ่งตัวเลือกคือถายบัฟเฟอร์ที่เป็นกลางที่มีการเพิ่มเชื้อปริมาณ $10 \mu\text{L}$ เข้าไปยังหลอดสารละลายไลซิส Neogen

ขนาดพื้นที่เก็บตัวอย่างที่แนะนำเพื่อตรวจสอบยืนยันการมีอยู่หรือการไม่มีอยู่ของเชื้อก่อโรคบนพื้นผิวคือขนาดอย่างน้อย 100 cm^2 (10 ซม. x 10 ซม. หรือ $4'' \times 4''$) เมื่อทำการเก็บตัวอย่างด้วยฟองน้ำ ให้ครอบคลุมพื้นที่โดยรวมทั้งสองทิศทาง (กล่าวคือ จากซ้ายไปขวา และจากบนลงล่าง) หรือเก็บตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมตามขั้นตอนการเก็บตัวอย่างปัจจุบันของคุณ หรือตามมาตรฐาน FDA BAM⁽¹⁾, USDA FSIS MLG⁽²⁾ หรือแนวทางตามมาตรฐาน ISO 18593:2018⁽⁷⁾

ผู้ใช้มีหน้าที่รับผิดชอบในการตรวจสอบระเบียบการสุ่มตัวอย่างหรืออัตราส่วนการเจือจางแบบอื่นว่าใช้ได้ เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีการทดสอบนี้สอดคล้องกับเกณฑ์ของผู้ใช้งาน

1. อุณหภูมิเพิ่มจำนวนเชื้อ BPW ISO ไว้ก่อนล่วงหน้าในระดับอุณหภูมิ $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ ซึ่งขึ้นอยู่กับเมทริกซ์ที่ทดสอบ โปรดดูตาราง 2, 3 หรือ 4
2. ผสมอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อกับตัวอย่างเข้าด้วยกันโดยใช้วิธีการแบบปลอดเชื้อ ผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดีด้วยวิธีการปั่นผสม การเขย่า หรือ การผสมด้วยมือเป็นระยะเวลา 2 ± 0.2 นาที บ่มเชื้อไว้ดังที่อธิบายไว้ในตารางวิธีการที่เกี่ยวข้อง โปรดดูตาราง 2, 3 หรือ 4

ตารางที่ 2 ระเบียบการของอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อทั่วไป

เมทริกซ์ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ	อุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนเชื้อ ($\pm 1^\circ\text{C}$)	เวลาการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)	ปริมาตรการวิเคราะห์ตัวอย่าง (ไมโครลิตร) ⁽ⁿ⁾
ระเบียบการที่ 1 ผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านการแปรรูป (ไม่รวมไขมัน และผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ระบุไว้ในระเบียบการอื่น ๆ) ^(a)	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-26	20
ระเบียบการที่ 2 อาหารดิบและอาหารที่ไม่ผ่านการแปรรูป ไขมัน อาหารสัตว์ และตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม ^(c)	25 g	225 mL BPW ISO (อุ่นไว้ล่วงหน้า)	41.5	18-26	20
ระเบียบการที่ 3 ผลิตภัณฑ์นมชนิดผง (ได้แก่ นมผงสำหรับทารก นมผงสำหรับทารกประเภทที่ห้าจากถั่วเหลือง)	25 g	225 mL BPW ISO	37	20-26	20
ระเบียบการที่ 4 ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากโกโก้ (ชนิดผง ช็อคโกแลต ลูกกวาด ฯลฯ)	25 g	นมผงพร้อมมันเนยแบบปลอดเชื้อความเข้มข้น 100 กรัมตอลิตรปริมาณ 225 มล. ที่ย้อมสีบิลเลียนตกรีนความเข้มข้น 0.002% ^(g,จ,ฉ)	37	24-30	20

ระเบียบการที่ 5 อื่น ๆ ไตแก เครื่องเทศ สมุนไพรที่มีกลิ่นหอม น้ำผลไม้เข้มข้น ชาและกาแฟพร้อมชง ซุปก้อน	25 g	2X BPW ISO 235 มล. ที่มี K ₂ SO ₃ 0.5% + นมผงพร่องมันเนยแบบปลอดเชื้อความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาณ 240 มล./L ^(ง,ข,ฅ)	37	24-30	10
ระเบียบการที่ 6 วอลนัทหรือถั่วเปลือกแข็งต่างๆ ที่ผสมด้วยวอลนัท (ขั้นตอนวิธีนี้เหมาะสำหรับถั่วเปลือกแข็งชนิดอื่นๆ, ไตแก พีแคน อัลมอนต์ พิสตาชิโอ เม็ดมะม่วงหิมพานต์ เกาลัด ถั่วแมคาเดเมีย ถั่วบราซิล ถั่วเหลือง และถั่วลิสง)	25 g	นมผงพร่องมันเนยแบบปลอดเชื้อ ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาณ 225 มล. ^(ข)	37	18-24	20

- (ก) ปริมาตรตัวอย่างที่นำไปใส่ไว้ในหลอดสารละลายไลซีส โปรดดูในขั้นตอน 4.7 ในหัวข้อไลซีส
- (ข) ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ที่นำมาทดสอบในระเบียบการที่ 1: อาหารพร้อมรับประทาน สลัดที่ขายในร้านค้า และคัสตาร์ด
- (ค) ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ที่นำมาทดสอบในระเบียบการที่ 2: เนื้อดิบ ผักแช่แข็ง เนยแข็งทุกชนิด นมเปรี้ยว ผักสลัดดิบ (ผักกาดหอม, ผักกาดหอมปิดตาเขียว)
- (ง) นมยูเอชทีพร่องมันเนยสามารถนำมาใช้แทนนมผงพร่องมันเนยได้
- (จ) ปริมาณ 0.45 มล. ของสีย้อมบิลเลียนด์กรีนชนิดน้ำที่มีค่าความเข้มข้น 1% ต่อมผงพร่องมันเนยปริมาณ 225 มล. ซึ่งให้ความเข้มข้นขั้นสุดท้ายของสีย้อมบิลเลียนด์กรีนที่ระดับ 0.002% (0.02 กรัมต่อลิตร)
- (ฉ) เพื่อเตรียมนมผงพร่องมันเนยแบบปลอดเชื้อ ให้แขวนลอยนมผงพร่องมันเนยปริมาณ 100 กรัม ที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้งไว้ในน้ำกลั่นหรือน้ำบริสุทธิ์ในปริมาณ 1 ลิตร คนไปมาจนกว่าจะละลาย นิ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 121°C จัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-30°C^(ข)
- (ช) K₂SO₃ ปริมาณ 5 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ BPW ISO 1000 มล. ของ ซึ่งจะทำให้ได้ค่าความเข้มข้นขั้นสุดท้ายของ K₂SO₃ ที่ระดับ 0.5%
- (ฅ) ต้องเติมนมผงพร่องมันเนยแบบปลอดเชื้อที่มีความเข้มข้น 100 กรัม/ลิตร ปริมาณ 240 มล.ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2X BPW ISO ปริมาณ 235 มล. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่มี K₂SO₃ 0.5%

หากใช้ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเชื้อทุกยูนิตแบบเพื่อเลือก เช่น อาหารเพิ่มจำนวนเชื้อ Rappaport Vassiliadis กรณีนี้จำเป็นต้องทำการเจือจางในอัตราส่วน 1:2 (เติมตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ส่วนลงในอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 ส่วน) หรือ เพียงแค่ถ่ายโอนอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อทุกยูนิตในปริมาณ 10 µL ไปยังหลอดสารละลายไลซีส Neogen หากใช้อาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ Tetrathionate (TT) ให้ถ่ายอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อทุกยูนิตในปริมาณ 20 µL ไปยังหลอดสารละลายไลซีส Neogen และห้ามกวนอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อ TT หรือเปิดตักจากกันหลอดอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการถ่ายโอนตะกอนใด ๆ ที่อาจเกิดขึ้นได้

คำแนะนำเฉพาะสำหรับวิธีการทดสอบที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

AOAC® Official Methods of AnalysisSM 2016.01

AOAC® Performance TestedSM Certificate #091501



จากโครงการ OMASM และ PTMSM ของสถาบันวิจัย AOAC Research Institute พบว่าชุดทดสอบ เชื้อ *ซาลโมเนลลา* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจหา เชื้อ *ซาลโมเนลลา* เมทริกซ์ที่ได้รับการทดสอบในการศึกษาดังกล่าวแสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ขั้นตอนปฏิบัติในการเพิ่มจำนวนเชื้อตามมาตรฐาน AOAC OMASM 2016.01 และตามใบรับรอง AOAC PTMSM Certificate #091501 ปริมาตรของตัวอย่างที่นำไปใส่ไว้ในหลอดสารละลายไลซีส Neogen คือ 20 ไมโครลิตร

เมทริกซ์ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ	อุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (±1°C)	เวลาการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)	
เนื้อวัวดิบบด	25 g	225 mL BPW ISO (อุ่นไวลวงหนา)	41.5	10-24	
	325 g	975 mL BPW ISO (อุ่นไวลวงหนา)			
เนื้อไก่ดิบบด	25 g	225 mL BPW ISO (อุ่นไวลวงหนา)	41.5	10-24	
	325 g	975 mL BPW ISO (อุ่นไวลวงหนา)	41.5	14-24	
เนื้อไก่ชุบแป้งทอดสุก	325 g	2,925 mL BPW ISO	37	18-24	
อาหารสุนัขชนิดแห้ง	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-24	
	375 g	1,500 mL BPW ISO			
พริกไทยดำ กุ้งดิบทั้งตัว ผักโขมดิบ บรอกโคลี เนยแข็งอเมริกันที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แล้ว	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-24	
น้ำล้างซากเนื้อไก่	30 มล.	30 mL BPW ISO (อุ่นไวลวงหนา)	41.5	18-24	
ฟองน้ำป้ายซากเนื้อไก่	ฟองน้ำ 1 ชิ้น	50 mL BPW ISO (อุ่นไวลวงหนา)	41.5	18-24	
นมผงพร่องมันเนยแบบพร้อมรับประทาน	25 g	225 mL BPW ISO	37	20-24	
ผงโกโก้	25 g	225 mL BPW ISO	37	24-28	
ไข่ดิบทั้งฟองที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แล้ว	100 มล.	900 mL BPW ISO	37	18-24	
น้ำรดต้นกล้าที่ไฉ้แล้ว	375 มล.	3,375 mL BPW ISO	37	18-24	
เนยถั่วชนิดครีม	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-24	
	375 g	3,375 mL BPW ISO			
ดอกกัญชาแห้ง ดอกกัญชงแห้ง ⁽⁴⁾	10 g	90 BPW-ISO	41.5	28-32	
จากสิ่งแวดล้อม	คอนกรีตแบบปิดผนึก	ฟองน้ำ 1 ชิ้น	225 mL BPW ISO (อุ่นไวลวงหนา)	41.5	18-24
	เหล็กสแตนเลส	ไม้สำลีป้ายเก็บตัวอย่าง 1 อัน	10 mL BPW ISO (อุ่นไวลวงหนา)	41.5	18-24
	กระเบื้องเซรามิกแบบปิดผนึก	ฟองน้ำ 1 ชิ้น	50 mL BPW ISO (อุ่นไวลวงหนา)	41.5	18-24

เมทริกซ์ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ	อุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (±1°C)	เวลาการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)	อาหารเพิ่มจำนวนเชื้อ (มล.)	อุณหภูมิของอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อ (±1°C)	เวลาการเพิ่มจำนวนเชื้อขั้นที่สอง (ชั่วโมง)
กุ้งดิบแบบทั้งตัว	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-24	R-V R10: 0.1 mL ลงใน 10 mL ⁽ⁿ⁾	41.5	4-24

(ก) ถ่ายโอนปริมาณ 10 µL ของตัวอย่างที่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแล้วไปยังหลอดสารละลายไลซีส โปรดดูในขั้นตอน 4.7 ในหัวข้อไลซีส



3M 01/16 -11/16
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

หากต้องการข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับการสิ้นสุดการบังคับใช้ของผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ โปรดอ่านเอกสารรับรองของ NF VALIDATION ที่พร้อมให้ใช้งานได้ตามเว็บไซต์ที่ระบุไว้ข้างต้น

วิธีการที่ได้รับการรับรองมาตรฐานของ NF VALIDATION ตามมาตรฐาน ISO 16140-2⁽⁷⁾ เมื่อเปรียบเทียบกับ ISO 6579⁽³⁾

ขอบเขตของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ มีดังต่อไปนี้: ผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับมนุษย์ทั้งหมด ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมด้านการผลิต (ที่รวมถึงตัวอย่างการผลิตขั้นปฐมภูมิ) อาหารสัตว์เลี้ยงและอาหารสัตว์โดยจัดทำการศึกษาตรวจสอบความถูกต้องในอาหารหลากหลายชนิด

การเตรียมตัวอย่าง: ควรเตรียมตัวอย่างตามมาตรฐาน EN ISO 6579⁽³⁾ และ EN ISO 6887⁽¹⁰⁻¹⁵⁾

เวอร์ชันซอฟต์แวร์: คู่มือรับรอง

ตารางที่ 4 ระเบียบการเพิ่มจำนวนเชื้อตาม 3M 01/16 -11/16 ที่เป็นวิธีการที่ผ่านการรับรองของ NF VALIDATION

ระเบียบการ	ขนาดตัวอย่าง	ปริมาณอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ	อุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (+1°C)	เวลาการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)	ปริมาณการวิเคราะห์ตัวอย่าง (ไมโครลิตร) ⁽ⁿ⁾
ระเบียบการที่ 1: <ul style="list-style-type: none"> ผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปหลากหลายชนิด (ไม่รวม ผงไข่ ผักและผลไม้แปรรูป และผลิตภัณฑ์ที่ระบุไว้ในระเบียบการอื่น ๆ) ผลิตภัณฑ์ปลาและอาหารทะเลแบบดิบทุกชนิด อาหารสัตว์เลี้ยงและอาหารสัตว์ การผลิตขั้นปฐมภูมิ (นอนฟัลล์) 	25 g	225 mL BPW ISO	37	18 - 26	20
ระเบียบการที่ 2: <ul style="list-style-type: none"> อาหารดิบและอาหารที่ไม่แปรรูปหลากหลายชนิด (ไม่รวมปลาดิบและอาหารทะเลดิบ และผลิตภัณฑ์ที่ระบุไว้ในระเบียบการอื่น ๆ) ผงไข่ ผักผลไม้ทุกชนิด ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมของการผลิตอาหาร 	25 กรัม หรือ การเช็ดถู 1 ครั้ง หรือ การป้ายเก็บตัวอย่าง 1 ครั้ง	อาหารเลี้ยงเชื้อ BPW ISO แบบอนุไวลวงหนาปริมาณ 225 มล.	41.5	18 - 26	20
ระเบียบการที่ 3: <ul style="list-style-type: none"> ผลิตภัณฑ์นมผง 	25 g	225 mL BPW ISO	37	20 - 26	20
ระเบียบการที่ 4: <ul style="list-style-type: none"> ผลิตภัณฑ์โกโก้ที่มีส่วนผสมของโกโก้มากกว่า 20% 	25 g	นมยูเอชทีพร่องมันเนย + สิบริลูเลียนตกรีนที่มีความเข้มข้น 0.002% ปริมาณ 225 มล.	37	24 - 30	20
ระเบียบการที่ 5: <ul style="list-style-type: none"> เครื่องเทศ สมุนไพรที่มีกลิ่นหอม น้ำผลไม้เข้มข้น ชา กาแฟ ส่วนผสมสำหรับทำอาหาร 	25 g	อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 x BPW ISO ปริมาณ 235 มล. + K ₂ SO ₃ 0.5% + นมยูเอชทีพร่องมันเนยปริมาณ 240 มล.	37	24 - 30	10
ระเบียบการที่ 6: <ul style="list-style-type: none"> เนื้อสัตว์ดิบ 	25 g	อาหารเลี้ยงเชื้อ BPW ISO แบบอนุไวลวงหนาปริมาณ 225 มล.	41.5	10 - 24	20

ระเบียบการที่ 7: • การผลิตชั้นปฐมภูมิ (พีคัล)	รองเท้าบูท สำหรับเก็บ ตัวอย่าง 1 ข้าง	100 mL ในอาหาร เหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ Tetrathionate	37	22 - 24	20
	25 g	อาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ Tetrathionate 225 mL			
ระเบียบการที่ 8: • นมผงสำหรับทารก ธัญพืชสำหรับ ทารก ผลิตภัณฑ์นมในรูปแบบผงที่ ไม่มีจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ^(b)	375 กรัม	อาหารเลี้ยงเชื้อ BPW ISO แบบอนุไวลวงหนาปริมาณ 3375 มล.	37	20 - 26	20
ระเบียบการที่ 9: • นมผงสำหรับทารก ธัญพืชสำหรับ ทารก ผลิตภัณฑ์นมในรูปแบบผงที่มี จุลินทรีย์ที่มีชีวิต ^(b)	375 กรัม	อาหารเลี้ยงเชื้อ BPW ISO แบบอนุไวลวงหนาปริมาณ 3375 มล. + Vancomycin (10 มก.ต่อลิตร)	37	20 - 26	20

(ก) ปริมาตรตัวอย่างที่นำไปใส่ไว้ในหลอดสารละลายไลซิส โปรดดูในขั้นตอน 4.7 ในหัวข้อไลซิส

(ข) สำหรับตัวอย่างนมผงและธัญพืชที่มีปริมาณมาก ค่อยๆ เติมตัวอย่างลงในช่องเหลวโดยคนบ่อยๆ เพื่อไม่ให้จับตัวกันเป็นก้อน

หมายเหตุ:

- ตัวอย่างที่มีปริมาณมากกว่า 25 กรัม ไม่ได้นำมาทดสอบในการศึกษาของ NF VALIDATION ยกเว้นในระเบียบการที่ 8 และ 9
- ระเบียบการโดยย่อในการตรวจหาเชื้อนั้น วัตถุประสงค์ของการบ่มเชื้อ จึงจำเป็นต้องปฏิบัติตามเงื่อนไขอุณหภูมิที่ระบุไว้ในข้อกำหนดทางเทคนิค ผู้ใช้ต้องตรวจสอบยืนยันว่าการอนุอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ ไวลวงหนานั้นถึงระดับอุณหภูมิที่กำหนดไว้ก่อนทำการบ่มเชื้อ ระยะเวลาในการเตรียมตัวอย่าง กล่าวคือ ความล่าช้าระหว่างช่วงท่ายของขั้นตอนการอนุอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ ไวลวงหนาจนถึงช่วงเริ่มต้นของขั้นตอนการบ่มเชื้อของตัวอย่างอาหารนั้นไม่ควรนานเกิน 45 นาที และแนะนำให้ใช้ตูมเชื้อที่มีของระบายอากาศสำหรับการบ่มเชื้อ
- ในการกายไอออนตัวอย่างจากอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ Tetrathionate (TT) ไปยังหลอดไลซิส Neogen นั้น ห้ามกวนอาหารเลี้ยงเชื้อ TT หรือบีบเปิดจากก้นหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการกายไอออนตะกอนใด ๆ ที่อาจเกิดขึ้นได้ การกายไอออนตะกอนอาจทำให้ได้ผลลัพธ์ที่ไม่ถูกต้อง
- จุดขัดจังหวะระเบียบการที่แนะนำคือช่วงภายหลังการเลี้ยงเชื้อหรือภายหลังการแยกสลายตัวอย่าง (sample lysis) อาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ หรือไลเซตตัวอย่างสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C ได้นานที่สุดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนำอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อออกจากที่เก็บ ให้ทำการทดสอบจากขั้นที่ 1 ในหัวข้อไลซิส หลังจากนำไลเซตตัวอย่างออกจากที่เก็บ ให้ทำการทดสอบจากขั้นที่ 8 ในหัวข้อไลซิส

การเตรียมภาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen®

1. ซุปผ้าหรือกระดาษเช็ดมือแบบใช้แล้วทิ้งในน้ำยาฟอกขาว 1-5% (ผสมกับน้ำตามอัตราส่วน) และเช็ดภาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen®
2. ใช้น้ำล้างภาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® นี้
3. ใช้กระดาษเช็ดมือแบบใช้แล้วทิ้งเช็ดภาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ให้แห้ง
4. ตรวจสอบให้แน่ใจว่าภาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen แห้งสนิทก่อนใช้งาน

การเตรียมซิลบลีคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen®

วางซิลบลีคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen® บนโต๊ะปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการโดยตรง ใช้ซิลบลีคที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (20-25°C)

การเตรียมฮีทบลีคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen®

วางฮีทบลีคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen® ในเครื่องทำความร้อนบลีคคู่แบบแห้ง เปิดเครื่องทำความร้อนบลีคแบบแห้งและตั้งอุณหภูมิเพื่อให้ฮีทบลีคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen มีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึง 100 ± 1°C

หมายเหตุ: ให้ฮีทบลีคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen มีอุณหภูมิตามที่กำหนดโดยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการทำงานของเครื่องทำความร้อน ไซเทอร์โมมิเตอร์ที่ได้รับตรวจสอบเทียบอย่างเหมาะสม (เช่น เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มบางส่วน เทอร์โมมิเตอร์แบบดิจิตอล ที่ไม่ใช่เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มทั้งหมด) วางไว้ในบริเวณที่กำหนด ตรวจสอบให้อุณหภูมิของฮีทบลีคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen อยู่ที่ 100 ± 1°C

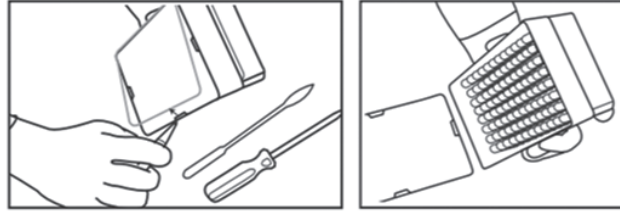
การเตรียมเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen®

1. เริ่มต้นการใช้งานซอฟต์แวร์สำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® แล้วลงชื่อเข้าสู่ระบบ ติดต่อตัวแทนของ Neogen Food Safety ของคุณเพื่อให้แน่ใจว่าคุณมีซอฟต์แวร์เวอร์ชันที่อัปเดตล่าสุด
2. เปิดเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen
3. สร้างหรือแก้ไขชุดการทดสอบที่มีข้อมูลสำหรับแต่ละตัวอย่าง ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในคู่มือการใช้งานระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

หมายเหตุ: ต้องรอให้เครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen มีสถานะพร้อมใช้ ก่อนที่จะใส่ภาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ขั้นตอนของการทำความร้อนนี้ใช้เวลาประมาณ 20 นาทีและบางชนิดด้วยไฟลีสัมบนแถบออกสถานะของเครื่อง เมื่อเครื่องมือพร้อมที่จะเริ่มต้นการทำงาน แถบออกสถานะดังกล่าวจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว

ไลซีส

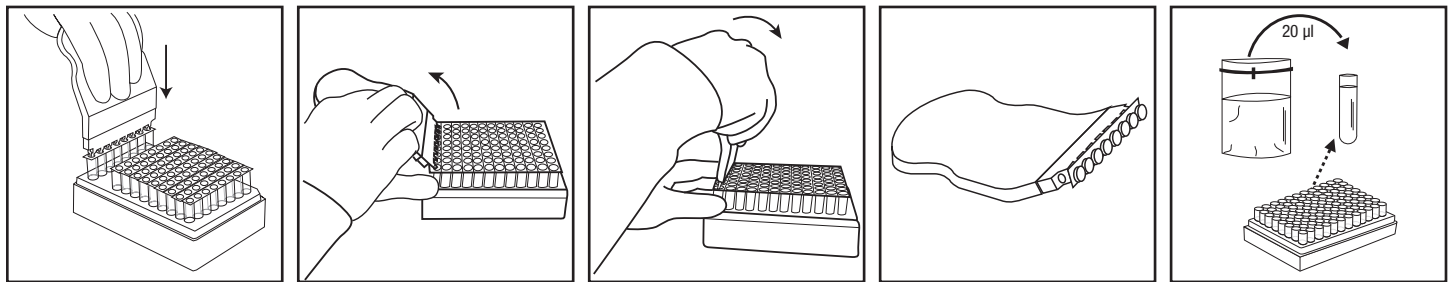
ใช้ไขควงไขหรือไม้พายถอดด้านล่างของที่วางสารละลายไลซีส Neogen ออก ก่อนวางลงบนฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen



1. รอให้หลอดสารละลายไลซีส Neogen อุ่นขึ้นโดยตั้งที่วางที่ระดับอุณหภูมิห้อง (20-25°C) นานข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) ทางเลือกอื่นๆ นอกเหนือจากการวางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ไว้ในอุณหภูมิห้อง ได้แก่ การวางไว้บนโต๊ะของห้องปฏิบัติการอย่างน้อย 2 ชั่วโมง การนำหลอดสารละลายไลซีส Neogen ไปต้มในที่ต้มน้ำที่อุณหภูมิ 37 ± 1°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือวางหลอดสารละลายไลซีสบนเครื่องทำความร้อนแบบแห้งเป็นเวลา 30 วินาทีที่อุณหภูมิ 100 ± 1°C
2. พลิกหลอดสารละลายไลซีสที่ปิดฝาอยู่ เพื่อผสมให้เข้ากัน ดำเนินการต่อในขั้นถัดไปภายใน 4 ชั่วโมง
3. นำอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อออกจากตุ้มเชื้อ
4. ใช้หลอดสารละลายไลซีส Neogen หนึ่งหลอดต่อตัวอย่างและต่อ NC (อาหารเพิ่มจำนวนเชื้อที่ปลอดเชื้อ)
 - 4.1 แก้วของหลอดสารละลายไลซีส Neogen สามารถตัดออกเพื่อให้มีจำนวนหลอดสารละลายไลซีส Neogen ตามที่ต้องการได้ เลือกจำนวนหลอดสารละลายไลซีส Neogen แต่ละหลอดหรือแก้วที่มี 8 หลอด ตามความจำเป็น วางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ลงในที่วางที่วางอยู่
 - 4.2 เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนข้าม ให้เปิดฝาของหลอดสารละลายไลซีส Neogen ทั้งแก้วในครั้งเดียว และใช้ปิเปตที่ปลอดเชื้อสำหรับถ่ายตัวอย่างในแต่ละขั้นตอน
 - 4.3 ถ่ายตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนเชื้อแล้วไปยังหลอดสารละลายไลซีส Neogen ตามคำอธิบายด้านล่างนี้:

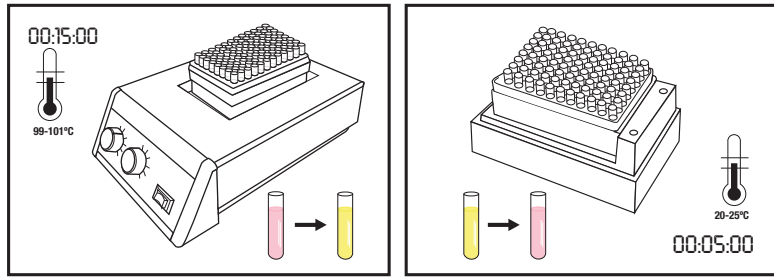
ถ่ายตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนเชื้อแต่ละตัวอย่างลงไปในหลอดสารละลายไลซีส Neogen แต่ละหลอด เป็นอันดับแรก ถ่าย NC เป็นอันดับสุดท้าย

- 4.4 ใช้อุปกรณ์เปิด/ปิดฝาหลอดสารละลายไลซีสโดยวิธี Neogen® ในการเปิดฝาหลอดสารละลายไลซีส Neogen ทีละแก้ว
- 4.5 ทิ้งฝาหลอดสารละลายไลซีส Neogen – หากจะเก็บไลเซตเอาไว้เพื่อทดสอบซ้ำ ให้วางฝาในภาชนะที่สะอาดเพื่อนำกลับมาใช้ซ้ำ
 - 4.5.1 หากต้องการข้อมูลเกี่ยวกับการดำเนินการเก็บไลเซต โปรดดูภาคผนวก A
- 4.6 กรณีทำการเก็บตัวอย่างที่มีลักษณะเหนียวหนืด ให้เขย่าถุงอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อก่อนเก็บตัวอย่างจากส่วนด้านข้างที่ผ่านการกรอง
- 4.7 ถ่ายไอออนตัวอย่างในปริมาณ 20 µL ไปยังหลอดสารละลายไลซีส Neogen เว้นแต่ระบุไว้เป็นอย่างอื่นในตารางแสดงระเบียบการ (ระเบียบการตัวอย่างที่ 5 และอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อทุติยภูมิใน RVS หรือ กรณีการใช้ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมที่มีบัพเฟอร์ที่เป็นกลาง)



5. ทำซ้ำขั้นตอน 4.4 ถึง 4.7 จนกระทั่งเติมตัวอย่างแต่ละตัวอย่างลงในหลอดสารละลายไลซีส Neogen ในแถวดังกล่าวเสร็จสิ้น
6. เมื่อถ่ายตัวอย่างทั้งหมดเสร็จแล้ว ให้ถ่าย NC (อาหารเพิ่มจำนวนเชื้อที่ปลอดเชื้อ เช่น BPW) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดสารละลายไลซีส Neogen ห้ามใช้น้ำเป็น NC
7. ตรวจสอบว่าอุณหภูมิของฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen อยู่ที่ 100 ± 1°C
8. วางภาดใส่หลอดสารละลายไลซีส Neogen ที่ไม่มีฝาปิด ลงในฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen และทำความร้อนเป็นเวลา 15 ± 1 นาที ระหว่างการทำให้ร้อน สารละลายในหลอดทดสอบไลซีส Neogen จะเปลี่ยนจากสีชมพู (เย็น) เป็นเหลือง (ร้อน)
 - 8.1. ตัวอย่างซึ่งไม่ได้รับความร้อนอย่างเหมาะสมในระหว่างขั้นตอนการไลซีสของชุดทดสอบอาจถือว่าเป็นสารที่อาจมีอันตรายทางชีวภาพ และไม่ควรใส่เข้าไปในเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen
9. นำที่วางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ที่ไม่ได้ปิดฝาดออกจากฮีทบล็อกและปล่อยให้เย็นลงในซิลบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen อย่างน้อย 5 นาทีแต่ไม่เกิน 10 นาที การใช้งานซิลบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen ให้วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยควรวางลงบนโต๊ะปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการโดยตรง เมื่อเย็นลงแล้ว สารละลายไลซีสก็จะเปลี่ยนกลับเป็นสีชมพู

10. นำที่วางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ออกจากซิลบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen

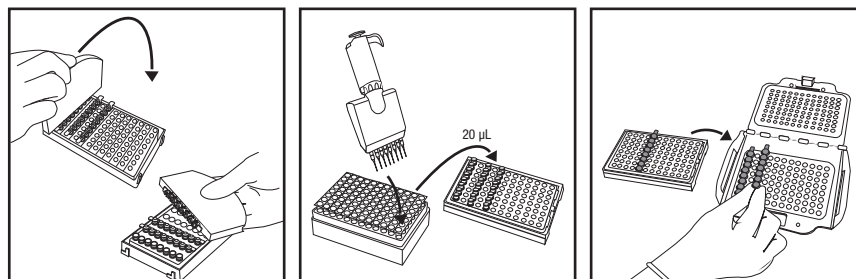


การเพิ่มขยาย

1. หลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบ ชื่อ *ซาล โมเนลส์* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen หนึ่งหลอดสำหรับตัวอย่างแต่ละชนิดและ NC
 - 1.1 สามารถตัดแถวของหลอดออก เพื่อให้มีจำนวนหลอดตามที่ต้องการได้ เลือกจำนวนหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบ ชื่อ *ซาล โมเนลส์* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen แต่ละหลอด หรือแถวที่มี 8 หลอด ตามต้องการ
 - 1.2 วางหลอดในที่วางที่วางอยู่
 - 1.3 หลีกเลียงการรบกวนเมตริเอเจนต์ที่กั้นหลอด
2. เลือกหลอดรีเอเจนต์คอนโทรลหนึ่งหลอดแล้ววางลงในที่วาง
3. เพื่อหลีกเลียงการปนเปื้อนข้าม ให้เปิดฝาของหลอดรีเอเจนต์หนึ่งแถวในแต่ละครั้งและใช้ปิเปตที่ปัดใหม่สำหรับถ่ายตัวอย่างในแต่ละขั้นตอน
4. ถ่ายไลเซตแต่ละตัวอย่างไปยังหลอดรีเอเจนต์และหลอด Neogen รีเอเจนต์คอนโทรลของชุดทดสอบ ชื่อ *ซาล โมเนลส์* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ตามคำอธิบายด้านล่าง:

ถ่ายไอโซเลตแต่ละตัวอย่างไปไว้ในหลอดรีเอเจนต์แต่ละหลอดก่อนเป็น **อันดับแรก** ตามด้วยชุดควบคุม (NC) เติมสารละลายลงในหลอด Neogen รีเอเจนต์คอนโทรลเป็น **ลำดับสุดท้าย**

5. ใช้เครื่องมือเปิด/ปิดฝาหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบ ชื่อ *ก้อโร* ระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen® ในการเปิดหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบ ชื่อ *ซาล โมเนลส์* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ทีละแถว ทิ้งฝาปิด
 - 5.1 ถ่ายไลเซตของตัวอย่างปริมาณ 20 ไมโครลิตร จากด้านบน 1/2 ของของเหลว (หลีกเลียงตะกอน) ในหลอดสารละลายไลซีส Neogen เข้าไปในหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบ ชื่อ *ซาล โมเนลส์* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ปล่อยสารละลายด้านข้างหลอด เพื่อหลีกเลียงการรบกวนเมตริเอเจนต์ที่กั้นหลอด ผสมโดยใช้ปิเปต ดูดขึ้นและลงเบา ๆ 5 ครั้ง
 - 5.2 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 5.1 จนกว่าจะเติมแต่ละไลเซตตัวอย่างลงไปในหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบ ชื่อ *ซาล โมเนลส์* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ในแถวนั้น
 - 5.3 ปิดหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบ ชื่อ *ซาล โมเนลส์* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ด้วยฝาก็อีกอันที่ให้มา และใช้ด้านบนของเครื่องมือเปิด/ปิดฝาหลอดทดสอบ โดยวิธี Neogen กดเข้าไปเข้ามาเพื่อให้แน่ใจว่าฝาปิดสนิท
 - 5.4 ทำซ้ำขั้นตอน 5.1 ถึง 5.3 ตามความจำเป็นสำหรับจำนวนตัวอย่างที่จะทดสอบ
 - 5.5 เมื่อถ่ายไลเซตตัวอย่างทั้งหมดแล้ว ให้ทำซ้ำขั้นตอนที่ 5.1 ถึง 5.3 เพื่อถ่ายไลเซต NC ปริมาณ 20 ไมโครลิตร เข้าไปในหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบ ชื่อ *ซาล โมเนลส์* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen
 - 5.6 ถ่ายไลเซต NC ปริมาณ 20 ไมโครลิตร เข้าไปในหลอด Neogen รีเอเจนต์คอนโทรล ปล่อยสารละลายด้านข้างหลอด เพื่อหลีกเลียงการรบกวนเมตริเอเจนต์ที่กั้นหลอด ผสมโดยใช้ปิเปต ดูดขึ้นและลงเบา ๆ 5 ครั้ง
6. บรรจุหลอดที่ปิดฝาแล้วลงในถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ที่สะอาดและขจัดกาปนเปื้อนแล้ว ปิดและล็อกฝาถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen



7. พิจารณาบททวนและยืนยันการดำเนินการที่กำหนดค่าไว้ในซอฟต์แวร์ทดสอบชื่อ *ก้อโร* ระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen
8. คลิกปุ่ม Start ในซอฟต์แวร์ แล้วเลือกเครื่องมือที่จะใช้ ฝาปิดของอุปกรณ์ที่เลือกจะเปิดโดยอัตโนมัติ

- ใส่ภาควัสดุทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ในเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen แล้วปิดฝาเพื่อเริ่มต้นการทดสอบ ระบบจะให้ผลการทดสอบภายในเวลา 60 นาที แม้ว่าผลที่เป็นบวกอาจจะตรวจจับได้เร็วกว่านั้นก็ตาม
- หลังจากการทดสอบเสร็จสมบูรณ์แล้ว ให้นำภาควัสดุทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ออกจากเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen แล้วกำจัดหลอดเหล่านั้นทิ้งโดยแช่ในน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (ในน้ำที่มีปริมาตรเท่ากัน) นาน 1 ชั่วโมง และปฏิบัติให้ห่างจากพื้นที่จัดเตรียมชุดทดสอบ

ข้อสังเกต: เพื่อลดความเสี่ยงในการได้ผลบวกปลอมอันเนื่องมาจากการปนเปื้อนข้าม ห้ามเปิดหลอดรีเอเจนต์ซึ่งบรรจุ DNA ที่เพิ่มขยายแล้ว ซึ่งรวมถึงหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบ เชื้อ *ซาลโมเนลลา* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen, หลอด Neogen รีเอเจนท์คอนโทรล และหลอดเมทริกซ์คอนโทรล Neogen กำจัดทิ้งหลอดรีเอเจนต์ที่ปิดฝาแล้วทุกครั้งโดยล้างในสารซักฟอกในครัวเรือนความเข้มข้น 1-5% (ต่อปริมาตรน้ำ) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และห่างจากบริเวณเตรียมการทดสอบ






ผลการทดสอบและการแปลความหมาย

อัลกอริทึมจะแปลความหมายเส้นโค้งของแสงที่ส่งออกมาอันเป็นผลมาจากการตรวจพบการเพิ่มขยายของกรดนิวคลีอิก ซอฟต์แวร์จะวิเคราะห์ผลการทดสอบนี้โดยอัตโนมัติและจะมีการเข้ารหัสสีตามผลที่ได้ดังกล่าว ผลการทดสอบที่ให้ค่าเป็นบวกหรือลบจะพิจารณาตัดสินโดยการวิเคราะห์พารามิเตอร์ของเส้นโค้งที่มีลักษณะเฉพาะตัวจำนวนหนึ่ง ผลการทดสอบเบื้องต้นที่เป็นบวกจะได้รับการรายงานในทันที ขณะที่ผลการทดสอบที่เป็นลบและผลที่น่าสงสัยจะแสดงผลภายหลังการทดสอบเสร็จสมบูรณ์แล้ว

ตัวอย่างที่สันนิษฐานว่าเป็นบวกควรได้รับการยืนยันตามขั้นตอนการปฏิบัติการตามมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ หรือโดยปฏิบัติตามการยืนยันวิธีการอ้างอิงที่เหมาะสม^(1,2,3) ที่เริ่มต้นด้วยการถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อ Neogen BPW ISO ปฐมภูมิไปยังอาหารเหลวทุติยภูมิตามด้วยการเลี้ยงเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อและการยืนยันการแยกเชื้อโดยใช้วิธีการทางชีวเคมีและและเซรัมวิทยาที่เหมาะสม

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบค่าแสงที่อ่านได้ก็ไม่ได้มีค่าเป็นศูนย์ เนื่องจากระบบและรีเอเจนต์ในการเพิ่มขยายสำหรับชุดทดสอบเชื้อ *ซาลโมเนลลา* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen จะมี "ค่าพื้นหลัง" ในหน่วยแสงสัมพัทธ์ (RLU)

ในบางครั้งอาจพบว่าแสงที่ได้จากปฏิกริยานี้มีลักษณะผิดปกติ อัลกอริทึมดังกล่าวจะถูกตีความออกมาว่าเป็น "ผลที่น่าสงสัย" บริษัท Neogen แนะนำให้ผู้ใช้ทำการทดสอบซ้ำสำหรับตัวอย่างที่ให้ผลที่น่าสงสัย หากผลการทดสอบยังคงเป็นที่น่าสนใจ ให้ทำการทดสอบเพื่อยืนยัน โดยใช้วิธีการตามที่ต้องการหรือตามที่ระบุโดยหน่วยงานกฏระเบียบในประเทศ

ประเภทของหลุมทดสอบ	สัญลักษณ์ผลการตรวจที่ได้จากหลุมทดสอบ	ผลการตรวจ	การแปลผลการตรวจวิเคราะห์
ตัวอย่าง		บวก	ตัวอย่างนี้ในเบื้องต้นให้ผลเป็นบวกสำหรับเชื้อก่อโรคเป้าหมาย
ตัวอย่าง		ลบ	ตัวอย่างนี้ให้ผลเป็นลบสำหรับเชื้อก่อโรคเป้าหมาย
ตัวอย่าง		ถูกยับยั้ง	เมทริกซ์ตัวอย่างนี้มีลักษณะยับยั้งต่อการตรวจวิเคราะห์ อาจจำเป็นต้องทำการทดสอบซ้ำ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดดูในส่วนหัวข้อการแก้ไขปัญหาและคำแนะนำการปฏิบัติงานผลิตภัณฑ์ของชุดทดสอบ
ตัวอย่าง		ตรวจสอบ	มีความคลุมเครือไม่แน่ชัดเกี่ยวกับการมีอยู่หรือไม่มีอยู่ของเชื้อก่อโรคเป้าหมาย อาจจำเป็นต้องทำการทดสอบซ้ำ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดดูในส่วนหัวข้อการแก้ไขปัญหาและคำแนะนำการปฏิบัติงานผลิตภัณฑ์ของชุดทดสอบ
ตัวอย่าง		ข้อผิดพลาด	ไม่ตรวจพบการเรืองแสงทางชีวภาพ อาจจำเป็นต้องทำการทดสอบซ้ำ สำหรับข้อมูลเพิ่มเติม โปรดดูในส่วนหัวข้อการแก้ไขปัญหาและคำแนะนำการปฏิบัติงานผลิตภัณฑ์ของชุดทดสอบ

การตรวจสอบยืนยันผลการทดสอบตามวิธีที่ได้รับการรับรองของ NF VALIDATION

ในบริบทของ NF VALIDATION ตัวอย่างทั้งหมดที่ระบุไว้ว่ามีผลเป็นบวกในการทดสอบด้วยชุดทดสอบ เชื้อ *ซาลโมเนลลา* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ต้องได้รับการยืนยันจากหนึ่งในการทดสอบต่อไปนี้:

- ตัวเลือกที่ 1:** การใช้มาตรฐาน ISO 6579⁽³⁾ ที่เริ่มต้นตั้งแต่การใช้อาหารเพิ่มจำนวนเชื้อบัพเฟอร์เปปโตโนวอร์เตอร์⁽³⁾
- ตัวเลือกที่ 2:** การใช้วิธีการยืนยันที่ประกอบด้วยวิธีการต่อไปนี้: ถ่ายโอนปริมาณ 0.1 mL ของอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อ BPW ISO⁽³⁾ หรืออาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Tetra Thionate (ตัวอย่างการผลิตขั้นปฐมภูมิ) ไปไว้ในอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ RVS ที่มีปริมาณ 10 mL บ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 24 ± 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 41.5°C ชัดเชื้อลงไปบนวุ้น Xylose Lysine Deoxycholate (XLD)⁽³⁾ หรือลงไปในวุ้น Chromogenic Agar ที่ใช้จำเพาะกับ เชื้อ *ซาลโมเนลลา* ดำเนินการด้วยเทคนิค Latex Agglutination โดยใช้ชุดทดสอบ Oxoid *Salmonella* LatexTest แบบโดยตรงบนโคโลนีที่แยกเชื้อ
- ตัวเลือกที่ 3:** การใช้โพรบวัดกรดนิวคลีอิกดังที่อธิบายไว้ในมาตรฐาน EN ISO 7218⁽⁵⁾ ซึ่งดำเนินการบนโคโลนีที่ได้แยกเชื้อที่จากวุ้น XLD หรือวุ้น Chromogenic Agar (ดูตัวเลือกที่ 1 หรือ 2) ต้องไม่ทำการทดสอบนี้ด้วยการใช้ชุดทดสอบ เชื้อ *ซาลโมเนลลา* ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen

ตัวเลือกที่ 4: สำหรับการใช่วิธีการอื่นใดที่ได้รับการรับรองจาก NF VALIDATION หลักการของวิธีการทดสอบจะต้องแตกต่างจากหลักการของชุดทดสอบ เชื้อซาลโมเนลล่าระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen จะต้องใช้ระเบียบการแบบครบถ้วนสมบูรณ์ที่อธิบายไว้สำหรับวิธีการที่สองที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้นี้ ขั้นตอนทั้งหมดก่อนการเริ่มต้นการยืนยันจะต้องเหมือนกันกับทั้งสองวิธีการ

กรณีผลการทดสอบไม่สอดคล้อง (ผลการทดสอบเบื้องต้นที่เป็นบวกด้วยการใช้ชุดทดสอบเชื้อซาลโมเนลล่าระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ที่ยังไม่ได้รับการยืนยันจากหนึ่งในเครื่องมือที่อธิบายไว้ข้างต้นและโดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับการทดสอบ Latex Agglutination) ห้องปฏิบัติการจะต้องปฏิบัติตามขั้นตอนที่จำเป็นเพื่อตรวจสอบว่าผลการทดสอบที่ได้รับถูกต้อง

หากท่านมีข้อสงสัยเกี่ยวกับการใช้งานหรือกรรมวิธีที่เฉพาะเจาะจงใดๆ โปรดเยี่ยมชมเว็บไซต์ของเราที่ www.neogen.com หรือติดต่อตัวแทนจำหน่ายหรือผู้จัดการจำหน่ายของบริษัท Neogen ในท้องถิ่นของท่าน

ภาคผนวก A การหยุดการทดสอบชั่วคราว: การเก็บรักษาและการนำไลเซตมาทดสอบซ้ำ

1. หากต้องการเก็บไลเซตที่ผ่านความร้อนมาแล้ว ให้ปิดฝาหลอดสารละลายไลเชตด้วยฝาที่สะอาด (โปรดดูไลเชต ในข้อ 4.5)
2. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ถึง 8°C ไม่เกิน 72 ชั่วโมง
3. เตรียมตัวอย่างที่เก็บไว้ โดยพลิกหลอดสารละลายไลเชตไปมา 2-3 ครั้งเพื่อผสมตัวอย่างให้เข้ากัน
4. เปิดฝาหลอด
5. ใส่หลอดไลเซตที่ผสมตัวอย่างเข้ากันแล้วลงในฮีทบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen และให้ความร้อนที่ $100 \pm 1^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 5 ± 1 นาที
6. นำที่วางหลอดสารละลายไลเชต Neogen ออกจากฮีทบล็อกและปล่อยให้เย็นในซิลบล็อกสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen อย่างน้อย 5 นาทีแต่ไม่เกิน 10 นาที
7. ดำเนินการทดสอบขั้นต่อไปในส่วน **การเพิ่มจำนวนเชื้อ** ตามรายละเอียดด้านล่าง

เอกสารอ้างอิง:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 5: *Salmonella*., Section C-24. November 2018 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 4.10. Isolation and identification of *Salmonella* from meat, poultry, pasteurized egg, and siluriformes (fish) products and carcass and environmental sponges. Effective Date: 2 January 2019.
3. ISO 6579-1. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218 Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. โปรดติดต่อตัวแทนของ Neogen Food Safety เพื่อรับเอกสารนี้
7. ISO 18593 Microbiology of the food chain – Horizontal methods for surface sampling.
8. US Food and Drug Administration – *Bacteriological Analytical Manual*, Medium M111: Nonfat Dry Milk (Reconstituted). January 2011.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain - part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
10. ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
11. ISO 6887-2:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products.
12. ISO 6887-3:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products.
13. ISO 6887-4:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
14. ISO 6887-5:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
15. ISO 6887-6:2013. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage.

คำอธิบายสัญลักษณ์

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.

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

Neogen Ireland, Ltd.

Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland



Neogen Corporation

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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00869A

제품 설명서

Neogen® Molecular Detection Assay 2 - **살모넬라**

제품 설명 및 용도

Neogen® Molecular Detection Assay 2 - **살모넬라**는 Neogen® Molecular Detection System을 사용하여 증균된 식품 및 식품 가공 환경 시료에서 **살모넬라**를 신속하고 명확하게 검출합니다.

Neogen® Molecular Detection Assay는 고리 매개 등은 증폭 방식으로 증폭 감지를 위한 생체발광이 결합되어, 높은 특이성과 민감도를 갖고 핵산 염기 서열을 빠르게 증폭시킵니다. 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 - **살모넬라**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 약품, 화장품, 임상 또는 수의학 시료 시험에 대해서는 이 제품을 문서화하지 않았습니다. Neogen Molecular Detection Assay 2 - **살모넬라**는 가능한 모든 식품, 식품 가공, 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, 시험 프로토콜, 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 펩트릭염완충액(BPW) ISO로 Neogen Molecular Detection Assay 2 - **살모넬라**를 평가했습니다.

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 - **살모넬라** 시험 키트에는 표 1에 설명된 바와 같이 96회 시험분이 포함되어 있습니다.

표 1. Neogen Molecular Detection Assay 키트 구성요소

항목	ID	수량	내용물	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 - 살모넬라 Reagent 튜브	녹색 튜브	96개 (8개들이 튜브 12개 스트립)	동결 건조된 특정 증폭 및 검출 혼합물	바로 사용 가능함
예비 캡	녹색 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 대조군(NC)은 멸균 증균 배지(예: BPW ISO)입니다. 물을 NC로 사용하지 마십시오.

안전

사용자는 Neogen Molecular Detection System 및 Neogen Molecular Detection Assay 2 - **살모넬라**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 - *살모넬라*를 사용해서는 안 됩니다.

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 - *살모넬라*를 보관할 때는 포장 및 제품 설명서에 명시된 바를 따릅니다.
- Neogen Molecular Detection Assay 2 - *살모넬라*는 유효 기간까지만 사용해야 합니다.
- Neogen Molecular Detection Assay 2 - *살모넬라*는 내부적으로 또는 제3자가 검증한 식품, 사료 및 식품 공정 환경 시료와 함께 사용합니다.
- Neogen Molecular Detection Assay 2 - *살모넬라*에는 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 증균 배양액 1에 넣음). Neutralizing Buffer 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:

- 교육을 받은 사람의 통제하에 적절하게 준비된 실험실에서 식중독균 시험을 수행하십시오. 배양된 증균 배지 및 장비 또는 배양된 증균 배지에 접촉한 표면에는 인체 건강에 위험을 초래할 수 있을 정도의 식중독균이 들어 있을 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 안됨). 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 표백제 또는 DNA 제거 용액으로 실험실 벤치와 장비(피펫, 캡/디캡 도구 등)의 오염을 제거하십시오.

위양성 결과가 발생할 위험을 줄이려면:

- 증폭 후에는 절대 튜브를 열지 마십시오.
- 오염된 튜브는 항상 1~5%(v:v 물)의 가정용 표백제에 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.com를 참고하거나 현지 Neogen이나 영업 대리점으로 문의하십시오.

시험 방법을 선택할 때, 시료 추출 방법, 시험 프로토콜, 시료 준비, 취급, 실험 기법, 시료 자체와 같은 외적 요인들이 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 - *살모넬라*의 결과에 영향을 미칠 수 있는지 확인할 수 있습니다. 매트릭스를 대표하는 여러 시료를 시험하십시오(예: Neogen 방법을 적용하거나 원료 또는 프로세스에 변화가 있었던 신규/미지의 매트릭스를 시험하는 유효성 검증의 기간 동안, 다양한 원천에서 얻은 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. 제품에서 의심되는 결함이 발견되면 발견일로부터 60일 이내에 Neogen으로 즉시 통지하고, 제품을 Neogen으로 반품해야 합니다. 추가 질문이 있으시면 Neogen 담당자 또는 Neogen 공인 대리점에 문의하시기 바랍니다.

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 - *살모넬라*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 - *살모넬라*는 사용하지 마십시오. 유효기한과 품목 번호는 상자의 외부 라벨에 기입되어 있습니다. 사용하고 난 증균 배지와 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *살모넬라* 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 표백제 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*SM 2016.01 및 AOAC® *Performance Tested*SM 인증서 #091501에 따른 증균 프로토콜.

표 4. NF VALIDATION 인증서 3M 01/16-11/16에 따른 증균 프로토콜.

시료 증균

표 2, 3 또는 4는 식품, 사료 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. BPW ISO 증균 배지를 시험할 매트릭스에 따라 주변 실험실 온도 또는 41.5±1°C로 온도 평형을 맞춥니다. 표 2, 3 또는 4 참조.
2. 증균 배지와 시료를 무균 방식으로 혼합합니다.
3. 2±0.2분간 혼합, 스토마킹 또는 손으로 충분히 혼합하거나 모든 덩어리가 완전히 녹아 증균 현탁액이 균질하게 될 때까지 균질화합니다⁽¹⁰⁻¹⁵⁾.
 - a. 모든 육류 및 입자가 매우 미세한 시료에 대해서는 필터 백을 사용하는 것이 좋습니다.
 - b. 물에서 부풀고 점성이 진한 매트릭스(예: 시리얼, 전분)의 경우 점도가 적당하게 줄어들 때까지 추가로 희석하거나(> 1:10) 멸균 1%(w/v) 알파-아밀라아제를 BPW (ISO)에 넣어줄 것을 권장합니다⁽¹⁰⁻¹³⁾.
 - c. 시료량이 많은 분유와 시리얼의 경우 멩치지 않도록 자주 섞으면서 시료를 천천히 용액에 넣어줍니다.
4. 적절한 프로토콜 표(표 2, 3 또는 4 참조)의 설명에 따라 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 Lethen Broth일 수 있습니다. 시료 추출 후 그 구역을 살균하는 것이 좋습니다.

경고: 스폰지용 수화 용액으로 아릴설포네이트 화합물을 함유하는 Neutralizing Buffer를 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 배양액 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 18593:2018⁽⁷⁾ 가이드라인에 따라 환경 시료를 채취합니다.

다른 시료 추출 프로토콜 또는 희석 비율을 검증하여 이 시험 방법이 사용자의 기준을 충족하도록 하는 것은 사용자의 책임입니다.

1. 시험할 매트릭스에 따라 BPW ISO 증균 배지를 41.5±1°C로 미리 가열합니다. 표 2, 3 또는 4 참조.
2. 증균 배지와 시료를 무균 방식으로 혼합합니다. 2±0.2분간 혼합, 스토마킹 또는 손으로 혼합하여 완전히 균질화합니다. 적절한 프로토콜 표의 설명에 따라 배양합니다. 표 2, 3 또는 4 참조.

표 2. 일반 증균 프로토콜.

시료 매트릭스	시료량	증균 배양액량	증균 온도 (±1°C)	증균 시간(hr)	시료 분석량 (μL) ^(a)
프로토콜 1 가공 식품(알가루 및 다른 프로토콜에 명시된 제품 제외) ^(b)	25g	225mL BPW ISO	37	18~26	20
프로토콜 2 날것 및 비가공 식품, 알가루, 동물 사료 및 환경 시료 ^(c)	25g	225mL BPW ISO (미리 가열)	41.5	18~26	20
프로토콜 3 분말 유제품(유아용 분유 및 유아용 콩분유)	25g	225mL BPW ISO	37	20~26	20
프로토콜 4 코코아계 제품(분말, 초콜릿, 과자 등)	25g	225mL의 멸균 100g/L 무지방 건조 우유와 0.002% 브릴리언트 그린 염료 ^(d,e,f)	37	24~30	20
프로토콜 5 기타: 향신료, 방향성 허브, 농축물, 인스턴트 차 및 커피, 부용 큐브	25g	235mL의 2X BPW ISO와 0.5% K ₂ SO ₃ + 240mL의 멸균 100g/L 무지방 건조 우유 ^(d,g,h)	37	24~30	10
프로토콜 6 호두 및 호두를 포함한 견과류 믹스 (이 프로토콜은 피칸, 아몬드, 피스타치오, 캐슈넛, 밤, 마카다미아, 브라질너트, 콩 견과류 및 땅콩을 비롯한 기타 견과류에도 적합합니다)	25g	225mL의 멸균 100g/L 무지방 건조 우유 ^(d)	37	18~24	20

- (a) Lysis Solution 튜브로 옮긴 시료의 양. Lysis 섹션, 4.7단계 참조.
- (b) 프로토콜 1를 이용해 시험할 제품의 예: 간편 조리 식사, 델리 샐러드, 커스터드.
- (c) 프로토콜 2를 이용해 시험할 제품의 예: 날고기, 냉동 야채, 모든 치즈, 발효유, 생샐러드(상추, 바타비아 상추).
- (d) 무지방 UHT 우유는 무지방 건조 우유로 대체할 수 있습니다.
- (e) 무지방 우유 225mL당 1% 수성 브릴리언트 그린 염료 0.45mL를 첨가하여, 최종 농도 0.002%(0.02g/L) 브릴리언트 그린 염료가 되게 합니다.
- (f) 멸균 무지방 건조 우유를 준비하기 위해 탈수 무지방 건조 우유 100g을 증류수 또는 정제수 1L에서 부유시킵니다. 녹을 때까지 휘저어 줍니다. 121°C에서 15분간 오토클레이브합니다. 2~30°C에서 보관합니다⁽⁸⁾.
- (g) BPW ISO 1000mL당 K₂SO₃ 5g을 첨가하여, 최종 농도 0.5% K₂SO₃가 되게 합니다.
- (h) 100g/L 멸균 무지방 건조 우유 240mL는 0.5% K₂SO₃가 첨가된 235mL 2X BPW ISO에 넣어야 합니다.

선택적 2차 증균 단계(예: Rappaport Vassiliadis 배지)를 이용할 경우 1:2 희석(시료 증균액 1을 멸균 증균 배양액 1에 넣음)을 하거나 간단히 2차 증균액 10μL를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮깁니다. Tetrathionate(TT) Broth를 사용하는 경우 2차 증균액 20μL를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮기고 침전물이 옮겨지지 않도록 TT 증균액을 vortex하거나 증균 튜브 바닥에서 피펫팅하지 마십시오.

검증 방법 관련 상세 설명

AOAC® Official Methods of AnalysisSM 2016.01

AOAC® Performance TestedSM 인증서 #091501



AOAC Research Institute OMASM 및 PTMSM 프로그램에서, Neogen Molecular Detection Assay 2 - 살모넬라는 살모넬라 검출에 효과적인 방법이라는 점이 밝혀졌습니다. 이 연구에서 실험된 매트릭스는 표 3에 나와 있습니다.

표 3. AOAC OMASM 2016.01 및 AOAC PTMSM 인증서 #091501에 따른 증균 프로토콜. Neogen Lysis Solution 튜브로 옮긴 시료량은 20µL입니다.

시료 매트릭스	시료량	증균 배양액량	증균 온도 (±1°C)	증균 시간(hr)	
생소고기 분쇄육	25g	225mL BPW ISO (미리 가열)	41.5	10~24	
	325g	975mL BPW ISO (미리 가열)			
생닭고기 분쇄육	25g	225mL BPW ISO (미리 가열)	41.5	10~24	
	325g	975mL BPW ISO (미리 가열)	41.5	14~24	
조리된 빵가루 입힌 닭고기	325g	2,925mL BPW ISO	37	18~24	
개 건조 식품	25g	225mL BPW ISO	37	18~24	
	375g	1,500mL BPW ISO			
검은 후추, 생 통새우, 포장된 생시금치, 저온 살균 처리된 미국산 치즈	25g	225mL BPW ISO	37	18~24	
닭고기 지육 세척	30mL	30mL BPW ISO (미리 가열)	41.5	18~24	
닭고기 지육 스펀지	스펀지 1개	50mL BPW ISO (미리 가열)	41.5	18~24	
인스턴트 무지방 건조 우유	25g	225mL BPW ISO	37	20~24	
코코아 분말	25g	225mL BPW ISO	37	24~28	
저온 살균 전란액	100mL	900mL BPW ISO	37	18~24	
사용된 발아식물 관개용수	375mL	3,375mL BPW ISO	37	18~24	
크리미 땅콩 버터	25g	225mL BPW ISO	37	18~24	
	375g	3,375mL BPW ISO			
말린 대마초 꽃, 말린 대마 꽃 ⁽⁴⁾	10 g	90 BPW-ISO	41.5	28-32	
PO 시험	포장된 콘크리트	스펀지 1개	225mL BPW ISO (미리 가열)	41.5	18~24
	스테인리스 스틸	면봉 1개	10mL BPW ISO (미리 가열)	41.5	18~24
	접착된 세라믹 타일	스펀지 1개	50mL BPW ISO (미리 가열)	41.5	18~24

시료 매트릭스	시료량	증균 배양액량	증균 온도 (±1°C)	증균 시간(hr)	2차 증균 배지 (mL)	2차 증균 온도 (±1°C)	2차 증균 시간 (hr)
생새우(머리 포함)	25g	225mL BPW ISO	37	18~24	R-V R10: 0.1mL를 10mL로 ^(a)	41.5	4~24

(a) 증균 시료 10µL를 Lysis Solution 튜브로 옮깁니다. Lysis 섹션, 4.7단계 참조.



3M 01/16 -11/16
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 6579⁽³⁾ 대비 ISO 16140-2⁽⁷⁾에 준한 NF VALIDATION 인증 방법.

검증의 범위: 광범위한 식품에 대한 유효성 검증 분석 수행을 통해 모든 인간의 식료품, 생산 환경 시료(일차 생산 시료 포함), 애완동물 사료 및 동물 사료.

시료 준비: 시료는 EN ISO 6579⁽³⁾ 및 EN ISO 6887⁽¹⁰⁻¹⁵⁾에 따라 준비해야 합니다.

소프트웨어 버전: 인증서 참고.

표 4. NF VALIDATION 인증 방법 3M 01/16 -11/16 따른 증균 프로토콜.

프로토콜	시료량	증균 배양액량	증균 온도 (+1°C)	증균 시간(hr)	시료 분석량 (µL) ^(a)
프로토콜 1: <ul style="list-style-type: none"> 광범위한 가공 식품(알가루, 가공 과일 및 야채, 다른 프로토콜에 명시된 제품 제외) 모든 생선 및 생해산물 애완동물 사료 및 동물 사료 일차 생산(분변이 아닌) 	25g	225mL BPW ISO	37	18~26	20
프로토콜 2: <ul style="list-style-type: none"> 광범위한 날것 및 비가공 식품 (날생선 및 생해산물, 다른 프로토콜에 명시된 제품 제외) 알가루 모든 과일 및 야채 식품 생산 환경 시료 	25g 또는 와이프 1개 또는 면봉 1개	225mL 미리 가열된 BPW ISO	41.5	18~26	20
프로토콜 3: <ul style="list-style-type: none"> 분말 유제품 	25g	225mL BPW ISO	37	20~26	20
프로토콜 4: <ul style="list-style-type: none"> 20% 이상 코코아를 함유한 코코아계 제품 	25g	225mL 무지방 UHT 우유 + 0.002% 브릴리언트 그린	37	24~30	20
프로토콜 5: <ul style="list-style-type: none"> 향신료, 방향성 허브, 농축물, 차, 커피, 요리 준비물 	25g	235mL 2 x BPW ISO + K ₂ SO ₃ 0.5% + 240mL 무지방 UHT 우유	37	24~30	10
프로토콜 6: <ul style="list-style-type: none"> 날고기 	25g	225mL 미리 가열된 BPW ISO	41.5	10~24	20
프로토콜 7: <ul style="list-style-type: none"> 일차 생산(분변) 	부츠 양말 1켄레	100mL Tetrathionate Broth	37	22~24	20
	25g	225mL Tetrathionate Broth			

프로토콜 8: <ul style="list-style-type: none"> ● 유아용 분유, 유아용 시리얼, 프로바이오틱스를 함유하지 않은 유제품 분말^(b) 	375g	3375mL 미리 가열된 BPW ISO	37	20~26	20
프로토콜 9: <ul style="list-style-type: none"> ● 유아용 분유, 유아용 시리얼, 프로바이오틱스를 함유한 유제품 분말^(b) 	375g	3375mL 미리 가열된 BPW ISO + 반코마이신 (10mg/L)	37	20~26	20

- (a) Lysis Solution 튜브로 옮긴 시료의 양. **Lysis** 섹션, 4.7단계 참조.
 (b) 시료량이 많은 분말과 시리얼의 경우 멩치지 않도록 자주 섞으면서 시료를 천천히 용액에 넣어줍니다.

참고:

- 25g을 초과하는 시료는 NF VALIDATION 연구에서 프로토콜 8과 9를 제외하고 시험되지 않았습니다.
- 단기 검출 프로토콜은 배양 조건에 민감합니다. 기술 사양에 명시된 온도 조건을 따라야 합니다. 사용자는 증균 배양액을 미리 가열하여 배양 전 필요한 온도에 도달하는지 반드시 확인해야 합니다. 증균 배지 사전 가열 단계 마지막과 식품 시료의 배양 단계 시작 사이의 지연 시간을 포함한 시료 준비 시간이 45분을 초과해서는 안 됩니다. 배양에는 환기 장치가 있는 배양기를 사용하는 것이 권장됩니다.
- 시료를 Tetrathionate(TT) Broth 증균액에서 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮기는 경우 침전물이 옮겨지지 않도록 TT 증균액을 vortex하거나 증균 튜브 바닥에서 피펫팅하지 마십시오. 침전물을 옮기는 경우 잘못된 결과가 나올 수 있습니다.
- 권장 프로토콜 중단 지점은 증균 후 또는 시료 Lysis 후입니다. 증균 배양액 또는 시료 lysate는 최대 72시간까지 2~8°C에서 보관할 수 있습니다. 증균 배양액을 보관소에서 꺼낸 후 **Lysis** 섹션의 1단계부터 시험을 다시 시작하십시오. 시료 lysate를 보관소에서 꺼낸 후 **Lysis** 섹션의 8단계부터 시험을 다시 시작하십시오.

Neogen® Molecular Detection 스피드 로더 트레이 준비

1. 1~5%(v:v 물) 가정용 표백 용액을 천 또는 1회용 타월에 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 블록 인서트를 바로 실험실 벤치에 놓아야 합니다. 실험실 실온(20~25°C)에서 블록을 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 아님)를 지정된 위치에 놓아 Neogen Molecular Detection 히팅 블록 인서트의 온도가 100±1°C인지 확인합니다.

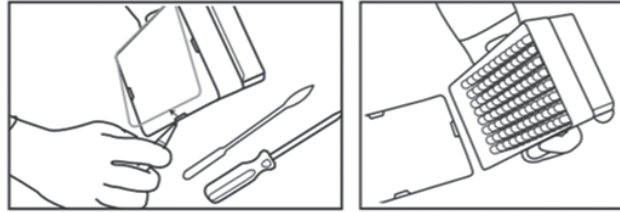
Neogen® Molecular Detection 장비 준비

1. Neogen® Molecular Detection 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

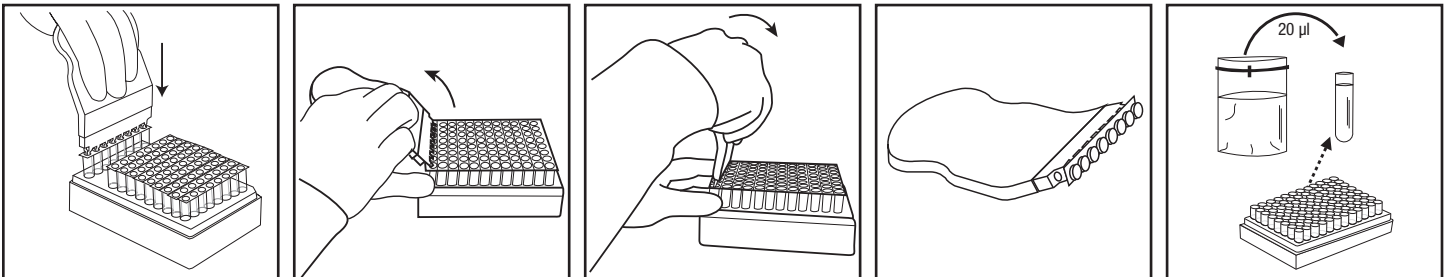
Neogen Molecular Detection 히팅 블록 인서트에 부착하기 전에 스크루드라이버나 스패툴라로 Neogen Lysis Solution 랙의 하단을 제거합니다.



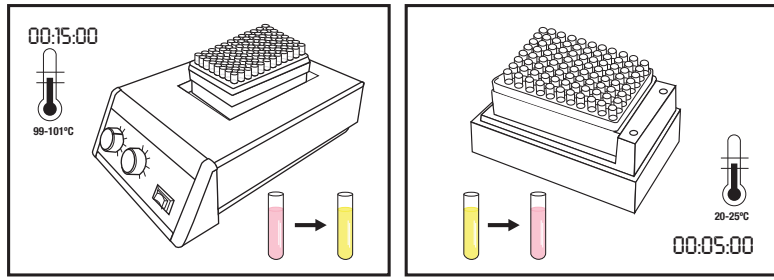
1. 랙을 실온(20~25°C)에서 하룻밤 동안(16~18시간) 두어 Neogen Lysis Solution 튜브를 예열합니다. Neogen Lysis Solution 튜브를 실온으로 평형시키는 또 다른 방법은 최소 2시간 동안 실험실 벤치에 Neogen Lysis Solution 튜브를 두거나, 37±1°C 배양기에 1시간 동안 Neogen Lysis Solution 튜브를 배양하거나 100±1°C의 건조한 이중 블록 히터에 30초간 두는 것입니다.
2. 캡을 씌운 튜브를 뒤집어 섞습니다. 4시간 이내에 다음 단계를 진행하십시오.
3. 배양기에서 증균 배양액을 꺼냅니다.
4. 각 시료와 NC 시료(멸균 증균 배지)에 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 마지막으로 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 점성이 있는 시료로 작업하는 경우 여과면에서 시료를 채취하기 전에 증균 백을 저어줍니다.
- 4.7 프로토콜 표에 별다른 표시가 없으면(예: 프로토콜 5 및 RVS에서 2차 증균 또는 Neutralizing Buffer와 함께 환경 시료를 사용할 경우) 시료 20µL를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮깁니다.



5. 각 시료가 스트립의 해당 Neogen Lysis Solution 튜브에 모두 추가될 때까지 4.4~4.7단계를 반복합니다.
6. 모든 시료를 옮겼을 때 NC(멸균 증균 배지, 예: BPW) 20µL를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮깁니다. 물을 NC로 사용하지 마십시오.
7. Neogen 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. Lysis 단계 동안 적절하게 열처리가 되지 않은 시료는 잠재적인 생물학적 위험으로 간주되므로 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. Neogen Molecular Detection 냉각 블록 인서트는 상온에서 바로 실험실 벤치에 놓아야 합니다. 식으면 Lysis Solution이 분홍색으로 다시 바뀝니다.
10. Neogen Lysis Solution 튜브의 랙을 Neogen Molecular Detection 냉각 블록 인서트에서 제거합니다.

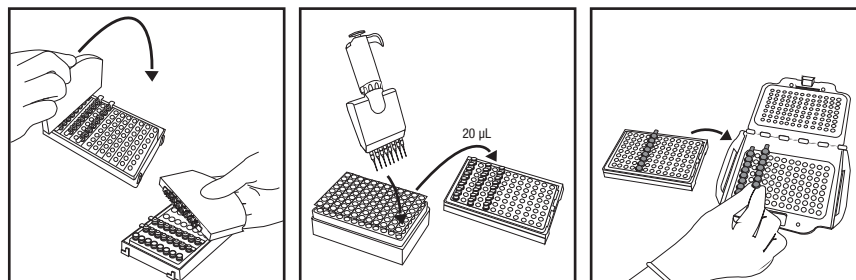


중폭

1. 각 시료와 NC를 위해 1개의 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *살모넬라* Reagent 튜브가 필요합니다.
 - 1.1 튜브 스트립을 원하는 튜브 개수로 자를 수 있습니다. 개별 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *살모넬라* Reagent 튜브 또는 필요한 8개들이 튜브 스트립 수를 선택합니다.
 - 1.2 Reagent 튜브를 빈 랙에 놓습니다.
 - 1.3 튜브 맨 아래 시약 알갱이를 휘젓지 마십시오.
2. 하나의 Reagent 컨트롤 튜브를 선택하고 랙에 놓습니다.
3. 교차 오염을 방지하기 위해 한 번에 하나씩 Reagent 튜브 스트립의 캡을 벗기고 각 분주 단계에 새 피펫 팁을 사용합니다.
4. 아래 설명된 대로 각 Lysate를 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *살모넬라* Reagent 튜브 및 Neogen Reagent 컨트롤 튜브로 옮깁니다.

각 시료 Lysate를 개별 Reagent 튜브로 **먼저** 옮긴 뒤 NC를 옮깁시오. **마지막**에 Neogen Reagent 컨트롤 튜브를 수화합니다.

5. Neogen® Molecular Detection Reagent Cap/Decap Tool을 사용하여 한 번에 스트립 하나씩 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *살모넬라* 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 - *살모넬라* Reagent 튜브로 옮깁니다. 알갱이가 휘저어져 섞이지 않도록 기울여 붓습니다. 위아래로 가볍게 5번을 피펫팅하여 섞습니다.
 - 5.2 개별 시료 Lysate이 스트립의 해당 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *살모넬라* Reagent 튜브에 추가될 때까지 5.1 단계를 반복합니다.
 - 5.3 제공된 여분의 마개로 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *살모넬라* 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 5.1~5.3단계를 반복하여 NC Lysate 20µL를 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *살모넬라* Reagent 튜브로 옮깁니다.
 - 5.6 **NC lysate 20µL를 Neogen Reagent 컨트롤 튜브로 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 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 60분 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 표백 용액에 1시간 동안 담갔다 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 - *살모넬라* Reagent, Neogen Reagent 컨트롤 및 Neogen 매트릭스 컨트롤 튜브가 포함됩니다. 밀봉된 Reagent 튜브는 1~5%(v:v 물)의 가정용 표백제에 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 Neogen BPW ISO 증균액에서 2차 증균 배양액으로 옮기는 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 - *살모넬라* 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.

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

NF VALIDATION의 경우 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *살모넬라*에서 양성으로 식별된 모든 시료는 다음 중 하나의 시험에 따라 확인해야 합니다:

방법 1: 펩톤식염완충액⁽³⁾ 증균액부터 ISO 6579⁽³⁾ 표준 사용.

방법 2: 다음으로 구성된 확인 방법 실행: BPW ISO⁽³⁾ 증균액 0.1mL 또는 Tetra Thionate Broth 증균액(일차 생산 시료)을 RVS Broth 10mL로 옮깁니다. 41.5°C에서 24±3시간 동안 배양합니다. Xylose Lysine Deoxycholate(XLD)⁽³⁾ 한천 배지 또는 *살모넬라*에 특화된 크로모제닉 한천 배지에 도말하십시오. Oxoid *살모넬라*라텍스 검사를 이용해 분리된 집락에 라텍스 응집 검사를 수행합니다.

방법 3: 분리된 집락(XLD 또는 크로모제닉 한천 배지)에 수행된 EN ISO 7218⁽⁵⁾ 표준에 명시된 대로 핵산 프로브 사용(방법 1 또는 2 참조). 이 시험은 Neogen Molecular Detection Assay 2 - *살모넬라*를 이용해 수행해서는 안 됩니다.

방법 4: Neogen Molecular Detection Assay 2 - *살모넬라*와 다른 원인인 기타 NF VALIDATION 인증된 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(Neogen Molecular Detection Assay 2 - *살모넬라* 사용 시 추정 양성, 상기 방법 중 한 가지로 확인 불가 및 특히 라텍스 응집 검사에 대해), 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 씩웁니다(Lysis 섹션 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 넣고 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 Analytical Manual. Chapter 5: *Salmonella*., Section C-24. November 2018 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 4.10. Isolation and identification of *Salmonella* from meat, poultry, pasteurized egg, and siluriformes (fish) products and carcass and environmental sponges. Effective Date: 2 January 2019.
3. ISO 6579-1. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 18593. Microbiology of the food chain – Horizontal methods for surface sampling.
8. US Food and Drug Administration – *Bacteriological Analytical Manual*, Medium M111: Nonfat Dry Milk (Reconstituted). January 2011.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain - part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
10. ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
11. ISO 6887-2:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products.
12. ISO 6887-3:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products.
13. ISO 6887-4:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
14. ISO 6887-5:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
15. ISO 6887-6:2013. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage.

기호 설명

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

Neogen Corporation

620 Leshar Place
Lansing, MI 48912 USA
Neogen.com

Neogen Europe Ltd.

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

Neogen Ireland, Ltd.

Bray Business Park, Bray
Co. Wicklow
A98YV29, Ireland



Neogen Corporation

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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00869A