SNAPSHOOT
ENGINEERED FOR A SAFER TOMORROW

현장을 이해하고, 필요한 솔루션을 연결합니다.

산업안전 · 추락방지 시스템
산업용 소재 · 건축자재
제품 제안부터 공급·시공·설치·교육까지



COMPANY INFORMATION

스냅슛 (SNAPSHOOT)

ADDRESS (15431) 경기도 안산시 단원구 풍전로 37-9 트리플렉스 301동 118호
TEL 0507-1374-9229
FAX 0504-481-6749
E-MAIL bkkim@snapshoot.co.kr

TECHNICAL DOCUMENTS

인증서 · 데이터시트 · 기술자료

제품의 규격과 성능, 인증 및 적용 조건을 확인하기 위한 자료입니다.

ABOUT SNAPSHOOT

제품 공급을 넘어, 현장에 맞는 해결책으로

스냅슛은 산업현장의 작업 환경과 요구 조건을 바탕으로
적합한 제품과 시스템을 제안합니다. 현장 실사를 통해 설치 조건을 확인하고,
공급부터 시공·설치 및 사용 교육까지 필요한 과정을 함께합니다.

추락방지 시스템

안전대부착설비 · 수평·수직 라이프라인
레일 시스템 · 리지드 포스트

밀폐공간 진입·구조 솔루션

데빗암 · 삼각대 · 구조용 윈치
윈치 안전블록 · 구조장비

산업안전 보호구

전신형 안전대 · 랜야드 · 안전블록
작업 환경에 맞춘 개인보호구

산업용 소재·건축자재

산업용 테이프 · 접착제 · 기능성 소재
구조용 스크류 · 목조건축 자재

SNAPSHOOT
ENGINEERED FOR A SAFER TOMORROW

홈페이지 바로가기 →
문서 라이브러리 바로가기 →
시공사례 바로가기 →
문의하기 →

본 페이지는 스냅슛의 자료 제공 안내용 표지입니다. 첨부된 인증서 및 기술자료의 발행 주체, 인증 대상과 적용 범위는 해당 원문을 기준으로 확인해 주세요.

NEOGEN®

Product Instructions
MDA2CRO96

- (EN) **Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter***
- (FR) **Kit de détection moléculaire version 2 - *Cronobacter***
- (DE) **Molekularer Detektions Assay 2 - *Cronobacter***
- (IT) **Analisi molecolare di seconda generazione per il rilevamento di *Cronobacter***
- (ES) **Ensayo 2 Detección Molecular - *Cronobacter***
- (NL) **Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter***
- (SV) **Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter***
- (DA) **Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter***
- (NO) **Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter***
- (FI) **Molecular Detection -testipakkaus 2 – *Kronobakteeri***
- (PT) **Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter***
- (EL) **Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter***
- (PL) **Molekularny test do wykrywania 2 - *Cronobacter***
- (RU) **Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter***
- (TR) **Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter***
- (JA) **病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用***
- (ZH) **分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌* (Simplified)**
- (TH) **ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์***
- (KO) **분자 검출 키트 2 - *크로노박터***
- (ID) **Deteksi Molekuler 2 - untuk Pengujian *Cronobacter***



Cronobacter

Issue Date: 2024-01

NEOGEN®

Product Instructions

Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter*

Product Description and Intended Use

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

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

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

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

Neogen has evaluated the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* with Buffered Peptone Water (ISO) enrichment medium.

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

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

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

Table 1. Neogen Molecular Detection Assay Kit Components

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

The Negative Control, not provided in the kit, is sterile enrichment medium, e.g., BPW ISO. Do not use water as a Negative Control.

Safety

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

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

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

⚠ WARNING

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

The user must train its personnel in current proper testing techniques: for example, Good Laboratory Practices[3], 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 - *Cronobacter* as indicated on the package and in the product instructions.
- Always use the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* by the expiration date.
- Use the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* with food and food process environmental samples that have been validated internally or by a third party.
- Use the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* only with surfaces, sanitizers, protocols and bacterial strains that have been validated internally or by a third party.
- For an environmental sample containing Neutralizing Buffer with aryl sulfonate complex, perform a 1:2 dilution before testing (1 part sample into 1 part sterile enrichment broth). Another option is to transfer 10 µL of the NB enrichment into the Neogen Lysis Solution tubes. Neogen® Sample Handling products which include Neutralizing Buffer with aryl sulfonate complex: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G and HS2410NB2G. This protocol has not been tested during the NF Validation study.

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

- Perform pathogen testing in a properly equipped laboratory under the control of trained personnel. Incubated enrichment media and equipment or surfaces that have come into contact with incubated enrichment media may contain pathogens at levels sufficient to cause risk to human health.
- Always follow standard laboratory safety practices, including wearing appropriate protective apparel and eye protection while handling reagents and contaminated samples.
- Avoid contact with the contents of the enrichment media and reagent tubes after amplification.
- Dispose of enriched samples and associated contaminated waste according to current local/regional/national/industry standards.
- 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.

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 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 are 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.
- If samples are suspected to contain high levels of *Cronobacter* DNA (e.g., DNA from non-viable *Cronobacter* cells that have been subjected to a kill / inactivation step), presumptive positive enrichments should be treated with DNase before the **Lysis** step. Contact your Neogen Representative for additional instructions. This protocol has not been tested during the NF Validation study.

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

If you have questions about specific applications or procedures, please visit our website at 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 including homogenization and mixing, handling, and laboratory technique may influence results.

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

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

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

To help customers evaluate the method for various 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 - *Cronobacter* results. Test several samples, representative of the matrix, i.e. samples obtained from different origin, during any validation period when adopting the Neogen method or when testing new or unknown matrices or matrices that have undergone raw material or process changes.

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

Limitation of Warranties / Limited Remedy

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

Limitation of Neogen Liability

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

Storage and Disposal

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

Do not use Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* past the expiration date. Expiration date and lot number are noted on the outside label of the box. After use, the enrichment medium and the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* tubes can potentially contain pathogenic materials. When testing is complete, follow 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 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*℠ 2018.01 and *Performance Tested*℠ Certificate number 101703

Table 4 for enrichment protocols according to NF VALIDATION certificate 3M 01/20-03/18

Sample Enrichment

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

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

Foods, Environmental Powders, Dusts, Sweepings and Sponges

1. Equilibrate the enrichment medium to ambient temperature (20-25°C) unless otherwise noted in the enrichment protocol (See Table 2, 3 or 4).
2. Aseptically combine the enrichment medium and sample and homogenize thoroughly by blending, stomaching, vortexing or hand mixing for 2 ± 0.2 minutes **or until all lumps are completely dissolved and the enrichment suspension is homogeneous**[7, 8].
   a. Factors such as sample preparation including homogenization and mixing, handling, and laboratory technique may influence results.
   b. For highly particulate samples, the use of filter bags is recommended.
   c. For matrices which swell in water and are highly viscous (e.g., cereals, starches), it is suggested to make further dilutions (> 1:10) until viscosity is suitably reduced or add sterile 1% (w/v) alpha-amylase to BPW (ISO)[8].
   d. For large sample sizes of cereals, add the powdered cereal slowly to the liquid with frequent mixing to avoid clumps.
3. Incubate as outlined in the appropriate protocol table (See Table 2, 3, or 4).

Table 2. General Enrichment Protocols

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

1. Neogen has evaluated the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* using the dilution ratios in Table 2 up to 300g. It is the user's responsibility to validate alternate dilution ratios or protocols to ensure the method meets the user's criteria.
2. Use **pre-warmed** BPW (ISO) if enrichment broth volume is > 300 mL (e.g., sample is > 30 grams).

Specific Instructions for Validated Methods

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

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

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

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

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

Sample Matrix	Sample Size	Enrichment Broth Volume[1]	Enrichment Temperature (± 1°C)	Enrichment Time (hours)	Sample Analysis Volume
Powdered Infant Formula and Powdered Infant Cereal	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
Powdered Infant Cereal non-probiotic	300 g	2700 mL BPW (ISO) (1:10)	Pre-Warmed 37	18-24	20 µL
Powdered Infant Formula and Powdered Infant Cereal with probiotics	300 g	2700 mL BPW (ISO) + 10 mg/L Vancomycin	Pre-Warmed 37	22-24	20 µL
Lactose	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
Environmental sponge with 10 mL D/E Neutralizing Broth	1 sampling device	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL

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

NF VALIDATION by AFNOR Certification

BY AFNOR CERTIFICATION NF VALIDATION EN ISO 16140

3M 01/20-03/18

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

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

NF VALIDATION certified method in compliance with ISO 16140-2[9] in comparison to ISO 22964.

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

Sample preparation: Samples should be prepared according to EN ISO 22694[2] and EN ISO 6887[7, 8].

Software version: See certificate.

Table 4. Enrichment Protocols According to NF VALIDATION Certified Method 3M 01/20-03/18

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

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

Preparation of the Neogen® Molecular Detection Speed Loader Tray

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

Preparation of the Neogen® Molecular Detection Chill Block Insert

Place the Neogen Molecular Detection Chill Block Insert directly on the laboratory bench: The Neogen Molecular Detection Chill Block Tray is not used. Use the block at ambient laboratory temperature (20-25°C).

Preparation of the Neogen® Molecular Detection Heat Block Insert

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

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

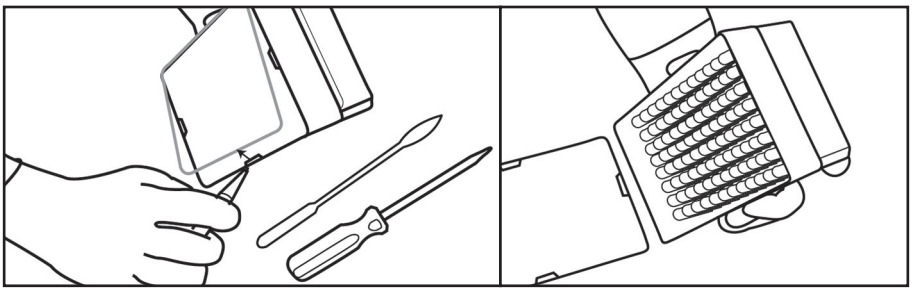
Preparation of the Neogen® Molecular Detection Instrument

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

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

Lysis

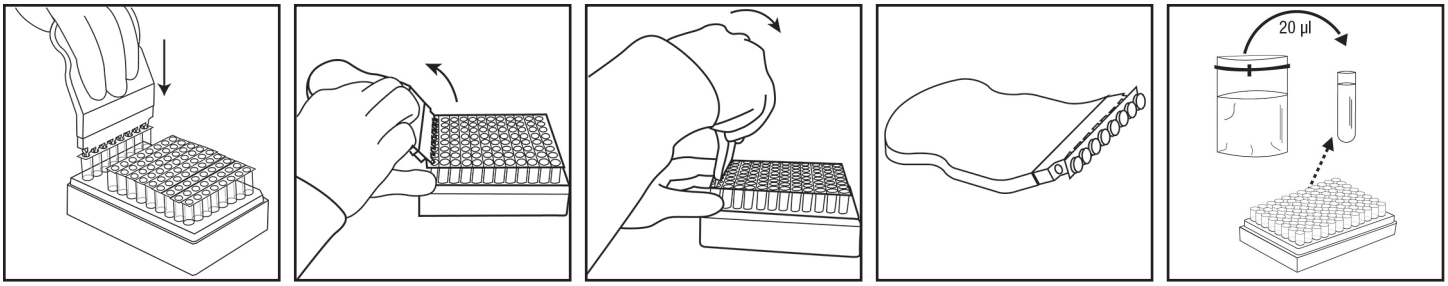
Remove the bottom of Neogen Lysis Solution Rack with a screwdriver before placing in in the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert.



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

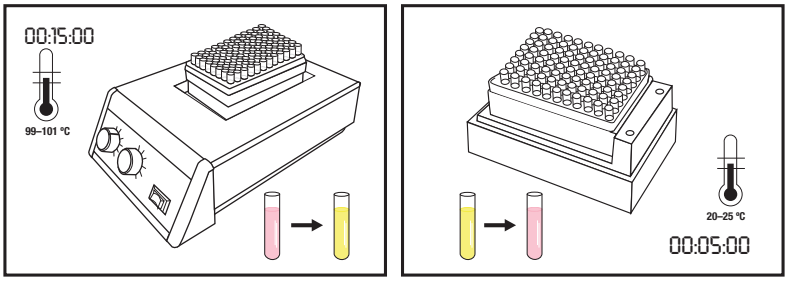
     Transfer each enriched sample into an individual Neogen Lysis Solution tube **first**. Transfer the NC **last**.

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



6. When all samples have been transferred, transfer 20 µL of NC (sterile enrichment medium e.g. BPW) into Neogen Lysis Solution tube. Do not use water as a NC.
7. Verify that the temperature of the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert is at 100 ± 1°C.
8. Place the uncovered rack of Neogen Lysis Solution tubes in the Neogen Molecular Detection Heat Block Insert and heat for 15 ± 1 minutes. During heating, the Neogen Lysis Solution will change from pink (cool) to yellow (hot).

   Samples that have not been properly heat treated during the assay lysis step may be considered a potential biohazard and should NOT be inserted into the Neogen Molecular Detection Instrument.
9. Remove the uncovered rack of Neogen Lysis Solution tubes from the Neogen Molecular Detection Heat Block and allow to cool in the Neogen Molecular Detection Chill Block Insert at least 5 minutes and a maximum of 10 minutes. The Neogen Molecular Detection Chill Block Insert, used at ambient temperature without the Neogen® Molecular Detection Chill Block Tray, should sit directly on the laboratory bench. When cool, the Neogen Lysis Solution will revert to a pink color.
10. Remove the rack of Neogen Lysis Solution tubes from the Neogen Molecular Detection Chill Block Insert.



Amplification

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

Transfer each sample lysate into individual Neogen Molecular Detection Assay 2- *Cronobacter* Reagent Tube **first** followed by the NC. Hydrate the Neogen Reagent Control Tube **last.**

5. Use the Neogen® Molecular Detection Cap/Decap Tool-Reagent to decap the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* Reagent tubes –one Reagent tube strip at a time. Discard cap.
   5.1 **Transfer 20 µL of sample lysate from the upper 1/2 of the liquid (avoid precipitate) in the Neogen Lysis Solution Tube into corresponding Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* Reagent Tube. Dispense at an angle to avoid disturbing the pellets. Mix by gently pipetting up and down 5 times.**
   5.2 Repeat step 5.1 until individual Sample lysate has been added to a corresponding Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* Reagent Tube in the strip.

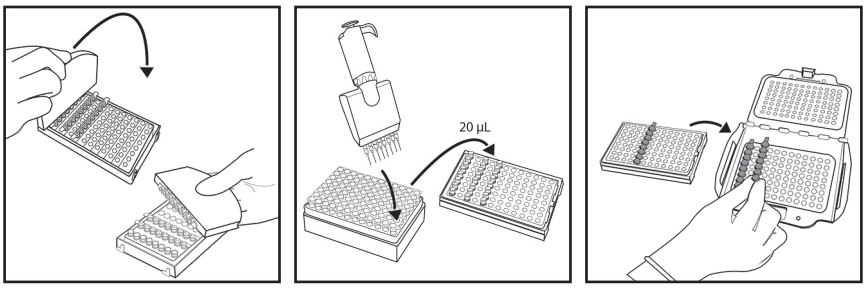
5.3 Cover the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* Reagent Tubes with the provided extra caps and use the rounded side of the Neogen Molecular Detection Cap/Decap Tool-Reagent to apply pressure in a back and forth motion ensuring that the cap is tightly applied.

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

5.5 When all sample lysates have been transferred, repeat 5.1 to 5.3 to transfer 20 µL of NC lysate into a Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* Reagent Tube.

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

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



7. Review and confirm the configured run in the Neogen Molecular Detection 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 - *Cronobacter* Reagent, Neogen Reagent Control, and Neogen Matrix Control Tubes. Always dispose of sealed reagent tubes by soaking in a 1-5% (v:v in water) 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.

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

Confirmation

- Confirmation of results according to the NF Validation Certified Method

In the context of the NF VALIDATION, all presumptive positive enrichments should be confirmed by following reference method confirmation[2], beginning with transfer from the primary enrichment (BPW ISO or BPW ISO supplemented with 10 mg/L of vancomycin).

- Other confirmation protocol

Presumptive positive enrichments should be confirmed per the laboratory standard operating procedures or by following the appropriate reference method confirmation[1,2], beginning with transfer from the primary enrichment (BPW ISO or BPW ISO supplemented with 10 mg/L of vancomycin) to a secondary enrichment media, followed by subsequent plating and confirmation of isolates using appropriate biochemical, serological and/or molecular methods.

In the rare event of any unusual light output, the algorithm labels this as Inspect. Neogen recommends the user to repeat the assay for any Inspect samples. If the result continues to be Inspect, proceed to confirmation test using your preferred method or as specified by local regulations[1,2].

In the event of discordant results (presumptive positive with the Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter*, non-confirmed by one of the means described above), the laboratory should follow their established standard operating procedures to report their results.

If you have questions about specific applications or procedures, please visit our website at 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 2 to 8°C for up to 72 hours.
3. Prepare a stored sample for amplification by inverting 2-3 times to mix.
4. Decap the tubes.
5. Place the mixed lysate tubes on Neogen Molecular Detection Heat Block Insert and heat at 100 ± 1°C for 5 ± 1 minutes.
6. Remove the rack of Neogen Lysis Solution Tubes from the heating block and allow to cool in the Neogen Molecular Detection Chill Block Insert at least 5 minutes and a maximum of 10 minutes.
7. Continue the protocol at the **Amplification** section detailed above.

References:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
8. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

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

Explanation of Symbols

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

NEOGEN

Instructions relatives au produit

Kit de détection moléculaire version 2 – *Cronobacter*

Description et utilisation du produit

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

Le Neogen Kit de détection moléculaire utilise la technique LAMP (loop-mediated isothermal amplification – amplification isotherme médiée par des boucles) afin d'amplifier rapidement les séquences d'acide nucléique de façon extrêmement spécifique et sensible, associée à la bioluminescence pour détecter l'amplification. Les résultats présumés positifs sont visibles en temps réel tandis que les résultats négatifs sont affichés à la fin de l'essai. Les résultats présumés positifs doivent être confirmés par les méthodes usuelles ou en fonction des méthodes spécifiques répondant aux normes locales[1, 2].

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

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

Neogen a évalué le Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - *Cronobacter* avec un milieu d'enrichissement 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, procédé qui détruit les organismes présents dans l'échantillon. Les échantillons qui n'ont pas été soumis à un traitement thermique adéquat pendant l'étape de lyse peuvent être considérés comme potentiellement dangereux et ne doivent PAS être insérés dans l'instrument de détection moléculaire Neogen.

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

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

Tableau 1. Composants du Neogen Kit de détection moléculaire

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

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

Consignes de sécurité

L'utilisateur doit lire, comprendre et suivre toutes les informations de sécurité mentionnées dans les instructions relatives au système de détection moléculaire Neogen et au Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - *Cronobacter*. Conserver ces consignes de sécurité pour s'y référer ultérieurement.

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

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

⚠ AVERTISSEMENT

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

L'utilisateur doit former son personnel de manière appropriée aux techniques d'analyse actuelles : par exemple, les bonnes pratiques de laboratoire[3], les normes 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 Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - *Cronobacter* conformément aux indications sur l'emballage et aux instructions relatives au produit.
- Toujours utiliser le Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - *Cronobacter* avant la date de péremption.
- Utiliser le Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - *Cronobacter* avec les échantillons environnementaux d'aliments et d'aliments transformés qui ont été validés en interne ou par une tierce partie.
- N'utiliser le Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - *Cronobacter* qu'avec des surfaces, des désinfectants, des protocoles et des souches bactériennes validés en interne ou par une tierce partie.
- 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 TN dans les tubes de solution de lyse Neogen. Produits pour la manipulation des échantillons Neogen® comprenant un tampon neutralisant contenant une composition d'aryle sulfonate : RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G et HS2410NB2G. Ce protocole n'a pas été testé dans le cadre de l'étude NF Validation.

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

- Effectuer les analyses bactériologiques dans un laboratoire correctement équipé et sous la supervision de professionnels qualifiés. Les milieux et les équipements d'enrichissement incubés ou les surfaces ayant été en contact avec des milieux d'enrichissement incubés peuvent contenir des agents pathogènes à des niveaux suffisamment élevés pour entraîner des risques pour la santé humaine.
- Toujours respecter les consignes de sécurité courantes du laboratoire, porter des tenues et lunettes de protection adaptées lors de la manipulation de réactifs et d'échantillons contaminés.
- Éviter tout contact avec le contenu du milieu d'enrichissement et les tubes de réactifs après l'amplification.
- Éliminer les échantillons enrichis et les déchets contaminés associés conformément aux normes locales/régionales/nationales/du secteur actuelles.
- 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.

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

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

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

- Ne pas dépasser le paramètre de température recommandé sur le dispositif de chauffe.
- Ne pas dépasser le temps de chauffe recommandé.

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

REMARQUE

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

- Changer de gants avant l'hydratation des pastilles réactives.
- 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 de l'ADN.

Afin de réduire les risques associés à un résultat 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 concentrée à 1-5 % (v:v dans l'eau) pendant une 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.
- Si des niveaux élevés d'ADN de *Cronobacter* (p. ex., ADN de cellules de *Cronobacter* non viables ayant fait l'objet d'une étape de destruction/d'inactivation) sont suspectés dans les échantillons, les enrichissements présumés positifs doivent être traités par DNase avant l'étape de **Lyse**. Pour en savoir plus, contacter un représentant Neogen. Ce protocole n'a pas été testé dans le cadre de l'étude NF Validation.

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 le représentant ou distributeur Neogen local.

Responsabilité de l'utilisateur

Il incombe aux utilisateurs de connaître les instructions et les informations relatives au produit. Rendez-vous sur notre site **www.neogen.com**, ou contactez votre représentant ou distributeur Neogen local pour obtenir de plus amples informations.

Lors du choix d'une méthode de test, il est important d'admettre que des facteurs externes comme les méthodes d'échantillonnage, les protocoles de test, la préparation des échantillons, notamment l'homogénéisation et le mélange, la manipulation et les techniques de laboratoires 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, Neogen a élaboré le kit de contrôle de matrice pour système de détection moléculaire Neogen®. Lorsque cela est nécessaire, utiliser le Contrôle de matrice (MC) pour déterminer si la matrice peut avoir un impact sur les résultats du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - *Cronobacter*. 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 processus ou de présentation, par exemple, cru/pasteurisé, frais/sec, etc.

Limitation de garantie/limites de recours

SAUF SI EXPRESSÉMENT ÉTABLI DANS LA SECTION DE GARANTIE LIMITÉE D'UN EMBALLAGE DE PRODUIT INDIVIDUEL, NEOGEN RENONCE À TOUTE GARANTIE EXPLICITE ET IMPLICITE, Y COMPRIS, MAIS SANS S'Y LIMITER, TOUTE GARANTIE DE COMMERCIALISATION OU D'ADAPTATION POUR UN USAGE SPÉCIFIQUE. En cas de défaut de tout produit Neogen Sécurité Alimentaire, Neogen ou son distributeur agréé s'engage, à son entière discrétion, au remplacement ou au remboursement du prix d'achat du produit. Il s'agit de vos recours exclusifs. 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 POUR RESPONSABLE DES PERTES OU DES DOMMAGES ÉVENTUELS, QU'ILS SOIENT DIRECTS, INDIRECTS, SPÉCIFIQUES, ACCIDENTELS OU CONSÉCUTIFS, Y COMPRIS, MAIS SANS S'Y LIMITER, LES PERTES DE PROFITS. En aucun cas et en aucune manière, la responsabilité de Neogen ne sera engagée au-delà du prix d'achat du produit prétendu défectueux.

Conservation et élimination des déchets

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

Ne pas utiliser le Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - *Cronobacter* après la date de péremption. La date de péremption et le numéro de lot sont inscrits sur l'étiquette à l'extérieur de la boîte. Après utilisation, il est possible que les tubes de milieu d'enrichissement et du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - *Cronobacter* contiennent des éléments pathogènes. 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 de l'ADN.

L'utilisateur doit suivre la formation de qualification de l'opérateur 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℠* 2018.01 et le *Performance Tested℠* Certificate n° 101703

Voir le tableau 4 pour les protocoles d'enrichissement selon la méthode de certification NF VALIDATION 3M 01/20-03/18

Enrichissement de l'échantillon

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

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

Aliments, poudres environnementales, poussières, balayures et éponges

1. Équilibrer le milieu d'enrichissement à une température (20-25 °C), sauf mention contraire dans le protocole d'enrichissement (voir les tableaux 2, 3 et 4).
2. Mélanger de manière aseptique le milieu d'enrichissement et l'échantillon et homogénéiser soigneusement par mélange, par digestion, en secouant ou à la main pendant 2 ± 0,2 minutes **ou jusqu'à dissolution complète des particules et jusqu'à ce que la suspension de l'enrichissement soit homogène**[7, 8].
    a. Des facteurs tels que la préparation des échantillons, notamment l'homogénéisation et le mélange, la manipulation et les techniques de laboratoires peuvent influencer les résultats.
    b. Pour les échantillons à forte teneur en particules, il est recommandé d'utiliser des sacs avec filtre.

c. Pour les matrices qui gonflent au contact de l'eau et qui sont très visqueuses (p. ex., céréales, amidons), il est recommandé de réaliser une dilution supplémentaire (> 1:10) jusqu'à ce que la viscosité soit réduite de manière appropriée ou d'ajouter de l'alpha-amylase 1 % (p/v) stérile à EPT (ISO)[8].

d. Pour les échantillons de céréales de grande taille, ajouter lentement les céréales en poudre au liquide en mélangeant régulièrement pour éviter la création d'amas particulaires.

3. Incuber comme indiqué dans le tableau de protocole adéquat (voir les tableaux 2, 3 et 4).

Tableau 2. Protocoles d'enrichissement généraux

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

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

Instructions spécifiques pour méthodes validées

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

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

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

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

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

Matrice de l'échantillon	Taille de l'échantillon	Volume de bouillon d'enrichissement[1]	Température d'enrichissement (± 1 °C)	Durée d'enrichissement (h)	Volume d'analyse d'échantillon
Préparation en poudre pour nourrisson et céréales en poudre pour nourrisson	10 g	90 ml EPT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Céréales en poudre sans probiotiques pour nourrisson	300 g	2 700 ml EPT (ISO) (1:10)	Préchauffés 37	18-24	20 µl
Préparation en poudre avec probiotiques pour nourrisson et céréales en poudre avec probiotiques pour nourrisson	300 g	2 700 ml EPT (ISO) + 10 mg/l vancomycine	Préchauffés 37	22-24	20 µl
Lactose	10 g	90 ml EPT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Éponge environnementale avec 10 ml de bouillon neutralisant D/E	1 dispositif d'échantillonnage	90 ml EPT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl

1. Utiliser une EPT (ISO) **préchauffée** si le volume du bouillon d'enrichissement est supérieur à 300 ml.

Méthode certifiée par AFNOR Certification

BY AFNOR CERTIFICATION NF VALIDATION EN ISO 16140

3M 01/20-03/18

MÉTHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE POUR L'AGROALIMENTAIRE

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

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

Méthode de certification NF Validation, conformément à la norme ISO 16140-2[(9)] par rapport à la norme ISO 22964.

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

Préparation de l'échantillon : les échantillons doivent être préparés conformément aux normes EN ISO 22694[(2)] et EN ISO 6887[(7, 8)].

Version de logiciel : voir le certificat.

Tableau 4. Protocoles d'enrichissement selon la méthode de certification NF VALIDATION 3M 01/20-03/18

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

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

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

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

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 : le plateau de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen n'est pas utilisé. Utiliser le bloc refroidissant à la température ambiante du laboratoire (20-25 °C).

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

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

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

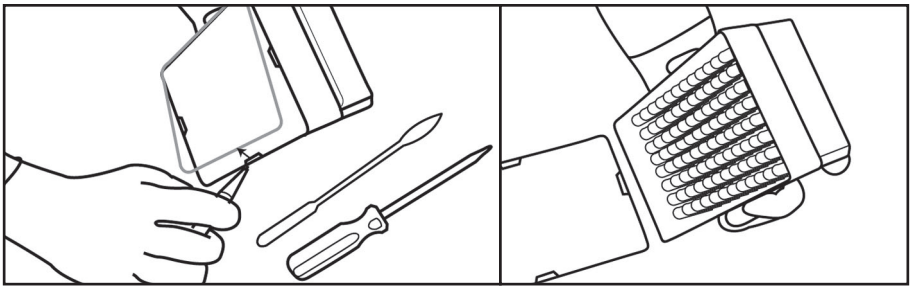
Préparation de l'instrument de détection moléculaire Neogen®

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

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

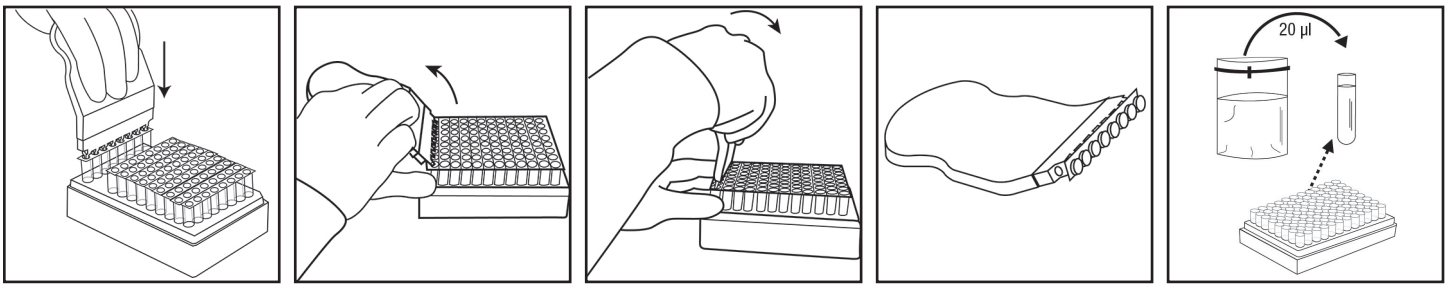
Lyse

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



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

     Transférer **tout d'abord** chaque échantillon enrichi dans des tubes de solution de lyse Neogen individuels. Transférer le NC **en dernier**.
   - 4.4 Ouvrir les barrettes de tubes de solution de lyse Neogen une à une à l'aide de l'outil d'ouverture/fermeture pour système de détection moléculaire Neogen® - Lyse.
   - 4.5 Jeter le bouchon du tube de solution de lyse Neogen. Si le lysat doit être soumis à un nouveau test, placer les bouchons dans un récipient propre pour réapplication après la lyse.
     - 4.5.1. Pour le traitement du lysat conservé, voir l'annexe A.
   - 4.6 Agiter le sac contenant l'enrichissement avant de prélever des échantillons du côté filtré lors du travail avec des échantillons visqueux.
   - 4.7 Transférer 20 µl d'échantillon dans un tube de solution de lyse Neogen, sauf indication contraire mentionnée dans le tableau de protocole.
5. Répéter l'étape 4.4 à 4.7 jusqu'à ce que chaque échantillon individuel soit ajouté à un tube de solution de lyse Neogen correspondant au niveau de la barrette.

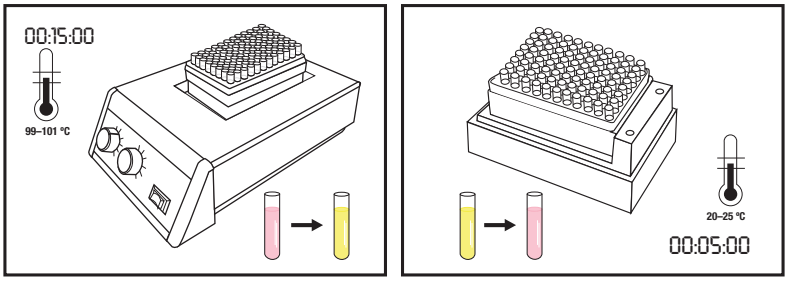


6. Une fois tous les échantillons transférés, transférer 20 µl de TN (milieu d'enrichissement stérile, p. ex. EPT) dans un tube de solution de lyse Neogen. Ne pas utiliser d'eau comme témoin négatif.
7. Vérifier que la température du support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen est de 100 ± 1 °C.
8. Placer le portoir non couvert de tubes de solution de lyse Neogen dans le support de bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen et chauffer pendant 15 ± 1 minutes. Lors du chauffage, la solution de lyse Neogen passera de rose (froide) à jaune (chaude).

   Les échantillons qui n'ont pas été soumis à un traitement thermique adéquat pendant l'étape de lyse peuvent être considérés comme potentiellement dangereux et ne doivent PAS être insérés dans l'instrument de détection moléculaire Neogen.
9. Retirer le portoir non couvert de tubes de solution de lyse Neogen du bloc chauffant pour système de détection moléculaire Neogen et laisser refroidir dans le support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen pendant au moins 5 minutes et au plus 10 minutes. Utilisé à température ambiante sans le plateau de bloc

refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen®, le support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen doit être posé directement sur le plan de travail du laboratoire. Une fois froide, la solution de lyse Neogen retrouvera une couleur rose.

10. Retirer le couvercle des tubes de solution de lyse Neogen du support de bloc refroidissant pour système de détection moléculaire Neogen.

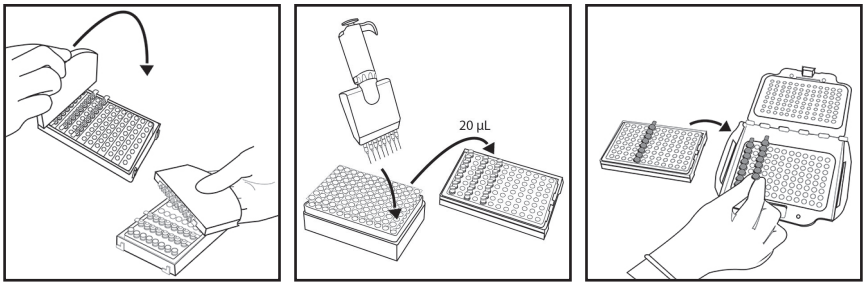


Amplification

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

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

5. Ouvrir les tubes de réactif du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - *Cronobacter* un à un à l'aide de l'outil d'ouverture/fermeture pour système de détection moléculaire Neogen® – Réactif. Jeter le bouchon.
   - 5.1 **Transférer 20 µl de lysat d'échantillon prélevé au niveau de la moitié (1/2) supérieure du liquide (éviter le précipité) dans le tube de solution de lyse Neogen du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - *Cronobacter* correspondant. Incliner la pipette pour ne pas agiter les pastilles. Mélanger en effectuant 5 cycles d'aspiration/de refoulement avec la pipette.**
   - 5.2 Répéter l'étape 5.1 jusqu'à ce que chaque lysat d'échantillon individuel ait été ajouté au tube de réactif du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - *Cronobacter* correspondant dans la barrette.
   - 5.3 Placer la capsule supplémentaire prévue à cet effet sur les tubes de réactif du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - *Cronobacter*, puis prendre le bord arrondi de l'outil d'ouverture/fermeture pour système de détection moléculaire Neogen – Réactif et appuyer dans un mouvement de va-et-vient afin de s'assurer que la capsule est fermement insérée sur le tube.
   - 5.4 Répéter les étapes 5.1 à 5.3 pour tous les échantillons à analyser.
   - 5.5 Lorsque tous les lysats d'échantillons ont été transférés, répéter les étapes 5.1 à 5.3 afin de transférer 20 µl de lysat de TN dans un tube de réactif Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - *Cronobacter*
   - 5.6 Transférer **20 µl de lysat de TN dans un tube de contrôle de réactif Neogen.** Incliner la pipette pour ne pas agiter les pastilles. Mélanger en effectuant 5 cycles d'aspiration/de refoulement avec la pipette.
6. Charger les tubes recouverts d'un bouchon dans un plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen propre et décontaminé. Fermer et verrouiller le couvercle du plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen.



7. 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'essai. Les résultats sont obtenus en 60 minutes ; toutefois, les résultats positifs peuvent être détectés plus tôt.
10. Une fois l'analyse terminée, retirer le plateau de chargement rapide pour système de détection moléculaire Neogen de l'instrument 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.

REMARQUE : pour réduire le risque de résultats faux positifs dus à une contamination croisée, ne jamais ouvrir les tubes de réactif contenant de l'ADN amplifié. Ceci comprend les tubes de réactif du Neogen Kit de détection moléculaire version 2 - *Cronobacter*, les tubes de contrôle de réactif Neogen et les tubes de contrôle de matrice Neogen. Toujours éliminer les tubes de réactif fermés en les trempant 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.

Résultats et interprétation

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

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

Confirmation

- Confirmation des résultats selon la méthode de certification NF Validation

Dans le cadre de la méthode de certification NF VALIDATION, tous les enrichissements présumés positifs doivent être confirmés en suivant la confirmation de la méthode de référence[2], en commençant par effectuer un transfert de l'enrichissement primaire (EPT ISO ou EPT ISO contenant 10 mg/l de vancomycine).

- Autre protocole de confirmation

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

Dans le cas peu probable d'un résultat lumineux inhabituel, l'algorithme considérera ce dernier comme « À vérifier ». Neogen recommande à l'utilisateur de recommencer l'essai pour tout échantillon considéré comme « À vérifier ». Si le résultat continue à être « À vérifier », passer au test de confirmation en utilisant les méthodes usuelles ou en suivant les méthodes spécifiques répondant aux normes locales[1,2].

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

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

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

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

Références :

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
8. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

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

Explication des symboles

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

NEOGEN

Gebrauchsanweisungen

Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter*

Produktbeschreibung und Verwendungszweck

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

Neogen Molekulares Detektions Assays 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 sollten mithilfe eines Testverfahrens Ihrer Wahl oder gemäß der jeweils geltenden Richtlinien bestätigt werden[1, 2].

Der Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* ist für den Gebrauch in Labors bestimmt und muss von in Laborverfahren geschultem Fachpersonal angewendet werden. Neogen verfügt über keine Daten zur Anwendung dieses Produkts in anderen Industrien als der Lebensmittel- und Getränkeindustrie. Zum Beispiel verfügt Neogen über keine Daten zur Verwendung dieses Produkts mit Pharmazeutika-, Kosmetika- oder klinischen und tiermedizinischen Proben. Der Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* wurde nicht für alle möglichen Lebensmittelprodukte, Lebensmittelverarbeitungsverfahren, Testprotokolle oder alle möglichen Bakterienstämme evaluiert.

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

Neogen hat den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* mit gepuffertem Peptonwasser (ISO) evaluiert.

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

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

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

Tabelle 1. Komponenten des Neogen Molekulares Detektions Assay

Artikel	Kennzeichnung	Stückzahl	Inhalt	Kommentare
Neogen® Lyselösung (LS)	Rosafarbene Lösung in transparenten Gefäßen	96 (12 Streifen in 8 Gefäßen)	580 µl LS pro Gefäß	Abgefüllt und gebrauchsfertig
Reagenzgefäße für Neogen® Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter*	Orangerote Gefäße	96 (12 Streifen in 8 Gefäßen)	Lyophilisierte spezifische Amplifikations- und Detektionsmischung	Gebrauchsfertig
Zusätzliche Kappen	Orangerote Kappen	96 (12 Streifen in 8 Kappen)		Gebrauchsfertig
Neogen® Reagenzkontrolle (RC)	Durchsichtige Kippgefäße	16 (2 Beutel mit 8 einzelnen Gefäßen)	Lyophilisierte Kontroll-DNS, Amplifikations- und Detektionsmatrix	Gebrauchsfertig

Die Negativkontrolle (nicht im Set enthalten) ist steriles Anreicherungsmedium, z. B. gepuffertes Peptonwasser (ISO). Als Negativkontrolle kein Wasser verwenden.

Sicherheit

Der Anwender sollte sämtliche in der Gebrauchsanleitung des Neogen Molekulares Detektionssystems und des Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* aufgeführten Sicherheitshinweise gelesen und verstanden haben. Bewahren Sie diese Sicherheitshinweise auf, um später auf sie zurückgreifen zu können.

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

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

⚠ WARNUNG

Den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* nicht zur Diagnose von Erkrankungen bei Menschen oder Tieren einsetzen.

Der Anwender muss sein Personal in den entsprechenden Testmethoden unterweisen: z. B. in den Grundsätzen der Guten Laborpraxis[3], ISO 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 Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* wie auf der Packung und in der Gebrauchsanweisung beschrieben.
- Verwenden Sie den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* stets vor Ablauf des Verfalldatums.
- Verwenden Sie den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* mit Lebensmittel-, Futter- und Lebensmittelverfahrensproben, die entweder intern oder von einem Dritten evaluiert worden sind.
- Verwenden Sie den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* nur mit Oberflächen, Desinfektionsmitteln, Protokollen und Bakterienstämmen, die intern oder durch Dritte validiert wurden.
- Wenn Sie eine Umgebungsprobe haben, die einen Neutralisierungspuffer 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 Neutralisierungspuffer mit Acrylsulfonat-Komplex enthalten: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G und HS2410NB2G. Dieses Protokoll wurde nicht im Rahmen der NF Validation Studie getestet.

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

- Führen Sie die Testverfahren mit Pathogenen in einem entsprechend ausgerüsteten Labor und unter der Aufsicht von geschultem Fachpersonal durch. Inkubierte Anreicherungsmedien und Arbeitsgeräte oder Oberflächen, die in Kontakt mit inkubierten Anreicherungsmedien gekommen sind, können so stark mit Krankheitserregern belastet sein, dass ein Risiko für die menschliche Gesundheit besteht.
- Befolgen Sie stets die üblichen Labor-Sicherheitsmaßnahmen und tragen Sie bei der Handhabung von Reagenzien und kontaminierten Proben angemessene Schutzkleidung und geeigneten Augenschutz.
- Vermeiden Sie nach der Amplifikation den Kontakt mit dem Anreicherungsmedium und den Reagenzgefäßen.
- Entsorgen Sie die angereicherten Proben und die damit verbundenen kontaminierten Abfälle gemäß den gültigen lokalen/regionalen/nationalen/Branchennormen.
- Achten Sie darauf, die empfohlene Temperatur des Heizgeräts nicht zu überschreiten.
- Achten Sie darauf, die empfohlene Anwärmdauer nicht zu überschreiten.
- Verwenden Sie ein geeignetes, kalibriertes Thermometer, um sicherzustellen, dass der Neogen® Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz die richtige Temperatur aufweist (z. B. ein Thermometer zum partiellen Eintauchen oder ein Digitalthermometer, kein Tauchthermometer). Das Thermometer muss an der vorgesehenen Stelle des Neogen Molekularen Detektion – Heizblockeinsatzes platziert werden.

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

- Achten Sie darauf, die empfohlene Temperatur des Heizgeräts nicht zu überschreiten.
- Achten Sie darauf, die empfohlene Anwärmdauer nicht zu überschreiten.

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

HINWEIS

Zur Verminderung von Kreuzkontaminationsrisiken bei der Vorbereitung des Tests:

- Wechseln Sie vor Hydratation des Reagenzpellets die Handschuhe.
- Es wird empfohlen, sterile, 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.
- Wenn der Verdacht besteht, dass Proben einen hohen Anteil an *Cronobacter* DNS enthalten (z. B. DNS von nicht lebensfähigen *Cronobacter*-Zellen, die zuvor abgetötet/inaktiviert wurden), müssen mutmaßlich positive Anreicherungen vor der **Lyse** mit DNase vorbehandelt werden. Zusätzliche Anweisungen erhalten Sie bei Ihrem Neogen-Ansprechpartner. Dieses Protokoll wurde nicht im Rahmen der NF Validation Studie getestet.

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.

Anwenderverantwortung

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, Testprotokolle, Probenaufbereitung einschließlich Homogenisierung und Mischung, Handhabung und Labortechnik die Ergebnisse beeinflussen können.

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

Ebenso liegt es in der Verantwortung des Anwenders, zu bestätigen, dass die Testmethoden und -ergebnisse den Anforderungen seiner Kunden und Lieferanten entsprechen.

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

Als Unterstützung von Kunden bei der Validierung der Methode für verschiedene 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 des Neogen Molekulares Detektion Assay 2 – *Cronobacter* Nachweises zu beeinträchtigen. Testen Sie mehrere für die Matrix repräsentative Proben, d. h. Proben unterschiedlicher Herkunft, während einer Validierungsphase, wenn die Neogen Methode zum Einsatz kommt oder beim Testen neuer oder unbekannter Matrizes oder Matrizes, 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 etc.) verursacht werden.

Haftungsbeschränkungen/Beschränktes Rechtsmittel

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

Einschränkung der Haftung von Neogen

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

Lagerung und Entsorgung

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

Verwenden Sie den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* nicht nach Ablauf des Verfalldatums. Das Verfalldatum und die Chargennummer sind auf dem äußeren Etikett der Packung angegeben. Nach dem Gebrauch können das Anreicherungsmedium und die Gefäße des Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* pathogene Stoffe enthalten. 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 Molekulares Detektionssystem absolvieren wie im Dokument „Protokolle und Anweisungen für Installationsqualifizierung (IQ) / Funktionsqualifizierung (OQ) für das Neogen Molekulares Detektionssystem“[6] beschrieben.

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

Anreicherungsprotokolle gemäß AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2018.01 und *Performance Tested℠* Certificate #101703 siehe Tabelle 3.

Anreicherungsprotokolle gemäß NF VALIDATION Neogen 01/20 -03/18 siehe Tabelle 4.

Probenanreicherung

Tabelle 2, 3 und 4 enthalten Richtlinien für das Anreichern von Lebensmittel- und Umgebungsproben.

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

Lebensmittel, Umgebungspulver, Stäube, Kehricht und Schwämme

1. Lassen Sie das Anreicherungsmedium Raumtemperatur (20–25 °C) annehmen, sofern im Anreicherungsprotokoll nichts anderes angegeben ist (siehe Tabellen 2, 3 oder 4).
2. Mischen Sie das Anreicherungsmedium und die Probe aseptisch und homogenisieren Sie diese gründlich durch 2 ± 0,2 Minuten langes Mischen, Stomachen, Vortexen oder Handmischen **bzw. bis alle Klumpen vollständig aufgelöst sind und die Anreicherungslösung homogen ist**[7, 8].
   a. Faktoren wie Probenaufbereitung einschließlich Homogenisierung und Mischung, Handhabung und Labortechnik können die Ergebnisse beeinflussen.
   b. Bei der Handhabung von partikelreichen Proben wird die Verwendung von Filterbeuteln empfohlen.

c. Bei Matrizen, die in Wasser quellen und hochviskos sind (z. B. Getreide, Stärke), wird empfohlen, bis zu einer angemessenen Viskosität weiter zu verdünnen (> 1:10), oder dem gepufferten Peptonwasser (ISO) sterile 1 % (w/v) Alpha-Amylase hinzuzufügen[8].

d. Bei umfangreichen Getreideproben das Getreidepulver allmählich und unter häufigem Mischen der Flüssigkeit beifügen, um Klumpenbildung zu vermeiden.

3. Inkubieren Sie die Probe gemäß der entsprechenden Protokolltabelle (siehe Tabellen 2, 3 oder 4).

Tabelle 2. Allgemeine Anreicherungsprotokolle

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

1. Neogen hat den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* unter Verwendung der Verdünnungsverhältnisse in Tabelle 2 bis zu 300 g evaluiert. Der Anwender ist selbst für die Validierung von alternativen Verdünnungsverhältnissen oder Protokollen verantwortlich, durch die sichergestellt werden muss, dass das Verfahren den Anforderungen entspricht.
2. Verwenden Sie **vorgewärmtes** gepuffertes Peptonwasser ISO, wenn die Menge der Anreicherungsbouillon > 300 ml ist (z. B. Probe > 30 Gramm).

Spezifische Anweisungen für validierte Verfahren

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

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

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

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

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

Probenmatrix	Probengröße	Menge der Anreicherungs-bouillon[1]	Anreicherungs-temperatur (± 1 °C)	Anre-icherungszeit (Stunden)	Probenanalyse-volumen
Säuglingsmilch in Pulverform und Säuglingsgetreide in Pulverform	10 g	90 ml Gepuffertes Peptonwasser ISO (1:10)	37	18–24	20 µl
Säuglingsgetreide in Pulverform, nicht-probiotisch	300 g	2700 ml Gepuffertes Peptonwasser (ISO) (1:10)	Vorgewärmt 37	18–24	20 µl
Säuglingsmilch in Pulverform und Säuglingsgetreide in Pulverform mit Probiotika	300 g	2700 ml Gepuffertes Peptonwasser (ISO) + 10 mg/l Vancomycin	Vorgewärmt 37	22–26	20 µl
Laktose	10 g	90 ml Gepuffertes Peptonwasser ISO (1:10)	37	18–24	20 µl
Umgebungsschwamm mit 10 ml Dey-Engley (D/E)-Neutralisationsbouillon	1 Probengerät	90 ml Gepuffertes Peptonwasser ISO (1:10)	37	18–24	20 µl

1. Verwenden Sie **vorgewärmtes** gepuffertes Peptonwasser ISO, wenn die Menge der Anreicherungsbouillon > 300 ml ist.

NF VALIDATION gemäß AFNOR Certification

3M 01/20-03/18
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

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

Die NF VALIDATION in Übereinstimmung mit der ISO Methode 16140-2[9] im Vergleich zur ISO 22964.

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

Probenvorbereitung: Die Proben sollten gemäß EN ISO 22694[2] und EN ISO 6887[7, 8] vorbereitet werden.

Softwareversion: Siehe Zertifikat.

Tabelle 4. Anreicherungsprotokolle gemäß NF VALIDATION zertifizierte Methode 3M 01/20–03/18

Probenmatrix	Proben-größe	Menge der Anreicherungs-bouillon[1]	Anre-icherungs-temperatur (± 1 °C)	Anre-icherungszeit (Stunden)	Probena-nalysevol-umen	Empfohlen-er Unter-brechungspunkt[2, 3]
• Säuglingsmilch in Pulverform • Säuglingsgetreide in Pulverform • Inhaltsstoffe wie Trockenmilchpulver, Sojapulver, Molkenproteinpulver, Laktose, Reismehl und Maltodextrin • Trockene Umgebungsproben wie Staub, Kehricht, Staubsaugerproben,	10 g	90 ml Gepuffertes Peptonwasser ISO (1:10)	37	18–24	20 µl	Die Anre-icherungsbouillon bzw. das Proben-lysat kann bis zu 72 Stunden bei 2–8 °C gelagert werden.
• Schwamm, Spülwasser, Wischtücher	1 Pro-bengerät oder 10 ml					Die Anre-icherungsbouillon bzw. das Proben-lysat kann bis zu 72 Stunden bei 2–8 °C gelagert werden.
Säuglingsmilch in Pulverform und Säuglingsgetreide in Pulverform (nicht-probiotisch)	30–300 g	Gepuffertes Peptonwasser ISO (1:10)	37	18–24	20 µl	Die Anre-icherungsbouillon bzw. das Proben-lysat kann bis zu 72 Stunden bei 2–8 °C gelagert werden.
Säuglingsmilch in Pulverform und Säuglingsgetreide in Pulverform (einschließlich probiotisch)	30–300 g	Gepuffertes Peptonwasser (ISO) + 10 mg/l Vancomycin (1:10)	37	22–26	20 µl	Keine

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

Vorbereitung der Neogen® Molekulare Detektion – Beladehilfe

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

Vorbereitung des Neogen® Molekularen Detektion – Kühlblockeinsatzes
Stellen Sie den Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz direkt auf die Laborbank: Der Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockträger wird nicht verwendet. Verwenden Sie den Block bei Raumtemperatur (20–25 °C).

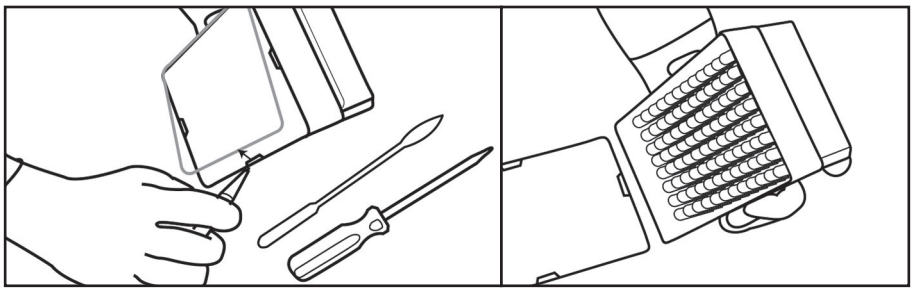
Vorbereitung des Neogen® Molekularen Detektion – Heizblockeinsatzes
Legen Sie den Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz in ein Trocken-Doppelblock-Heizgerät. Schalten Sie das Trocken-Blockheizgerät ein und stellen Sie die Temperatur für den Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz auf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

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

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

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

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



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

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

4.4 Öffnen Sie jeden Neogen Streifen mit Lyselösungsgefäßen einzeln mit dem Neogen® Molekulare Detektion – Cap/Decap-Werkzeug – Lyse.

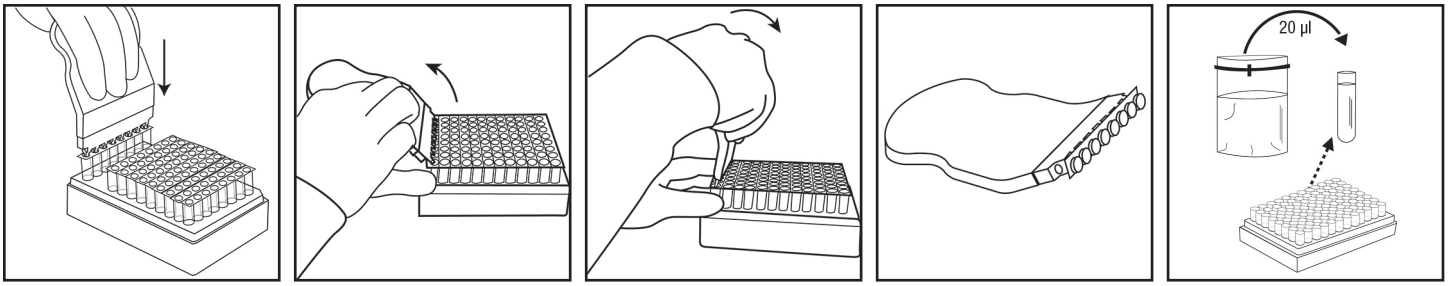
4.5 Entsorgen Sie die Kappen der Neogen Lyselösungsgefäße. Wenn noch Lysat für weitere Tests übrig bleibt, bewahren Sie die Kappen in einem sauberen Container auf, um sie nach der Lyse wieder aufzusetzen.

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

4.6 Schütteln Sie bei der Arbeit mit viskosen Proben den Anreicherungsbeutel, bevor Sie die Probe über die gefilterte Seite entnehmen.

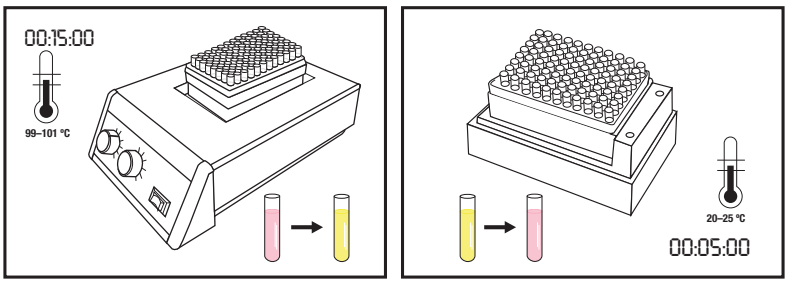
4.7 Übertragen Sie 20 µl der Probe in ein Neogen Lyselösungsgefäß sofern in der Protokolltabelle nichts anderes angegeben ist.

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



6. Sobald Sie alle Proben übertragen haben, übertragen Sie 20 µl der Negativkontrolle (steriles Anreicherungsmedium, z. B. gepuffertes Peptonwasser BPW) in ein Neogen Lyselösungsgefäß. Als Negativkontrolle kein Wasser verwenden.
7. Stellen Sie fest, ob der Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz die erforderliche Temperatur von 100 ± 1 °C erreicht hat.
8. 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).

   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 Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz. Lassen Sie ihn im Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz 5 bis 10 Minuten lang abkühlen. Der Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz wird bei Raumtemperatur ohne den Neogen® Molekulare Detektion – Kühlblockträger verwendet und sollte direkt auf die Laborbank gesetzt werden. Wenn die Neogen-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 Reagenzgefäß für Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* erforderlich.

   1.1 Die Gefäßstreifen können auf die gewünschte Anzahl der Gefäße zurechtgeschnitten werden. Wählen Sie die Anzahl der erforderlichen Reagenzgefäße für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* bzw. der Gefäßstreifen zu 8 Gefäßen.

   1.2 Stellen Sie die Reagenzgefäße für Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* in einen leeren Gefäßträger.

   1.3 Vermeiden Sie es, die Reagenzkügelchen im unteren Teil der Gefäße aufzurühren.

2. Wählen Sie ein Gefäß mit Neogen Reagenzkontrolle und stellen Sie es in den Gefäßträger.
3. Um eine Kreuzkontamination zu vermeiden, öffnen Sie jeweils nur einen Reagenzgefäßstreifen des Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* und verwenden Sie bei jedem Übertragungsschritt eine neue Pipettenspitze.
4. Übertragen Sie wie unten beschrieben die einzelnen Lysate in ein Reagenzgefäß für Neogen Molekulares Detektion Assay 2 – *Cronobacter* und ein Gefäß mit Neogen Reagenzkontrolle:

   Übertragen Sie jedes Probenlysat *zuerst* in ein eigenes Reagenzgefäß für Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - **Cronobacter**, gefolgt von der neutralen Kontrolle. Hydrieren Sie das Gefäß mit Neogen Reagenzkontrolle als **letztes.**

5. Öffnen Sie die Reagenzgefäße für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* mit dem Neogen® Molekulare Detektion Cap/Decap-Werkzeug – Reagenz, und zwar immer nur einen Reagenzgefäßstreifen auf einmal. Werfen Sie die Kappe weg.

   5.1 **Übertragen Sie 20 µl des Probenlysats aus der oberen Hälfte der Flüssigkeit (Ablagerungen vermeiden) im Neogen Lyselösungsgefäß in das entsprechende Reagenzgefäß für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter*. Pipettieren Sie schräg in die Gefäße, um ein Aufrühren der Kügelchen zu vermeiden. Mischen Sie anschließend den Gefäßinhalt, indem Sie ihn 5 Mal auf und ab pipettieren.**

   5.2 Wiederholen Sie Schritt 5.1, bis Sie jedes einzelne Probenlysat einem entsprechenden Reagenzgefäß für den Neogen Molekulares Detektion Assay 2 – *Cronobacter* Nachweis im Streifen hinzugefügt haben.

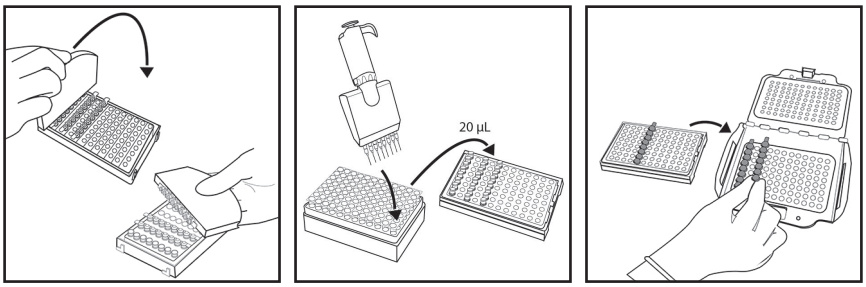
   5.3 Verschließen Sie die Reagenzgefäße für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* mit den mitgelieferten zusätzlichen Kappen und üben Sie mit der abgerundeten Seite des Neogen Molekularen Detektion Cap/Decap-Werkzeugs – Reagenz in einer Vorwärts- und Rückwärtsbewegung Druck aus, um sicherzustellen, dass die Kappe fest sitzt.

   5.4 Wiederholen Sie bei Bedarf die Schritte 5.1 bis 5.3 bei allen zu prüfenden Proben.

   5.5 Sobald Sie alle Probenlysate übertragen haben, wiederholen Sie die Schritte 5.1 bis 5.3, um 20 µl des NC-Lysats in ein Reagenzgefäß für den Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* zu übertragen.

   5.6 Übertragen Sie **20 µl des <u>NC-Lysats</u> in ein Gefäß mit Neogen Reagenzkontrolle**. Pipettieren Sie schräg in die Gefäße, um ein Aufrühren der Kügelchen zu vermeiden. Mischen Sie anschließend den Gefäßinhalt, indem Sie ihn 5 Mal auf und ab pipettieren.

6. Beladen Sie eine saubere und dekontaminierte Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe mit den mit Kappen verschlossenen Gefäßen. Schließen und verriegeln Sie die Klappe der Neogen Molekulare Detektion – Beladehilfe.



7. Überprüfen und bestätigen Sie die Konfiguration des 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 Molekularen Detektions Assay 2 - *Cronobacter* 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 mutmaßlich positiven Ergebnisse werden in Echtzeit erstellt, während negative und zu überprüfende Ergebnisse erst nach Abschluss des Testdurchlaufs dargestellt werden.

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

Bestätigung

- Bestätigung der Ergebnisse anhand der zertifizierten NF Validation Methode

Im Rahmen der NF VALIDATION sollten alle vermutlich positiven Anreicherungen durch Befolgen der Referenzbestätigungsmethode[(2)] bestätigt werden, beginnend mit der Überführung aus der Erstanreicherung (Gepuffertes Peptonwasser (ISO) oder gepuffertes Peptonwasser (ISO) mit 10 mg/l Vancomycin).

- Anderes Bestätigungsprotokoll

Vermutlich positive Anreicherungen sollten anhand der Standardarbeitsanweisungen (SOP) des Labors oder durch Befolgen der geeigneten Referenzbestätigungsmethode [(1,2)], beginnend mit der Überführung aus der Erstanreicherung (Gepuffertes Peptonwasser (ISO) oder gepuffertes Peptonwasser (ISO) mit 10 mg/l Vancomycin) in die Zweitanreicherung, gefolgt von anschließendem Ausplattieren und Bestätigen von Isolaten mittels geeigneter biochemischer, serologischer und/oder molekularer Methoden.

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[(1,2)].

Bei abweichenden Ergebnissen (mutmaßlich positiven beim Neogen Molekulares Detektions Assay 2 - *Cronobacter* unbestätigten Ergebnissen eines der oben genannten Verfahren) sollte das Labor seine geltenden Standardarbeitsanweisungen befolgen, um die Ergebnisse darzustellen.

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. Unterbrechungen: Lagerung und erneutes Testen von wärmebehandelten Lysaten

1. Um ein wärmebehandeltes Lysat zu lagern, setzen Sie eine saubere Kappe auf das Lysegefäß (siehe **Lyse**, Abschnitt 4.5)
2. Lagern Sie sie bis zu 72 Stunden bei 2 bis 8 °C.
3. Bereiten Sie eine gelagerte Probe zur Amplifikation vor, indem Sie sie zum Mischen 2 bis 3 Mal umdrehen.
4. Entkappen Sie die Gefäße.
5. Setzen Sie die gemischten Lysatgefäße in den Neogen Molekulare Detektion – Heizblockeinsatz und erwärmen Sie sie 5 Minuten ± 1 Minute lang bei 100 ± 1 °C.
6. Nehmen Sie den Träger mit den Neogen Lyselösungsgefäßen aus dem Heizblockeinsatz. Lassen Sie ihn 5 bis 10 Minuten lang im Neogen Molekulare Detektion – Kühlblockeinsatz abkühlen.
7. Setzen Sie das Protokoll ab dem oben beschriebenen Abschnitt **Amplifikation** fort.

Literaturnachweise:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
8. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

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

Erklärung der Symbole

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

Data di pubblicazione: 2024-01

NEOGEN®

Istruzioni sul prodotto

Analisi molecolare di seconda generazione per il rilevamento di *Cronobacter*

Descrizione del prodotto e uso previsto

L'analisi molecolare di seconda generazione Neogen® per il rilevamento di *Cronobacter* è utilizzata con il Sistema per l'analisi molecolare Neogen® per il rilevamento rapido e specifico di *Cronobacter* in campioni ambientali di alimenti, di mangimi e di processi alimentari arricchiti.

L'Analisi molecolare Neogen per il rilevamento dei microrganismi patogeni utilizza l'amplificazione isotermica mediata da loop per amplificare rapidamente le sequenze di acidi nucleici a elevata specificità e sensibilità, combinata alla bioluminescenza per rilevare l'amplificazione. I risultati presunti positivi sono riportati in tempo reale, mentre quelli negativi si visualizzano al completamento dell'analisi. I risultati presunti positivi vanno confermati utilizzando il proprio metodo d'elezione o secondo quanto specificato dalle normative locali[1,2].

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

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

Neogen ha valutato l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter* con terreno di arricchimento con acqua peptonata tamponata (ISO).

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

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

Il kit di prova per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter* contiene 96 test, descritti nella Tabella 1.

Tabella 1. Componenti del kit dell'analisi molecolare Neogen

Articolo	Identificazione	Quantità	Indice	Commenti
Soluzione di lisi (LS) Neogen®	Soluzione rosa in tubi trasparenti	96 (12 strisce da 8 tubi)	580 µl di LS per tubo	In rastrelliera e pronti all'uso
Tubi di reagente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen® per il rilevamento di *Cronobacter*	Tubi arancio-rosso	96 (12 strisce da 8 tubi)	Miscela di rilevamento e amplificazione specifica liofilizzata	Pronti all'uso
Tappi supplementari	Tappi arancio-rosso	96 (12 strisce da 8 tappi)		Pronti all'uso
Controllo reagente (RC) Neogen®	Tubi trasparenti con apertura a scatto	16 (2 strisce da 8 tubi singoli)	Miscela di rilevamento e amplificazione DNA di controllo liofilizzato	Pronti all'uso

Il controllo negativo, non fornito nel kit, è un terreno di arricchimento sterile, ad esempio, BPW ISO. Non utilizzare l'acqua come Controllo negativo.

Sicurezza

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

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

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

⚠ AVVERTENZA

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

L'utente è tenuto a formare il proprio personale alle attuali tecniche di analisi appropriate: ad esempio, le buone prassi di laboratorio[3], ISO/IEC 17025[4] o ISO 7218[5].

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

- Attenersi al protocollo ed eseguire i test esattamente come descritto nelle Istruzioni sul prodotto.
- Conservare l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter* come indicato sulla confezione e nelle istruzioni sul prodotto.
- Utilizzare sempre l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter* entro la data di scadenza.
- Utilizzare l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter* con campioni ambientali di alimenti, di mangimi e di processi alimentari che sono stati convalidati internamente o da terzi.
- Utilizzare l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter* solo con superfici, disinfettanti, protocolli e ceppi di batteri che sono stati validati internamente o da terzi.
- Per un campione ambientale contenente un tampone neutralizzante con il complesso di aril solfonato, eseguire una diluizione 1:2 prima di eseguire il test (1 parte di campione in 1 parte di brodo di arricchimento sterile). Un'altra opzione consiste nel trasferimento di 10 µl di arricchimento del tampone neutralizzante all'interno dei tubi della soluzione di lisi Neogen. Prodotti per la movimentazione campioni di Neogen® che includono Tampone neutralizzante con complesso aril-solfonato: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G e HS2410NB2G. Questo protocollo non è stato testato durante lo studio NF Validation.

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

- Eseguire un test per patogeni in un laboratorio adeguatamente equipaggiato, sotto la supervisione di personale esperto. Il terreno di arricchimento incubato e le attrezzature o le superfici che sono venute in contatto con il terreno di arricchimento incubato potrebbero contenere patogeni a livelli sufficienti per causare rischi alla salute umana.
- Durante la manipolazione di reagenti e campioni contaminati, seguire sempre le pratiche standard di sicurezza di laboratorio, compreso l'utilizzo di abbigliamento protettivo e protezioni appropriate per gli occhi.
- Evitare il contatto con il contenuto dei tubi di reagente e del terreno di arricchimento dopo l'amplificazione.
- Smaltire i campioni arricchiti e i rifiuti contaminati associati conformemente agli attuali standard locali/regionali/nazionali/settoriali.
- Non superare l'impostazione di temperatura raccomandata sul riscaldatore.
- Non superare il tempo di riscaldamento raccomandato.
- Utilizzare un termometro calibrato e appropriato per verificare la temperatura dell'Inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen® (ad es., un termometro a immersione parziale o con termocoppia digitale, non un termometro a immersione totale). Il termometro deve essere collocato nella posizione indicata nell'Inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen.

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

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

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

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

AVVISO

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

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

Per ridurre i rischi associati a un risultato falso positivo:

- Non aprire mai i tubi dopo l'amplificazione.
- Gettare sempre i tubi contaminati immergendoli in una soluzione di candeggina per uso domestico all'1-5% (diluita in acqua v:v) per 1 ora lontano dall'area di preparazione dell'analisi.
- Non sterilizzare mai in autoclave i tubi di reagente dopo l'amplificazione.
- Se si sospetta che i campioni contengano livelli elevati di DNA di *Cronobacter* (ad es., DNA da cellule non vitali di *Cronobacter* che sono state sottoposte a fase di distruzione/inattivazione), i presunti arricchimenti positivi devono essere trattati con DNase prima della fase **Lisi**. Contattare il rappresentante Neogen locale per ulteriori informazioni. Questo protocollo non è stato testato durante lo studio NF Validation.

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

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

Responsabilità dell'utente

Gli utenti sono tenuti a leggere e acquisire familiarità con le istruzioni e le informazioni sul prodotto. Visitare il sito web **www.neogen.com** o contattare il distributore o rappresentante Neogen di zona per ulteriori informazioni.

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

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

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

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

Per aiutare i clienti nella valutazione del metodo per le varie matrici, Neogen ha elaborato il kit di Controllo della matrice di rilevamento molecolare Neogen®. Quando necessario, utilizzare il Controllo della matrice (CM) per determinare se questa sia in grado di influenzare i risultati dell'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter*. Durante qualsiasi periodo di valutazione in caso di adozione di un metodo Neogen o durante l'esecuzione di test su matrici note o sconosciute o su matrici sottoposte a modifiche di materie prime o di processo, sottoporre a test numerosi campioni rappresentativi della matrice, cioè campioni di diversa origine.

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

Limitazione di garanzia/Rimedio limitato

SALVO NEI CASI ESPRESSAMENTE INDICATI IN UNA SEZIONE DI GARANZIA LIMITATA DELLA SINGOLA CONFEZIONE DEL PRODOTTO, NEOGEN NON RICONOSCE ALCUNA GARANZIA ESPLICITA O IMPLICITA, INCLUSE, MA NON A ESSE LIMITATE, LE EVENTUALI GARANZIE DI COMMERCIABILITÀ O DI IDONEITÀ A UNO SCOPO PARTICOLARE. Qualora un prodotto Neogen Sicurezza alimentare sia difettoso, Neogen o il suo distributore

autorizzato provvederanno, a loro discrezione, alla sostituzione o al rimborso del prezzo d'acquisto del prodotto. Questi sono gli unici rimedi a disposizione del cliente. Per ulteriori domande, contattare il rappresentante Neogen o il distributore autorizzato Neogen.

Limitazione di responsabilità da parte di Neogen

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

Conservazione e smaltimento

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

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

Istruzioni per l'uso

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

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

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

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

Tabella 3 per i protocolli di arricchimento secondo AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2018.01 e *Performance Tested℠* certificato n. 101703

Tabella 4 per i protocolli di arricchimento secondo il certificato NF VALIDATION 3M 01/20-03/18

Arricchimento del campione

Le tabelle 2, 3 o 4 presentano una guida ai protocolli di arricchimento per campioni ambientali di alimenti.

È responsabilità dell'utente convalidare i protocolli di campionamento alternativi o i rapporti di diluizione per assicurare che il presente metodo di test soddisfi i propri criteri.

Alimenti, polveri ambientali, polveri, spazzate e spugne

1. Portare il terreno di arricchimento alla temperatura ambiente (20-25 °C) salvo diversamente indicato nel protocollo di arricchimento (vedere Tabella 2, 3 o 4).
2. Unire asetticamente il terreno di arricchimento al campione e omogeneizzare accuratamente miscelando con vortex o a mano e agitando per 2 ± 0,2 minuti **o finché tutti i grumi non siano completamente sciolti e la sospensione di arricchimento risulti omogenea**[7, 8].
    a. Fattori quali la preparazione del campione, tra cui omogeneizzazione e miscelazione, la manipolazione e le tecniche di laboratorio possono influenzare i risultati.
    b. Per tutti i campioni a elevato numero di particelle, si consiglia l'utilizzo di filtri a sacco.
    c. Per matrici che si gonfiano in acqua e sono molto viscose (es. cereali, amidi), si consiglia di effettuare ulteriori diluizioni (> 1:10) finché la viscosità non risulta adeguatamente ridotta oppure aggiungere l'1% (p/v) di alfa-amilasi al BPW (ISO)[8].
    d. Per campioni di grandi dimensioni di cereali, aggiungere lentamente cereale in polvere al liquido, mescolando frequentemente per evitare grumi.
3. Incubare secondo quanto specificato nella rispettiva tabella del protocollo (vedere Tabella 2, 3 o 4).

Tabella 2. Protocolli di arricchimento generici

Matrice campione	Dimensione campione[1]	Volume brodo di arricchimento[1, 2]	Temperatura di arricchimento (± 1 °C)	Tempo di arricchimento (ore)	Volume dell'analisi del campione
Alimenti per lattanti in polvere (PIF) e materie prime come latte in polvere secco, polvere di soia, siero di latte in polvere, lattosio, farina di riso e maltodestrina	1X grammo di campione	9X ml di BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Materie prime come sali, minerali, amminoacidi, DHA (acido docosaesaenoico) e vitamine	1X grammo di campione	99X ml di BPW (ISO) (1:100)	37	18-24	20 µl
Campioni ambientali secchi come polvere, spazzate, raccolta a vuoto	1X grammo di campione	9X ml di BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Spugna ambientale con 10 ml di brodo Letheen o brodo neutralizzante D/E	1 dispositivo di campionamento	90 ml di BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl

1. Neogen ha valutato l'analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter* utilizzando i rapporti di diluizione indicati nella Tabella 2 fino a 300 g. È responsabilità dell'utente convalidare i rapporti di diluizione o i protocolli alternativi per assicurare che il metodo soddisfi i propri criteri.
2. Utilizzare BPW (ISO) **preriscaldato** qualora il volume del brodo di arricchimento sia > 300 ml (es. campione > 30 grammi).

Istruzioni specifiche per metodi validati

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

AOAC® *Performance Tested℠* (PTM) certificato n. 101703

PERFORMANCE TESTED
AOAC
RESEARCH INSTITUTE
LICENSE NUMBER 101703

Negli studi OMA℠ e PTM℠ dell'Istituto di ricerca AOAC, l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter* è stata scoperta essere un efficace metodo per il rilevamento di *Cronobacter*. Le matrici testate nello studio sono riportate nella Tabella 3.

Tabella 3. Protocolli di arricchimento secondo AOAC® *OMA*[SM] 2018.01 e *PTM*[SM] 101703

Matrice campione	Dimensione campione	Volume del brodo di arricchimento[1]	Temperatura di arricchimento (± 1 °C)	Tempo di arricchimento (ore)	Volume dell'analisi del campione
Alimenti per lattanti in polvere e cereali in polvere per lattanti	10 g	90 ml di BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Cereali in polvere non probiotici per lattanti	300 g	2700 ml di BPW (ISO) (1:10)	Preriscaldato a 37	18-24	20 µl
Alimenti per lattanti in polvere e cereali in polvere con probiotici per lattanti	300 g	2700 ml di BPW (ISO) + 10 mg/l di vancomicina	Preriscaldato a 37	22-24	20 µl
Lattosio	10 g	90 ml di BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Spugna ambientale con 10 ml di brodo neutralizzante D/E	1 dispositivo di campionamento	90 ml di BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl

1. Utilizzare BPW (ISO) **preriscaldato** se il volume del brodo di arricchimento è > 300 ml.

NF VALIDATION concessa dalla AFNOR Certification

3M 01/20-03/18

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

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

Metodo certificato NF VALIDATION in conformità a ISO 16140-2[9] in confronto a ISO 22964.

Ambito della validazione: alimenti per lattanti in polvere e cereali per lattanti con e senza probiotici, materie prime e campioni ambientali.

Preparazione del campione: i campioni devono essere preparati secondo EN ISO 22694[2] ed EN ISO 6887[7, 8].

Versione del software: vedere il certificato.

Tabella 4. Protocolli di arricchimento secondo il metodo certificato NF VALIDATION 3M 01/20-03/18

Matrice campione	Dimensione campione	Volume del brodo di arricchimento[1]	Temperatura di arricchimento (± 1 °C)	Tempo di arricchimento (ore)	Volume dell'analisi del campione	Punto di interruzione raccomandato[2, 3]
• Alimenti in polvere per lattanti • Cereali in polvere per lattanti • Ingredienti come latte in polvere secco, polvere di soia, siero di latte in polvere, lattosio, farina di riso e maltodestrina • Campioni ambientali secchi come polvere, spazzate, raccolta a vuoto	10 g	90 ml di BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl	Il brodo di arricchimento o lisato campione può essere conservato a 2-8 °C fino a 72 ore
• Spugna, acqua di risciacquo, panni	1 dispositivo di campio-namento o 10 ml					Il brodo di arricchimento o lisato campione può essere conservato a 2-8 °C fino a 72 ore
Alimenti in polvere per lattanti e cereali in polvere per lattanti (non probiotici)	30-300 g	BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl	Il brodo di arricchimento o lisato campione può essere conservato a 2-8 °C fino a 72 ore
Cereali in polvere per lattanti e alimenti in polvere per lattanti (con probiotici)	30-300 g	BPW (ISO) + 10 mg/l di vancomicina (1:10)	37	22-24	20 µl	Nessuno

1. Utilizzare BPW (ISO) preriscaldato qualora il volume del brodo di arricchimento sia > 300 ml (es. campione > 30 grammi).
2. Dopo aver rimosso il brodo di arricchimento dal luogo di conservazione, riprendere il test dal Punto 1 nella sezione Lisi. Dopo aver rimosso il lisato campione dal luogo di conservazione, riprendere il test dal Punto 7 nella sezione Lisi.
3. Fare riferimento all'Appendice A per rieseguire il test di lisati trattati termicamente conservati.

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

1. Bagnare un panno o un asciugamano monouso con una soluzione di candeggina per uso domestico all'1-5% (diluita in acqua v:v) e pulire il Vassoio per caricamento rapido per il sistema di rilevamento molecolare Neogen.
2. Sciacquare con acqua il Vassoio per caricamento rapido per il sistema di rilevamento molecolare Neogen.

3. Utilizzare un panno usa e getta per asciugare il Vassoio per caricamento rapido per il sistema di rilevamento molecolare Neogen.
4. Assicurarsi che il Vassoio per caricamento rapido per il sistema di rilevamento molecolare Neogen sia asciutto prima dell'uso.

Preparazione del supporto per il Blocco di raffreddamento estraibile per il sistema di rilevamento molecolare Neogen®
Posizionare il supporto per il Blocco di raffreddamento estraibile per il sistema di rilevamento molecolare Neogen direttamente sul banco di laboratorio: il Vassoio per blocco di raffreddamento estraibile per il sistema rilevamento molecolare Neogen non viene utilizzato. Utilizzare il blocco alla temperatura ambiente del laboratorio (20-25 °C).

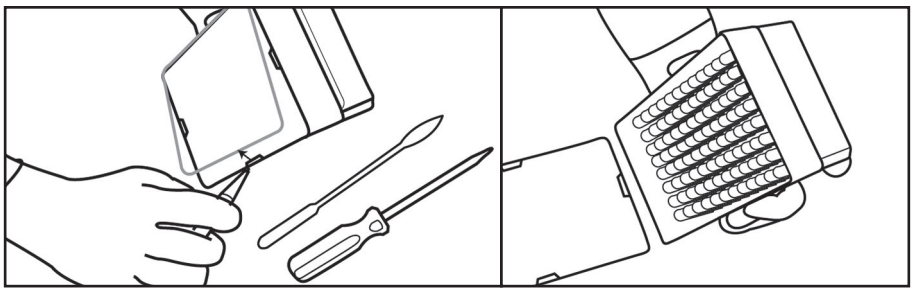
Preparazione dell'Inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen®
Posizionare l'Inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen in un'unità riscaldante a secco con doppio blocco. Accendere l'unità riscaldante a secco con blocco e impostare la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

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

Preparazione dello Strumento per l'analisi molecolare Neogen®
1. Avviare il Software per l'analisi molecolare Neogen® ed effettuare l'accesso. Contattare il proprio rappresentante Neogen Food Safety per assicurarsi di avere la versione del software più aggiornata.
2. Accendere lo Strumento per l'analisi molecolare Neogen.
3. Creare o modificare una corsa con i dati per ciascun campione. Fare riferimento al Manuale per l'utente del Sistema per l'analisi molecolare Neogen per i dettagli.

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

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



1. Far riscaldare i tubi della soluzione di lisi Neogen lasciando la rastrelliera a temperatura ambiente (20-25 °C) per una notte (16-18 ore). Le alternative per equilibrare i tubi della soluzione di lisi Neogen a temperatura ambiente sono: posizionare i tubi della soluzione di lisi Neogen sul banco di laboratorio per almeno 2 ore; incubarli in un incubatore a 37 ± 1 °C per 1 ora; oppure posizionarli in un'unità riscaldante a secco con doppio blocco per 30 secondi a 100 ± 1 °C.
2. Capovolgere i tubi provvisti di tappo per miscelare. Procedere con la fase successiva entro 4 ore dopo l'inversione.
3. Rimuovere il brodo di arricchimento dall'incubatore.
4. È richiesto un tubo della soluzione di lisi Neogen per ciascun campione e campione NC (terreno di arricchimento sterile).
   4.1 Le strisce di tubi per soluzione di lisi Neogen possono essere tagliate al numero desiderato. Selezionare il numero necessario di strisce dei tubi della soluzione di lisi Neogen singole o da 8 tubi. Posizionare i tubi della soluzione di lisi Neogen in una rastrelliera vuota.

4.2 Al fine di evitare la contaminazione crociata, stappare una striscia di tubi della soluzione di lisi Neogen alla volta e utilizzare una nuova punta di pipetta per ciascuna fase di trasferimento.

4.3 Trasferire il campione arricchito nei tubi della soluzione di lisi Neogen come descritto di seguito:

Trasferire **innanzitutto** ciascun campione arricchito in un tubo della soluzione di lisi Neogen singolo. Trasferire l'NC **per ultimo.**

4.4 Utilizzare lo Strumento di inserimento/rimozione del tappo per il rilevamento molecolare Neogen® - Lisi per rimuovere il tappo da una striscia di tubi della soluzione di lisi Neogen, una striscia alla volta.

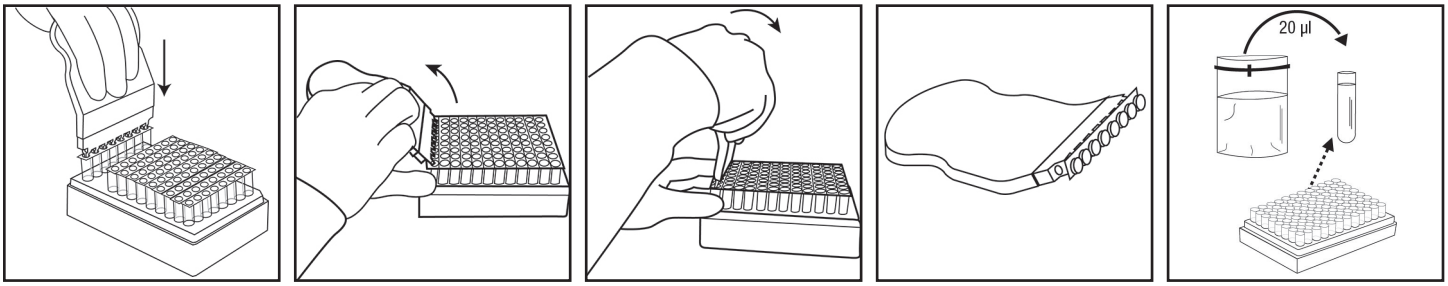
4.5 Gettare via il tappo del tubo della soluzione di lisi Neogen; se il lisato viene conservato per effettuare nuovamente il test, posizionare i tappi in un contenitore pulito per consentirne nuovamente l'applicazione dopo la lisi.

4.5.1. Per l'elaborazione del lisato conservato, consultare l'Appendice A.

4.6 Agitare la busta di arricchimento prima di raccogliere il campione dal lato filtrato quando si lavora con campioni viscosi.

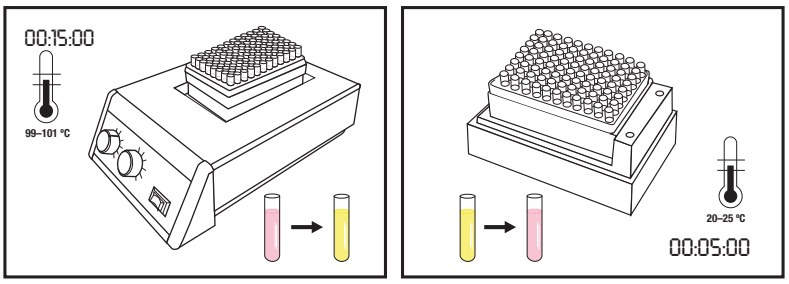
4.7 Trasferire 20 µl di campione in un tubo della soluzione di lisi Neogen, a meno che non venga indicato altrimenti nella tabella del protocollo.

5. Ripetere i punti da 4.4 a 4.7 finché ciascun singolo campione non è stato aggiunto a un tubo della soluzione di lisi Neogen corrispondente nella striscia.



6. Quando tutti i campioni sono stati trasferiti, trasferire 20 µl di NC (mezzo di arricchimento sterile, ad esempio BPW) in un tubo della soluzione di lisi Neogen. Non utilizzare l'acqua come NC (Controllo negativo).
7. Verificare che la temperatura dell'Inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen sia 100 ± 1 °C.
8. Posizionare la rastrelliera per tubi della soluzione di lisi Neogen, scoperta, nell'Inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen e riscaldare per 15 ± 1 minuti. Durante il riscaldamento, la soluzione di lisi Neogen passerà dal colore rosa (freddo) al giallo (caldo).

   I campioni non correttamente trattati termicamente durante la fase di lisi dell'analisi possono essere considerati un potenziale rischio biologico e NON dovranno essere inseriti nello Strumento per l'analisi molecolare Neogen.
9. Rimuovere la rastrelliera dei tubi della soluzione di lisi Neogen senza coperchio dal Blocco riscaldante per il sistema di rilevamento molecolare Neogen e far raffreddare nel Blocco di raffreddamento estraibile per il sistema di rilevamento molecolare Neogen per almeno 5 minuti e per un massimo di 10 minuti. Il Blocco di raffreddamento estraibile per il sistema di rilevamento molecolare Neogen, utilizzato a temperatura ambiente senza il Vassoio per Blocco di raffreddamento estraibile per il sistema di rilevamento molecolare Neogen®, deve essere posto direttamente sul banco del laboratorio. Quando è fredda, la soluzione di lisi Neogen torna a essere di colore rosa.
10. Rimuovere la rastrelliera dei tubi della soluzione di lisi Neogen dal Blocco di raffreddamento estraibile per il sistema di rilevamento molecolare Neogen.

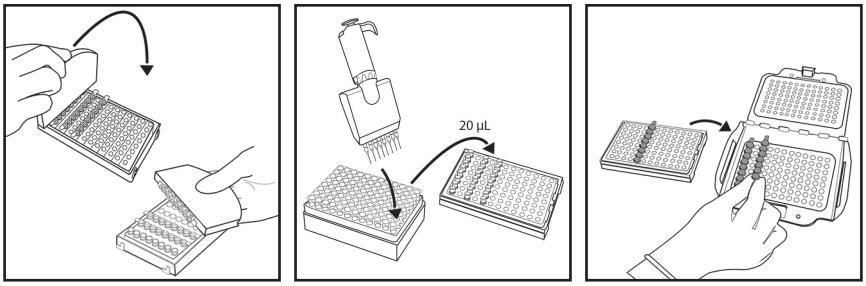


Amplificazione

1. È richiesto un tubo di reagente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter* per ciascun campione e per il NC.
   1.1 Le strisce dei tubi possono essere tagliate al numero di tubo desiderato. Selezionare il numero necessario di tubi di reagente singoli o di strisce da 8 tubi per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter*.
   1.2 Collocare i tubi di reagente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter* in una rastrelliera vuota.
   1.3 Evitare di spostare le pastiglie di reagente poste sul fondo dei tubi.
2. Selezionare un tubo di Controllo reagente Neogen e posizionarlo nella rastrelliera.
3. Al fine di evitare la contaminazione crociata, rimuovere i tappi da una striscia di tubi di reagente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter* alla volta e utilizzare un nuovo puntale per pipetta per ciascuna fase di trasferimento.
4. Trasferire ciascuno dei lisati in un tubo di reagente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter* e un tubo di controllo reagente Neogen come indicato di seguito:

   Trasferire **prima** ciascun lisato campione nei tubi di reagente singoli per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter*, quindi trasferire il NC. Idratare il tubo di controllo reagente Neogen **per ultimo**.

5. Utilizzare lo Strumento di inserimento/rimozione del tappo per il rilevamento molecolare Neogen® per rimuovere il tappo da un tubo di reagente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter*, una striscia di tubi per volta. Gettare il tappo.
   5.1 **Trasferire 20 µl di lisato campione dalla metà superiore del liquido (evitare il deposito) di un tubo della soluzione di lisi Neogen nel corrispondente tubo di reagente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter*. Erogare con un'inclinazione per evitare il movimento delle pastiglie. Miscelare pipettando delicatamente su e giù per 5 volte.**
   5.2 Ripetere il punto 5.1 finché ciascun singolo lisato campione non è stato aggiunto al corrispondente tubo di reagente per l'analisi molecolare Neogen di seconda generazione per il rilevamento di *Cronobacter* nella striscia.
   5.3 Coprire i tubi di reagente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter* con i tappi supplementari forniti e utilizzare il lato arrotondato dello strumento di inserimento/rimozione dei tappi per il rilevamento molecolare Neogen – Reagente per applicare pressione con un movimento avanti e indietro assicurandosi di stringere bene il tappo.
   5.4 Ripetere i punti da 5.1 a 5.3 fin quando è necessario, per il numero di campioni da testare.
   5.5 Quando tutti i lisati sono stati trasferiti, ripetere i punti da 5.1 a 5.3 per trasferire 20 µl di lisato NC in un tubo di reagente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter*.
   5.6 Trasferire **20 µl di lisato NC in un tubo di controllo reagente Neogen.** Erogare con un'inclinazione per evitare il movimento delle pastiglie. Miscelare pipettando delicatamente su e giù per 5 volte.
6. Caricare i tubi provvisti di tappo su un Vassoio per caricamento rapido per il sistema di rilevamento molecolare Neogen pulito e decontaminato. Chiudere saldamente il coperchio del Vassoio per caricamento rapido per il sistema di rilevamento molecolare Neogen.



7. Controllare e confermare l'esecuzione configurata sul Software per l'analisi molecolare Neogen.
8. Fare clic sul pulsante Start nel software e selezionare lo strumento da utilizzare. Il coperchio dello strumento selezionato si apre automaticamente.
9. Posizionare il Vassoio per caricamento rapido per il sistema di rilevamento molecolare Neogen nello Strumento per l'analisi molecolare Neogen e chiudere il coperchio per avviare l'analisi. I risultati sono forniti entro 60 minuti, sebbene quelli positivi possano essere rilevati prima.
10. Una volta completata l'analisi, rimuovere il Vassoio per caricamento rapido per il sistema di rilevamento molecolare Neogen dallo Strumento per l'analisi molecolare Neogen e smaltire i tubi immergendoli in una soluzione di candeggina per uso domestico 1-5% (diluita con acqua v:v) per 1 ora e lontano dall'area di preparazione dell'analisi.

AVVISO: per ridurre il rischio di falsi positivi dovuti alla contaminazione crociata, non aprire mai i tubi di reagente contenenti DNA amplificato. Questi includono il reagente per l'Analisi molecolare di seconda generazione Neogen per il rilevamento di *Cronobacter*, i tubi di controllo reagente Neogen e i tubi di controllo della matrice Neogen. Smaltire sempre i tubi di reagente sigillati immergendoli in una soluzione di candeggina per uso domestico 1-5% (diluita con acqua v:v) per 1 ora e lontano dall'area di preparazione dell'analisi.

Risultati e interpretazione

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

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

Conferma

- Conferma dei risultati secondo il metodo certificato NF Validation

Nel contesto del NF VALIDATION, tutti gli arricchimenti presunti positivi dovranno essere confermati seguendo il metodo di riferimento per la conferma[2], iniziando dal trasferimento dall'arricchimento primario (BPW ISO o BPW ISO integrato con 10 mg/l di vancomicina).

- Altro protocollo di conferma

Tutti i presunti risultati positivi vanno confermati in base alle procedure operative standard del laboratorio o seguendo un adeguato metodo di riferimento per la conferma[1,2], iniziando dal trasferimento dall'arricchimento primario (BPW ISO o BPW ISO integrato con 10 mg/l di vancomicina) a un terreno di arricchimento secondario, seguito dall'applicazione di un disco e dalla conferma degli isolati utilizzando metodi biochimici e sierologici adeguati.

Nel raro caso di emissione luminosa insolita, l'algoritmo la classifica come Da esaminare. Neogen consiglia all'utente di ripetere l'analisi per qualsiasi campione da esaminare. Se il risultato continua a essere Da esaminare, procedere con il test di conferma utilizzando il proprio metodo di elezione o come specificato dalle normative locali[1,2].

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

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

Appendice A. Interruzione del protocollo: conservazione e nuovo test dei lisati trattati con calore

1. Per conservare un lisato trattato con calore, richiudere il tubo di lisi con un tappo pulito (vedere la sezione **Lisi,** 4.5)
2. Conservare a 2-8 °C fino a 72 ore.
3. Preparare il campione conservato per l'amplificazione capovolgendolo 2-3 volte per miscelarlo.
4. Togliere il tappo ai tubi.
5. Collocare i tubi di lisato miscelato sull'Inserto del blocco di calore per il sistema di rilevamento molecolare Neogen e riscaldare a 100 ± 1 °C per 5 ± 1 minuti.
6. Rimuovere la rastrelliera dei tubi della soluzione di lisi Neogen dal blocco di calore e consentire il raffreddamento nel Blocco di raffreddamento estraibile per il sistema di rilevamento molecolare Neogen per almeno 5 minuti e per un massimo di 10 minuti.
7. Continuare il protocollo indicato nella sezione **Amplificazione** illustrata sopra.

Bibliografia:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
8. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

Fare riferimento alle versioni attuali dei metodi standard elencati in precedenza.

Legenda dei simboli

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

NEOGEN

Instrucciones del Producto

Ensayo 2 Detección Molecular - *Cronobacter*

Descripción del producto y uso previsto

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

El Ensayo de Detección Molecular Neogen usa amplificación isotérmica mediada por asas 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].

El Ensayo 2 Detección Molecular - *Cronobacter* está previsto para su uso en laboratorios por profesionales capacitados en el empleo de técnicas de laboratorio. Neogen no documentó el uso de este producto en otras industrias que no sean la alimentaria o la de bebidas. Por ejemplo, Neogen no ha documentado este producto para la evaluación de muestras farmacéuticas, cosméticas, clínicas o veterinarias. Ensayo 2 Detección Molecular - *Cronobacter* no se evaluó con todos los productos alimenticios, los procesos de alimentos o protocolos de pruebas posibles ni con todas las cepas de bacterias posibles.

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

Neogen ha evaluado el Ensayo 2 Detección Molecular - *Cronobacter* con Agua Peptonada Tamponada 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 tiene certificación ISO (International Organization for Standardization) 9001 para diseño y fabricación.

El kit de prueba para el Ensayo 2 Detección Molecular - *Cronobacter* contiene 96 pruebas, que se describen en la Tabla 1.

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

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

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

Seguridad

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

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

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

⚠ ADVERTENCIA

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

El usuario debe capacitar a su personal en las técnicas de evaluación adecuadas: por ejemplo, Buenas Prácticas de Laboratorio[3], la norma ISO 17025[4] o la norma 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 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter* como se indica en el embalaje y en las Instrucciones del producto.
- Siempre use el Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter* antes de su fecha de vencimiento.
- Use el Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter* con muestras de alimentos y muestras ambientales de donde se procesan alimentos validadas internamente o por un tercero.
- Use el Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter* solo con superficies, desinfectantes, protocolos y cepas bacterianas que hayan sido validados internamente o por un tercero.
- En el caso de muestras ambientales que contengan una solución amortiguadora neutralizante (NB) 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 solución amortiguadora neutralizante a los tubos de Solución de Lisis Neogen. Productos de manipulación de la muestra Neogen® que incluyen la solución amortiguadora Neutralizante con el complejo de aril sulfonato: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G y HS2410NB2G. Este protocolo no se ha evaluado durante el estudio de NF Validation.

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

- Realice las pruebas de patógenos en un laboratorio debidamente equipado, bajo la supervisión de personal capacitado. El medio de enriquecimiento incubado y el equipo o las superficies que hayan entrado en contacto con el medio de enriquecimiento podrían contener patógenos en niveles suficientes para provocar un riesgo para la salud humana.
- Siempre proceda de acuerdo con las prácticas estándar de seguridad del laboratorio. Eso incluye usar la ropa de protección adecuada y protección para los ojos al manipular reactivos y muestras contaminadas.
- Evite el contacto con el contenido del medio de enriquecimiento y de los tubos de reactivos después de la amplificación.
- Deseche las muestras enriquecidas y desechos contaminados asociados según los estándares locales/regionales/nacionales/industriales actuales.
- No exceda la temperatura recomendada al configurar el calentador.
- No exceda el tiempo de calentamiento recomendado.
- Use un termómetro calibrado adecuado para verificar la temperatura del Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen® (por ej., un termómetro de inmersión parcial o un termómetro digital termopar, no un termómetro de inmersión total). El termómetro debe colocarse en la ubicación designada en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen.

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

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

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

- No exceda la temperatura recomendada al configurar el calentador.
- No exceda el tiempo de calentamiento recomendado.

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

ATENCIÓN

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

- Cámbiese los guantes antes de hidratar los gránulos reactivos.
- Se recomienda usar puntas de pipetas estériles de calidad de biología molecular con barrera para aerosoles (puntas 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 abra los tubos de reactivos después de la amplificación.
- Si se sospecha que las muestras contienen niveles elevados de ADN de *Cronobacter* (es decir, ADN de células de *Cronobacter* no viables que hayan estado sujetas a un paso de eliminación/inactivación), los enriquecimientos presuntamente positivos se deben tratar con la DNasa antes del paso de **Lisis**. Comuníquese con su Representante de Neogen para recibir instrucciones adicionales. Este protocolo no se ha evaluado durante el estudio de NF Validation.

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

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

Responsabilidad del usuario

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

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

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

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

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

Para ayudar a los clientes a evaluar 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 tiene la capacidad de impactar en los resultados del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter*. 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 provocados por las diferencias en su procesamiento o presentación, por ejemplo, crudo o pasteurizado, fresco o deshidratado, etc.

Limitación de garantías / Recurso limitado

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

Limitación de responsabilidad de Neogen

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

Almacenamiento y desecho

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

No use el Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter* después de su fecha de vencimiento. La fecha de vencimiento y el número de lote están impresos en la etiqueta externa de la caja. Después de usarlos, el medio de enriquecimiento y los tubos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter* podrían contener materiales patógenos. Una vez 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 regulaciones locales para el desecho de materiales.

Instrucciones de uso

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

Descontamine periódicamente las mesas y el equipo de laboratorio (pipetas, herramientas para tapar/destapar, 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:

La Tabla 3 para los protocolos de enriquecimiento según el OAOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2018.01 y el Certificado *Performance Tested*℠ n.º 101703.

La Tabla 4 de los protocolos de enriquecimiento según el certificado NF VALIDATION 3M 01/20-03/18.

Enriquecimiento de la Muestra

Las Tablas 2, 3 o 4 presentan una guía para los protocolos de enriquecimiento de muestras ambientales y de alimentos.

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

Alimentos, polvos ambientales, polvos, barreduras y esponjas

1. Equilibre el medio de enriquecimiento a la temperatura ambiente de la sala (20-25 °C) a menos que el protocolo de enriquecimiento indique lo contrario (Consulte la Tabla 2, 3 o 4).
2. Combine asépticamente el medio de enriquecimiento y la muestra y homogenice mediante mezclado, un homogeneizador peristáltico o a mano durante 2 ± 0,2 minutos **o hasta que todos los grumos se hayan disuelto por completo y la suspensión de enriquecimiento sea homogénea**[7, 8].
    a. Los factores como la preparación de la muestra, incluso la homogenización y mezclado, manipulación y técnicas de laboratorio pueden influir sobre los resultados.

b. Para muestras con alto contenido de partículas, se recomienda utilizar bolsas con filtro.

c. Para matrices que se expanden en agua y son ampliamente viscosas (por ejemplo, cereales, almidones), se sugiere hacer más diluciones (> 1:10) hasta que la viscosidad se haya reducido de manera adecuada o agregue 1% (p/v) de alfa-amilasa a BPW (ISO)[8].

d. Para muestras de gran tamaño de cereales, agregue el cereal en polvo lentamente al líquido mezclando frecuentemente para evitar los grumos.

3. Incube como se indica en la tabla del protocolo que corresponda (Consulte la Tabla 2, 3 o 4).

Tabla 2. Protocolos Generales de Enriquecimiento

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

1. Neogen ha evaluado el Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter* usando las proporciones de dilución que se indican en la Tabla 2 hasta 300 g. Es responsabilidad del usuario validar protocolos o las proporciones de dilución alternativos para garantizar que este método de prueba satisface los criterios del usuario.
2. Use BPW (ISO) **precalentada** si el volumen del caldo de enriquecimiento es >300 ml (por ejemplo, si la muestra es >30 gramos).

Instrucciones Específicas para Métodos Validados

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

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

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

En los estudios de AOAC Research Institute, OMA℠ y PTM℠, se descubrió que el Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter* era un método efectivo para la detección de la *Cronobacter.* Las matrices evaluadas en el estudio se muestran en la Tabla 3.

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

Matriz de Muestreo	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento[1]	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Volumen de análisis de la muestra
Fórmula en polvo para lactantes y cereal en polvo para lactantes	10 g	90 ml de BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Cereal en polvo para lactantes no probiótico	300 g	2700 ml de BPW (ISO) (1:10)	Precalentada 37	18-24	20 µl
Fórmula en polvo para lactantes y cereal en polvo para lactantes con probióticos	300 g	2700 ml de BPW (ISO) + 10 mg/l de vancomicina	Precalentada 37	22-24	20 µl
Lactosa	10 g	90 ml de BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Esponja ambiental con 10 ml de D/E Caldo Neutralizante D/E	1 dispositivo de muestreo	90 ml de BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl

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

NF VALIDATION por AFNOR Certification

3M 01/20-03/18

METODOS ALTERNATIVOS DE ANÁLISIS PARA LA AGROINDUSTRIA

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

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

Método certificado de NF VALIDATION en cumplimiento de la norma ISO 16140-2[9] comparada con la norma ISO 22964.

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

Preparación de la muestra: Las muestras se deben preparar según las normas EN ISO 22694[2] y EN ISO 6887[7, 8].

Versión de Software: Consulte el certificado.

Tabla 4. Protocolos de enriquecimiento según el método certificado de NF VALIDATION 3M 01/20-03/18.

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

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

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

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

Preparación del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen®
Coloque la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen directamente sobre la mesa del laboratorio: No se usa la Bandeja para el Bloque de Frío del Sistema de Detección Molecular Neogen. Use el bloque a temperatura ambiente del laboratorio (20 °C a 25 °C).

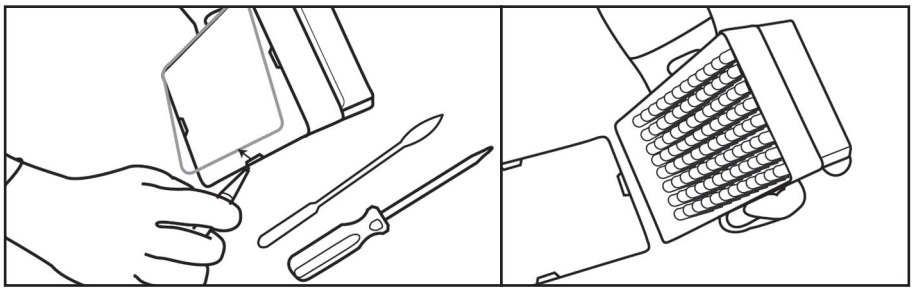
Preparación del Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen®
Coloque el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen en una unidad o plancha de calentamiento seca. Encienda la unidad de calentamiento de bloques seca y ajuste la temperatura para permitir que el Bloque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

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

Preparación del Equipo de Detección Molecular Neogen®
1. Inicie el Software de Detección Molecular Neogen® e inicie sesión. Comuníquese con su representante de Neogen Food Safety para asegurarse de que cuenta con la versión más actualizada del software.
2. Encienda el Equipo de Detección Molecular Neogen.
3. Cree o edite una corrida con datos para cada muestra. Para obtener detalles, consulte el Manual del Usuario del Sistema de Detección Molecular Neogen.

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

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



1. Permita que los tubos de Solución de Lisis Neogen se calienten colocando la gradilla a temperatura ambiente (20-25 °C) durante la noche (16 a 18 horas). Las alternativas para que los tubos de Solución de Lisis Neogen alcancen temperatura ambiente son colocar los tubos de Solución de Lisis Neogen sobre el banco de laboratorio durante por lo menos 2 horas, incubar los tubos de Solución de Lisis Neogen en una incubadora a 37 ± 1 °C durante 1 hora o colocarlos en una unidad de calentamiento de dos bloques seca durante 30 segundos a 100 ± 1 °C.
2. Invierta los tubos tapados para mezclarlos. Proceda con el paso siguiente dentro de las 4 horas después de la inversión.
3. Retire 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. Seleccione la cantidad de tubos de Solución de Lisis Neogen individuales o de tiras de 8 tubos necesarias. Coloque los tubos de Solución de Lisis Neogen en una gradilla vacía.
   4.2 Para evitar la contaminación cruzada, destape una tira de tubos de Solución de Lisis Neogen por vez y use una nueva punta de pipeta para cada paso de transferencia.
   4.3 Transfiera la muestra enriquecida a los tubos de Solución de Lisis Neogen como se describe a continuación:

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

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

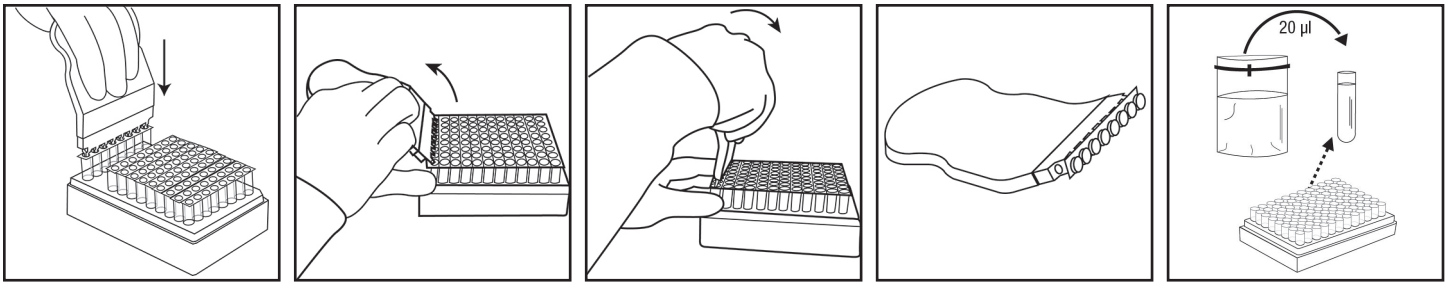
4.5 Deseche la tapa del tubo de Solución de Lisis Neogen; si se conservara el lisado para una repetición de prueba, coloque las tapas en un envase limpio para su reaplicación luego de la lisis.

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

4.6 Agite la bolsa de enriquecimiento antes de recolectar la muestra del lado filtrado cuando trabaje con muestras viscosas.

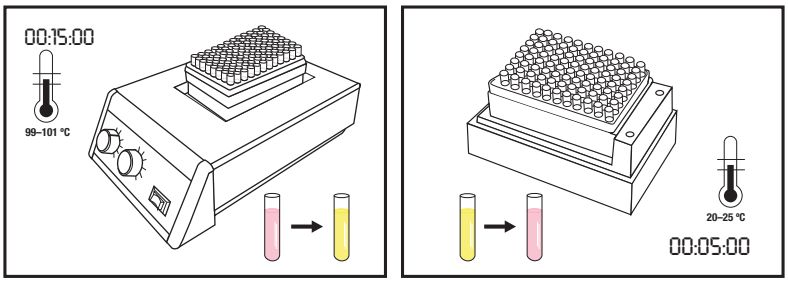
4.7 Transfiera 20 µl de la muestra a un tubo de Solución de Lisis Neogen a menos que se indique de manera contraria en la tabla de protocolo.

5. Repita los pasos 4.4 a 4.7 hasta que cada muestra individual se haya agregado al correspondiente tubo de Solución de Lisis Neogen de la tira.



6. Cuando se hayan transferido todas las muestras, transfiera 20 µl del NC (medio de enriquecimiento estéril, por ejemplo, BPW) a un tubo de Solución de Lisis Neogen. No use agua como un NC.
7. Verifique que la temperatura del Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen sea de 100 °C ±1 °C.
8. 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).

   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 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 la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen a temperatura ambiente sin la Bandeja para el Bloque de Frío del Sistema de Detección Molecular Neogen®, debe colocarse directamente sobre el banco de laboratorio. Cuando esté frío, la Solución de Lisis Neogen se revertirá a un color rosado.
10. Retire la gradilla de tubos de Solución de Lisis Neogen de la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen.



Amplificación

1. Se necesita un Tubo de Reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter* por cada muestra y el NC.

   1.1 Las tiras de tubos pueden cortarse para obtener la cantidad de tubos deseada. Seleccione la cantidad de Tubos de Reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter* o tiras de 8 tubos según sea necesario.

   1.2 Tubos de reactivos para el Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter*

   1.3 Evite mover las perlas de reactivo en el fondo de los tubos.
2. Seleccione un tubo de Control de Reactivos Neogen y colóquelo en la gradilla.

3. Para evitar la contaminación cruzada, destape una tira de Tubos de Reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter* por vez y use una nueva punta de pipeta para cada paso de transferencia.
4. Transfiera cada uno de los lisados a un Tubos de Reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter* y a un Tubo de Control de Reactivos Neogen como se describe a continuación:

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

5. Use la Herramienta para Encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular – Reactivo Neogen® para destapar los Tubos de Reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter*, una tira de tubo a la vez. Desecha la tapa.

   5.1 **Transfiera 20 µl del lisado de muestra de la 1/2 superior del líquido (evite el precipitado) en el tubo de Solución de Lisis Neogen que corresponde al Tubo de Reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter*. Aplique en un ángulo que permita evitar que se muevan los gránulos. Mezcle pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.**

   5.2 Repita el paso 5.1 hasta que se haya añadido una muestra individual del lisado a un Tubo de Reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter* en la tira.

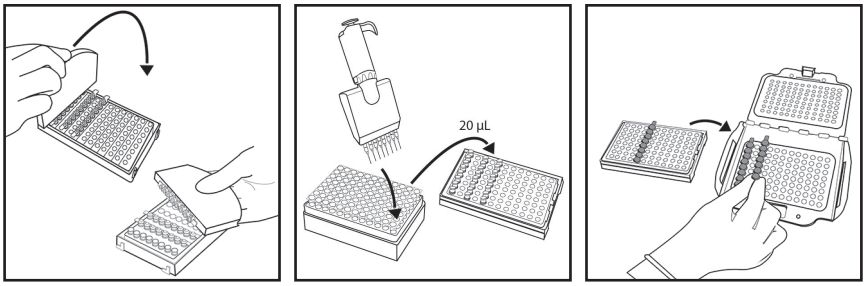
   5.3 Cubra los Tubos de Reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter* con las tapas adicionales provistas y utilice el lado redondeado de la Herramienta para Encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular – Reactivo Neogen para aplicar presión con un movimiento hacia adelante y hacia atrás para asegurarse de que la tapa quede bien ajustada.

   5.4 Repita los pasos 5.1 a 5.3 según sea necesario para la cantidad de muestras que se deben analizar.

   5.5 Cuando se hayan transferido todos los lisados de la muestra, repita los pasos 5.1 a 5.3 para transferir 20 µl de lisado NC a un Tubo de Reactivos del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter*.

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

6. Cargue los tubos tapados en una Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen limpia y descontaminada. Cierre y trabe la tapa de la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular Neogen.



7. Revise y confirme la 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 DNA amplificado. Esto incluye un Tubo de Reactivo del Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter*, el Control de Reactivos Neogen y los Tubos de Control de Matriz Neogen. Siempre deseche los tubos de reactivo sellados sumergiéndolos en una solución de cloro de uso doméstico del 1% al 5% (v:v en agua) durante una hora y lejos del área de preparación del ensayo.

Resultados e interpretación

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

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

Confirmación

- Confirmación de los resultados según el Método Certificado de NF Validation

En el contexto de NF VALIDATION, todos los enriquecimientos presuntamente positivos se deben confirmar siguiendo la confirmación del método de referencia[2], comenzando con la transferencia desde el enriquecimiento primario (BPW ISO o BPW ISO suplementada con 10 mg/l de vancomicina).

- Otro protocolo de confirmación

Todos los enriquecimientos con resultados presuntamente positivos deben ser confirmados de acuerdo con los procedimientos operativos estándar del laboratorio o mediante la confirmación del método de referencia apropiado[1, 2], comenzando con la transferencia del medio de enriquecimiento primario (BPW ISO o BPW ISO suplementada con 10 mg/l de vancomicina) al secundario, seguido del subsiguiente sembrado en placa y la confirmación de cepas, utilizando métodos bioquímicos, serológicos o moleculares apropiados.

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[1,2].

En caso de resultados discordantes (presuntamente positivo con el Ensayo 2 Detección Molecular Neogen - *Cronobacter* no confirmado por alguno de los medios descritos anteriormente), el laboratorio debe seguir los pasos necesarios para asegurar 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 lisato tratado con calor, vuelva a tapar el tubo de lisis con una tapa limpia (consulte **Lysis**, la sección 4.5)
2. Almacene entre 2 y 8 °C por hasta 72 horas.
3. Prepare una muestra almacenada para amplificación invirtiéndola 2 a 3 veces para mezclar.
4. Destape los tubos.
5. Coloque los tubos de lisado mezclados en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular Neogen y caliéntelos a 100 °C ±1 °C durante 5 ±1 minutos.
6. Retire la gradilla de tubos Solución de Lysis Neogen del bloque de calentamiento y deje que se enfríe en la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular Neogen al menos durante 5 minutos y por un máximo de 10 minutos.
7. Siga el protocolo en la sección **Amplificación** que se detalla arriba.

Referencias:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
8. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

Consulte las versiones actuales de los métodos estándar enumerados anteriormente.

Explicación de los símbolos

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

Datum van uitgifte: 2024-01

NEOGEN

Productinstructies

Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter*

Productbeschrijving en beoogd gebruik

De Neogen® Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* wordt samen met het Neogen® Moleculair Detectiesysteem gebruikt voor een snelle en specifieke detectie van *Cronobacter* in verrijkte voedingsmonsters en omgevingsmonsters uit de voedingsindustrie.

De Neogen Moleculair Detectie Assay maakt gebruik van lusgebonden isothermische amplificatie voor de snelle amplificatie van nucleïnezuurschakels met een hoge specificiteit en gevoeligheid, in combinatie met bioluminescentie om de amplificatie op te sporen. Vermoedelijk positieve resultaten worden onmiddellijk gerapporteerd, terwijl negatieve resultaten pas na de voltooiing van de analyse worden weergegeven. Vermoedelijk positieve resultaten moeten worden bevestigd door middel van de door u verkozen methode of volgens de lokale regelgevingen[1, 2].

De Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* is bedoeld voor gebruik in een laboratoriumomgeving door professionals geschoold in laboratoriumtechnieken. Neogen heeft het gebruik van dit product niet gedocumenteerd in andere sectoren dan de voedings- of dranksector. Neogen heeft dit product bijvoorbeeld niet gedocumenteerd voor farmaceutische, cosmetische, klinische of veterinaire monsters. De Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* is niet geëvalueerd voor alle mogelijke voedingsmiddelen, voedselverwerkingen, testprotocollen of voor alle mogelijke bacteriestammen.

Zoals bij alle testmethoden, kunnen de bron, de formulering en de kwaliteit van het verrijkingsmedium de resultaten beïnvloeden. Factoren zoals monstermethoden, testprotocollen, monstervoorbereiding inclusief homogeniseren en mixen, behandeling en laboratoriumtechniek kunnen de resultaten tevens beïnvloeden. Neogen beveelt evaluatie van de methode aan, waaronder verrijking van het medium, in de omgeving van de gebruiker aan de hand van een voldoende aantal monsters met specifieke voedings- en/of omgevingsmonsters en microbiële uitdagingen om te verzekeren dat de methode aan de criteria van de gebruiker voldoet.

Neogen heeft de Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* geëvalueerd met ISO Gebufferd Peptonwater als verrijkingsmedium.

Het Neogen® Moleculair Detectieinstrument is bedoeld voor gebruik bij monsters die een warmtebehandeling hebben ondergaan tijdens de lyse-stap (wordt op twee verschillende manieren geschreven in dit document) van de analyse, die ontwikkeld is om de in het monster aanwezige organismen te vernietigen. Monsters die tijdens de lyseanalysestap niet de correcte warmtebehandeling hebben ondergaan, kunnen als een potentieel biologisch gevaar worden beschouwd en mogen NIET in het Neogen Moleculaire Detectieinstrument worden geplaatst.

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

De Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* testset bevat 96 testen, beschreven in Tabel 1.

Tabel 1. Onderdelen testset Neogen Moleculair Detectie Assay

Artikel	Identificatie	Hoeveelheid	Inhoud	Opmerkingen
Neogen® Lyse-oplossing (LS)	Roze oplossing in doorzichtige buisjes	96 (12 stroken van 8 buisjes)	580 µL LO per buisje	In rek en klaar voor gebruik
Neogen® Moleculair Detectie Assay 2 -*Cronobacter* reagensbuisjes	Oranjerode buisjes	96 (12 stroken van 8 buisjes)	Gevriesdroogde specifieke amplificatie- en detectiemix	Klaar voor gebruik
Extra doppen	Oranjerode doppen	96 (12 stroken van 8 doppen)		Klaar voor gebruik
Neogen® Reagenscontrole (RC)	Doorzichtige buisjes met kliksluiting	16 (2 zakjes met 8 individuele buisjes)	Gevriesdroogd controle-DNA, amplificatie- en detectiemix	Klaar voor gebruik

De Negatieve Controle, niet meegeleverd in de set, is een steriel verrijkingsmedium, bijv. BPW ISO. Gebruik geen water als Negatieve Controle.

Veiligheid

De gebruiker moet alle veiligheidsinformatie in de instructies van het Neogen Moleculair Detectiesysteem en de Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* lezen en in acht nemen. Bewaar de veiligheidsinstructies om deze later te kunnen raadplegen.

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

OPMERKING: geeft een mogelijk gevaarlijke situatie aan die, als ze niet vermeden wordt, kan resulteren in materiële schade.

⚠ WAARSCHUWING

Gebruik de Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* niet voor de diagnose van aandoeningen bij mensen of dieren.

De gebruiker moet zijn personeel scholen in de huidige juiste testtechnieken, bijvoorbeeld goede laboratoriumpraktijken[3], ISO/IEC 17025[4], of ISO 7218[5].

Om de risico's van een vals negatief resultaat dat tot de vrijlating van het besmet product leidt te verminderen, doet u het volgende:

- Volg het protocol en voer de testen exact uit zoals aangegeven in de productinstructies.
- Bewaar de Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* zoals wordt aangegeven op de verpakking en in de productinstructies.
- Gebruik de Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* altijd voor de vervaldatum.
- Gebruik de Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* met voedingsmonsters en omgevingsmonsters uit de voedingsindustrie die intern of door een derde partij zijn goedgekeurd.
- Gebruik de Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* alleen met oppervlakken, reinigingsmiddelen, protocollen en bacteriestammen die intern of door een derde partij zijn goedgekeurd.
- Voor een milieumonster dat een neutraliserende bufferoplossing bevat met een arylsulfonaatcomplex, verdunt u 1:2 vóór het testen (1 maat van het monster in 1 maat steriele verrijkingsbouillon). Een andere optie is om 10 µl van de NB-verrijking in de Neogen buisjes met lyse-oplossing over te brengen. Neogen® monsterverwerkende producten, waaronder een neutraliserende buffer met arylsulfonaatcomplex: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G en HS2410NB2G. Dit protocol is niet getest tijdens de NF Validation-studie.

Om het risico op blootstelling aan biologische en chemische gevaren te beperken, doet u het volgende:

- Voer de pathogeentesten uit in een goed uitgerust laboratorium onder begeleiding van opgeleid personeel. Geïncubeerde verrijkingsmedia en -apparatuur of oppervlakken die in contact zijn gekomen met geïncubeerde verrijkingsmedia bevatten mogelijk voldoende pathogenen om een gevaar te vormen voor de menselijke gezondheid.
- Volg altijd de standaard veiligheidsvoorschriften voor laboratoria op, waaronder het dragen van toepasselijke beschermende kleding en oogbescherming bij het behandelen van reagentia en besmette monsters.
- Vermijd contact met de inhoud van de verrijkingsmedia en reagensbuisjes na amplificatie.
- Voer verrijkte monsters met bijbehorende besmet afval af conform de geldende plaatselijke/regionale/nationale/industrienormen.
- Overschrijd de aanbevolen temperatuurinstelling op de verwarmer niet.
- Overschrijd de aanbevolen verwarmingstijd niet.
- Gebruik een geschikte, gekalibreerde thermometer om de temperatuur van het Neogen® Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk te controleren (bijv. gedeeltelijk ondergedompelde thermometer of digitale thermokoppelthermometer, geen volledig ondergedompelde thermometer). De thermometer moet op de aangewezen locatie in het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk geplaatst worden.

Om de risico's op kruisbesmetting te beperken tijdens de voorbereiding van de test, doet u het volgende:

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

Om de risico's van blootstelling aan hete vloeistoffen te verminderen, dient u aan de volgende voorschriften te voldoen:

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

OPMERKING

Om de risico's op kruisbesmetting te beperken tijdens de voorbereiding van de test, doet u het volgende:

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

Om het risico op valse positieve resultaten te beperken, doet u het volgende:

- Open de buisjes nooit na de amplificatie.
- Verwijder de verontreinigde buisjes altijd door ze 1 uur lang onder te dompelen in een huishoudbleekmiddeloplossing van 1-5% (volume in water), uit de buurt van de testbereidingsruimte.
- U dient reagensbuisjes nooit te autoclaveren na amplificatie.
- Als u vermoedt dat monsters een hoog gehalte *Cronobacter*-DNA bevatten (d.w.z. DNA van niet-levensvatbare *Cronobacter*-cellen die gedood/geïnactiveerd zijn), dienen vermoedelijk positieve monsters vóór de lyse-stap te worden behandeld met DNase. Neem voor instructies contact op met uw Neogen-vertegenwoordiger. Dit protocol is niet getest tijdens de NF Validation-studie.

Raadpleeg het veiligheidsinformatieblad voor bijkomende informatie en de lokale regelgeving inzake afvalverwerking.

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

Verantwoordelijkheid van de gebruiker

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

Bij het kiezen van een testmethode is het belangrijk om te erkennen dat externe factoren zoals monsternamemethoden, testprotocollen, monstervoorbereiding inclusief homogeniseren en mixen, behandeling en laboratoriumtechniek de resultaten kunnen beïnvloeden.

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

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

Zoals bij elke testmethode, garanderen de verkregen resultaten van het gebruik van een Neogen Food Safety-product de kwaliteit van de geteste matrices of processen niet.

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

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

Beperkte garantie / Beperkt verhaal

BEHALVE WAAR UITDRUKKELIJK VERMELD IN EEN BEPERKTE GARANTIEBEPALING VAN EEN INDIVIDUELE PRODUCTVERPAKKING, WIJST NEOGEN ALLE UITDRUKKELIJKE EN IMPLICIETE GARANTIES AF, MET INBEGRIP VAN, MAAR NIET BEPERKT TOT, ELKE GARANTIE MET BETREKKING TOT DE GOEDE WERKING EN DE GESCHIKTHEID VOOR EEN BEPAALD DOEL. Als een Neogen Voedselveiligheidproduct gebrekkig is, zal Neogen of zijn gevolmachtigde distributeur naar eigen keuze het product vervangen of de aankoopprijs van het product terugbetalen. Dit is het enige

rechtsmiddel waarover u beschikt. Neem contact op met uw Neogen-vertegenwoordiger of erkende Neogen-distributeur voor verdere vragen.

Beperking van Neogen-aansprakelijkheid

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

Opslag en afvalverwerking

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

Gebruik de Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* niet na de vervaldatum. De vervaldatum en het partijnummer zijn terug te vinden op het etiket aan de buitenzijde van de doos. Na gebruik bevatten het verrijkingsmedium en de buisjes van de Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* mogelijk pathogeen materiaal. Na het voltooien van de testen dient u de van kracht zijnde industrienormen op te volgen betreffende de afvoer van besmet afval. Raadpleeg het veiligheidsinformatieblad voor bijkomende informatie en de lokale regelgeving inzake afvalverwerking.

Gebruiksaanwijzingen

Volg alle instructies zorgvuldig op. Het niet opvolgen van de instructies kan onnauwkeurige resultaten tot gevolg hebben.

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

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

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

Tabel 3 voor verrijkingsprotocollen conform AOAC® *Official Method voor analyse*^{SM} 2018.01 en *Performance Tested*^{SM} certificaatnummer 101703

Zie Tabel 4 voor verrijkingsprotocollen volgens het NF VALIDATION-certificaat 3M 01/20-03/18

Monsterverrijking

Tabel 2, 3 of 4 biedt advies voor algemene verrijkingsprotocollen voor voedings- en omgevingsmonsters.

Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om alternatieve bemonsterings- of verrijkingsprotocollen of verdunningsverhoudingen te valideren om ervoor te zorgen dat deze testmethode voldoet aan de criteria van de gebruiker.

Voedsel, omgevingspoeders, stof, veegsel en sponzen

1. Breng het verrijkingsmedium op kamertemperatuur (20-25 °C), tenzij het verrijkingsprotocol anders voorschrijft (zie Tabel 2, 3 of 4).
2. Voeg het monster toe aan het verrijkingsmedium op een aseptische wijze en homogeniseer het mengsel grondig met een blender, stomacher, vortexer of handmixer gedurende 2 ± 0,2 minuten **of totdat alle klonteringen volledig zijn opgelost en de verrijkingssuspensie homogeen is**[7, 8].
    a. Factoren zoals monstervoorbereiding inclusief homogeniseren en mixen, behandeling en laboratoriumtechniek kunnen de resultaten beïnvloeden.
    b. Voor alle hoge-partikelmonsters is het gebruik van filterzakken aanbevolen.
    c. Voor matrices die opzwellen in water en die hoog viskeus zijn (bijvoorbeeld granen, zetmeel), wordt aangeraden om de verdunning te verhogen (> 1:10) totdat de viscositeit voldoende is verlaagd, of voeg steriele 1% (w/v) alpha-amylase toe aan BPW (ISO)[8].
    d. Bij grote graanmonsters moet het poedervormige graanmateriaal langzaam aan de vloeistof worden toegevoegd met frequent mixen, om klonteringen te voorkomen.
3. Incubeer volgens de instructies in de toepasselijke protocoltabel (zie Tabel 2, 3 of 4).

Tabel 2. Algemene verrijkingsprotocollen

Monstermatrix	Monster-grootte[1]	Volume verrijkings-bouillon[1, 2]	Verrijkings-temperatuur (± 1 °C)	Verrijkingstijd (uur)	Volume monster-analyse
Babymelkpoeder (PIF) en grondstoffen zoals droge-melkpoeder, sojapoeder, weipoeder, lactose, rijstmeel en maltodextrine	Monster 1X gram	9X ml BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
Ruwe grondstoffen als zouten, mineralen, aminozuren, DHA (docosahexaeenzuur) en vitaminen	Monster 1X gram	99X ml BPW (ISO) (1:100)	37	18-24	20 µL
Droge omgevingsmonsters zoals stof, veegsel, opgezogen materiaal	Monster 1X gram	9X ml BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
Omgevingsspons met 10 ml letheenbouillon of D/E neutraliserende bouillon	1 hulpmiddel voor monstername	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL

1. Neogen heeft de Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* geëvalueerd met behulp van de verdunningsverhoudingen in Tabel 2 tot 300 g. Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om alternatieve verdunningsverhoudingen of -protocollen te valideren om ervoor te zorgen dat deze testmethode voldoet aan de gebruikerscriteria.
2. Gebruik **voorverwarmde** BPW (ISO) als het volume van de verrijkingsbouillon meer dan 300 ml bedraagt (bijv. het monster is > 30 gram).

Specifieke instructies voor gevalideerde methoden

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

AOAC® *Performance Tested*℠ (PTM) Certificaatnr. 101703

PERFORMANCE TESTED
AOAC
RESEARCH INSTITUTE
LICENSE NUMBER 101703

Uit de studies OMA℠ en PTM℠ van het AOAC Research Institute blijkt dat de Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* een effectieve methode is voor de detectie van *Cronobacter.* De matrices die getest werden in het onderzoek worden getoond in Tabel 3.

Tabel 3. Verrijkingsprotocollen conform AOAC® *OMA*[SM] 2018.01 en *PTM*[SM] 101703

Monstermatrix	Monster-grootte	Volume verrijkings-bouillon[1]	Verrijkings-temperatuur (± 1 °C)	Verrijkings-tijd (uur)	Volume monster-analyse
Babymelkpoeder en babygraanpoeder	10 g	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
Babygraanpoeder niet-probiotisch	300 g	2700 ml BPW (ISO) (1:10)	Voorverwarmd 37	18-24	20 µL
Babymelkpoeder en babygraanpoeder met probiotica	300 g	2700 ml BPW (ISO) + 10 mg/l vancomycine	Voorverwarmd 37	22-24	20 µL
Lactose	10 g	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
Omgevingsspons met 10 ml D/E neutraliserende bouillon	1 hulpmiddel voor monstername	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL

1. Gebruik **voorverwarmde** BPW (ISO) als het volume van de verrijkingsbouillon meer dan 300 ml bedraagt.

NF VALIDATION door AFNOR Certification

3M 01/20-03/18

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

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

Gecertificeerde methode NF VALIDATION conform ISO 16140-2[(9)] in vergelijking met ISO 22964.

Toepassingsgebied van de validatie: Babymelkpoeder en babygranen met en zonder probiotica, ruwe grondstoffen en omgevingsmonsters.

Voorbereiding van het monster: Monsters moeten worden voorbereid conform EN ISO 22694[(2)] en EN ISO 6887[(7, 8)].

Softwareversie: Zie certificaat.

Tabel 4. Verrijkingsprotocollen volgens de gecertificeerde methode NF VALIDATION 3M 01/20-03/18

Monstermatrix	Verrijkings-tijd	Volume verrijkings-bouillon[1]	Verrijkings-temperatuur (± 1 °C)	Monster-grootte (uur)	Volume monster-analyse	Aanbevolen onder-brekingspunt[2, 3]
• Babymelkpoeder • Babygraanpoeder • Ingrediënten als droog melkpoeder, sojapoeder, weipoeder, lactose, rijstmeel, maltodextrine • Droge omgevingsmonsters zoals stof, veegsel, opgezogen materiaal,	10 g	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL	Verrijkingsbouillon of het lysaatmonster kunnen tot 72 uur worden bewaard tussen 2 en 8 °C
• Spons, spoelwater, doekjes	1 monster-nameapparaat of 10 mL					Verrijkingsbouillon of het lysaatmonster kunnen tot 72 uur worden bewaard tussen 2 en 8 °C
Babymelkpoeder en babygraanpoeder (niet-probiotisch)	30-300 g	BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL	Verrijkingsbouillon of het lysaatmonster kunnen tot 72 uur worden bewaard tussen 2 en 8 °C
Babygraanpoeder en babymelkpoeder (inclusief probiotica)	30-300 g	BPW (ISO) + 10 mg/l vancomycine (1:10)	37	22-24	20 µL	Geen

1. Gebruik voorverwarmde BPW (ISO) als het volume van de verrijkingsbouillon meer dan 300 ml bedraagt (bijv. het monster is > 30 gram).
2. Nadat de verrijkingsbouillon uit de opslag is gehaald, kan het testen verdergaan vanaf Stap 1 in het lysehoofdstuk. Nadat het lysaatmonster uit de opslag is gehaald, kan het testen verdergaan vanaf Stap 7 in het lysehoofdstuk.
3. Raadpleeg bijlage A voor het opnieuw testen van opgeslagen warmtebehandelde lysaten.

Voorbereiding van de Neogen® Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray

1. Maak een doek of wegwerpdoek vochtig met een bleekmiddeloplossing van 1-5% (volumeconcentratie in water) en reinig de Neogen Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray.
2. Spoel de Neogen Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray met water.
3. Gebruik een wegwerpdoekje om de Neogen Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray af te vegen.
4. Zorg ervoor dat de Neogen Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray droog is voordat u hem gebruikt.

Voorbereiding van het Neogen® Moleculaire Detectie - Koelblokinzetstuk

Plaats het Neogen Moleculaire Detectie - Koelblokinzetstuk rechtstreeks op de laboratoriumtafel: de Neogen Moleculaire Detectie - Lade voor koelblok wordt niet gebruikt. Gebruik het koelblok op de omgevingstemperatuur van het laboratorium (20-25 °C).

Voorbereiding van het Neogen® Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk

Plaats het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk in een droge dubbelblokverhitter. Schakel de droge blokverhitter in en stel de temperatuur in zodat het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk 100 ± 1 °C kan bereiken en behouden.

OPMERKING: afhankelijk van de verhitter laat u het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk ongeveer 30 minuten op temperatuur komen. Gebruik een geschikte, gekalibreerde thermometer (bijv. gedeeltelijke dompelthermometer of digitale thermokoppelthermometer, geen volledige dompelthermometer) geplaatst op de aangewezen locatie om te controleren of het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk zich op 100 ± 1 °C bevindt.

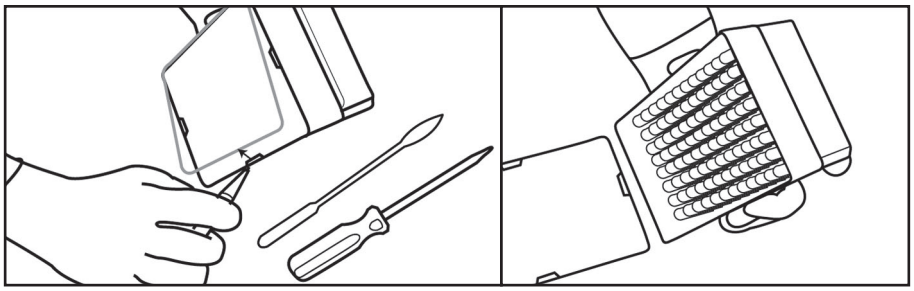
Voorbereiding van het Neogen® Moleculair Detectieinstrument

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

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

Lyse

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



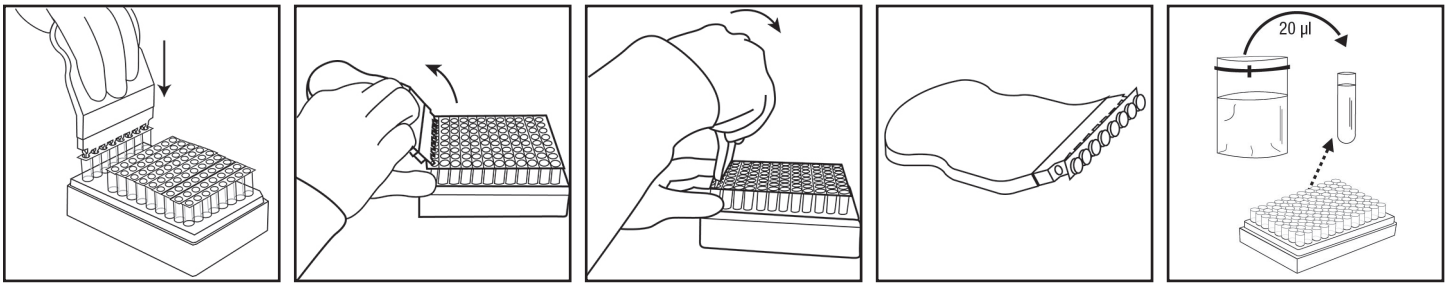
1. Laat de Neogen buisjes met lyse-oplossing opwarmen door het rek een nacht lang (16-18 uur) op omgevingstemperatuur (20-25 °C) te plaatsen. U kunt de Neogen buisjes met lyse-oplossing eveneens op omgevingstemperatuur brengen door de buisjes ten minste 2 uur lang op de laboratoriumtafel te plaatsen, de buisjes 1 uur lang te incuberen in een incubator bij 37 ± 1 °C of ze 30 seconden lang in een droge dubbelblokverhitter op 100 ± 1 °C te plaatsen.
2. Keer de buisjes met dop om om ze te mengen. Ga binnen 4 uur na het omkeren verder met de volgende stap.
3. Haal de verrijkingsbouillon uit de incubator.
4. Er is een Neogen buisje met lyse-oplossing vereist voor elk monster, evenals het NC-monster (steriel verrijkingsmedium).
   - 4.1 Stroken met Neogen buisjes met lyse-oplossing kunnen worden afgesneden tot op het gewenste aantal buisjes. Selecteer het aantal individuele Neogen buisjes met lyse-oplossing of 8-buis stroken, indien nodig. Plaats de Neogen buisjes met lyse-oplossing in een leeg rek.
   - 4.2 Haal de stroken van de Neogen buisjes met lyse-oplossing een voor een uit de verpakking en gebruik een nieuwe pipettip voor elke overdrachtstap om zo kruisbesmetting te voorkomen.
   - 4.3 Breng het verrijkte monster over in de Neogen buisjes met lyse-oplossing zoals hieronder beschreven:

     Breng **eerst** ieder verrijkt monster over in een individueel Neogen buisje met lyse-oplossing. Breng de NC het **laatst** over.

   - 4.4 Gebruik het Neogen® Moleculaire Detectie Cap/Decap gereedschap - Lyse (glossary) om een strook van een Neogen buisje met lyse-oplossing open te doen - één strook per keer.
   - 4.5 Gooi de dop van het Neogen buisje met lyse-oplossing weg - als er lysaat wordt bewaard voor een hertest, plaats de doppen dan in een schone bak om ze na de lyse opnieuw aan te brengen.
     - 4.5.1. Zie Appendix A voor de verwerking van bewaard lysaat.
   - 4.6 Roer de inhoud van de verrijkingszak voordat u een monster van de gefilterde zijde neemt, bij het werken met viskeuze monsters.

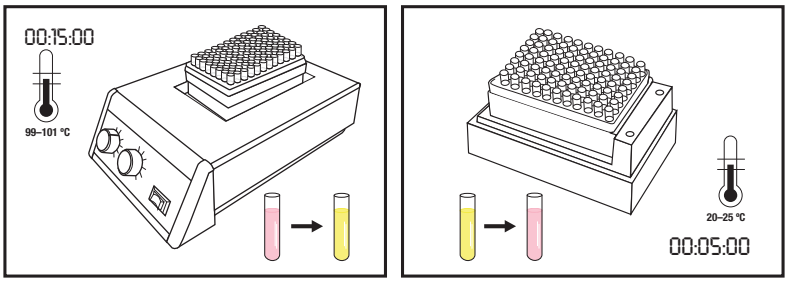
4.7 Breng 20 µl monster over in een Neogen buisje met lyse-oplossing, tenzij dit anders in de protocoltabel wordt aangegeven.

5. Herhaal stap 4.4 t/m 4.7 totdat elk individueel monster is toegevoegd aan een bijhorende Neogen buisje met lyse-oplossing in de strook.



6. Wanneer alle monsters overgebracht zijn, brengt u 20 µL NC (steriel verrijkingsmedium, bijv. BPW) over in een Neogen buisje met lyse-oplossing. Gebruik geen water als NC.
7. Controleer of de temperatuur van het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk zich op 100 ± 1 °C bevindt.
8. Plaats het onbedekte rek met Neogen buisjes met lyse-oplossing in het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk en verwarm 15 ± 1 minuten. Tijdens de verwarming verandert de Neogen lyse-oplossing van roze (koel) naar geel (heet).

   Monsters die tijdens de lyseanalysestap niet de correcte warmtebehandeling hebben ondergaan, kunnen als een potentieel biologisch gevaar worden beschouwd en mogen NIET in het Neogen Moleculaire Detectieinstrument worden geplaatst.
9. Haal het onbedekte rek met Neogen buisjes met lyse-oplossing uit het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblok en laat het ten minste 5 minuten en niet meer dan 10 minuten afkoelen in het Neogen Moleculaire Detectie - Koelblokinzetstuk. Het Neogen Moleculaire Detectie - Koelblokinzetstuk, gebruikt op omgevingstemperatuur zonder de Neogen® Moleculaire Detectie - Lade voor Koelblok, moet rechtstreeks op de laboratoriumtafel leunen. Zodra de Neogen lyse-oplossing koel is, zal deze een roze kleur krijgen.
10. Haal het rek met Neogen buisjes met lyse-oplossing uit het Neogen Moleculaire Detectie - Koelblokinzetstuk.



Amplificatie

1. Er is één Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* reagensbuisje vereist voor elk monster en de NC.

   1.1 Buisstrookjes kunnen gesneden worden tot op het gewenste aantal buisjes. Selecteer het vereiste aantal individuele Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* reagensbuisjes of stroken met 8-buisjes.

   1.2 Plaats Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* reagensbuisjes in een leeg rek.

   1.3 Vermijd dat u de reagens op de bodem van de buisjes beweegt.
2. Selecteer één buisje voor Neogen Reagenscontrole en plaats deze in het rek.
3. Om kruisbesmetting te vermijden, opent u één strook met Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* reagensbuisjes per keer en gebruikt u een nieuwe pipettip voor elke overdrachtsstap.
4. Breng elk lysaat over in een Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* reagensbuisje en een Neogen Reagenscontrolebuisje zoals hieronder is beschreven:

Breng elk lysaatmonster *eerst* over naar een individueel Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - **Cronobacter** reagensbuisje, gevolgd door de NC. Hydrateer het buisje voor Neogen Reagenscontrole **als laatste**.

5. Gebruik de Neogen® Moleculaire Detectie Cap/Decap gereedschap - Reagens om het Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* reagensbuisje te openen - één strook met reagensbuisjes per keer. Gooi de dop weg.

   5.1 **Breng 20 µl van het lysaatmonster uit de bovenste helft van de vloeistof (voorkom bezinksel) in het Neogen buisje met lyse-oplossing over in het bijbehorende Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* reagensbuisje. Laat het mengsel in een hoek uitlopen om de pellets niet te veel te bewegen. Meng door voorzichtig 5 keer naar boven en naar onder te pipetteren.**

   5.2 Herhaal stap 5.1 totdat elk individueel lysaatmonster is toegevoegd aan het bijbehorende Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* reagensbuisje in de strook.

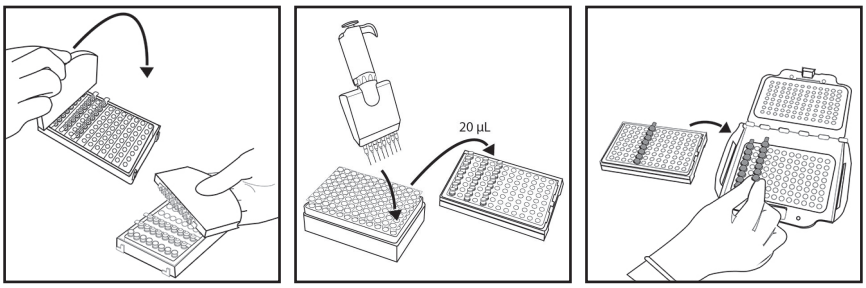
   5.3 Bedek de Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* reagensbuisjes met de bijgeleverde extra dop en gebruik de afgeronde zijde van het Neogen Moleculaire Detectie Cap/Decap gereedschap - Reagens om druk uit te oefenen in een voor- en achterwaartse beweging om ervoor te zorgen dat de dop goed vastzit.

   5.4 Herhaal stappen 5.1 tot 5.3 voor alle monsters die worden getest.

   5.5 Zodra alle lysaatmonsters zijn overgebracht, herhaalt u stappen 5.1 t/m 5.3 om 20 µl NC-lysaat over te brengen naar een Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* reagensbuisje.

   5.6 Breng **20 µL <u>NC-lysaat</u> over naar een buisje voor Neogen Reagenscontrole.** Laat het mengsel in een hoek uitlopen om de pellets niet te veel te bewegen. Meng door voorzichtig 5 keer naar boven en naar onder te pipetteren.

6. Plaats de buisjes met dop in een propere en ontsmette Neogen Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray. Sluit en vergrendel het deksel van de Neogen Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray.



7. Reviseer en bevestig de geconfigureerde instelling en start de Neogen Moleculaire Detectiesoftware.
8. Klik op de Startknop van de software en selecteer het te gebruiken instrument. Het deksel van het geselecteerde instrument opent automatisch.
9. Plaats de Neogen Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray in het Neogen Moleculaire Detectieinstrument en sluit het deksel om de analyse te beginnen. De resultaten zijn binnen 60 minuten beschikbaar, maar positieve resultaten kunnen sneller gedetecteerd worden.
10. Als de test voltooid is, haal dan de Neogen Moleculaire Detectie - Speed Loader Tray uit het Neogen Moleculaire Detectieinstrument en verwijder de buisjes door ze eerst gedurende 1 uur, op een plaats die ver verwijderd is van het testgebied, in een bleekmiddeloplossing van 1-5% (volumeconcentratie in water) te dompelen.

OPMERKING: Om het risico op valse positieve resultaten door kruisbesmetting te beperken, mag u nooit reagensbuisjes met geamplificeerd DNA openen. Dit geldt voor Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* reagensbuisjes, buisjes voor Neogen Reagenscontrole en Neogen Matrix controlebuisjes. Gooi verzegelde reagensbuisjes weg door ze eerst gedurende 1 uur, op een plaats die ver verwijderd is van het testgebied, in een bleekmiddeloplossing van 1-5% (volumeconcentratie in water) te dompelen.

Resultaten en interpretatie

Een algoritme interpreteert de lichtcurve die het resultaat is van de nucleïnezuuramplificatie. De software analyseert de resultaten automatisch en worden aangegeven met een kleurencode, afhankelijk van het resultaat. Een positief of negatief resultaat wordt bepaald door de analyse van een aantal unieke curveparameters. Vermoedelijke positieve resultaten worden onmiddellijk gerapporteerd, terwijl de negatieve en inspectieresultaten pas na de voltooiing van de analyse worden weergegeven.

OPMERKING: Zelfs een negatief monster zal u geen nulresultaat geven, want het systeem en de Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter* amplificatiereagentia hebben een 'achtergrond' van relatieve lichteenheid (RLU).

Bevestiging

- Verificatie van resultaten conform de gecertificeerde methode NF Validation

In het kader van de NF Validation moeten alle vermoedelijk positieve verrijkingen worden geverifieerd met de volgende referentiemethodeverificatie[(2)], te beginnen met de overdracht van de primaire verrijking (BPW ISO of BPW ISO aangevuld met 10 mg/l vancomycine).

- Ander verificatieprotocol

Vermoedelijk positieve verrijkingen moeten worden geverifieerd conform de standaard werkmethode van het laboratorium, door de toepasselijke referentiemethodeverificatie[(1,2)] te volgen, te beginnen met de overdracht van de primaire verrijking (BPW ISO of BPW ISO aangevuld met 10 mg/l vancomycine) naar een secundair verrijkingsmedium, gevolgd door een lagenkweek en verificatie van isolaten met gebruik van toepasselijke biochemische, serologische en/of moleculaire methoden.

In het onwaarschijnlijke geval van ongebruikelijke lichtuitvoer, definieert het algoritme dit als 'Inspecteren'. Neogen beveelt de gebruiker aan om de test voor de te inspecteren monsters opnieuw uit te voeren. Als het resultaat nog steeds 'Inspecteren' is, voert u een bevestigingstest uit aan de hand van uw voorkeursmethode of volgens de plaatselijke regelgeving[(1,2)].

In geval van tegenstrijdige resultaten (vermoedelijke positieve resultaten met de Neogen Moleculair Detectie Assay 2 - *Cronobacter*, niet geverifieerd met één van de hierboven beschreven methoden), moet het laboratorium zijn eigen ingestelde standaard werkmethoden volgen om de resultaten te rapporteren.

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

Appendix A. Protocolonderbreking: het bewaren en hertesten van warmtebehandelde lysaten

1. Om een warmtebehandeld lysaat te bewaren, sluit u het lysebuisje opnieuw af met een schone dop (zie hoofdstuk 4.5 **Lyse**)
2. Bewaar maximaal 72 uur bij 2 tot 8 °C.
3. Bereid een bewaard monster voor op de amplificatie door het 2-3 keer om te draaien om het te mengen.
4. Haal de doppen van de buisjes.
5. Plaats de gemengde lysaatbuisjes op het Neogen Moleculaire Detectie - Verwarmingsblokinzetstuk en verwarm gedurende 5 ± 1 minuten op 100 ± 1 °C.
6. Haal het rek met Neogen buisjes met lyse-oplossing uit het verwarmingsblok en laat het ten minste 5 minuten en niet meer dan 10 minuten afkoelen in het Neogen Moleculaire Detectie - Koelblokinzetstuk.
7. Ga verder met het protocol in het gedeelte **Amplificatie** dat hierboven wordt omschreven.

Referenties:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
8. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

Raadpleeg de huidige versies van de standaardmethodes die hierboven zijn opgesomd.

Verklaring van symbolen

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

NEOGEN®

Produktinformation

Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter*

Produktbeskrivning och avsedd användning

Neogen® Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* används med Neogen® Molekylärt Detektionssystem för snabb och specifik detektion av *Cronobacter* i prover från anrikade livsmedel och livsmedelsbearbetningsmiljöer.

Neogen Molecular Detection Assay använder LAMP-teknik (Loop-Mediated Isothermal Amplification) för att snabbt amplifiera nukleinsyrasekvenser med hög specificitet och sensitivitet kombinerat med bioluminiscens för att detektera amplifieringen. Presumtivt positiva resultat rapporteras i realtid medan negativa resultat visas när analysen har slutförts. Presumtivt positiva resultat bör bekräftas med hjälp av egen vald metod eller som specificeras av lokala föreskrifter[1, 2].

Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* är avsedd för användning i laboratoriemiljö av yrkespersoner som har utbildning i laboratorieteknik. Neogen har inte dokumenterat användningen av denna produkt inom andra industrier än livsmedels- och dryckesindustrin. Neogen har exempelvis inte dokumenterat produkten för testning av läkemedel, kosmetika, kliniska prover eller veterinärprover. Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* har inte utvärderats med samtliga möjliga livsmedelsprodukter, livsmedelsbearbetningsmetoder, testprotokoll eller bakteriestammar.

Precis som för alla testmetoder kan källan till, beredningen av och kvaliteten på anrikningsmedlet påverka resultaten. Faktorer som provtagningsmetod, testprotokoll, provpreparering inklusive homogenisering och blandning, hantering och laboratorieteknik kan också påverka resultat. Neogen rekommenderar att metoden, inklusive anrikningsmedlet, utvärderas i användarens miljö med tillräckligt många prover av särskilda livsmedel och/eller miljöprover samt mikrobiella utmaningar för att säkerställa att metoden uppfyller användarens kriterier.

Neogen har utvärderat Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* med anrikningsmedlet buffrat peptonvatten ISO.

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

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

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

Tabell 1. Komponenter i Neogen Molecular Detection Assay Testsats

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

Det negativa kontrollprovet (medföljer ej i satsen) är ett sterilt anrikningsmedel, t. ex. buffrat peptonvatten ISO. Använd inte vatten som negativ kontroll.

Säkerhet

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

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

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

⚠ VARNING

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

Användaren måste utbilda sin personal i rådande och korrekta testtekniker: exempelvis god laboratoriesed[3], ISO/IEC 17025[4] eller ISO 7218[5].

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

- Följ protokollet och utför testerna exakt så som beskrivs i relevant produktinformation.
- Förvara Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* enligt föreskrifterna på förpackningen och i produktinformationen.
- Använd alltid Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* före utgångsdatumet.
- Använd Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* med prover från livsmedel och livsmedelsbearbetningsmiljöer som har validerats internt eller av tredje part.
- Använd endast Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* med ytor, desinficeringsmedel, protokoll och bakteriestammar som har validerats internt eller av tredje part.
- För miljöprov innehållande neutraliseringsbuffert med arylsulfonatkomplex, späd till 1:2 innan testet utförs (1 del prov till 1 del steril anrikningsbuljong). Ett annat alternativ är att föra över 10 µL av neutraliserande buffertanrikning i Neogen Lyseringslösningsrör. Neogen® provhanteringsprodukter som inkluderar neutraliseringsbuffert med arylsulfonatkomplex: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G och HS2410NB2G. Detta protokoll har inte testats under NF Validation-studien.

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

- Utför tester av patogener i ett välutrustat laboratorium under överinseende av utbildad personal. Inkuberat anrikningsmedel och utrustning eller ytor som har haft kontakt med inkuberat anrikningsmedel kan innehålla patogener vid nivåer som är tillräckliga för att utgöra en hälsorisk för människor.
- Följ alltid praxis för standardiserad laboratoriesäkerhet, inklusive användning av lämpliga skyddskläder och skyddsglasögon vid hantering av reagenser och kontaminerade prover.
- Undvik kontakt med innehållet i anrikningsmedlet och reagensrören efter amplifiering.
- Kassera anrikade prover och tillhörande kontaminerat avfall enligt gällande lokala/regionala/nationella/branschstandarder.
- Överskrid inte rekommenderad temperaturinställning på uppvärmningsanordningen.
- Överskrid inte den rekommenderade uppvärmningstiden.
- Använd en lämplig, kalibrerad termometer (t.ex. en termometer för delvis nedsänkning eller en digital värmeelementstermometer, inte en termometer för fullständig nedsänkning) för att kontrollera temperaturen i Neogen® Molekylär Detektion, Insats för Värmeblock. Termometern måste placeras på anvisad plats i Neogen Molekylär Detektion, Insats för Värmeblock.

För att minska riskerna för korskontaminering vid analysförberedelserna:

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

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

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

OBSERVERA

För att minska riskerna för korskontaminering vid analysförberedelserna:

- Byt handskar innan reagenspelletsarna vätes.
- Användning av sterila pipettspetsar med aerosolbarriär (filtrerade) för molekylärbiologiskt bruk rekommenderas.

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

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

- Öppna aldrig provrör efter amplifieringen.
- Kassera alltid kontaminerade rör genom att blötlägga dem i en 1–5 % (volym i vatten) blekmedelslösning i 1 timme och på avstånd från platsen där analysen förbereds.
- Autoklavera aldrig reagensrör efter amplifieringen.
- Om prover misstänks innehålla stora mängder *Cronobacter*-DNA (t.ex. DNA från icke-livsdugliga *Cronobacter*-celler som har genomgått ett döda-/inaktiverasteg) ska presumtiva positiva anrikningar behandlas med DNase före **LYSERINGS**-steget. Kontakta din Neogen-representant för ytterligare anvisningar. Detta protokoll har inte testats under NF Validation-studien.

Se säkerhetsdatabladet för ytterligare information och lokala föreskrifter för kassering.

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

Användaransvar

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

Vid val av testmetod är det viktigt att inse att externa faktorer som provtagningsmetod, testprotokoll, provpreparering inklusive homogenisering och blandning, hantering och laboratorieteknik kan påverka resultat.

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

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

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

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

En matris kan definieras som en typ av produkt med särskilda egenskaper, såsom sammansättning eller bearbetning. Skillnaderna mellan matriser kan vara så enkla som effekterna som orsakas av skillnader i bearbetning eller utformning, till exempel rå kontra pastöriserad, färsk kontra torkad, o.s.v.

Begränsad garanti / Begränsad ersättning

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

Neogen:s ansvarsfriskrivning

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

Förvaring och kassering

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

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

Bruksanvisning

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

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

Användaren måste genomgå utbildningen i driftkvalifikation för Neogen Molekylärt Detektionssystem, enligt beskrivningen i dokumentet ”Protokoll för installationskvalifikation/driftkvalifikation och anvisningar för Neogen Molekylärt Detektionssystem” (Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System)[6].

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

Tabell 3 för anrikningsprotokoll enligt AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2018.01 och *Performance Tested*℠ Certificate number 101703

Tabell 4 för anrikningsprotokoll enligt NF VALIDATION-certifikatet 3M 01/20-03/18.

Provanrikning

I tabell 2, 3 eller 4 visas en vägledning till anrikningsprotokoll för livsmedels- och miljöprover.

Användaren ansvarar för att validera alternativa provtagnings- eller anrikningsprotokoll eller spädningsförhållanden för att säkerställa att testmetoden uppfyller användarens kriterier.

Livsmedel, miljöstoft, damm, sopningar och svampar

1. Värm anrikningsmedlet till rumstemperatur (20-25 °C) såvida inget annat anges i anrikningsprotokollet (se tabell 2, 3 eller 4).
2. Kombinera berikningsmediet och provet aseptiskt och homogenisera noggrant genom att blanda, stomachera, vortexa eller handblanda i 2 ± 0,2 minuter **eller tills alla klumpar är helt upplösta och berikningssuspensionen är homogen**[7, 8].
    a. Faktorer som provpreparering inklusive homogenisering och blandning, hantering och laboratorieteknik kan påverka resultat.
    b. För prover som innehåller en stor mängd partiklar rekommenderas att filterpåsar används.
    c. För matriser som sväller i vatten och är mycket viskösa (t.ex. spannmål, stärkelse), rekommenderas det att göra ytterligare spädningar (> 1:10) tills viskositeten reduceras till lämplig nivå eller att tillsätta sterilt 1 % (w/v) alfa-amylas till buffrat peptonvatten (ISO)[8].
    d. För stora provstorlekar av spannmål tillsätter du pulveriserat spannmål långsamt till vätskan med frekvent blandning för att undvika klumpar.
3. Inkubera enligt anvisning i lämplig protokolltabell (se tabell 2, 3 eller 4).

Tabell 2. Allmänna anrikningsprotokoll

Provmatris	Provstorlek[1]	Volym anrikningsbuljong[1, 2]	Anrikningstemperatur (± 1 °C)	Anrikningstid (tim)	Volym för provanalys
Modersmjölksersättning i pulverform och råvaror såsom mjölkpulver, sojapulver, vasslepulver, laktos, rismjöl och maltodextrin	1 x gram prov	9 x ml Buffrat peptonvatten (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl
Råvaror som salter, mineraler, aminosyror, DHA (docosahexaensyra) och vitaminer	1 x gram prov	99 x ml Buffrat peptonvatten (ISO) (1:100)	37	18–24	20 µl
Torra miljöprover som damm, sopningar, dammsugningsinsamling	1 x gram prov	9 x ml Buffrat peptonvatten (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl
Miljösvamp med 10 ml Letheen-buljong eller D/E-neutraliseringsbuljong	1 provtagningsenhet	90 ml Buffrat peptonvatten (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl

1. Neogen har utvärderat Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* med spädningsförhållandena i tabell 2, upp till 300 g. Användaren ansvarar för att validera alternativa spädningsförhållanden eller protokoll för att säkerställa att metoden uppfyller användarens kriterier.
2. Använd **föruppvärmt** buffrat peptonvatten ISO om anrikningsbuljongvolymen är > 300 ml (t.ex. provet är > 30 gram).

Specifika anvisningar för validerade metoder

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

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

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

I AOAC Research Institute OMA℠ och PTM℠-programmen var Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* en effektiv metod för att upptäcka *Cronobacter.* Matriserna som testades i studien visas i tabell 3.

Tabell 3. Anrikningsprotokoll enligt AOAC® *OMA*[SM] 2018.01 och *PTM*[SM] 101703

Provmatris	Provstorlek	Volym anrikningsbuljong[1]	Anrikningstemperatur (± 1 °C)	Anrikningstid (tim)	Volym för provanalys
Modersmjölksersättning i pulverform och pulveriserade spannmålsprodukter för spädbarn	10 g	90 ml Buffrat peptonvatten (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl
Pulveriserade spannmålsprodukter för spädbarn icke-probiotiska	300 g	2 700 ml Buffrat peptonvatten (ISO) (1:10)	Förvärmt 37	18–24	20 µl
Modersmjölksersättning i pulverform och pulveriserade spannmålsprodukter för spädbarn med probiotika	300 g	2 700 ml Buffrat peptonvatten (ISO) + 10 mg/l Vancomycin	Förvärmt 37	22-24	20 µl
Laktos	10 g	90 ml Buffrat peptonvatten (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl
Miljösvamp med 10 ml D/E-neutraliseringsbuljong	1 provtagningsenhet	90 ml Buffrat peptonvatten (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl

1. Använd **föruppvärmt** buffrat peptonvatten ISO om anrikningsbuljongvolymen är > 300 ml.

NF VALIDATION av AFNOR Certification

3M 01/20-03/18
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

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

NF Validation-certifierad metod i enlighet med ISO 16140-2[(9)] i jämförelse med ISO 22964.

Omfattning av valideringen: Modersmjölksersättning i pulverform och pulveriserade spannmålsprodukter för spädbarn med och utan probiotika, råvaror och miljöprover.

Provberedning: Prover bör beredas enligt EN ISO 22694[(2)] och EN ISO 6887[(7, 8)].

Mjukvaruversion: Se certifikatet.

Tabell 4: Anrikningsprotokoll enligt NF VALIDATION-certifierad metod 3M 01/20-03/18

Provmatris	Provstorlek	Volym anrikningsbuljong[1]	Anrikningstemperatur (± 1 °C)	Anrikningstid (timmar)	Volym för provanalys	Rekommenderad brytpunkt[2, 3]
• Modersmjölksersättning i pulverform • Pulveriserade spannmålsprodukter för spädbarn • Ingredienser såsom mjölkpulver, sojapulver, vasslepulver, laktos, rismjöl, maltodextrin • Torra miljöprover som damm, sopningar, dammsugningsinsamling,	10 g	90 ml Buffrat peptonvatten (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl	Anrikningsbuljong eller provlysat kan förvaras i 2–8 °C i upp till 72 timmar
• Svamp, sköljvatten, torkdukar	1 provtagningsenhet eller 10 ml					Anrikningsbuljong eller provlysat kan förvaras i 2–8 °C i upp till 72 timmar
Modersmjölksersättning i pulverform och pulveriserade spannmålsprodukter för spädbarn (icke-probiotiska)	30-300 g	Buffrat peptonvatten (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl	Anrikningsbuljong eller provlysat kan förvaras i 2–8 °C i upp till 72 timmar
Pulveriserade spannmålsprodukter för spädbarn och modersmjölksersättning i pulverform (med probiotika)	30-300 g	Buffrat peptonvatten (ISO) + 10 mg/l vancomycin (1:10)	37	22-24	20 µl	Ingen

1. Använd föruppvärmt buffrat peptonvatten ISO om anrikningsbuljongvolymen är > 300 ml (t.ex. provet är > 30 gram).
2. Efter det att anrikningsbuljongen har avlägsnats från förvaringsplatsen kan testet återupptas från steg 1 i avsnittet Lysering. Efter att provlysatet har avlägsnats från förvaringsplatsen kan testet återupptas från steg 7 i avsnittet Lysering.
3. Se Bilaga A för omtestning av lagrade värmebehandlade lysater.

Förberedelse av Neogen® Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda

1. Fukta en trasa eller en engångshandduk med 1–5 % (volym i vatten) blekmedelslösning för hushållsanvändning och torka av Neogen Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda.
2. Skölj Neogen Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda med vatten.
3. Torka av Neogen Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda med en pappershandduk.
4. Säkerställ att Neogen Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda är torr innan den används.

Förberedning av Neogen® Molekylär Detektion, Insats för Kylblock

Placera Neogen Molekylär Detektion, Insats för Kylblock direkt på laboratoriebänken: Neogen Molekylär Detektion, Kylblockslåda används inte. Använd blocket i laboratoriets omgivningstemperatur (20–25 °C).

Förberedelse av Neogen® Molekylär Detektion, Insats för Värmeblock

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

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

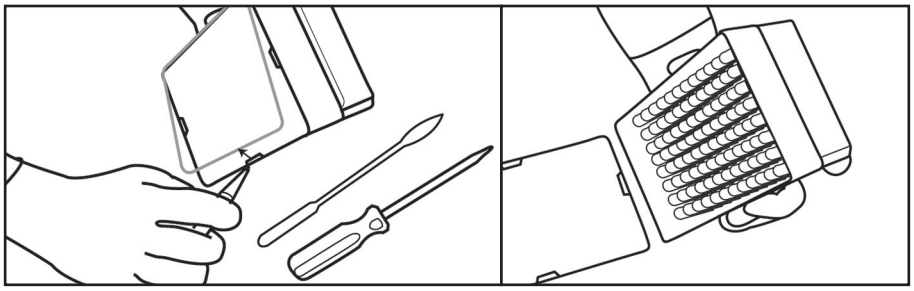
Beredning av Neogen® Molekylärt Detektionsinstrument

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

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

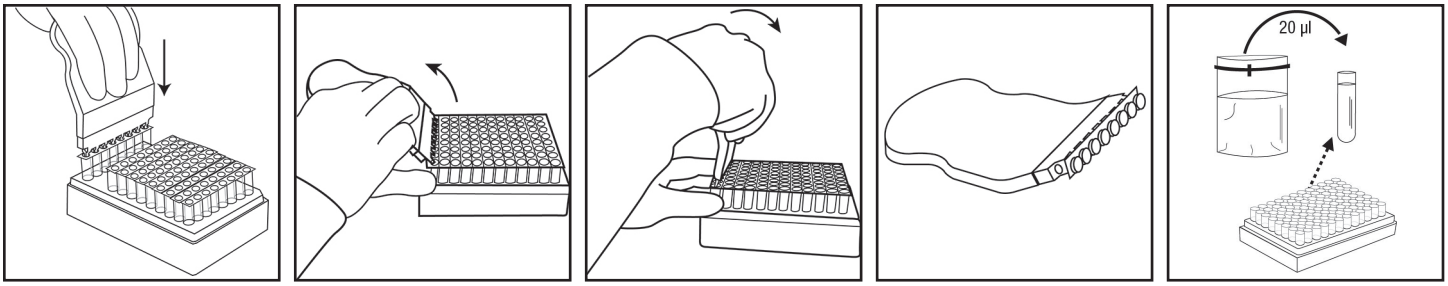
Lysering

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



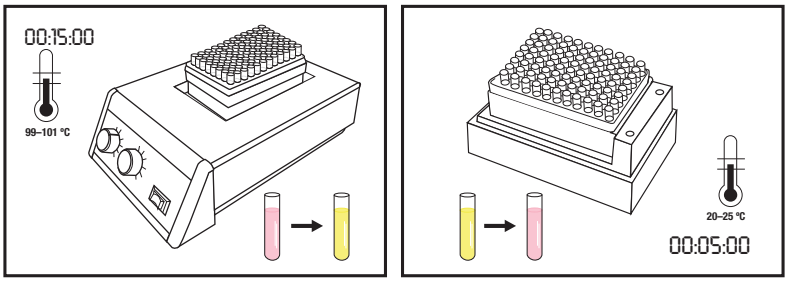
1. Låt Neogen Lyseringslösningsrör värmas upp genom att placera stället i rumstemperatur (20–25 °C) över natten (16-18 timmar). Alternativa metoder för att värma Neogen Lyseringslösningsrören till rumstemperatur är att ställa Neogen Lyseringslösningsrören på laboratoriebänken i minst 2 timmar, inkubera Neogen Lyseringslösningsrören vid 37 ± 1 °C i 1 timme eller placera dem i en torr dubbelblockvärmare i 30 sekunder vid 100 ± 1 °C.
2. Invertera de lockförsedda rören för att blanda. Fortsätt till nästa steg inom 4 timmar efter invertering.
3. Ta ut anrikningsbuljongen från inkubatorn.
4. Ett Neogen Lyseringslösningsrör krävs för varje prov och NK-prov (sterilt anrikningsmedel).
   - 4.1 Remsor med Neogen Lyseringslösningsrör kan klippas för önskat antal. Välj det antal individuella Neogen Lyseringslösningsrör eller remsor om 8 rör som behövs. Placera Neogen Lyseringslösningsrören i ett tomt ställ.
   - 4,2 Undvik korskontaminering genom att öppna ett lock på en remsa med Neogen Lyseringslösningsrör i taget och använd en ny pipettspets vid varje överföringssteg.
   - 4.3 För över det anrikade provet till Neogen Lyseringslösningsrören enligt beskrivningen nedan:

     För över varje anrikat prov till ett enskilt Neogen Lyseringslösningsrör **först.** Överför NK **sist.**
   - 4.4 Använd Neogen® Molekylär Detektion, Cap/Decap Redskap - Lysering för att öppna en remsa med Neogen Lyseringslösningsrör, en remsa i taget.
   - 4.5 Kassera locket till Neogen Lyseringslösningsröret – om lysatet ska behållas för omprov ska locken placeras i en ren behållare för återanvändning efter lysering.
     - 4.5.1. Se bilaga A för information om behandling av förvarat lysat.
   - 4.6 Agitera anrikningspåsen innan du samlar in provet från den filtrerade sidan när du arbetar med viskösa prov.
   - 4.7 Överför 20 µL prov till ett Neogen Lyseringslösningsrör såvida inte annat anges i protokolltabellen.
5. Upprepa steg 4.4 till 4.7 tills varje enskilt prov har tillsatts i ett motsvarande Neogen Lyseringslösningsrör i remsan.



6. När alla prover har överförts ska 20 µL NK (sterilt anrikningsmedel, t.ex. buffrat peptonvatten) överföras till ett Neogen Lyseringslösningsrör. Använd inte vatten som NK.
7. Kontrollera att temperaturen på Neogen Molekylär Detektion, Insats för Värmeblock är 100 ± 1 °C.
8. Placera det oövertäckta stället med Neogen Lyseringslösningsrör i Neogen Molekylär Detektion, Insats för Värmeblock och värm i 15 ± 1 minuter. Under uppvärmningen kommer Neogen Lyseringslösningen att ändra färg från rosa (kall) till gul (varm).

   Prover som inte har värmebehandlats korrekt under analysens lyseringssteg bör betraktas som en potentiell biologisk fara och ska INTE föras in i Neogen Molekylärt Detektionsinstrument.
9. Ta ut det oövertäckta stället med Neogen Lyseringslösningsrör från Neogen Molekylär Detektion, Värmeblock och låt det svalna i Neogen Molekylär Detektion, Insats för Kylblock under minst 5 minuter men högst 10 minuter. Neogen Molekylär Detektion, Insats för Kylblock som används vid omgivningstemperatur utan Neogen® Molekylär Detektion, Kylblockslåda ska placeras direkt på laboratoriebänken. När Neogen Lyseringslösningen svalnar återgår dess färg till rosa.
10. Ta ut stället med Neogen Lyseringslösningsrör från Neogen Molekylär Detektion, Insats för Kylblock.



Amplifiering

1. Ett Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* Reagensrör krävs för varje prov och för NK-provet.

   1.1 Remsorna med rör kan klippas till önskat antal rör. Välj antalet enskilda Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* reagensrör eller remsor om 8 rör som behövs.

   1.2 Placera Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* Reagensrör i ett tomt ställ.

   1.3 Undvik att röra upp reagenspelletsarna i provrörens botten.
2. Välj ett rör för Neogen Reagenskontroll och placera det i stället.
3. Undvik korskontaminering genom att öppna ett lock på en remsa med Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* reagensrör i taget och använd en ny pipettspets vid varje överföringssteg.
4. För över varje lysat till ett Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* reagensrör och ett rör för Neogen Reagenskontroll enligt beskrivningen nedan:

Överför varje provlysat till enskilda Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* reagensrör **först** , följt av NK. Hydrera rör för Neogen Reagenskontroll **sist**.
5. Använd Neogen® Molekylär Detektion, Cap/Decap Redskap - Reagens för att öppna Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* Reagensröret – en remsa reagensrör i taget. Kassera locket.

   5.1 **För över 20 µL av provlysat från den övre 1/2 av vätskan (undvik utfällning) i Neogen Lyseringslösningsröret till motsvarande Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* reagensrör. Dispensera i en vinkel för att undvika att pelletsarna rörs upp. Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger.**

5.2 Upprepa steg 5.1 tills enskilda provlysat har lagts till i ett motsvarande Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* Reagensrör i remsan.

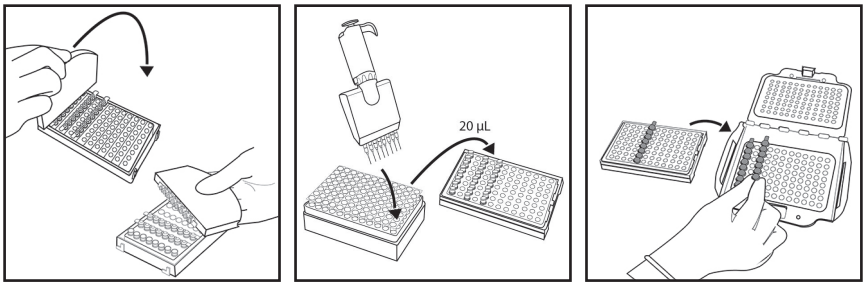
5.3 Täck Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* reagensrör med medföljande extralock och använd den rundade sidan av Neogen Molekylär Detektion, Cap/Decap Redskap - Reagens och pressa fram och tillbaka för att stänga locket ordentligt.

5.4 Upprepa efter behov steg 5.1 till 5.3 för det antal prover som ska testas.

5.5 När alla provlysat har överförts upprepar du 5.1 till 5.3 för att föra över 20 µL NK-lysat i ett Neogen Molecular Detection Assay 2 - *Cronobacter* reagensrör.

5.6 För över **20 µL av NK-lysat i ett rör för Neogen Reagenskontroll**. Dispensera i en vinkel för att undvika att pelletsarna rörs upp. Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger.

6. Ladda de förslutna provrören i en ren och dekontaminerad Neogen Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda. Stäng och lås locket på Neogen Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda.



7. Granska och bekräfta den konfigurerade körningen i Neogen Molekylär detektionsprogramvara.
8. Klicka på startknappen i programmet och välj vilket instrument som ska användas. Det valda instrumentets lock öppnas automatiskt.
9. Placera Neogen Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda i Neogen Molekylärt Detektionsinstrument och stäng locket för att starta analysen. Resultaten ges inom 60 minuter, men positiva resultat kan detekteras tidigare.
10. Ta ut Neogen Molekylär Detektion, Snabbladdningslåda från Neogen Molekylärt Detektionsinstrument när analysen har slutförts och kassera rören genom att blötlägga dem i en 1–5 % (volym i vatten) blekmedelslösning för hushållsanvändning i 1 timme på avstånd från analysberedningsområdet.

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

Resultat och Tolkning

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

OBS! Inte ens ett negativt prov kommer att ge ett nollresultat eftersom systemet och amplifieringsreagenserna i Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter* innehar en tidigare RLU-avläsning (avläsning i enheten ”relative light unit”).

Bekräftelse

- Bekräftelse av resultat enligt NF Validation-certifierad metod

I samband med NF VALIDATION bör alla presumtiva positiva anrikningar bekräftas genom att följa lämplig referensmetodbekräftelse[2], med början vid överföringen från den primära anrikningen (Buffrat peptonvatten ISO eller Buffrat peptonvatten ISO kompletterat med 10 mg/l vankomycin).

- Andra bekräftelseprotokoll

Presumtiva positiva anrikningar bör bekräftas enligt laboratoriets standardiserade rutiner eller genom att följa lämplig referensmetodbekräftelse[1, 2], med början vid överföringen från den primära anrikningen (Buffrat peptonvatten ISO eller Buffrat peptonvatten ISO kompletterat med 10 mg/l vankomycin) till det sekundära anrikningsmedel, åtföljt av uppläggning och bekräftelse av isolater med hjälp av lämpliga biokemiska, serologiska och/eller molekylära metoder.

Skulle ovanlig ljusutstrålning förekomma, vilket är sällsynt, märker algoritmen detta med Inspektera. Neogen rekommenderar att användaren upprepar analysen av prover som resulterar i Inspektera. Om resultatet fortsätter att vara Inspektera ska du gå vidare till testbekräftelse med den metod du föredrar eller så som anges i lokala föreskrifter[1,2].

I fall av icke överensstämmande resultat (presumtivt positiva med Neogen Molecular Detection Assay 2 – *Cronobacter*, ej bekräftat med någon av de beskrivna metoderna ovan) bör laboratoriet följa sina etablerade standardiserade rutiner för att rapportera sina resultat.

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

Bilaga A. Protokollavbrott: Förvaring och omprovning av värmebehandlade lysater

1. Återförslut lyseringsprovröret med ett rent lock (se avsnittet **Lysering**, 4.5) för att förvara ett värmebehandlat lysat.
2. Förvara vid 2 till 8 °C i upp till 72 timmar.
3. Förbered ett förvarat prov för amplifiering genom att vända det upp och ned 2–3 gånger så att det blandas.
4. Avlägsna locken från rören.
5. Placera de blandade lysatrören i Neogen Molekylär Detektion, Insats för Värmeblock och värm vid 100 ± 1 °C i 5 ± 1 minuter.
6. Ta ut stället med Neogen Lyseringslösningsrör från värmeblocket och låt det svalna i Neogen Molekylär Detektion, Insats för Kylblock under minst 5 minuter men högst 10 minuter.
7. Fortsätt enligt protokollet i avsnittet **Amplifiering** som beskrivs ovan.

Referenser:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
8. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

Se de aktuella versionerna av standardmetoderna som anges ovan.

Symbolförklaringar

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

Udstedelsesdato: 2024-01

NEOGEN®

Produktvejledning

Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter*

Teknisk beskrivelse og tilsigtet anvendelse

Neogen® Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* bruges sammen med Neogen® Molekylær Detektions System til hurtig og præcis detektion af *Cronobacter* i opformerede fødevareprøver og fødevaremiljøprøver.

Neogen Molekylær Detektions Analyse bruger loop-medieret, isotermisk amplifikation til hurtigt at forstærke nukleinsyresekvenser med høj specificitet og følsomhed kombineret med bioluminescens for at afsløre amplifikationen. Formodede positive resultater bliver rapporteret i realtid, mens negative resultater bliver vist, når analysen er gennemført. Formodede positive resultater bør verificeres ved hjælp af din foretrukne metode eller som angivet i de lokale vedtægter[1, 2].

Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* er beregnet til brug i laboratorieomgivelser af professionelle, der er uddannede i laboratorieteknikker. Neogen har ikke dokumenteret brugen af dette produkt i andre brancher end føde- og drikkevarebranchen. For eksempel har Neogen ikke dokumenteret dette produkt til test af medicinalvarer, kosmetiske, kliniske eller veterinære prøver. Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* er ikke blevet evalueret med alle mulige fødevarer, forarbejdningsprocesser, testprotokoller eller med alle mulige bakteriestammer.

Som for alle testmetoder kan kilden, sammensætningen og kvaliteten af opformeringsmediet påvirke resultatet. Faktorer så som prøvetagningsmetoder, testprotokoller, klargørelse af prøver, inklusive homogenisering og blanding, håndtering samt laboratorieteknik kan ligeledes påvirke resultaterne. Neogen anbefaler evaluering af metoden inklusive opformeringsmediet i brugerens omgivelser ved hjælp af et tilstrækkeligt antal prøver med specifikke fødevarer og/eller fødevaremiljøprøver og mikrobielle udfordringer for at sikre, at metoden opfylder brugerens kriterium.

Neogen har evalueret Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* med Bufferet Peptonvand ISO opformeringsmedie.

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

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

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

Tabel 1. Komponenter i Neogen Molekylær Detektions Analyse analysesæt

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

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

Sikkerhed

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

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

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

⚠ ADVARSEL

Du må ikke anvende Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* til diagnosticering af sygdomme på mennesker eller dyr.

Brugeren skal uddanne sit personale i de aktuelle, korrekte testteknikker: for eksempel God laboratoriepraksis[3], ISO/IEC 17025[4] eller ISO 7218[5].

For at reducere risiciene forbundet med et falsk-negativt resultat, der fører til frigørelse af kontaminerede produkter:

- Følg proceduren, og udfør tests præcist som angivet i produktvejledning.
- Opbevar Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* som angivet på pakken og i produktvejledningen.
- Anvend altid Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* inden udløbsdatoen.
- Benyt Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* med miljøprøver der er valideret internt eller af tredjepart.
- Anvend udelukkende Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* med overflader, desinfektionsmidler, protokoller og bakteriestammer, der er blevet evalueret internt eller af tredjepart.
- For at lave en miljøprøve, der indeholder neutraliserende buffer med arylsulfonatkompleks, udføres et 1:2 blandingsforhold inden testning (1 del prøve til 1 del steril opformeringsbouillon). En anden mulighed er at overføre 10 µL NB opformeringsbuffer til Neogen lysinbehandlingsreagensglassene. Neogen®-produkter til prøvehåndtering, som inkluderer neutraliserende buffer med arylsulfonatkompleks: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G og HS2410NB2G. Denne protokol er ikke blevet testet under NF Validations undersøgelsen.

For at reducere risiciene forbundet med eksponering for kemikalier og biologiske farer:

- Foretag patogentestning i et korrekt udstyret laboratorium under uddannet personales kontrol. Inkuberet opformeringsmedie og udstyr eller overflader, der har været i kontakt med inkuberet opformeringsmedie, kan indeholde patogenniveauer, der er tilstrækkelige til at udgøre en risiko for menneskelig sundhed.
- Følg altid sikkerhedspraksis for et standardlaboratorium, inklusive brug af passende beskyttelsesudstyr og beskyttelsesbriller under håndtering af reagenser og kontaminerede prøver.
- Undgå kontakt med indholdet af opformeringsmediet og reagensglas efter amplifikationen.
- Bortskaf opformerede prøver og kontamineret affald forbundet hermed i overensstemmelse med den aktuelle lokale/regionale/nationale lovgivning.
- Overskrid ikke den anbefalede temperaturindstilling på varmeelementet.
- Overskrid ikke den anbefalede opvarmningstid.
- Brug et passende, kalibreret termometer til at verificere temperaturen for Neogen® Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg (f.eks. et termometer til delvis nedsænkning eller et digitalt termoelementtermometer, ikke et termometer til hel nedsænkning). Termometeret skal anbringes på det dertil indrettede sted i Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg.

Overhold følgende forholdsregler for at reducere risiciene i forbindelse med krydskontaminering under klargøring af analysen:

- Brug altid handsker (for at beskytte brugeren og undgå introduktion af nukleaser).

For at reducere risici forbundet med eksponering af varme væsker:

- Overskrid ikke den anbefalede temperaturindstilling på varmeelementet.
- Overskrid ikke den anbefalede opvarmningstid.
- Brug et passende, kalibreret termometer til at verificere temperaturen for Neogen® Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg (f.eks. et termometer til delvis nedsænkning eller et digitalt termoelementtermometer, ikke et termometer til hel nedsænkning). Termometeret skal anbringes på det dertil indrettede sted i Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg.

BEMÆRK

Overhold følgende forholdsregler for at reducere risiciene i forbindelse med krydskontaminering under klargøring af analysen:

- Skift handsker før reagenskuglehydrering.
- Der anbefales brug af sterile, aerosol-barriere (filtrerede), molekylærbiologiske pipettespidser.
- Brug en ny pipettespids til hver prøveoverførsel.
- Anvend god laboratoriepraksis til overførsel af prøven fra opformeringsglasset til lysinreagensglasset. For at undgå kontaminering af pipetterne kan brugeren vælge at tilføje et mellemliggende overførselstrin. For eksempel kan brugeren overføre hver enkel opformerede prøve til et sterilt reagensglas.
- Anvend om muligt en molekylærbiologisk arbejdsstation, der inkluderer en bakteriedræbende lampe.
- Dekontaminer med jævne mellemrum laboratoriets arbejdsborde og udstyr (pipetter, luknings-/åbningsredskaber osv.) med en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsklorinopløsning eller DNA-renseopløsning.

For at reducere risiciene i forbindelse med et falsk-positivt resultat:

- Reagensglas må aldrig åbnes efter amplifikation.
- Før bortskaffelse af de kontaminerede reagensglas skal de altid iblødlægges i en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsklorinopløsning i 1 time og holdes væk fra området for analyseforberedelse.
- Reagensglas må aldrig autoklaveres efter amplifikation.
- Hvis det mistænkes, at prøver indeholder høje niveauer af *Cronobacter* DNA (f.eks., DNA fra ikke-levedygtige *Cronobacter* celler, som har været udsat for et aflivnings-/ inaktiveringstrin), skal formodede positive opformeringer behandles med DNase før **Lysis** trinet. Kontakt din Neogen-repræsentant for yderligere vejledninger. Denne protokol er ikke blevet testet under NF Validations undersøgelsen.

Se sikkerhedsdatabladet for yderligere oplysninger og lokale vedtægter for bortskaffelse.

Hvis du har spørgsmål til specifikke anvendelser eller procedurer, bedes du besøge vores websted på www.neogen.com eller kontakte din lokale Neogen-repræsentant eller -leverandør.

Brugeransvar

Brugerne er ansvarlige for at gøre sig bekendt med produktvejledninger og oplysninger. Besøg vores websted på **www.neogen.com** eller kontakt din lokale Neogen repræsentant eller forhandler for yderligere oplysninger.

Når der vælges en testmetode, er det vigtigt, at man er klar over, at eksterne faktorer, så som prøveudtagningsmetoder, testprotokoller, klargøring af prøven, inklusive homogenisering og blanding, håndtering samt laboratorieteknikker, kan påvirke resultaterne.

Det er brugerens eget ansvar at vælge en testmetode, som evaluerer et tilstrækkeligt antal prøver med de passende matricer og udfordringer for derved at sikre brugeren, at den valgte testmetode lever op til brugerens krav.

Det er også brugerens eget ansvar at fastsætte, at alle testmetoder og resultater lever op til kundernes og leverandørernes krav.

Som med alle andre testmetoder gælder det, at de resultater, der opnås med dette Neogen Food Safety-produkt, ikke giver garanti for kvaliteten af de testede matricer og processer.

For at hjælpe kunder med at evaluere metoden til flere forskellige matricer har Neogen udviklet Neogen® Molekylær Detektions Matrix Kontrolkit. Efter behov kan Matrix Control (MC) anvendes til at afgøre om matricen har evnen til at påvirke Neogen Molekylær Detektionsanalyse 2 - *Cronobacter* resultaterne. Test flere forskellige repræsentative prøver fra matricen, dvs. prøver hentet fra forskellige kilder, fra enhver valideringsperiode under anvendelse af Neogen-metoden eller under testning af nye eller ukendte matricer eller matricer, der har gennemgået ændringer i råmaterialet eller i processen.

En matrice kan defineres som en produkttype med iboende egenskaber såsom sammensætning og proces. Forskelle mellem matricer kan være så simple som effekterne forårsaget af forskelle i deres bearbejdning eller præsentation, f.eks. rå vs. pasteuriseret, frisk vs. tørret osv.

Begrænsning af garantier / Begrænset restitution

BORTSET FRA HVAD DER ER UDTRYKKELIGT ANFØRT I DEN BEGRÆNSEDE GARANTI TIL INDIVIDUEL PRODUKTEMBALLAGE, FRASIGER NEOGEN SIG ALLE UDTRYKKELIGE OG UNDERFORSTÅEDE GARANTIER INDBEFATTET MEN IKKE BEGRÆNSET TIL ENHVER SALGBARHEDSGARANTI ELLER EGNETHED TIL EN BESTEMT ANVENDELSE. Hvis et Neogen Food Safety-produkt er behæftet med fejl eller mangler, vil Neogen eller en af dennes autoriserede distributører efter dennes eget skøn udskifte eller refundere produktets købspris. Dette er den eneste til

rådighed værende afhjælpning. Kontakt venligst din Neogen-repræsentant eller autoriserede Neogen-distributør for yderligere spørgsmål.

Begrænsning af Neogen's ansvar

NEOGEN SKAL IKKE HOLDES ANSVARLIG FOR EVT. TAB ELLER SKADER, HVAD END DE ER OPSTÅET DIREKTE, INDIREKTE, UNDER SÆRLIGE OMSTÆNDIGHEDER ELLER TILFÆLDIGE SKADER INDBEFATTET MEN IKKE BEGRÆNSET TIL MISTET FORTJENESTE. Under ingen omstændigheder skal Neogen's erstatningsansvar kunne overstige købsprisen af produktet der efter sigende er behæftet med fejl.

Opbevaring og bortskaffelse

Opbevar Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* ved temp. mellem 2-8 °C. Undlad at fryse. Opbevar kittet på et mørkt sted. Efter åbning skal det kontrolleres, at folieposen er intakt. Hvis posen er beskadiget, må produktet ikke anvendes. Efter åbning bør ubenyttede reagensglas altid opbevares i den genlukkelige pose med tørremidlet indeni for at opretholde de frysetørrede reagensers stabilitet. Opbevar de forseglede poser ved temperaturer mellem 2-8 °C i højst 60 dage.

Du må ikke anvende Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* efter udløbsdatoen. Udløbsdato og lotnummer findes på æskens udvendige mærkat. Efter brug, kan det beriget medie og Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* reagensglas muligvis indeholde sygdomsfremkaldende materialer. Når testning er fuldført, bedes du følge nuværende industristandarder for bortskaffelse af kontamineret affald. Se sikkerhedsdatabladet for yderligere oplysninger og lokale vedtægter for bortskaffelse.

Brugsanvisning

Følg omhyggeligt alle vejledninger. Hvis dette ikke overholdes, kan det medføre unøjagtige resultater.

Dekontaminer med jævne mellemrum laboratoriets arbejdsborde og udstyr (pipetter, luknings-/åbningsredskaber osv.) med en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsklorinopløsning eller DNA-renseopløsning.

Brugeren skal fuldføre undervisningen til Neogen Molekylær Detektions System brugerkvalifikation, som beskrevet i dokumentet “Installationskvalifikations- (IQ) / driftskvalifikations (OQ) -protokoller og -vejledning til Neogen Molekylær Detektions System”[6].

Se afsnittet “Specifik vejledning i validerede metoder” for specifikke krav:

Tabel 3 for opformningsprotokoller i henhold til AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2018.01 og *Performance tested*℠ Certifikatnummer 101703

Tabel 4 for opformeringsprotokol ifølge NF VALIDATION-certifikat 3M 01/20-03/18

Prøveopformering

Tabel 2, 3 eller 4 viser retningslinjer for opformeringsprotokoller for fødevare-, foder- og miljøprøver.

Det er brugerens ansvar at evaluere alternative prøve- eller opformeringsprotokoller, eller blandingsforhold for at sikre, at denne testmetode imødekommer brugerens kriterier.

Fødevarer, miljøpulver, støv, opfejninger og svampe

1. Stabiliser opformeringsmediet til stuetemperatur (20-25 °C) med mindre andet er angivet i opformeringsprotokollen (Se tabel 2, 3 eller 4).
2. Kombiner opformningsmediet og prøven aseptisk og homogeniser grundigt ved blending, centrifugering, vortex-behandling eller håndmixing i 2 ± 0,2 minutter **eller indtil alle klumper er helt opløst og opformningsopløsningen er homogen**[7, 8]
    a. Faktorer så som prøveklargøring inklusive homogenisering og blanding, håndtering og laboratorieteknikker kan påvirke resultaterne.
    b. Til højpartikelprøver anbefales brug af filterposer.
    c. Hvad angår matricer, der svumer op i vand og her stærkt viskøse (f.eks. kornprodukter, stivelse), kan det foreslås, at fortynde yderligere (>1:10), indtil viskositeten er passende reduceret, eller tilsætte 1 % (w/v) alpha-amylase til BPW (ISO)[8].
    d. Hvad angår store prøvestørrelse af kornprodukter tilsættes kornprodukt i pulverform langsomt væsken under hyppig omrøring for at undgå klumper.
3. Inkuber som beskrevet i den relevante protokoltabel (se Tabel 2, 3, eller 4).

Tabel 2. Generelle opformeringsprotokoller

Prøvematrice	Prøvestørrelse[1]	Opformerings-bouillonvolumen[1, 2]	Opformerings-temperatur (± 1 °C)	Opformeringstid (timer)	Prøveanalyse-volumen
Modermælkserstatning i pulverform og råvarer, så som mælkepulver, sojapulver, vallepulver, laktose, rismel, og maltodekstrin	1X gram prøve	9X ml BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Råmaterialer, så som salte, mineraler, aminosyrer, DHA (docosahexaensyre) og vitaminer	1X gram prøve	99X ml BPW (ISO) (1:100)	37	18-24	20 µl
Prøver fra tørt miljø, så som støv, opfejninger, støvsuger opsamlinger	1X gram prøve	9X ml BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Miljøsvamp med 10 ml Letheen bouillon eller D/E neutraliserende bouillon	1 prøveenhed	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl

1. Neogen har evalueret Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* ved brug af blandingsforhold i Tabel 2 op til 300 g. Det er brugerens ansvar at evaluere alternative blandingsforhold eller protokoller for at sikre, at testmetoden imødekommer brugerens kriterier.
2. Brug **for-opvarmet** BPW (ISO), hvis opformeringsbouillonvolumen er > 300 ml (f.eks., prøven er > 30 gram).

Specifik vejledning i validerede metoder

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

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

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

I AOAC Research Institute OMA℠ og PTM℠-programmer viste Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* sig at være en effektiv metode til detektion af *Cronobacter.* Matricerne, der er testet i denne undersøgelse, er vist i Tabel 3.

Tabel 3. Opformeringsprotokoller i henhold til AOAC® *OMA*[SM] 2018.01 og *PTM*[SM] 101703

Prøvematrice	Prøvestørrelse	Opformerings-bouillonvolumen[1]	Opformering-stemperatur (± 1 °C)	Opformering-stid (timer)	Prøveanalyse-volumen
Powdered Infant Formula og Powdered Infant Cereal	10 g	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Powdered Infant Cereal uden probiotika	300 g	2700 ml BPW (ISO) (1:10)	For-opvarmet 37	18-24	20 µl
Powdered Infant Formula og Powdered Infant Cereal med probiotika	300 g	2700 ml BPW (ISO) + 10 mg/l Vancomycin	For-opvarmet 37	22-24	20 µl
Laktose	10 g	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Miljøsvamp med 10 ml D/E neutraliserende bouillon	1 prøveenhed	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl

1. Brug **for-opvarmet** BPW ISO hvis opformerings bouillonvolumen er > 300 ml.

NF VALIDATION af AFNOR Certification

3M 01/20-03/18

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

For yderligere oplysninger om validering henvises der til NF VALIDATION certifikatet, der er tilgængeligt på det websted, som blev nævnt ovenfor.

NF VALIDATION-certificeret metode i overensstemmelse med ISO 16140-2[9] i sammenligning med ISO 22964.

Valideringsområdet: Powdered infant formula og infant cereals med og uden probiotika, råmaterialer og miljøprøver.

Prøveforberedelse: Prøver bør forberedes i henhold til EN ISO 22694[2] og EN ISO 6887[7, 8].

Softwareversion: Se certifikat.

Tabel 4. Opformeringsprotokol ifølge NF VALIDATION certificeret metode 3M 01/20-03/18

Prøvematrice	Prøvestørrelse	Opformeringsbouillonvolumen[1]	Opformeringstemperatur (± 1 °C)	Berigelsestid (timer)	Prøveanalysevolumen	Anbefalede afbrydelsespunkter[2, 3]
• Powdered Infant Formula • Powdered Infant cereals • Ingredienser, så som mælkepulver, sojapulver, vallepulver, laktose, rismel, og maltodekstrin • Prøver fra tørt miljø, så som støv, opfejninger, støvsuger opsamlinger,	10 g	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl	Opformeringsbouillon eller prøvelysat kan opbevares ved 2-8 °C i op til 72 timer
• Svamp, skyllevand, wipes	1 prøveenhed eller 10 ml					Opformeringsbouillon eller prøvelysat kan opbevares ved 2-8 °C i op til 72 timer
Powdered Infant Formula og Powdered Infant Cereal (uden probiotika)	30-300 g	BPW ISO (1:10)	37	18-24	20 µl	Opformeringsbouillon eller prøvelysat kan opbevares ved 2-8 °C i op til 72 timer
Powdered Infant Formula og Powdered Infant Cereal (med probiotika)	30-300 g	BPW (ISO) + 10 mg/l Vancomycin (1:10)	37	22-24	20 µl	Ingen

1. Brug for-opvarmet BPW (ISO), hvis opformeringsbouillonvolumen er > 300 ml (f.eks., prøven er > 30 gram).
2. Efter at have taget opformeringsbouillonen ud af opbevaring genoptages testning fra trin 1 i afsnittet Lysinbehandling. Efter at have taget lysatprøven ud af opbevaring genoptages testning fra trin 7 i afsnittet Lysinbehandling.
3. Se Bilag A for genprøvning af opbevarede, varmebehandlede lysater.

Forberedelse af Neogen® Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning

1. Fugt en klud eller et engangshåndklæde med en 1-5 % (v: v i vand) husholdningsklorinopløsning, og aftør Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning.
2. Skyl Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning med vand.
3. Brug et engangshåndklæde til at aftørre Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning.
4. Sørg for, at Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning er tør inden brug.

Klargørelse af Neogen® Molekylær Detektions Køleblok Indlæg

Anbring Neogen Molekylær Detektions Køleblok Indlæg direkte på laboratoriebordet: Neogen Molekylær Detektions Køleblok Bakke benyttes ikke. Brug blokken ved laboratorietemperatur (20-25 °C).

Klargørelse af Neogen® Molekylær Detektions Varmeblok Indlægget

Anbring Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg på en tør dobbelt varmeenhed. Tænd for den tørre varmeenhed, og indstil temperaturen, så Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg kan nå og opretholde en temperatur på 100 ±1 °C.

BEMÆRK: Afhængigt af varmeenheden skal man påregne ca. 30 minutter, før Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg opnår temperaturen. Ved hjælp af et passende, kalibreret termometer (f.eks. et termometer til delvis nedsænkning eller et digitalt termoelementtermometer, men ikke et fuldstændigt nedsænkningstermometer) anbragt på det dertil indrettede sted skal det verificeres, at Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg er på 100 ±1 °C.

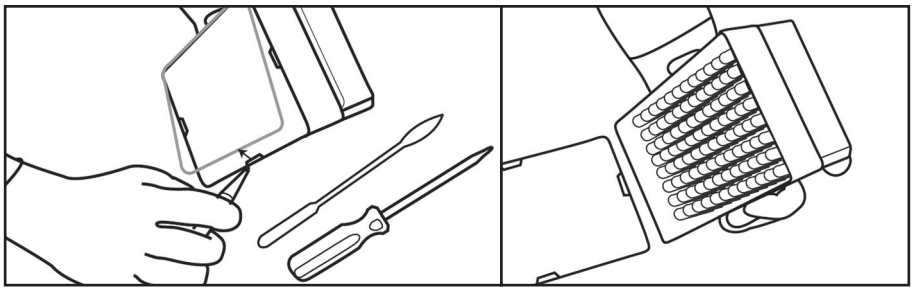
Klargørelse af Neogen® Molekylær Detektions Instrument

1. Start Neogen® Molekylær Detektions Softwaren og log på. Kontakt din Neogen Food Safety-repræsentant for at sikre, at du har den mest opdaterede version af softwaren.
2. Tænd for Neogen Molekylær Detektions Instrument.
3. Opret, eller rediger en kørsel med data for hver prøve. Se brugsanvisningen til Neogen Molekylær Detektions System for flere oplysninger.

BEMÆRK: Neogen Molekylær Detektions Instrument skal opnå Klar-tilstanden inden der indsættes reagensglas i Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning. Dette opvarmningstrin varer ca. 20 minutter og bliver angivet med et ORANGE lys på instrumentets statussøjle. Når instrumentet er klart til en kørsel, lyser statussøjlen GRØNT.

Lysinbehandling

Fjern bunden af holderen til Neogen Lysinbehandlingsopløsning med en skruetrækker før den placeres i Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg.

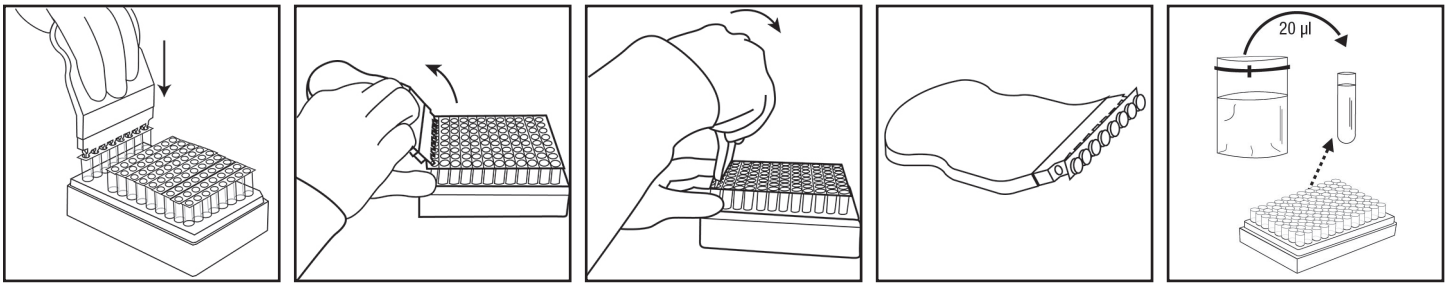


1. Lad Neogen Lysinbehandlingsreagensglassene varme op ved at indstille holderen på stuetemperatur (20-25 °C) natten over (16-18 timer). Alternativer til at stabilisere Neogen Lysinbehandlingsreagensglassene til stuetemperatur er at sætte Neogen Lysinbehandlingsreagensglassene på arbejdsbordet i mindst 2 timer, inkubere Neogen Lysinbehandlingsreagensglassene i en 37 ±1 °C inkubator i 1 time eller stille dem i en tør, dobbelt varmeblok i 30 sekunder ved 100 ± 1 °C.
2. Vend de lukkede reagensglas på hovedet for at blande. Gå til næste trin inden 4 timer efter at have vendt glasset.
3. Fjern opformeringsbouillonen fra inkubatoren.
4. Et Neogen Lysinbehandlingsreagensglas er påkrævet til hver prøve og til NC-prøven (sterilt opformeringsmedie).
   - 4.1 Neogen Lysinbehandlingsreagensglasstrips kan skæres til det ønskede antal rør. Vælg antallet af individuelle Neogen LS-reagensglas eller 8-reagensglasstrimler efter behov. Sæt Neogen LS-reagensglassene i en tom glasholder.
   - 4.2 Åbn én Neogen LS-reagensglasstrimmel ad gangen for at undgå krydskontaminering, og brug en ny pipette til hvert overførselstrin.
   - 4.3 Overfør opformeret prøve til Neogen LS-reagensglas som beskrevet nedenfor:

     Overfør hver opformeret prøve til et individuelt Neogen LS-reagensglas **først**. Overfør NC **til sidst.**
   - 4.4 Brug Neogen® Molekylær Detektions Værktøj til Cap/Decap (lukning/åbning) – Lysinbehandling til at åbne én Neogen LS-reagensglasstrimmel ad gangen.
   - 4.5 Smid Neogen LS-reagensglassets låg væk – hvis lysat vil blive bevaret til gentestning, så placér lågene i en ren beholder til genpåsætning efter lysinbehandlingen.
     - 4.5.1. For bevaring af lysat se bilag A.
   - 4.6 Ryst opformningsposen før prøven indhentes fra den filtrerede side, når der arbejdes med viskøse prøver.

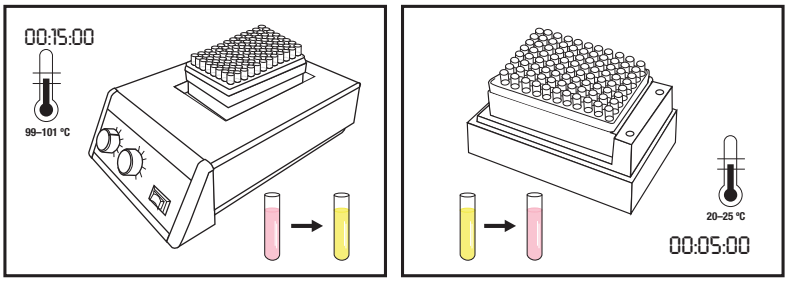
4.7 Overfør 20 µl af prøven ind i et Neogen Lysinbehandlingssreagensglas, medmindre andet er indikeret i protokoltabellen.

5. Gentag trin 4.4 til 4.7, indtil hver individuel prøve er blevet tilføjet til et tilsvarende Neogen Lysinbehandlingsreagensglas i strimlen.



6. Når alle prøver er blevet overført, skal der overføres 20 µl NC (sterilt opformeringsmedie, f.eks. BPW) til et Neogen Lysinbehandlingsreagensglas. Brug ikke vand som en NC.
7. Kontrollér, at Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg har en temperatur på 100 ±1 °C.
8. Anbring glasholderen med Neogen Lysinbehandlingsreagensglas i Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg, og opvarm i 15 ±1 minutter. I løbet af opvarmningen vil Neogen Lysinopløsningen skifte fra pink (kølig) til gul (varm).

   Prøver, som ikke er blevet korrekt varmebehandlet under analysens lysinbehandlingstrin, kan udgøre en væsentlig miljørisiko og bør IKKE sættes ind i Neogen Molekylær Detektions Instrument.
9. Fjern den udækkede holder med Neogen Lysinbehandlingsreagensglas fra Neogen Molekylær Detektions Varmeblok, og lad det køle i Neogen Molekylær Detektions Køleblok Indlæg i mindst 5 minutter og i højst 10 minutter. Neogen Molekylær Detektions Køleblok Indlæg brugt ved stuetemperatur uden Neogen® Molekylær Detektions Køleblok Bakke bør stå direkte på laboratoriebordet. Når det er koldt, skifter Neogen lysinopløsningen til lyserød.
10. Fjern stativet med Neogen LS-reagensglas fra Neogen Molekylær Detektions Køleblok Indlæg.



Amplifikation

1. Et Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* reagensglas er påkrævet til hver prøve og NC.

   1.1 Reagensglasstrimler kan tilpasses til det ønskede antal reagensglas. Vælg antallet af individuelle Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* reagensglas eller 8-reagensglasstrimler efter behov.

   1.2 Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 -*Cronobacter* reagensglas i en tom glasholder.

   1.3 Undgå at forstyrre reagenskuglerne på bunden af reagensglassene.
2. Vælg ét Neogen Reagens Kontrol-reagensglas, og anbring det i holderen.
3. For at undgå krydskontaminering åbnes én Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* reagensglasstrimler ad gangen, og der bruges en ny pipettespids til hvert overførselstrin.
4. Overfør hvert lysat til et Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* reagensglas og Neogen Reagens Kontrol-reagensglas som beskrevet nedenfor:

Overfør hver prøvelysat til individuelle Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* reagensglas **først,** efterfulgt af NC. Hydrer Neogen Reagens Kontrol-reagensglasset **sidst.**

5. Brug Neogen® Molekylær Detektions Værktøj til Cap/Decap (lukning/åbning) - Reagens til at åbne Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* -reagensglas - én reagensglasstrimmel ad gangen. Bortskaf hætten.

5.1 **Overfør 20 µl prøvelysat fra den øverste halvdel af væsken (undgå præcipitat) i Neogen Lysinbehandlingsreagensglasset til tilsvarende Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* reagensglas. Dosér med en skrå hældning for at undgå at forstyrre kuglerne. Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned 5 gange.**

5.2 Gentag trin 5.1, til individuelt prøvelysat er blevet tilføjet til et tilsvarende Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* reagensglas i strimlen.

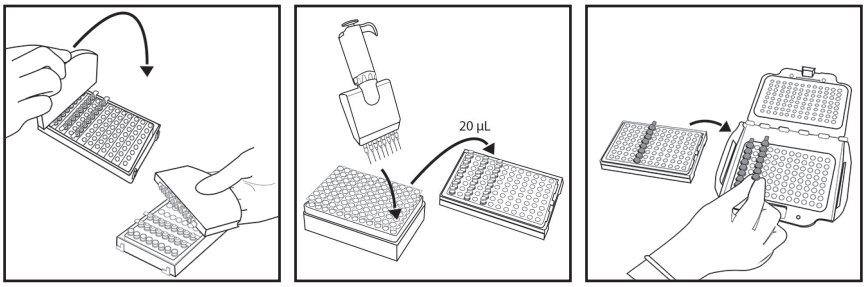
5.3 Dæk Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* reagensglasset med det medfølgende ekstra låg og brug den runde side af Neogen Molekylær Detektions Værktøj til Cap/Decap (lukning/åbning) - Reagens til at påføre tryk i en frem- og tilbagegående retning, og sørg for, at låget sidder fast.

5.4 Gentag trinene 5.1 til 5.3 efter behov for antallet af prøver, der skal testes.

5.5 Når alle prøvelysater er blevet overført, gentages trinene 5.1 til 5.3 for at overføre 20 µl NC-lysat til et Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* reagensglas.

5.6 Overfør **20 µL NC-lysat til et Neogen Reagens Kontrol-reagensglas**. Dosér med en skrå hældning for at undgå at forstyrre kuglerne. Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned 5 gange.

6. Sæt reagensglassene med låg påsat i en ren og dekontamineret Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning. Luk, og lås låget til Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning.



7. Gennemgå og bekræft den konfigurerede kørsel i Neogen Molekylær Detektions softwaren.
8. Klik på startknappen i softwaren, og vælg det instrument, du vil bruge. Det valgte instruments låg åbnes automatisk.
9. Anbring Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning i Neogen Molekylær Detektions Instrument, og luk låget for at påbegynde analysen. Resultaterne fremkommer inden for 60 minutter, skønt positive resultater kan fremkomme hurtigere.
10. Når analysen er færdig, fjernes Neogen Molekylær Detektions Bakke til hurtig påfyldning fra Neogen Molekylær Detektions Instrument, reagensglassene smides væk ved at lade dem ligge i blød i en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsklorinopløsning i 1 time og på god afstand af analyseklargørelsesområdet.

BEMÆRK: For at minimere risikoen for falsk-positiver pga. krydskontaminering må reagensglas, der indeholder forstærket DNA, aldrig åbnes. Dette omfatter Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter* reagensglas, Neogen Reagens Kontrol - og Neogen Matrix Kontrol-reagensglas. Læg altid forseglede reagensglas i blød i en 1-5 % (v:v i vand) husholdningsklorinopløsning i 1 time og på god afstand af analyseklargørelsesområdet.

Resultater og fortolkning

En algoritme fortolker lyseffektkurven, der er et resultat af detektionen af nukleinsyreamplifikation. Resultaterne bliver automatisk analyserede af softwaren og bliver farvekodede baseret på resultatet. Et positivt eller negativt resultat bliver fastslået ved at analysere et antal unikke kurveparametre. Formodede positive resultater bliver rapporterede i realtid, mens negative resultater og inspektionsresultater bliver vist, efter kørslen er gennemført.

BEMÆRK: Selv en negativ prøve vil ikke give en nulaflæsning, idet systemet og Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter*-amplifikationsreagenser har en "baggrundsmæssig" relativ lysenhed (RLU)-læsning.

Bekræftelse

- Bekræftelse af resultater ifølge den certificerede metode NF Validation

Inden for rammerne of NF Validation, bør alle formodet positive opformeringer bekræftes med følgende referencemetodebekræftelse[2], startende med overførsel fra primær opformning (BPW ISO eller BPW ISO suppleret med 10 mg/l vancomycin).

- Andre bekræftelsesprotokoller

Formodede positive opformeringer skal bekræftes ifølge sikkerhedspraksis for et standardlaboratorium eller ved at følge den relevante referencemetodebekræftelse[1,2], der begynder med overførsel fra den primære opformering (BPW ISO eller BPW ISO suppleret med 10 mg/l vancomycin) til et sekundært opformeringsmedium, efterfulgt af efterfølgende plettering og bekræftelse af isolater ved hjælp af passende biokemiske, serologiske og/eller molekulære metoder.

I sjældne tilfælde af en usædvanlig lyseffekt vil algoritmemærkaterne kategorisere dette som Inspektion. Neogen anbefaler brugeren at gentage analysen for alle inspektionsprøver. Hvis resultatet fortsat markeres til Inspektion, skal du fortsætte til bekræftelsestest ved brug af din foretrukne metode eller som specificeret i lokale forskrifter[1,2].

I tilfælde af uoverensstemmende resultater (formodede positive med Neogen Molekylær Detektions Analyse 2 - *Cronobacter*, ikke bekræftet med en af metoderne beskrevet ovenfor), skal laboratoriet følge de deres etablerede standard arbejdsprocedurer for at sikre valideringen af de opnåede resultater.

Hvis du har spørgsmål til specifikke anvendelser eller procedurer, bedes du besøge vores websted på www.neogen.com eller kontakte din lokale Neogen-repræsentant eller -leverandør.

Bilag A. Protokolafbrydelse: Opbevaring og gentestning af varmebehandlede lysater

1. Til opbevaring af varmebehandlet lysat påsættes en ren hætte på lysisreagensglasset (se afsnittet **Lysis**, afsnit 4.5)
2. Opbevar ved 2 til 8 °C i op til 72 timer.
3. Forbered en opbevaret prøve til amplifikation ved at vende den på hovedet 2-3 gange for at blande.
4. Tag lågene af reagensglassene.
5. Placér de blandede lysatreagensglas på Neogen Molekylær Detektions Varmeblok Indlæg, og varm op til 100 ±1 °C i 5 ±1 minutter.
6. Fjern holderen med Neogen LS-reagensglas fra varmeblokken, og lad det køle i Neogen Molekylær Detektions Køleblok Indlæg i mindst 5 minutter og i højst 10 minutter.
7. Fortsæt protokollen i afsnittet **Amplifikation** som angivet ovenfor.

Litteraturhenvisninger:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
8. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

Der henvises til de gældende versioner af de standardmetoder, som er angivet ovenfor.

Symbolforklaring

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

Utgivelsesdato: 2024-01

NEOGEN

Produktveiledning

Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter*

Produktbeskrivelse og tiltenkt bruk

Neogen® Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* brukes sammen med Neogen® System for molekylær deteksjon for rask og spesifikk deteksjon av *Cronobacter* i miljøprøver av beriket mat, fôr- og matprosess.

Neogen Molekylære deteksjonstester bruker sløyfe-mediert isotermisk amplifikasjon for hurtig amplifikasjon av nukleinsyresekvenser med høy spesifisitet og sensitivitet, kombinert med bioluminescens for å registrere amplifikasjonen. Antatte positive testresultater rapporteres i sanntid, mens negative resultater vises etter at testen er fullført. Antatte positive resultater skal bekreftes ved hjelp av din foretrukne metode eller som spesifisert av lokale forskrifter[1, 2].

Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* er ment for bruk i et laboratoriemiljø av fagpersoner med opplæring i laboratorieteknikker. Neogen har ikke godkjent dette produktet for bruk i andre industrier enn mat og drikke. Neogen har for eksempel ikke godkjent dette produktet for testing av farmasøytiske, kosmetiske, kliniske eller veterinærprøver. Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* har ikke blitt evaluert med alle mulige matprodukter, matprosesser, testprotokoller eller med alle mulige bakteriestammer.

Som ved alle testmetoder kan kilden, formuleringen og kvaliteten til anrikningsmediet påvirke resultatene. Faktorer som prøveinnsamlingsmetoder, testprotokoller, prøveforberedelse inkludert homogenisering og blanding, håndtering og laboratorieteknikk kan også påvirke resultatet. Neogen anbefaler å evaluere metoden, inkludert anrikningsmediet, i brukerens miljø ved bruk av et tilstrekkelig antall prøver ved spesielle mat- og/eller miljøprøver og mikrobielle utfordringer for å sikre at metoden oppfyller brukerens kriterier.

Neogen har evaluert Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* med bufret peptonvann ISO.

Neogen® Instrument for molekylær deteksjon er ment for bruk med prøver som har gjennomgått varmebehandling i testens lyseringstrinn, som er konstruert for å ødelegge organismer som finnes i prøven. Prøver som ikke har blitt ordentlig varmebehandlet under testlyseringstrinnet kan vurderes som en potensiell biologisk fare og skal IKKE settes inn i Neogen Instrument for molekylær deteksjon.

Neogen Food Safety er ISO (International Organization for Standardization) 9001-sertifisert for utforming og produksjon.

Settet med Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* inneholder 96 tester, beskrevet i tabell 1.

Tabell 1. Komponenter i Neogen Molekylært deteksjonskit

Objekt	Beskrivelse	Antall	Innhold	Kommentarer
Neogen® Lyseringsoppløsning (LS)	Rosa oppløsning i gjennomsiktige rør	96 (12 rekker med 8 rør)	580 µl LS per rør	Plassert i stativ og klar til bruk
Reagensrør for Neogen® Molekulær deteksjonskit 2 - *Cronobacter*	Orange-røde rør	96 (12 rekker med 8 rør)	Lyofilisert spesifikk amplifikasjon og deteksjonsblanding	Klar til bruk
Ekstra lokk	Orange-rød hetter	96 (12 rekker med 8 lokk)		Klar til bruk
Neogen® Reagenskontroll (RC)	Gjennomsiktige rør med vippelokk	16 (2 poser med 8 individuelle rør)	Lyofilisert kontroll-DNA, amplifikasjon og deteksjonsblanding	Klar til bruk

Den negative kontrollen (NC), som ikke følger med i settet, er et sterilt anrikningsmedium, f.eks. BPW ISO. Ikke bruk vann som negativ kontroll.

Sikkerhet

Brukeren må lese, forstå og følge all informasjon om sikkerhet i instruksjonene for Neogen System for molekylær deteksjon og Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter*. Behold sikkerhetsveiledningen for fremtidig referanse.

⚠**ADVARSEL:** Indikerer en farlig situasjon som, om den ikke unngås, kan resultere i død eller alvorlig personskade og/eller materielle skader.

MERKNAD: Indikerer en potensielt farlig situasjon som, om den ikke unngås, kan føre til materielle skader.

⚠ ADVARSEL

Ikke bruk Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* i diagnostisering av tilstander hos mennesker eller dyr.

Brukeren må sørge for at personalet får tilstrekkelig opplæring i korrekte testteknikker: for eksempel, God laboratoriepraksis[3], ISO/IEC 17025[4] eller ISO 7218[5].

For å redusere risikoene forbundet med et falskt negativt resultat som kan føre til utslipp av kontaminert produkt:

- Følg protokollen og utfør testene akkurat slik de beskrives i produktveiledning.
- Oppbevar Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* slik som beskrevet på pakningen og i produktveiledningen.
- Bruk alltid Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* før utløpsdatoen.
- Bruk Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* med miljøprøver i mat-, fôr- og næringsmiddelprosesser som har blitt godkjent internt eller av tredjepart.
- Bruk kun Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* med overflater, desinfeksjonsmidler, protokoller og bakteriestammer som har blitt validert internt eller av en tredjepart.
- For en miljøprøve som inneholder nøytraliserende buffer med aryl sulfonat-kompleks, skal du utføre en 1:2 fortynning før testing (1 del prøve i 1 del steril anrikningsbuljong). Et annet alternativ er å overføre 10 µl av den NB-anrikningen inn i Neogen lyseringsoppløsningsrørene. Prøvehåndteringsprodukter fra Neogen® som inkluderer nøytraliserende buffer med arylsulfonatkompleks: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G og HS2410NB2G. Denne protokollen er ikke blitt testet under NF Validation-studien.

For å redusere risikoene forbundet med eksponering for kjemikalier og biologiske farer:

- Utfør patogentesting i et laboratorium som er korrekt utstyrt, under oppsyn av fagopplært personell. Inkubert anrikningsmedium og utstyr eller overflater som har vært i kontakt med inkubert anrikningsmedium, kan inneholde patogener på et nivå som kan innebære helserisiko for mennesker.
- Følg alltid standard praksis for laboratoriesikkerhet, inkludert bruk av egnet personlig verneutstyr og øyevern ved håndtering av reagensrør og kontaminerte prøver.
- Unngå kontakt med innholdet i anrikningsmediet og reagensrør etter amplifisering.
- Kast anrikede prøver og tilhørende kontaminert avfall i henhold til gjeldende lokale/regionale/nasjonale/industrielle standarder.
- Ikke overstig den anbefalte temperaturinnstillingen på varmeblokken.
- Ikke overstig den anbefalte oppvarmingstiden.
- Bruk et passende, kalibrert termometer til å kontrollere temperaturen på Neogen® Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon (f.eks. delvis nedsenket termometer eller digitalt termoelement-termometer, ikke et helt nedsenket termometer). Termometeret må plasseres på det angitte stedet på Neogen Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon.

For å redusere risikoene forbundet med krysskontaminering ved klargjøring av test:

- Bruk alltid hansker (for å beskytte brukeren og forhindre innføring av nukleaser).

For å redusere risiko forbundet med eksponering for varme væsker:

- Ikke overstig den anbefalte temperaturinnstillingen på varmeblokken.
- Ikke overstig den anbefalte oppvarmingstiden.
- Bruk et passende, kalibrert termometer til å kontrollere temperaturen på Neogen® Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon (f.eks. delvis nedsenket termometer eller digitalt termoelement-termometer, ikke et helt nedsenket termometer). Termometeret må plasseres på det angitte stedet på Neogen Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon.

MERKNAD

For å redusere risikoene forbundet med krysskontaminering ved klargjøring av test:

- Skift hansker før hydrering av reagens-pellet.
- Det anbefales å bruke pipettespisser med sterile, spraybaserte barrierer (filtrerte), av molekylærbiologi-karakter.
- Bruk en ny pipettespiss for hver prøveoverføring.
- Bruk gode laboratoriepraksiser til å overføre prøven fra anrikningen til lyseringsrøret. For å unngå kontaminering av pipetter kan brukeren velge å legge til et mellomtrinn under overføring. Brukeren kan for eksempel overføre hver anrikede prøve til et sterilt rør.
- Dersom tilgjengelig, bør brukeren bruke en arbeidsstasjon for molekylær biologi som har en bakteriedrepende lampe.
- Utfør periodisk dekontaminering av benker og utstyr (pipetter, verktøy for lukking/åpning, osv.) i laboratoriet med en 1–5 % (volumandel i vann) oppløsning av husholdningsblekemiddel eller oppløsning for fjerning av DNA.

For å redusere risikoene forbundet med falskt positivt resultat:

- Åpne aldri rørene etter amplifisering.
- Kast alltid de kontaminerte rørene ved å bløtlegge dem i en 1–5 % (volumandel i vann) oppløsning av husholdningsblekemiddel i 1 time og borte fra testens forberedelsesområde.
- Autoklaver aldri rørene etter amplifisering.
- Hvis prøvene er mistenkt for å inneholde høye nivåer av *Cronobacter*-DNA (for eksempel, DNA fra ikke-levedyktige *Cronobacter*-celler som har vært utsatt for en drepe-/inaktiveringstrinn), presumptive positive anrikninger bør behandles med DNase før **LYSIS**-trinnet. Kontakt din Neogen representant for ytterligere instruksjoner. Denne protokollen er ikke blitt testet under NF Validation-studien.

Se HMS-databladet for ytterligere informasjon og lokale forskrifter for avhending.

Hvis du har spørsmål om spesifikke bruksområder eller prosedyrer, besøk vårt nettsted på www.neogen.com eller kontakt den lokale Neogen-representanten eller forhandleren.

Brukeransvar

Brukere er ansvarlige for å sette seg inn i produktveiledningen og informasjon om produktet. Besøk nettsiden vår **www.neogen.com** eller kontakt din lokale Neogen-representant eller distributør for mer informasjon.

Ved valg av testmetode er det viktig å ta hensyn til at eksterne faktorer som metoder for stikkprøver, testprotokoller, preparering av prøver inkludert homogenisering og blanding, håndtering og laboratorieteknikk kan påvirke resultatene.

Ved valg av testmetode er det brukerens ansvar å vurdere et tilstrekkelig antall prøver med passende matriser og mikrobielle utfordringer for å tilfredsstille brukeren om at den valgte prøvemetoden oppfyller brukerens kriterier.

Det er også brukerens ansvar å fastslå at alle prøvemetoder og resultater tilfredsstiller kundens og leverandørens krav.

Som med alle testmetoder, utgjør ikke resultatene som oppnås ved bruk av noe Neogen Food Safety-produkt noen garanti om kvaliteten av matrisene eller prosessene som testes.

For å hjelpe kunder med å evaluere metoden for forskjellige matmatriser, har Neogen utviklet Neogen® Matrisekontrollsett for molekylær deteksjon. Bruk matrisekontroll (MC) ved behov for å avgjøre om matrisen har egenskapen til å påvirke resultatene for Neogen Molekulær deteksjonskit 2 - Cronobacter. Test flere prøver som representerer matrisen, dvs. prøver innhentet fra forskjellige opphav, i løpet av en hvilken som helst valideringsperiode når Neogen-metoden brukes, ved testing av nye eller ukjente matriser, eller matriser som har gjennomgått endringer i råvarematerialer eller prosess.

En matrise kan defineres som en produkttype med indre egenskaper, slik som sammensetning og prosess. Forskjeller mellom matriser kan være så enkle som effekter som skyldes forskjeller i prosessering eller presentasjon, for eksempel rå i motsetning til pasteurisert, fersk i motsetning til tørket osv.

Begrensning av garantier / begrensede rettigheter

MED MINDRE DET ER UTTRYKKELIG SKREVET I EN BEGRENSET GARANTI PÅ EN PRODUKTPAKNING, FRASKRIVER NEOGEN SEG ALLE DIREKTE OG INDIREKTE GARANTIER, INKLUDERT MEN IKKE BEGRENSET TIL, ENHVER GARANTI OM SALGBARHET ELLER ANVENDELSE TIL ET BESTEMT FORMÅL. Hvis noe Neogen Food Safety-produkt er defekt vil Neogen eller dets autoriserte distributør erstatte eller refundere produktets kjøpesum etter eget skjønn. Dette er dine ubetingede rettigheter. Kontakt Neogen-representanten din eller den autoriserte Neogen-distributøren hvis du har flere spørsmål.

Begrensning av Neogens ansvar

NEOGEN VIL IKKE VÆRE ANSVARLIG FOR NOE TAP ELLER SKADE, DIREKTE ELLER INDIREKTE, SPESIELL, TILFELDIG ELLER FØLGESKADE, INKLUDERT, MEN IKKE BEGRENSET TIL, TAPT FORTJENESTE. Ikke under noen omstendighet skal Neogens ansvar, under noen juridisk teori, overstige kjøpesummen for et produkt som antas å være defekt.

Oppbevaring og avhending

Oppbevar Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* ved 2–8 °C. Må ikke fryses. Hold settet borte fra lys under oppbevaring. Etter at settet er åpnet, skal folieposen undersøkes for skader. Må ikke brukes dersom posen er skadet. Etter åpning skal ubrukte reagensrør alltid oppbevares i den gjenlukkbare posen med tørkemiddelet inni, for å opprettholde stabiliteten til de lyofiliserte reagensene. Oppbevar forseglede poser ved 2–8 °C i maksimalt 60 dager.

Ikke bruk Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* etter utløpsdatoen. Utløpsdato og lotnummer er angitt på etiketten på utsiden av esken. Etter bruk kan rørene med oppformeringsmediet og Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* inneholde potensielle patogent materiale. Når testingen er fullført, følger brukeren gjeldende industristandarder for kasting av kontaminert avfall. Se HMS-databladet for ytterligere informasjon og lokale forskrifter for avhending.

Bruksanvisning

Følg alle instruksjonene nøye. Dersom dette ikke blir gjort, kan det føre til unøyaktige resultater.

Utfør periodisk dekontaminering av benker og utstyr (pipetter, verktøy for lukking/åpning, osv.) i laboratoriet med en 1–5 % (volumandel i vann) oppløsning av husholdningsblekemiddel eller oppløsning for fjerning av DNA.

Brukeren må fullføre opplæringen for operatører av Neogen System for molekylær deteksjon (OQ), som beskrevet i dokumentet «Installasjonskvalifikasjon (IQ) / Driftskvalifikasjon (QW) Protokoller og instruksjoner for Neogen System for molekylær deteksjon» (Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System)[6].

Se avsnittet «Spesifikke veiledninger for validerte metoder» for spesifikke krav:

Tabell 3 for anrikningsprotokoller i henhold til AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2018.01 and *Performance Tested*℠ sertifikatnummer 101703

Tabell 4 for anrikningsprotokoller i henhold til NF VALIDATION-sertifikat 3M 01/20-03/18

Prøveanriking

Tabell 2, 3 eller 4 viser veiledning for anrikningsprotokoller for mat-, fôr- og miljøprøver.

Det er brukerens ansvar å validere alternative prøve- eller berikelsesprotokoller eller fortynningsforhold for å sikre at testmetoden møter brukerens krav.

Næringsmidler, miljøpulvere, støv, søppel og svamper

1. Ekvilibrer anrikningsmediet til værelsestemperatur (20-25 °C) hvis ikke annet er angitt i anrikningsprotokollen (se tabell 2, 3 eller 4).
2. Kombinere anrikningsmediet og prøven aseptisk og homogeniser grundig ved å blande, homogenisere, blande i virvelblander eller håndblande i 2 ± 0,2 minutter **eller til alle klumper er fullstendig oppløst, og anrikingsopphenget er homogent**[7, 8].
    a. Faktorer som prøveforberedelse inkludert homogenisering og blanding, håndtering og laboratorieteknikk kan påvirke resultatet.
    b. For svært oppdelte prøver anbefales det å bruke filterposer.
    c. For matriser som svulmer i vann og er svært viskøse (f.eks. kornblandinger, stivelser), anbefales det å gjøre ytterligere fortynninger (> 1:10) til viskositeten reduseres hensiktsmessig eller tilsette steril 1 % (v/v) alfa-amylase til BPW (ISO)[8].
    d. For store prøvestørrelser av kornblandinger, tilsett det pulverformige kornet væsken sakte mens du blander ofte å unngå klumper.
3. Inkuber i henhold til de passende protokolltabellene (se tabell 2, 3 eller 4).

Tabell 2. Generelle anrikningsprotokoller

Prøvematrise	Prøvestør-relse[1]	Volum anriknings-buljong[1, 2]	Anrikningstemperatur (± 1 °C)	Anrikningstid (timer)	Prøveanalyse-volum
Pulverisert morsmelkerstatning (PIF) og råvarer som for eksempel tørrmelkpulver, soyapulver, mysepulver, laktose, rismel og maltodekstrin	1X gram prøve	9X mL BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl
Råvarer som salter, mineraler, aminosyrer, DHA (docosahexaensyre) og vitaminer	1X gram prøve	99X mL BPW (ISO) (1:100)	37	18–24	20 µl
Tørre miljøprøver som støv, feiing, vakuum-innsamling	1X gram prøve	9X mL BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl
Miljøsvamp med 10 ml Letheen-buljong eller D/E nøytraliserende buljong	1 prøvetaker	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl

1. Neogen har evaluert Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* ved hjelp av fortynningsforhold i tabell 2 opp til 300 g. Det er brukerens ansvar å validere alternative prøveprotokoller eller fortynningsforhold for å sikre at testmetoden møter brukerens krav.
2. Bruk **forvarmet** BPW ISO hvis anrikningsbuljongs volum er > 300 ml (f.eks. hvis prøven er > 30 gram).

Spesifikke veiledninger for validerte metoder

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

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

PERFORMANCE TESTED
AOAC
RESEARCH INSTITUTE
LICENSE NUMBER 101703

Studier ved AOAC Research Institute OMA℠ og PTM℠ viste at Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter*var en effektiv metode for å påvise *Cronobacter.* Matrisene som ble testet i studien er vist i tabell 3.

Tabell 3. Anrikningsprotokoller i henhold til AOAC® *OMA*[SM] 2018.01 og *PTM*[SM] 101703

Prøvematrise	Prøvestørrelse	Volum anrikningsbuljong[1]	Anrikningstemperatur (± 1 °C)	Anrikningstid (timer)	Prøveanalysevolum
Pulverisert morsmelkerstatning og pulverisert kornblanding for babyer	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl
Pulverisert morsmelkerstatning, ikke-probiotisk	300 g	2700 mL BPW (ISO) (1:10)	Forvarmet 37	18–24	20 µl
Pulverisert morsmelkerstatning og pulverisert kornblanding for babyer med probiotika	300 g	2700 mL BPW (ISO) + 10 mg/l vancomycin	Forvarmet 37	22-24	20 µl
Laktose	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl
Miljøsvamp med 10 ml D/E nøytraliserende buljong	1 prøvetaker	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl

1. Bruk **forvarmet** BPW ISO hvis anrikningsbuljongs volum er > 300 ml.

NF VALIDATION av AFNOR Certification

3M 01/20-03/18

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

For mer informasjon om utløp av validitet, henvises det til NF VALIDATION-sertifikat tilgjengelig på nettstedet nevnt ovenfor.

NF VALIDATION sertifisert metode i henhold til ISO 16140-2[(9)] sammenlignet med ISO 22964.

Omfang av godkjenningen: Pulverisert morsmelkerstatning og pulverisert kornblanding for babyer uten probiotika, råmaterialer og miljøprøver.

Prøveklargjøring: Prøver skal klargjøres i henhold til EN ISO 22694[(2)] og EN ISO 6887[(7, 8)].

Programvareversjon: Se sertifikat.

Tabell 4. Anrikningsprotokoller i henhold til NF VALIDATION sertifisert metode 3M 01/20-03/18

Prøvematrise	Prøvestørrelse	Volum anrikningsbuljong[1]	Anrikningstemperatur (± 1 °C)	Anrikningstid (timmer)	Prøveanalysevolum	Anbefalt avbruddspunkt[2, 3]
• Pulverisert morsmelkerstatning • Pulverisert kornblanding for babyer • Ingredienser som for eksempel tørrmelkpulver, soyapulver, mysepulver, laktose, rismel og maltodekstrin • Tørre miljøprøver som støv, feiing, vakuuminnsamling,	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl	Anrikningsbuljongen eller prøvelyseringen kan oppbevares ved 2–8 °C i opptil 72 timer
• Svamp, skyllevann, vaskeservietter	1 prøvetaker eller 10 ml					Anrikningsbuljongen eller prøvelyseringen kan oppbevares ved 2–8 °C i opptil 72 timer
Pulverisert morsmelkerstatning og pulverisert kornblanding for babyer (ikke-probiotisk)	30-300 g	BPW ISO (1:10)	37	18–24	20 µl	Anrikningsbuljongen eller prøvelyseringen kan oppbevares ved 2–8 °C i opptil 72 timer
Pulverisert kornblanding for babyer og pulverisert morsmelkerstatning (inkludert probiotika)	30-300 g	BPW (ISO) + 10 mg/l vancomycin (1:10)	37	22-24	20 µl	Ingen

1. Bruk forvarmet BPW ISO hvis anrikningsbuljongs volum er > 300 ml (f.eks. hvis prøven er > 30 gram).
2. Etter at anrikningsbuljongen tas ut fra oppbevaring, gjenopptas testingen fra trinn 1 i delen Lysering. Etter at prøvelyseringen tas ut fra oppbevaring, gjenopptas testingen fra trinn 7 i delen Lysering.
3. Se i vedlegg A for ny testing av varmebehandlede lysate.

Klargjøring av Neogen® Brett til hurtiglading for molekylær deteksjon

1. Væt en klut med 1–5 % (volumandel i vann) husholdningsblekemiddel og tørk av Neogen Brett til hurtiglading for molekylær deteksjon.
2. Skyll Neogen Brett til hurtiglading for molekylær deteksjon med vann.
3. Bruk en engangsklut til å tørke Neogen Brett til hurtiglading for molekylær deteksjon.
4. Sørg for at Neogen Brett til hurtiglading for molekylær deteksjon er tørt før bruk.

Klargjøring av Neogen® Kjøleblokkinnsats for molekylær deteksjon

Plasser Neogen Kjøleblokkinnsats for molekylær deteksjon direkte på laboratoriebenken: Neogen Brett til kjøleblokk for molekylær deteksjon er ubrukt. Bruk kjøleblokken ved laboratoriets romtemperatur (20–25 °C).

Klargjøring av Neogen® Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon

Plasser Neogen Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon i en tørr, dobbelblokkvarmeenhet. Slå på den tørre blokkvarmeenheten og still inn temperaturen slik at Neogen Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon når og opprettholder en temperatur på 100 ±1 °C.

MERK: Avhengig av varmeenheten, skal Neogen Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon bruke omtrent 30 minutter på å nå temperaturen. Bruk et passende, kalibrert termometer (f.eks. et delvis nedsenket termometer eller et digitalt termoelement-termometer, ikke et helt nedsenket termometer) plassert på angitt sted og verifiser at Neogen Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon er ved 100 ±1 °C.

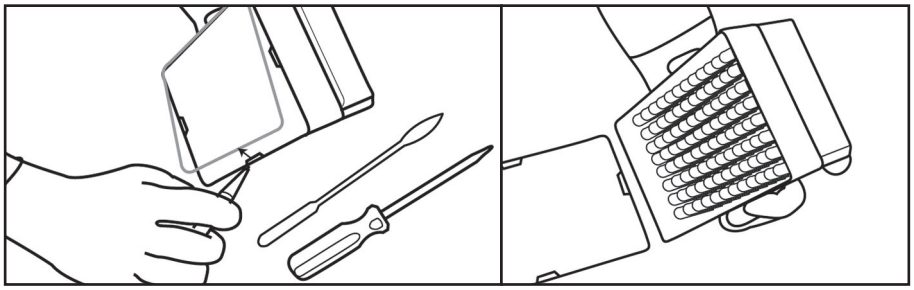
Klargjøring av Neogen® Instrument for molekylær deteksjon

1. Start programvaren Neogen® molekylær deteksjon og logg inn. Kontakt Neogen Food Safety-representanten for å få bekreftet at du har den nyeste versjonen av programvaren.
2. Slå på Neogen Instrument for molekylær deteksjon.
3. Opprett eller endre en gjennomkjøring med data for hver prøve. Se brukermanualen for Neogen System for molekylær deteksjon for mer informasjon.

MERK: Neogen Instrument for molekylær deteksjon må nå klar tilstand før innsetting av Neogen Brett til hurtiglading for molekylær deteksjon med reagensrør. Dette varmetrinnet tar omtrent 20 minutter og indikeres av et ORANSJE lys på instrumentets statuslinje. Når instrumentet er klart for å starte en gjennomkjøring, vil statuslinjen lyse GRØNT.

Lysering

Fjerne bunnen av stativet med Neogen lyseringsoppløsningsrør med en skrutrekker før du plasserer den i Neogen Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon.



1. La Neogen lyseringsoppløsningsrørene varmes opp ved å sette stativet i omgivelsestemperatur (20–25 °C) over natten (16–18 timer). Alternativer til å stabilisere Neogen lyseringsoppløsningsrørene til omgivelsestemperatur er å sette Neogen lyseringsoppløsningsrørene på laboratoriebenken i minst 2 timer, inkubere Neogen lyseringsoppløsningsrørene i en inkubator ved 37 ± 1 °C i 1 time, eller plassere dem i en tørr dobbelblokkvarmeenhet i 30 sekunder ved 100 ± 1 °C.
2. Vend rørene med hetten på for å blande. Fortsett til neste trinn innen 4 timer etter invertering.
3. Fjern anrikningsbuljongen fra inkubatoren.
4. Ett Neogen lyseringsoppløsningsrør kreves for hver prøve og NC-prøve (sterilt anrikningsmedium).
   - 4.1 Rekker med Neogen lyseringsoppløsningsrør kan klippes til ønsket antall rør. Velg det nødvendige antallet enkeltstående Neogen lyseringsoppløsningsrør eller rekker med 8 rør. Plasser Neogen lyseringsoppløsningsrørene i et tomt stativ.
   - 4.2 For å unngå krysskontaminering skal kun én rekke med Neogen lyseringsoppløsningsrør åpnes om gangen og en ny pipettespiss brukes for hvert overføringstrinn.
   - 4.3 Overfør anriket prøve til Neogen lyseringsoppløsningsrørene som beskrevet under:

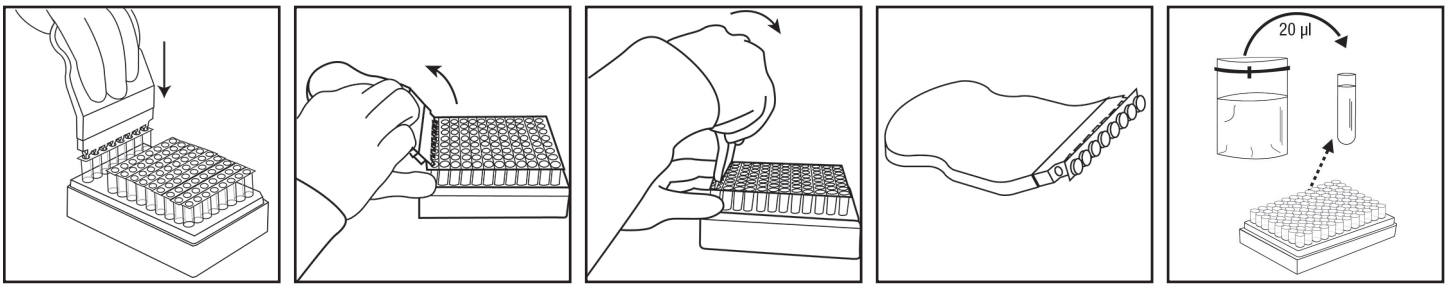
     Overfør hver anrikede prøve til enkeltstående Neogen lyseringsoppløsningsrør **først.** Overfør NC-prøven **til sist.**
   - 4.4 Bruk Neogen® Verktøy for lukking/åpning av lyseringsrør for molekylær deteksjon for å åpne én rekke med Neogen lyseringsoppløsningsrør – én rekke om gangen.
   - 4.5 Kast lokket på Neogen lyseringsoppløsningsrøret – dersom lysatet skal oppbevares for ny test, plasseres lokkene i en ren beholder for å sette dem på igjen etter lysering.

     4.5.1. Se vedlegg A for prosessering av tilbakeholdt lysat.

4.6 Agiter anrikningsposen før du samler prøven fra den filtrerte siden når du arbeider med viskøse prøver.

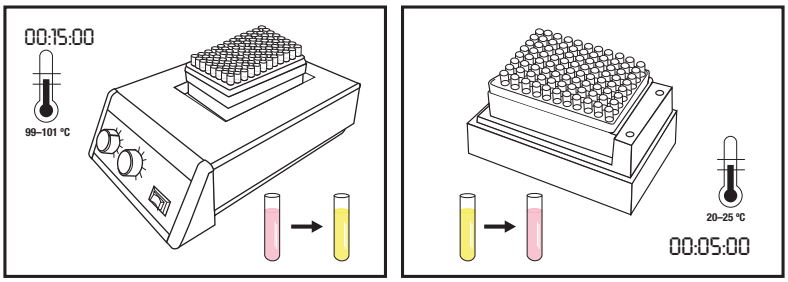
4.7 Overfør 20 µl med prøve til et Neogen lyseringsoppløsningsrør, med mindre noe annet er indikert i protokolltabellen.

5. Gjenta trinn 4.4 til 4.7 til alle individuelle prøver er lagt til et korresponderende Neogen lyseringsoppløsningsrør i rekken.



6. Når alle prøvene er overført, overføres 20 µl av NC (sterilt anrikningsmedium, f.eks. BPW) inn i et Neogen lyseringsoppløsningsrør. Ikke bruk vann som NC.
7. Verifiser at Neogen Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon har en temperatur på 100 ±1 °C.
8. Plasser det utildekkede stativet med Neogen lyseringsoppløsningsrør i Neogen Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon og varm opp i 15 ± 1 minutter. Under oppvarmingen vil Neogen lyseringsoppløsningen endre farge fra rosa (kald) til gul (varm).

   Prøver som ikke har blitt ordentlig varmebehandlet under testlyseringstrinnet kan vurderes som en potensiell biologisk fare og skal IKKE settes inn i Neogen Instrument for molekylær deteksjon.
9. Fjern det utildekkede stativet med Neogen lyseringsoppløsningsrør fra Neogen varmeblokken for molekylær deteksjon og la det avkjøles i Neogen Kjøleblokkinnsats for molekylær deteksjon i minst 5 minutter og maksimum 10 minutter. Når Neogen Kjøleblokkinnsats for molekylær deteksjon, som brukes deteksjon bruke ved romtemperatur uten Neogen® Brett til kjøleblokk for molekylær deteksjon, skal det plasseres direkte på laboratoriebenken. Når den er avkjølt, vil Neogen lyseringsoppløsningen endre farge tilbake til rosa.
10. Fjern stativet med Neogen lyseringsoppløsningsrør fra Neogen Kjøleblokkinnsats for molekylær deteksjon.



Amplifikasjon

1. Ett reagensrør for Neogen Molekulær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* kreves for hver prøve og for NC.

   1.1 Rekker med rør kan klippes til ønsket antall rør. Velg det nødvendige antallet enkeltstående reagensrør eller rekker med 8 rør for Neogen Molekulær deteksjonskit 2 - *Cronobacter*.

   1.2 Plasser reagensrør for Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* i et tomt stativ.

   1.3 Unngå å forstyrre reagenspelletene i bunnen av rørene.
2. Velg ett Neogen Reagenskontroll-rør og plasser det i stativet.
3. For å unngå krysskontaminering, ta av lokket på én Neogen Molekulær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* rørrekke om gangen og bruk ny pipette ved hver prøveoverføring.
4. Overfør hvert lysat til reagensrør for Neogen Molekulær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* og et Neogen Reagenskontroll-rør som beskrevet nedenfor:

Overfør hvert prøvelysat til individuelle Neogen Molekulær deteksjonskit 2 - *Cronobacter*-reagensrør SR-rør **først** etterfulgt av NC. Hydrer Neogen Reagenskontroll-røret til **sist.**

5. Bruk Neogen® Verktøy for lukking/åpning av reagensrør for molekylær deteksjon for å åpne én rekke med reagensrør for Neogen Molekulær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* – én rekke om gangen. Kast lokket.

   5.1 **Overfør 20 µl av prøvelysatet fra den øverste halvdelen av væsken (unngå presipitat) i Neogen lyseringsoppløsningsrøret til det korresponderende reagensrøret for Neogen Molekulær deteksjonskit 2 - *Cronobacter*. Hold i vinkel under overføring for å unngå å forstyrre pelletene. Bland ved å bevege pipetten forsiktig opp og ned 5 ganger.**

   5.2 Gjenta trinn 5.1 til individuelt prøvelysat har blitt lagt til i et korresponderende reagensrør for Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* i rekken.

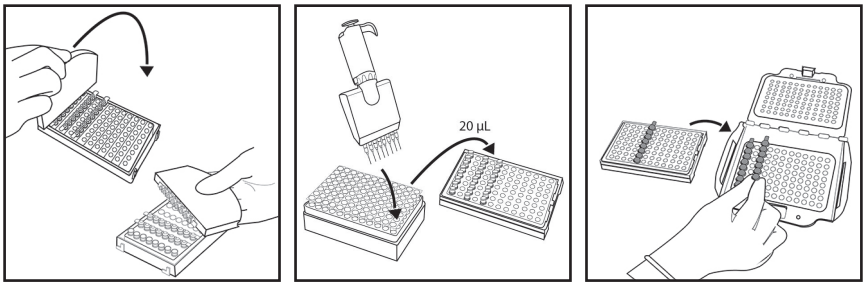
   5.3 Tildekk reagensrørene for Neogen Molekulær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* med de medfølgende ekstra lokkene, og bruk den avrundede siden av Neogen Verktøy for lukking/åpning av reagensrør for molekylær deteksjon til å presse i en fram-og-tilbake-bevegelse slik at lokket festes godt.

   5.4 Gjenta trinn 5.1 til 5.3 som nødvendig, for det antall valgte prøver som skal testes.

   5.5 Når alt prøvelysatet er overført, gjentas trinn 5.1 til 5.3 for å overføre 20 ml med NC-lysat inn i et reagensrør for Neogen Molekulær deteksjonskit 2 - *Cronobacter*.

   5.6 Overfør **20 µl med NC-lysat inn i et Neogen Reagenskontroll-rør**. Hold i vinkel under overføring for å unngå å forstyrre pelletene. Bland ved å bevege pipetten forsiktig opp og ned 5 ganger.

6. Sett lukkede rør over i et rent og dekontaminert Neogen Brett til hurtiglading for molekylær deteksjon. Lukk og lås lokket til Neogen Brett til hurtiglading for molekylær deteksjon.



7. Se igjennom og bekreft den konfigurerte gjennomkjøringen i programvaren for Neogen Molekylær deteksjon.
8. Klikk på startknappen i programvaren og velg instrumentet som skal brukes. Det valgte instrumentets lokk åpnes automatisk.
9. Plasser Neogen Brett til hurtiglading for molekylær deteksjon inn i Neogen Instrument for molekylær deteksjon og lukk lokket for å starte testen. Resultatene er klare innen 60 minutter, mens positive resultat kan bli oppdaget raskere.
10. Etter at testen er fullført, fjern Neogen Brett til hurtiglading for molekylær deteksjon fra Neogen Instrument for molekylær deteksjon og kvitt deg med rørene ved å senke dem i en 1–5 % (volumandel i vann) husholdningsblekemiddel i 1 time og borte fra testens forberedelsesområde.

MERKNAD: For å minimere risikoen for falske positive resultater på grunn av krysskontaminering skal aldri reagensrør som inneholder amplifisert DNA, åpnes. Dette inkluderer reagensrør for Neogen Molekulær deteksjonskit 2 - *Cronobacter*, Neogen Reagenskontroll-rør og Neogen matrisekontrollrør. Kvitt deg alltid med de forseglede rørene ved å senke dem i et 1–5 % (volumandel i vann) husholdningsblekemiddel i 1 time og borte fra testens forberedelsesområde.

Resultater og tolkning

En algoritme tolker lyseffektskurven som er resultatet av deteksjonen av nukleinsyre-amplifikasjon. Resultatene analyseres automatisk av programvaren og er fargekodet basert på resultatet. Et positivt eller negativt resultat fastslås av analysen av flere unike kurveparametere. Antatt positive resultater rapporteres i sanntid, mens negative og «Inspect» (inspiser)-resultater vil vises etter at gjennomkjøringen er fullført.

MERK: Ikke engang en negativ prøve vil gi et null-resultat ettersom systemet og amplifikasjonsreagensene til Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter* har en «bakgrunns»-, relativ lysenhet (RLU).

Bekreftelse

- Bekreftelse av resultatene i henhold til NF Validation sertifisert metode

I forbindelse med NF VALIDATION må alle antatte positive anrikninger bekreftes ved å følge referansemetode for bekreftelse[2], som begynner med overføring fra den primære anrikningen (BPW ISO elle BPW ISO supplert med 10 mg/l av vancomycin).

- Annen bekreftelsesprotokoll

Antatte positive anrikninger må bekreftes i henhold til laboratoriets standard operasjonsprosedyrer eller ved å følge den aktuelle referansemetoden for bekreftelse[1,2], som begynner med overføring fra den primære anrikningen (BPW ISO elle BPW ISO supplert med 10 mg/l av vancomycin) til sekundære anrikningsmedia, etterfulgt av videre plating og bekreftelse av isolater ved å bruke de riktige biokjemiske, serologiske og/eller molekylære metodene.

I et sjeldent tilfelle av eventuelle uvanlige lyseffekter, merker algoritmen dette som Inspect. Neogen anbefaler brukeren å gjenta testen for alle «Inspect»-prøver. Dersom resultatet fortsatt er «Inspect», fortsett til bekreftelsestesten og bruk av din foretrukne metode eller som oppgitt av lokale forskrifter[1,2].

I tilfelle av forskjellige svar (antatt positiv med Neogen Molekylær deteksjonskit 2 - *Cronobacter*, ikke bekreftet av én av metodene beskrevet ovenfor), må laboratoriet følge etablerte standard operasjonsprosedyrer for å rapportere resultatene.

Hvis du har spørsmål om spesifikke bruksområder eller prosedyrer, besøk vårt nettsted på www.neogen.com eller kontakt den lokale Neogen-representanten eller forhandleren.

Vedlegg A. Avbrytelse av protokoll: Oppbevaring og ny testing av varmebehandlede lysater

1. Lukk igjen lyseringsrøret med et rent lokk for å oppbevare et varmebehandlet lysat (se del 4.5 **Lysering**)
2. Oppbevar ved 2 til 8 °C i opptil 72 timer.
3. Bland en oppbevart prøve ved å vende den 2–3 ganger for å forberede den på amplifikasjon.
4. Åpne rørene.
5. Plasser de blandede lysatrørene på Neogen Varmeblokkinnsats for molekylær deteksjon og varm ved 100 ±1 °C i 5 ±1 minutter.
6. Fjern stativet med Neogen lyseringsoppløsningsrør fra varmeblokken og la det avkjøles i Neogen Kjøleblokkinnsats for molekylær deteksjon i minst 5 minutter og maksimum 10 minutter.
7. Se delen **Amplifikasjon** beskrevet ovenfor for å fortsette protokollen.

Referanser:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
8. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

Se gjeldende versjoner av standardmetodene oppført ovenfor.

Symbolforklaring

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

Julkaisuajankohta: 2024-01

NEOGEN

Tuoteseloste

Molecular Detection -testipakkaus 2 – *Kronobakteeri*

Tuotteen kuvaus ja käyttötarkoitus

Neogen® Molecular Detection -testipakkaus 2 – *Kronobakteeri* on tarkoitettu käytettäväksi yhdessä Neogen® Molekyläärisen testijärjestelmän kanssa *Kronobakteeri*-suvun bakteerien nopeaan ja täsmälliseen tunnistamiseen rikastetuista elintarvikenäytteistä ja elintarvikevalmistuksen ympäristönäytteistä.

Neogen Molekyläariset testipakkaukset perustuvat nukleiinihapposekvenssien nopeaan, täsmälliseen ja herkkään silmukkavälitteiseen isotermiseen monistamismenetelmään (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) ja käyttävät monistuksen havaitsemiseen bioluminesenssia. Oletetut positiiviset tulokset ilmoitetaan reaaliaikaisesti, kun taas negatiiviset tulokset näytetään testin valmistumisen jälkeen. Oletetut positiiviset tulokset on vahvistettava käyttämällä itse parhaaksi katsottua tai paikallisten määräysten mukaista menetelmää[1, 2].

Neogen Molecular Detection -testipakkaus 2 – *Kronobakteeri* on tarkoitettu laboratoriotekniikoihin koulutettujen ammattilaisten käytettäväksi laboratorioympäristössä. Neogen ei ole osoittanut tuotetta käytettäväksi muilla kuin elintarvike- ja
juomateollisuuden aloilla. Neogen ei esimerkiksi ole osoittanut tuotetta lääke- tai kosmetiikkanäytteiden testaamiseen eikä kliinisten tai eläinlääketieteellisten näytteiden testaamiseen. Neogen Molecular Detection -testipakkaus 2 – *Kronobakteeri* ei ole arvioitu kaikkien mahdollisten elintarviketuotteiden, elintarvikeprosessien tai testauskäytäntöjen suhteen eikä kaikkien mahdollisten bakteerikantojen suhteen.

Kuten kaikkien testausmenetelmien tapauksessa, rikastusalustan lähde, koostumus ja laatu voivat vaikuttaa tuloksiin. Esimerkiksi näytteenottomenetelmät, testauskäytännöt, näytteiden valmistelu mukaan lukien homogenointi ja sekoittaminen, käsittely ja laboratoriotekniikka saattavat myös vaikuttaa tuloksiin. Neogen suosittelee menetelmän sekä rikastusalustan arviointia käyttäjän ympäristössä käyttäen riittävän suurta näytemäärää ja tiettyjä elintarvike- tai ympäristönäytteitä ja mikrobisisältöjä sen varmistamiseksi, että menetelmät vastaavat käyttäjän vaatimuksia.

Neogen on arvioinut Neogen Molecular Detection -testipakkauksen 2 – *Kronobakteeri* käyttäen rikastusalustana puskuroitua peptonivettä (ISO).

Neogen® Molekyläärinen testi-instrumentti on tarkoitettu käytettäväksi sellaisten näytteiden kanssa, jotka on lämpökäsitelty testin lyysivaiheen aikana näytteessä olevien organismien tuhoamiseksi. Jos näytteitä ei ole asianmukaisesti lämpökäsitelty testin lyysivaiheen aikana, ne saattavat muodostaa biologisen vaaratekijän, jolloin niitä EI saa asettaa Neogen Molekyläariseen testi-instrumenttiin.

Neogen Food Safety -osaston suunnittelu- ja valmistusmenetelmät on ISO (International Organization for Standardization) 9001 -sertifioitu.

Neogen Molecular Detection -testipakkaus 2 – *Kronobakteeri* sisältää 96 testiä, jotka on kuvattu taulukossa 1.

Taulukko 1. Neogen Molecular Detection -testipakkauksen osat

Nimike	Tunnusmerkki	Määrä	Sisältö	Kommentit
Neogen® Lyysiliuos (LS)	Vaaleanpunainen liuos läpinäkyvissä putkissa	96 (12 kpl 8 putken liuskoja)	580 µl lyysiliuosta/ putki	Telineessä ja käyttövalmis
Neogen® Molecular Detection -testipakkaus 2 – *Kronobakteeri* -reagenssiputket	Oranssit/punaiset putket	96 (12 kpl 8 putken liuskoja)	Lyofilisoitu spesifi monistus- ja tunnistusyhdistelmä	Käyttövalmis
Lisäsuojukset	Oranssit/punaiset suojukset	96 (12 kpl 8 suojuksen liuskoja)		Käyttövalmis
Neogen® Reagenssin valvonta (RC)	Läpinäkyvät flip-top-putket	16 (2 pussia, joissa kummassakin 8 yksittäistä putkea)	Lyofilisoitu kontrolli-DNA, monistus- ja tunnistusyhdistelmä	Käyttövalmis

Negatiivinen kontrolli, jota ei toimiteta paketin mukana, on steriili rikastusaine, esim. BPW ISO. Älä käytä vettä negatiivisena kontrollina.

Turvallisuus

Käyttäjän on luettava ja ymmärrettävä kaikki Neogen Molekylääristä testijärjestelmää ja Neogen Molecular Detection -testipakkausta 2 – *Kronobakteeri* koskevat turvallisuusohjeet ja noudatettava niitä. Säilytä turvallisuusohjeet myöhempää käyttöä varten.

⚠**VAROITUS:** Osoittaa vaarallisen tilanteen, joka saattaa johtaa kuolemaan tai vakavaan loukkaantumiseen ja/tai omaisuusvahinkoon, jos tilannetta ei vältetä.

HUOMAUTUS: Osoittaa mahdollisesti vaarallisen tilanteen, joka saattaa johtaa aineelliseen vahinkoon, jos tilannetta ei vältetä.

⚠ VAROITUS

Älä käytä Neogen Molecular Detection -testipakkausta 2 – *Kronobakteeri* ihmisten tai eläinten diagnosointiin.

Käyttäjän on järjestettävä henkilökunnalleen koulutusta ajantasaisista ja asianmukaisista testausmenetelmistä, esimerkiksi Good Laboratory Practices[3], ISO/IEC 17025[4] tai ISO 7218[5].

Väärien negatiivisten tulosten vuoksi markkinoille voi päästä kontaminoituneita tuotteita. Voit vähentää tähän liittyvä riskejä toimimalla seuraavasti:

- Noudata käytäntöä ja tee testit täsmälleen tuoteselosteessa esitetyllä tavalla.
- Säilytä Neogen Molecular Detection -testipakkausta 2 – *Kronobakteeri* pakkausmerkintöjen ja tuoteselosteen mukaan.
- Käytä Neogen Molecular Detection -testipakkaus 2 – *Kronobakteeri* aina ennen viimeistä käyttöpäivää.
- – Käytä Neogen Molecular Detection -testipakkaus 2 – *Kronobakteeri* elintarvikenäytteille ja elintarvikevalmistuksen ympäristönäytteille, jotka on hyväksytty sisäisesti tai kolmannen osapuolen toimesta.
- Käytä Neogen Molecular Detection -testipakkausta 2 – *Kronobakteeri* vain sellaisten pintojen, puhdistusaineiden, käytäntöjen ja bakteerikantojen kanssa, jotka on hyväksytty sisäisesti tai kolmannen osapuolen toimesta.
- Laimenna ympäristönäytteet, joissa käytetään aryylisulfonaattikompleksia sisältävää neutraloivaa puskuria, suhteessa 1:2 ennen testausta (1 osa näytettä 1 osaan steriiliä rikastusliuosta). Toinen vaihtoehto on siirtää 10 µl neutraloivaa puskuririkastusliuosta Neogen-lyysiliuosputkiin. Neogen®-näytteiden käsittelytuotteet, jotka sisältävät aryylisulfonaattikompleksia sisältävää neutraloivaa puskuria, ovat seuraavat: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G ja HS2410NB2G. Tätä käytäntöä ei ole testattu NF Validation -tutkimuksessa.

Vähennä kemikaaleille altistumiseen ja biologisiin vaaratekijöihin liittyviä riskejä noudattamalla seuraavia ohjeita:

- Testaa taudinaiheuttajat asianmukaisesti varustetussa laboratoriossa koulutetun henkilöstön valvonnassa. Inkuboitu rikastusaine ja laitteet tai pinnat, jotka ovat joutuneet kosketuksiin inkuboidun rikastusaineen kanssa, saattavat sisältää taudinaiheuttajia määrän, joka riittää aiheuttamaan vaaran ihmisten terveydelle.
- Noudata aina laboratorioiden vakioturvallisuuskäytäntöjä, joihin kuuluu asianmukaisten suojavaatteiden ja silmäsuojainten käyttäminen reagensseja ja kontaminoituja näytteitä käsiteltäessä.
- Vältä kosketusta rikastusalustan ja reagenssiputkien sisällön kanssa monistuksen jälkeen.
- Hävitä rikastetut näytteet ja niihin liittyvä jäte voimassa olevien paikallisten, alueellisten tai kansallisten määräysten mukaisesti.
- Älä ylitä lämmityslaitteeseen merkittyä suositeltua lämpötila-asetusta.
- Älä ylitä suositeltua kuumennusaikaa.
- Tarkasta Neogen® Molekylääräisen testilämpölohkon pistokkeen lämpötila tarkoituksenmukaisella kalibroidulla lämpömittarilla (esim. osittain upotettavalla lämpömittarilla tai digitaalisella termoparimittarilla, ei kokonaan upotettavalla lämpömittarilla). Lämpömittari on asetettava sille määrättyyn paikkaan Neogen Molekylääräisen testilämpölohkon pistokkeessa.

Vähennä ristikontaminaatioon liittyviä riskejä testin valmistelun yhteydessä toimimalla seuraavasti:

- Käytä aina suojakäsineitä (käyttäjän suojaamiseksi ja nukleaasien siirtymisen estämiseksi).

Jotta voit vähentää kuumille nesteille altistumisesta aiheutuvia riskejä, noudata seuraavia ohjeita:

- Älä ylitä lämmityslaitteeseen merkittyä suositeltua lämpötila-asetusta.
- Älä ylitä suositeltua kuumennusaikaa.
- Tarkasta Neogen® Molekylääräisen testilämpölohkon pistokkeen lämpötila tarkoituksenmukaisella kalibroidulla lämpömittarilla (esim. osittain upotettavalla lämpömittarilla tai digitaalisella termoparimittarilla, ei kokonaan upotettavalla lämpömittarilla). Lämpömittari on asetettava sille määrättyyn paikkaan Neogen Molekylääräisen testilämpölohkon pistokkeessa.

HUOMAUTUS

Vähennä ristikontaminaatioon liittyviä riskejä testin valmistelun yhteydessä toimimalla seuraavasti:

- Vaihda käsineet ennen reagenssipelletin kastelemista.
- Steriilien aerosoliesteen muodostavien molekyylibiologiaan soveltuvaa laatua olevien pipetinkärkien (suodatinkärkien) käyttö on suositeltavaa.
- Käytä jokaisen näytteen siirtämiseen uutta pipetinkärkeä.
- Käytä näytteiden siirtämiseen rikastamisesta lyysiputkeen hyviä laboratoriokäytäntöjä. Pipetoijan kontaminoitumisen välttämiseksi käyttäjä voi halutessaan lisätä ylimääräisen siirtovaiheen. Jokaisen rikastetun näytteen voi esimerkiksi siirtää steriiliin putkeen.
- Jos mahdollista, käytä molekyylibiologista työasemaa, jossa on bakteerintuholamppu.
- Steriloi laboratorion työtasot ja välineet (pipetit, sulku- ja avaustyökalut jne.) säännöllisesti 1–5-prosenttisella (veteen laimennetulla) talouskäyttöisellä valkaisuaineliuoksella tai DNA:n poistoliuoksella.

Vähennä vääriin positiivisiin tuloksiin liittyviä riskejä toimimalla seuraavasti:

- Älä avaa putkia monistuksen jälkeen.
- Hävitä kontaminoituneet putket aina liottamalla niitä 1–5-prosenttisessa (veteen laimennetussa) valkaisuaineliuoksessa 1 tunnin ajan etäällä testin valmistelualueelta.
- Älä koskaan autoklavoi reagenssiputkia monistuksen jälkeen.
- Jos näytteiden epäillään sisältävän runsaasti *Kronobakteeri*-DNA:ta (esim. DNA:ta elinkelvottomista *Kronobakteeri*-soluista inaktivointivaiheen jälkeen) oletetut positiiviset rikastetut näytteet on käsiteltävä DNaasilla ennen **lyysi**vaihetta. Pyydä tarvittaessa lisäohjeita Neogen-edustajalta. Tätä käytäntöä ei ole testattu NF Validation -tutkimuksessa.

Katso lisätietoja hävittämisestä ja paikallisista määräyksistä käyttöturvallisuustiedotteesta.

Jos sinulla on jotain tiettyä sovellusta tai menetelmää koskevia kysymyksiä, käy verkkosivuillamme osoitteessa www.neogen.com tai ota yhteyttä paikalliseen Neogen-edustajaan tai -jälleenmyyjään.

Käyttäjän vastuu

Käyttäjän vastuulla on tutustua tuotteen käyttöohjeisiin ja tietoihin. Saat lisätietoja käymällä verkkosivustollamme osoitteessa **www.neogen.com** tai ottamalla yhteyttä paikalliseen Neogen-tytäryhtiöön tai -jälleenmyyjään.

Testausmenetelmää valitessa on tärkeää ottaa huomioon, että ulkoiset tekijät, kuten näytteenottomenetelmät, testauskäytännöt, näytteiden valmistus mukaan lukien homogenaatio ja sekoitus, käsittely ja laboratoriotekniikat voivat vaikuttaa testaustuloksiin.

Käyttäjä on aina testausmenetelmää valitessaan vastuussa siitä, että hän arvioi riittävän määrän näytteitä kyseisistä elintarvikkeista ja mikrobialtistuksista varmistamaan käyttäjän kriteerien täyttymisen.

Käyttäjän vastuulla on myös varmistaa, että testausmenetelmät ja tulokset täyttävät hänen asiakkaidensa tai toimittajiensa vaatimukset.

Kuten kaikkien testausmenetelmien kohdalla, minkä tahansa Neogen Food Safety -tuotteen käytöstä saavutetut tulokset eivät ole takuu matriisien tai testatuiden prosessien laadusta.

Voidakseen auttaa erilaisten matriisien arvioinnissa Neogen on kehittänyt Neogen® Molekyläärisen testitaulukon valvontapakkauksen. Määritä tarvittaessa matriisinvalvontapakkauksen avulla, vaikuttaako matriisi Neogen Molecular Detection -testipakkauksen 2 – *Kronobakteeri* tuloksiin. Testaa validointivaiheiden aikana useita matriisia edustavia näytteitä, ts. eri lähteistä saatuja näytteitä, kun olet ottamassa käyttöön Neogen-menetelmää tai kun olet testaamassa uusia tai tuntemattomia matriiseja tai matriiseja, joiden raaka-aineita tai valmistustapoja on muutettu.

Matriisi voidaan määrittää tuotetyypiksi, jolla on sisäisiä ominaisuuksia, kuten koostumus ja valmistustapa. Matriisien väliset erot voivat johtua niinkin yksinkertaisista tekijöistä kuin eroista niiden käsittelyssä tai esittämistavassa, esim. raaka tai pastöroitu, tuore tai kuivattu.

Takuiden rajoitukset / Rajoitettu korvaus

NEOGEN KIISTÄÄ KAIKKI NIMENOMAISET JA EPÄSUORAT TAKUUT MUKAAN LUKIEN KAIKKI TAKUUT KÄYPYYDESTÄ TAI SOPIVUUDESTA TIETTYYN KÄYTTÖTARKOITUKSEEN, PAITSI JOS TUOTEPAKKAUKSEN TAKUUOSIOSSA TOISIN MAINITAAN. Jos mikä tahansa Neogen Food Safety -tuote on viallinen, Neogen tai sen valtuutettu jälleenmyyjä joko korvaa tuotteen tai palauttaa sen ostohinnan. Nämä ovat ainoat myönnetyt korvaukset. Ota yhteyttä Neogen-edustajaasi tai valtuutettuun Neogen-jälleenmyyjään, jos sinulla on kysyttävää.

Neogen:n vastuun rajoitukset

NEOGEN EI OLE VASTUUSSA MENETYKSISTÄ TAI VAHINGOISTA, OLIVAT NE SITTEN SUORIA, EPÄSUORIA, ERITYISLAATUISIA, SATUNNAISIA TAI VÄLILLISIÄ, MUKAAN LUKIEN VOITONMENETYKSET. Missään tapauksessa Neogen:n vastuu ei minkään laillisen perusteen mukaan ole suurempi kuin vialliseksi väitetyn tuotteen hinta.

Säilytys ja hävittäminen

Säilytä Neogen Molecular Detection -testipakkaus 2 – *Kronobakteeri* 2–8 °C:n lämpötilassa. Suojattava jäätymiseltä. Säilytä paketti valolta suojattuna. Kun olet avannut paketin, tarkista, että foliopussi on ehjä. Ei saa käyttää, jos pussi on vahingoittunut. Avaamisen jälkeen käyttämättömät reagenssiputket on aina säilytettävä uudelleensuljettavassa pussissa, jonka sisällä on kuivausainetta lyofilisoitujen reagenssien stabiliteetin ylläpitämiseksi. Säilytä uudelleensuljettuja pusseja 2–8 °C:n lämpötilassa enintään 60 päivän ajan.

Älä käytä Neogen Molecular Detection -testipakkaus 2 – *Kronobakteeri* viimeisen käyttöpäivän jälkeen. Viimeinen käyttöpäivä ja eränumero on merkitty pakkauksen ulkopuolelle. Käytön jälkeen rikastusaine ja Neogen Molecular Detection -testipakkauksen 2 – *Kronobakteeri* putket voivat sisältää mahdollisesti patogeenisia aineita. Kun testi on suoritettu loppuun, noudata saastuneen jätteen hävittämisessä alan nykykäytäntöjä. Katso lisätietoja hävittämisestä ja paikallisista määräyksistä käyttöturvallisuustiedotteesta.

Käyttöohjeet

Noudata huolellisesti kaikkia ohjeita. Jos ohjeita ei noudateta, tulokset saattavat olla epätarkkoja.

Steriloi laboratorion työtasot ja välineet (pipetit, sulku- ja avaustyökalut jne.) säännöllisesti 1–5-prosenttisella (veteen laimennetulla) talouskäyttöisellä valkaisuaineliuoksella tai DNA:n poistoliuoksella.

Käyttäjän on suoritettava Neogen Molekyläärisen testijärjestelmän käyttäjäkoulutus, kuten asiakirjassa ”Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System”[6] kuvataan.

Katso erityisvaatimukset kohdasta Erikoisohjeet validoituja menetelmiä varten.

Taulukko 3 sisältää rikastusmenetelmät seuraavien mukaisesti: AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2018.01 ja *Performance Tested*℠ -sertifikaatti #101703

Taulukko 4 sisältää NF VALIDATION -sertifikaatin Neogen 01/20–03/18 mukaisen rikastuskäytännön

Näytteen rikastaminen

Taulukoissa 2, 3 tai 4 on nykyiset rikastuskäytäntöjen ohjeet elintarvike- ja ympäristönäytteille.

Käyttäjän vastuulla on vahvistaa vaihtoehtoisten näytteenotto- tai rikastuskäytäntöjen ja laimennussuhteiden soveltuvuus sen varmistamiseksi, että testimenetelmä vastaa käyttäjän kriteereitä.

Elintarvikkeet, ympäristön jauhenäytteet, pölynäytteet, pyyhkäisynäytteet ja sienellä otetut näytteet

1. Anna rikastusaineen lämpötilan tasaantua huoneenlämpöön (20–25 °C), ellei rikastuskäytännössä toisin mainita (katso taulukko 2, 3 tai 4).
2. Yhdistä rikastusalusta ja näyte aseptisesti ja homogenoi sekoittamalla, vatsasekoituksella, sekoitusalustalla tai käsin sekoittamalla 2 ± 0,2 minuuttia **tai kunnes kaikki kiinteät palat ovat täysin liuenneet ja rikastusliuos on homogenoitu**[7, 8].
    a. Esimerkiksi näytteiden valmistelu mukaan lukien homogenointi ja sekoittaminen, käsittely ja laboratoriotekniikka saattavat vaikuttaa tuloksiin.
    b. Erittäin hiukkaspitoisten näytteiden yhteydessä suositellaan käyttämään suodatinpusseja.
    c. Vedessä paisuville ja erittäin viskoosit matriisit (esim. viljat, tärkkelykset) suositellaan lisälaimennusta (> 1:10), kunnes viskositeetti on vähentynyt riittävästi, tai steriilin 1 % (w/v) alfa-amylaasin lisäämistä puskuroituun peptoniveteen (ISO)[8].
    d. Suurten viljanäytekokojen tapauksessa lisää jauhettu vilja hitaasti nesteeseen jatkuvasti sekoittaen, jotta rykelmiä ei muodostuisi.
3. Inkuboi noudattamalla asianmukaista käytäntötaulukkoa (katso taulukko 2, 3 tai 4).

Taulukko 2. Yleiset rikastuskäytännöt

Näytematriisi	Näytteen koko[1]	Rikastusliemen tilavuus[1, 2]	Rikastuslämpötila (± 1 °C)	Rikastusaika (h)	Näyteanalyysin laajuus
Jauhemainen äidinmaidonkorvike ja raaka-aineet, kuten maitojauhe, soijajauho, herajauhe, laktoosi, riisijauho ja maltodekstriini	1X gramman näyte	9X ml BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl
Raakamateriaalit, kuten suolat, mineraalit, aminohapot, DHA (dokosaheksaeenihappo) ja vitamiinit	1X gramman näyte	99X ml BPW (ISO) (1:100)	37	18–24	20 µl
Kuivat ympäristönäytteet, kuten pöly, pyyhkäisynäytteet ja alipainenäytteet	1X gramman näyte	9X ml BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl
Ympäristönäyte sienessä, jossa on 10 ml Letheen-lientä tai neutraloivaa D/E-lientä	1 näytteenotin	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl

1. Neogen on arvioinut Neogen Molecular Detection -testipakkauksen 2 – *Kronobakteeri* käyttäen taulukon 2 laimennussuhteita 300 grammaan saakka. Käyttäjän vastuulla on vahvistaa vaihtoehtoisten laimennussuhteiden tai käytäntöjen soveltuvuus sen varmistamiseksi, että menetelmä vastaa käyttäjän kriteereitä.
2. Käytä **esilämmitettyä** BPW ISO -ainetta, mikäli rikastusliemen tilavuus on > 300 ml (esim. näyte on > 30 grammaa).

Erikoisohjeet validoituja menetelmiä varten

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

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

PERFORMANCE TESTED
AOAC
RESEARCH INSTITUTE
LICENSE NUMBER 101703

Tutkimuslaitos AOAC:n OMA℠- ja PTM℠-ohjelmissa Neogen Molekulaarinen testisetti 2 – *Kronobakteeri* todettiin tehokkaaksi *kronobakteerin havaitsemismenetelmäksi.* Tutkimuksessa testatut matriisit näkyvät taulukossa 3.

Taulukko 3. Rikastuskäytännöt AOAC® *OMA*℠ 2018.01:n ja *PTM*℠ 101703:n mukaan

Näytematriisi	Näytteen koko	Rikastusliemen tilavuus[1]	Rikastuslämpötila (± 1 °C)	Rikastusaika (h)	Näyteanalyysin laajuus
Jauhemainen äidinmaidonkorvike ja jauhemainen vauvojen puuro	10 g	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl
Jauhemainen vauvojen puuro, ei probiootteja	300 g	2700 ml BPW (ISO) (1:10)	Esilämmitetty 37	18–24	20 µl
Jauhemainen äidinmaidonkorvike ja jauhemainen vauvojen puuro probiooteilla	300 g	2700 ml BPW (ISO) + 10 mg/l vankomysiini	Esilämmitetty 37	22–24	20 µl
Laktoosi	10 g	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl
Ympäristönäyte sienessä, jossa on 10 ml neutraloivaa D/E-lientä	1 näytteenotin	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl

1. Käytä **esilämmitettyä** BPW (ISO) -ainetta, mikäli rikastusliemen tilavuus on > 300 ml.

AFNOR Certificationin myöntämä NF VALIDATION -sertifikaatti

3M 01/20–03/18
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

Lisätietoja validointiajan päättymisestä on NF VALIDATION -sertifikaatissa, joka on saatavissa edellä mainitusta verkkosivustosta.

NF VALIDATION -sertifioitu ISO 16140-2[9] -standardin mukainen menetelmä verrattuna ISO 22964 -standardiin.

Validoinnin soveltamisala: Jauhemainen äidinmaidonkorvike ja vauvan puurot probiooteilla ja ilman, raakamateriaalit ja ympäristönäytteet.

Näytteiden valmistaminen: Näytteiden valmistamisessa on noudatettava standardeja EN ISO 22694[2] ja EN ISO 6887[7, 8].

Ohjelmistoversio: Katso sertifikaatista.

Taulukko 4. NF VALIDATION -sertifioidun 3M 01/20–03/18 -menetelmän mukaiset rikastusmenetelmät

Näytematriisi	Näytteen koko	Rikastusliemen tilavuus[1]	Rikastuslämpötila (± 1 °C)	Rikastusaika (tuntia)	Näyteanalyysin laajuus	Suositeltu keskeytyspiste[2, 3]
• Jauhemainen äidinmaidonkorvike • Jauhemainen vauvojen puuro • Raaka-aineet, kuten maitojauhe, soijajauho, herajauhe, laktoosi, riisijauho, maltodekstriini. • Kuivat ympäristönäytteet, kuten pöly, pyyhkäisynäytteet ja alipainenäytteet.	10 g	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl	Rikastuslientä tai näytelysaattia voidaan säilyttää 2–8 °C:ssa enintään 72 tuntia
• Sieni, huuhteluvesi, pyyhkeet	1 näytteenotin tai 10 ml					Rikastuslientä tai näytelysaattia voidaan säilyttää 2–8 °C:ssa enintään 72 tuntia
Jauhemainen äidinmaidonkorvike ja jauhemainen vauvojen puuro (ei probiootteja)	30–300 g	BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl	Rikastuslientä tai näytelysaattia voidaan säilyttää 2–8 °C:ssa enintään 72 tuntia
Jauhemainen vauvojen puuro ja jauhemainen äidinmaidonkorvike (probiooteilla)	30–300 g	BPW (ISO) + 10 mg/l vankomysiini (1:10)	37	22–24	20 µl	Ei mitään

1. Käytä esilämmitettyä BPW ISO -ainetta, mikäli rikastusliemen tilavuus on > 300 ml (esim. näyte on > 30 grammaa).
2. Kun rikastusliemi on ollut säilöttynä ja otetaan käyttöön, aloita testaus uudelleen Lyysi-osion vaiheesta 1. Kun näytelysaatti on ollut varastoituna ja otetaan käyttöön, jatka testausta Lyysi-osion vaiheesta 7.
3. Lisätietoja säilytettyjen, lämpökäsiteltyjen lysaattien uudelleentestaamisesta on liitteessä A.

Neogen® Molekyläärisen testinopeuden latausalustan valmistelu

1. Kostuta liina tai kertakäyttöinen liina 1–5-prosenttisella (veteen laimennetulla) talouskäyttöisellä valkaisuliuoksella ja pyyhi Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalusta.
2. Huuhtele Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalusta vedellä.
3. Pyyhi Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalusta kuivaksi kertakäyttöisellä liinalla.
4. Varmista ennen käyttöä, että Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalusta on kuiva.

Neogen® Molekyläärisen testijäähdytyslohkon pistokkeen valmistelu

Aseta Neogen Molekyläärisen testijäähdytyslohkon pistoke suoraan laboratorion työtasolle: Neogen Molekyläärisen testijäähdytyslohkon alustaa ei käytetä. Käytä lohkoa laboratorion ilman lämpötilassa (20–25 °C).

Neogen® Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeen valmistelu

Aseta Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistoke kaksilohkoiseen kuivalämmityslaitteeseen. Kytke kuivalohkolämmitin päälle, aseta lämpötila ja anna Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeen lämmetä 100 ±1 °C:n lämpötilaan niin, että saavutettu lämpötila pysyy samana.

HUOMAA: Anna Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeen lämmetä asetuslämpötilaan noin 30 minuuttia lämmityslaitteen mukaan. Varmista tarkoituksenmukaisen kalibroidun lämpömittarin avulla (esim. osittain upotettava lämpömittari tai digitaalinen termoparimittari, ei kokonaan upotettava lämpömittari), joka on asetettu sille määrättyyn paikkaan, että Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeen lämpötila on 100 ±1 °C.

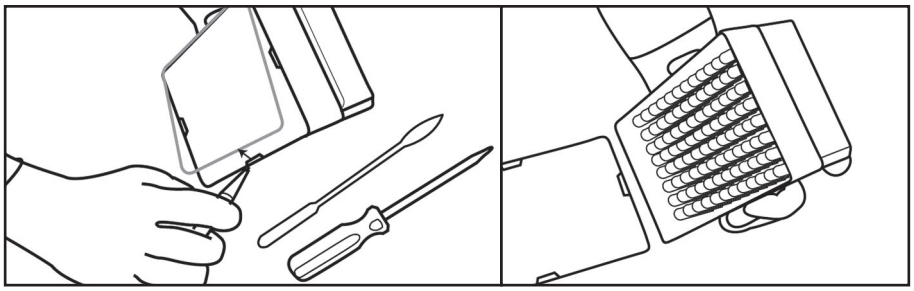
Neogen® Molekyläärisen testi-instrumentin valmistelu

1. Käynnistä Neogen® Molekyläärisen testijärjestelmän ohjelmisto ja kirjaudu sisään. Varmista Neogen Food Safety -edustajaltasi, että käytössäsi on ohjelmiston uusin versio.
2. Kytke Neogen Molekyläärinen testi-instrumentti päälle.
3. Luo tai muokkaa ajo kunkin näytteen tiedoille. Katso tarkemmat tiedot Neogen Molekyläärisen testijärjestelmän käyttöoppaasta.

HUOMAA: Neogen Molekyläärisen testi-instrumentin on saavutettava Valmis-tila ennen Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalustan ja reaktioputkien asettamista laitteeseen. Lämmitysvaihe kestää noin 20 minuuttia, ja sen merkiksi instrumentin tilarivillä palava oranssi valo. Kun instrumentti on valmis ajon käynnistämistä varten, tilarivin valo muuttuu VIHREÄKSI.

Lyysi

Poista Neogen Lyysiliuostelineen pohja ruuvimeisselillä ennen kuin asetat sen Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeeseen.

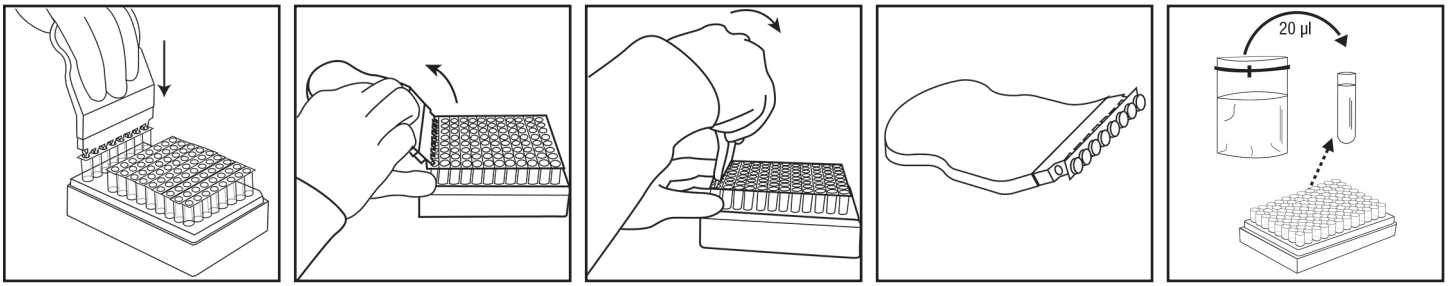


1. Anna Neogen Lyysiliuosputkien lämmetä jättämällä teline huoneenlämpöön (20–25 °C) yön yli (16–18 tunnin ajaksi). Neogen Lyysiliuosputket voi lämmittää huoneenlämpöön myös asettamalla ne laboratorion työtasolle vähintään 2 tunniksi, inkuboimalla Neogen Lyysiliuosputkia inkubaattorissa 37 ±1 °C:ssa 1 tunnin ajan tai asettamalla Neogen Lyysiliuosputket kaksilohkoiseen kuivalämmittimeen 100 ± 1 °C:n lämpötilaan 30 sekunniksi.
2. Sekoita suljetut putket kääntämällä ne ylösalaisin. Siirry seuraavaan vaiheeseen 4 tunnin kuluessa kääntämisestä.
3. Poista rikastusliemi inkubaattorista.
4. Jokaiselle näytteelle ja negatiiviselle kontrollinäytteelle (steriili rikastusaine) tarvitaan yksi Neogen Lyysiliuosputki.
   - 4.1 Neogen Lyysiliuos-putkiliuskat voidaan leikata haluttuun määrään. Valitse tarvittava yksittäisten Neogen Lyysiliuosputkien tai 8 putken liuskojen määrä. Aseta Neogen Lyysiliuosputket tyhjään telineeseen.
   - 4.2 Ristikontaminaation välttämiseksi poista suojus yhdestä Neogen Lyysiliuosputkiliuskasta kerrallaan ja käytä jokaiseen siirtovaiheeseen uutta pipettiä.
   - 4.3 Siirrä rikastettu näyte Neogen Lyysiliuosputkiin seuraavien ohjeiden mukaisesti:

     Siirrä jokainen rikastettu näyte **ensin** erilliseen Neogen Lyysiliuosputkeen. Siirrä negatiivinen kontrolli (NC) **viimeiseksi.**

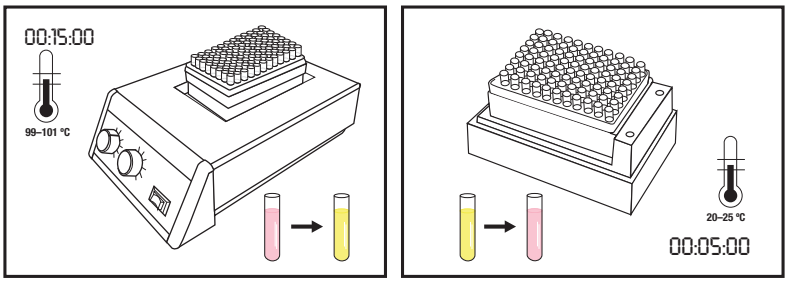
   - 4.4 Käytä Neogen® Molekyläärisen testin cap/decap-työkalua – Lysis yhden Neogen Lyysiliuosputkiliuskan avaamiseen. Avaa yksi liuska kerrallaan.
   - 4.5 Heitä Neogen Lyysiliuosputken suojus pois – jos lysaatti säilytetään uudelleentestausta varten, laita suojukset puhtaaseen astiaan lyysin jälkeistä uudelleenkäyttöä varten.
     - 4.5.1. Säilytetyn lysaatin käsittelyyn liittyvät ohjeet ovat liitteessä A.
   - 4.6 Sekoita rikastuspussia ennen kuin keräät näytteen suodatetulta puolelta, kuntyöskentelevätviskoosisten näytteiden kanssa.
   - 4.7 Siirrä 20 µl näytettä Neogen Lyysiliuosputkeen, jollei näytteenottokäytäntötaulukossa muuta mainita.

5. Toista vaiheet 4.4–4.7, kunnes kukin yksittäinen näyte on lisätty vastaavaan Neogen Lyysiliuosputkeen liuskassa.



6. Kun kaikki näytteet on siirretty, siirrä 20 µl negatiivista kontrollia (steriiliä rikastusainetta, esim. puskuroitua peptonivettä, BPW) Neogen Lyysiliuosputkeen. Älä käytä vettä negatiivisena kontrollina.
7. Varmista, että Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeen lämpötila on 100 ±1 °C.
8. Aseta peittämätön Neogen Lyysiliuosputkiteline Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeeseen ja kuumenna 15 ±1 minuuttia. Kuumennuksen aikana Neogen Lyysiliuoksen väri muuttuu vaaleanpunaisesta (viileä) keltaiseksi (kuuma).

   Jos näytteitä ei ole asianmukaisesti lämpökäsitelty testin lyysivaiheen aikana, ne saattavat muodostaa biologisen vaaratekijän, jolloin niitä EI saa asettaa Neogen Molekyläärisen testi-instrumenttiin.
9. Poista Neogen Lyysiliuosputkiteline Neogen Molekyläärisestä lämmityslohkosta ja anna sen viilentyä Neogen Molekyläärisessä testijäähdytyslohkon pistokkeessa vähintään 5 minuuttia ja enintään 10 minuuttia. Neogen Molekyläärisen testijäähdytyslohkon pistoke, jota käytetään ympäristön lämpöisenä ilman Neogen® Molekyläärisen testijäähdytyslohkon alustaa, asetetaan suoraan laboratorion työtasolle. Viileänä Neogen-lyysiliuoksen väri palaa vaaleanpunaiseksi.
10. Poista Neogen Lyysiliuosputkiteline Neogen Molekyläärisen testijäähdytyslohkon pistokkeesta.



Monistaminen

1. Jokaiselle näytteelle ja negatiiviselle kontrollinäytteelle tarvitaan yksi Neogen Molecular Detection -testipakkaus 2 – *Kronobakteeri* -reagenssiputki.

   1.1 Putkiliuskat voidaan leikata haluttuun määrään putkia. Valitse tarvittava yksittäisten Neogen Molecular Detection -testipakkausten 2 – *Kronobakteeri* -reagenssiputkien tai 8 putken liuskojen määrä.

   1.2 Aseta Neogen Molecular Detection -testipakkaus 2 – *Kronobakteeri* -reagenssiputket tyhjään telineeseen.

   1.3 Vältä liikuttamasta reagenssipellettejä putkien pohjalta.
2. Valitse yksi Neogen Reagenssin valvontaputki ja aseta telineeseen.
3. Ristikontaminaation välttämiseksi poista suojus yhdestä Neogen Molecular Detection -testipakkaus 2 – *Kronobakteeri* -reagenssiputkinauhasta kerrallaan ja käytä uutta pipetin kärkeä jokaisessa siirtovaiheessa.
4. Siirrä jokainen lysaatti Neogen Molecular Detection -testipakkauksen 2 – *Kronobakteeri* -reagenssiputkeen ja Neogen Reagenssin valvontaputkeen seuraavasti:

Siirrä jokainen näytelysaatti yksittäiseen Neogen Molecular Detection -testipakkaus 2 – *Kronobakteeri* -reagenssiputkeen **ensin,** ja sitten negatiivinen kontrolli. Hydratoi Neogen Reagenssin valvontaputki **viimeisenä**.

5. Avaa Neogen Molecular Detection -testipakkauksen 2 – *Kronobakteeri* -reagenssiputki käyttämällä Neogen® Molekyläärisen testin cap/decap-työkalua – Reagenssi. Avaa yksi reagenssiputkiliuska kerrallaan. Heitä suojus pois.

   5.1 **Siirrä 20 µL näytelysaattia Neogen Lyysiliuosputkessa olevan nesteen ylemmästä puoliskosta (vältä sakkaa) vastaavaan Neogen Molecular Detection -testipakkauksen 2 – *Kronobakteeri* -reagenssiputkeen. Annostele vinossa kulmassa, jotta et liikuta pellettejä. Sekoita pipetoimalla varovasti ylös ja alas 5 kertaa.**

5.2 Toista vaihe 5.1, kunnes kaikki näytelysaatit on lisätty vastaavaan Neogen Molekulaarisen testisetin 2 – *Kronobakteeri* -reagenssiputkeen liuskassa.

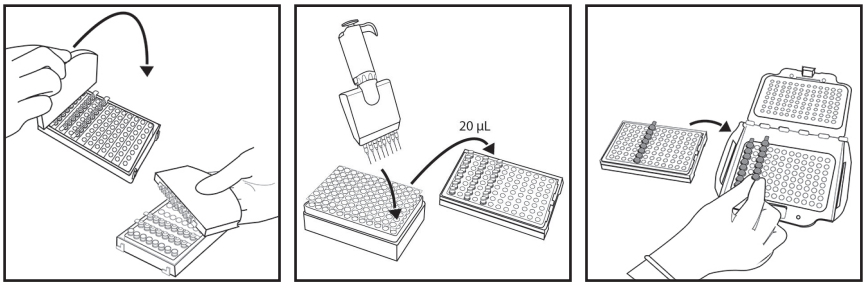
5.3 Peitä Neogen Molekyläärisen testipakkauksen 2 – *Kronobakteeri* -reagenssiputket mukana toimitetuilla lisäsuojuksilla ja varmista, että ne ovat tiukasti paikoillaan painamalla niitä Neogen Molekyläärisen testin cap/decap-työkalun – Reagenssi pyöristetyllä puolella eteen- ja taaksepäin suuntautuvalla liikkeellä.

5.4 Toista tarvittaessa vaiheet 5.1–5.3 testattavien näytteiden määrän mukaan.

5.5 Kun kaikki näytelysaatit on siirretty, siirrä 20 µl negatiivista kontrollilysaattia Neogen Molecular Detection -testipakkauksen 2 – *Kronobakteeri* -reagenssiputkeen toistamalla vaiheet 5.1–5.3.

5.6 Siirrä **20 µl negatiivista kontrollilysaattia Neogen Reagenssin valvontaputkeen.** Annostele vinossa kulmassa, jotta et liikuta pellettejä. Sekoita pipetoimalla varovasti ylös ja alas 5 kertaa.

6. Aseta suojuksella suljetut putket puhtaaseen ja steriloituun Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalustaan. Sulje ja lukitse Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalustan kansi.



7. Tarkasta ja vahvista määritetty ajo Neogen Molekyläärisen testijärjestelmän ohjelmistossa.
8. Napsauta ohjelmiston Start (Käynnistä) -painiketta ja valitse käytettävä instrumentti. Valitun instrumentin kansi aukeaa automaattisesti.
9. Aseta Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalusta Neogen Molekylääriseen testi-instrumenttiin ja aloita testi sulkemalla kansi. Saat tulokset 60 minuutin kuluessa, positiiviset tulokset saatetaan kuitenkin havaita jo aikaisemmin.
10. Kun testi on suoritettu loppuun, ota Neogen Molekyläärisen testinopeuden latausalusta Neogen Molekyläärisestä testi-instrumentista ja hävitä putket liottamalla niitä 1–5-prosenttisessa (veteen laimennetussa) talouskäyttöisessä valkaisuaineliuoksessa 1 tunnin ajan ja etäällä testin valmistelualueelta.

HUOMAUTUS: Jotta ristikontaminaation aiheuttamien väärien positiivisten riski olisi mahdollisimman pieni, älä koskaan avaa monistettua DNA:ta sisältäviä reagenssiputkia. Tämä koskee Neogen Molecular Detection -testipakkauksen 2 – *Kronobakteeri* -reagenssiputkia, Neogen Reagenssin valvontaputkia ja Neogen Testitaulukon valvontaputkia. Hävitä tiiviisti suljetut reagenssiputket aina liottamalla niitä 1–5-prosenttisessa (veteen laimennetussa) talouskäyttöisessä valkaisuaineliuoksessa 1 tunnin ajan ja etäällä testin valmistelualueelta.

Tulokset ja tulkinta

Algoritmi tulkitsee nukleiinihappojen monistuksen tunnistuksesta saatavaa valon sirontakäyrää. Ohjelmisto analysoi tulokset automaattisesti, ja tulokset värikoodataan tuloksen mukaan. Positiivinen tai negatiivinen tulos määritetään analysoimalla useita yksilöllisiä käyräparametreja. Oletetut positiiviset tulokset ilmoitetaan reaaliaikaisesti, kun taas negatiiviset ja tarkastettavat tulokset näytetään ajon valmistumisen jälkeen.

HUOMAA: Negatiivinenkaan näyte ei anna nollalukemaa, sillä järjestelmällä ja Neogen Molecular Detection -testipakkauksen 2 – *Kronobakteeri* monistusreagensseilla on tausta-RLU-lukema (suhteellinen valoyksikkö).

Vahvistus

- Tulosten vahvistaminen NF VALIDATION -sertifioidun menetelmän mukaisesti

NF VALIDATIONin yhteydessä kaikki määritetyt positiiviset rikastukset tulisi vahvistaa seuraavalla viitetapavahvistuksella[2], joka alkaa ensisijaisen rikastuksen (BPW ISO tai BPW ISO, johon lisätty 10 mg/l vankomysiiniä) siirrosta.

- Muu vahvistuskäytäntö

Oletetut positiiviset rikastetut näytteet on vahvistettava laboratorion vakiotoimintamenetelmien mukaisesti tai noudattamalla asianmukaista vertailumenetelmää[1,2] aloittamalla näytteen siirrosta ensisijaisesta rikastusaineesta (BPW ISO tai BPW ISO, johon lisätty 10 mg/l vankomysiiniä) toissijaiseen rikastusaineeseen, mitä seuraa viljely petrimaljassa ja isolaattien vahvistaminen asianmukaisilla biokemiallisilla ja serologisilla menetelmillä.

Joissain harvoissa tapauksissa valon sironta voi olla epätavallinen, jolloin algoritmi merkitsee sen tarkastettavaksi (”Inspect”). Neogen suosittelee testin uusimista tarkastettavaksi merkittyjen (Inspect) näytteiden osalta. Jos tulokseksi tulee jatkuvasti Inspect, tee varmistustesti käyttämällä itse parhaaksi katsomaasi menetelmää tai paikallisten määräysten mukaista menetelmää[1,2].

Jos tulokset ovat ristiriitaisia (oletettu positiivinen tulos Neogen Molecular Detection -testipakkauksella 2 – *Kronobakteeri*, jota ei saada vahvistettua jollakin edellä kuvatuista tavoista), laboratorion on tehtävä tarvittavat toimenpiteet saatujen tulosten raportoimiseksi.

Jos sinulla on jotain tiettyä sovellusta tai menetelmää koskevia kysymyksiä, käy verkkosivuillamme osoitteessa www.neogen.com tai ota yhteyttä paikalliseen Neogen-edustajaan tai -jälleenmyyjään.

Liite A. Käytännön keskeytys: Lämpökäsiteltyjen lysaattien säilyttäminen ja uudelleentestaus

1. Säilytä lämpökäsitelty lysaatti sulkemalla lyysiputki uudelleen puhtaalla suojuksella (katso **Lyysi**-osio, 4.5).
2. Säilytä 2–8 °C:ssa enintään 72 tuntia.
3. Valmistele säilytetty näyte monistamista varten kääntelemällä sitä 2–3 kertaa, jotta se sekoittuu.
4. Poista suojukset putkista.
5. Aseta sekoitetut lyysiputket Neogen Molekyläärisen testilämpölohkon pistokkeeseen ja kuumenna 100 ±1 °C:ssa 5 ±1 minuuttia.
6. Poista Neogen Lyysiliuosputkiteline lämmityslohkosta ja anna sen viilentyä Neogen Molekyläärisen testijäähdytyslohkon pistokkeessa vähintään 5 minuuttia ja enintään 10 minuuttia.
7. Jatka edellä olevasta kohdasta **Monistaminen**.

Viitteet:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
8. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

Tarkista edellä mainittujen standardien mukaisten menetelmien ajantasaiset versiot.

Symbolien selitykset

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

Data de emissão: 2024-01

NEOGEN

Instruções do Produto

Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter*

Descrição do produto e Uso Recomendado

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

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

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

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

A Neogen avaliou o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter* com meio de enriquecimento de Água Peptonada Tamponada (ISO).

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

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

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

Tabela 1. Componentes do kit Neogen Ensaio de Detecção Molecular

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

O Controle Negativo, não fornecido no kit, é um meio de enriquecimento estéril, por exemplo, APT ISO. Não utilize água como controle negativo.

Segurança

O usuário deve ler, compreender e seguir todas as informações de segurança presentes nas instruções do Neogen Sistema de Detecção Molecular e do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter*. Guarde as instruções de segurança para consulta futura.

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

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

⚠ AVISO

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

O usuário deve treinar seu pessoal nas técnicas de testes apropriadas atuais: por exemplo, Boas Práticas de Laboratório[3], ISO/IEC 17025[4] ou ISO 7218[5].

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

- Siga o protocolo e realize os testes exatamente conforme especificado nas instruções do produto.
- Armazene o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter* conforme indicado na embalagem e nas instruções do produto.
- Sempre utilize o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter* dentro da data de validade.
- Use o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter* com alimentos e amostras ambientais de processos de alimentos que tenham sido validadas internamente ou por um terceiro.
- Utilize o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter* somente com superfícies, desinfetantes, protocolos e linhagens de bactérias que tenham sido validados internamente ou por um terceiro.
- Para uma amostra ambiental que contém um tampão neutralizante com complexo de sulfonato de arila, faça uma diluição de 1:2 antes de testar (1 parte da amostra em 1 parte do caldo de enriquecimento estéril). Outra opção é transferir 10 µL do enriquecimento NB para os tubos de Solução de Lise Neogen. Produtos Neogen® Sample Handling que incluem Tampão de Neutralização com complexo de sulfonato de arila: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G e HS2410NB2G. Este protocolo não foi testado durante o estudo da NF Validation.

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

- Execute testes de agentes patogênicos em um laboratório adequadamente equipado, sob o controle de pessoal bem treinado. O meio de enriquecimento incubado e equipamentos ou superfícies que tenham entrado em contato com o meio de enriquecimento incubado podem conter patógenos em níveis suficientes para apresentar riscos à saúde humana.
- Sempre adote as práticas de segurança padrão em laboratórios, como usar trajes de proteção adequados e óculos de proteção ao manipular reagentes e amostras contaminadas.
- Evite o contato com o conteúdo do meio de enriquecimento e dos tubos de reagentes após a amplificação.
- Descarte as amostras enriquecidas e os resíduos contaminados relacionados de acordo com as normas locais/regionais/nacionais/industriais vigentes.
- Não exceda a temperatura recomendada ao ajustar o aquecedor.
- Não exceda o tempo de aquecimento recomendado.
- Utilize um termômetro calibrado adequado para verificar a temperatura de inserção do Neogen® Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular (por exemplo, um termômetro de imersão parcial ou termômetro termopar digital, e não um termômetro de imersão total). O termômetro deve ser colocado no local indicado do Neogen Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular.

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

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

Para reduzir os riscos de exposição com líquidos quentes:

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

RECOMENDAÇÃO

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

- Troque de luvas antes da hidratação do pellet do reagentes.
- Recomenda-se o uso de ponteiras de pipeta estéreis, com barreira de aerossol (filtros) e de 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 enxaguando-os em uma solução de hipoclorito doméstico de 1 a 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.
- Se houver suspeita de as amostras conterem elevados níveis de DNA de *Cronobacter* (por exemplo, DNA de células *Cronobacter* não viáveis que tenham sido submetidas a uma etapa de destruição/desativação), os enriquecimentos positivos presuntivos devem ser tratados com DNase antes da etapa de **Lise**. Entre em contato com seu representante da Neogen para obter mais instruções. Este protocolo não foi testado durante o estudo da NF Validation.

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

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

Responsabilidade do usuário

Os usuários são responsáveis por se familiarizarem com as informações e instruções do produto. Acesse nosso website em **www.neogen.com**, ou contate o seu representante ou distribuidor local da Neogen 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, incluindo mistura e homogeneização, manipulação e a técnica de laboratório utilizada, podem influenciar nos resultados.

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

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

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

Para ajudar os clientes a avaliar o método para diversas matrizes, 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 tem a capacidade de impactar os resultados do Neogen Ensaio para Detecção Molecular 2 - *Cronobacter*. Teste diversas amostras representativas da matriz, isto é, amostras obtidas a partir de diferentes origens, durante qualquer período de validação quando adotar o método da Neogen, quando testar matrizes novas ou desconhecidas ou matrizes que tiverem passado por mudanças de processo ou matéria-prima.

Uma matriz pode ser definida como um tipo de produto com propriedades intrínsecas, tais como composição e 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 Garantia/Recursos Limitados

EXCETO EM CASOS ESPECÍFICOS DE GARANTIA LIMITADA DE PRODUTOS INDIVIDUAIS, A NEOGEN REJEITA TODOS OS TERMOS EXPRESSOS E IMPLÍCITOS DE GARANTIA, INCLUINDO MAS NÃO SE LIMITANDO A, QUAISQUER GARANTIAS DE COMERCIALIZAÇÃO OU DE ADEQUAÇÃO PARA UM DETERMINADO USO. Se ficar provado que qualquer produto da Neogen Food Safety encontra-se defeituoso, a Neogen ou seu distribuidor autorizado

procederá à respectiva substituição ou, se assim o decidir, restituirá o dinheiro da compra do produto. Estes são os seus únicos termos de recurso. Entre em contato com seu representante da Neogen ou distribuidor autorizado da Neogen para qualquer dúvida adicional.

Limitação de responsabilidade da Neogen

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

Armazenamento e Descarte

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

Não utilize o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter* após a data de validade. A data de vencimento e o número do lote estão impressos na parte externa da caixa. Após o uso, o meio de enriquecimento e os tubos do Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter* podem conter materiais patogênicos. Quando o teste for concluído, siga os regulamentos industriais padrões 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 do Neogen Sistema de Detecção Molecular, 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 Validados” para obter os requisitos específicos:

Tabela 3 para protocolos de enriquecimento conforme o *Official Method of Analysis*℠ e o Certificado *Performance Tested*℠ nº 101703 da AOAC® 2018.01

Tabela 4 para protocolos de enriquecimento de acordo com certificado NF VALIDATION 3M 01/20-03/18

Enriquecimento da Amostra

As Tabelas 2, 3 ou 4 oferecem orientação para protocolos de enriquecimento de alimentos e amostras ambientais.

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

Alimentos, Pós Ambientais, Poeiras, Varreduras e Esponjas

1 Estabilize o meio de enriquecimento à temperatura ambiente (20-25°C), salvo indicação contrária no protocolo de enriquecimento (vide Tabela 2, 3 ou 4).

2 Usando técnica asséptica, misture o meio de enriquecimento e a amostra e homogenize vigorosamente batendo, usando um vórtex ou misturando à mão por 2 ± 0,2 minutos **ou até que os grumos se dissolvam completamente e a suspensão de enriquecimento esteja homogênea**[7, 8].

   a. Fatores como a preparação de amostras, incluindo mistura e homogeneização, manuseio e técnica de laboratório podem influenciar os resultados.

   b. Para amostras altamente particuladas, recomenda-se o uso de sacos de filtragem.

   c. Para matrizes que se dilatam em água e são altamente viscosas (por exemplo, cereais, amidos), sugere-se efetuar mais diluições (> 1:10) até que a viscosidade seja devidamente reduzida ou acrescentar alfa-amilase estéril 1% (p/v) ao APT (ISO)[8].

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

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

Tabela 2. Protocolos Gerais de Enriquecimento

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

1 A Neogen avaliou o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter* utilizando as taxas de diluição da Tabela 2 até 300 g. É responsabilidade do usuário validar protocolos ou taxas de diluição alternativos para garantir que o método atenda aos seus critérios.

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

Instruções Específicas para Métodos Validados

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

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

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

Nos programas do Instituto de Pesquisa AOAC OMA℠ e PTM℠, o Neogen Ensaio de Detecção Molecular de 2 - *Cronobacter* foi constatado como um método eficiente para a detecção de *Cronobacter.* As matrizes testadas no estudo são apresentadas na tabela 3.

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

Matriz de Amostra	Tamanho da amostra	Volume do Caldo de Enriquecimento[1]	Temperatura de Enriquecimento (± 1°C)	Tempo de Enriquecimento (horas)	Volume Analisado da Amostra
Fórmula infantil em pó e Cereal infantil em pó	10 g	90 mL de APT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
Cereal infantil em pó não probiótico	300 g	2700 mL de APT (ISO) (1:10)	Preaquecido 37	18-24	20 µL
Fórmula infantil em pó e Cereal infantil em pó com probióticos	300 g	2700 mL de APT (ISO) + 10 mg/L de Vancomicina	Preaquecido 37	22-24	20 µL
Lactose	10 g	90 mL de APT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
Esponja ambiental com 10 mL de caldo neutralizante D/E	1 dispositivo de amostragem	90 mL de APT (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL

1 Use APT (ISO) **preaquecido** se o volume do caldo de enriquecimento for > 300 mL.

NF VALIDATION da AFNOR Certification

3M 01/20-03/18

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

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

Método certificado da NF VALIDATION em conformidade com a ISO 16140-2[9] em comparação com a ISO 22964.

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

Preparo da amostra: As amostras devem ser preparadas segundo a EN ISO 22694[2] e a EN ISO 6887[7, 8].

Versão do software: Consulte o certificado.

Tabela 4. Protocolos de enriquecimento de acordo com o método certificado da NF VALIDATION 3M 01/20-03/18

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

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

2 Após a remoção do caldo de enriquecimento do armazenamento, continue o teste a partir da Etapa 1, na seção Lise. Após a remoção do lisado de amostra do armazenamento, continue o teste a partir da Etapa 7, na seção Lise.

3 Consulte o Apêndice A para testar novamente lisados armazenados tratados termicamente.

Preparo da Neogen® Bandeja de Carga Rápida para Detecção Molecular

1 Umedeça um pano em uma solução de 1 a 5% (v:v em água) de água sanitária (hipoclorito) e limpe a Neogen Bandeja de Carga Rápida de Detecção Molecular.

2 Enxágue a Neogen Bandeja de Carga Rápida de Detecção Molecular com água.

3 Utilize uma toalha descartável para secar a Neogen Bandeja de Carga Rápida de Detecção Molecular.

4 Certifique-se de que a Neogen Bandeja de Carga Rápida de Detecção Molecular esteja seca antes de utilizá-la.

Preparação do Neogen® Bloco de Resfriamento de Detecção Molecular

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

Preparo do Neogen® Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular

Coloque o Neogen Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular em uma unidade de aquecimento com bloco seco duplo. Ligue a unidade de aquecimento de bloco a seco e defina a temperatura para permitir que o Neogen Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular alcance e mantenha a temperatura de 100 ± 1°C.

NOTA: Dependendo da unidade de aquecimento, aguarde aproximadamente 30 minutos até que o Neogen Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular alcance a temperatura. Utilizando um termômetro calibrado adequado (por exemplo, um termômetro de imersão parcial ou um termômetro digital de termopares, não um termômetro de imersão total) colocado no local indicado, verifique se o Neogen Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular está a 100 ± 1°C.

Preparo do Neogen® Equipamento de Detecção Molecular

1 Inicie o Neogen® Software do Sistema de Detecção Molecular e faça login. Entre em contato com seu representante da Neogen Food Safety para garantir o uso da versão mais atualizada do software.

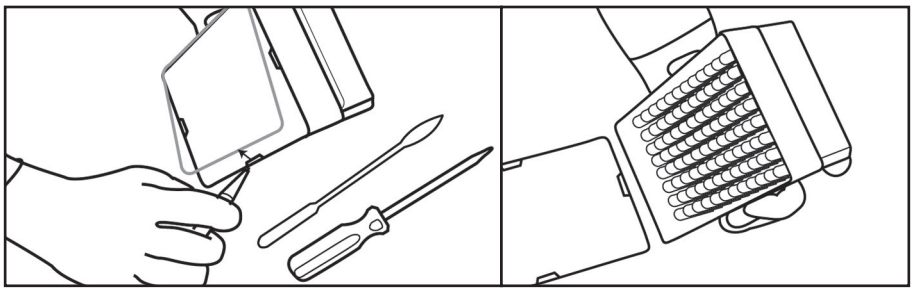
2 Ligue o Neogen Equipamento de Detecção Molecular.

3 Crie ou edite uma execução com dados para cada amostra. Consulte o Manual do Usuário do Neogen Sistema de Detecção Molecular para obter mais detalhes.

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

Lise

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



1 Deixe que os tubos de Neogen Solução de Lise, cheguem à temperatura ambiente (de 20 a 25°C) deixando as racks fora de refrigeração de um dia para o outro (de 16 a 18 horas). A alternativa para equilibrar os tubos de Neogen Solução de Lise à temperatura ambiente é posicioná-los na bancada do laboratório durante pelo menos 2 horas, incubá-los em uma incubadora a 37 ± 1°C por 1 hora ou colocá-los em um aquecedor com bloco seco duplo por 30 segundos a 100°C ± 1°C.

2 Inverta os tubos com tampa para misturar. Prossiga para a próxima etapa em até 4 horas após a inversão.

3 Remova o caldo de enriquecimento da incubadora.

4 Um tubo de Neogen Solução de Lise é necessário para cada amostra e além do CN (meio de enriquecimento esterilizado).

4.1 As tiras de tubos de Neogen Solução de Lise podem ser cortadas para obter o número de tubos desejado. Selecione o número de tubos de Neogen Solução de Lise individuais ou as tiras de 8 tubos necessárias. Coloque os tubos de Neogen Solução de Lise em uma rack vazia.

4.2 Para evitar contaminação, destampe uma tira de tubo Neogen LS de cada vez e utilize uma nova ponteira de pipeta para cada etapa da transferência.

4.3 Transfira a amostra enriquecida para os tubos Neogen SL conforme descrito abaixo:

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

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

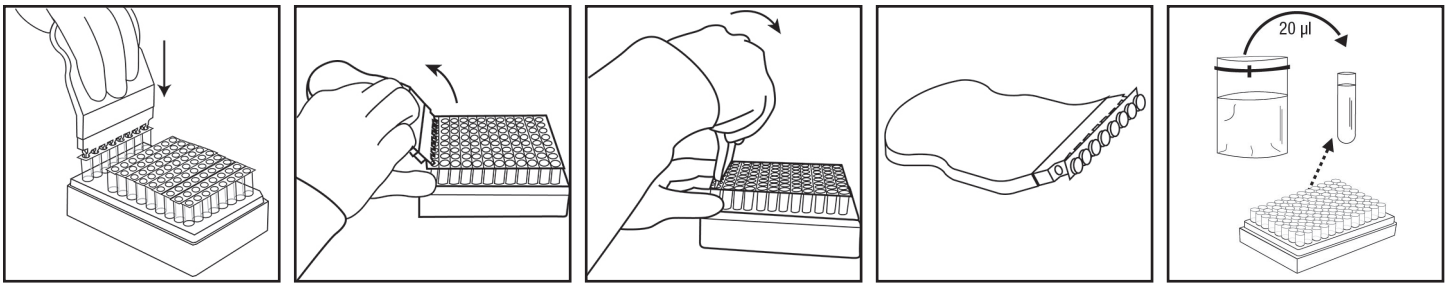
4.5 Descarte a tampa do tubo de Neogen Solução de Lise; se o lisado for mantido para novo teste, coloque as tampas em um recipiente limpo para reutilização após a lise.

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

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

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

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



6 Quando todas as amostras tiverem sido transferidas, transfira 20 µL de CN (meio de enriquecimento estéril, por exemplo, APT) para um tubo Neogen SL. Não use água como CN.

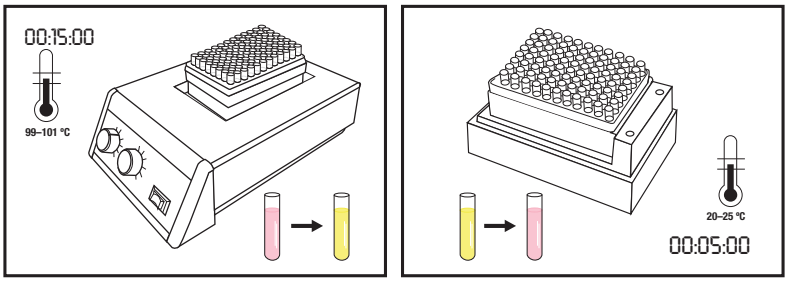
7 Verifique se a temperatura do Neogen Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular está a 100 ± 1°C.

8 Coloque a rack descoberta de tubos Neogen SL no Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular e aqueça por 15 ± 1 minutos. Durante o aquecimento, a solução Neogen SL irá mudar de cor de rosa (frio) para amarelo (quente).

Amostras que não foram tratadas com aquecimento de forma adequada durante a etapa lise do ensaio, podem ser consideradas um risco biológico potencial e NÃO devem ser inseridas no Neogen Equipamento de Detecção Molecular.

9 Retire a rack descoberta de tubos de Neogen Solução de Lise do Neogen Bloco de Aquecimento para Detecção Molecular e deixe esfriar no Neogen Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular por pelo menos 5 minutos e no máximo 10 minutos. O Neogen Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular, usado em temperatura ambiente sem a Neogen® Bandeja de Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular, deve ser colocado diretamente sobre a bancada do laboratório. Quando resfriada, a Neogen Solução de Lise voltará à cor rosa.

10 Retire a rack de tubos Neogen SL do Bloco de Resfriamento de Detecção Molecular Neogen.



Amplificação

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

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

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

1.3 Evite agitar os reagentes precipitados da parte inferior dos tubos.

2 Selecione um Neogen Tubo de Controle de Reagentes e coloque-o na rack.

3 Para evitar contaminação cruzada, destampe uma tira de Tubo de Reagente Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter* de cada vez e utilize uma nova ponteira de pipeta para cada etapa da transferência.

4 Transfira cada um dos lisados a um Tubo de Reagente Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter* e Neogen Tubo de Controle de Reagentes conforme descrito abaixo:

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

5 Use a Ferramenta Reagente de Tampar/Destampar de Detecção Neogen® para destampar o Tubo de Reagente para Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter* - uma tira de Tubos de Reagentes por vez. Descarte a tampa.

5.1 **Transfira 20 µL de amostra de lisado da metade superior do líquido (evite o precipitado) no tubo de Neogen Solução de Lise para o Tubo de Reagente para Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter*. Dispense em ângulo para evitar a agitação dos pellet. Misture pipetando gentilmente 5 vezes.**

5.2 Repita a etapa 5.1 até que a amostra de lisado individual tenha sido adicionada a um Tubo de Reagente para Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter* correspondente na tira.

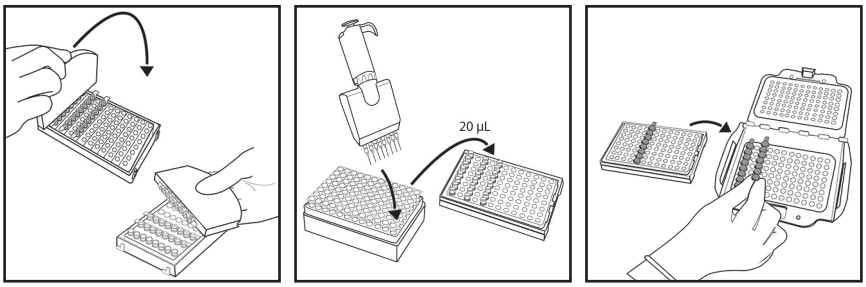
5.3 Cubra os Tubos de Reagentes para Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter* com a tampa adicional fornecida e utilize o lado arredondado da Neogen Ferramenta de Tampar/Destampar para Detecção Molecular para aplicar pressão com um movimento de vai e vem, garantindo que a tampa fique bem apertada.

5.4 Repita as etapas 5.1 a 5.3, conforme necessário, para o número de amostras a serem testadas.

5.5 Quando todas as amostras de lisado tiverem sido transferidas, repita as etapas de 5.1 a 5.3 para transferir 20 µL de lisado CN para um Neogen Tubo de Reagente para Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter*.

5.6 Transfira **20 µL de lisado CN para um Neogen Tubo de Controle de Reagente**. Dispense em ângulo para evitar a agitação dos pellet. Misture pipetando gentilmente 5 vezes.

6 Carregue os tubos tampados em uma Neogen Bandeja de Carga Rápida de Detecção Molecular limpa e descontaminada. Feche e trave a tampa da Neogen Bandeja de Carga Rápida de Detecção Molecular.



7 Analise e confirme a corrida configurada no Neogen Software do Sistema de Detecção Molecular.

8 Clique no botão iniciar do software e selecione o instrumento a utilizar. A tampa do instrumento selecionado abre automaticamente.

9 Posicione a Neogen Bandeja de Carga Rápida de Detecção Molecular no Neogen Equipamento de Detecção Molecular e feche a tampa para iniciar o ensaio. Os resultados são fornecidos em 60 minutos, embora os positivos possam ser detectados ainda mais cedo.

10 Depois que o ensaio estiver concluído, remova a Neogen Bandeja de Carga Rápida de 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.

RECOMENDAÇÃO: Para minimizar o risco de falso-positivos por contaminação cruzada, nunca abra Tubos de Reagentes que contenham DNA amplificado. Isso inclui o Tubo de Reagente para Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter*, Tubos Neogen Controle de Reagentes e Neogen Tubos de Controle de Matriz. Sempre descarte os Tubos de Reagentes selados mergulhando-os em uma solução de água sanitária de 1 a 5% (v:v em água) 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 a verificar serão exibidos após a conclusão da execução.

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

Confirmação

- Confirmação de resultados segundo o método NF de Validação Certificado

No contexto da VALIDAÇÃO NF, todos os enriquecimentos positivos presuntivos devem ser confirmados segundo o método de confirmação de referência[2], começando com a transferência do meio de enriquecimento primário (APT ISO ou APT ISO complementado com 10 mg/L de vancomicina).

- Outro protocolo de confirmação

Os enriquecimentos positivos presuntivos devem ser confirmados conforme os procedimentos laboratoriais operacionais padrão ou seguindo o método de confirmação de referência apropriado[1,2], começando com a transferência do meio de enriquecimento primário (APT ISO ou APT ISO complementado com 10 mg/L de vancomicina) para o meio de enriquecimento secundário, seguido por plaqueamento e confirmação posterior de isolados utilizando métodos bioquímicos, sorológicos e moleculares apropriados.

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

No caso de resultados divergentes (positivos presuntivos com o Neogen Ensaio de Detecção Molecular 2 - *Cronobacter* não confirmados por um dos meios descritos acima), o laboratório deve seguir seus procedimentos operacionais padrões para relatar os resultados.

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

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

1 Para armazenar um lisado tratado termicamente, tampe novamente o tubo de lise com uma tampa limpa (consulte a seção **Lise**, 4.5)

2 Armazene à temperatura na faixa de 2°C a 8°C por até 72 horas.

3 Prepare uma amostra armazenada para amplificação invertendo de 2 a 3 vezes para misturar.

4 Destampe os tubos.

5 Coloque os tubos de lisado misturados no Neogen Bloco de Aquecimento de Detecção Molecular e aqueça a 100 ± 1°C por 5 ± 1 minutos.

6 Retire o suporte de tubos Neogen Solução de Lise do bloco de aquecimento e deixe esfriar no Neogen Bloco de Resfriamento para Detecção Molecular por pelo menos 5 minutos e no máximo 10 minutos.

7 Continue o protocolo na seção **Amplificação** detalhada acima.

Referências:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
8. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

Consulte as versões atuais dos métodos-padrão listados acima.

Explicação dos Símbolos

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

Ημερομηνία έκδοσης: 2024-01

Πληροφορίες προϊόντος

Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter*

Περιγραφή Προϊόντος και Σκοπός Χρήσης

Η Neogen® Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* χρησιμοποιείται με το Neogen® Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης για τη γρήγορη και ειδική ανίχνευση του *Cronobacter*, σε εμπλουτισμένα περιβαλλοντικά δείγματα τροφίμων και κατεργασιών τροφίμων.

Η Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης χρησιμοποιεί ισοθερμική ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου για τη γρήγορη ενίσχυση αλληλουχιών νουκλεϊνικών οξέων με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, σε συνδυασμό με βιοφωταύγεια για την ανίχνευση της ενίσχυσης. Τα υποθετικά θετικά αποτελέσματα αναφέρονται σε πραγματικό χρόνο, ενώ τα αρνητικά αποτελέσματα εμφανίζονται μετά την ολοκλήρωση της δοκιμασίας. Τα υποθετικά θετικά αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που προτιμάτε ή όπως καθορίζεται από τους τοπικούς κανονισμούς[1, 2].

Η Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* προορίζεται για χρήση σε εργαστηριακό περιβάλλον από επαγγελματίες εκπαιδευμένους στις εργαστηριακές τεχνικές. Η Neogen δεν έχει τεκμηριώσει τη χρήση αυτού του προϊόντος σε βιομηχανίες άλλες από εκείνες των τροφίμων και ποτών. Για παράδειγμα, η Neogen δεν έχει τεκμηριώσει αυτό το προϊόν για τον έλεγχο δειγμάτων φαρμακευτικών προϊόντων, καλλυντικών, κλινικών ή κτηνιατρικών δειγμάτων. Η Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* δεν έχει αξιολογηθεί με όλα τα πιθανά προϊόντα τροφίμων, κατεργασίες τροφίμων, πρωτόκολλα δοκιμών ή με όλα τα πιθανά στελέχη βακτηρίων.

Όπως και με όλες τις δοκιμαστικές μεθόδους, η πηγή, η σύνθεση και η ποιότητα του μέσου εμπλουτισμού μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Παράγοντες όπως οι μέθοδοι δειγματοληψίας, τα πρωτόκολλα ελέγχου, η προετοιμασία των δειγμάτων συμπεριλαμβανομένης της ομογενοποίησης και της ανάμειξης, ο χειρισμός και η εργαστηριακή τεχνική μπορεί επίσης να επηρεάσουν τα αποτελέσματα. Η Neogen συνιστά την αξιολόγηση της μεθόδου συμπεριλαμβανομένου του μέσου εμπλουτισμού, στο περιβάλλον του χρήστη με τη χρήση επαρκούς αριθμού δειγμάτων με συγκεκριμένα τρόφιμα ή/και περιβαλλοντικά δείγματα και μικροβιακές προκλήσεις ώστε να διασφαλιστεί ότι η μέθοδος πληροί τα κριτήρια του χρήστη.

Η Neogen έχει αξιολογήσει την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* με μέσο εμπλουτισμού Ρυθμιστικό Νερό Πεπτόνης ISO.

Το Neogen® Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης προορίζεται για χρήση με δείγματα που έχουν υποβληθεί σε θερμική κατεργασία κατά τη διάρκεια του βήματος λύσης της δοκιμασίας, το οποίο είναι σχεδιασμένο για την καταστροφή των οργανισμών που είναι παρόντες στο δείγμα. Δείγματα που δεν έχουν υποβληθεί στην κατάλληλη θερμική κατεργασία κατά τη διάρκεια του βήματος λύσης της δοκιμασίας μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανός βιολογικός κίνδυνος και ΔΕΝ πρέπει να εισάγονται στο Neogen Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης.

Η Neogen Food Safety είναι πιστοποιημένη κατά το πρότυπο του Διεθνούς Οργανισμού Τυποποίησης (ISO) 9001 για σχέδιο και κατασκευή.

Το κιτ ελέγχου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* περιέχει 96 δοκιμές που περιγράφονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Στοιχεία του κιτ Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης

Είδος	Ταυτοποίηση	Ποσότητα	Περιεχόμενα	Σχόλια
Neogen® Διάλυμα Λύσης (ΛΣ)	Ροζ διάλυμα σε διαφανείς δοκιμαστικούς σωλήνες	96 (12 ταινίες των 8 δοκιμαστικών σωλήνων)	580 µL ΛΣ ανά δοκιμαστικό σωλήνα	Σε στατώ και έτοιμο προς χρήση
Δοκιμαστικοί σωλήνες Αντιδραστηρίου Neogen® Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter*	Πορτοκαλί-κόκκινοι δοκιμαστικοί σωλήνες	96 (12 ταινίες των 8 δοκιμαστικών σωλήνων)	Λυοφιλοποιημένο ειδικό μίγμα ενίσχυσης και ανίχνευσης	Έτοιμο προς χρήση
Επιπλέον πώματα	Πορτοκαλί-κόκκινα πώματα	96 (12 ταινίες των 8 πωμάτων)		Έτοιμο προς χρήση
Neogen® Έλεγχος Αντιδραστηρίου (ΕΑ)	Διαφανείς δοκιμαστικοί σωλήνες με αρθρωτό πώμα	16 (2 σακουλάκια των 8 ατομικών δοκιμαστικών σωλήνων)	Λυοφιλοποιημένος έλεγχος DNA, μίγμα ενίσχυσης και ανίχνευσης	Έτοιμο προς χρήση

Ο Αρνητικός Έλεγχος, που δεν παρέχεται στο κιτ, είναι ένα στείρο μέσο εμπλουτισμού, π.χ. Ρυθμιστικό Νερό Πεπτόνης (BPW) ISO. Μη χρησιμοποιείτε νερό ως Αρνητικό Έλεγχο.

Ασφάλεια

Ο χρήστης πρέπει να διαβάσει, κατανοήσει και ακολουθήσει όλες τις πληροφορίες ασφαλείας στις οδηγίες για το Neogen Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης και την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter*. Φυλάξτε τις οδηγίες ασφάλειας για μελλοντική αναφορά.

⚠ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Υποδεικνύει μια επικίνδυνη κατάσταση, η οποία, εάν δεν αποφευχθεί, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα θάνατο ή σοβαρό τραυματισμό ή/και καταστροφή ιδιοκτησίας.

ΥΠΟΔΕΙΞΗ: Υποδεικνύει μια δυνητικά επικίνδυνη κατάσταση, η οποία, εάν δεν αποφευχθεί, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα καταστροφή ιδιοκτησίας.

⚠ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Μη χρησιμοποιείτε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* για τη διάγνωση καταστάσεων σε ανθρώπους ή ζώα.

Ο χρήστης πρέπει να εκπαιδεύσει το προσωπικό του στις τρέχουσες κατάλληλες τεχνικές ελέγχου: για παράδειγμα, Καλές Εργαστηριακές Πρακτικές[3], ISO/IEC 17025[4] ή ISO 7218[5].

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα που οδηγεί στην αποδέσμευση μολυσμένου προϊόντος:

- Ακολουθείτε το πρωτόκολλο και διενεργείτε τους ελέγχους ακριβώς όπως περιγράφεται στις πληροφορίες προϊόντος.
- Φυλάσσετε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* όπως υποδεικνύεται στη συσκευασία και στις οδηγίες του προϊόντος.
- Χρησιμοποιείτε πάντοτε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- Χρησιμοποιείτε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* με περιβαλλοντικά δείγματα τροφίμων και κατεργασιών τροφίμων που έχουν επικυρωθεί εσωτερικά ή από τρίτο μέρος.
- Χρησιμοποιείτε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* μόνο με επιφάνειες, αποστειρωτικά, πρωτόκολλα και βακτηριακά στελέχη που έχουν επικυρωθεί εσωτερικά ή από τρίτο μέρος.
- Για ένα περιβαλλοντικό δείγμα που περιέχει Ρυθμιστικό Διάλυμα Ουδετεροποίησης με αρυλ-σουλφονικό σύμπλοκο, πραγματοποιήστε αραίωση 1:2 πριν τον έλεγχο (1 μέρος δείγματος σε 1 μέρος στείρου ζωμού εμπλουτισμού). Μια άλλη επιλογή είναι να μεταφέρετε 10 mL Ρυθμιστικού Διαλύματος Ουδετεροποίησης (NB) εμπλουτισμού μέσα στους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης. Προϊόντα χειρισμού δειγμάτων της Neogen® που περιέχουν Ρυθμιστικό Διάλυμα Ουδετεροποίησης με αρυλ-σουλφονικό σύμπλοκο: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G και HS2410NB2G. Αυτό το πρωτόκολλο δεν έχει ελεγχθεί κατά τη διάρκεια της μελέτης NF Validation.

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με την έκθεση σε χημικές ουσίες και τους βιολογικούς κινδύνους:

- Διενεργείτε τον έλεγχο παθογόνων σε κατάλληλα εξοπλισμένο εργαστήριο υπό τον έλεγχο εκπαιδευμένου προσωπικού. Επωασμένα μέσα εμπλουτισμού και εξοπλισμός ή επιφάνειες που έχουν έρθει σε επαφή με επωασμένα μέσα εμπλουτισμού μπορεί να περιέχουν παθογόνα σε επίπεδα επαρκή να προκαλέσουν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία.
- Τηρείτε πάντοτε τις τυπικές πρακτικές εργαστηριακής ασφάλειας, όπως χρήση κατάλληλης προστατευτικής ενδυμασίας και προστασίας ματιών, όταν χειρίζεστε αντιδραστήρια και μολυσμένα δείγματα.
- Αποφεύγετε την επαφή με τα περιεχόμενα των μέσων εμπλουτισμού και με τους δοκιμαστικούς σωλήνες αντιδραστηρίου μετά την ενίσχυση.
- Απορρίψτε τα εμπλουτισμένα δείγματα και τα σχετικά μολυσμένα απόβλητα σύμφωνα με τα ισχύοντα τοπικά/περιφερειακά/εθνικά/βιομηχανικά πρότυπα.
- Μην υπερβαίνετε τη συνιστώμενη ρύθμιση θερμοκρασίας στο θερμαντήρα.
- Μην υπερβαίνετε το συνιστώμενο χρόνο θέρμανσης.
- Χρησιμοποιείτε ένα κατάλληλο, βαθμονομημένο θερμόμετρο για να επαληθεύσετε τη θερμοκρασία του Neogen® Ένθετου για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρος Μοριακής Ανίχνευσης (π.χ. θερμόμετρο μερικής εμβύθισης ή ψηφιακό θερμόμετρο θερμοζεύγους, όχι θερμόμετρο ολικής εμβύθισης). Το θερμόμετρο πρέπει να τοποθετείται στην προβλεπόμενη θέση στο Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης.

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με διασταυρούμενη μόλυνση κατά την προετοιμασία της δοκιμασίας:

- Φοράτε πάντοτε γάντια (για την προστασία του χρήστη και την πρόληψη εισαγωγής νουκλεασών).

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με την έκθεση σε καυτά υγρά:

- Μην υπερβαίνετε τη συνιστώμενη ρύθμιση θερμοκρασίας στο θερμαντήρα.
- Μην υπερβαίνετε το συνιστώμενο χρόνο θέρμανσης.
- Χρησιμοποιείτε ένα κατάλληλο, βαθμονομημένο θερμόμετρο για να επαληθεύσετε τη θερμοκρασία του Neogen® Ένθετου για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρος Μοριακής Ανίχνευσης (π.χ. θερμόμετρο μερικής εμβύθισης ή ψηφιακό θερμόμετρο θερμοζεύγους, όχι θερμόμετρο ολικής εμβύθισης). Το θερμόμετρο πρέπει να τοποθετείται στην προβλεπόμενη θέση στο Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με διασταυρούμενη μόλυνση κατά την προετοιμασία της δοκιμασίας:

- Αλλάξτε γάντια πριν από την ενυδάτωση των σφαιριδίων αντιδραστηρίου.
- Συνιστάται να χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα, με φραγμό για αερολύματα (με φίλτρο), ρύγχη πιπέτας κατηγορίας μοριακής βιολογίας.
- Χρησιμοποιείτε νέο ρύγχος πιπέτας για κάθε μεταφορά δείγματος.
- Χρησιμοποιείτε Καλές Εργαστηριακές Πρακτικές για τη μεταφορά του δείγματος από το δοκιμαστικό σωλήνα εμπλουτισμού στο δοκιμαστικό σωλήνα λύσης. Για να αποφευχθεί η μόλυνση της πιπέτας, ο χρήστης μπορεί να επιλέξει να προσθέσει ένα ενδιάμεσο βήμα μεταφοράς. Για παράδειγμα, ο χρήστης μπορεί να μεταφέρει κάθε εμπλουτισμένο δείγμα μέσα σε έναν αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα.
- Χρησιμοποιείτε σταθμό εργασίας μοριακής βιολογίας που να περιέχει μικροβιοκτόνο λυχνία, όπου είναι διαθέσιμη.
- Απολυμαίνετε περιοδικά τους πάγκους και τον εξοπλισμό του εργαστηρίου (πιπέτες, εργαλεία σφράγισης/αποσφράγισης κτλ.) με διάλυμα οικιακής χλωρίνης 1–5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) ή με διάλυμα απομάκρυνσης DNA.

Για να μειώσετε τους κινδύνους που σχετίζονται με ψευδώς θετικό αποτέλεσμα:

- Μην ανοίγετε ποτέ τους δοκιμαστικούς σωλήνες μετά την ενίσχυση.
- Απορρίπτετε πάντοτε τους μολυσμένους δοκιμαστικούς σωλήνες μουλιάζοντάς τους σε διάλυμα οικιακής χλωρίνης 1–5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) για 1 ώρα και μακριά από την περιοχή προετοιμασίας της δοκιμασίας.
- Μην κλιβανίσετε ποτέ τους δοκιμαστικούς σωλήνες αντιδραστηρίου μετά την ενίσχυση.
- Εάν πιθανολογείται ότι τα δείγματα περιέχουν υψηλά επίπεδα DNA *Cronobacter* (π.χ. DNA από μη βιώσιμα κύτταρα *Cronobacter* τα οποία έχουν υποβληθεί σε βήμα καταστροφής/αδρανοποίησης), οι υποθετικοί θετικοί εμπλουτισμοί θα πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία με DNάση πριν από το βήμα **Λύσης**. Επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο της Neogen για πρόσθετες οδηγίες. Αυτό το πρωτόκολλο δεν έχει ελεγχθεί κατά τη διάρκεια της μελέτης NF Validation.

Συμβουλευθείτε το Φύλλο Δεδομένων Ασφαλείας για πρόσθετες πληροφορίες και τοπικούς κανονισμούς σχετικά με την απόρριψη.

Εάν έχετε ερωτήσεις σχετικά με συγκεκριμένες εφαρμογές ή διαδικασίες, παρακαλούμε επισκεφθείτε τη διεύθυνση www.neogen.com ή επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο ή διανομέα της Neogen.

Ευθύνη του χρήστη

Οι χρήστες είναι υπεύθυνοι να εξοικειωθούν με τις οδηγίες και τις πληροφορίες του προϊόντος. Επισκεφθείτε την ιστοσελίδα μας στο **www.neogen.com** ή επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο ή διανομέα της Neogen για περισσότερες πληροφορίες.

Κατά την επιλογή μιας μεθόδου ελέγχου, είναι σημαντικό να αναγνωρίζετε ότι οι εξωτερικοί παράγοντες όπως οι μέθοδοι δειγματοληψίας, τα πρωτόκολλα ελέγχου, η προετοιμασία των δειγμάτων συμπεριλαμβανομένης της ομογενοποίησης και της ανάμειξης, ο χειρισμός και η εργαστηριακή τεχνική μπορεί επίσης να επηρεάσουν τα αποτελέσματα.

Αποτελεί ευθύνη του χρήστη να επιλέξει οποιαδήποτε μέθοδο ή προϊόν ελέγχου, για να αξιολογήσει έναν επαρκή αριθμό δειγμάτων με τις κατάλληλες μήτρες και μικροβιακές προκλήσεις, ώστε η επιλεγμένη μέθοδος να ικανοποιεί τα κριτήρια του χρήστη.

Αποτελεί επίσης ευθύνη του χρήστη να καθορίσει ότι όλες οι μέθοδοι δοκιμής και τα αποτελέσματα ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις των πελατών και των προμηθευτών του.

Όπως και με κάθε μέθοδο ελέγχου, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τη χρήση οποιουδήποτε προϊόντος Neogen Food Safety δεν συνιστούν εγγύηση της ποιότητας των μητρών ή των διαδικασιών που υποβάλλονται σε έλεγχο.

Για να βοηθήσει τους πελάτες να αξιολογήσουν τη μέθοδο για τις διάφορες μήτρες τροφίμων, η Neogen έχει αναπτύξει το κιτ Neogen® Πίνακα Ελέγχου Μοριακής Ανίχνευσης. Όταν χρειάζεται, χρησιμοποιήστε τον Πίνακα Ελέγχου (MC) για να προσδιορίσετε εάν η μήτρα έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει τα αποτελέσματα από την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter*. Ελέγξτε διάφορα δείγματα που είναι αντιπροσωπευτικά της μήτρας, δηλ. δείγματα που λαμβάνονται από διαφορετική προέλευση, κατά τη διάρκεια οποιασδήποτε περιόδου επικύρωσης όταν υιοθετείτε τη μέθοδο της Neogen, ή όταν ελέγχετε νέες ή άγνωστες μήτρες ή μήτρες που έχουν υποβληθεί σε αλλαγές στις πρώτες ύλες ή στην επεξεργασία.

Μια μήτρα μπορεί να οριστεί ως ένας τύπος προϊόντος με ενδογενείς ιδιότητες όπως σύνθεση και επεξεργασία. Οι διαφορές μεταξύ των μητρών μπορεί να είναι απλές, όπως οι επιδράσεις που προκαλούνται από διαφορές στην επεξεργασία ή στην παρουσίασή τους, για παράδειγμα, ακατέργαστο έναντι παστεριωμένου, φρέσκο έναντι αποξηραμένου κτλ.

Περιορισμός εγγυήσεων / Περιορισμένη αποκατάσταση

ΕΚΤΟΣ ΕΑΝ ΔΗΛΩΝΕΤΑΙ ΡΗΤΑ ΣΕ ΜΙΑ ΕΝΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΕΝΗ ΕΓΓΥΗΣΗ ΣΤΗΝ ΑΤΟΜΙΚΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ, Η NEOGEN ΑΠΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΡΗΤΕΣ ΚΑΙ ΕΝΝΟΟΥΜΕΝΕΣ ΕΓΓΥΗΣΕΙΣ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΑ ΟΧΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ, ΟΠΟΙΩΝΔΗΠΟΤΕ ΕΓΓΥΗΣΕΩΝ ΕΜΠΟΡΕΥΣΙΜΟΤΗΤΑΣ Ή ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΜΙΑ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ. Εάν οποιοδήποτε προϊόν Neogen Food Safety είναι ελαττωματικό, η Neogen ή ο εξουσιοδοτημένος διανομέας της, κατά την κρίση τους, θα αντικαταστήσουν ή επιστρέψουν την τιμή αγοράς του προϊόντος. Αυτές είναι οι αποκλειστικές σας αποκαταστάσεις. Επικοινωνήστε με τον αντιπρόσωπο της Neogen ή τον εξουσιοδοτημένο διανομέα της Neogen για περαιτέρω ερωτήσεις.

Περιορισμός της ευθύνης της Neogen

Η NEOGEN ΔΕΝ ΕΥΘΥΝΕΤΑΙ ΓΙΑ ΟΠΟΙΑΔΗΠΟΤΕ ΑΠΩΛΕΙΑ Ή ΖΗΜΙΑ, ΕΙΤΕ ΑΜΕΣΗ, ΕΜΜΕΣΗ, ΕΙΔΙΚΗ, ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΗ Ή ΑΠΟΘΕΤΙΚΗ ΖΗΜΙΑ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ, ΑΛΛΑ ΟΧΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ, ΔΙΑΦΥΓΟΝΤΩΝ ΚΕΡΔΩΝ. Η ευθύνη της Neogen δεν υπερβαίνει σε καμία περίπτωση και υπό καμία νομική θεωρία την τιμή αγοράς του προϊόντος που εικάζεται ότι είναι ελαττωματικό.

Αποθήκευση και Απόρριψη

Φυλάσσετε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* στους 2–8 °C. Να μην καταψύχεται. Αποφεύγετε την έκθεση του κιτ στο φως κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Αφού ανοίξετε το κιτ, ελέγξτε ότι το αλουμινένιο σακουλάκι είναι άθικτο. Εάν το αλουμινένιο σακουλάκι έχει υποστεί ζημιά, μη χρησιμοποιήσετε το προϊόν. Μετά το άνοιγμα, οι αχρησιμοποίητοι δοκιμαστικοί σωλήνες αντιδραστηρίων πρέπει πάντοτε να φυλάσσονται στο επανασφραγιζόμενο σακουλάκι με το αφυγραντικό μέσο, ώστε να διατηρείται η σταθερότητα των λυοφιλοποιημένων αντιδραστηρίων. Φυλάσσετε τα επανασφραγισμένα σακουλάκια στους 2–8 °C για χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο από 60 ημέρες.

Μη χρησιμοποιείτε την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* μετά την ημερομηνία λήξης. Η ημερομηνία λήξης και ο αριθμός παρτίδας επισημαίνονται στην εξωτερική ετικέτα του κουτιού. Μετά τη χρήση, το μέσο εμπλουτισμού και οι δοκιμαστικοί σωλήνες της Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* μπορεί ενδεχομένως να περιέχουν παθογόνα υλικά. Μετά την ολοκλήρωση του ελέγχου, τηρείτε τα τρέχοντα βιομηχανικά πρότυπα για την απόρριψη μολυσμένων αποβλήτων. Συμβουλευθείτε το Φύλλο Δεδομένων Ασφαλείας για πρόσθετες πληροφορίες και τοπικούς κανονισμούς σχετικά με την απόρριψη.

Οδηγίες Χρήσης

Ακολουθείτε όλες τις οδηγίες προσεκτικά. Η μη τήρηση των οδηγιών μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβή αποτελέσματα.

Απολυμαίνετε περιοδικά τους πάγκους και τον εξοπλισμό του εργαστηρίου (πιπέτες, εργαλεία σφράγισης/αποσφράγισης κτλ.) με διάλυμα οικιακής χλωρίνης 1–5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) ή με διάλυμα απομάκρυνσης DNA.

Ο χρήστης πρέπει να ολοκληρώσει την εκπαίδευση πιστοποίησης χειριστή για το Neogen Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης, όπως περιγράφεται στο έγγραφο “Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System” (Πρωτόκολλα και οδηγίες πιστοποίησης εγκατάστασης (IQ) / πιστοποίησης λειτουργίας (OQ) για το Neogen Σύστημα Μοριακής Ανίχνευσης)[6].

Βλέπε την ενότητα “Ειδικές οδηγίες για επικυρωμένες μεθόδους” για τις ειδικές απαιτήσεις:

Πίνακας 3 για τα πρωτόκολλα εμπλουτισμού σύμφωνα με AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2018.01 και *Performance Tested℠* Αριθμός Πιστοποιητικού 101703

Πίνακας 4 για τα πρωτόκολλα εμπλουτισμού σύμφωνα με NF VALIDATION Πιστοποιητικό 3M 01/20-03/18

Εμπλουτισμός του δείγματος

Ο Πίνακας 2, 3 ή 4 παρουσιάζει οδηγίες για πρωτόκολλα εμπλουτισμού για δείγματα τροφίμων και περιβαλλοντικών δειγμάτων.

Αποτελεί ευθύνη του χρήστη η επικύρωση εναλλακτικών πρωτοκόλλων δειγματοληψίας ή εμπλουτισμού ή αναλογιών αραίωσης, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι αυτή η μέθοδος ελέγχου πληροί τα κριτήρια του χρήστη.

Τρόφιμα, περιβαλλοντικές πούδρες, σκόνες, σαρώματα και σπόγγοι

1. Εξισορροπήστε το μέσο εμπλουτισμού σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20–25 °C) εκτός εάν επισημαίνεται διαφορετικά στο πρωτόκολλο εμπλουτισμού (Βλ. Πίνακα 2, 3 ή 4).
2. Συνδυάστε με ασηπτικό τρόπο το μέσο εμπλουτισμού και το δείγμα, και ομογενοποιήστε πλήρως μέσω ανάμειξης, διαδικασίας stomaching, ανάδευσης σε συσκευή vortex ή ανάμειξης με το χέρι για 2 ±0,2 λεπτά **ή μέχρι όλα τα συσσωματώματα να έχουν διαλυθεί τελείως και το εναιώρημα εμπλουτισμού να είναι ομοιογενές[7, 8].**
    α. Παράγοντες όπως η προετοιμασία των δειγμάτων συμπεριλαμβανομένης της ομογενοποίησης και της ανάμειξης, ο χειρισμός και η εργαστηριακή τεχνική μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα.
    β. Για τα δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε σωματιδιακή ύλη, συνιστάται η χρήση ασκών φιλτραρίσματος.
    γ. Για μήτρες που διογκώνονται στο νερό και είναι ιδιαίτερα ιξώδεις (π.χ. δημητριακά, άμυλα), συνιστάται η διενέργεια περαιτέρω αραιώσεων (>1:10) μέχρι το ιξώδες να μειωθεί κατάλληλα, ή η προσθήκη αποστειρωμένης 1% (βάρος κατ' όγκο) άλφα-αμυλάσης στο BPW (ISO)[8].
    δ. Για μεγάλα μεγέθη δείγματος δημητριακών, προσθέστε τη σκόνη δημητριακών αργά στο υγρό με συχνή ανάμειξη για να αποφύγετε τα συσσωματώματα.
3. Επωάστε όπως περιγράφεται στον αντίστοιχο πίνακα πρωτοκόλλου (βλ. Πίνακα 2, 3 ή 4).

Πίνακας 2. Γενικά πρωτόκολλα εμπλουτισμού

Πίνακας δειγμάτων	Μέγεθος δείγματος[1]	Όγκος ζωμού εμπλουτισμού[1, 2]	Θερμοκρασία εμπλουτισμού (±1 °C)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)	Όγκος ανάλυσης δείγματος
Παιδικό γάλα σε σκόνη (PIF) και πρώτες ύλες όπως ξηρή σκόνη γάλακτος, σκόνη σόγιας, σκόνη ορού γάλακτος, λακτόζη, ρυζάλευρο και μαλτοδεξτρίνη	1X γραμμάριο ανά δείγμα	9X mL BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µL
Πρώτες ύλες όπως άλατα, μεταλλικά στοιχεία, αμινοξέα, DHA (δοκοσαεξαενοϊκό οξύ) και βιταμίνες	1X γραμμάριο δείγμα	99X mL BPW (ISO) (1:100)	37	18–24	20 µL
Ξηρά περιβαλλοντικά δείγματα όπως σκόνη, σαρώματα, συλλογή ηλεκτρικής σκούπας	1X γραμμάριο ανά δείγμα	9X mL BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µL
Περιβαλλοντικός σπόγγος με 10 mL Ζωμό Letheen ή Ζωμό Ουδετεροποίησης D/E	1 συσκευή δειγματοληψίας	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µL

1. Η Neogen έχει αξιολογήσει την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* χρησιμοποιώντας τις αναλογίες αραίωσης στον Πίνακα 2 έως και 300 g. Αποτελεί ευθύνη του χρήστη η επικύρωση εναλλακτικών αναλογιών ή πρωτοκόλλων αραίωσης, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι η μέθοδος πληροί τα κριτήρια του χρήστη.
2. Χρησιμοποιείτε **προθερμασμένο** BPW (ISO) εάν ο όγκος του ζωμού εμπλουτισμού είναι >300 mL (π.χ. το δείγμα είναι >30 γραμμάρια).

Ειδικές οδηγίες για επικυρωμένες μεθόδους

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

AOAC® *Performance Tested℠* (PTM) Πιστοποιητικό αρ. 101703

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

Στις μελέτες του Ερευνητικού Ινστιτούτου OMA℠ και PTM℠, η Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* βρέθηκε ότι αποτελεί αποτελεσματική μέθοδο για την ανίχνευση του *Cronobacter.* Οι μήτρες που ελέγχθηκαν στη μελέτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Πρωτόκολλα εμπλουτισμού σύμφωνα με AOAC® *OMA*[SM] 2018.01 και *PTM*[SM] 101703

Πίνακας δειγμάτων	Μέγεθος δείγματος	Όγκος ζωμού εμπλουτισμού[1]	Θερμοκρασία εμπλουτισμού (±1 °C)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)	Όγκος ανάλυσης δείγματος
Βρεφικό γάλα σε σκόνη και βρεφικά δημητριακά σε σκόνη	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µL
Βρεφικά δημητριακά σε σκόνη χωρίς προβιοτικά	300 g	2700 mL BPW (ISO) (1:10)	Προθερμασμένο 37	18–24	20 µL
Βρεφικό γάλα σε σκόνη και βρεφικά δημητριακά σε σκόνη με προβιοτικά	300 g	2700 mL BPW (ISO) + 10 mg/L βανκομυκίνη	Προθερμασμένο 37	22–24	20 µL
Λακτόζη	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µL
Περιβαλλοντικός σπόγγος με 10 mL Ζωμό Ουδετεροποίησης D/E	1 συσκευή δειγματοληψίας	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µL

1. Χρησιμοποιείτε **προθερμασμένο** BPW (ISO) εάν ο όγκος του ζωμού εμπλουτισμού είναι >300 mL.

NF VALIDATION από την AFNOR Certification

3M 01/20-03/18

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη λήξη της εγκυρότητας, παρακαλούμε ανατρέξτε στο πιστοποιητικό NF VALIDATION που διατίθεται στον ιστότοπο που αναφέρεται παραπάνω.

Μέθοδος πιστοποίησης NF VALIDATION σύμφωνα με το πρότυπο ISO 16140-2[(9)] σε σύγκριση με το πρότυπο ISO 22964.

Πεδίο εγκυρότητας: Βρεφικό γάλα σε σκόνη και βρεφικά δημητριακά με και χωρίς προβιοτικά, πρώτες ύλες και περιβαλλοντικά δείγματα.

Προετοιμασία δείγματος: Τα δείγματα πρέπει να προετοιμάζονται σύμφωνα με τα πρότυπα EN ISO 22694[(2)] και EN ISO 6887[(7, 8)].

Έκδοση λογισμικού: Βλ. πιστοποιητικό.

Πίνακας 4. Πρωτόκολλα εμπλουτισμού σύμφωνα με την πιστοποιημένη μέθοδο NF VALIDATION 3M 01/20-03/18

Πίνακας δειγμάτων	Μέγεθος δείγματος	Όγκος ζωμού εμπλουτισμού[1]	Θερμοκρασία εμπλουτισμού (±1 °C)	Χρόνος εμπλουτισμού (ώρες)	Όγκος ανάλυσης δείγματος	Συνιστώμενο σημείο διακοπής[2, 3]
• Βρεφικό γάλα σε σκόνη • Βρεφικά δημητριακά σε σκόνη • Συστατικά όπως ξηρή σκόνη γάλακτος, σκόνη σόγιας, σκόνη ορού γάλακτος, λακτόζη, ρυζάλευρο, μαλτοδεξτρίνη • Ξηρά περιβαλλοντικά δείγματα όπως σκόνη, σαρώματα, συλλογή ηλεκτρικής σκούπας,	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µL	Ο ζωμός εμπλουτισμού ή το λύμα δείγματος μπορεί να φυλαχθεί στους 2–8 °C για έως 72 ώρες
• Σπόγγος, νερό έκπλυσης, μαντιλάκια	1 συσκευή δειγματοληψίας ή 10 mL					Ο ζωμός εμπλουτισμού ή το λύμα δείγματος μπορεί να φυλαχθεί στους 2–8 °C για έως 72 ώρες
Βρεφικό γάλα σε σκόνη και βρεφικά δημητριακά σε σκόνη (χωρίς προβιοτικά)	30–300 g	BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µL	Ο ζωμός εμπλουτισμού ή το λύμα δείγματος μπορεί να φυλαχθεί στους 2–8 °C για έως 72 ώρες
Βρεφικά δημητριακά σε σκόνη και βρεφικό γάλα σε σκόνη (με προβιοτικά)	30–300 g	BPW (ISO) + 10 mg/L βανκομυκίνη (1:10)	37	22–24	20 µL	Κανένα

1. Χρησιμοποιείτε προθερμασμένο BPW (ISO) εάν ο όγκος του ζωμού εμπλουτισμού είναι >300 mL (π.χ. το δείγμα είναι >30 γραμμάρια).
2. Αφού ο ζωμός εμπλουτισμού τεθεί εκτός φύλαξης, συνεχίστε τις δοκιμές από το Βήμα 1 στην ενότητα Λύση. Αφού το λύμα δείγματος τεθεί εκτός φύλαξης, συνεχίστε τις δοκιμές από το Βήμα 7 στην ενότητα Λύση.
3. Ανατρέξτε στο Παράρτημα Α για τον επανέλεγχο αποθηκευμένων θερμικά κατεργασμένων λυμάτων.

Προετοιμασία του Neogen® Δίσκου Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης

1. Διαβρέξτε ένα πανί ή πετσέτα μίας χρήσης με διάλυμα οικιακής χλωρίνης 1–5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) και σκουπίστε τον Neogen Δίσκο Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης.
2. Ξεπλύνετε τον Neogen Δίσκο Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης με νερό.
3. Χρησιμοποιήστε μια πετσέτα μίας χρήσης για να στεγνώσετε τον Neogen Δίσκο Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης.
4. Διασφαλίστε ότι ο Neogen Δίσκος Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης είναι στεγνός πριν τη χρήση.

Προετοιμασία του Neogen® Ένθετου Υποδοχής Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης

Τοποθετήστε το Neogen Ένθετο Υποδοχής Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης απευθείας στον πάγκο του εργαστηρίου: Ο Neogen Δίσκος Υποδοχής Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης δεν χρησιμοποιείται. Χρησιμοποιήστε το ένθετο υποδοχής σωλήνων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος εργαστηρίου (20–25 °C).

Προετοιμασία του Neogen® Ένθετου για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρος Μοριακής Ανίχνευσης

Τοποθετήστε το Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης σε μια διπλή μονάδα υποδοχής σωλήνων ξηρής θέρμανσης. Ενεργοποιήστε τη μονάδα ξηρής θέρμανσης και ρυθμίστε τη θερμοκρασία για να επιτρέψετε στο Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης να φθάσει και να διατηρήσει θερμοκρασία 100±1 °C.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Ανάλογα με τη μονάδα θέρμανσης, αφήστε το Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης να φθάσει στην κατάλληλη θερμοκρασία για περίπου 30 λεπτά. Χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο, βαθμονομημένο θερμόμετρο (π.χ. θερμόμετρο μερικής εμβύθισης ή ψηφιακό θερμόμετρο θερμοζεύγους, όχι θερμόμετρο ολικής εμβύθισης) τοποθετημένο στην καθορισμένη θέση, επαληθεύστε ότι το Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης βρίσκεται στους 100±1 °C.

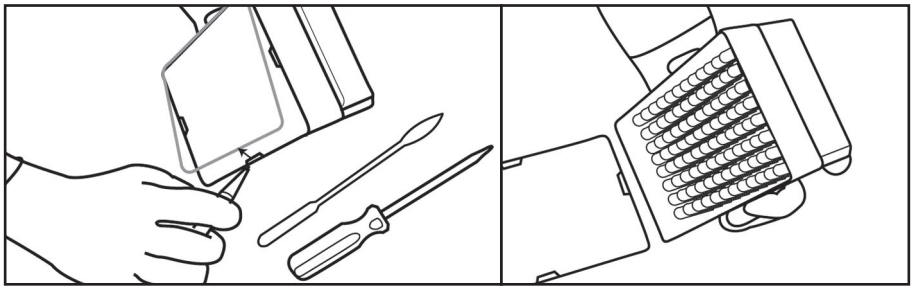
Προετοιμασία του Neogen® Οργάνου Μοριακής Ανίχνευσης

1. Εκκινήστε το Neogen® Λογισμικό Μοριακής Ανίχνευσης και συνδεθείτε. Επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο της Neogen Food Safety για να διασφαλίσετε ότι διαθέτετε την τελευταία έκδοση του λογισμικού.
2. Ενεργοποιήστε το Neogen Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης.
3. Δημιουργήστε ή επεξεργαστείτε μια διαδικασία με δεδομένα για κάθε δείγμα. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του Neogen Συστήματος Μοριακής Ανίχνευσης για λεπτομέρειες.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το Neogen Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης πρέπει να φθάσει σε κατάσταση ετοιμότητας προτού εισαχθεί ο Neogen Δίσκος Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης με τους δοκιμαστικούς σωλήνες αντίδρασης. Αυτό το βήμα θέρμανσης διαρκεί περίπου 20 λεπτά και υποδεικνύεται από ένα ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ φως στη γραμμή κατάστασης του οργάνου. Όταν το όργανο είναι έτοιμο για να αρχίσει μια διαδικασία, η γραμμή κατάστασης θα γίνει ΠΡΑΣΙΝΗ.

Λύση

Αφαιρέστε τον πυθμένα του στατώ Neogen Διαλύματος Λύσης με ένα κατσαβίδι πριν το τοποθετήσετε στο Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης.

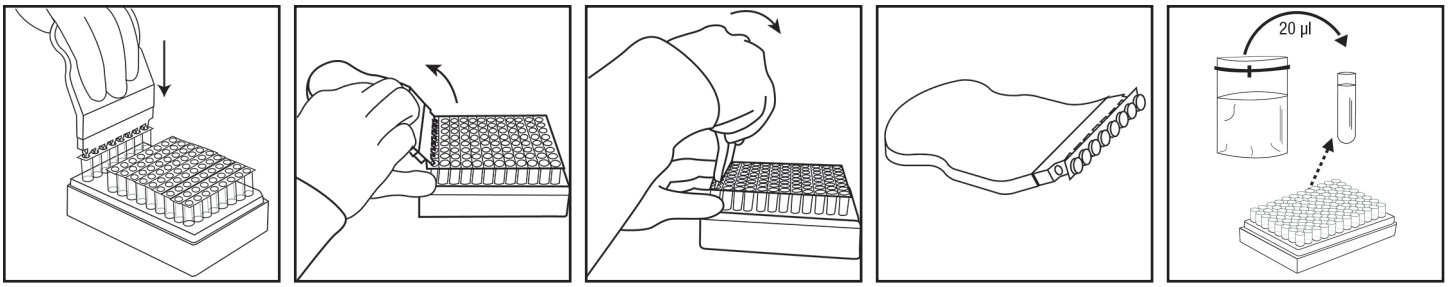


1. Αφήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης να θερμανθούν θέτοντας το στατώ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20–25 °C) κατά τη διάρκεια της νύχτας (16–18 ώρες). Εναλλακτικές λύσεις για την εξισορρόπηση των δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι να θέσετε τους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης επάνω στον πάγκο του εργαστηρίου για τουλάχιστον 2 ώρες, να επωάσετε τους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης σε επωαστήρα 37±1 °C για 1 ώρα ή να τους τοποθετήσετε σε διπλή μονάδα υποδοχής σωλήνων ξηρής θέρμανσης για 30 δευτερόλεπτα στους 100 ±1 °C.

2. Αναστρέψτε τους πωματισμένους δοκιμαστικούς σωλήνες για να αναμίξετε. Προχωρήστε στο επόμενο βήμα εντός 4 ωρών μετά την αναστροφή.
3. Βγάλτε το ζωμό εμπλουτισμού από τον επωαστήρα.
4. Απαιτείται ένας δοκιμαστικός σωλήνας Neogen Διαλύματος Λύσης για κάθε δείγμα και δείγμα ΑΕ (στείρο μέσο εμπλουτισμού).
   4.1 Οι ταινίες δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης μπορούν να κοπούν στον επιθυμητό αριθμό. Επιλέξτε τον αριθμό των μεμονωμένων δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης ή τις απαιτούμενες ταινίες των 8 δοκιμαστικών σωλήνων. Τοποθετήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης σε ένα κενό στατώ.
   4.2 Για να αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση, αποσφραγίζετε μία ταινία δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης κάθε φορά, και χρησιμοποιείτε νέο ρύγχος πιπέτας για κάθε βήμα μεταφοράς.
   4.3 Μεταφέρετε το εμπλουτισμένο δείγμα στους δοκιμαστικούς σωλήνες Neogen Διαλύματος Λύσης όπως περιγράφεται παρακάτω:

   > Μεταφέρετε κάθε εμπλουτισμένο δείγμα σε μεμονωμένο σωλήνα Neogen Διαλύματος Λύσης **πρώτα**. Μεταφέρετε τον ΑΕ **τελευταίο**.

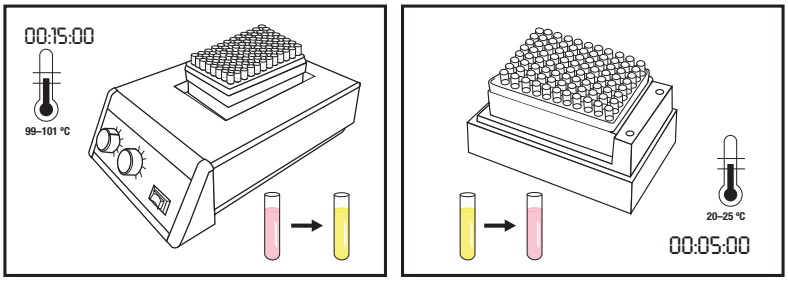
   4.4 Χρησιμοποιήστε το Neogen® Εργαλείο Σφράγισης / Αποσφράγισης - Λύσης Μοριακής Ανίχνευσης για να αποσφραγίσετε μία ταινία δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης – μία ταινία κάθε φορά.
   4.5 Απορρίψτε το πώμα του δοκιμαστικού σωλήνα Neogen Διαλύματος Λύσης – εάν το λύμα πρόκειται να διατηρηθεί για επανέλεγχο, τοποθετήστε τα πώματα μέσα σε ένα καθαρό δοχείο, για εκ νέου εφαρμογή μετά τη λύση.
      4.5.1. Για την επεξεργασία του διατηρημένου λύματος, βλ. Παράρτημα Α.
   4.6 Αναταράξτε τον σάκο εμπλουτισμού πριν τη συλλογή του δείγματος από την πλευρά με το φίλτρο όταν εργάζεστε με ιξώδη δείγματα.
   4.7 Μεταφέρετε 20 µL δείγματος σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Διαλύματος Λύσης εκτός εάν υποδεικνύεται διαφορετικά στον πίνακα πρωτοκόλλου.
5. Επαναλάβετε τα βήματα 4.4 έως 4.7 μέχρι το κάθε επιμέρους δείγμα να έχει προστεθεί σε έναν αντίστοιχο δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Διαλύματος Λύσης στην ταινία.



6. Όταν έχουν μεταφερθεί όλα τα δείγματα, μεταφέρετε 20 µL ΑΕ (στείρο μέσο εμπλουτισμού, π.χ. BPW) μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Διαλύματος Λύσης. Μη χρησιμοποιείτε νερό ως ΑΕ.
7. Επαληθεύστε ότι η θερμοκρασία του Neogen Ένθετου για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης βρίσκεται στους 100±1 °C.
8. Τοποθετήστε το ακάλυπτο στατώ δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης στο Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης και θερμάνετε για 15±1 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της θέρμανσης, το Neogen Διάλυμα Λύσης θα αλλάξει από ροζ (ψυχρό) σε κίτρινο (θερμό).

   Δείγματα που δεν έχουν υποβληθεί στην κατάλληλη θερμική κατεργασία κατά τη διάρκεια του βήματος λύσης της δοκιμασίας μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανός βιολογικός κίνδυνος και ΔΕΝ πρέπει να εισάγονται στο Neogen Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης.

9. Αφαιρέστε το ακάλυπτο στατώ των δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης από το Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης και αφήστε το να κρυώσει στο Neogen Ένθετο Υποδοχής Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης για τουλάχιστον 5 λεπτά και μέγιστο 10 λεπτά. Το Neogen Ένθετο Υποδοχής Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης, όταν χρησιμοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος χωρίς τον Neogen® Δίσκο Υποδοχής Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης, πρέπει να τοποθετηθεί απευθείας επάνω στον πάγκο του εργαστηρίου. Όταν κρυώσει, το Neogen Διάλυμα Λύσης θα αποκτήσει ξανά ροζ χρώμα.
10. Αφαιρέστε το στατώ των δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης από το Neogen Ένθετο Υποδοχής Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης.



Ενίσχυση

1. Απαιτείται ένας δοκιμαστικός σωλήνας Αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* για κάθε δείγμα και τον ΑΕ.
   1.1 Οι ταινίες δοκιμαστικών σωλήνων μπορούν να κοπούν στον επιθυμητό αριθμό δοκιμαστικών σωλήνων. Επιλέξτε τον απαιτούμενο αριθμό των μεμονωμένων δοκιμαστικών σωλήνων Αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* ή τις απαιτούμενες ταινίες των 8 δοκιμαστικών σωλήνων.
   1.2 Τοποθετήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες Αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* σε ένα κενό στατώ.
   1.3 Αποφύγετε να διαταράξετε τα σφαιρίδια αντιδραστηρίου από τον πάτο των δοκιμαστικών σωλήνων.
2. Επιλέξτε έναν δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Ελέγχου Αντιδραστηρίου και τοποθετήστε τον στο στατώ.
3. Για να αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση, αποσφραγίζετε μία ταινία δοκιμαστικών σωλήνων Αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* κάθε φορά, και χρησιμοποιείτε νέο ρύγχος πιπέτας για κάθε βήμα μεταφοράς.
4. Μεταφέρετε κάθε λύμα σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* και δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Ελέγχου Αντιδραστηρίου, όπως περιγράφεται παρακάτω:

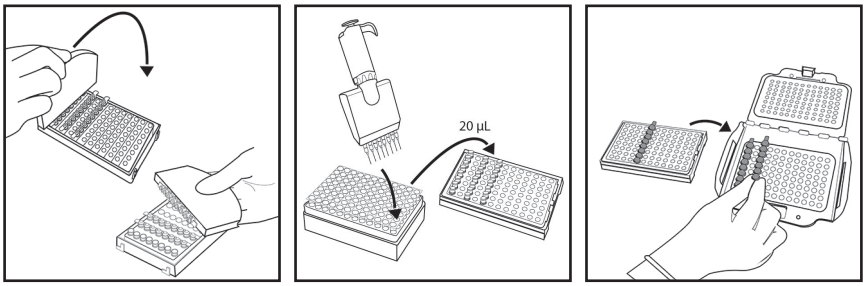
Μεταφέρετε κάθε λύμα δείγματος στους επιμέρους δοκιμαστικούς σωλήνες Αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* **πρώτα** και στη συνέχεια τον ΑΕ. Ενυδατώστε τον δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Ελέγχου Αντιδραστηρίου **τελευταίο**.

5. Χρησιμοποιήστε το Neogen® Εργαλείο Σφράγισης / Αποσφράγισης - Αντιδραστηρίου Μοριακής Ανίχνευσης για να αποσφραγίσετε τους δοκιμαστικούς σωλήνες Αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* – μία ταινία δοκιμαστικών σωλήνων Αντιδραστηρίου κάθε φορά. Απορρίψτε το πώμα.
   5.1 **Μεταφέρετε 20 µL του λύματος δείγματος από το επάνω 1/2 του υγρού (αποφύγετε το ίζημα) στον δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Διαλύματος Λύσης στον αντίστοιχο δοκιμαστικό σωλήνα Αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter*. Χορηγήστε υπό γωνία για να αποφύγετε να διαταράξετε τα σφαιρίδια. Αναμίξτε πιπετάροντας προσεκτικά πάνω-κάτω 5 φορές.**
   5.2 Επαναλάβετε το βήμα 5.1 μέχρι το επιμέρους λύμα Δείγματος να έχει προστεθεί σε έναν αντίστοιχο δοκιμαστικό σωλήνα Αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* στην ταινία.
   5.3 Καλύψτε τους δοκιμαστικούς σωλήνες Αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* με τα παρεχόμενα επιπλέον πώματα και χρησιμοποιήστε τη στρογγυλευμένη πλευρά του Neogen Εργαλείου Σφράγισης / Αποσφράγισης - Αντιδραστηρίου Μοριακής Ανίχνευσης για να ασκήσετε πίεση με μια κίνηση εμπρός-πίσω, διασφαλίζοντας ότι το πώμα έχει εφαρμοστεί σφιχτά.
   5.4 Επαναλάβετε τα βήματα 5.1 έως 5.3 όπως απαιτείται, για τον αριθμό των δειγμάτων προς έλεγχο.

5.5 Όταν έχουν μεταφερθεί όλα τα λύματα δείγματος, επαναλάβετε τα βήματα 5.1 έως 5.3 για να μεταφέρετε 20 µL του λύματος AE μέσα σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter*.

5.6 Μεταφέρετε **20 µL του λύματος AE μέσα σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Ελέγχου Αντιδραστηρίου**. Χορηγήστε υπό γωνία για να αποφύγετε να διαταράξετε τα σφαιρίδια. Αναμίξτε πιπετάροντας προσεκτικά πάνω-κάτω 5 φορές.

6. Φορτώστε τους σφραγισμένους δοκιμαστικούς σωλήνες σε έναν καθαρό και απολυμασμένο Neogen Δίσκο Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης. Κλείστε και ασφαλίστε το καπάκι του Neogen Δίσκου Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης.



7. Ανασκοπήστε και επιβεβαιώστε τη διαμορφωμένη διαδικασία στο Neogen Λογισμικό Μοριακής Ανίχνευσης.
8. Κάντε κλικ στο κουμπί Έναρξη στο λογισμικό και επιλέξτε το όργανο που θα χρησιμοποιηθεί. Το καπάκι του επιλεγμένου οργάνου ανοίγει αυτόματα.
9. Τοποθετήστε τον Neogen Δίσκο Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης μέσα στο Neogen Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης και κλείστε το καπάκι για να εκκινήσετε τη δοκιμασία. Τα αποτελέσματα παρέχονται εντός 60 λεπτών, αν και τα θετικά μπορεί να ανιχνευθούν νωρίτερα.
10. Αφού ολοκληρωθεί η δοκιμασία, αφαιρέστε τον Neogen Δίσκο Ταχείας Φόρτωσης Μοριακής Ανίχνευσης από το Neogen Όργανο Μοριακής Ανίχνευσης και απορρίψτε τους δοκιμαστικούς σωλήνες μουλιάζοντάς τους σε διάλυμα οικιακής χλωρίνης 1–5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) για 1 ώρα και μακριά από την περιοχή προετοιμασίας της δοκιμασίας.

ΥΠΟΔΕΙΞΗ: Για την ελαχιστοποίηση του κινδύνου ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων λόγω διασταυρούμενης μόλυνσης, ποτέ μην ανοίγετε τους δοκιμαστικούς σωλήνες αντιδραστηρίων που περιέχουν ενισχυμένο DNA. Αυτό περιλαμβάνει τον δοκιμαστικό σωλήνα Αντιδραστηρίου Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter*, τον δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Ελέγχου Αντιδραστηρίου και τον δοκιμαστικό σωλήνα Neogen Πίνακα Ελέγχου. Απορρίπτετε πάντοτε τους σφραγισμένους δοκιμαστικούς σωλήνες αντιδραστηρίου μουλιάζοντάς τους σε διάλυμα οικιακού λευκαντικού 1–5% (όγκο κατ' όγκο σε νερό) για 1 ώρα και μακριά από την περιοχή προετοιμασίας της δοκιμασίας.

Αποτελέσματα και ερμηνεία

Ένας αλγόριθμος ερμηνεύει την καμπύλη παροχής φωτός που προκύπτει από την ανίχνευση της ενίσχυσης νουκλεϊνικών οξέων. Τα αποτελέσματα αναλύονται αυτόματα από το λογισμικό και κωδικοποιούνται χρωματικά με βάση το αποτέλεσμα. Ένα Θετικό ή Αρνητικό αποτέλεσμα καθορίζεται μέσω ανάλυσης ενός αριθμού μοναδικών παραμέτρων καμπύλης. Τα υποθετικά θετικά αποτελέσματα αναφέρονται σε πραγματικό χρόνο, ενώ τα Αρνητικά και τα αποτελέσματα Προς Επιθεώρηση εμφανίζονται μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Ακόμα και ένα αρνητικό δείγμα δεν θα δώσει μηδενική ένδειξη, καθώς το σύστημα και τα αντιδραστήρια ενίσχυσης Neogen Δοκιμασίας Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter* έχουν μια σχετική μονάδα φωτός (RLU) “υποβάθρου”.

Επιβεβαίωση

- Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων σύμφωνα με τη μέθοδο πιστοποίησης NF Validation

Στο πλαίσιο του NF VALIDATION, όλοι οι υποθετικοί θετικοί εμπλουτισμοί πρέπει να επιβεβαιώνονται ακολουθώντας επιβεβαίωση μεθόδου αναφοράς[2], αρχίζοντας με τη μεταφορά από τον πρωτογενή εμπλουτισμό (BPW ISO ή BPW ISO που συμπληρώνεται με 10 mg/L βανκομυκίνης).

- Άλλο πρωτόκολλο επιβεβαίωσης

Οι υποθετικοί θετικοί εμπλουτισμοί πρέπει να επιβεβαιώνονται σύμφωνα με τις τυπικές διαδικασίες λειτουργίας του εργαστηρίου ή ακολουθώντας την κατάλληλη επιβεβαίωση μεθόδου αναφοράς[1,2], αρχίζοντας με τη μεταφορά από τον πρωτογενή εμπλουτισμό (BPW ISO ή BPW ISO που συμπληρώνεται με 10 mg/L βανκομυκίνης) σε ένα μέσο δευτερεύοντος εμπλουτισμού, ακολουθούμενη από μετέπειτα εξέταση σε αντικειμενοφόρο και επιβεβαίωση των απομονωμάτων χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες βιοχημικές, οροδιαγνωστικές ή/και μοριακές μεθόδους.

Στη σπάνια περίπτωση ασυνήθιστης παροχής φωτός, ο αλγόριθμος το επισημαίνει ως Προς Επιθεώρηση. Η Neogen συνιστά στο χρήστη να επαναλάβει τη δοκιμασία για όλα τα δείγματα Προς Επιθεώρηση. Εάν το αποτέλεσμα συνεχίζει να είναι Προς Επιθεώρηση, προχωρήστε στον έλεγχο επιβεβαίωσης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που προτιμάτε ή όπως καθορίζεται από τους τοπικούς κανονισμούς[1,2].

Σε περίπτωση ασυμφωνίας των αποτελεσμάτων (υποθετικά θετικά με την Neogen Δοκιμασία Μοριακής Ανίχνευσης 2 - *Cronobacter*, που δεν έχουν επιβεβαιωθεί με έναν από τους τρόπους που περιγράφονται παραπάνω), το εργαστήριο πρέπει να ακολουθεί τις καθιερωμένες τυπικές διαδικασίες λειτουργίας του για να αναφέρει τα αποτελέσματά του.

Εάν έχετε ερωτήσεις σχετικά με συγκεκριμένες εφαρμογές ή διαδικασίες, παρακαλούμε επισκεφθείτε τη διεύθυνση www.neogen.com ή επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο ή διανομέα της Neogen.

Παράρτημα Α. Διακοπή πρωτοκόλλου: Αποθήκευση και επανέλεγχος θερμικά κατεργασμένων λυμάτων

1. Για να αποθηκεύσετε ένα θερμικά κατεργασμένο λύμα, επαναπωματίστε το δοκιμαστικό σωλήνα λύσης με ένα καθαρό πώμα (βλ. ενότητα **Λύση**, 4.5)
2. Αποθηκεύστε στους 2 έως 8 °C για έως 72 ώρες.
3. Προετοιμάστε ένα αποθηκευμένο δείγμα για ενίσχυση αναστρέφοντας 2–3 φορές για να αναμίξετε.
4. Αφαιρέστε το πώμα από τους δοκιμαστικούς σωλήνες.
5. Τοποθετήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες με το αναμεμιγμένο λύμα στο Neogen Ένθετο για Υποδοχή Σωλήνων Θερμαντήρα Μοριακής Ανίχνευσης και θερμάνετε στους 100±1 °C για 5±1 λεπτά.
6. Αφαιρέστε το στατώ των δοκιμαστικών σωλήνων Neogen Διαλύματος Λύσης από το ένθετο θέρμανσης και αφήστε το να κρυώσει στο Neogen Ένθετο Υποδοχής Σωλήνων για Ψύξη Μοριακής Ανίχνευσης για τουλάχιστον 5 λεπτά και μέγιστο 10 λεπτά.
7. Συνεχίστε το πρωτόκολλο στην ενότητα **Ενίσχυση** που περιγράφεται λεπτομερώς παραπάνω.

Βιβλιογραφία:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
8. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

Ανατρέξτε στις τρέχουσες εκδόσεις των τυπικών μεθόδων που παρατίθενται παραπάνω.

Επεξήγηση των Συμβόλων

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

NEOGEN

Informacje o produkcie

Molekularny test do wykrywania 2 – *Cronobacter*

Opis i przeznaczenie produktu

Neogen® Molekularny test do wykrywania 2 – *Cronobacter* stosuje się razem z systemem Neogen® do diagnostyki molekularnej w celu szybkiego i swoistego wykrywania bakterii *Cronobacter* w próbkach pochodzących ze wzbogaconego pokarmu 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].

Neogen Molekularny test do wykrywania 2 – *Cronobacter* jest przeznaczony do stosowania w środowisku laboratoryjnym przez specjalistów stosownie 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. Neogen Molekularnego testu do wykrywania 2 – *Cronobacter* 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 wzbogacającego może mieć wpływ na otrzymywane wyniki. Czynniki takie jak metody pobierania próbek, protokoły przeprowadzania badań, przygotowanie próbki, w tym homogenizacja i mieszanie, postępowanie i techniki laboratoryjne również mogą wpłynąć na wynik badania. Firma Neogen zaleca ocenienie metody wykorzystującej podłoże wzbogacające w środowisku użytkownika, stosując wystarczającą liczbę próbek konkretnej żywności i/lub próbek środowiskowych oraz próbek stwarzających wyzwania związane z drobnoustrojami, aby zapewnić, że dana metoda spełnia potrzeby użytkownika.

Firma Neogen oceniła Neogen Molekularny test do wykrywania 2 – *Cronobacter* przy użyciu buforowanej wody peptonowej 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 Neogen Molekularny test do wykrywania 2 – *Cronobacter* zawiera 96 testów, opisanych w Tabeli 1.

Tabela 1. Elementy zestawu Neogen Molekularnego testu do wykrywania

Element	Charakterystyka	Liczba sztuk	Zawartość	Komentarze
Roztwór lizujący Neogen® (LS)	Różowy roztwór w przezroczystych probówkach	96 (12 taśm z 8 probówkami)	580 µl LS na probówkę	Ustawione w statywie i gotowe do użytku
Neogen® Molekularny test do wykrywania 2 – *Cronobacter* Probówki z reagentami	Probówki pomarańczowo-czerwone	96 (12 taśm z 8 probówkami)	Liofilizowana swoista mieszanina do amplifikacji i wykrywania	Gotowe do użycia
Dodatkowe korki	Korki pomarańczowo-czerwone	96 (12 taśm z 8 korkami)		Gotowe do użycia
Kontrola Neogen® reagenta (KR)	Przezroczyste probówki z korkiem zatrzaskowym	16 (2 woreczki po 8 oddzielnych probówek)	Liofilizowane DNA kontrolne, mieszanina do amplifikacji i wykrywania	Gotowe do użycia

Kontrola ujemna, niebędąca częścią zestawu, to jałowe podłoże wzbogacające, np. BPW ISO. Nie stosować wody jako kontroli ujemnej.

Bezpieczeństwo

Użytkownik powinien dokładnie zapoznać się ze wszystkimi informacjami dotyczącymi bezpieczeństwa zawartymi w instrukcji dotyczącej systemu Neogen do diagnostyki molekularnej oraz Neogen Molekularnego testu do wykrywania 2 – *Cronobacter* 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 uszkodzenia mienia.

WAŻNA INFORMACJA: Oznacza potencjalnie niebezpieczną sytuację, której skutkiem, w razie niepodjęcia środków zapobiegawczych, może być uszkodzenie mienia.

⚠ OSTRZEŻENIE

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

Obowiązkiem użytkownika jest przeszkolenie personelu w zakresie aktualnych, odpowiednich technik badań: przykładowo, Dobrych praktyk laboratoryjnych[3], 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.
- Neogen Molekularny test do wykrywania 2 – *Cronobacter* należy przechowywać w sposób podany na opakowaniu i w informacjach o produkcie.
- Neogen Molekularny test do wykrywania 2 – *Cronobacter* należy zawsze wykorzystać przed upływem terminu ważności.
- Neogen Molekularny test do wykrywania 2 – *Cronobacter* należy wykorzystać do badania próbek żywności, paszy i środowiska przetwarzania żywności, które poddano walidacji wewnętrznej lub przez osoby trzecie.
- Neogen Molekularny test do wykrywania 2 – *Cronobacter* należy stosować wyłącznie w połączeniu z powierzchniami, środkami odkażającymi, protokołami i szczepami bakterii poddanymi walidacji wewnętrznej lub przez osoby trzecie.
- W przypadku próbki środowiskowej zawierającej bufor neutralizujący z kompleksem sulfonianu arylu przed rozpoczęciem badania należy przygotować roztwór rozcieńczony w stosunku 1:2 (1 część próbki w 1 części jałowego bulionu wzbogacającego). Inną możliwością jest przeniesienie 10 µl wzbogacającego 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. Protokół ten nie został przetestowany podczas badania NF Validation.

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 wzbogacające oraz sprzęt lub powierzchnie, które mogły mieć kontakt z inkubowanym podłożem wzbogacającym, 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 wzbogacającym oraz reagentem po amplifikacji.
- Należy utylizować wzbogacone próbki i związane z nimi zanieczyszczone odpady zgodnie z obowiązującymi normami lokalnymi/regionalnymi/krajowymi/branżowymi.
- 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.

Aby zmniejszyć ryzyko związane z zanieczyszczeniem krzyżowym podczas przygotowania testu:

- Należy zawsze nosić rękawiczki (aby chronić użytkownika i zapobiegać wprowadzaniu nukleaz).

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.

UWAGA

Aby zmniejszyć ryzyko związane z zanieczyszczeniem krzyżowym podczas przygotowania testu:

- Zmienić rękawiczki przed nawodnieniem osadu reagenta.
- Zaleca się stosowanie jałowych końcówek pipet do biologii molekularnej z (filtrowaną) barierą aerozolową.
- Do każdego przeniesienia próbki używać nowej końcówki pipety.
- Przy przenoszeniu próbek z probówki wzbogacenia do probówki lizującej należy przestrzegać zasad dobrej praktyki laboratoryjnej. Aby uniknąć skażenia pipetora, użytkownik może zdecydować się dodać etap transferu pośredniego. Przykładowo można przenieść wzbogaconą próbkę do jałowej probówki.
- W miarę możliwości należy używać stanowiska badawczego biologii molekularnej z lampą bakteriobójczą.
- Należy okresowo dezynfekować stoły i sprzęt laboratoryjny (pipety, narzędzia do zakładania/zdejmowania korków itp.) za pomocą 1–5% (obj./obj., wodnego) roztworu domowego wybielacza lub roztworu do usuwania DNA.

Aby ograniczyć ryzyko związane z wynikiem fałszywie dodatnim:

- Nie otwierać probówek po procesie amplifikacji.
- Zanieczyszczone probówki należy utylizować, namaczając je w 1–5% (obj./obj., wodnym) roztworze domowego wybielacza przez 1 godzinę i wynosząc poza obszar przygotowania testów.
- Nie umieszczać probówek reagenta w autoklawie po procesie amplifikacji.
- Jeśli istnieje podejrzenie, że próbki zawierają duże ilości DNA bakterii *Cronobacter* (np. DNA pochodzące z tkanek nieżywotnych *Cronobacter* poddanych etapowi eliminacji/inaktywacji), domniemane dodatnie wzbogacenia próbek należy poddać DNazie przed etapem **lizy**. Dodatkowe instrukcje można uzyskać u przedstawiciela firmy Neogen. Protokół ten nie został przetestowany podczas badania NF Validation.

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, w tym homogenizacja i mieszanie, dalsze postępowanie i technika laboratoryjna mogą wpływać na uzyskiwane wyniki.

Obowiązkiem użytkownika przy wyborze jakiejkolwiek metody testowania lub produktu jest poddanie ocenie dostatecznej liczby próbek z właściwymi macierzami i z uwzględnieniem zagrożeń powodowanych przez mikroorganizmy, tak aby zastosowana metoda mogła spełnić oczekiwania użytkownika i ustalone przez niego kryteria.

Obowiązkiem użytkownika jest również dopilnowanie, aby zastosowane metody testowania i uzyskane wyniki spełniały wymagania klienta i dostawcy.

Podobnie jak w przypadku każdej metody testowania, wyniki uzyskiwane za pomocą produktu firmy Neogen Food Safety nie stanowią gwarancji jakości testowanych macierzy lub procesów.

Aby pomóc klientom ocenić metodę dla różnych macierzy, firma Neogen opracowała zestaw kontroli Neogen® macierzy do diagnostyki molekularnej. W razie potrzeby należy użyć zestawu kontroli macierzy (KM) do ustalenia, czy dana macierz może wpływać na wyniki Neogen Molekularnego testu do wykrywania 2 – *Cronobacter*. Należy przetestować kilka próbek reprezentatywnych dla macierzy, czyli próbek pozyskanych z różnych źródeł, podczas dowolnego okresu walidacji przy stosowaniu metody firmy Neogen lub podczas testowania nowych lub nieznanych macierzy albo macierzy poddanych zmianom w zakresie procesu lub surowców.

Macierz można zdefiniować jako typ produktu o nieodłącznych właściwościach, takich jak skład i proces wytwarzania. Różnice pomiędzy macierzami mogą być równie łatwo zauważalne, jak efekty spowodowane różnicami w procedurach obróbki lub prezentacji, przykładowo surowe a pasteryzowane, świeże a suszone itd.

Ograniczenie gwarancji / Ograniczony środek prawny

JEŚLI NIE ZOSTAŁO TO WYRAŹNIE OKREŚLONE W ROZDZIALE DOT. OGRANICZONEJ GWARANCJI POJEDYNCZYCH OPAKOWAŃ PRODUKTÓW, FIRMA NEOGEN WYŁĄCZA ODPOWIEDZIALNOŚĆ WSZYSTKICH GWARANCJI DOMNIEMANYCH I DOROZUMIANYCH, W TYM MIĘDZY INNYMI, DOWOLNYCH GWARANCJI ZGODNOŚCI Z PRZEZNACZENIEM I PRZYDATNOŚCI DO OKREŚLONEGO CELU. W razie wad jakiegokolwiek produktu firmy Neogen Food Safety firma Neogen lub jej autoryzowany dystrybutor wymieni taki produkt lub, wedle własnego uznania, zwróci koszty zakupu tego produktu. Są to jedyne przysługujące środki zaradcze. W przypadku dalszych pytań prosimy o kontakt z przedstawicielem firmy Neogen lub autoryzowanym dystrybutorem firmy Neogen.

Ograniczenie odpowiedzialności firmy Neogen

FIRMA NEOGEN NIE BĘDZIE ODPOWIEDZIALNA ZA JAKIEKOLWIEK SZKODY ANI STRATY, ZARÓWNO BEZPOŚREDNIE, POŚREDNIE, SZCZEGÓLNE, UBOCZNE LUB NASTĘPCZE, W TYM MIĘDZY INNYMI ZA UTRACONE ZYSKI. W żadnym wypadku odpowiedzialność firmy Neogen przyznana na mocy prawa nie może przekroczyć ceny zakupu rzekomo wadliwego produktu.

Przechowywanie i utylizacja

Neogen Molekularny test do wykrywania 2 – *Cronobacter* należy przechowywać w temp. 2–8°C. Nie zamrażać. Podczas przechowywania chronić zestaw przed światłem. Po otwarciu zestawu należy sprawdzić, czy woreczek foliowy nie jest uszkodzony. Nie używać zestawu, jeżeli woreczek jest uszkodzony. Po otwarciu nieużywane probówki z reagentem należy przechowywać w woreczku wielokrotnego zamknięcia z pochłaniaczem wilgoci wewnątrz, co pozwoli zachować stabilność liofilizowanych reagentów. Ponownie zamknięte woreczki można przechowywać w temp. 2–8°C maksymalnie przez 60 dni.

Nie stosować Neogen Molekularnego testu do wykrywania 2 – *Cronobacter* po upływie daty ważności. Termin ważności i numer partii podano na zewnętrznej etykiecie pudełka. Po użyciu podłoże wzbogacające i probówki Neogen Molekularnego testu do wykrywania 2 – *Cronobacter* 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 użytkownika systemu Neogen do diagnostyki molekularnej (OQ), jak opisano w dokumencie „instrukcje i protokoły odnośnie wymagań dotyczących instalacji (IQ) / kwalifikacji operacyjnej (OQ) systemu Neogen do diagnostyki molekularnej”[6].

Szczegółowe wymagania opisano w części „Specjalne instrukcje dotyczące zatwierdzonych metod”:

Tabela 3 – protokoły wzbogacania według AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2018.01 i certyfikatu *Performance Tested*℠ nr 101703.

Tabela 4 – protokoły wzbogacania zgodnie z certyfikatem NF VALIDATION 3M 01/20-03/18.

Wzbogacanie próbki

Tabele 2, 3 i 4 zawierają wytyczne dotyczące protokołów wzbogacania żywności i próbek środowiskowych.

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

Żywność, proszki środowiskowe, pył, zmiotki i gąbki

1. Jeśli procedura wzbogacania nie stanowi inaczej (patrz Tabele 2, 3 lub 4), doprowadzić podłoże wzbogacające do temperatury pokojowej (20-25°C).
2. Aseptycznie połączyć podłoże wzbogacające z próbką i dokładnie zhomogenizować poprzez zmieszanie, wytrząsanie, wirowanie lub mieszanie ręczne przez 2 ± 0,2 minuty **lub do całkowitego rozpuszczenia wszystkich grudek i uzyskania jednolitej zawiesiny wzbogacającej**[7, 8].
    a. Czynniki takie jak przygotowanie próbki, w tym homogenizacja i mieszanie, postępowanie i techniki laboratoryjne również mogą wpłynąć na wynik badania.
    b. W przypadku próbek o wysokiej zawartości cząstek stałych zaleca się stosowanie worków z filtrem.

c. W przypadku macierzy, które zwiększają swoją objętość w wodzie i są wysoce lepkie (np. zboża, skrobie), zaleca się wykonanie dalszych rozcieńczeń (> 1:10) aż do odpowiedniego zmniejszenia lepkości lub dodanie sterylnej 1% (% obj.) alfa-amylazy do BPW (ISO)[8].

d. W przypadku dużych próbek kaszek powoli dodać kaszkę w proszku do płynu, często mieszając, aby uniknąć grudek.

3. Inkubować w sposób podany w tabeli odpowiedniego protokołu (patrz Tabela 2, 3 lub 4).

Tabela 2. Ogólne protokoły wzbogacania

Macierz próbki	Wielkość próbki[1]	Objętość bulionu wzbogacającego[1,2]	Temperatura wzbogacania (± 1°C)	Czas wzbogacania (godz.)	Objętość badanej próbki
Mleka w proszku dla niemowląt i materiały nieprzetworzone, takie jak mleko w proszku, proszek sojowy, serwatka w proszku, laktoza, mąka ryżowa i maltodekstryna	Próbka 1X g	9X ml BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl
Materiały nieprzetworzone, takie jak sole, minerały, aminokwasy, DHA (kwas dokozaheksaenowy) i witaminy	Probka 1X g	99X ml BPW (ISO) (1:100)	37	18–24	20 µl
Suche próbki środowiskowe, takie jak kurz, zmiotki, brud zassany do odkurzacza	Próbka 1X g	9X ml BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl
Gąbka środowiskowa z 10 ml bulionu Letheen lub bulionu neutralizującego D/E	1 urządzenie do pobierania próbek	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl

1. Firma Neogen oceniła Neogen Molekularny test do wykrywania 2 – *Cronobacter* przy użyciu współczynników rozcieńczenia podanych w Tabeli 2, do 300 g. Użytkownik ma obowiązek przeprowadzić walidację alternatywnych protokołów i proporcji roztworów, aby sprawdzić, czy metoda badawcza spełnia kryteria określone przez użytkownika.
2. Jeśli objętość bulionu wzbogacającego jest większa niż 300 ml (np. próbka jest większa niż 30 g), należy stosować **wstępnie ogrzane** podłoże BPW (ISO).

Specjalne instrukcje dotyczące zatwierdzonych metod

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

Certyfikat nr 101703 AOAC® *Performance Tested℠* (PTM)

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

W badaniach AOAC Research Institute OMA℠ i PTM℠ Neogen Molekularny test do wykrywania 2 – *Cronobacter* okazał się być skuteczną metodą wykrywania bakterii *Cronobacter.* W Tabeli 3 przedstawiono macierze przetestowane w ramach tego badania.

Tabela 3. Protokoły wzbogacania zgodnie z AOAC® *OMA*[SM] 2018.01 i *PTM*[SM] 101703

Macierz próbki	Wielkość próbki	Objętość bulionu wzbogacającego[1]	Temperatura wzbogacania (± 1°C)	Czas wzbogacania (godz.)	Objętość badanej próbki
Mleko w proszku dla niemowląt i kaszka w proszku dla niemowląt	10 g	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl
Nieprobiotyczna kaszka w proszku dla niemowląt	300 g	2700 ml BPW (ISO) (1:10)	Wstępnie ogrzane 37	18–24	20 µl
Mleko w proszku dla niemowląt i kaszka w proszku dla niemowląt z probiotykami	300 g	2700 ml BPW (ISO) + 10 mg/l wankomycyny	Wstępnie ogrzane 37	22–24	20 µl
Laktoza	10 g	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl
Gąbka środowiskowa z 10 ml bulionu neutralizującego D/E	1 urządzenie do pobierania próbek	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl

1. Jeśli objętość bulionu wzbogacającego jest większa niż 300 ml, należy stosować **wstępnie ogrzane** podłoże BPW (ISO).

Certyfikacja NF VALIDATION instytutu AFNOR Certification

3M 01/20-03/18
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[9] w porównaniu do normy ISO 22964.

Zakres zatwierdzania: preparat w proszku dla niemowląt i kaszki w proszku dla niemowląt z probiotykami lub bez, materiały nieprzetworzone i próbki środowiskowe.

Przygotowanie próbki: próbki należy przygotować zgodnie z normą EN ISO 22694[2] i EN ISO 6887[7, 8].

Wersja oprogramowania: patrz certyfikat.

Tabela 4. Protokoły wzbogacania zgodnie z metodą 3M 01/20-03/18 certyfikowaną według NF VALIDATION

Macierz próbki	Wielkość próbki	Objętość bulionu wzbogacającego[1]	Temperatura wzbogacania (± 1°C)	Czas wzbogacania (godziny)	Objętość badanej próbki	Zalecany punkt przerwania[2, 3]
• Mleko w proszku dla niemowląt • Kaszka w proszku dla niemowląt • Składniki takie jak mleko w proszku, proszek sojowy, serwatka w proszku, laktoza, mąka ryżowa, maltodekstryna • Suche próbki środowiskowe, takie jak kurz, zmiotki, brud zassany do odkurzacza	10 g	90 ml BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl	Bulion wzbogacający lub próbkę lizatu można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 72 godziny
• Gąbka, woda do płukania, chusteczki	1 urządzenie do pobierania próbek lub 10 ml					Bulion wzbogacający lub próbkę lizatu można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 72 godziny
Mleko w proszku dla niemowląt i kaszka w proszku dla niemowląt (nieprobiotyczne)	30–300 g	BPW (ISO) (1:10)	37	18–24	20 µl	Bulion wzbogacający lub próbkę lizatu można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 72 godziny
Mleko w proszku dla niemowląt i kaszka w proszku dla niemowląt (z probiotykiem)	30–300 g	BPW (ISO) + 10 mg/l wankomycyny (1:10)	37	22–24	20 µl	Żaden

1. Jeśli objętość bulionu wzbogacającego jest większa niż 300 ml (np. próbka jest większa niż 30 g), należy stosować wstępnie ogrzane podłoże BPW (ISO).
2. Po wyjęciu bulionu wzbogacającego z magazynu należy wznowić testy od kroku 1 części Lizy. Po wyjęciu próbki lizatu z magazynu należy wznowić testy od kroku 7 części Lizy.
3. Ponowne badanie przechowywanych lizatów poddanych obróbce termicznej – patrz Załącznik A.

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. Taca Neogen bloku chłodzenia do diagnostyki molekularnej nie będzie potrzebna. Stosować blok w temperaturze otoczenia w laboratorium (20–25°C).

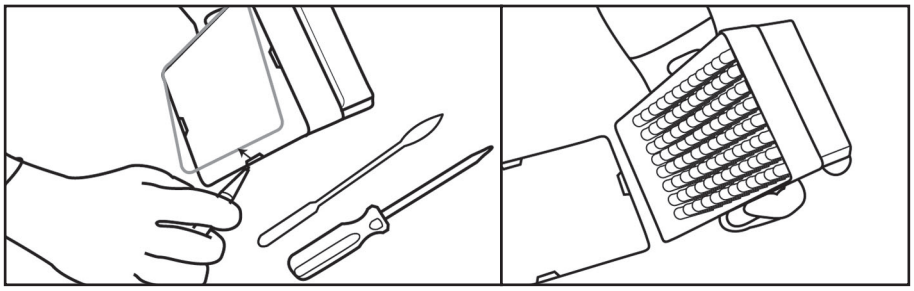
Przygotowanie Wkładki Neogen® bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej
Wkładkę Neogen bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej należy umieścić w suchym podwójnym bloku grzewczym. Włączyć suchy blok grzewczy i ustawić temperaturę pozwalającą Wkładce Neogen bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej 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 ± 1°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 probówkami reakcyjnymi Urządzenie Neogen do diagnostyki molekularnej musi osiągnąć stan gotowości. Etap nagrzewania trwa około 20 minut i sygnalizuje go POMARAŃCZOWA kontrolka na pasku stanu urządzenia. Kiedy urządzenie będzie gotowe do rozpoczęcia analizy, kolor paska stanu zmieni się na ZIELONY.

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



1. Umożliwić ogrzanie probówek z roztworem lizującym Neogen (LS), pozostawiając stojak w temperaturze otoczenia (20–25°C) na noc (16–18 godzin). Alternatywą dla równoważenia temperatury probówek z roztworem lizującym Neogen do temperatury otoczenia jest pozostawienie probówek z roztworem lizującym Neogen na stole laboratoryjnym na co najmniej 2 godziny, inkubacja probówek z roztworem lizującym Neogen w cieplarce nastawionej na 37 ± 1°C przez 1 godzinę lub umieszczenie ich w suchym podwójnym bloku grzewczym na 30 sekund w temp. 100°C ± 1°C.
2. Odwrócić probówki zamknięte korkiem w celu wymieszania ich zawartości. Przejść do następnego kroku w ciągu 4 godzin od odwrócenia.
3. Wyjąć bulion wzbogacający z cieplarki.
4. Dla każdej próbki oraz próbki KU (sterylnego podłoża wzbogacającego) wymagana jest jedna probówka z roztworem lizującym Neogen.

4.1 Taśmy z probówkami z roztworem lizującym Neogen można dociąć do żądanej liczby probówek. Zależnie od sytuacji należy dobrać liczbę pojedynczych probówek z roztworem lizującym Neogen lub taśm złożonych z 8 probówek. Umieścić probówki z roztworem lizującym Neogen w pustym stojaku.

4.2 Aby uniknąć zanieczyszczeń krzyżowych, należy otwierać taśmy z probówkami z roztworem lizującym Neogen pojedynczo i na każdym etapie przenoszenia stosować nową końcówkę pipety.

4.3 Wzbogaconą próbkę należy przenieść do probówek z roztworem lizującym Neogen w opisany poniżej sposób:

Najpierw przenieść każdą wzbogaconą próbkę do pojedynczej probówki z roztworem lizującym Neogen. Na **końcu** przenieść KU.

4.4 Do zdejmowania korków taśmy z probówkami z roztworem lizującym Neogen (po jednej taśmie na raz) należy wykorzystać Narzędzie Neogen® do zakładania/zdejmowania korków probówek do diagnostyki molekularnej – Liza.

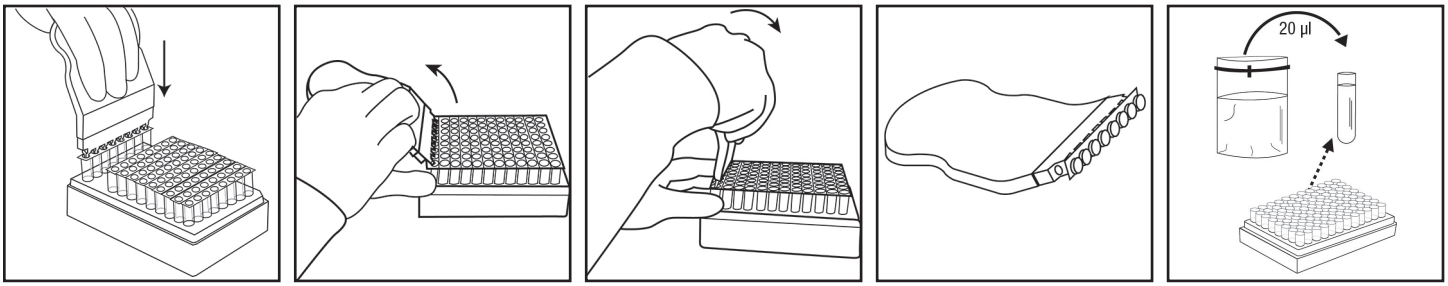
4.5 Zdjąć korek probówki z roztworem lizującym Neogen – jeśli lizat będzie zachowany do celów ponownego wykonania testu, umieścić korki w czystym pojemniku do ponownego założenia po wykonaniu lizy.

4.5.1. Odnośnie obróbki zachowanego lizatu patrz Załącznik A.

4.6 Wstrząsnąć worek z podłożem wzbogacającym przed pobraniem próbki od strony filtra podczas pracy z próbkami lepkimi.

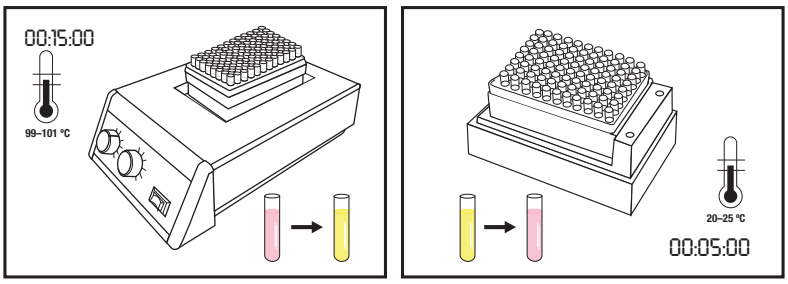
4.7 Przenieść 20 µl próbki do probówki z roztworem lizującym Neogen, o ile nie podano inaczej w protokole zamieszczonym w tabeli.

5. Powtarzać kroki 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 KU (jałowe podłoże wzbogacające, np. BPW) do probówki z roztworem lizującym Neogen. Nie stosować wody jako KU.
7. Upewnić się, że temperatura Wkładki Neogen bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej wynosi 100 ± 1°C.
8. Umieścić odkryty stojak na probówki z roztworem lizującym Neogen we Wkładce Neogen bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej i ogrzewać przez 15 ± 1 min. Podczas ogrzewania roztwór lizujący Neogen zmieni barwę z różowej (chłodny) na żółtą (gorący).

   Próbki, które nie przeszły odpowiedniej obróbki cieplnej na etapie lizy, można uznać za potencjalne zagrożenie biologiczne i NIE należy ich umieszczać w Urządzeniu Neogen do diagnostyki molekularnej.
9. Wyjąć odkryty stojak z probówkami z roztworem lizującym Neogen z bloku grzewczego Neogen do diagnostyki molekularnej 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 bez Tacy Neogen® bloku chłodzenia do diagnostyki molekularnej, powinna znajdować się bezpośrednio na stole laboratoryjnym. Po schłodzeniu roztwór lizujący Neogen 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 KU wymagana jest jedna probówka reagenta Neogen Molekularnego testu do wykrywania 2 – *Cronobacter*.

   1.1 Taśmy z probówkami można dociąć do pożądanej liczby probówek. Dobrać wymaganą liczbę pojedynczych probówek z reagentem Neogen Molekularnego testu do wykrywania 2 – *Cronobacter* lub taśm złożonych z 8 probówek.

   1.2 Umieścić probówki z reagentem Neogen Molekularnego testu do wykrywania 2 – *Cronobacter* w pustym stojaku.

   1.3 Nie wolno dopuścić do wstrząśnięcia granulek reagenta na dnie probówek.

2. Wybrać jedną probówkę Kontroli Neogen reagenta i umieścić ją w stojaku.

3. Aby uniknąć zanieczyszczeń krzyżowych, należy otwierać taśmy z probówkami z reagentem Neogen Molekularnego testu do wykrywania 2 – *Cronobacter* pojedynczo i na każdym etapie przenoszenia stosować nową końcówkę pipety.

4. Przenieść poszczególne lizaty do probówki z reagentem Neogen Molekularnego testu do wykrywania 2 – *Cronobacter* oraz do probówki z Kontrolą Neogen reagenta w sposób opisany poniżej:

   Przenieść **najpierw** każdą próbkę lizatu do oddzielnej probówki z reagentem Neogen Molekularnego testu do wykrywania 2 – *Cronobacter*, a następnie przenieść KU. **Na końcu** nawodnić probówkę z Kontrolą Neogen reagenta.

5. Do zdejmowania korków probówek z reagentem Neogen Molekularnego testu do wykrywania 2 – *Cronobacter* 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) probówki z roztworem lizującym Neogen do odpowiedniej probówki z reagentem Neogen Molekularnego testu do wykrywania 2 – *Cronobacter*. 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 z reagentem Neogen Molekularnego testu do wykrywania 2 – *Cronobacter* znajdujących się w taśmie.

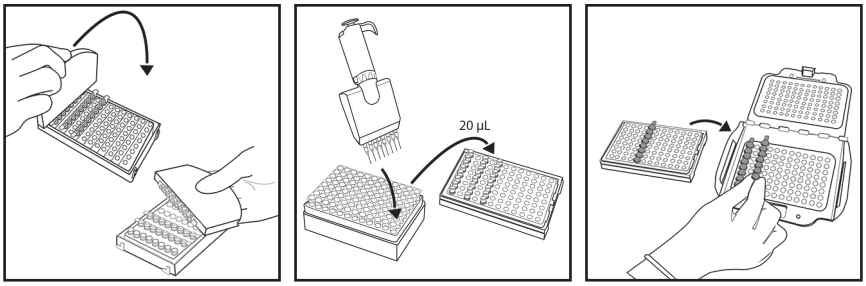
   5.3 Probówki z reagentem Neogen Molekularnego testu do wykrywania 2 – *Cronobacter* należy zamknąć załączonymi dodatkowymi korkami i za pomocą zaokrąglonej strony Narzędzia Neogen do zakładania/zdejmowania korków probówek do diagnostyki molekularnej – Reagent wywołać nacisk ruchem w przód i w tył, aby upewnić się, że korek został szczelnie nałożony.

   5.4 Kroki 5.1 do 5.3 należy powtarzać zależnie od potrzeby dla wszystkich próbek poddawanych badaniu.

   5.5 Po przeniesieniu wszystkich próbek lizatu powtórzyć kroki 5.1 do 5.3, aby przenieść 20 µl lizatu KU do probówki z reagentem Neogen Molekularnego testu do wykrywania 2 – *Cronobacter*.

   5.6 Przenieść **20 µl lizatu KU do probówki z Kontrolą 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 reagenta zawierających DNA po amplifikacji. Dotyczy to reagenta Neogen Molekularnego testu do wykrywania 2 – *Cronobacter*, Kontroli Neogen reagenta oraz probówek kontroli Neogen macierzy. Zanieczyszczone uszczelnione próbówki reagenta 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.

UWAGA: Nawet próbka ujemna nie da odczytu zerowego, jako że system i odczynniki do amplifikacji Neogen Molekularnego testu do wykrywania 2 – *Cronobacter* charakteryzują się swoistym poziomem tła w RLU.

Potwierdzenie

- Potwierdzenie wyników zgodnie z certyfikowaną metodą NF VALIDATION

W kontekście walidacji NF VALIDATION, wszystkie domniemane dodatnie wzbogacenia próbek należy potwierdzić stosując referencyjną metodę potwierdzania[(2)], począwszy od transferu z głównego podłoża wzbogacającego (BPW ISO lub BPW ISO uzupełnione 10 mg/l wankomycyny).

- Inny protokół potwierdzania

Domniemane dodatnie wzbogacenia próbek należy potwierdzić zgodnie ze standardowymi procedurami operacyjnymi laboratorium lub stosując odpowiednią referencyjną metodę potwierdzającą[(1, 2)], począwszy od transferu z głównego podłoża wzbogacającego (BPW ISO lub BPW ISO uzupełnione 10 mg/l wankomycyny) do drugorzędowego podłoża wzbogacającego, a następnie wyizolowanie i potwierdzenie izolatów za pomocą stosownych metod biochemicznych, serologicznych i/lub molekularnych.

W rzadkich przypadkach, przy wystąpieniu nietypowego światła wychodzącego, algorytm opisze je jako „Sprawdzić” (Inspect). Firma Neogen zaleca powtórzenie testów dla wszystkich próbek oznaczonych jako „Sprawdzić” (Inspect). Jeżeli utrzymuje się wynik „Sprawdzić” (Inspect), należy przejść do testu potwierdzającego z zastosowaniem preferowanej metody lub zgodnie z lokalnymi przepisami[(1,2)].

W przypadku niezgodności wyników (domniemany wynik dodatni w badaniu Neogen Molekularnym testem do wykrywania 2 – *Cronobacter*, brak potwierdzenia jedną z powyższych metod) laboratorium musi wykonać czynności niezbędne do zapewnienia ważności uzyskanych wyników.

W przypadku pytań dotyczących konkretnych zastosowań lub procedur należy odwiedzić stronę www.neogen.com lub skontaktować się z lokalnym przedstawicielem lub dystrybutorem firmy Neogen.

Załącznik A. Przerwanie protokołu: przechowywanie i ponowne badanie lizatów poddanych obróbce cieplnej

1. W celu przechowywania lizatu poddanego obróbce termicznej należy ponownie zamknąć probówkę lizatu czystym korkiem (patrz część **Liza**, punkt 4.5).
2. Przechowywać w temp. 2 do 8°C maksymalnie przez 72 godziny.
3. Przygotować przechowywaną próbkę do amplifikacji przez odwrócenie 2–3 razy w celu zmieszania.
4. Otworzyć probówki.
5. Umieścić mieszane probówki lizatu we Wkładce Neogen bloku grzewczego do diagnostyki molekularnej i ogrzewać w temp. 100 ± 1°C przez 5 ± 1 min.
6. Wyjąć stojak z probówkami z roztworem lizującym Neogen z bloku grzewczego i umożliwić schłodzenie we wkładce Neogen bloku chłodzenia do diagnostyki molekularnej przez co najmniej 5 minut, a maksymalnie 10 minut.
7. Kontynuować protokół od etapu **Amplifikacji** wyszczególnionego powyżej.

Bibliografia:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
8. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

Należy odnieść się do aktualnych wersji wymienionych powyżej metod standardowych.

Objaśnienie symboli

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

Дата выпуска: 2024-01

Инструкции к препарату

Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*

Описание и предназначение продукта

Комплект «Neogen® Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*» используется вместе с системой молекулярной диагностики Neogen® для быстрого и точного обнаружения штаммов *Cronobacter* в обогащенных пробах пищевых продуктов и сред производства пищевых продуктов.

В комплекте «Neogen Тест-набор для молекулярного анализа» используется петлевая изотермическая амплификация для быстрого расширения нуклеотидных последовательностей с высокой точностью и чувствительностью в сочетании с биолюминесценцией для выявления амплификации. Предположительно положительные результаты отображаются в реальном времени, а отрицательные результаты — по завершении анализа. Результаты, которые можно считать положительными, следует подтверждать предпочтительным для вас методом или в соответствии с местными нормативными требованиями[1, 2].

Комплект «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*» предназначен для применения в лабораторных условиях и должен использоваться специалистами, прошедшими обучение лабораторным методам работы. Компания Neogen документально не подтверждала возможность использования этого продукта в других отраслях промышленности, кроме отрасли производства продуктов питания и напитков. Например, компания Neogen не подтверждала документально возможность использования этого продукта для тестирования фармацевтических, косметических, клинических или ветеринарных проб. Действие комплекта «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*» не оценивалось в отношении всех возможных пищевых продуктов, технологий производства пищевых продуктов, протоколов тестирования и штаммов бактерий.

Как и в случае применения любого метода тестирования, на результаты исследования может повлиять источник, состав и качество обогатительной среды. На результаты исследования могут также повлиять такие факторы, как метод отбора проб, протоколы тестирования, подготовка проб, включая гомогенизацию и смешивание, способы обработки, а также методика лабораторной работы. Чтобы гарантировать соответствие выбранного метода критериям пользователя, компания Neogen рекомендует оценить метод, включая обогатительную среду, непосредственно в лаборатории пользователя с применением достаточного количества проб, конкретных пищевых продуктов и (или) проб окружающей среды, а также микробных провокационных проб.

Компания Neogen оценивала действие комплекта «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*», используя в качестве обогатительной среды забуференную пептонную воду ISO.

Прибор для молекулярной диагностики Neogen® предназначен для использования вместе с пробами, прошедшими тепловую обработку на этапе лизиса, который проводится с целью уничтожения присутствующих в пробе организмов. Пробы, которые не прошли надлежащую тепловую обработку на этапе лизиса, могут представлять биологическую опасность. ЗАПРЕЩАЕТСЯ вставлять их в прибор для молекулярной диагностики Neogen.

Процессы разработки и производства компании Neogen Food Safety прошли проверку и получили сертификат ISO 9001 (Международная организация по стандартизации).

В комплекте «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*» предусмотрено 96 тестов, описание которых содержится в таблице 1.

Таблица 1. Компоненты комплекта «Neogen Тест-набор для молекулярного анализа»

Элемент	Обозначение	Количество	Содержимое	Комментарии
Neogen® Раствор для лизиса (LS)	Розовый раствор в прозрачных пробирках	96 (12 пластинок по 8 пробирок на каждой)	580 мкл раствора для лизиса в каждой пробирке	В штативе и готовы к использованию
Neogen® Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter* (Пробирки с реагентом)	Оранжево-красные пробирки	96 (12 пластинок по 8 пробирок на каждой)	Лиофилизированная смесь для амплификации и обнаружения штаммов	Готовы к использованию
Запасные колпачки	Оранжево-красные колпачки	96 (12 пластинок по 8 колпачков на каждой)		Готовы к использованию
Neogen® Контроль реагентов (RC)	Прозрачные пробирки с контрольно-герметизирующими крышками	16 (2 пакета по 8 отдельных пробирок в каждом)	Лиофилизированная контрольная ДНК, смесь для амплификации и обнаружения штаммов	Готовы к использованию

Отрицательный контроль, не входящий в комплект, представляет собой стерильную обогатительную среду, например забуференную пептонную воду ISO. Не используйте воду в качестве среды для отрицательного контроля.

Техника безопасности

Прочтите, примите к сведению и соблюдайте все правила техники безопасности, содержащиеся в инструкциях по эксплуатации системы молекулярной диагностики Neogen и комплекта «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*». Сохраните инструкции по технике безопасности для использования в дальнейшем.

⚠ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ. Указывает на опасную ситуацию, которая, если ее не избежать, может привести к смерти или тяжелой травме и (или) к повреждению имущества.

УВЕДОМЛЕНИЕ. Указывает на потенциально опасную ситуацию, которая, если ее не избежать, может привести к повреждению имущества.

⚠ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Не используйте комплект «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*» при диагностировании заболеваний людей или животных.

Пользователь несет ответственность за обучение персонала соответствующим методикам проведения тестирования, например описанным в своде правил «Надлежащая лабораторная практика»[3], стандарте ISO/IEC 17025[4] или ISO 7218[5].

Для снижения рисков, связанных с выпуском зараженного продукта вследствие ложноотрицательного результата, соблюдайте приведенные далее правила.

- Соблюдайте протокол и выполняйте тестирование в строгом соответствии с инструкциями к препарату.
- Храните комплект «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*» согласно указаниям на упаковке и инструкциям к продукту.
- Всегда используйте комплект «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*» до истечения срока годности.

- Комплект «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*» следует использовать для исследования проб пищевых продуктов и сред производства пищевых продуктов, прошедших внутреннюю или стороннюю валидацию.
- Используйте комплект «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*» только на тех поверхностях, с теми дезинфицирующими средствами, в соответствии с теми протоколами и для тех штаммов бактерий, которые прошли внутреннюю или стороннюю проверку.
- Пробу среды, содержащую нейтрализующий буферный раствор с арилсульфонатным комплексом, следует перед проверкой разбавить в пропорции 1:2 (1 часть пробы в 1 части стерильного обогатительного бульона). Альтернативный вариант — перелить 10 мкл обогатительной среды нейтрализующего буферного раствора в пробирки с раствором для лизиса Neogen. Средства подготовки проб к анализу Neogen®, которые содержат нейтрализующий буферный раствор с арилсульфонатным комплексом: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G и HS2410NB2G. Этот протокол не тестировался во время исследования NF Validation.

Для снижения рисков, связанных с воздействием химических и биологически опасных веществ, соблюдайте приведенные далее правила.

- Выполняйте тестирование на патогены в оборудованной надлежащим образом лаборатории под контролем обученного персонала. Инкубированные обогатительные среды, а также оборудование или поверхности, которые контактировали с инкубированными обогатительными средами, могут содержать патогены в количестве, достаточном для угрозы здоровью человека.
- Обязательно соблюдайте стандартные лабораторные меры обеспечения безопасности, в том числе используйте защитную одежду и средства защиты глаз при работе с реагентами и загрязненными пробами.
- Избегайте контакта с обогатительной средой и пробирками с реагентом после амплификации.
- Утилизируйте обогащенные пробы и связанные загрязненные отходы в соответствии с действующими местными, региональными, национальными и промышленными стандартами.
- Не превышайте рекомендованную температуру в нагревателе.
- Не превышайте рекомендованную продолжительность нагрева.
- Для проверки температуры внутреннего нагревательного блока для молекулярной диагностики Neogen® следует использовать соответствующим образом откалиброванный термометр (например, термометр частичного погружения или термопарный цифровой термометр, но не термометр полного погружения). Термометр следует вставить в специально отведенное место на внутреннем нагревательном блоке для молекулярной диагностики Neogen.

Для снижения рисков, связанных с перекрестным загрязнением при подготовке проб для диагностики, соблюдайте приведенные далее правила.

- Обязательно надевайте перчатки (для защиты пользователя и во избежание введения нуклеаз).

Для снижения рисков, связанных с воздействием горячих жидкостей, соблюдайте приведенные далее правила.

- Не превышайте рекомендованную температуру в нагревателе.
- Не превышайте рекомендованную продолжительность нагрева.
- Для проверки температуры внутреннего нагревательного блока для молекулярной диагностики Neogen® следует использовать соответствующим образом откалиброванный термометр (например, термометр частичного погружения или термопарный цифровой термометр, но не термометр полного погружения). Термометр следует вставить в специально отведенное место на внутреннем нагревательном блоке для молекулярной диагностики Neogen.

УВЕДОМЛЕНИЕ

Для снижения рисков, связанных с перекрестным загрязнением при подготовке проб для диагностики, соблюдайте приведенные далее правила.

- Перед смачиванием осадка реагента меняйте перчатки.
- Рекомендуется использовать стерильные аэрозоль-устойчивые (фильтрующие) наконечники для пипеток, применяемые в молекулярной биологии.
- Для переливания каждой пробы используйте пипетку с новым наконечником.
- При переливании пробы из обогатительной среды в пробирку с раствором для лизиса придерживайтесь свода правил «Надлежащие лабораторные практики» (Good Laboratory Practices). Во избежание загрязнения микродозатора можно добавить дополнительный этап переливания. Например, пользователь может переливать каждую обогащенную пробу в стерильную пробирку.

- По возможности следует использовать установки для работ в области молекулярной биологии, оборудованные бактерицидными лампами.
- Периодически проводите дезинфекцию лабораторных столов и оборудования (пипеток, инструментов для запечатывания и распечатывания пробирок и т. д.) с помощью раствора бытового отбеливателя (1–5 % в объемном отношении с водой) или раствора для удаления ДНК.

Для снижения рисков, связанных с получением ложноположительных результатов, соблюдайте приведенные далее правила.

- Ни в коем случае не открывайте пробирки после амплификации.
- Всегда утилизируйте загрязненные пробирки путем погружения в раствор бытового отбеливателя (1–5 % в объемном соотношении с водой) на 1 час вдали от зоны подготовки проб для диагностики.
- Ни в коем случае не подвергайте пробирки с реагентом автоклавной обработке после амплификации.
- При подозрении на содержание высоких уровней ДНК штамма *Cronobacter* в пробах (например, ДНК из нежизнеспособных клеток *Cronobacter*, подвергающихся уничтожению или нейтрализации) перед началом этапа **лизиса** к предположительно положительным обогатительным средам следует применить ДНКазу. Обратитесь к представителю компании Neogen за дополнительными инструкциями. Этот протокол не тестировался во время исследования NF Validation.

Дополнительную информацию и местные нормативные требования в отношении утилизации отходов см. в паспортах безопасности.

Если у вас возникли вопросы по конкретным способам применения или процедурам, посетите наш веб-сайт по адресу www.neogen.com или обратитесь к местному представителю или дистрибьютору компании Neogen.

Ответственность пользователей

Пользователи несут полную ответственность за ознакомление с инструкциями и информацией об использовании препарата. Для получения более подробной информации посетите наш веб-сайт по адресу **www.neogen.com** либо свяжитесь с вашим местным представителем или дистрибьютором Neogen.

При выборе метода исследования важно понимать, что на результаты исследования могут влиять внешние факторы, например метод забора проб, протокол исследования, подготовка проб к исследованию, включая гомогенизацию и смешивание, способы обработки проб во время исследования, а также используемое оборудование.

За выбор метода исследования и исследуемого продукта отвечает пользователь. Пользователь должен на основании исследования достаточного количества образцов с помощью надлежащих матриц и микробных провокационных проб определить, отвечает ли выбранный метод исследования необходимым ему критериям.

Кроме того, пользователь обязан установить, отвечают ли методы и результаты проводимых им анализов требованиям его клиентов и поставщиков.

Результаты, полученные с помощью продукта Neogen Food Safety (как и при использовании любого другого метода исследований), не гарантируют качество матриц или технологических процессов, подвергавшихся исследованиям.

Чтобы помочь клиентам оценить метод применительно к различным матрицам, компания Neogen разработала комплект «Контроль матрицы для молекулярной диагностики Neogen®». При необходимости используйте контроль матрицы (MC), чтобы определить, может ли матрица повлиять на результаты тестов из комплекта «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*». При принятии метода Neogen или тестировании новых или неизвестных матриц либо матриц, материалы или методы обработки которых подверглись изменениям, протестируйте несколько выборочных проб матрицы, т. е. проб различного происхождения (в течение любого периода проверки).

Матрицу можно определить как тип продукта с характерными свойствами, такими как состав и метод обработки. Различия между матрицами могут быть вызваны просто различиями в их обработке или состоянии. Например, сырые или пастеризованные, свежие или высушенные и т. д.

Ограничение гарантий и средств судебной защиты

ЕСЛИ ИНОЕ ЯВНО НЕ УКАЗАНО В РАЗДЕЛЕ ОБ ОГРАНИЧЕННОЙ ГАРАНТИИ НА ИНДИВИДУАЛЬНОЙ УПАКОВКЕ ПРОДУКТА, NEOGEN НЕ ПРИЗНАЕТ ПРЯМЫЕ ИЛИ КОСВЕННЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА, ВКЛЮЧАЯ, ПОМИМО ПРОЧЕГО, ГАРАНТИЮ ТОВАРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ИЛИ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СООТВЕТСТВИИ С УКАЗАННОЙ ОБЛАСТЬЮ ПРИМЕНЕНИЯ. Если качество продукта отдела безопасности пищевой продукции компании

Neogen не является надлежащим, компания Neogen или уполномоченный этой компанией дистрибьютор обязуется по своему усмотрению заменить этот продукт или возместить стоимость покупки этого продукта. Это единственный способ разрешения спора. По любым дополнительным вопросам обращайтесь к представителю или официальному дилеру Neogen.

Ограничение ответственности компании Neogen

NEOGEN НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА УЩЕРБ ИЛИ ПОВРЕЖДЕНИЯ, ЯВЛЯЮЩИЕСЯ ПРЯМЫМИ, НЕПРЯМЫМИ, УМЫШЛЕННЫМИ, СЛУЧАЙНЫМИ ИЛИ КОСВЕННЫМИ, ВКЛЮЧАЯ, ПОМИМО ПРОЧЕГО, УТРАЧЕННУЮ ПРИБЫЛЬ. Ответственность компании Neogen ни при каких обстоятельствах и несмотря ни на какие требования не может превышать стоимость продукта.

Хранение и утилизация

Комплект «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*» следует хранить при температуре 2–8 °C. Не замораживайте продукт. Храните комплект вдали от источников света. После открытия комплекта убедитесь в том, что пакет из фольги не поврежден. Если пакет поврежден, не используйте продукт. Открытые неиспользуемые пробирки с реагентом следует хранить в повторно герметизируемом пакете с влагопоглотителем. Это обеспечивает стабильность лиофилизированных реагентов. Повторно герметизированные пакеты можно хранить при температуре 2–8 °C не более 60 дней.

Не используйте комплект «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*» по истечении срока годности. Дата истечения срока годности и номер партии указаны на этикетке на наружной поверхности коробки. После применения обогатительная среда и пробирки для проведения тестов из комплекта «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*» могут содержать болезнетворные микроорганизмы. По окончании тестирования утилизируйте загрязненные отходы согласно действующим промышленным стандартам. Дополнительную информацию и местные нормативные требования в отношении утилизации отходов см. в паспортах безопасности.

Инструкции по применению

Строго соблюдайте все инструкции. В противном случае результаты могут быть неточными.

Периодически проводите дезинфекцию лабораторных столов и оборудования (пипеток, инструментов для запечатывания и распечатывания пробирок и т. д.) с помощью раствора бытового отбеливателя (1–5 % в объемном отношении с водой) или раствора для удаления ДНК.

Пользователь должен пройти обучение по вопросам аттестации функционирующего оборудования применительно к системе молекулярной диагностики Neogen, как описано в документе «Аттестация установленного оборудования (IQ) и аттестация функционирующего оборудования (OQ): протоколы и инструкции для системы молекулярной диагностики Neogen»[6].

Особые требования см. в разделе «Особые инструкции к утвержденным методам».

Таблица 3: протоколы обогащения согласно AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2018.01 и AOAC® *Performance Tested℠*, сертификат № 101703.

Таблица 4: протоколы обогащения согласно сертификату NF VALIDATION Neogen 01.20–03.18.

Обогащение пробы

В таблицах 2, 3 и 4 приведены инструкции по обогащению проб пищевых продуктов и окружающей среды.

За проверку альтернативных протоколов отбора проб или обогащения или степеней разбавления для обеспечения соответствия этого метода тестирования критериям пользователя несет ответственность сам пользователь.

Пищевые продукты, пробы окружающей среды, пыль, смет и губки

1. Подождите, пока температура обогатительной среды не достигнет температуры окружающей среды (20–25 °C), если в протоколе обогащения не указано иное (см. таблицы 2, 3 и 4).
2. Соедините среду обогащения и пробу в стерильных условиях и тщательно перемешайте до однородности в смесителе, гомогенизаторе, вихревой мешалке или вручную в течение 2 ± 0,2 минуты **или до полного растворения сгустков и однородности суспензии[7, 8].**
   A. На результаты исследования могут повлиять такие факторы, как подготовка проб, включая гомогенизацию и смешивание, способы обработки, а также методика лабораторной работы.

Б. В случае тестирования проб высокодисперсных материалов рекомендуется использовать мешочные фильтры.

В. Для матриц, которые набухают в воде и являются высоковязкими (например, хлебные злаки или крахмалы), рекомендуется выполнять разбавления (> 1:10) до подходящего уменьшения вязкости или добавить стерильный 1%-ный раствор альфа-амилазы к BPW (ISO)[8].

Г. В случае тестирования проб хлебных злаков, медленно добавляйте порошковые хлебные злаки в жидкость, часто помешивая, чтобы избежать образования комков.

3. Инкубируйте, как описано в таблице соответствующего протокола (см. таблицы 2, 3 и 4).

Таблица 2. Общие протоколы обогащения проб

Матрица пробы	Размер пробы[1]	Объем обогатительного бульона[1, 2]	Температура обогащения (±1 °C)	Время обогащения (ч)	Объем анализа проб
Порошковая детская смесь и сырьевые материалы, такие как сухое молоко, соевый порошок, сухая сыворотка, лактоза, рисовая мука и мальтодекстрин	Проба 1X г	9X мл BPW (ISO) (1:10)	37	18—24	20 мкл
Сырьевые материалы, такие как соли, минералы, аминокислоты, ДГК (докозагексановая кислота) и витамины	Проба 1X г	99X мл BPW (ISO) (1:100)	37	18—24	20 мкл
Сухие пробы окружающей среды, такие как пыль, смет, мусор, собранный пылесосной системой	Проба 1X г	9X мл BPW (ISO) (1:10)	37	18—24	20 мкл
Губки для отбора проб, содержащие 10 мл летинового бульона или нейтрализующего бульона Ди-Ингли	1 устройство для отбора проб	90 мл BPW (ISO) (1:10)	37	18—24	20 мкл

1. Компания Neogen оценивала комплект «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*» с применением степеней разбавления, указанных в таблице 2 до 300 г. За проверку альтернативных степеней разбавления или протоколов для обеспечения соответствия этого метода критериям пользователя несет ответственность сам пользователь.
2. Если объем обогатительного бульона больше 300 мл, используйте **предварительно подогретую** забуференную пептонную воду ISO (например, вес пробы превышает 30 грамм).

Особые инструкции к утвержденным методам

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

AOAC® *Performance Tested℠* (PTM), сертификат № 101703

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

В программах AOAC Research Institute OMA℠ и PTM℠ комплект «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*» оказался эффективным для обнаружения *Cronobacter.* Тестируемые во время исследования матрицы показаны в таблице 3.

Таблица 3. Протоколы обогащения согласно AOAC® *OMA*[SM] 2018.01 AOAC *PTM*[SM] № 101703

Матрица пробы	Размер пробы	Объем обогатительного бульона[1]	Температура обогащения (±1 °C)	Время обогащения (ч)	Объем анализа проб
Порошковая детская смесь и порошковые детские каши	10 г	90 мл BPW (ISO) (1:10)	37	18—24	20 мкл
Порошковые детские каши без пробиотиков	300 г	2700 мл BPW (ISO) (1:10)	Предварительно подогретые 37	18—24	20 мкл
Порошковая детская смесь и порошковые детские каши с пробиотиками	300 г	2700 мл BPW (ISO) + 10 мг/л ванкомицина	Предварительно подогретые 37	22—24	20 мкл
Лактоза	10 г	90 мл BPW (ISO) (1:10)	37	18—24	20 мкл
Губки для отбора проб из окружающей среды, содержащие 10 мл нейтрализующего бульона Ди-Ингли	1 устройство для отбора проб	90 мл BPW (ISO) (1:10)	37	18—24	20 мкл

1. Если объем обогатительного бульона больше 300 мл, используйте **предварительно подогретую** забуференную пептонную воду ISO.

NF VALIDATION от AFNOR Certification

3M 01.20-03.18

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

Более подробную информацию о сроке действия см. в сертификате NF VALIDATION, который доступен на указанном выше веб-сайте.

Метод с сертификатом NF VALIDATION, соответствующий стандарту ISO 16140-2[(9)], по сравнению со стандартом ISO 22964.

Объект проверки: порошковая детская смесь и порошковые детские каши с пробиотиками или без, сырьевые материалы и пробы окружающей среды.

Подготовка образца: пробы следует готовить в соответствии со стандартами EN ISO 22694[(2)] и EN ISO 6887[(7, 8)].

Версия программного обеспечения: см. сертификат

Таблица 4. Протоколы обогащения согласно методу с сертификатом NF VALIDATION 3M 01.20–03.18

Матрица пробы	Размер пробы	Объем обогатительного бульона[1]	Температура обогащения (±1 °C)	Время обогащения (часов)	Объем анализа проб	Рекомендованная точка прерывания[2, 3]
• Порошковая детская смесь. • Порошковые детские каши. • Такие ингредиенты, как сухое молоко, соевый порошок, сухая сыворотка, лактоза, рисовая мука и мальтодекстрин. • Сухие пробы окружающей среды, такие как пыль, смет, мусор, собранный пылесосной системой.	10 г	90 мл BPW (ISO) (1:10)	37	18—24	20 мкл	Обогатительный бульон или лизат пробы можно хранить при температуре 2–8 °C в течение не более 72 часов
• Губка, промывная вода, салфетки	1 устройство для отбора проб или 10 мл					Обогатительный бульон или лизат пробы можно хранить при температуре 2–8 °C в течение не более 72 часов
Порошковая детская смесь и порошковые детские каши (без пробиотиков)	30–300 г	BPW (ISO) (1:10)	37	18—24	20 мкл	Обогатительный бульон или лизат пробы можно хранить при температуре 2–8 °C в течение не более 72 часов
Порошковые детские каши и порошковая детская смесь (включая пробиотики)	30–300 г	BPW (ISO) + 10 мг/л ванкомицина (1:10)	37	22—24	20 мкл	Нет

1. Если объем обогатительного бульона больше 300 мл, используйте предварительно подогретую забуференную пептонную воду ISO (например, вес пробы превышает 30 грамм).
2. После извлечения обогатительного бульона из хранилища продолжите тестирование с этапа 1, указанного в разделе Лизис. После извлечения лизата пробы из хранилища продолжите тестирование с этапа 7, указанного в разделе Лизис.
3. Чтобы получить дополнительную информацию о хранении и повторном тестировании лизатов, подвергшихся термообработке, см. приложение A.

Подготовка лотка быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen®

1. Смочите кусок ткани или одноразовое полотенце в растворе бытового отбеливателя (1–5 % в объемном отношении с водой) и протрите им лоток быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen.

2. Сполосните водой лоток быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen.
3. Протрите лоток быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen досуха одноразовым полотенцем.
4. Перед использованием лотка быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen убедитесь в том, что он сухой.

Подготовка блока «Neogen® Молекулярная диагностика. Охладительный блок (вставной)»
Поместите блок «Neogen Молекулярная диагностика. Охладительный блок (вставной)» на лабораторный стол. При этом лоток «Neogen Молекулярная диагностика. Лоток для охладительного блока» не используется. Блок следует использовать при температуре окружающей среды в лаборатории (20–25°C).

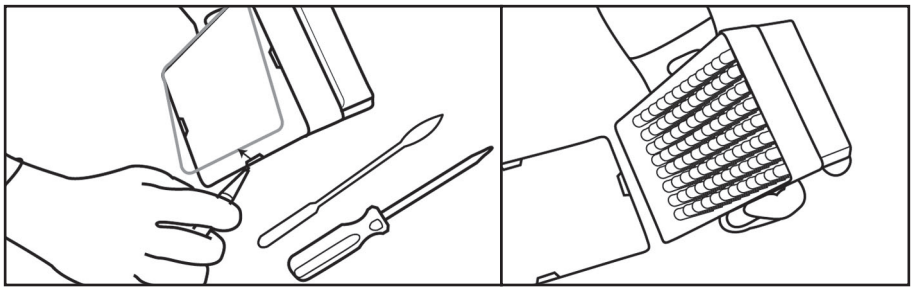
Подготовка внутреннего нагревательного блока для молекулярной диагностики Neogen®
Поместите внутренний нагревательный блок для молекулярной диагностики Neogen в сухое двухблочное нагревательное устройство. Включите сухое нагревательное устройство и установите температуру таким образом, чтобы температура внутреннего нагревательного блока для молекулярной диагностики Neogen достигла постоянного значения 100 ± 1 °C.

ПРИМЕЧАНИЕ. Внутренний нагревательный блок для молекулярной диагностики Neogen достигает нужной температуры примерно за 30 минут (в зависимости от типа нагревательного устройства). Используя подходящий откалиброванный термометр (например, термометр частичного погружения, термопарный цифровой термометр, но не термометр полного погружения), размещенный в указанном месте, убедитесь в том, что температура внутреннего нагревательного блока для молекулярной диагностики Neogen составляет 100 ± 1 °C.

Подготовка прибора для молекулярной диагностики Neogen®
1. Запустите программное обеспечение для молекулярной диагностики Neogen® и войдите в систему. Чтобы убедиться в наличии самой последней версии программного обеспечения, обратитесь к представителю Neogen Food Safety.
2. Включите прибор для молекулярной диагностики Neogen.
3. Создайте или отредактируйте цикл с данными относительно каждой пробы. Более подробные сведения см. в руководстве пользователя системы молекулярной диагностики Neogen.

ПРИМЕЧАНИЕ. Прежде чем вставлять лоток быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen с реакционными пробирками в прибор для молекулярной диагностики Neogen, убедитесь в том, что прибор достиг состояния готовности. Прибор нагревается приблизительно за 20 минут. На процесс нагрева указывает ОРАНЖЕВЫЙ световой индикатор на панели состояния прибора. Когда прибор будет готов к запуску цикла, цвет панели состояния изменится на ЗЕЛЕНЫЙ.

Лизис
Извлеките нижнюю часть штатива для пробирок с раствором для лизиса Neogen с помощью отвертки, прежде чем помещать его во внутренний нагревательный блок для молекулярной диагностики Neogen.



1. Пробирки с раствором для лизиса Neogen должны нагреться: для этого оставьте штатив в условиях температуры окружающей среды (20–25 °C) на ночь (16–18 часов). Альтернативный способ довести пробирки с раствором для лизиса Neogen до температуры окружающей среды: поместить пробирки с раствором для лизиса Neogen на лабораторный стол минимум на 2 часа, оставить их для инкубации в инкубаторе при температуре 37 ± 1 °C в течение 1 часа или поместить их на 30 секунд в сухое двухблочное нагревательное устройство при температуре 100 ±1 °C.
2. Переверните запечатанные пробирки для смешивания содержимого. Перейдите к следующему шагу через 4 часа после переворачивания.

3. Извлеките обогатительный бульон из инкубатора.
4. На каждую пробу, а также пробу для отрицательного контроля (NC) (в стерильной обогатительной среде) требуется одна пробирка с раствором для лизиса Neogen.

   4.1 Для получения необходимого количества пробирок пластинки с пробирками с раствором для лизиса Neogen можно разрезать. Выберите необходимое количество отдельных пробирок или пластинок по 8 пробирок с раствором для лизиса Neogen. Поместите пробирки с раствором для лизиса Neogen в пустой штатив.

   4.2. Во избежание перекрестного загрязнения распечатывайте пластинки с пробирками с раствором для лизиса Neogen по одной за раз и для каждого этапа переноса используйте новый наконечник для пипетки.

   4.3. Перенесите обогащенную пробу в пробирки для лизиса Neogen согласно приведенному ниже описанию.

   > **В первую очередь** перенесите каждую обогащенную пробу в отдельную пробирку с раствором для лизиса Neogen. Пробы для отрицательного контроля переливайте **в последнюю очередь**.

   4.4. Распечатайте пробирки с раствором для лизиса Neogen на одной пластинке с помощью инструмента «Neogen® Молекулярная диагностика. Инструмент для запечатывания/распечатывания пробирок (Лизис)». Пластинки с пробирками следует распечатывать по одной за раз.

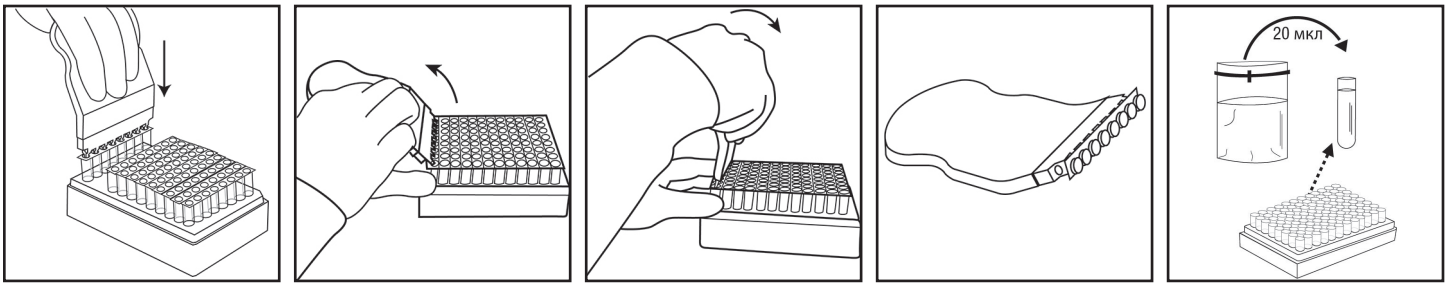
   4.5. Выбросьте колпачок от пробирки с раствором для лизиса Neogen. Если лизат необходимо сохранить для повторного тестирования, поместите колпачки в чистый контейнер для повторного использования после лизиса.

      4.5.1. Процедура обработки сохраненного лизата описана в приложении A.

   4.6 При работе с вязкими пробами взболтайте мешок для обогащения перед тем, как собрать пробу с фильтрованной стороны.

   4.7 Перенесите 20 мкл образца в пробирку с раствором для лизиса Neogen, если другое не указано в таблице протокола.

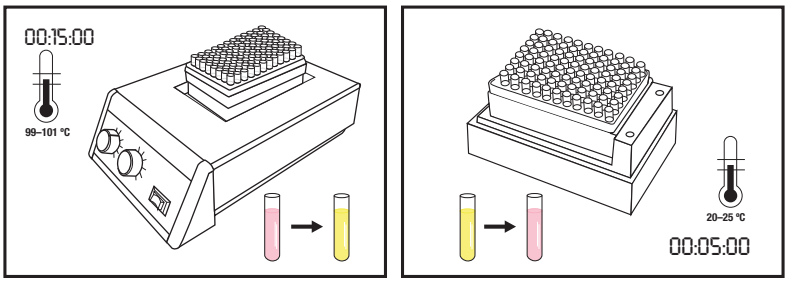
5. Повторяйте шаги 4.4–4.7 до тех пор, пока каждая отдельная проба не будет перелита в соответствующую пробирку с раствором для лизиса Neogen на пластинке.



6. После переноса всех проб перенесите в пробирку с раствором для лизиса Neogen 20 мкл среды для отрицательного контроля (стерильной обогатительной среды, например ЗПВ). Не используйте воду в качестве среды для отрицательного контроля.
7. Убедитесь в том, что температура внутреннего нагревательного блока для молекулярной диагностики Neogen составляет 100 ± 1 °C.
8. Поместите штатив с открытыми пробирками для лизиса Neogen во внутренний нагревательный блок для молекулярной диагностики Neogen и нагревайте в течение 15 ± 1 минуты. Во время нагрева цвет раствора для лизиса Neogen изменится с розового (в холодном состоянии) на желтый (в горячем состоянии).

   Пробы, которые не прошли надлежащую тепловую обработку на этапе лизиса, могут представлять биологическую опасность. ЗАПРЕЩАЕТСЯ вставлять их в прибор для молекулярной диагностики Neogen.
9. Извлеките штатив с открытыми пробирками с раствором для лизиса Neogen из нагревательного блока молекулярной диагностики Neogen и поместите его для охлаждения в блок «Neogen Молекулярная диагностика. Охладительный блок (вставной)» на период от 5 до 10 минут. Блок «Neogen Молекулярная диагностика. Охладительный блок (вставной)», используемый при температуре окружающей среды без лотка «Neogen Молекулярная диагностика. Лоток для охладительного блока», должен находиться непосредственно на лабораторном столе. После охлаждения цвет раствора для лизиса Neogen снова станет розовым.

10. Извлеките штатив с пробирками для лизиса Neogen из блока «Neogen Молекулярная диагностика. Охладительный блок (вставной)».



Амплификация

1. На каждую пробу, а также пробу для отрицательного контроля (NC) требуется одна пробирка с реагентом «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*».

   1.1 Для получения нужного количества пробирок пластинки с пробирками можно разрезать. Выберите необходимое количество отдельных пробирок или пластинок по 8 пробирок комплекта «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*».

   1.2 Поместите Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter* (Пробирки с реагентом) в пустой штатив.

   1.3 Не поднимайте осадок от реагента, который может образоваться на дне пробирок.

2. Выберите одну пробирку «Neogen Контроль реагентов» и поместите ее в штатив.

3. Во избежание перекрестного загрязнения распечатывайте одну пластинку с пробирками с реагентом из комплекта «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*» за раз и для каждого этапа переноса используйте новый наконечник для пипетки.

4. Перенесите каждый лизат в пробирку с реагентом комплекта «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*» и пробирку «Neogen Контроль реагентов» согласно приведенному ниже описанию.

Перенесите лизат каждой пробы в отдельные пробирки с реагентом комплекта «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter* » в **первую** очередь, а затем — пробы для отрицательного контроля (NC). Смочите пробирку «Neogen Контроль реагентов» **в последнюю очередь**.

5. Распечатайте пробирки с реагентом комплекта «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*» с помощью инструмента «Neogen® Молекулярная диагностика. Инструмент для запечатывания/распечатывания пробирок (Реагент)». Пластинки с пробирками следует распечатывать по одной за раз. Выбросьте колпачки.

   5.1 **Перенесите 20 мкл лизата пробы из верхней ½ части пробирки с раствором для лизиса Neogen (не допуская попадания осадка) в соответствующую пробирку с реагентом комплекта «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter* ». Переливать лизат в пробирку следует под наклоном, чтобы не поднять осадок. Перемешайте лизат в пробирке: для этого 5 раз осторожно наберите и выпустите жидкость из пипетки.**

   5.2 Повторяйте этап 5.1 до тех пор, пока лизат каждой пробы не будет перелит в соответствующую пробирку с реагентом «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter* » на пластинке.

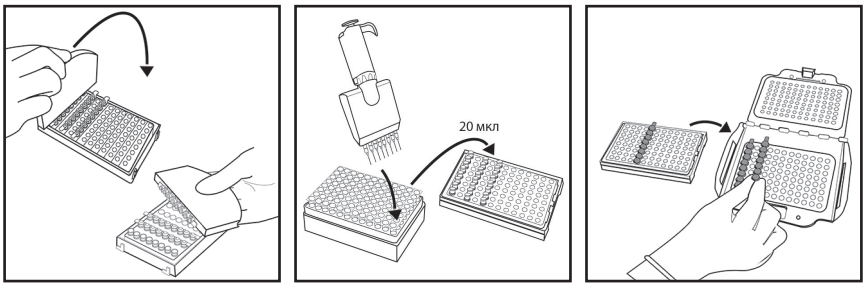
   5.3 Закройте пробирки с реагентом комплекта «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter* » запасными колпачками и надавите скругленной стороной инструмента «Neogen Молекулярная диагностика. Инструмент для запечатывания/распечатывания пробирок (Реагент)», совершая движения вперед-назад, чтобы обеспечить плотную посадку колпачков.

   5.4 Повторите этапы 5.1–5.3 столько раз, сколько проб необходимо протестировать.

   5.5 После переноса лизатов всех проб повторите действия 5.1–5.3, чтобы перенести 20 мкл лизата для отрицательного контроля (NC) в пробирку с реагентом комплекта «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*».

   5.6 Перенесите **20 мкл <u>лизата для отрицательного контроля (NC)</u> в пробирку «Neogen Контроль реагентов»**. Переливать лизат в пробирку следует под наклоном, чтобы не поднять осадок. Перемешайте лизат в пробирке: для этого 5 раз осторожно наберите и выпустите жидкость из пипетки.

6. Загрузите запечатанные пробирки в чистый продезинфицированный лоток быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen. Закройте и зафиксируйте крышку лотка быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen.



7. Проверьте параметры настройки цикла в программном обеспечении для молекулярной диагностики Neogen.
8. Нажмите кнопку запуска в программном обеспечении и выберите прибор, который необходимо использовать. Крышка выбранного прибора откроется автоматически.
9. Поместите лоток быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen в прибор для молекулярной диагностики Neogen и закройте крышку, чтобы запустить анализ. Результаты появятся в течение 60 минут. Положительные результаты могут появиться раньше.
10. По завершении анализа диагностики извлеките лоток быстрой загрузки для молекулярной диагностики Neogen из прибора для молекулярной диагностики Neogen и утилизируйте пробирки, поместив их в раствор бытового отбеливателя (1–5 % в объемном отношении с водой) на 1 час вдали от области подготовки проб для анализа.

УВЕДОМЛЕНИЕ. Для минимизации риска получения ложноположительных результатов вследствие перекрестного загрязнения ни в коем случае не открывайте пробирки с реагентом, содержащие амплифицированную ДНК. Это касается пробирки с реагентом комплекта «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*», пробирки «Neogen Контроль реагентов» и пробирок контроля матрицы Neogen. Запечатанные пробирки с реагентами следует выдерживать в растворе бытового отбеливателя (1–5 % в объемном отношении с водой) в течение 1 часа вдали от зоны проведения анализа.

Результаты диагностики и их интерпретация

Специальный алгоритм анализирует кривую светоотдачи, выводимую в результате обнаружения амплификации нуклеотидных последовательностей. Программное обеспечение автоматически анализирует полученные данные и снабжает их цветовыми кодами. Положительный или отрицательный результат определяется путем анализа ряда уникальных параметров кривой. Предположительно положительные результаты отображаются в реальном времени, а отрицательные результаты и данные, требующие изучения, — по окончании анализа.

ПРИМЕЧАНИЕ. Результаты анализа не могут быть нулевыми даже в случае исследования отрицательной пробы, поскольку система и амплификационные реагенты из комплекта «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*» способны считывать показания «фоновой» RLU (относительная световая единица).

Подтверждение

- Подтверждение результатов в соответствии с методом, получившим сертификат NF Validation

В рамках NF VALIDATION все предположительно положительные обогатительные среды должны быть подтверждены указанным далее эталонным методом[2]. Для этого сначала выполняется переливание из первичной обогатительной среды (BPW ISO или BPW ISO, дополненная 10 мг/л ванкомицина).

- Другой протокол подтверждения

Предположительно положительные обогатительные среды следует подтверждать в соответствии со стандартными лабораторными процедурами или подходящим эталонным методом[1,2]. Для этого сначала выполняется переливание из первичной обогатительной среды во вторичную обогатительную среду (BPW ISO или BPW ISO, дополненная 10 мг/л ванкомицина) с последующим культивированием и подтверждением изолятов с использованием соответствующих биохимических, серологических и (или) молекулярных методов.

В редких случаях получения необычных световых данных алгоритм заносит соответствующие результаты в категорию информации, требующей изучения. Компания Neogen рекомендует проводить повторный анализ проб, требующих изучения. Если результат анализа не меняется, проверьте его предпочтительным для вас методом или в соответствии с местными нормативными требованиями[1, 2].

В случае противоречивых результатов (предположительно положительные после проведения тестов из комплекта «Neogen Тест-набор 2 для молекулярного анализа - *Cronobacter*», не подтвержденные одним из описанных выше способов) сотрудники лаборатории должны придерживаться установленных стандартных процедур, чтобы сообщать результаты.

Если у вас возникли вопросы по конкретным способам применения или процедурам, посетите наш веб-сайт по адресу www.neogen.com или обратитесь к местному представителю или дистрибьютору компании Neogen.

Приложение A. Прерывание выполнения протокола: хранение и повторное тестирование лизатов, подвергшихся термообработке

1. Для хранения лизатов, подвергшихся термообработке, снова запечатайте пробирку с раствором для лизиса чистым колпачком (см. раздел 4.5 **Лизис**).
2. Отправьте пробу на хранение при температуре от 2 до 8 °C на период до 72 часов.
3. Подготовьте сохраненную пробу для амплификации, перевернув пробирку 2–3 раза для перемешивания.
4. Распечатайте пробирки.
5. Поместите пробирки со смешанным лизатом во внутренний нагревательный блок для молекулярной диагностики Neogen и подогрейте до температуры 100 ± 1 °C в течение 5 ± 1 минуты.
6. Извлеките штатив с пробирками с раствором для лизиса Neogen из нагревательного блока и поместите его для охлаждения в блок «Neogen Молекулярная диагностика. Охладительный блок (вставной)» на период от 5 до 10 минут.
7. Продолжите выполнение протокола в соответствии с разделом **Амплификация**, как описано выше.

Ссылки.

1. Руководство по бактериологическому анализу (BAM) Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США, гл. 29; МАРТ 2012 Г.
2. ISO 22964:2017 Микробиология пищевой цепи. Горизонтальный метод обнаружения штаммов *Cronobacter*.
3. Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США. Свод федеральных постановлений, статья 21, часть 58. Надлежащая лабораторная практика для доклинических лабораторных исследований.
4. ISO/IEC 17025:2017. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и руководство по микробиологическому анализу.
6. Аттестация установленного оборудования (IQ) и аттестация функционирующего оборудования (OQ) Neogen®: система молекулярной диагностики Neogen. Для получения копии этого документа обратитесь к представителю Neogen Food Safety.
7. ISO 6887-5:2010. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка образцов для анализа, исходная суспензия и десятикратное разбавление для микробиологического анализа. Часть 5. Особые правила подготовки образцов молока и молочных продуктов.
8. ISO 6887-4:2017. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка образцов для анализа, исходная суспензия и десятикратное разбавление для микробиологического анализа. Часть 4. Особые правила подготовки образцов разных продуктов.
9. ISO 16140-2:2016. Микробиология пищевой цепи. Проверка метода. Часть 2. Протокол проверки альтернативных (запатентованных) методов в сравнении со стандартными методами.

См. текущие версии приведенных выше стандартных методов.

Пояснение символов

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

NEOGEN

Ürün Talimatları

Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter*

Ürün Tanımı ve Kullanım Amacı

Neogen® Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* zenginleştirilmiş gıda ve çevresel gıda işleme numunelerinde *Cronobacter*'ın hızlı ve spesifik Tespiti için Neogen® Moleküler Tayin Sistemi ile birlikte kullanılır.

Neogen Moleküler Tespit Analizi'nde, nükleik asit dizgelerinin yüksek özgüllük ve duyarlılıkla hızla amplifiye edilmesi için döngü aracılı izotermal amplifikasyonun yanı sıra amplifikasyonun tespit edilmesi amacıyla biyoluminesans kullanılır. Negatif sonuçlar test tamamlandıktan sonra gösterilirken, olası pozitif sonuçlar gerçek zamanlı olarak bildirilir. Olası pozitif sonuçlar, tercih edilen yöntem kullanılarak veya yerel düzenlemelerde belirtildiği şekilde doğrulanmalıdır[1, 2].

Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* ürünü, laboratuvar ortamında, laboratuvar teknikleri konusunda eğitim almış profesyonellerin kullanımına yöneliktir. Neogen, bu ürünü yiyecek veya içecek endüstrileri dışında kullanım için tescil ettirmemiştir. Örneğin Neogen bu ürünü farmasötik ürünler, kozmetik malzemeler, klinik veya veterinerlik amaçlı numunelerin testlerinde kullanım için tescil ettirmemiştir. Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter*, olası tüm gıda ürünleri, işlenmiş gıdalar, test protokolleri veya mümkün olan tüm bakteri suşları ile değerlendirilmemiştir.

Tüm test yöntemlerinde olduğu gibi, zenginleştirme ortamının kaynağı, formülasyonu ve kalitesi sonuçları etkileyebilir. Numune alma yöntemleri, test protokolleri, homojenleştirme ve karıştırma dahil numune hazırlama işlemleri, taşıma ve laboratuvar tekniği gibi faktörler de sonuçları etkileyebilir. Neogen, yöntemin kullanıcının ölçütlerini karşıladığından emin olmak için belirli gıdalar ve/veya çevresel numuneler ve mikrop uyarımlar ile birlikte yeterli sayıda numune kullanılarak kullanıcının ortamında zenginleştirme ortamı dahil olmak üzere yöntemin değerlendirilmesini önerir.

Neogen, Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter*'ı Tamponlanmış Peptonlu Su (ISO) zenginleştirme ortamı ile değerlendirmiştir.

Neogen® Moleküler Tayin Cihazı, numune içinde var olan organizmaları yok etmek için tasarlanmış lizis test aşaması sırasında ısıl işlemden geçen numuneler ile kullanım için tasarlanmıştır. Lizis tet aşaması sırasında doğru şekilde ısıl işleme tabi tutulmayan numuneler, olası bir biyolojik tehlike olarak düşünülebilir ve Neogen Moleküler Tayin Cihazı'na YERLEŞTİRİLMEMELİDİR.

Neogen Food Safety, ISO (Uluslararası Standardizasyon Teşkilatı) 9001 tasarım ve üretim sertifikasına sahiptir.

Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* test kiti, Tablo 1'de açıklanmış olduğu gibi 96 test içerir.

Tablo 1. Neogen Moleküler Tespit Analizi Kit Bileşenleri

Malzeme	Tanım	Miktar	İçindekiler	Yorumlar
Neogen® Lizis Solüsyonu (LS)	Şeffaf tüplerde pembe solüsyon	96 (8 tüplük 12 şerit)	Tüp başına 580 µL LS	Raflı ve kullanıma hazır
Neogen® Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* Reaktif Tüpleri	Turuncu-kırmızı tüpler	96 (8 tüplük 12 şerit)	Liyofilize spesifik amplifikasyon ve tespit karışımı	Kullanıma hazır
İlave kapaklar	Turuncu-kırmızı kapaklar	96 (8 kapaklık 12 şerit)		Kullanıma hazır
Neogen® Reaktif Kontrolü (RC)	Şeffaf üstten kapatmalı tüpler	16 (8 ayrı tüp içeren 2 poşet)	Liyofilize kontrol DNA'sı, amplifikasyon ve tespit karışımı	Kullanıma hazır

Kitle birlikte sunulmayan Negatif Kontrol (NC), BPW ISO gibi steril bir zenginleştirme ortamıdır. NC olarak su kullanmayın.

Güvenlik

Kullanıcı, Neogen Moleküler Tayin Sistemi ve Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* ile ilgili talimatlarda yer alan tüm güvenlik bilgilerini okumalı, anlamalı ve bunlara uymalıdır. Güvenlik talimatlarını ileride başvurmak üzere saklayın.

⚠**UYARI:** Önlenmemesi halinde ölüm ya da ciddi yaralanma ve/veya mal zararı ile sonuçlanabilecek tehlikeli bir durumu gösterir.

BİLDİRİM: Kaçınılmaması halinde maddi zarar ile sonuçlanabilecek olası tehlikeli bir durumu gösterir.

⚠ UYARI

Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter*'ı insanların veya hayvanların sağlık durumlarını tanılamak amacıyla kullanmayın.

Kullanıcının güncel ve doğru test teknikleri konusunda personeline eğitim vermesi gerekir: örneğin İyi Laboratuvar Uygulamaları[3], ISO/IEC 17025[4] veya ISO 7218[5].

Kontamine ürünün açığa çıkmasına yol açan yanlış bir negatif sonuçla ilişkili riskleri azaltmak için:

- Tam olarak ürün talimatlarında belirtildiği şekilde protokolü uygulayın ve testleri gerçekleştirin.
- Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter*'ı ambalaj üzerinde ve ürün talimatlarında belirtildiği şekilde saklayın.
- Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter*'ı mutlaka son kullanma tarihinden önce kullanın.
- Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter*'ı, firmamız veya bir üçüncü tarafça onaylanmış gıda ve çevresel gıda işleme numuneleri ile kullanın.
- Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 *Cronobacter*'ı sadece kurum içinde veya üçüncü bir tarafça onaylanmış yüzeyler, sanitizerler, protokoller ve bakteri suşları ile kullanın.
- Aril sülfonat kompleksiyle birlikte Nötrleştirici Tampon içeren çevresel bir numune için test etmeden önce 1:2 oranında bir dilüsyon gerçekleştirin (1 miktar steril zenginleştirme sıvı besi yeri içine 1 miktar numune). Başka bir seçenek ise Neogen Lizis Solüsyonu tüplerinde 10 µL NB zenginleştirme yöntemidir. Aril sülfonat kompleksli Nötrleştirici Tampon içeren Neogen® Numune Tutma ürünleri: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G ve HS2410NB2G. Bu protokol, NF Validation çalışması sırasında test edilmemiştir.

Kimyasallara ve biyolojik tehlikelere maruz kalma ile ilişkili riskleri azaltmak için:

- Patojen testini doğru donanıma sahip bir laboratuvarda, eğitimli personelin kontrolü altında gerçekleştirin. İnkübe edilmiş zenginleştirme ortamı ve inkübe edilmiş zenginleştirme ortamıyla temas etmiş ekipman veya yüzeyler, insan sağlığı için risk oluşturmaya yetecek düzeylerde patojenler içerebilir.
- Reaktifler ve kontamine olmuş numuneler ile çalışırken, uygun koruyucu kıyafet ve gözlük kullanımı dahil olmak üzere, daima standart laboratuvar güvenlik uygulamalarını izleyin.
- Amplifikasyon sonrasında zenginleştirme ortamları ve reaktif tüplerin içeriği ile temastan kaçının.
- Zenginleştirilmiş numuneleri ve ilişkili kontamine atıkları, geçerli yerel/bölgesel/ulusal/sektörel standartlara göre imha edin.
- Isıtıcıdaki önerilen sıcaklık ayarını aşmayın.
- Önerilen ısıtma süresini aşmayın.
- Neogen® Moleküler Tayin Isıtma Bloğu Ek Parçası sıcaklığını doğrulamak için uygun ve kalibre edilmiş bir termometre kullanın (örneğin tamamen daldırma tipi termometre değil, kısmi daldırma tipi termometre veya dijital sıcaklık sensörlü termometre). Termometre, Neogen Moleküler Tayin Isıtma Bloğu Ek Parçası'nda belirlenmiş olan konuma yerleştirilmelidir.

Testi hazırlarken çapraz kontaminasyonla ilişkili riskleri azaltmak için:

- Daima eldiven takın (kullanıcıyı korumak ve nükleazların girişini önlemek için).

Sıcak sıvılara maruz kalınmasıyla ilişkili riskleri azaltmak için:

- Isıtıcıdaki önerilen sıcaklık ayarını aşmayın.
- Önerilen ısıtma süresini aşmayın.
- Neogen® Moleküler Tayin Isıtma Bloğu Ek Parçası sıcaklığını doğrulamak için uygun ve kalibre edilmiş bir termometre kullanın (örneğin tamamen daldırma tipi termometre değil, kısmi daldırma tipi termometre veya dijital sıcaklık sensörlü termometre). Termometre, Neogen Moleküler Tayin Isıtma Bloğu Ek Parçası'nda belirlenmiş olan konuma yerleştirilmelidir.

BİLDİRİM

Testi hazırlarken çapraz kontaminasyonla ilişkili riskleri azaltmak için:

- Reaktif pellet hidrasyonundan önce eldivenleri değiştirin.
- Steril, aerosol bariyerli (filtreli), moleküler biyoloji sınıfı pipet uçlarının kullanılması tavsiye edilir.

- Her numune aktarımı için yeni bir pipet ucu kullanın.
- Numunenin zenginleştirilmiş besi yerinden lizis tüpüne aktarılması için İyi Laboratuvar Uygulamalarını kullanın. Pipeti kullanacak kişinin kontaminasyona maruz kalmasından kaçınmak için kullanıcı ara bir aktarım adımı eklemeyi seçebilir. Örneğin kullanıcı zenginleştirilmiş her numuneyi steril bir tüpe aktarabilir.
- Mevcutsa germisidal lamba içeren bir moleküler biyoloji çalışma tezgahı kullanın.
- Laboratuvar tezgahlarını ve ekipmanını (pipetler, kapak takma/kapak sökme araçları vb.) %1-5'lik (suda v:v) bir çamaşır suyu çözeltisi veya DNA uzaklaştırma çözeltisi ile periyodik olarak dekontamine edin.

Yanlış pozitif sonuçlarla ilişkili riskleri azaltmak için:

- Amplifikasyon sonrasında tüpleri asla açmayın.
- Kontamine olmuş tüpleri, her zaman %1-5'lik (suda v:v) bir çamaşır suyu solüsyonunda 1 saat süreyle bekleterek ve test hazırlık alanından uzakta imha edin.
- Amplifikasyon sonrasında reaktif tüplerine asla otoklav uygulamayın.
- Numunelerin yüksek düzeyde *Cronobacter* DNA'sı (ör. yok etme / etkisiz hale getirme adımına maruz bırakılmış cansız *Cronobacter* hücrelerinden alınan DNA) içerdiğinden şüphelenilirse olası pozitif zenginleştirmelere **Lizis** adımından önce enzim uygulanmalıdır. Ek talimatlar için Neogen Temsilcinizle iletişim kurun. Bu protokol, NF Validation çalışması sırasında test edilmemiştir.

Ek bilgiler ve ürünün imha edilmesi ile ilgili yerel düzenlemeler için Güvenlik Veri Formu'na bakın.

Belirli uygulamalar veya prosedürler hakkında sorularınız varsa www.neogen.com adresindeki web sitemizi ziyaret edin veya yerel Neogen temsilcisi ya da distribütörü ile iletişim kurun.

Kullanıcının Sorumluluğu

Kullanıcılar ürün talimatları ve bilgileri hakkında bilgi edinmekle yükümlüdür. Daha fazla bilgi için **www.neogen.com** adresini ziyaret edin ya da yerel Neogen temsilcinizle veya dağıtımcınızla iletişim kurun.

Bir test yöntemi seçilirken numune alma yöntemleri, test protokolleri, homojenleştirme ve karıştırma gibi numune hazırlama işlemleri, taşıma ve laboratuvar tekniği gibi dış faktörlerin sonuçları etkileyebileceğinin bilinmesi gerekir.

Seçilen test yönteminin kullanıcının kriterlerini karşıladığı konusunda kullanıcıyı tatmin edecek uygun matrisler ve mikrobiyal zorluklarla yeterli sayıda numuneyi değerlendirmek üzere herhangi bir test yönteminin veya ürününün seçilmesi kullanıcının sorumluluğundadır.

Tüm test yöntemlerinin ve sonuçlarının müşteri ve tedarikçi gereksinimlerini karşılamasını sağlamak yine kullanıcının sorumluluğundadır.

Tüm test yöntemlerinde olduğu gibi, herhangi bir Neogen Gıda Güvenliği ürününün kullanılmasından elde edilen sonuçlar test edilen matrislerin veya süreçlerin kalitesi konusunda bir garanti oluşturmaz.

Çeşitli matrislere yönelik olarak yöntemin değerlendirilmesinde müşterilere yardımcı olmak için Neogen, Neogen® Moleküler Tayin Matris Kontrolü kitini geliştirmiştir. Gerektiğinde, matrisin Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* sonuçlarını etkileyip etkileyemediğini belirlemek üzere Matris Kontrolü (MC) olanağını kullanın. Neogen yönteminin adapte edildiği ya da yeni veya bilinmeyen matrislerin ya da ham maddesi veya prosesi değişen matrislerin test edildiği herhangi bir validasyon döneminde, matrisi temsil eden birkaç numuneyi, yani farklı kaynaktan alınan numuneleri test edin.

Matris; bileşim ve proses gibi yapısal özellikleri olan bir ürün türü olarak tanımlanabilir. Matrisler arasındaki farklılıklar, proseslerindeki veya sunumlarındaki farklılıkların neden olduğu etkiler kadar basit olabilir (ör. pastörize ve ham, kuru ve taze vb.).

Garanti Sınırlaması/Yasal Yollara İlişkin Sınırlama

NEOGEN, HER BİR ÜRÜN AMBALAJININ ÜZERİNDEKİ SINIRLI GARANTİ KISMINDA AÇIKÇA BELİRTİLENLER HARİCİNDE, PAZARLANABİLİRLİK VEYA BELİRLİ BİR KULLANIMA UYGUNLUK GARANTİLERİ DAHİL ANCAK BUNLARLA SINIRLI OLMAMAK ÜZERE TÜM AÇIK VEYA ZIMNİ GARANTİLERİ KABUL ETMEMEKTEDİR. Herhangi bir Neogen Gıda Güvenlik Ürünü'nün kusurlu olması durumunda, Neogen veya yetkili dağıtıcısı, tercihine göre ürünü değiştirecek veya ürün satış tutarını iade edecektir. Tarafınıza münhasır çözümler bunlardır. Diğer her türlü sorunuz için lütfen Neogen temsilciniz veya yetkili Neogen distribütörünüz ile iletişim kurun.

Neogen Sorumluluğunun Sınırlandırılması

NEOGEN DOĞRUDAN, DOLAYLI, ÖZEL, ARIZİ VEYA NETİCE KABİLİNDEN DOĞMUŞ, KAYBEDİLMİŞ KAZANÇLAR DAHİL ANCAK BUNUNLA SINIRLI OLMAMAK ÜZERE HERHANGİ BİR KAYIP VEYA ZARARDAN SORUMLU OLMAYACAKTIR. Hiçbir durumda Neogen'in herhangi bir hukuk kuramı altındaki sorumluluğu, kusurlu olduğu iddia edilen ürünün satış fiyatını aşamaz.

Saklama ve İmha

Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter*'ı 2-8°C sıcaklıkta saklayın. Dondurmayın. Saklama sırasında kiti ışıktan uzak tutun. Kiti açtıktan sonra, folyo poşetin zarar görmemiş olduğunu teyit edin. Poşet zarar görmüşse kullanmayın. Açıldıktan sonra, kullanılmayan reaktif tüplerinin, liyofilize reaktiflerin stabilitesini sürdürmek amacıyla, içinde nem çekici ile ağzı tekrar kapatılabilir poşet içinde saklanması gerekir. Yeniden mühürlenmiş poşetleri 60 günden uzun olmamak kaydıyla 2-8°C sıcaklıkta saklayın.

Son kullanma tarihi geçen Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter*'ı kullanmayın. Son kullanma tarihi ve lot numarası kutunun dış yüzündeki etikette belirtilmiştir. Kullanım sonrasında, zenginleştirme ortamı ve Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* tüpleri, potansiyel olarak patojenik materyaller içerebilir. Test tamamlandığında, kontamine atığın imha edilmesi için geçerli endüstri standartlarına uyun. Ek bilgiler ve ürünün imha edilmesi ile ilgili yerel düzenlemeler için Güvenlik Veri Formu'na bakın.

Kullanım Talimatları

Tüm talimatları dikkate izleyin. Bu uyarının dikkate alınmaması hatalı sonuçlara neden olabilir.

Laboratuvar tezgahlarını ve ekipmanını (pipetler, kapak takma/kapak sökme araçları vb.) %1-5'lik (suda v:v) bir çamaşır suyu çözeltisi veya DNA uzaklaştırma çözeltisi ile periyodik olarak dekontamine edin.

Kullanıcı, “Neogen Moleküler Tayin Sistemi için Kurulum Yeterliliği (IQ) / Çalışma Yeterliliği (OQ) Protokolleri ve Talimatlar” belgesinde[6] açıklanan şekilde Neogen Moleküler Tayin Sistemi operatör yeterliliği eğitimini tamamlamalıdır.

Özel gereksinimler için “Valide edilmiş yöntemler için özel talimatlar” bölümüne bakın:

AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2018.01 ve *Performance Tested*℠ Certificate 101703’e göre zenginleştirme protokolleri için Tablo 3

NF VALIDATION sertifikası 3M 01/20-03/18’e göre zenginleştirme protokolleri için Tablo 4

Numune Zenginleştirme

Tablo 2, 3 veya 4’te gıda ve çevre numunelerine yönelik zenginleştirme protokollerinin yönergeleri verilmiştir.

Bu test yönteminin kullanıcı kriterlerini karşılamasını sağlamak üzere alternatif numune alma protokollerinin, zenginleştirme protokollerinin veya seyreltme oranlarının valide edilmesi kullanıcının sorumluluğundadır.

Gıdalar, Çevresel Tozlar, Tozlar, Süprüntüler ve Süngerler

1. Zenginleştirme protokolünde aksi belirtilmediği takdirde (Bkz. Tablo 2, 3 veya 4), zenginleştirme ortamını ortam sıcaklığına (20-25°C) eşitleyin.
2. Zenginleştirme ortamı ile numuneyi aseptik olarak birleştirin ve 2 ± 0,2 dakika boyunca harmanlama, hazmetme, vorteksleme veya elle karıştırma yoluyla **ya da tüm topaklar tamamen çözünü zenginleştirme süspansiyonu homojen hale gelinceye kadar homojenize edin**[7,8].
   a. Homojenleştirme ve karıştırma dahil numune hazırlama işlemleri, taşıma ve laboratuvar tekniği gibi faktörler sonuçları etkileyebilir.
   b. Yüksek oranda partikül içeren numuneler için filtre torbalarının kullanılması önerilir.
   c. Suda şişen ve yüksek oranda kıvamlı olan matrisler için (ör. tahıllar, nişastalar), viskozite uygun şekilde azaltılana kadar seyreltme (> 1:10) yapılması veya BPW’ye (ISO)[8] steril %1’lik (a/h) alfa-amilaz eklenmesi önerilir.
   d. Büyük boyutlardaki tahıl numuneleri için topak oluşumunu önlemek üzere sık sık karıştırarak toz halindeki tahılı yavaşça sıvıya ekleyin.
3. İlgili protokol tablosunda özetlendiği gibi inkübe edin (Bkz. Tablo 2, 3 veya 4).

Tablo 2. Genel Zenginleştirme Protokolleri

Numune Matrisi	Numune Boyutu[1]	Zenginleştirme Besi Yeri Hacmi[1, 2]	Zenginleştirme Sıcaklığı (± 1°C)	Zenginleştirme Süresi (saat)	Numune Analiz Hacmi
Süt tozu, soya tozu, peynir altı suyu tozu, laktoz, pirinç unu ve maltodekstrin gibi toz bebek maması (PIF) ve ham maddeler	1X gram numune	9X mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Tuz, mineraller, amino asitler, DHA (dokosaheksaenoik asit) ve vitaminler gibi ham maddeler	1X gram numune	99X mL BPW (ISO) (1:100)	37	18-24	20 µl
Toz, süprüntüler ve vakum koleksiyonu gibi kuru çevresel numuneler	1X gram numune	9X mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
10 mL Letheen Besi Yeri veya D/E Nötrleştirici Besi Yerine sahip çevresel sünger	1 numune alma cihazı	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl

1. Neogen, 300 grama kadar Tablo 2'deki seyreltme oranlarını kullanarak Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter*'ı değerlendirmiştir. Bu yöntemin kullanıcı kriterlerini karşılamasını sağlamak üzere alternatif seyreltme oranlarının veya protokollerinin valide edilmesi kullanıcının sorumluluğundadır.
2. Zenginleştirme besi yeri hacmi 300 mL'den büyükse **önceden ısıtılmış** BPW (ISO) kullanın (ör. numune 30 gramdan büyükse).

Valide Edilmiş Yöntemler İçin Özel Talimatlar

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

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

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

AOAC Research Institute OMA℠ ve PTM℠ çalışmalarında, Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter*'ın *Cronobacter* tespitinde etkili bir yöntem olduğu bulunmuştur. Çalışmada test edilen matrisler Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. AOAC® *OMA*℠ 2018.01 ve *PTM*℠ 101703'e göre zenginleştirme protokolleri

Numune Matrisi	Numune Boyutu	Zenginleştirme Besi Yeri Hacmi[1]	Zenginleştirme Sıcaklığı (± 1°C)	Zenginleştirme Süresi (saat)	Numune Analiz Hacmi
Toz Halinde İnfant Formül ve Toz Halinde İnfant Tahıl	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
Toz Halinde İnfant Tahıl non-probiyotik	300 g	2.700 mL BPW (ISO) (1:10)	Önceden Isıtılmış 37	18-24	20 µl
Probiyotiklerle birlikte Toz Halinde İnfant Formül ve Toz Halinde İnfant Tahıl	300 g	2.700 mL BPW (ISO) + 10 mg/L Vankomisin	Önceden Isıtılmış 37	22-24	20 µl
Laktoz	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl
10 mL D/E Nötrleştirici Besi Yerine sahip çevresel sünger	1 numune alma cihazı	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl

1. Zenginleştirme besi yeri hacmi 300 mL'den büyükse **önceden ısıtılmış** BPW (ISO) kullanın.

AFNOR Certification ile NF VALIDATION

3M 01/20-03/18

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

Validasyonun bitiş tarihi ve geçerliliği ile ilgili daha fazla bilgi için lütfen yukarıda bahsi geçen web sitesindeki NF VALIDATION sertifikasına bakın.

ISO 22964 ile kıyaslandığında ISO 16140-2[9] uyarınca onaylı NF VALIDATION sertifikalı yöntem.

Validasyonun kapsamı: Probiyotikler, ham maddeler ve çevresel numuneler ile birlikte ve bunları içermeyen toz halinde infant formül ve infant tahıllar.

Numune hazırlama: Numuneler EN ISO 22694[2] and EN ISO 6887[7, 8]'ye uygun şekilde hazırlanmalıdır.

Yazılım sürümü: Sertifikaya bakın.

Tablo 4. NF VALIDATION Sertifikalı 3M 01/20-03/18 Yöntemine Göre Zenginleştirme Protokolleri

Numune Matrisi	Numune Boyutu	Zenginleştirme Besi Yeri Hacmi[1]	Zenginleştirme Sıcaklığı (± 1°C)	Zenginleştirme Süresi (saat)	Numune Analiz Hacmi	Önerilen Kesme Noktası[2, 3]
• Toz halinde infant formül • Toz halinde infant tahıllar • Kuru süt tozu, soya tozu, peynir altı suyu tozu, laktoz, pirinç unu, maltodekstrin gibi malzemeler • Toz, süprüntüler ve vakum koleksiyonu gibi kuru çevresel numuneler,	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl	Zenginleştirme besi yeri veya numune lizatı 2-8°C'de 72 saate kadar saklanabilir
• Sünger, durulama suyu, mendiller	1 numune alma cihazı veya 10 mL					Zenginleştirme besi yeri veya numune lizatı 2-8°C'de 72 saate kadar saklanabilir
Toz halinde infant formül ve toz halinde infant tahıl (non-probiyotik)	30-300 g	BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µl	Zenginleştirme besi yeri veya numune lizatı 2-8°C'de 72 saate kadar saklanabilir
Toz halinde infant tahıl ve toz halinde infant formül (probiyotik içeren)	30-300 g	BPW (ISO) + 10 mg/L vankomisin (1:10)	37	22-24	20 µl	Hiçbiri

1. Zenginleştirme besi yeri hacmi 300 mL'den büyükse önceden ısıtılmış BPW (ISO) kullanın (ör. numune 30 gramdan büyükse).
2. Zenginleştirme besi yerini saklama ortamından çıkardıktan sonra, Lizis kısmındaki 1. aşamadan itibaren teste devam edin. Numune lizatını saklama ortamından çıkardıktan sonra, Lizis kısmındaki 7. aşamadan itibaren teste devam edin.
3. Isıl işlem görmüş saklanan lizatların yeniden test edilmesi için Ek A'ya bakın.

Neogen® Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi'nin Hazırlanması

1. Bir bezi veya tek kullanımlık havluyu %1-5 (suda v:v) çamaşır suyu çözeltisiyle ıslatın ve Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi'ni silin.
2. Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi'ni su ile durulayın.
3. Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi'ni silmek için tek kullanımlık bir havlu kullanın.
4. Kullanmadan önce, Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi'nin kuru olduğundan emin olun.

Neogen® Moleküler Tayin Soğutma Bloğu Ek Parçası'nın Hazırlanması

Neogen Moleküler Tayin Soğutma Bloğu Ek Parçası'nı doğrudan laboratuvar tezgahına yerleştirin: Neogen Moleküler Tayin Soğutma Bloğu Tepsisi kullanılmaz. Bloğu laboratuvar ortam sıcaklığında kullanın (20-25°C).

Neogen® Moleküler Tayin Isıtma Bloğu Ek Parçası'nın Hazırlanması

Neogen Moleküler Tayin Isıtma Bloğu Ek Parçası'nı kuru, çift bloklu bir ısıtma ünitesine yerleştirin. Kuru blok ısıtıcı ünitesini çalıştırın ve Neogen Moleküler Tayin Isıtma Bloğu Ek Parçası'nın 100 ±1°C'lik bir sıcaklığa ulaşmasını ve bu sıcaklığı korumasını sağlamak için sıcaklığı ayarlayın.

NOT: Isıtma ünitesine bağlı olarak, Neogen Moleküler Tayin Isıtma Bloğu Ek Parçası'nın istenen sıcaklığa ulaşması için yaklaşık 30 dakika bekleyin. Belirlenen yere yerleştirilmiş uygun, kalibre edilmiş bir termometre (ör. tamamen daldırmalı termometre değil, kısmi daldırmalı termometre veya dijital sıcaklık sensörü termometre) kullanarak Neogen Moleküler Tayin Isıtma Bloğu Ek Parçası'nın 100 ± 1°C'de olduğunu doğrulayın.

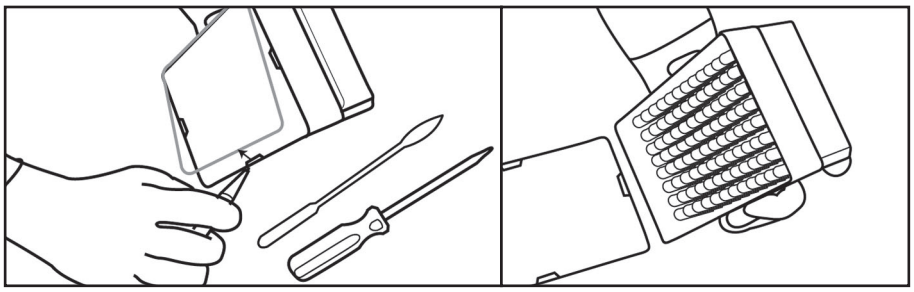
Neogen® Moleküler Tayin Cihazı'nın Hazırlanması

1. Neogen® Moleküler Tayin Yazılımı'nı başlatın ve giriş yapın. Yazılımın en güncel sürümüne sahip olduğunuzdan emin olmak için Neogen Food Safety temsilcisiyle temas kurun.
2. Neogen Moleküler Tayin Cihazı'nı çalıştırın.
3. Her bir numune için verilerin olduğu bir test oluşturun veya düzenleyin. Ayrıntılar için bkz. Neogen Moleküler Tayin Sistemi Kullanım Kılavuzu.

NOT: Reaksiyon tüpleri ile birlikte Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi yerleştirilmeden önce, Neogen Moleküler Tayin Cihazı Hazır duruma gelmelidir. Bu ısınma aşaması yaklaşık 20 dakika sürer ve cihazın durum çubuğunda TURUNCU bir ışıkla gösterilir. Cihaz bir testi başlatmaya hazır olduğunda, durum çubuğu YEŞİL renge döner.

Lizis

Neogen Lizis Solüsyonu Rafını Neogen Moleküler Tayin Isıtma Bloğu Ek Parçası'na yerleştirmeden önce tornavida ile sökün.



1. Rafı bir gece boyunca (16-18 saat) ortam sıcaklığına (20-25°C) ayarlayarak Neogen Lizis Solüsyonu tüplerinin ısınmasını sağlayın. Neogen Lizis Solüsyonu tüplerini ortam sıcaklığına getirmek için alternatifler, Neogen Lizis Solüsyonu tüplerini en az 2 saat laboratuvar tezgahına koymak, Neogen Lizis Solüsyonu tüplerini 1 saatliğine 37 ± 1°C'de inkübe etmek veya kuru çift bloklu bir ısıtıcıya 100 ± 1°C'de 30 saniyeliğine yerleştirmektir.
2. Karıştırmak için kapaklı tüpleri ters çevirin. Ters çevirdikten sonraki 4 saat içinde sıradaki adıma geçin.
3. Zenginleştirme besi yerini inkübatörden çıkarın.
4. Her numune ve NC numunesi (steril zenginleştirme ortamı) için bir Neogen Lizis Solüsyonu tüpü gereklidir.

4.1 Neogen Lizis Solüsyonu tüp şeritleri, istenilen tüp sayısı kadar kesilebilir. İhtiyaç duyulan sayıda ayrı Neogen Lizis Solüsyonu tüpü veya 8 tüplük şeritler seçin. Neogen Lizis Solüsyonu tüplerini boş bir rafa koyun.

4.2 Çapraz kontaminasyonu önlemek için Neogen Lizis Solüsyonu tüplerinin kapaklarını teker teker açın ve her aktarım aşaması için yeni bir pipet ucu kullanın.

4.3 Aşağıda açıklandığı gibi, zenginleştirilmiş numuneyi Neogen Lizis Solüsyonu tüplerine aktarın:

> **İlk olarak,** her bir zenginleştirilmiş numuneyi ayrı bir Neogen Lizis Solüsyonu tüpüne aktarın. **Son olarak** NC'yi aktarın.

4.4 Tek seferde bir şerit üzerinde çalışarak, Neogen Lizis Solüsyonu tüp şeridinin kapağını sökmek için Neogen® Moleküler Tayin Kapak Takma / Kapak Sökme Aracı - Lizis'i kullanın.

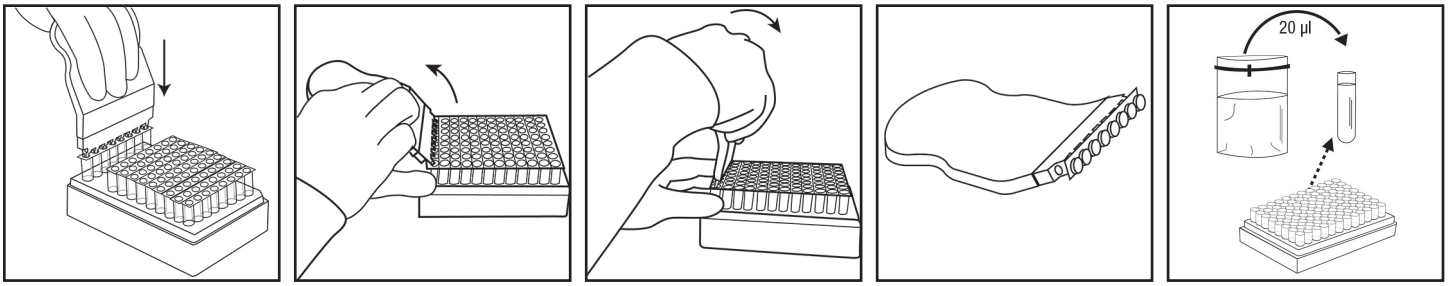
4.5 Neogen Lizis Solüsyonu tüp kapağını atın; lizat tekrar test edilmek üzere tutulacaksa lizisten sonra tekrar uygulama için kapakları temiz bir kaba koyun.

4.5.1. Elde bulunan lizatın işlenmesi için Ek A'ya bakın.

4.6 Kıvamlı numunelerle çalışırken numuneyi filtrelenmiş taraftan toplamadan önce zenginleştirme torbasını ajite edin.

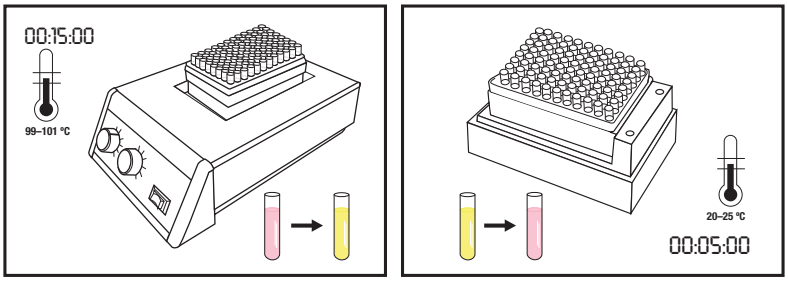
4.7 20 µl numuneyi, protokol tablosunda aksi belirtilmedikçe Neogen Lizis Solüsyonu tüpüne aktarın.

5. Ayrı numune şeritlerinin her biri ilgili Neogen Lizis Solüsyonu tüpüne eklenene kadar 4.4 ile 4.7 arasındaki adımları tekrarlayın.



6. Tüm numuneler aktarıldığında, 20 µL kadar NC'yi (BPW gibi steril zenginleştirme ortamı) Neogen Lizis Solüsyonu tüpüne aktarın. NC olarak su kullanmayın.
7. Neogen Moleküler Tayin Isıtma Bloğu Ek Parçası sıcaklığının 100 ± 1°C'de olduğunu doğrulayın.
8. Üstü açık Neogen Lizis Solüsyonu tüpleri rafını Neogen Moleküler Tayin Isıtma Bloğu Ek Parçası'na yerleştirin ve 15 ± 1 dakika boyunca ısıtın. Isıtma boyunca, Neogen Lizis Solüsyonunun rengi pembeden (soğuk) sarıya (sıcak) dönecektir.

   Lizis tet aşaması sırasında doğru şekilde ısıl işleme tabi tutulmayan numuneler, olası bir biyolojik tehlike olarak düşünülebilir ve Neogen Moleküler Tayin Cihazı'na YERLEŞTİRİLMEMELİDİR.
9. Neogen Lizis Solüsyonu tüplerinin açık rafını Neogen Moleküler Tayin Isıtma Bloğundan çıkarın ve Neogen Moleküler Tayin Soğutma Bloğu Ek Parçası'nda en az 5, en fazla 10 dakika soğumasını bekleyin. Neogen® Moleküler Tayin Soğutma Bloğu Tepsisi olmadan oda sıcaklığında kullanılan Neogen Moleküler Tayin Soğutma Bloğu Ek Parçası, laboratuvar tezgahına doğrudan yerleştirilmelidir. Soğuduğunda, Neogen Lizis Solüsyonunun rengi tekrar pembeye dönecektir.
10. Neogen Lizis Solüsyonu tüp rafını Neogen Moleküler Tayin Soğutma Bloğu Ek Parçası'ndan çıkarın.



Amplifikasyon

1. Her bir numune ve NC için bir Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* Reaktif Tüpü gereklidir.

   1.1 Tüp şeritleri istenilen tüp sayısı kadar kesilebilir. Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* Reaktif Tüplerinin veya gereken 8'li tüp şeritlerinin sayısını seçin.

   1.2 Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* Reaktif Tüplerini boş bir rafa yerleştirin.

1.3 Tüplerin dip tarafındaki reaktif pelletlerini karıştırmaktan kaçının.

2. Bir adet Neogen Reaktif Kontrolü Tüpü seçin ve rafa yerleştirin.
3. Çapraz kontaminasyonu önlemek için tek seferde yalnızca bir Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* Reaktif Tüpü şerit kapağını açın ve her aktarım aşaması için yeni bir pipet ucu kullanın.
4. Lizatların her birini Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* Reaktif Tüpü ile Neogen Reaktif Kontrolü Tüpüne aşağıda açıklanan şekilde aktarın:

Her bir numune lizatını *önce* bir Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - **Cronobacter** Reaktif Tüpüne, ardından NC'ye aktarın. Neogen Reaktif Kontrolü Tüpünü **en son** hidratlayın.

5. Neogen® Moleküler Tayin Kapak Takma / Kapak Sökme Aracı - Reaktif'i kullanarak, Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* Reaktif Tüplerinin kapağını, aynı anda tek tüp şeridi olacak şekilde çıkarın. Kapağı atın.

   5.1 **20 µL lizat numunesini, Neogen Lizis Solüsyonu tüpündeki sıvının 1/2'lik üst kısmından (çökeltiyi önleyerek) ilgili Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* Reaktif Tüpüne aktarın. Pelletlerin karışmasını önlemek için açılı olarak dökün. Yukarı ve aşağı 5 kez pipetleyerek nazikçe karıştırın.**

   5.2 Şeritte karşılık gelen Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* Reaktif Tüpüne tek lizat numunesi eklenene kadar adım 5.1'i tekrarlayın.

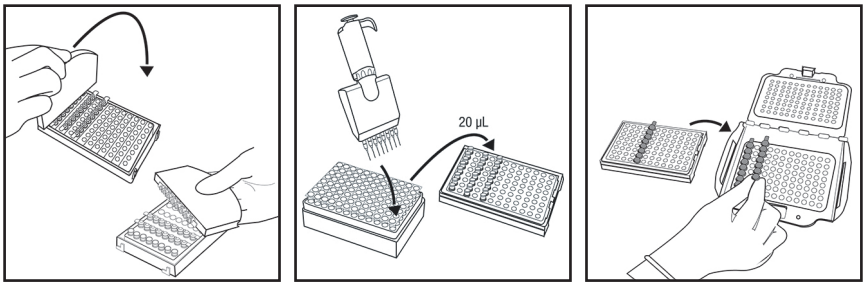
   5.3 Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* Reaktif Tüplerini, tedarik edilen ilave kapak ile kapatın ve kapağın sıkı bir şekilde kapatıldığından emin olmak amacıyla, aşağı yukarı hareketle basınç uygulamak üzere Neogen Moleküler Tayin Kapak Takma / Kapak Sökme Aracı - Reaktif'inin yuvarlak tarafını kullanın.

   5.4 Test edilecek numune sayısı için 5.1 ila 5.3 adımlarını gerektiği şekilde tekrar edin.

   5.5 Tüm lizat numuneleri aktarıldığında, adım 5.1 ila 5.3'ü tekrarlayarak 20 µL NC lizatı bir Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* Reaktif Tüpüne aktarın.

   5.6 **20 µL <u>NC lizatı</u> bir Neogen Reaktif Kontrolü Tüpüne** aktarın. Pelletlerin karışmasını önlemek için açılı olarak dökün. Yukarı ve aşağı 5 kez pipetleyerek nazikçe karıştırın.

6. Kapağı takılmış olan tüpleri temiz ve dekontamine edilmiş bir Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi'ne yükleyin. Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi kapağını kapatın ve mandalını kilitleyin.



7. Neogen Moleküler Tespit Yazılımı'nda yapılandırılmış testi gözden geçirin ve onaylayın.
8. Yazılımdaki Start (Başlat) düğmesine tıklayın ve kullanılacak cihazı seçin. Seçilen cihazın kapağı otomatik olarak açılır.
9. Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi'ni Neogen Moleküler Tayin Cihazı'na yerleştirin ve testi başlatmak üzere kapağı kapatın. Pozitif sonuçlar daha önce tespit edilebilmekle beraber, sonuçlar 60 dakika içinde elde edilir.
10. Test tamamlandıktan sonra, Neogen Moleküler Tayin Hızlı Yükleyici Tepsisi'ni Neogen Moleküler Tayin Cihazı'ndan çıkarın ve tüpleri 1 saat süresince %1-5'lik (suda v:v) çamaşır suyu çözeltisine daldırarak test hazırlık alanından uzağa atın.

BİLDİRİM: Çapraz kontaminasyondan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçların elde edilmesi riskini en aza indirmek için amplifiye edilmiş DNA'yı içeren reaktif tüplerini hiçbir zaman açmayın. Buna Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* Reaktif, Neogen Reaktif Kontrolü ve Neogen Matris Kontrol Tüpleri dahildir. Mühürlü reaktif tüplerini daima, 1 saat süresince %1-5'lik (suda v:v) çamaşır suyu çözeltisine daldırarak test hazırlık alanından uzağa atın.

Sonuçlar ve Yorumlama

Bir algoritma, nükleik asit amplifikasyonu tayininden kaynaklanan ışık çıkışı eğrisini yorumlar. Sonuçlar yazılım tarafından otomatik olarak analiz edilir ve sonuca göre renk kodlamasına tabi tutulur. Benzersiz eğri parametreleri sayısı analiz edilerek Pozitif veya Negatif bir sonuç belirlenir. Negatif sonuçlar ve Kontrol sonuçları test tamamlandıktan sonra gösterilirken, olası pozitif sonuçlar gerçek zamanlı olarak bildirilir.

NOT: Sistem ve Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* amplifikasyon reaktifleri bir "arka plan" bağıl ışık birimine (RLU) sahip olduğu için negatif bir numune bile sıfır okuma sonucu vermeyecektir.

Onay

- NF Validation Sertifikalı Yönteme göre sonuçların doğrulanması

NF VALIDATION kapsamında, birincil zenginleştirme yönteminden (BPW ISO veya 10 mg/L vankomisin takviyeli BPW ISO) aktarımla başlayarak tüm varsayıma dayalı pozitif zenginleştirmeler aşağıdaki referans yöntem onayı[2] ile doğrulanmalıdır.

- Diğer onay protokolü

Varsayıma dayalı pozitif numunelerin doğrulanması, laboratuvarın standart işletme prosedürlerine uygun olarak veya uygun referans yöntem onayı[1,2] ile, birincil zenginleştirmeden (BPW ISO veya 10 mg/L vankomisin takviyeli BPW ISO) ikincil zenginleştirme ortamına aktarımla başlayıp, sonrasında uygun biyokimyasal, serolojik ve/veya moleküler yöntemler kullanılarak izolatların kaplanması ve doğrulanmasıyla gerçekleştirilmelidir.

Nadir olarak olağan dışı ışık çıkışı durumunda, algoritma bu durumu Kontrol olarak etiketler. Neogen, tüm İnceleme numuneleri için kullanıcının testinin tekrarlanmasını önerir. Kontrol sonucu almaya devam ederseniz tercih ettiğiniz yöntemi kullanarak veya yerel düzenlemeler ile belirlendiği şekilde, doğrulama testine geçin[1,2].

Uyumsuz sonuçlar halinde (Neogen Moleküler Tespit Analizi 2 - *Cronobacter* ile varsayıma dayalı pozitif, yukarıda tanımlanan yöntemlerden biri ile doğrulanmamış) laboratuvar, sonuçları bildirmek için yerleşik standart çalışma prosedürlerini izlemelidir.

Belirli uygulamalar veya prosedürler hakkında sorularınız varsa www.neogen.com adresindeki web sitemizi ziyaret edin veya yerel Neogen temsilcisi ya da distribütörü ile iletişim kurun.

Ek A. Protokol Kesintisi: Isıl işlem görmüş lizatların saklanması ve yeniden test edilmesi

1. Isıl işlem görmüş lizatı saklamak için lizis tüpünü temiz bir kapakla kapatın (bkz. **Lizis bölümü** 4.5)
2. 72 saate kadar 2-8°C sıcaklıkta saklayın.
3. Saklanan numuneyi, karıştırmak üzere 2-3 kez ters yüz ederek amplifikasyon için hazırlayın.
4. Tüplerin kapaklarını çıkarın.
5. Karıştırılan lizat tüplerini Neogen Moleküler Tayin Isıtma Bloğu Ek Parçası üzerine yerleştirin ve 5 ± 1 dakika 100 ± 1°C'de ısıtın.
6. Neogen Lizis Solüsyonu Tüplerinin rafını ısıtma bloğundan çıkarın ve Neogen Moleküler Tayin Soğutma Bloğu Ek Parçası'nda en az 5, en fazla 10 dakika soğumasını bekleyin.
7. Protokole, yukarıda detayları verilen **Amplifikasyon** bölümünden devam edin.

Referanslar:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
8. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

Yukarıda açıklanan standart yöntemlerin mevcut sürümlerine başvurun.

Sembollerin Açıklaması

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

発行日：2024-01

製品情報

病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用*

製品の概要および用途

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

Neogen 病原菌検出アッセイは、増幅した菌を検出するために、高い特異性と感度を持つ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]。

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

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

Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用*と緩衝ペプトン水ISO（BPW ISO）増菌培地との併用における評価は実施されています。

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

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

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

表1. Neogen 病原菌検出アッセイキットの内容

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

陰性コントロール（キットには付属しません）は、BPW ISOなどの滅菌済増菌培地です。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 病原菌自動検出システムおよびNeogen 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用*の製品情報に記載のすべての安全情報を読み、理解し、遵守してください。また、これらの情報は大切に保管してください。

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

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

⚠ 警告

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

検査実施担当者に現行の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[3]、ISO/IEC 17025[4]、ISO 7218[5]）。

汚染検体の偽陰性結果のリスクを回避するために：

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

化学物質およびバイオハザードへの暴露に伴う危険を回避するために：

- 技能訓練を受けた検査実施担当者の管理下で、適切な設備のある検査室にて食中毒菌検査を行ってください。培養済み増菌培地および培養済み増菌培地と接触する機器または接触面には、人体に有害となりうる量の病原体が含まれている可能性があります。
- 試薬および汚染された検体を取り扱う際は、適切な保護衣、保護メガネの装着など、標準的な検査室の安全手順に常に従ってください。
- 増菌後の培地や、増幅後の試薬チューブ内容物には触れないでください。
- 現行の行政基準および産業基準に従って、増菌された検体や関連する汚染された廃棄物を廃棄してください。
- ヒーターの温度設定を推奨温度以上にしないでください。
- 推奨される加熱時間を超えないでください。
- 適切な較正済みの温度計を使用して、Neogen® 測定機器 病原菌自動検出システム用ヒートブロックインサートの温度を確認してください（例：浸線付温度計またはデジタル熱電対温度計。全浸没温度計は使用しないこと）。温度計は、必ずNeogen 測定機器 病原菌自動検出システム用ヒートブロックインサートの指定の部位に設置してください。

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）。

高温の液体への暴露に伴う危険を回避するために：

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

注記

アッセイ準備中の交差汚染に伴う危険を回避するために：

- 試薬ペレットを水和する前に、手袋を交換してください。
- 滅菌済み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）に従って検体を増菌培地からライシスチューブに移してください。ピペットの汚染を回避するため、中間的な滴下ステップを追加することもできます。例えば、増菌された各検体を滅菌チューブに滴下することができます。
- 利用可能な場合は、殺菌灯が装備された病原菌取扱エリアを使用してください。
- 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、1～5%（v/v in water）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、1～5%（v/v in water）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ください。
- 検体に*クロノバクター属菌*のDNA（例：殺菌／不活性化された成育不能な*クロノバクター属菌*細胞由来のDNA）が高濃度で含まれていることが疑われる場合は、**ライシス**ステップに進む前に、陽性と推定される増菌培地をDNaseで処理してください。手順の詳細については、Neogen担当者までお問い合わせください。このプロトコルは、NF Validation検証で試験を実施しておりません。

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

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

お客様の使用責任

お客様には、使用前に添付文書および製品情報を熟読し、情報に精通する責任があります。詳細につきましては、当社ウェブサイト**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にお問い合わせください。

検査方法を選択する際には、サンプリング方法、検査プロトコル、均質化や混合などの検体の準備、取り扱い、および検査手技などの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。

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

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

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

各種マトリックスの検査方法の評価にご利用いただくため、NeogenではNeogen® マトリックスコントロール 病原菌検出システム用キットをご用意しました。必要に応じて、マトリックスコントロール（MC）を使用し、対象マトリックスがNeogen 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用*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マトリックス、あるいは原材料を加工したマトリックスや加工工程に変化の生じたマトリックスを検査する場合は、検証期間中に、マトリックスの標準となる複数の検体（由来の異なる検体）を検査してください。

マトリックスは、成分や加工状態など固有の特性を備える製品の種類として定義されます。マトリックスは、加工や外観など（例：未加工／滅菌済み、生食用／乾物等）の違いと同じように単純に区別できます。

保証の制限／限定的救済策

個々の製品パッケージの限定保証条項に明示されている場合を除き、NEOGENは明示または黙示を問わず、商品性または特定の目的への適合性に関する保証を含むがこれに限定されない、あらゆる種類の保証も負いかねます。Neogen食品衛生部門の製品に欠陥があった場合、Neogenまたは取扱販売店で交換あるいは返品処理をいたします。対応は上記のみとさせていただきます。ご不明な点がございましたら、Neogenの担当者またはNeogenの正規卸売業者にお問い合わせください。

Neogenの保証責任範囲

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

保管と廃棄

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

使用期限を過ぎたNeogen 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用*は使用しないでください。使用期限およびロット番号は外箱ラベルに記載されています。使用後、増菌培地およびNeogen 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用*には病原性の物質が含まれる可能性があります。検査終了後は、汚染廃棄物に関する現行の産業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、製品安全データシートを参照してください。

使用方法

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

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、1～5%（v/v in water）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 病原菌自動検出システムの設置資格（IQ）／操作資格（OQ）プロトコルと手順」[6]に記載のとおり、Neogen 病原菌自動検出システムのオペレーター資格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、「妥当性確認された方法」の項を参照してください。

表3. AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2018.01および*Performance Tested℠* 認証番号101703に基づく増菌プロトコル

表4. NF VALIDATION 3M 01/20-03/18に基づく増菌プロトコル

検体の増菌

表2、3、4には、食品および環境検体を増菌する場合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、十分な数の検体または増菌プロトコル、あるいは希釈率で事前確認いただき、お客様の責任で使用の可否をご判断ください。

食品、環境粉体、埃、ごみ、スポンジ

1. 増菌プロトコルに別途指定のある場合を除き、増菌培地を室温（20～25°C）に戻します（表2、3、4を参照）。
2. 増菌培地と検体を無菌的に混合します。均一になるように、ブレンダー、ストマッキング、撹拌機、手作業など、各種方法のいずれかで2±0.2分間、**あるいはすべての塊が完全に溶解し、濃縮懸濁液が均質になるまで、**よく撹拌（ホモジナイズ）します[7,8]。
   a. 均質化や混合などの検体の準備、取り扱い、および検査手技などの要因が結果に影響する場合があります。
   b. 超微粒子検体に関しては、フィルターバッグの使用を推奨します。
   c. 水中で膨潤し、粘度の高い食材（例：シリアル、でんぷん）については、粘度が適度に低下するまでさらに希釈（> 1:10）するか、滅菌済みの1%（w/v）α-アミラーゼをBPW（ISO）に添加することを推奨します[8]。
   d. 検体量が多いシリアルの場合、凝集しないよう、頻繁に混合しながら液体に粉末シリアルを徐々に加えます。
3. 該当するプロトコルの表に記載のとおり培養します（表2、3、4を参照）。

表2. 一般的な増菌プロトコル

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

1. Neogenは、表2に掲載の希釈率を用いてNeogen 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用*の評価（300 gまで）を実施しています。この方法がお客様の基準に合致するかを確かめるため、事前に他の希釈率あるいはプロトコルでご確認いただいた上で、使用の可否をご判断ください。
2. 増菌培地の量が300 mLを超える場合（例：検体量が30 gを超える）は、**あらかじめ加温した**BPW（ISO）を使用してください。

妥当性確認された方法

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

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

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

AOAC Research Institute OMA℠およびPTM℠を用いた試験において、Neogen 病原菌検出アッセイ2　*クロノバクター属菌用*は、*クロノバクター属菌の検出に有効な方法であることが確認されています。*上記試験において検査の対象となったマトリックスを表3に掲載します。

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

検体マトリックス	検体量	増菌培地の量[1]	増菌温度（±1°C）	増菌時間（時間）	検体の分析量
乳児用調製粉乳および乳児用粉末シリアル	10 g	BPW（ISO）90 mL（1:10）	37	18～24	20 µL
乳児用粉末シリアル（プロバイオティクスを含有しない）	300 g	BPW（ISO）2700 mL（1:10）	37°Cにあらかじめ加温済み	18～24	20 µL
乳児用調製粉乳および乳児用粉末シリアル（プロバイオティクスを含有する）	300 g	BPW（ISO）2700 mL + バンコマイシン10 mg/L	37°Cにあらかじめ加温済み	22～24	20 µL
ラクトース	10 g	BPW（ISO）90 mL（1:10）	37	18～24	20 µL
D/E中和ブロス10 mLを含ませた環境スポンジ	検体採取装置1個	BPW（ISO）90 mL（1:10）	37	18～24	20 µL

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

AFNOR CertificationによるNF VALIDATION

3M 01/20-03/18
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

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

NF VALIDATIONにより認証された方法は、ISO 22964よりもISO 16140-2（9）に準拠しています。

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

検体の準備： 検体は、EN ISO 22694 (2) およびEN ISO 6887 (7,8) に従って調製してください。

ソフトウェアバージョン： 認定証を参照してください。

表4. NF VALIDATIONにより認証された方法3M 01/20-03/18に基づく増菌プロトコル

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

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

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

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

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

Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用チルブロックインサートを作業台の上に直に置きます。Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用チルブロックトレイは使用しません。ブロックは検査室の室温（20～25°C）で使用します。

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

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

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

Neogen® 測定機器 病原菌自動検出システム用の準備

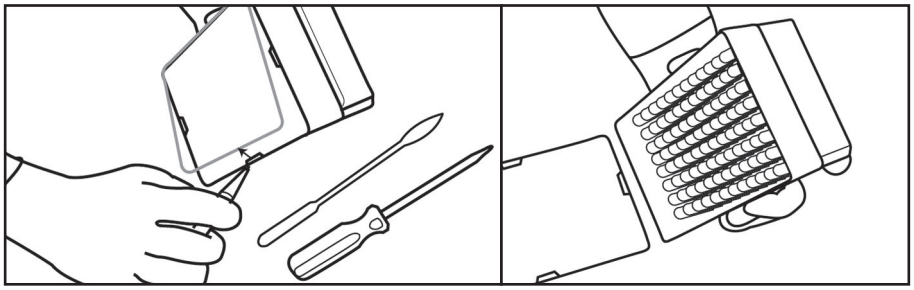
1. Neogen® 測定機器　病原菌自動検出システム用ソフトウェアを起動して、ログインします。お使いのソフトウェアが最新バージョンであるかどうかを確認するには、Neogen食品衛生部門の営業担当者あるいは販売店までお問い合わせください。
2. Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用の電源を入れます。

3. 各検体のデータを含む検出結果を作成、編集します。詳細については、Neogen 病原菌自動検出システムユーザーマニュアルを参照してください。

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

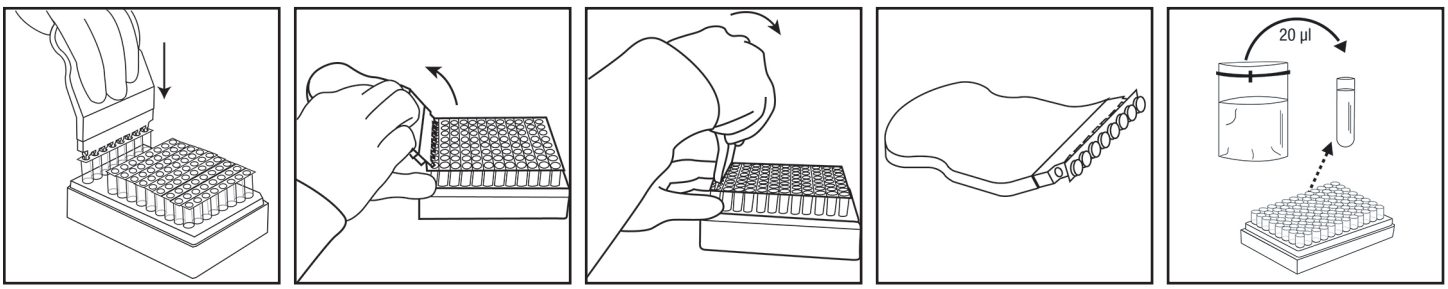
ライシス

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



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

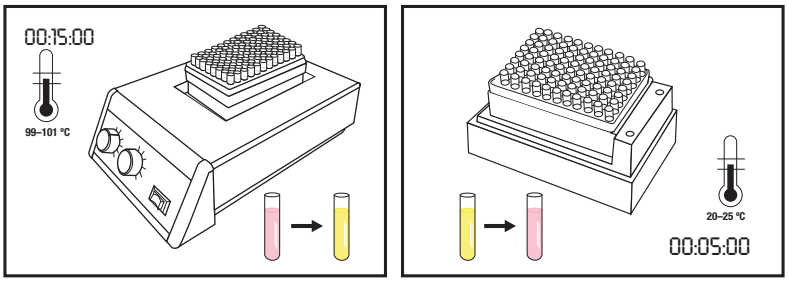
     最初に、増菌した各検体を各Neogen ライシスチューブに滴下します。**最後に**NCを滴下します。
   - 4.4 Neogen® 病原菌自動検出システム用キャップ／デキャップツール ― 溶解を使用して、Neogen ライシスチューブのキャップを一度に1ストリップずつ外します。
   - 4.5 Neogen ライシスチューブのキャップを廃棄します。ライシス液を再検査用に保存する場合は、キャップを清潔な容器に入れておき、ライシス後に再度キャップを嵌めます。
     - 4.5.1. 保存した溶解物の処理については、付録Aを参照してください。
   - 4.6 粘度の高い検体を扱うときは、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



6. すべての検体を移注したら、NC（ネガティヴコントロール用滅菌増菌培地、例：BPW）20 µLをNeogen ライシスチューブに滴下します。水は陰性コントロールとして使用しないでください。

7. Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用ヒートブロックインサートの温度が100±1°Cであることを確認してください。
8. Neogen 測定機器病原菌自動検出システム用ヒートブロックインサート内にカバーを外したNeogen ライシスチューブラックを入れて、15±1分間加熱します。加熱中、Neogen ライシス液はピンク色（低温）から黄色（高温）に変色します。

   アッセイのライシスステップ中に適切な熱処理を行っていない検体は、潜在的バイオハザードと考えられる可能性がありますので、Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用の装置内には入れないでください。
9. ヒートブロックからカバーを外したNeogen ライシスチューブラックを取り出し、Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用チルブロックインサート内で5分間以上（最大10分間）冷却します。Neogen® 測定機器 病原菌自動検出システム用チルブロックトレイを外して室温に戻されたNeogen 測定機器 病原菌自動検出システム用チルブロックインサートは、作業台の上に直に置いてください。冷却されると、ライシス液はピンク色に戻ります。
10. Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用チルブロックインサートからNeogen ライシスチューブラックを取り出します。



増幅

1. 各検体およびNCにつきNeogen 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用* 試薬チューブ1本が必要です。

   1.1 チューブのストリップは、必要な数に合わせてカットできます。各Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用* 試薬チューブまたは8連チューブのストリップの数を選択してください。

   1.2 Neogen® 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用* 試薬チューブを空のラックに置きます。

   1.3 チューブの底の試薬ペレットを撹拌しないでください。
2. Neogen 試薬コントロールチューブを1本選択して、ラックに置きます。
3. 交差汚染を回避するため、Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用*の試薬チューブのキャップは一度に1ストリップずつ外し、分注ステップごとに新しいピペットチップを使用してください。
4. 下記のように、各溶解物を、Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用* 試薬チューブおよびNeogen 試薬コントロールチューブに滴下してください。

   Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用*の各試薬チューブに**最初に**各検体溶解物を滴下し、次にNCを滴下します。**最後に**Neogen 試薬コントロールチューブを水和します。
5. Neogen® 測定機器 病原菌自動検出システム用キャップ／デキャップツール ― 試薬を使用して、Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用* 試薬
   チューブのキャップを一度に1ストリップずつ外します。キャップを廃棄します。

   5.1 **検液20 µLをNeogen ライシスチューブの液体の上部1/2（沈澱物は避けてください）から取り、対応するNeogen 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用* 試薬チューブに分注します。ペレットが撹拌されないよう、一定の角度で分注します。ピペッティングを上下5回やさしく行って混合します。**

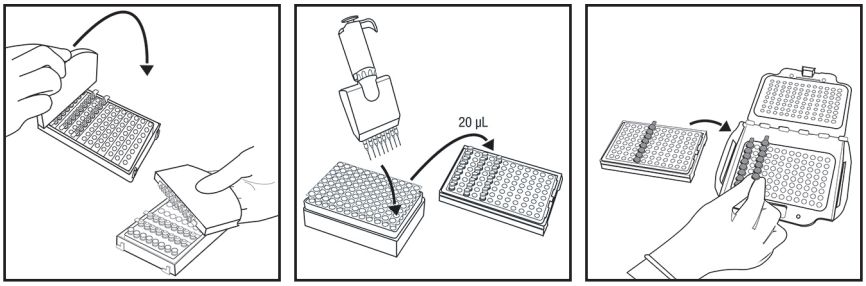
   5.2 各検体溶解物が、ストリップの対応するNeogen 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用* 試薬チューブに添加されるまでステップ5.1を繰り返します。

   5.3 付属の予備キャップを使用してNeogen 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用* 試薬チューブをカバーし、Neogen® 測定機器 病原菌自動検出システム用キャップ／デキャップツール ― 試薬の丸い方を使って、キャップがしっかりと嵌るよう前後に動かして圧力をかけます。

   5.4 検査する検体数に応じて、ステップ5.1～5.3を繰り返します。

   5.5 すべての検体ライシス液を滴下したら、ステップ5.1～5.3を繰り返してNCライシス液20 µLをNeogen 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用* 試薬チューブに滴下します。

   5.6 **Neogen 試薬コントロールチューブにNC溶解物20 µL**を滴下します。ペレットが撹拌されないよう、一定の角度で分注します。ピペッティングを上下5回やさしく行って混合します。
6. 清潔な、殺菌済みNeogen 測定機器 病原菌自動検出システム用スピードローダートレイにキャップをしたチューブを装填します。Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用スピードローダートレイを閉めて、留めがねをかけます。



7. Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用ソフトウェアで設定した検査内容を確認します。
8. ソフトウェアのスタートボタンをクリックして、使用する装置を選択します。選択された装置の蓋が自動的に開きます。
9. Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用装置内にNeogen 測定機器 病原菌自動検出システム用スピードローダートレイを置き、蓋を閉めてアッセイをスタートします。結果は60分ほどで判定されますが、陽性の場合はもっと早く検出されます。
10. アッセイ終了後、Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用スピードローダートレイをNeogen 測定機器 病原菌自動検出システム用から取り出し、チューブは1～5%（v/v in water）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。

注記： 交差汚染による偽陽性の危険を最小限に抑えるため、増幅DNAの入った試薬チューブは絶対に開けないでください。これには、Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用* 試薬、Neogen 試薬コントロール、Neogen マトリックスコントロールチューブが含まれます。密閉された試薬チューブは必ず、1～5%（v/v in water）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。

結果と解釈

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

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

確認

- NF Validationにより認証された方法に基づく結果の確認

NF VALIDATIONに照らして陽性と推定される増菌培地はすべて、前培養培地（BPW ISOまたはバンコマイシン10 mg/Lを添加したBPW ISO）を滴下することから始まる以下の参照法[2]に従って確認する必要があります。

- その他の確認方法

陽性と推定される増菌培地は、検査室の標準作業手順書、または適切な参照法[1,2]に従って確認する必要があります。まず、前培養培地（BPW ISOまたはバンコマイシン10 mg/Lを添加したBPW ISO）を選択増菌培地に移動し、次にプレート接種と適切な生化学的・血清学的手法を使用した釣菌を行って確認してください。

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。その結果が続け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[1,2]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。

結果が一致しない場合（Neogen 病原菌検出アッセイ2 - *クロノバクター属菌用*で陽性と推定されたものの、上記の検査方法では確認できなかった場合）は、検査室の標準作業手順書に従って得られた結果を報告してください。

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

付録A. プロトコルの中断：加熱処理済み溶解物の保管と再検査

1. 加熱処理済み溶解物を保管するには、ライシスチューブに清潔なキャップを嵌めます（「**ライシス**」セクション、4.5を参照）
2. 2～8°Cで最大72時間保管します。
3. 保管された検体を2～3回反転させて混合し、増幅用として準備します。
4. チューブのキャップを外します。
5. 混合したライシスチューブをNeogen 測定機器 病原菌自動検出システム用ヒートブロックインサートに置き、100±1°Cで5±1分間加熱します。

6. ヒートブロックからNeogen ライシスチューブラックを取り出し、Neogen 測定機器 病原菌自動検出システム用チルブロックインサート内で5分間以上（最大10分間）冷却します。
7. 上記の「**増幅**」セクションに詳述されているプロトコルを継続します。

参考文献：

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
8. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

上述の標準試験法については、現行の最新版を参照してください。

記号の説明

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

发布日期：2024-01

NEOGEN®

产品信息

分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*

产品说明及预期用途

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

Neogen 分子检测试剂盒采用环介导等温扩增技术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。实时报告假定阳性结果，阴性结果将在分析完成之后显示。应该使用您喜欢的方法或按照当地法规指定的方法确认假定阳性结果[1,2]。

Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*专供受过实验室技术培训的专业人员在实验室环境下使用。对于在食品或饮料以外的行业中使用此产品，Neogen 尚未有资料可证。例如，对于此产品用于检测制药、化妆品、临床或家畜样品，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 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*。

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

Neogen 已评估 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*可与缓冲蛋白胨水 (ISO) 增菌培养基一起使用。

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有机物。未在分析裂解步骤中经过适当热处理的样品可以被视为潜在的生物危害，不应将其插入 Neogen 分子检测仪器。

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

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

表 1. Neogen 分子检测试剂盒构成

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

阴性对照是无菌增菌培养基（如 BPW ISO），未在检测盒中提供。请勿将水用作阴性对照。

安全

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

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

注意： 表示潜在的危险情况，如果不注意避免，可能导致财产损失。

⚠ 警告

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

用户必须就当前适用的检测技术对其操作人员进行培训：例如，实验室良好操作规范[3]、ISO/IEC 17025[4] 或 ISO 7218[5]。

为了降低与假阴性结果关联的风险，避免释放出污染产品：

- 遵守操作流程并按照产品信息中提供的方法执行检测。
- 请按照包装和产品说明中的指示存储 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*。
- 始终在过期日期之前使用 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*。
- 将 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*用于经内部或第三方验证的食品和食品加工环境样品。
- 仅将 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*用于经内部或第三方验证的表面、消毒剂、方案和菌株。

- 对于含有芳基磺酸酯复合物的中和缓冲液的环境样品，请在检测前按 1:2 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 的中和缓冲培养液转移至 Neogen 裂解溶液管内。Neogen® 采样产品中包含芳基磺酸酯复合物的中和缓冲液：RS96010NB、RS9604NB、SSL10NB、SSL10NB2G、HS10NB、HS10NB2G 和 HS2410NB2G。该方案尚未在 NF Validation 研究中进行检测。

为了降低与化学品和生物危害暴露相关的风险，请注意以下事项：
- 在训练有素的工作人员的控制下，于妥善配备的实验室中执行致病菌检测。增菌培养基以及接触过增菌培养基的设备或表面可能含有致病菌，足以对人体健康造成风险。
- 始终遵守标准实验室安全规范，包括在处理试剂和受污染样品时穿戴适当的防护服和眼睛防护装置。
- 扩增后避免接触增菌培养基和试剂管的内容物。
- 根据当前的当地/地区/国家/行业标准处理增菌后的样品。.
- 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® 分子检测加热模块温度（如局浸温度计或热电偶数字温度计，而非全浸温度计）。温度计必须放置于 Neogen 分子检测加热模块中的指定位置。

为了在准备分析时降低与交叉污染相关联的风险，请注意以下事项：
- 始终戴手套（保护操作者和防止引入核酸酶）。

为了降低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® 分子检测加热模块温度（如局浸温度计或热电偶数字温度计，而非全浸温度计）。温度计必须放置于 Neogen 分子检测加热模块中的指定位置。

注意

为了在准备分析时降低与交叉污染相关联的风险，请注意以下事项：
- 在进行试剂小球水化之前更换手套。
- 建议使用无菌喷雾屏障（带滤芯）分子生物级移液器吸头。
- 每次转移样品时使用新的吸头。
- 采用实验室良好操作规范将样品从培养基转移至裂解管。为了避免吸头污染，用户可以选择增加一个中间转移步骤。例如，用户可以将每个经过增菌的样品转移至无菌管中。
- 在适用的地方使用配有杀菌灯的分子生物工作站。
- 使用 1-5%（与水的比例为 v:v）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（移液器、开盖器等）。

为了降低假阳性结果的相关风险，请注意以下事项：
- 扩增后切勿打开试管。
- 处理污染的试管时始终将其在浓度为 1-5%（与水的比例为 v:v）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管进行高压灭菌。
- 如果怀疑样品含有高浓度*阪崎肠杆菌*DNA（如来自无活性*阪崎肠杆菌*细胞的 DNA，这些细胞已经过灭活步骤），请在**裂解**步骤之前使用 DNase 处置假定阳性培养液。联络您的 Neogen 代表获取其他指示。该方案尚未在 NF Validation 研究中进行检测。

请参考安全数据表了解其它信息和当地处置法规。

如果您对于特定的应用或程序存有疑问，请访问我们的网站 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

用户负责熟悉本产品的说明和信息。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（包括均质及混合）、处理和实验室技术）都可能会影响结果。

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

用户也应自行负责确定任何检测方法和结果符合其客户和供应商的要求。

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

Neogen 已开发出 Neogen® 分子检测基质对照检测盒用于帮助客户评估各种基质方法。在需要时，使用基质对照 (MC) 来确定基质能否影响 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*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，检测若干典型基质样品，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，例如原材料和经过巴杀处理间的差异以及新鲜和干燥之间的差异。

保证限制/有限补救措施

除非各个产品包装的有限保证部分明确声明，NEOGEN 就所有明示或默示保证做出免责声明，包括但不限于适销性及适合某种特定用途的保证。如果证明任何 Neogen 食品安全产品存在缺陷，Neogen 或其授权经销商可以进行换货或者由其决定是否为该产品进行退款。这些都是专门针对您而设计的解决方案。如有任何疑问，请联系 Neogen 代表或 Neogen 授权经销商。

Neogen 责任限制

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

存储和弃置

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

请勿使用过期的 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*。过期日期和批号注明在包装箱外侧的标签上。使用之后，增菌培养基和 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*管可能会含有带菌材料。检测完成时，请遵照当前行业标准处置受污染废物。请参考安全数据表了解其它信息和当地处置法规。

使用说明

仔细遵循所有说明。否则，可能导致不准确的结果。

使用 1-5%（与水的比例为 v:v）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（移液器、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”文档中的规定接受 Neogen 分子检测系统操作员资格验证培训[6]。

请参看“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*℠ 2018.01 和 *Performance Tested*℠ 证书 #101703 实施的培养方案

表 4：遵照 NF VALIDATION 证书 3M 01/20-03/18 实施的培养方案

样品培养

表 2、表 3 或表 4 提供了针对食品和环境样品的一般培养方案指导。

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

食品、环境粉末、灰尘、碎屑及海绵

1. 将培养基平衡至环境温度 (20-25°C)，除非培养方案另有规定（请参阅表 2、表 3 和表 4）。
2. 在无菌环境下将培养基和样品混合起来，并且采用混合、均质操作 (stomaching)、涡旋或手动混合进行混匀操作 2 ± 0.2 分钟**，或者直至所有块状物彻底溶解及培养混悬液变均匀**[7, 8]**。**
   a. 样品制备（均质及混合）、处理和实验室技术等因素都可能会影响结果。
   b. 对于微粒样品，建议使用过滤袋。
   c. 对于在水中膨胀且高度黏性的基质（如谷物、淀粉），建议进一步稀释 (> 1:10)，直至黏性适当降低或者向 BPW (ISO)[8] 中添加无菌的 1% (w/v) 淀粉酶。
   d. 为了大样品量的谷物样品，将谷物粉慢慢加入液体中，频繁混合，避免结块。
3. 按照正确方案表的规定进行培养（请参阅表 2、表 3 和表 4）。

表 2. 通用培养方案

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

1. Neogen 已使用表 2 中的稀释率（最多 300 克）评估 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*。用户有责任验证备用稀释率或方案，以确保本方法符合用户的标准。
2. 如果培养肉汤量大于 300 mL（如样品大于 30g），使用**预热** BPW (ISO)。

验证方法具体说明

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

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

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

在 AOAC 研究机构OMA℠ 和 PTM℠ 研究中，Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*被发现是用于检测*阪崎肠杆菌的有效方法*。研究中检测的基质显示在表 3 中。

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

样品基质	样品大小	培养肉汤量[1]	培养温度 (± 1°C)	培养时间 (小时)	样品分析量
婴儿配方乳粉和婴儿谷粉	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
无益生菌婴儿谷粉	300 g	2700 mL BPW (ISO) (1:10)	预热 37	18-24	20 µL
婴儿配方乳粉及婴儿谷粉（含益生菌）	300 g	2700 mL BPW (ISO) + 10 mg/L 万古霉素	预热 37	22-24	20 µL
乳糖	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
含有 10 mL D/E 中和肉汤的环境海绵	1 套取样设备	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL

1. 如果培养肉汤量大于 300 mL，使用**预热** BPW (ISO)。

AFNOR Certification 认证的 NF VALIDATION

BY AFNOR CERTIFICATION NF VALIDATION EN ISO 16140

3M 01/20-03/18

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。

NF VALIDATION 认证方法遵循 ISO 16140-2[9]（与 ISO 22964 相比）。

验证范围：婴儿配方乳粉以及含/不含益生菌的婴儿谷物、原料及和环境样品。

样品制备：遵照 EN ISO 22694[2] 和 EN ISO 6887[7, 8] 来制备样品。

软件版本：参见证书。

表 4. 遵照 NF VALIDATION 认证方法 3M 01/20-03/18 实施的培养方案

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

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

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%（与水的比例为 v:v）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。

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：无需使用 Neogen 分子检测冷却模块托盘。在实验室环境温度下使用模块 (20-25°C)。

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。

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

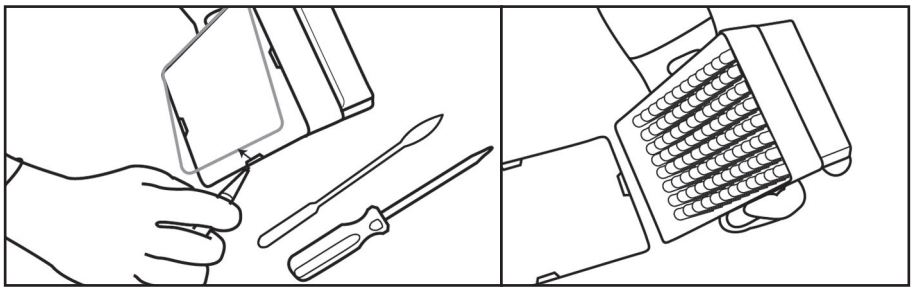
Neogen® 分子检测仪器的准备工作

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

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

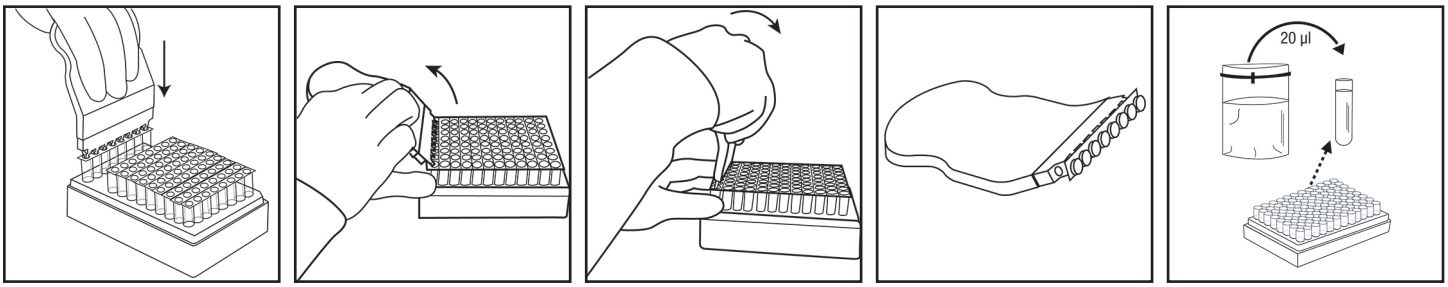
裂解

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



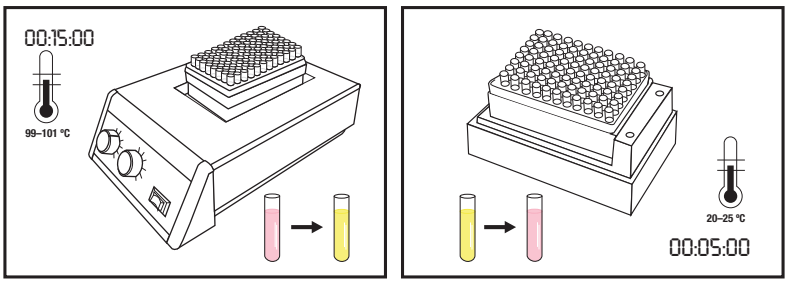
1. 将管架置于室温 (20-25°C) 一整夜（16-18 小时），让 Neogen 裂解溶液管预热。使 Neogen 裂解溶液管平衡到室温的另一种方法是将 Neogen 裂解溶液管放在实验室工作台上至少 2 小时、在 37 ±1°C 培养设备中培养 Neogen 裂解溶液管 1 小时或将其置于双干燥块加热器，在 100 ± 1°C 下持续 30 秒。
2. 倒置封闭后的裂解液管进行混合。在倒置后 4 小时内继续下一步。
3. 从培养箱中取出培养肉汤。
4. 每个样品和每个 NC 样品（无菌增菌培养基）需要一根 Neogen 裂解溶液管。
   - 4.1 可以将 Neogen 裂解溶液管条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

     首先将每个经过增菌的样品转移到单个 Neogen 裂解溶液管。**最后**转移 NC。
   - 4.4 使用 Neogen® 分子检测开盖器 - Lysis 打开 Neogen 裂解溶液管条的盖，一次只打开一条。
   - 4.5 弃置 Neogen 裂解溶液管盖 – 如果保留裂解液以重新检测，请将管盖放入清洁容器，以备裂解后重新使用。
     - 4.5.1. 如需处理保留的裂解液，请参阅附录 A。
   - 4.6 在处理黏性样品时，搅动增菌袋，然后从过滤一侧收集样品。
   - 4.7 将 20 µL 样品转移到 Neogen 裂解溶液管内，除非方案表中另有说明。
5. 重复步骤 4.4 到 4.7，直到将每个样品添加到条内对应的 Neogen 裂解溶液管为止。



6. 当转移完所有样品时，将 20 µL 的 NC（无菌增菌培养基，如 BPW）转移到一个 Neogen 裂解溶液管中。请勿将水用作 NC。
7. 检验 Neogen 分子检测加热模块的温度是否达到了 100 ± 1°C。
8. 将无盖 Neogen 裂解溶液管架放在 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（冷）变为黄色（热）。

   未在分析裂解步骤中经过适当热处理的样品可以被视为潜在的生物危害，不应将其插入 Neogen 分子检测仪器。
9. 从 Neogen 分子检测加热模块中取出无盖的 Neogen 裂解溶液管架，将其放进 Neogen 分子检测冷却架冷却最短 5 分钟，最长 10 分钟。Neogen 分子检测冷却架用于没有 Neogen® 分子检测冷却模块托盘的环境温度下，应直接置于实验室工作台之上。冷却后，Neogen 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。

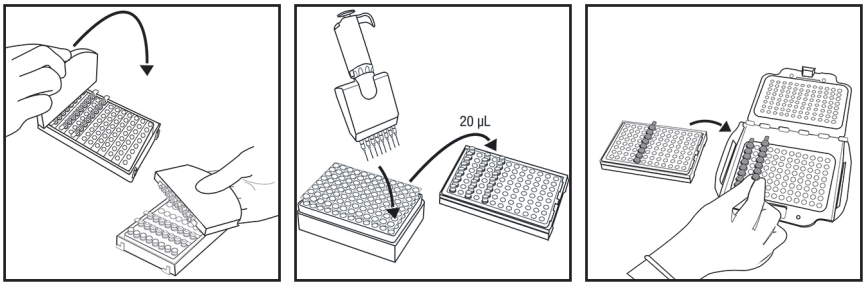


扩增

1. 每个样品和每个NC 需要一根 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*试剂管。
   1.1 可以将管条切割为需要的管数。选择需要的单个 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*试剂管或 8 管条的数量。
   1.2 将 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*试剂管放在空管架中。
   1.3 请勿将试剂小球搅离管底。
2. 选择 1 根 Neogen 试剂对照管并放入管架。
3. 为了避免交叉污染，请一次只开一根 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*试剂管条的盖，并且每次转移时使用新的移液器吸头。
4. 按如下所述将每个裂解液转移到 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*试剂管和 Neogen 试剂对照管：

先将每个样品裂解液转移到单个 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*试剂管，**然后**转移到 NC。水化，**最后**转移到 Neogen 试剂对照管。

5. 使用 Neogen® 分子检测开盖器 - Reagent 打开 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*试剂管的盖，一次只打开一条。丢弃盖子。
   5.1 **将 Neogen 裂解溶液管液体上部 1/2 中的 20 µL 样品溶菌液（避免沉淀）转移到对应的 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*试剂管。成角度注入，以避免搅动小球。轻轻地上下吸动 5 次，以充分混合。**
   5.2 重复步骤 5.1，直到将单个样品裂解液添加到条内对应的 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*试剂管为止。
   5.3 使用附加盖盖住 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*试剂管并使用 Neogen 分子检测开盖器 - Reagent 较圆的一侧以前后移动的方式加压，以确保将盖子盖紧。
   5.4 根据需要对要进行检测的样品，重复步骤 5.1 到 5.3。
   5.5 当转移完所有样品裂解液时，重复 5.1 到 5.3 以将 20 µL NC 溶菌液转移到 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*试剂管。
   5.6 将 **20 µL NC 裂解液转移至 Neogen 试剂对照管**。成角度注入，以避免搅动小球。轻轻地上下吸动 5 次，以充分混合。
6. 将加盖的管 装进干净和经过灭菌的 Neogen 分子检测快速转移托盘。关闭并锁定 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 分子检测仪器并关闭盖，以启动分析。结果将在 60 分钟之内提供，但阳性结果可以更快检测到。
10. 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，并通过将反应管浸入 1-5%（与水的比例为 v:v）家用漂白溶液 1 小时并远离分析准备区来处置反应管。

注意：为了将因为交叉污染而导致的假阳性结果风险降至最低，请勿打开包含扩增的 DNA 的反应管。这包括 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*试剂、Neogen 试剂对照和 Neogen 基质对照管。处理密封试剂管时始终将其在浓度为 1-5%（与水的比例为 v:v）的家用漂白溶液中浸泡 1 个小时，且始终远离分析准备区。

结果和说明

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

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

确认

- 依照 NF Validation 认证方法确认结果

在 NF VALIDATION 背景之下，所有假定阳性样品应当遵循参考方法进行确认[2]，开始从初步培养液转移（添加了 10 mg/L 万古霉素的 BPW ISO 或 BPW ISO）。

- 其他确认方案

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]，开始从初步培养液（添加了 10 mg/L 万古霉素的 BPW ISO 或 BPW ISO）转移至二次培养基，然后利用正确的生化、血清和/或分子方法对分离菌进行检测和确认。

在任何不正常光输出的极少情况下，该算法标签显示为“检查”。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确认检测[1,2]。

如果出现结果不一致（采用 Neogen 分子检测试剂盒 2 - *阪崎肠杆菌*的结果为假定阳性，未通过上述其中一种方法予以确认），实验室应当遵循既定标准操作程序来报告结果。

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

参考资料：

1. 美国食品药品监督管理局微生物分析手册 (BAM) Ch. 29；2012 年 3 月
2. ISO 22964:2017 食品供应链微生物 -- 检测*阪崎肠杆菌* 的水平方法。
3. 美国食品药品监督管理局。美国《联邦规章典集》(Code of Federal Regulations) 第 21 篇，第 58 部分。非临床实验室良好研究规范。
4. ISO/IEC 17025:2017。用于检验和定标实验室能力的一般要求。
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013。食品和动物饲料微生物 – 微生物检验用一般要求和指南。
6. 安装合格 (IQ)/操作合格 (OQ) Neogen® 分子检测系统。联络您的 Neogen 食品安全代表，获取本文档的副本。
7. ISO 6887-5:2010。食品和动物饲料微生物 – 用于微生物检验的检测样品、初始混合悬液和梯度稀释液的制备 -- 第 5 部分：牛奶和奶制品制备特定规则。
8. ISO 6887-4:2017。食品和动物饲料微生物 – 用于微生物检验的检测样品、初始混合悬液和梯度稀释液的制备 -- 第 4 部分：制备复杂产品的具体规则。
9. ISO 16140-2:2016。食品供应微生物 – 方法验证 – 第 2 部分：根据参考方法验证替代（专有）方法的方案。

请参考以上所列标准方法的现行版本。

符号说明

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

NEOGEN®

คำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์

ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*

รายละเอียดผลิตภัณฑ์และวัตถุประสงค์การใช้งาน

Neogen® ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์* จะนำมาใช้กับระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® สำหรับการตรวจหาเชื้อ*ครอโนแบคเตอร์*อย่างรวดเร็วและเฉพาะเจาะจงในตัวอย่างอาหารหลังเพิ่มจำนวนเชื้อและตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมจากกระบวนการแปรรูปอาหาร

ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ใช้การเพิ่มขยายยีนแบบลูป (Loop-mediated isothermal) ที่อุณหภูมิเดียวเพื่อเพิ่มขยายปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงและความไวสูงผสานกับการเรืองแสงทางชีวภาพเพื่อตรวจจับการเพิ่มขยายจำนวน ผลการทดสอบเบื้องต้นที่เป็นบวกจะได้รับการรายงานในทันที ขณะที่ผลการทดสอบที่เป็นลบจะแสดงผลภายหลังจากที่การทดสอบดังกล่าวเสร็จสมบูรณ์แล้ว ผลการทดสอบเบื้องต้นที่เป็นบวกควรได้รับการยืนยันโดยใช้วิธีการที่ท่านเห็นสมควรหรือตามที่ระบุไว้ในระเบียบข้อบังคับต่าง ๆ ในท้องถิ่น[1, 2]

ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen มีจุดมุ่งหมายให้ใช้ในสภาพแวดล้อมในห้องปฏิบัติการโดยผู้เชี่ยวชาญด้านวิชาชีพที่ผ่านการอบรมเทคนิคการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ Neogen ยังไม่ได้จัดทำเอกสารเกี่ยวกับการใช้ผลิตภัณฑ์นี้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ นอกจากอุตสาหกรรมอาหารหรือเครื่องดื่ม ตัวอย่างเช่น Neogen ยังไม่ได้ออกเอกสารเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์นี้สำหรับการทดสอบตัวอย่างยา ตัวอย่างเครื่องสำอาง ตัวอย่างทางคลินิก หรือตัวอย่างเกี่ยวกับสัตว์ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์* ยังไม่ได้รับการประเมินกับผลิตภัณฑ์อาหาร การแปรรูปอาหาร ระเบียบการทดสอบที่เป็นไปได้ทั้งหมดหรือกับสายพันธุ์แบคทีเรียที่เป็นไปได้ทั้งหมด

แหล่งที่มา สูตร และคุณภาพของอาหารสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อสามารถส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบที่ได้เช่นเดียวกับวิธีการทดสอบอื่น ๆ นอกจากนี้ ปัจจัยต่าง ๆ เช่น วิธีการสุ่มเก็บตัวอย่าง วิธีการทดสอบ การเตรียมตัวอย่าง การทำให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกันและการผสม รวมถึงการจัดการและเทคนิคที่ใช้ในห้องปฏิบัติการอาจส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบที่ได้ด้วยเช่นกัน Neogen ขอแนะนำให้ประเมินวิธีการทดสอบรวมทั้งอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อในสภาพแวดล้อมของผู้ใช้โดยใช้จำนวนตัวอย่างที่เพียงพอกับอาหารแต่ละชนิดและ/หรือตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและสภาวะที่มีความท้าทายกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีการดังกล่าวเป็นไปตามเกณฑ์ของผู้ใช้

Neogen ได้ประเมินชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen กับอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อชนิดบัฟเฟอร์เปปโตนวอร์เตอร์ (ISO)

เครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® มีจุดมุ่งหมายในการใช้กับตัวอย่างที่ได้ผ่านกระบวนการให้ความร้อนในระหว่างขั้นตอนการไลซีสของการทดสอบซึ่งได้รับการออกแบบมาเพื่อทำลายเชื้อที่มีในตัวอย่าง ตัวอย่างซึ่งไม่ได้รับความร้อนอย่างเหมาะสมในระหว่างขั้นตอนการไลซีสของชุดทดสอบอาจถือว่าเป็นสารที่อาจมีอันตรายทางชีวภาพ และไม่ควรใส่เข้าไปในเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

ชุดทดสอบอาหารปลอดภัย Neogen ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO (องค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน) 9001 ด้านการออกแบบและการผลิต

ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen มีทั้งหมด 96 ชุดทดสอบตามที่อธิบายไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

รายการ	ลักษณะ	จำนวน	สิ่งที่บรรจุภายใน	ความคิดเห็น
หลอดสารละลายไลซีส Neogen® (LS)	สารละลายสีชมพูในหลอดใส	96 หลอด (12 แถว แถวละ 8 หลอด)	ปริมาตร LS 580 ไมโครลิตรต่อหลอด	บรรจุอยู่ในที่วางและพร้อมใช้งาน
หลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen®	หลอดสีแดงส้ม	96 หลอด (12 แถว แถวละ 8 หลอด)	ส่วนผสมสำหรับการเพิ่มขยายและการตรวจหาเชื้อโรคแบบเฉพาะเจาะจงที่ทำแห้งเยือกแข็งแล้ว	พร้อมใช้งาน
ฝาสำรอง	ฝาสีแดงส้ม	96 หลอด (12 แถว แถวละ 8 ฝา)		พร้อมใช้งาน
Neogen® รีเอเจ้นท์คอนโทรล (RC)	หลอดใสชนิดเปิดฝาด้านบน	16 หลอด (2 ถุง ถุงละ 8 หลอด)	ส่วนผสมที่ทำแห้งเยือกแข็งแล้วสำหรับการเพิ่มและการตรวจหา DNA สำหรับใช้เป็นมาตรฐานเทียบ	พร้อมใช้งาน

ชุดควบคุมผลลบหรือ Negative Control (NC) เป็นอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อที่ปลอดเชื้อ เช่น BPW ISO ไม่ได้รวมอยู่ในชุดอุปกรณ์ ห้ามใช้น้ำเป็นตัวแทนในการทำการควบคุมผลลบ

ความปลอดภัย

ผู้ใช้ควรอ่าน ทำความเข้าใจและปฏิบัติตามข้อมูลความปลอดภัยทั้งหมดในคำแนะนำ การใช้งานระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen และ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์* เก็บคำแนะนำด้านความปลอดภัยนี้ไว้สำหรับใช้อ้างอิงในอนาคต

⚠คำเตือน: แสดงสถานการณ์ที่เป็นอันตราย ซึ่งหากไม่หลีกเลี่ยง อาจก่อให้เกิดการเสียชีวิตหรือการบาดเจ็บรุนแรงและ/หรือความเสียหายต่อทรัพย์สิน

ข้อสังเกต: ระบุสถานการณ์ที่อาจเป็นอันตราย หากไม่หลีกเลี่ยง อาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อทรัพย์สิน

⚠ คำเตือน

ห้ามใช้ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์* โดยวิธี Neogen ในการวินิจฉัยโรคในมนุษย์หรือสัตว์

ผู้ใช้ต้องผ่านการฝึกอบรมบุคลากรที่เกี่ยวกับเทคนิคการทดสอบที่ถูกต้องและเหมาะสมในปัจจุบัน: ตัวอย่างเช่น แนวปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการที่ดี[3], ISO/IEC 17025[4] หรือ ISO 7218[5]

เพื่อลดความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับผลลบปลอมซึ่งนำไปสู่การปล่อยผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนไปขาย ให้ปฏิบัติดังนี้:

- ปฏิบัติตามระเบียบการและดำเนินการทดสอบดังที่ระบุไว้อย่างชัดเจนในคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์
- เก็บรักษา Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์* ตามที่ระบุไว้บนบรรจุภัณฑ์และในคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์
- ใช้ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์* ก่อนวันหมดอายุเสมอ
- ใช้ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์* กับตัวอย่างอาหารและตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตอาหารซึ่งได้รับการพิสูจน์ยืนยันเป็นการภายในหรือโดยหน่วยงานภายนอกแล้ว
- ใช้ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์* เฉพาะกับพื้นผิว สารฆ่าเชื้อ วิธีการและสายพันธุ์แบคทีเรีย ซึ่งได้รับการพิสูจน์ยืนยันเป็นการภายในหรือโดยหน่วยงานภายนอกแล้วเท่านั้น
- สำหรับตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมที่มีนิวทรอไรซิ่งบัฟเฟอร์ โดยมีสารประกอบเชิงซ้อนของเอริลซัลโฟเนต (Aryl sulfonate complex) อยู่ด้วย ให้ทำการเจือจางด้วยอัตราส่วน 1:2 ก่อนที่จะทดสอบ (เติมตัวอย่าง 1 ส่วนลงในอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 ส่วน) อีกวิธีหนึ่ง คือถ่ายอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อที่มี นิวทรอไรซิ่งบัฟเฟอร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงในหลอดสารละลายไลซีส Neogen ผลิตภัณฑ์เก็บตัวอย่างของ Neogen® ซึ่งประกอบด้วย นิวทรอไรซิ่งบัฟเฟอร์โดยมีสารประระกอบเชิงซ้อนของเอริลซัลโฟเนตมีดังนี้: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G และ HS2410NB2G วิธีนี้ยังไม่ผ่านการทดสอบในช่วงที่ทำการศึกษา NF Validation

เพื่อลดความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการสัมผัสสารเคมีหรือสารอันตรายทางชีวภาพ ให้ปฏิบัติดังนี้:

- ให้ทำการทดสอบเชื้อก่อโรคในห้องปฏิบัติการที่มีอุปกรณ์อย่างเหมาะสมภายใต้การควบคุมของบุคลากรที่ได้รับการอบรม อาหารที่เพิ่มจำนวนเชื้อ หลังจากที่บ่มแล้ว หรือพื้นผิวที่มีการสัมผัสกับอาหาร หลังเพิ่มจำนวนเชื้อโดยบ่มแล้ว อาจจะมีเชื้อโรคในระดับเพียงพอที่จะก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์ได้
- ปฏิบัติตามแนวปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการมาตรฐานทุกครั้ง โดยรวมถึงการสวมเครื่องแต่งกายเพื่อป้องกันและอุปกรณ์ปกป้องดวงตาในขณะที่ปฏิบัติงานกับ รีเอเจนต์และตัวอย่างที่มีการปนเปื้อน
- หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับอาหารหลังบ่มเพิ่มจำนวนเชื้อและหลอดรีเอเจนต์ภายหลังการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ
- กำจัดตัวอย่างอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อและของเสียปนเปื้อนที่เกี่ยวข้อง ตามเกณฑ์มาตรฐานของท้องถิ่น/ภูมิภาค/ประเทศ/อุตสาหกรรมในปัจจุบัน
- ห้ามใช้อุณหภูมิสูงกว่าที่แนะนำไว้บนเครื่องทำความร้อน
- ห้ามใช้เวลาทำความร้อนเกินที่แนะนำ
- ใช้เทอร์โมมิเตอร์ที่ได้รับการสอบเทียบตามมาตรฐานและเหมาะสม เพื่อยืนยันอุณหภูมิของฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen (เช่น เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มบางส่วน หรือเทอร์โมมิเตอร์แบบดิจิตอล ที่ไม่ใช่เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มทั้งหมด) จะต้องวางเทอร์โมมิเตอร์ในบริเวณที่กำหนดไว้ของฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen

เพื่อลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนข้ามขณะเตรียมชุดทดสอบ ให้ปฏิบัติดังนี้:

- สวมถุงมือตลอดเวลา (เพื่อปกป้องผู้ใช้งานและป้องกันการเกิดนิวคลีเอส)

เพื่อเป็นการลดความเสี่ยงอันเกิดจากการสัมผัสโดนของเหลวร้อน ให้ปฏิบัติดังนี้:

- ห้ามใช้อุณหภูมิสูงกว่าที่แนะนำไว้บนเครื่องทำความร้อน
- ห้ามใช้เวลาทำความร้อนเกินที่แนะนำ

- ใช้เทอร์โมมิเตอร์ที่ได้รับการสอบเทียบตามมาตรฐานและเหมาะสม เพื่อยืนยันอุณหภูมิของฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen® (เช่น เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มบางส่วน หรือเทอร์โมมิเตอร์แบบดิจิตอล ที่ไม่ใช่เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มทั้งหมด) จะต้องวางเทอร์โมมิเตอร์ในบริเวณที่กำหนดไว้ของฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen

ข้อสังเกต

เพื่อลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนข้ามขณะเตรียมชุดทดสอบ ให้ปฏิบัติดังนี้:

- เปลี่ยนถุงมือก่อนขั้นตอนการผสมสารละลายกับเม็ดรีเอเจนต์
- แนะนำให้ใช้ปีเปตทิป ระดับชีววิทยาโมเลกุลชนิดที่มีตัวกั้นละอองอากาศ (กรอง) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- ใช้ปีเปตทิปอันใหม่สำหรับการถ่ายตัวอย่างในแต่ละครั้ง
- ใช้ Good Laboratory Practices (การดำเนินงานของห้องปฏิบัติการที่ดี) เพื่อถ่ายตัวอย่างจากอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อ หลังบ่มไปยังหลอดสายละลายไลซีส เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนในขั้นตอนไปเปตเตอร์ ผู้ใช้อาจเพิ่มขั้นตอนในการถ่ายตัวอย่างสารละลายตัวอย่างเช่น ผู้ใช้อาจถ่ายตัวอย่างอาหารที่เพิ่มจำนวนเชื้อแต่ละตัวอย่างใส่ในหลอดที่ฆ่าเชื้อแล้ว
- ทำการทดสอบงานทางชีววิทยาโมเลกุลในพื้นที่ที่มีหลอดไฟฆ่าเชื้อหากทำได้
- ลดการปนเปื้อนบนโต๊ะปฏิบัติงานและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ (ปีเปต เครื่องมือเปิด/ปิดฝา ฯลฯ) อย่างสม่ำเสมอด้วยน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (ผสมกับน้ำตามอัตราส่วน) หรือสารละลายกำจัดดีเอ็นเอ

เพื่อลดความเสี่ยงจากผลบวกที่เป็นเท็จ ให้ปฏิบัติดังนี้

- ห้ามเปิดหลอดทดลองภายหลังการเพิ่มขยายจำนวนเชื้อ
- กำจัดหลอดทดลองที่ปนเปื้อนแล้วเสมอ โดยแช่ในน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (ผสมกับน้ำตามอัตราส่วน) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และให้อยู่ห่างจากพื้นที่จัดเตรียมชุดทดสอบทุกครั้ง
- ห้ามนึ่งฆ่าเชื้อหลอด รีเอเจนต์ภายหลังการเพิ่มขยายจำนวน
- หากสงสัยว่าตัวอย่างมี DNA ของ*ครอโนแบคเตอร์* ในปริมาณมาก (เช่น DNA จากเซลล์*ครอโนแบคเตอร์*ที่ผ่านขั้นตอนการฆ่า / ทำลาย) ตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบเบื้องต้นเป็นบวก หลังจากขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเชื้อควรผ่านการทำปฏิกิริยากับ DNase ก่อนขั้นตอน**ไลซีส** ติดต่อตัวแทน Neogen ของท่านเพื่อขอคำแนะนำเพิ่มเติม วิธีนี้ยังไม่ผ่านการทดสอบในช่วงที่ทำการศึกษา NF Validation

ศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมในเอกสารข้อมูลความปลอดภัยและระเบียบข้อบังคับการกำจัดทิ้งในประเทศ

หากท่านมีข้อสงสัยเกี่ยวกับการใช้งานหรือกรรมวิธีที่เฉพาะเจาะจงใด ๆ โปรดเยี่ยมชมเว็บไซต์ของเราที่ www.neogen.com หรือติดต่อตัวแทนจำหน่ายหรือผู้จัดจำหน่ายของบริษัท Neogen ในท้องถิ่นของท่าน

ความรับผิดชอบของผู้ใช้

ผู้ใช้จะต้องทำความเข้าใจในคู่มือการใช้งานผลิตภัณฑ์และข้อมูลเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ หากต้องการข้อมูลเพิ่มเติม สามารถเยี่ยมชมเว็บไซต์ของเราได้ที่ **www.neogen.com** หรือติดต่อตัวแทนหรือผู้จัดจำหน่าย Neogen ในท้องถิ่นของท่าน

เมื่อจะเลือกวิธีทดสอบ สำคัญอย่างยิ่งที่จะต้องรู้จักปัจจัยภายนอกต่าง ๆ เช่น วิธีการสุ่มตัวอย่าง เกณฑ์วิธีในการทดสอบ การเตรียมตัวอย่างรวมถึงการทำให้เป็นเนื้อเดียวกันและการผสม การจัดการ และเทคนิคที่ใช้ในห้องปฏิบัติการอาจส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบได้

ผู้ใช้มีหน้าที่ในการเลือกวิธีการทดสอบ ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ รวมถึงจำนวนตัวอย่างที่เพียงพอเพื่อใช้ในการประเมินและตรวจสอบจุลินทรีย์ในสภาวะต่าง ๆ และในเมทริกซ์ที่เหมาะสม เพื่อให้ผู้ใช้มั่นใจได้ว่าวิธีการทดสอบที่เลือกนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ของผู้ใช้

นอกจากนี้ ผู้ใช้จะต้องรับผิดชอบในการเลือกวิธีการทดสอบและผลลัพธ์ที่ได้ว่าเป็นไปตามข้อกำหนดของลูกค้าและของผู้จัดส่งสินค้า

เช่นเดียวกับวิธีการทดสอบอื่น ๆ ผลลัพธ์ที่ได้จากการใช้ผลิตภัณฑ์ของ Neogen Food Safety ใด ๆ ก็ตาม ไม่ได้รับประกันถึงคุณภาพของเมทริกซ์หรือขั้นตอนที่ใช้ทดสอบ

Neogen ได้พัฒนาชุดน้ำยาควบคุมเพื่อทดสอบผลของส่วนประกอบในตัวอย่างแต่ละประเภท โดยวิธี Neogen® เพื่อช่วยให้ลูกค้าประเมินวิธีการสำหรับเมทริกซ์ต่าง ๆ ได้ ในกรณีจำเป็น ให้ใช้ชุดน้ำยาควบคุมเพื่อทดสอบผลของส่วนประกอบในตัวอย่างแต่ละประเภท (MC) เพื่อทดสอบว่าเมทริกซ์นั้นสามารถส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen หรือไม่ ทดสอบตัวอย่างหลาย ๆ ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของเมทริกซ์นั้น ๆ เช่น ตัวอย่างที่ได้จากแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกัน ตัวอย่างที่ได้ในระหว่างการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบต่าง ๆ เมื่อนำวิธีการของ Neogen มาใช้ หรือเมื่อทำการทดสอบเมทริกซ์ใหม่หรือที่ไม่รู้จัก หรือเมทริกซ์ที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบหรือการแปรรูป

เมทริกซ์อาจอธิบายได้ว่าเป็นชนิดของผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติตามธรรมชาติ เช่น องค์ประกอบและกระบวนการแปรรูป ความแตกต่างระหว่างเมทริกซ์ต่าง ๆ อาจจะเป็นเพียงผลที่เกิดจากความแตกต่างในกระบวนการแปรรูปหรือสภาพลักษณะของเมทริกซ์ เช่น ดิบกับผ่านการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอไรซ์ สดกับแห้ง ฯลฯ

เงื่อนไขการรับประกัน

เว้นแต่จะระบุอย่างชัดแจ้งในข้อจำกัดการรับผิดเกี่ยวกับบรรจุภัณฑ์ของสินค้าแต่ละประเภท นีโอเจนขอสงวนสิทธิ์ในการรับประกันใดๆ ไม่ว่าโดยชัดแจ้งหรือโดยปริยาย ซึ่งรวมถึงแต่ไม่จำกัดเพียง การรับประกันใดๆ ในความสามารถในการค้าขายได้ (Merchantability) หรือ การใช้สอยสินค้าให้สมประโยชน์ตามความมุ่งหมายเฉพาะ (Fitness) หากสินค้าใดๆ ของนีโอเจน มีข้อบกพร่องในความปลอดภัยเกี่ยวกับอาหาร นีโอเจนหรือตัวแทนจัดจำหน่ายที่ได้รับอนุญาตจากนีโอเจนจะเลือกว่าจะเปลี่ยนสินค้าทดแทนหรือคืนเงินค่าสินค้า ซึ่งเป็นการเยียวยาเฉพาะตัวแก่ลูกค้าหากมีคำถามเพิ่มเติม กรุณาติดต่อตัวแทนของนีโอเจนหรือตัวแทนจัดจำหน่ายที่ได้รับอนุญาตจากนีโอเจน

ขอบเขตความรับผิดชอบของ Neogen

NEOGEN จะไม่รับผิดชอบต่อการสูญเสียหรือความเสียหายใด ๆ ทั้งโดยตรง โดยอ้อม ความเสียหายจำเพาะที่เกิดขึ้นเนื่องจากการผิดสัญญา หรือที่เป็นผลสืบเนื่อง รวมถึงแต่ไม่จำกัดเพียงการสูญเสียผลกำไร ความรับผิดชอบของทาง Neogen ในทางกฎหมายจะต้องไม่เกินราคาของผลิตภัณฑ์ที่เสียหายหรือบกพร่องไม่ว่ากรณีใด ๆ ก็ตาม

การเก็บรักษาและการกำจัด

เก็บ Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*ที่อุณหภูมิ 2-8°C ห้ามแช่แข็ง เก็บชุดอุปกรณ์ให้พ้นแสงในระหว่างการเก็บรักษา หลังจากเปิดชุดอุปกรณ์แล้ว ให้ตรวจสอบว่าถุงฟอยล์ไม่ชำรุดเสียหาย หากถุงฟอยล์ชำรุดเสียหาย ห้ามใช้ผลิตภัณฑ์นั้น หลังจากเปิดแล้ว ควรเก็บรักษาหลอดรีเอเจนต์ที่ยังไม่ได้ใช้ไว้ในถุงที่ซีลปิดซ้ำได้โดยมีสารดูดความชื้นใส่อยู่ภายในเพื่อรักษาความคงตัวของรีเอรีเอเจนต์ที่ทำแห้งเยือกแข็งแล้ว เก็บรักษาถุงที่ซีลปิดซ้ำแล้วไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C เป็นเวลาไม่เกิน 60 วัน

ห้ามใช้ชุดทดสอบเชื้อ*ครอโนแบคเตอร์*ระดับโมเลกุล 2 โดยวิธี Neogen ที่พ้นกำหนดวันหมดอายุแล้ว วันหมดอายุและหมายเลขล็อตจะแสดงไว้บนฉลากด้านนอกของกล่อง หลังใช้งาน อาหารเพิ่มจำนวนเชื้อและหลอด Neogen ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*อาจมีสารก่อให้เกิดโรคอยู่ เมื่อการทดสอบเสร็จสมบูรณ์แล้ว ให้ปฏิบัติตามมาตรฐานอุตสาหกรรมในปัจจุบันสำหรับการกำจัดและทิ้งขยะปนเปื้อน ศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมในเอกสารข้อมูลความปลอดภัยและระเบียบข้อบังคับการกำจัดทิ้งในประเทศ

คำแนะนำสำหรับการใช้งาน

ปฏิบัติตามคำแนะนำทั้งหมดอย่างละเอียดรอบคอบ หากไม่ปฏิบัติเช่นนั้น อาจให้ผลที่ไม่ถูกต้องแม่นยำได้

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

ผู้ใช้ควรผ่านการฝึกอบรมเกี่ยวกับคุณสมบัติสำหรับผู้ปฏิบัติงานระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ตามที่ระบุในเอกสาร "แนวทางและระเบียบการด้านคุณสมบัติการติดตั้ง (IQ) / คุณสมบัติการปฏิบัติการ (OQ) สำหรับระบบการทดสอบเชื้อในระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen"[6]

ดูในส่วน “คำแนะนำเฉพาะสำหรับวิธีการที่ได้รับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี” สำหรับข้อกำหนดเฉพาะ:

ตารางที่ 3 สำหรับเกณฑ์วิธีการเพิ่มจำนวนเชื้อตาม AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2018.01 และ *Performance Tested*℠ Certificate หมายเลข 101703

ตารางที่ 4 สำหรับเกณฑ์วิธีการเพิ่มจำนวนเชื้อตามใบรับรองของ NF VALIDATION 3M 01/20-03/18

การเพิ่มจำนวนเชื้อในตัวอย่าง

ตารางที่ 2, 3 หรือ 4 แสดงคำแนะนำสำหรับเกณฑ์วิธีการเพิ่มจำนวนเชื้อทั่วไปสำหรับอาหาร และตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม

ผู้ใช้มีหน้าที่รับผิดชอบในการพิสูจน์ยืนยันระเบียบการสุ่มตัวอย่างหรืออัตราส่วนการเจือจางแบบอื่นเพื่อให้ความเชื่อมั่นว่าวิธีการทดสอบนี้สอดคล้องกับเกณฑ์ของผู้ใช้งานเอง

อาหาร ฝุ่นผงจากสิ่งแวดล้อม ฝุ่นละออง เศษจากการปัดกวาดและดูดซับด้วยฟองน้ำ

1. ปรับอุณหภูมิของอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง (20-25°C) เว้นแต่ได้ระบุไว้ในเกณฑ์วิธีการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ดูตารางที่ 2, 3 หรือ 4)
2. การผสมแบบปลอดเชื้อระหว่างอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อกับตัวอย่าง และทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยผ่านการปั่นผสม การบด การผสมแบบหมุนวนหรือการผสมด้วยมือเป็นเวลา 2 ± 0.2 นาที **หรือ จนกระทั่งส่วนที่จับตัวเป็นก้อนทั้งหมดละลายจนหมดเป็นสารแขวนลอยในอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อและผสมเป็นเนื้อเดียวกัน**[7, 8]
    ก. ปัจจัยต่าง ๆ เช่น การเตรียมตัวอย่าง รวมถึงการทำให้เป็นเนื้อเดียวกันและการผสม การจัดการและเทคนิคที่ใช้ในห้องปฏิบัติการอาจส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบ
    ข. สำหรับตัวอย่างที่ลักษณะเป็นละอองอนุภาคขนาดเล็ก แนะนำให้ใช้ถุงกรอง

ค. สำหรับเมทริกซ์ซึ่งพองตัวในน้ำและมีความหนืดสูง (เช่น ธัญพืช แป้ง) แนะนำให้ทำการเจือจางเพิ่มขึ้น (> 1:10) จนกระทั่งความหนืดลดลงจนเหมาะสมหรือเติม 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) อัลฟา-อะไมเลสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงใน BPW (ISO)[8]

ง. สำหรับตัวอย่างผงธัญพืช ให้เติมผงธัญพืชลงในของเหลวนั้นอย่างช้า ๆ โดยใช้วิธีการผสมอย่างต่อเนื่อง เพื่อไม่ให้จับตัวเป็นก้อน

3. บ่มตามที่กำหนดไว้ในตารางเกณฑ์วิธีที่เหมาะสม (ดูตารางที่ 2, 3 หรือ 4)

ตารางที่ 2 ระเบียบการของอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อทั่วไป

เมทริกซ์ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่าง[1]	ปริมาตรอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ[1, 2]	อุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (± 1°C)	เวลาการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)	ปริมาตรสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่าง
นมผงดัดแปลงสำหรับทารก (PIF) และวัตถุดิบ เช่น นมผงแห้ง ผงถั่วเหลือง เวย์ผง น้ำตาลแลคโตส แป้งข้าวเจ้าและมอลโทเดกซ์ทริน	ตัวอย่าง 1X กรัม	BPW (ISO) (1:10) 9X มล.	37	18-24	20 ไมโครลิตร
วัตถุดิบต่าง ๆ เช่น เกลือ แร่ธาตุ กรดอะมิโน DHA (กรดโดโคซะเฮกซะอีโนอิก) และวิตามิน	1X กรัม ตัวอย่าง	BPW (ISO) (1:100) 99X มล.	37	18-24	20 ไมโครลิตร
ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมที่แห้ง เช่น ฝุ่น มูลฝอยจากการปัดกวาด ฝุ่นละอองจากการดูดเก็บตัวอย่าง	ตัวอย่าง 1X กรัม	BPW (ISO) (1:10) 9X มล.	37	18-24	20 ไมโครลิตร
ฟองน้ำเก็บตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ เลทีน บรอธ หรืออาหารเลี้ยงเชื้อ ดี/อี นิวทรอไลซิ่ง บรอธ 10 มล.	อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง 1 ชิ้น	BPW (ISO) (1:10) 90 มล.	37	18-24	20 ไมโครลิตร

1. Neogen ได้ประเมินชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์* โดยใช้การเจือจางในระดับสูงสุด 300 ก.ตามตาราง 2 ผู้ใช้มีหน้าที่รับผิดชอบในการพิสูจน์ยืนยันอัตราส่วนการเจือจางหรือระเบียบวิธีการแบบอื่นเพื่อให้มั่นใจว่าวิธีการทดสอบนี้สอดคล้องกับเกณฑ์ของผู้ใช้
2. ใช้ BPW (ISO) **ที่ผ่านการอุ่นไว้ล่วงหน้า** ในกรณีที่อาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อมีปริมาตร > 300 มล. (เช่น ตัวอย่าง > 30 กรัม)

คำแนะนำเฉพาะสำหรับวิธีการทดสอบที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

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

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

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

จากการศึกษา OMA℠ และ PTM℠ ของสถาบันวิจัย AOAC ชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์* โดยวิธี Neogen พบว่าเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ*ครอโนแบคเตอร์* เมทริกซ์ที่ได้รับการทดสอบในการศึกษาดังกล่าวแสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เกณฑ์วิธีการเพิ่มจำนวนเชื้อตาม AOAC® *OMA*[SM] 2018.01 และ *PTM*[SM] 101703

เมทริกซ์ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ[1]	อุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (± 1°C)	เวลาการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)	ปริมาตรสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่าง
นมผงดัดแปลงสำหรับทารกและธัญพืชผงสำหรับทารก	10 ก.	BPW (ISO) (1:10) 90 มล.	37	18-24	20 ไมโครลิตร
ธัญพืชผงสำหรับทารกชนิดปราศจากโปรไบโอติก	300 ก.	BPW (ISO) (1:10) 2,700 มล.	ผ่านการอุ่นไว้ล่วงหน้าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	18-24	20 ไมโครลิตร
นมผงดัดแปลงสำหรับทารกและธัญพืชผงสำหรับทารกชนิดที่มีโปรไบโอติก	300 ก.	BPW (ISO) 2,700 มล. + 10 มก./ล. แวนโคมัยซิน	ผ่านการอุ่นไว้ล่วงหน้าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	22-24	20 ไมโครลิตร
แลคโตส	10 ก.	BPW (ISO) (1:10) 90 มล.	37	18-24	20 ไมโครลิตร
ฟองน้ำเก็บตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ ดี/อี นิวทรอไลซิ่ง บรอธ 10 มล.	อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง 1 ชิ้น	BPW (ISO) (1:10) 90 มล.	37	18-24	20 ไมโครลิตร

1. ใช้ BPW (ISO) **ที่ผ่านการอุ่นไว้ล่วงหน้า** ในกรณีที่อาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อมีปริมาตร > 300 มล.

NF VALIDATION โดย AFNOR Certification

3M 01/20-03/18
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
http://nf-validation.afnor.org/en

หากต้องการข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับการสิ้นสุดการบังคับใช้ของผลจากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ โปรดอ่านเอกสารรับรองของ NF VALIDATION ที่พร้อมให้ใช้งานได้ตามเว็บไซต์ที่ระบุไว้ข้างต้น

วิธีการที่ได้รับการรับรองมาตรฐานของ NF VALIDATION ตามมาตรฐาน ISO 16140-2[9] เมื่อเปรียบเทียบกับ ISO 22964

ขอบเขตของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ มีดังต่อไปนี้: นมผงดัดแปลงสำหรับทารกและธัญพืชผงสำหรับทารกชนิดที่มีโปรไบโอติกและปราศจากโปรไบโอติก วัตถุดิบและตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม

การเตรียมตัวอย่าง: เตรียมตัวอย่างตาม EN ISO 22694[2] และ EN ISO 6887[7, 8]

เวอร์ชั่นซอฟต์แวร์: ดูใบรับรอง

ตารางที่ 4 เกณฑ์วิธีการเพิ่มจำนวนเชื้อตามวิธีการที่ได้รับการรับรองของ NF VALIDATION 3M 01/20-03/18

เมทริกซ์ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ[1]	อุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (± 1°C)	ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเชื้อ (ชั่วโมง)	ปริมาตรสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่าง	จุดที่หยุดการทดสอบชั่วคราวตามที่แนะนำ[2, 3]
• นมผงดัดแปลงสำหรับทารก • ธัญพืชผงสำหรับทารก • ส่วนผสมต่าง ๆ เช่น นมผงแห้ง ผงถั่วเหลือง เวย์ผง น้ำตาลแลคโตส แป้งข้าวเจ้า และมอลโทเดกซ์ทริน • ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมที่แห้ง เช่น ฝุ่น มูลฝอยจากการปัดกวาด ฝุ่นละอองจากการดูดเก็บตัวอย่าง	10 ก.	BPW (ISO) (1:10) 90 มล.	37	18-24	20 ไมโครลิตร	อาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ หรือไลเซตตัวอย่างสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C ได้นานที่สุดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง
• ฟองน้ำ น้ำชะล้าง วัสดุสำหรับเช็ดทำความสะอาด	อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง 1 ชิ้น หรือ 10 มล.					อาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ หรือไลเซตตัวอย่างสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C ได้นานที่สุดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง
นมผงดัดแปลงสำหรับทารกและธัญพืชผงสำหรับทารก (ชนิดปราศจากโปรไบโอติก)	30-300 ก.	BPW ISO (1:10)	37	18-24	20 ไมโครลิตร	อาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อ หรือไลเซตตัวอย่างสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C ได้นานที่สุดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง
นมผงดัดแปลงสำหรับทารกและธัญพืชผงสำหรับทารก (ชนิดมีโปรไบโอติก)	30-300 ก.	BPW (ISO) + 10 มก./ล. แวนโคมัยซิน (1:10)	37	22-24	20 ไมโครลิตร	ไม่มี

1. ใช้ BPW (ISO) ที่ผ่านการอุ่นไว้ล่วงหน้า ในกรณีที่อาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อมีปริมาตร > 300 มล. (เช่น ตัวอย่าง > 30 กรัม)
2. หลังจากนำอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อออกจากที่เก็บ ให้ทำการทดสอบจากขั้นที่ 1 ในหัวข้อ ไลซีส หลังจากนำไลเซตตัวอย่างออกจากที่เก็บ ให้ทำการทดสอบจากขั้นที่ 7 ในหัวข้อ ไลซีส
3. โปรดดูภาคผนวก A หากต้องการทดสอบซ้ำไลเซตที่เก็บไว้และผ่านความร้อนมาแล้ว

การเตรียมถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen®

1. จุ่มผ้าหรือกระดาษเช็ดมือแบบใช้แล้วทิ้งลงในน้ำยาฟอกขาว 1-5% (ผสมกับน้ำตามอัตราส่วน) และเช็ดถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen
2. ใช้น้ำล้างถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen นี้
3. ใช้กระดาษเช็ดมือแบบใช้แล้วทิ้งเช็ดถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ให้แห้ง
4. ตรวจสอบให้แน่ใจว่าถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen แห้งสนิทก่อนใช้งาน

การเตรียมซิลบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen®

วางซิลบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen บนโต๊ะปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการโดยตรง: ไม่ใช้ถาดวางซิลบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen ใช้ซิลบล็อคที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (20-25°C)

การเตรียมฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen®

วางฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen ในเครื่องทำความร้อนบล็อกคู่แบบแห้ง เปิดเครื่องทำความร้อนบล็อคแบบแห้งและตั้งอุณหภูมิเพื่อให้ฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen มีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึง 100 ±1°C

หมายเหตุ: ให้ฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen มีอุณหภูมิตามที่กำหนดโดยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการทำงานของเครื่องทำความร้อน ใช้เทอร์โมมิเตอร์ที่ได้รับการสอบเทียบมาตรฐานและเหมาะสม (เช่น เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มบางส่วน เทอร์โมมิเตอร์แบบดิจิตอล ที่ไม่ใช่เทอร์โมมิเตอร์แบบจุ่มทั้งหมด) วางไว้ในบริเวณที่กำหนด ตรวจสอบให้อุณหภูมิของฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen อยู่ที่ 100 ±1°C

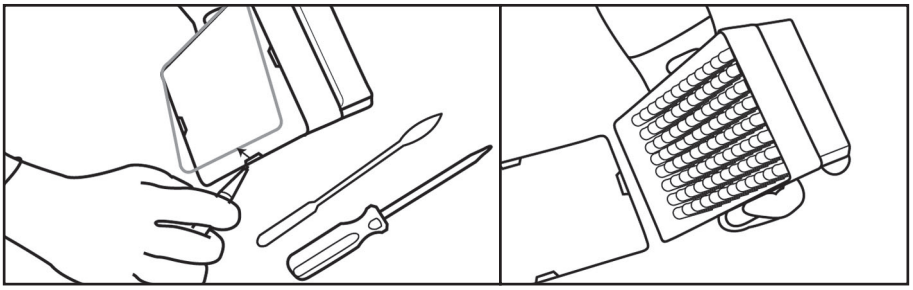
การเตรียมเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen®

1. เปิดใช้ซอฟต์แวร์ทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen® แล้วเข้าสู่ระบบ ติดต่อตัวแทนแผนก Neogen Food Safety ของคุณ เพื่อให้แน่ใจว่าคุณมีซอฟต์แวร์เวอร์ชันที่อัปเดตล่าสุด
2. เปิดเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen
3. สร้างหรือแก้ไขชุดการทำงานที่มีข้อมูลสำหรับแต่ละตัวอย่าง ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในคู่มือการใช้งานระบบทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen

หมายเหตุ: ต้องรอให้เครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen มีสถานะพร้อมใช้ ก่อนที่จะใส่ถาด ใส่หลอดทดสอบเข้าเครื่องทดสอบเชื้อระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ขั้นตอนของการทำความร้อนนี้ใช้เวลาประมาณ 20 นาทีและบ่งชี้ด้วยไฟสีส้มบนแถบบอกสถานะของเครื่อง เมื่อเครื่องมือพร้อมที่จะเริ่มต้นการทำงาน แถบบอกสถานะดังกล่าวจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว

การไลซีส

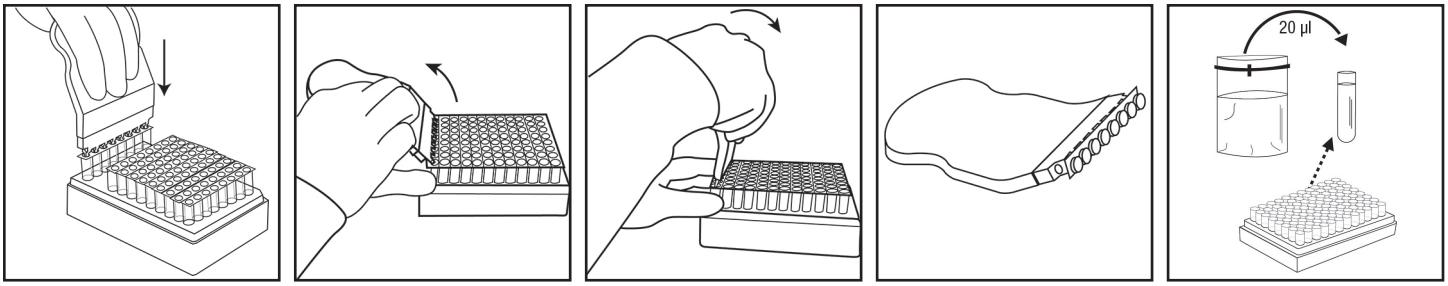
ใช้ไขควงไขด้านล่าง ของที่วางสารละลายไลซิส Neogen ออก ก่อนวางลงบนฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen



1. รอให้หลอดสารละลายไลซีส Neogen อุ่นขึ้นโดยนำออกมาวางที่อุณหภูมิห้อง (20-25 °C) ข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) อีกวิธีหนึ่งในการปรับอุณหภูมิของหลอดสารละลายไลซีส Neogen ให้เท่ากับอุณหภูมิห้อง คือ วางหลอดไลซีส Neogen ไว้บนโต๊ะในห้องปฏิบัติการอย่างน้อย 2 ชั่วโมง หรือนำหลอดสารละลายไลซีส Neogen ไปบ่มในที่ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ±1°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือวางหลอดสารละลายไลซีสบนเครื่องทำความร้อนแบบแห้งเป็นเวลา 30 วินาทีที่อุณหภูมิ 100 ± 1°C
2. พลิกหลอดสารละลายไลซีสที่ปิดฝาอยู่ เพื่อผสมให้เข้ากัน ดำเนินการต่อในขั้นถัดไปไปภายใน 4 ชั่วโมง หลังจากพลิกหลอดแล้ว
3. นำอาหารเหลวเพิ่มจำนวนเชื้อออกจากตู้บ่มเชื้อ
4. ตัวอย่างแต่ละชนิดและตัวอย่าง NC (อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อ) จะต้องใช้หลอดสารละลายไลซีส Neogen หนึ่งหลอดต่อหนึ่งตัวอย่าง
   - 4.1 แถวของหลอดสารละลายไลซีส Neogen สามารถตัดออกเพื่อให้มีจำนวนตามที่ต้องการได้ เลือกจำนวนหลอดสารละลายไลซีส Neogen แต่ละหลอดหรือแถวที่มี 8 หลอด ตามความจำเป็น วางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ลงในชั้นวางที่ว่างอยู่
   - 4.2 เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนข้าม ให้เปิดฝาของหลอดสารละลายไลซีส Neogen ทั้งแถวในครั้งเดียว และใช้ปีเปตทิป อันใหม่สำหรับถ่ายตัวอย่างในแต่ละขั้นตอน
   - 4.3 ถ่ายตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนเชื้อแล้วไปยังหลอดสารละลายไลซีส Neogen ตามคำอธิบายด้านล่างนี้:

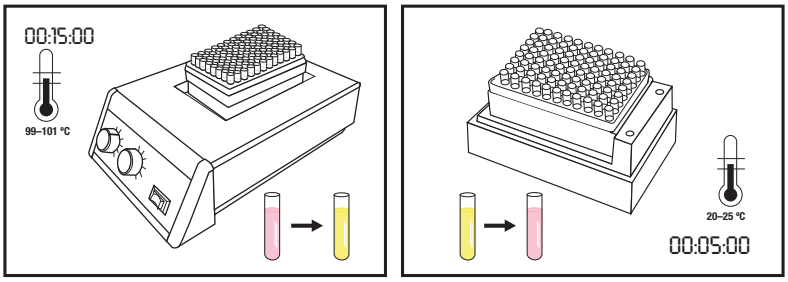
     ถ่ายตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนเชื้อแต่ละตัวอย่างลงไปในหลอดสารละลายไลซีส Neogen แต่ละหลอด **เป็นอันดับแรก** ถ่าย NC เป็น**อันดับสุดท้าย**

   - 4.4 ใชเครื่องมือ์เปิด/ปิดฝาหลอดสารละลายไลซีสโดยวิธี Neogen® ในการเปิดฝาหลอดสารละลายไลซีส Neogen ทีละแถว
   - 4.5 ทิ้งฝาหลอดสารละลายไลซีส Neogen – หากจะเก็บไลเซตเอาไว้เพื่อทดสอบซ้ำ ให้วางฝาในภาชนะที่สะอาดเพื่อนำกลับมาใช้ซ้ำ
     - 4.5.1. หากต้องการดูข้อมูลเกี่ยวกับการดำเนินการเก็บไลเซต โปรดดูภาคผนวก A
   - 4.6 เขย่าถุงตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนเชื้อ ก่อนทำการดึงตัวอย่างจากด้านที่มีการกรอง สำหรับตัวอย่างที่มีความหนืด
   - 4.7 ถ่ายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรลงในหลอดสารละลายไลซีส Neogen ยกเว้นว่าจะระบุไว้เป็นปริมาณอื่นตามตารางเกณฑ์วิธี
5. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 4.4 ถึง 4.7 จนกว่าจะเติมตัวอย่างแต่ละตัวอย่างลงในหลอดสารละลายไลซีส Neogen ในแถวดังกล่าวเสร็จสิ้น



6. เมื่อถ่ายตัวอย่างทั้งหมดเสร็จแล้ว ให้ถ่าย NC (อาหารเพิ่มจำนวนเชื้อ ที่ปลอดเชื้อ เช่น BPW) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดสารละลายไลซีส Neogen ห้ามใช้น้ำเป็น NC
7. ตรวจสอบว่าอุณหภูมิของฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen อยู่ที่ 100 ±1°C
8. วางถาดใส่หลอดสารละลายไลซีส Neogen ที่ไม่มีฝาปิด ลงในฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen และทำความร้อนเป็นเวลา 15 ± 1 นาที ระหว่างการอุ่นร้อน สารละลายในหลอดทดสอบไลซีส Neogen จะเปลี่ยนจากสีชมพู (เย็น) เป็นเหลือง (ร้อน)

   ตัวอย่างซึ่งไม่ได้รับความร้อนอย่างเหมาะสมในระหว่างขั้นตอนการไลซีสของชุดทดสอบอาจถือว่าเป็นสารที่อาจมีอันตรายทางชีวภาพ และไม่ควรใส่เข้าไปในเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen
9. นำถาดวางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ที่ไม่มีฝาปิด ออกจากฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen และปล่อยให้เย็นลงในชิลบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen อย่างน้อย 5 นาที แต่ไม่เกิน 10 นาที ควรวางชิลบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen ที่จะใช้งานที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่มีถาดรองชิลบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen ควรวางลงบนโต๊ะในห้องปฏิบัติการโดยตรง เมื่อเย็นลงแล้ว สารละลายไลซีส Neogen ก็จะเปลี่ยนกลับเป็นสีชมพู
10. นำเอาถาดวางหลอดสารละลายไลซีส Neogen ออกจาก ชิลบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen



การเพิ่มขยาย

1. ต้องมีหลอด รีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen หนึ่งหลอดสำหรับตัวอย่างแต่ละตัวอย่างและ NC

   1.1 สามารถตัดแถวของหลอดออก เพื่อให้มีจำนวนหลอดตามที่ต้องการได้ เลือกจำนวนหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen แต่ละหลอด หรือแถวที่มี 8 หลอด ตามที่ต้องการ

   1.2 วางหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen ลงในถาดวางที่ยังว่างอยู่

   1.3 หลีกเลี่ยงการรบกวนเม็ด รีเอเจนต์ที่ก้นหลอด
2. เลือกหลอด Neogen รีเอเจ้นท์คอนโทรลหนึ่งหลอดแล้ววางลงในถาดวาง
3. เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนข้าม ให้เปิดฝาหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen ทีละแถว และใช้ปีเปตทิปอันใหม่ในการถ่ายตัวอย่างในแต่ละขั้นตอน
4. ถ่ายไลเซตแต่ละตัวอย่างไปยังหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen และหลอด Neogen รีเอเจ้นท์คอนโทรล ตามคำอธิบายด้านล่าง:

   ถ่ายไลเซตของแต่ละตัวอย่างลงในหลอด รีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen **แต่ละหลอดเป็นอันดับแรก** แล้วจึงถ่าย NC เติมสารละลายลงในหลอด Neogen รีเอเจ้นท์คอนโทรลเป็น**ลำดับสุดท้าย**
5. ใช้เครื่องมือเปิด/ปิดฝาหลอดทดสอบ-รีเอเจนต์ โดยวิธี Neogen® ในการเปิดหลอด รีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์* โดยวิธี Neogen ทีละแถว ทิ้งฝาปิด

5.1 **ถ่ายไลเซตของตัวอย่างปริมาณ 20 ไมโครลิตร จากด้านบน 1/2 ของของเหลว (หลีกเลี่ยงส่วนตะกอน) ในหลอดสารละลายไลซีส Neogen ลงไปในหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *โครโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen ปล่อยสารละลายด้านข้างหลอด เพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนเม็ดรีเอเจนต์ที่ก้นหลอด ผสมโดยใช้ปีเปต ดูดขึ้นและลงเบา ๆ 5 ครั้ง**

5.2 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 5.1 จนว่าจะเติมแต่ละไลเซตตัวอย่างลงไปในหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์* โดยวิธี Neogen ในแถวนั้น

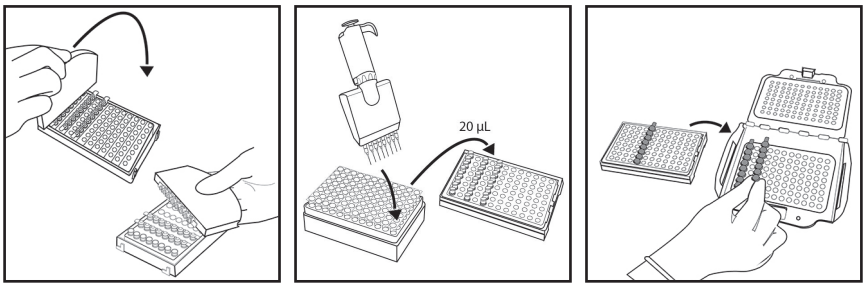
5.3 ปิดหลอดรีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen ด้วยเครื่องมือเปิด/ปิดฝาหลอดทดสอบ - รีเอเจนต์ให้มา และใช้ด้านมนของเครื่องมือเปิด/ปิดฝา หลอดทดสอบ - รีเอเจนต์โดยวิธี Neogen กดซ้ำไปซ้ำมา เพื่อให้แน่ใจว่าฝานั้นปิดสนิท

5.4 ทำซ้ำขั้นตอน 5.1 ถึง 5.3 ตามความจำเป็นสำหรับจำนวนตัวอย่างที่จะทดสอบ

5.5 เมื่อถ่ายไลเซตตัวอย่างทั้งหมดแล้ว ให้ทำซ้ำขั้นตอนที่ 5.1 ถึง 5.3 เพื่อถ่ายไลเซต NC ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดรี รีเอเจนต์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen

5.6 ถ่าย**ไลเซต NC <u>ปริมาณ</u> 20 ไมโครลิตร เข้าไปในหลอด Neogen รีเอเจ้นท์คอนโทรล** ปล่อยสารละลายด้านข้างหลอด เพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนเม็ดรีเอเจนต์ที่ก้นหลอด ผสมโดยใช้ปีเปต ดูดขึ้นและลงเบา ๆ 5 ครั้ง

6. บรรจุหลอดที่ปิดฝาแล้วลงในถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ที่สะอาดและขจัดการปนเปื้อนแล้ว ปิดและล็อคฝาถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen



7. พิจารณาทบทวนและยืนยันการดำเนินการที่กำหนดค่าไว้ในซอฟต์แวร์ทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen
8. คลิกปุ่ม Start ในซอฟต์แวร์ แล้วเลือกเครื่องมือที่จะใช้ ฝาปิดของอุปกรณ์ที่เลือกจะเปิดโดยอัตโนมัติ
9. ใส่ถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ในเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen แล้วปิดฝาเพื่อเริ่มต้นการทดสอบ ระบบจะให้ผลการทดสอบภายในเวลา 60 นาที แม้ว่าผลที่เป็นบวกอาจจะตรวจจับได้เร็วกว่านั้นก็ตาม
10. หลังจากการทดสอบเสร็จสมบูรณ์แล้ว ให้นำถาดใส่หลอดทดสอบสำหรับเข้าเครื่องทดสอบระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen ออกจากเครื่องมือสำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคระดับโมเลกุลโดยวิธี Neogen แล้วกำจัดหลอดเหล่านั้นทิ้งโดยแช่ในน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (ในน้ำที่มีปริมาตรเท่ากัน) นาน 1 ชั่วโมง และปฏิบัติให้ห่างจากพื้นที่จัดเตรียมชุดทดสอบ

ข้อสังเกต: เพื่อลดความเสี่ยงในการได้ผลบวกปลอมอันเนื่องมาจากการปนเปื้อนข้าม ห้ามเปิดหลอดรีเอเจ้นท์ซึ่งบรรจุ DNA ที่เพิ่มขยายแล้ว ซึ่งรวมถึงหลอดรีเอเจ้นท์ของชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen หลอดรีเอเจ้นท์คอนโทรล Neogen และหลอดเมตริกซ์คอนโทรล Neogen กำจัดหลอดรีเอเจ้นท์เหล่านั้นทิ้งโดยแช่ในน้ำยาฟอกขาวที่ใช้ในครัวเรือนที่มีความเข้มข้น 1-5% (ในน้ำที่มีปริมาตรเท่ากัน) นาน 1 ชั่วโมง และปฏิบัติให้ห่างจากพื้นที่จัดเตรียมชุดทดสอบ

ผลการทดสอบและการแปลความหมาย

อัลกอริธึมจะแปลความหมายเส้นโค้งของแสงที่ส่งออกมาอันเป็นผลมาจากการตรวจพบการเพิ่มขยายของกรดนิวคลีอิก ซอฟต์แวร์จะวิเคราะห์ผลการทดสอบนี้โดยอัตโนมัติและจะมีการเข้ารหัสสีตามผลที่ได้ดังกล่าว ผลการทดสอบที่ให้ค่าเป็นบวกหรือลบจะพิจารณาตัดสินโดยการวิเคราะห์พารามิเตอร์ของเส้นโค้งที่มีลักษณะเฉพาะตัวจำนวนหนึ่ง ผลการทดสอบเบื้องต้นที่เป็นบวกจะมีการรายงานในทันที ขณะที่ผลที่เป็นลบและผลที่น่าสงสัยจะแสดงผลภายหลังการทดสอบเสร็จสมบูรณ์แล้ว

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบก็จะไม่ให้ค่าที่อ่านได้เป็นศูนย์ เนื่องจากรีเอเจ้นท์ในการเพิ่มขยายสำหรับชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen จะมีค่าพื้นหลังในหน่วยแสงสัมพัทธ์ (RLU)

การตรวจสอบยืนยัน

- การตรวจสอบยืนยันผลการทดสอบตามวิธีที่ได้รับการรับรองของ NF VALIDATION

ตามเนื้อหาข้อกำหนดของ NF VALIDATION ตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบเบื้องต้นเป็นบวกหลังจากการขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเชื้อทั้งหมดควรได้รับการตรวจสอบยืนยันโดยการตรวจสอบยืนยันวิธีการอ้างอิงดังต่อไปนี้[2] เริ่มจากการถ่ายเชื้อจากอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อขั้นแรก (BPW ISO หรือ BPW ISO ที่มีการเติม 10 มก./ล. แวนโคมัยซิน)

- เกณฑ์วิธีการตรวจสอบยืนยันอื่น ๆ

ตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบเบื้องต้นเป็นบวกหลังจากการขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเชื้อควรได้รับการตรวจสอบยืนยันตามมาตรฐานการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ หรือโดยปฏิบัติตามการตรวจสอบยืนยันวิธีการอ้างอิงที่เหมาะสม[1,2] เริ่มจากการถ่ายเชื้อจากอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อขั้นแรก (BPW ISO หรือ BPW ISO ที่มีการเติม 10 มก./ล. แวนโคมัยซิน) ลงในอาหารเพิ่มจำนวนเชื้อขั้นที่สอง ตามด้วยการแยกเชื้อในจานเพาะเชื้อตามลำดับและตรวจสอบยืนยันเชื้อที่แยกได้ โดยใช้วิธีการทางชีวเคมี วิทยาเซรุ่ม และ/หรือวิธีการระดับโมเลกุลตามที่เหมาะสม

ในกรณีที่พบไม่บ่อยนัก แสงที่ส่งออกมานั้นจะมีลักษณะผิดปกติ อัลกอริธึมดังกล่าวจะส่งข้อมูลออกมาเป็นผลที่น่าสงสัย บริษัท Neogen แนะนำให้ผู้ใช้ทำการทดสอบนี้ซ้ำสำหรับตัวอย่างที่ให้ผลที่น่าสงสัย หากผลการทดสอบยังคงเป็นที่น่าสงสัย ให้ทำการทดสอบเพื่อยืนยันโดยใช้วิธีการตามที่ต้องการหรือตามที่ระบุโดยหน่วยงานกฎระเบียบในประเทศ[1,2]

หากผลที่ได้ไม่สอดคล้องกัน (การให้ผลการทดสอบเบื้องต้นที่เป็นบวกด้วยชุดทดสอบเชื้อระดับโมเลกุล 2 - *ครอโนแบคเตอร์*โดยวิธี Neogen ไม่ได้รับการตรวจสอบยืนยันโดยวิธีการใดวิธีการหนึ่งดังที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น) ห้องปฏิบัติการต้องปฏิบัติตามมาตรฐานการปฏิบัติงานที่จัดทำไว้ เพื่อรายงานผลการทดสอบที่ได้

หากท่านมีข้อสงสัยเกี่ยวกับการใช้งานหรือกรรมวิธีที่เฉพาะเจาะจงใดๆ โปรดเยี่ยมชมเว็บไซต์ของเราที่ www.neogen.com หรือติดต่อตัวแทนจำหน่ายหรือผู้จัดจำหน่ายของบริษัท Neogen ในท้องถิ่นของท่าน

ภาคผนวก A การหยุดการทดสอบชั่วคราว: การเก็บรักษาและการนำไลเซตมาทดสอบซ้ำ

1. หากต้องการเก็บไลเซตที่ผ่านความร้อนมาแล้ว ให้ปิดฝาหลอดสารละลายไลซิสด้วยฝาที่สะอาด (โปรดดู**ไลซีส**ส่วนที่ 4.5)
2. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 ถึง 8°C ไม่เกิน 72 ชั่วโมง
3. เตรียมตัวอย่างที่เก็บไว้ โดยพลิกหลอดสารละลายไลซิสไปมา 2-3 ครั้งเพื่อผสมตัวอย่างให้เข้ากัน
4. เปิดฝาหลอด
5. ใส่หลอดไลเซตที่ผสมตัวอย่างเข้ากันแล้วลงในฮีทบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen และให้ความร้อนที่ 100 ±1°C เป็นเวลา 5 ±1 นาที
6. นำที่วางหลอดใส่สารละลายไลซีส Neogen ออกจากฮีทบล็อคและปล่อยให้เย็นลงในชิลบล็อคสำหรับใส่หลอดทดสอบระดับโมเลกุล โดยวิธี Neogen อย่างน้อย 5 นาทีแต่ไม่เกิน 10 นาที
7. ดำเนินการทดสอบขั้นต่อไปในส่วน**การเพิ่มจำนวนเชื้อ**ตามรายละเอียดด้านล่าง

เอกสารอ้างอิง:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
8. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

โปรดอ้างอิงวิธีการมาตรฐานฉบับปัจจุบันที่แสดงรายการไว้ข้างต้น

คำอธิบายสัญลักษณ์

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

발행일: 2024-01

NEOGEN

제품 설명서

분자 검출 키트 2 - *크로노박터*

제품 설명 및 용도

Neogen® 분자 검출 키트 2 - *크로노박터*는 Neogen® 분자 검출 시스템을 사용하여 증균된 식품 및 식품 가공 환경 시료에서 *크로노박터*를 신속하고 명확하게 검출합니다.

Neogen 분자 검출 키트는 고리 매개 등온 증폭 방식으로 증폭 감지를 위한 생체발광이 결합되어, 높은 특이성과 민감도를 가진 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 확인되어야 합니다[1, 2].

Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터*는 시험 기법에 대해 적절한 교육을 받은 전문가들이 실험실 환경에서 사용하도록 고안되었습니다. Neogen은 식품이나 음료가 아닌 다른 산업에서의 이 제품 사용을 문서화하지 않았습니다. 예를 들어 Neogen은 약품, 화장품, 임상 또는 수의학 시료 시험에 대해 이 제품을 문서화하지 않았습니다. Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터*는 가능한 모든 식품, 식품 가공, 시험 프로토콜 또는 가능한 모든 박테리아 변종에 평가되지는 않았습니다.

모든 시험 방법처럼 증균 배지의 원료, 제조법 및 특성은 결과에 영향을 미칠 수 있습니다. 시료 추출 방법, 검사 계획서, 시료 준비(균질화 및 혼합 포함), 조작 및 실험 기법 또한 결과에 영향을 미칠 수 있습니다. Neogen은 충분한 수의 특정 식품 시료 및/또는 환경 시료와 미생물을 이용하여 사용자의 환경에서 사용자의 기준을 충족하는지 확인하기 위해 증균 배지를 포함한 해당 방법의 평가를 권장합니다.

Neogen은 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터*를 펩톤완충수(ISO) 증균 배지로 평가했습니다.

Neogen® 분자 검출기는 시료에 있는 유기체를 파괴하기 위한 Lysis 단계 중에 열처리를 거친 시료와 함께 사용하기 위한 것입니다. Lysis 단계 동안 적절하게 열처리가 되지 않은 샘플은 잠재적인 생물학적 위험으로 간주되어 Neogen 분자 검출기에 절대로 삽입하지 마십시오.

Neogen Food Safety는 설계 및 제조에 관한 ISO(International Organization for Standardization) 9001 인증을 받았습니다.

Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터* 시험 키트에는 표 1에 설명된 바와 같이 96회 시험분이 포함되어 있습니다.

표 1. Neogen 분자 검출 키트 구성요소

항목	ID	수량	내용물	설명
Neogen® LS(Lysis Solution)	투명한 튜브의 분홍색 용액	96개(8개들이 튜브 12개 스트립)	튜브당 580µL의 LS	랙에 꽂혀 있고 바로 사용 가능함
Neogen® 분자 검출 키트 2 - *크로노박터* Reagent 튜브	오렌지-레드 색의 튜브	96개(8개들이 튜브 12개 스트립)	동결 건조된 특정 증폭 및 검출 혼합물	사용 준비됨
예비 캡	오렌지-레드 캡	96개(8개들이 캡 12개 스트립)		사용 준비됨
Neogen® Reagent 컨트롤(RC)	투명 플립톱 튜브	16개(8개들이 개별 튜브 2개 파우치)	동결 건조된 컨트롤 DNA, 증폭 및 검출 혼합물	사용 준비됨

키트에 제공되지 않은 음성 대조군은 멸균 증균 배지(예: BPW ISO)입니다. 물을 음성 대조군으로 사용하지 마십시오.

안전

사용자는 Neogen 분자 검출 시스템 및 Neogen 분자 검출 키트 2 -*크로노박터*와 관련된 지침의 안전 정보 일체를 숙지하고 따라야 합니다. 나중에 참조할 수 있도록 안전 지침을 보관하십시오.

⚠**경고:** 피하지 못할 경우 사망이나 심각한 부상 및/또는 재산상의 손해를 초래할 수 있는 위험 상황을 의미합니다.

알림: 피하지 못할 경우 재산상의 피해를 초래할 수 있는 잠재적으로 위험한 상황을 나타냅니다.

⚠ 경고

인간 또는 동물의 상태를 진단하는 데 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터*를 사용해서는 안 됩니다.

담당자는 최신의 적절한 시험 기법에 대해 사용자에게 교육을 실시해야 합니다. 우수 실험실 관리기준[3], ISO/IEC 17025[4] 또는 ISO 7218[5].

오염된 제품의 출고를 초래하는 위음성 결과와 관련된 위험을 줄이려면:
- 계획서를 준수하고 제품 설명서에 명시된 대로 정확하게 시험을 수행하십시오.
- Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터*를 보관할 때는 포장 및 제품 지침에 명시된 바를 따릅니다.
- Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터*는 유효 기간까지만 사용해야 합니다.
- Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터*는 내부 또는 제3자가 확인한 식품 및 식품 처리 환경 시료와 함께 사용합니다.
- Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터*에는 내부적으로 또는 타사에 의해 검증된 표면, 멸균제, 프로토콜 및 박테리아 종만 사용하십시오.
- 아릴설포네이트 화합물이 포함된 Neutralizing 버퍼를 함유하는 환경 시료의 경우 시험하기 전에 1: 2로 희석하십시오(시료 1을 동량의 멸균 증균액 1에 넣음). NB 증균액 10µL를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮기는 방법도 있습니다. 아릴설포네이트 화합물이 포함된 Neutralizaing 버퍼를 함유하는 Neogen® 샘플 핸들링 제품: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G 및 HS2410NB2G. 이 프로토콜은 NF Validation 연구 중에 시험하지 않았습니다.

화학물질 및 생물학적 유해 물질 노출 관련 위험을 줄이려면:
- 교육을 받은 사람의 통제하에 적절하게 준비된 실험실에서 병원성균 시험을 수행하십시오. 배양된 증균 배지 및 장비 또는 배양된 증균 배지에 접촉한 표면에는 인체 건강에 위험을 초래할 수 있을 정도의 병원성균이 들어있을 수 있습니다.
- 시약 및 오염된 시료를 다룰 때는 적절한 보호복과 보안경 착용을 비롯하여 항상 표준 실험실 안전 방침을 준수하십시오.
- 증폭 후 증균 배지 및 Reagent 튜브의 내용물과 접촉하지 않도록 하십시오.
- 증균 시료와 관련 오염 폐기물은 현행 지역/국가/업계 표준에 따라 폐기하십시오.
- 권장 가열 온도를 초과하지 마십시오.
- 권장 가열 시간을 초과하지 마십시오.
- 적절한 눈금이 있는 온도계를 사용하여 Neogen® 분자 검출 히팅 블록 인서트 온도를 확인하십시오(예: 부분 침지 온도계 또는 디지털 열전대 온도계. 전체 침지 온도계는 안됨). 온도계는 반드시 Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트의 지정된 장소에 놓아야 합니다.

시험을 준비하는 동안 교차 오염과 관련된 위험을 줄이려면:
- (사용자를 보호하고 뉴클레아제의 침투를 막기 위해) 항상 장갑을 착용해야 합니다.

뜨거운 액체에 노출된 경우 가능한 위험을 줄이려면:
- 권장 가열 온도를 초과하지 마십시오.
- 권장 가열 시간을 초과하지 마십시오.
- 적절한 눈금이 있는 온도계를 사용하여 Neogen® 분자 검출 히팅 블록 인서트 온도를 확인하십시오(예: 부분 침지 온도계 또는 디지털 열전대 온도계. 전체 침지 온도계는 안됨). 온도계는 반드시 Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트의 지정된 장소에 놓아야 합니다.

참고

시험을 준비하는 동안 교차 오염과 관련된 위험을 줄이려면:
- 시약 펠릿 수화 전에 장갑을 교체하십시오.
- 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 샘플을 증균에서 용해 튜브로 옮기십시오. 피펫 오염을 방지하려면 중간 분주 단계를 추가해야 할 수도 있습니다. 예를 들어 사용자는 증균된 각 샘플을 멸균 튜브로 옮길 수 있습니다.
- 해당되는 경우 살균 램프가 있는 분자생물학 워크스테이션을 사용하십시오.
- 주기적으로 1-5%(v: v 물) 가정용 표백 용액 또는 DNA 제거 용액으로 실험실 벤치와 장비(피펫, 캡/디캡 도구 등)의 오염을 제거하십시오.

위양성 결과가 발생할 위험을 줄이려면:
- 증폭 후에는 절대 튜브를 열지 마십시오.
- 오염된 튜브는 항상 1-5% 농도(v:v 물)의 가정용 표백제에 1시간 동안 담가두었다가 키트 준비 구역과 멀리 떨어진 위치에 폐기합니다.
- 증폭 후 Reagent 튜브는 절대 오토클레이브하지 마십시오.
- 시료에 *크로노박터* DNA(살균/비활성화 단계를 거쳐 생존 불가한 *크로노박터* 세포의 DNA)가 다량 함유된 것으로 의심될 경우 **Lysis** 단계 전에 DNA 분해 효소로 추정 양성 증균 처리를 해야 합니다. 자세한 정보는 Neogen에 문의하십시오. 이 프로토콜은 NF Validation 연구 중에 시험하지 않았습니다.

폐기에 대한 추가 정보 및 현지 규정은 안전보건자료(SDS)를 참조하십시오.

구체적인 용도나 절차에 대하여 궁금한 점이 있으면 당사 웹 사이트(www.neogen.com)를 방문하거나 현지 Neogen 또는 판매업체로 문의하십시오.

사용자 책임

사용자는 제품 설명서와 정보를 숙지할 책임이 있습니다. 더 자세한 정보는 당사의 웹사이트 **www.neogen.com**를 참고하거나 현지 Neogen 또는 판매점에 문의하십시오.

시험 방법을 선택할 때, 시료 추출 방법, 시험 프로토콜, 시료 준비(균질화 및 혼합 포함), 취급, 실험 기법과 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 사용자에게는 여느 테스트 방법 및 결과가 해당 고객 및 공급자의 요구 사항을 충족하는지 판단할 책임이 있습니다.

여느 테스트 방법과 마찬가지로 Neogen Food Safety 제품을 사용하여 얻은 결과가 테스트된 매트릭스나 프로세스의 품질을 보장하는 것은 아닙니다.

Neogen에서는 다양한 매트릭스 방법 평가에 도움을 드리기 위해 Neogen® 분자 검출 매트릭스 컨트롤 키트를 개발했습니다. 필요한 경우 매트릭스 컨트롤(MC)을 이용하여 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터* 결과에 영향을 미칠 능력이 매트릭스에 있는지 확인할 수 있습니다. 매트릭스를 대표하는 여러 시료를 시험하십시오(예: Neogen 방법 적용 시 또는 원료 또는 프로세스에 변화가 있었던 신규/미상의 매트릭스 시험 시 유효성 검사를 하는 중에 다양한 원천에서 얻은 시료).

매트릭스는 구성이나 프로세스와 같은 내재적 성질이 있는 제품의 종류로 정의할 수 있습니다. 매트릭스 간의 차이점은 매트릭스의 처리 방법 또는 모양(예: 비살균/저온 살균, 생제품/건조제품 등)이 미치는 영향처럼 간단합니다.

보증의 한계/제한적 구제

개별 제품 포장의 제한적 보증 부분에 명시된 경우를 제외하고, NEOGEN은 상품성 또는 특정 용도 적합성에 대한 보증을 포함한 어떤 명시적이거나 암묵적인 보증도 거부합니다. Neogen Food Safety 제품에 결함이 있을 경우, Neogen이나 그의 공식 판매업체는 자체 판단에 따라 제품을 교체하거나 구매 금액을 환불해 드립니다. 다음은 귀하의 유일한 구제 방법입니다. 추가 질문이 있으면 Neogen 담당자 또는 Neogen 공인 대리점에 문의하십시오.

Neogen 책임의 한계

NEOGEN은 수익의 상실을 포함하여 어떤 직접적인, 간접적인, 특별한, 부수적인, 결과적인 손해나 손실에 대해서도 책임지지 않습니다. 법 이론에 따른 Neogen의 책임은 어떤 경우에도 결함이 있다고 주장된 제품의 구매 대금을 초과하지 않습니다.

보관 및 폐기

Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터*는 2-8°C에서 보관합니다. 동결시키지 마십시오. 보관 중 키트가 빛을 받지 않도록 하십시오. 키트를 열어 보고 호일 파우치가 손상되지 않았는지 확인합니다. 파우치가 손상된 경우 사용하지 마십시오. 개봉 후, 사용하지 않은 Reagent 튜브는 항상 다시 밀봉 가능한 파우치에 건조제와 함께 넣어 보관하여 건조 동결된 시약의 안정성을 유지해야 합니다. 다시 밀봉한 제품은 최대 60일 동안 2-8°C에서 보관하십시오.

유효 기간이 지난 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터*는 사용하지 마십시오. 유통기한과 품목 번호는 상자의 외부 라벨에 기입되어 있습니다. 사용하고 난 증균 배지와 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터*용 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) 가정용 표백 용액 또는 DNA 제거 용액으로 실험실 벤치와 장비(피펫, 캡/디캡 도구 등)의 오염을 제거하십시오.

사용자는 "설치 적격성 평가(IQ)/작동 적격성 평가(OQ) 프로토콜 및 Neogen 분자 검출 시스템 지침" 문서[6]에 명시된 대로 Neogen 분자 검출 시스템 작업자 적격성 평가 교육을 완료해야 합니다.

특정 요건에 관해서는 "검증 방법 관련 상세 설명" 섹션을 참조하십시오.

표 3. AOAC® *Official Method of Analysis℠* 2018.01 및 *Performance Tested℠* 인증서 101703에 따른 증균 프로토콜

표 4. NF VALIDATION 인증서 3M 01/20-03/18에 따른 증균 프로토콜

시료 증균

표 2, 3 또는 4는 식품과 환경 시료용 증균 프로토콜에 대한 안내입니다.

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

식품, 환경 분말, 먼지, 이물질, 스펀지

1. 증균 배지는 증균 프로토콜에서 별도로 명시하지 않는 한 실온(20~25°C)으로 평형을 맞추십시오(표 2, 3 또는 4 참고).
2. 무균 방식으로 증균 배지와 시료를 조합하고 2±0.2분 동안 **또는 모든 덩어리가 완전히 용해되고 배양액이 균질화될 때까지 블렌딩 또는 스토마킹을 하거나, 휘젓거나 손으로 혼합하여 완전히 균질화합니다**[7, 8].
   a. 시료 준비(균질화 및 혼합 포함), 조작 및 실험 기법이 결과에 영향을 미칠 수 있습니다.
   b. 입자가 매우 미세한 시료에 대해서는 필터 백을 사용하는 것이 좋습니다.
   c. 물 속에서 부풀고 점성이 강한 매트릭스(예: 곡류, 녹말)의 경우 점성이 적절히 감소할 때까지 추가 희석하거나(> 1:10) BPW(ISO)에 멸균 1%(w/v) 알파-아밀라아제를 추가하십시오[8].
   d. 양이 많은 곡물 시료의 경우 덩어리가 생기지 않도록 자주 혼합하면서 액체에 분말 곡물을 천천히 추가하십시오.
3. 적절한 프로토콜 표에 명시된 바에 따라 배양하십시오(표 2, 3 또는 4 참고).

표 2. 일반 증균 프로토콜

시료 매트릭스	시료 크기[1]	증균액량[1, 2]	증균 온도 (±1°C)	증균 시간 (hr)	시료 분석량
조제 분유(PIF) 및 건조 우유 분말, 대두 분말, 유청 분말, 유당, 쌀가루 및 말토덱스트린 등의 원료	1X 그램 시료	9XmL BPW(ISO) (1:10)	37	18-24	20µL
염분, 미네랄, 아미노산, DHA(docosahexaenoic acid) 및 비타민 등의 원료	1X 그램 시료	99XmL BPW(ISO) (1:100)	37	18-24	20µL
먼지, 이물질, 진공 흡수된 잔류물과 같은 건조 환경 시료	1X 그램 시료	9XmL BPW(ISO) (1:10)	37	18-24	20µL
10mL Letheen Broth 또는 D/E Neutralizaing Broth로 적신 환경 스펀지	시료 추출 기기 1개	90mL BPW(ISO) (1:10)	37	18-24	20µL

1. Neogen은 최대 300g까지 표 2의 희석 비율을 적용하여 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터*를 평가했습니다. 다른 희석 비율 또는 프로토콜을 검증하여 해당 방법이 사용자의 기준을 충족하도록 하는 것은 사용자의 책임입니다.
2. 증균액이 300mL보다 많을 시에는 **미리 가열된** BPW(ISO)를 사용하십시오(예: 시료 > 30그램).

검증 방법 관련 상세 설명

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

AOAC® *Performance Tested℠*(PTM) 인증서 101703

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

AOAC Research Institute OMA℠및 PTM℠ 연구에서, Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터는 크로노박터 검출에 효과적인 방법이라는 점이 밝혀졌습니다.* 이 연구에서 실험된 매트릭스는 표 3에 나와 있습니다.

표 3. AOAC® *OMA℠* 2018.01 및 *PTM℠* 101703에 따른 증균 프로토콜

시료 매트릭스	시료 크기	증균액량[1]	증균 온도 (±1°C)	증균 시간 (hr)	시료 분석량
조제 분유와 유아용 분말 시리얼	10g	90mL BPW(ISO)(1:10)	37	18-24	20µL
유아용 분말 시리얼 비생균제	300g	2700mL BPW(ISO)(1:10)	미리 가열된 37	18-24	20µL
조제 분유와 유아용 분말 시리얼(생균제 포함)	300g	2700mL BPW(ISO) + 10mg/L 반코마이신	미리 가열된 37	22-24	20µL
유당	10g	90mL BPW(ISO)(1:10)	37	18-24	20µL
10mL D/E Neutralizaing Broth로 적신 환경 스펀지	시료 추출 기기 1개	90mL BPW(ISO)(1:10)	37	18-24	20µL

1. 증균액이 300mL보다 많을 시에는 **미리 가열된** BPW ISO를 사용하십시오.

AFNOR Certification에 의한 NF Validation

3M 01/20-03/18

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

유효기간 관련하여 상세 정보는 상기에 명시한 웹 사이트에 있는 NF VALIDATION 인증서를 참고하십시오.

ISO 22964 대비 ISO 16140-2[9]에 준한 NF VALIDATION 인증 방법

검증의 범위: 조제 분유와 유아용 분말 시리얼(생균제 포함 또는 미포함), 원료 및 환경 시료.

시료 준비: 시료는 EN ISO 22694[2] 및 EN ISO 6887[7, 8]에 따라 준비해야 합니다.

소프트웨어 버전: 인증서 참고.

표 4. NF VALIDATION 인증 방법 3M 01/20-03/18에 따른 증균 프로토콜

시료 매트릭스	시료 크기	증균액량[1]	증균 온도 (±1°C)	증균 시간 (hr)	시료 분석량	권장 중단 시점[2, 3]
• 조제 분유 • 유아용 분말 시리얼 • 건조 우유 분말, 대두 분말, 유청 분말, 유당, 쌀가루, 말토덱스트린 등의 성분 • 먼지, 이물질, 진공 흡수된 잔류물과 같은 건조 환경 시료	10g	90mL BPW(ISO) (1:10)	37	18-24	20µL	증균액 또는 시료 용해물은 최대 72 시간까지 2-8°C에서 보관할 수 있습니다.
• 스폰지, 헹굼물, 닦개	시료 추출 기기 1개 또는 10mL					증균액 또는 시료 용해물은 최대 72 시간까지 2-8°C에서 보관할 수 있습니다.
조제 분유와 유아용 분말 시리얼(비생균제)	30-300g	BPW(ISO) (1:10)	37	18-24	20µL	증균액 또는 시료 용해물은 최대 72 시간까지 2-8°C에서 보관할 수 있습니다.
유아용 분말 시리얼과 조제 분유(생균제 포함)	30-300g	BPW(ISO) + 10mg/L 반코마이신 (1:10)	37	22-24	20µL	없음

1. 증균액이 300mL보다 많을 시에는 미리 가열된 BPW ISO를 사용하십시오(예: 시료 > 30그램).
2. 증균액을 보관소에서 꺼낸 후 Lysis 섹션의 1단계부터 시험을 다시 시작하십시오. 시료 용해물을 보관소에서 꺼낸 후 Lysis 섹션의 7단계부터 시험을 다시 시작하십시오.
3. 저장된 열처리 용해물의 재시험은 부록 A를 참조하십시오.

Neogen® 분자 검출 스피드 로더 트레이 준비

1. 1-5%(v:v 물) 가정용 표백 용액을 천 또는 1회용 타월에 적셔 Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이를 닦습니다.
2. 물로 Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이를 헹굽니다.
3. 1회용 타월을 사용하여 Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이를 닦아서 말립니다.
4. 사용하기 전에 Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이가 마른 상태인지 확인하십시오.

Neogen® 분자 검출 냉각 블록 인서트 준비
Neogen 분자 검출 냉각 블록 인서트를 바로 실험실 벤치에 놓아야 합니다. Neogen 분자 검출 냉각 블록 트레이를 사용하지 않습니다. 주변 실험실 온도(20-25°C)에서 블록을 사용합니다.

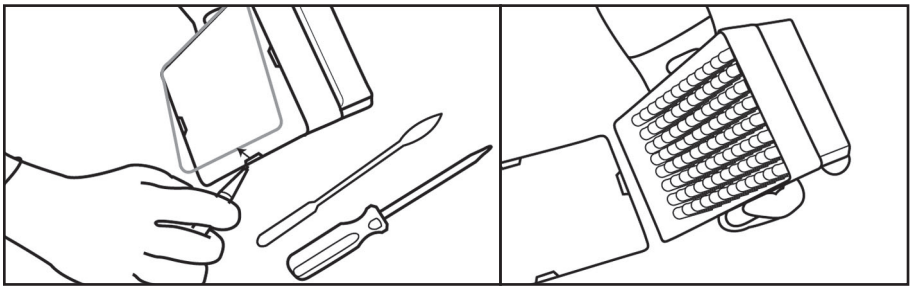
Neogen® 분자 검출 히팅 블록 인서트 준비
건조 이중 블록 히터 장치에 Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트를 놓습니다. 건조 블록 히터 장치를 켜고 Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트가 100±1°C를 유지할 수 있도록 합니다.

참고: 히터 장치에 따라, Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트가 온도에 도달하는 데 약 30분이 걸릴 수 있습니다. 적절한 눈금이 있는 온도계(예: 부분 침지 온도계 또는 디지털 열전대 온도계. 전체 침지 온도계는 아님)를 지정된 위치에 놓아 Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트의 온도가 100±1°C인지 확인합니다.

Neogen® 분자 검출기 준비
1. Neogen® 분자 검출 소프트웨어를 시작하고 로그인합니다. 소프트웨어가 최신 업데이트 버전인지 확인하려면 Neogen Food Safety 담당자에게 문의하십시오.
2. Neogen 분자 검출기를 켭니다.
3. 각 시료에 대한 데이터를 포함하는 실행을 만들거나 편집합니다. 자세한 내용은 Neogen 분자 검출 시스템 사용 설명서를 참조하십시오.

참고: 반응 튜브를 포함한 Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이를 삽입하기 전에 Neogen 분자 검출기는 준비 상태에 도달해야 합니다. 이 가열 단계는 약 20분이 걸리며 완료되면 기기의 상태 표시줄에 주황색 등이 켜집니다. 기기가 실행할 준비가 되면 상태 표시줄이 녹색으로 바뀝니다.

LYSIS
Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트에 부착하기 전에 스크루드라이버로 Neogen Lysis Solution 랙의 하단을 제거합니다.

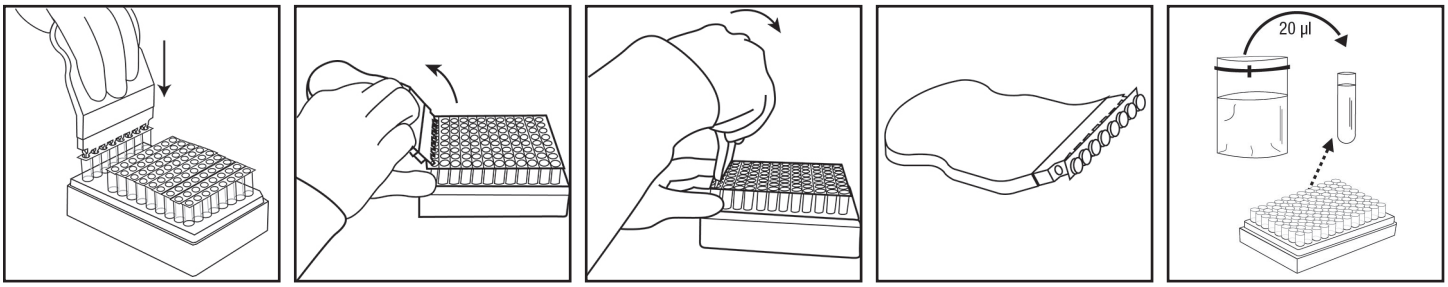


1. 랙을 주변 온도(20~25°C)에서 하룻밤 동안(16~18시간) 두어 Neogen Lysis Solution 튜브를 예열합니다. Neogen Lysis Solution 튜브를 주변 온도로 평형시키는 또 다른 방법은 최소 2시간 동안 실험실 벤치에 Neogen Lysis Solution 튜브를 두거나, 37±1°C 배양기에 1시간 동안 Neogen Lysis Solution 튜브를 배양하거나 100±1°C의 건조한 이중 블록 히터에 30초간 두는 것입니다.
2. 캡을 씌운 튜브를 뒤집어 섞습니다. 뒤집은 다음 4시간 이내에 다음 단계를 진행하십시오.
3. 배양기에서 증균 배지를 제거합니다.
4. 각 시료와 NC 시료(멸균 증균 배지)에 Neogen Lysis Solution 튜브 1개가 필요합니다.
   4.1 Neogen Lysis Solution 튜브 스트립을 원하는 수로 자를 수 있습니다. 필요한 개별 Neogen Lysis Solution 튜브 또는 8-튜브 스트립 수를 선택합니다. Neogen Lysis Solution 튜브를 빈 랙에 놓습니다.
   4.2 교차 오염을 방지하기 위해 한 번에 하나씩 Neogen Lysis Solution 튜브 스트립의 캡을 벗기고 각 분주 단계에 새 피펫 팁을 사용합니다.
   4.3 아래 설명된 대로, 증균된 시료를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮깁니다.

   각 증균된 시료를 개별 Neogen Lysis Solution 튜브로 **먼저** 옮깁니다. NC를 **마지막**으로 옮깁니다.

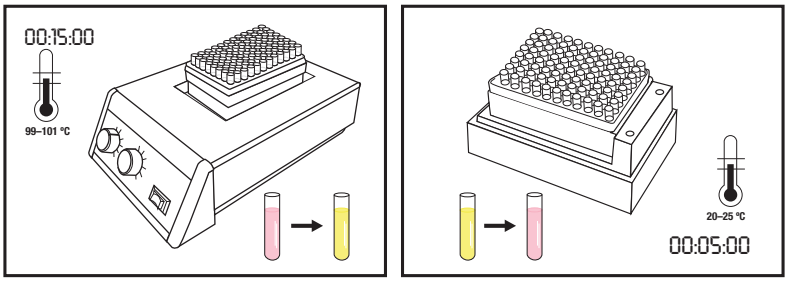
   4.4 Neogen® 분자 검출 Lysis Cap/Decap Tool을 사용하여 한 번에 스트립 하나씩, Neogen Lysis Solution 튜브 스트립 1개의 캡을 벗깁니다.
   4.5 Neogen Lysis Solution 튜브 캡 폐기 – 재시험을 위해 용해물을 그대로 둘 경우 캡을 깨끗한 용기에 두어 용해 후 다시 사용할 수 있도록 합니다.
      4.5.1. 보존된 용해물 처리에 대해서는 부록 A를 참조하십시오.
   4.6 점성 있는 시료를 사용할 때는 여과된 쪽의 시료를 수집하기 전에 증균 백을 저어주십시오.
   4.7 프로토콜 표에 별다른 표시가 없으면 20µl의 시료를 Neogen Lysis Solution 튜브에 옮기십시오.

5. 각 시료가 스트립의 해당 Neogen Lysis Solution 튜브에 추가될 때까지 4.4~4.7단계를 반복합니다.



6. 모든 시료를 옮겼을 때 NC(멸균 증균 배지, 예: BPW) 20µL를 Neogen Lysis Solution 튜브로 옮깁니다. 물을 NC로 사용하지 마십시오.
7. Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트의 온도가 100±1°C인지 확인합니다.
8. 덮개를 씌우지 않은 Neogen Lysis Solution 튜브의 랙을 Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트에 놓고 15±1분 동안 가열합니다. 가열 중 Neogen Lysis Solution 용액은 분홍색(차가움)에서 노란색(뜨거움)으로 바뀝니다.

   Lysis 단계 동안 적절하게 열처리가 되지 않은 샘플은 잠재적인 생물학적 위험으로 간주되어 Neogen 분자 검출기에 절대로 삽입하지 마십시오.
9. 덮개를 씌우지 않은 Neogen Lysis Solution 튜브의 랙을 Neogen 분자 검출 히팅 블록에서 제거하고 Neogen 분자 검출 냉각 블록 인서트에 최소 5분, 최대 10분 냉각시킵니다. Neogen® 분자 검출 냉각 블록 인서트는 Neogen® 분자 검출 냉각 블록 트레이 없이 상온에서 바로 실험실 벤치에 놓아야 합니다. 식었으면 Neogen Lysis Solution이 분홍색으로 다시 바뀝니다.
10. Neogen Lysis Solution 튜브의 랙을 Neogen 분자 검출 냉각 블록 인서트에서 제거합니다.



증폭

1. 각 시료와 NC를 위해 1개의 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터* Reagent 튜브가 필요합니다.

   1.1 튜브 스트립을 원하는 튜브 개수로 자를 수 있습니다. 개별 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터* Reagent 튜브 또는 필요한 8-튜브 스트립 수를 선택합니다.

   1.2 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터* Reagent 튜브를 빈 랙에 놓습니다.

   1.3 튜브 맨 아래 시약 알갱이를 휘젓지 마십시오.
2. 하나의 Neogen Reagent 컨트롤 튜브를 선택하고 랙에 놓습니다.
3. 교차 오염을 방지하기 위해 한 번에 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터* Reagent 튜브 스트립 1개의 캡을 벗기고 각 분주 단계마다 새 피펫을 사용합니다.
4. 아래 설명된 대로 각 용해물을 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터* Reagent 튜브 및 Neogen Reagent 컨트롤 튜브로 옮깁니다.

   각 시료 용해물을 개별 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터* Reagent 튜브로 **먼저** 옮긴 뒤 NC를 옮기십시오. **마지막에** Neogen Reagent 컨트롤 튜브를 수화합니다.
5. Neogen® 분자 검출 Reagent Cap/Decap Tool을 사용하여 한 번에 Reagent 튜브 스트립 하나씩 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터* Reagent 튜브를 벗깁니다. 캡을 버리십시오.

   5.1 **Neogen Lysis Solution 튜브에서 용액의 상부 1/2에서 시료 용해물 20µL를 침전되지 않도록 하여 해당 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터* Reagent 튜브로 옮깁니다. 알갱이가 휘저어져 섞이지 않도록 기울여 붓습니다. 위아래로 가볍게 5번을 피펫팅하여 섞습니다.**

   5.2 개별 시료 용해물이 스트립의 해당 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터* Reagent 튜브에 추가될 때까지 5.1단계를 반복합니다.

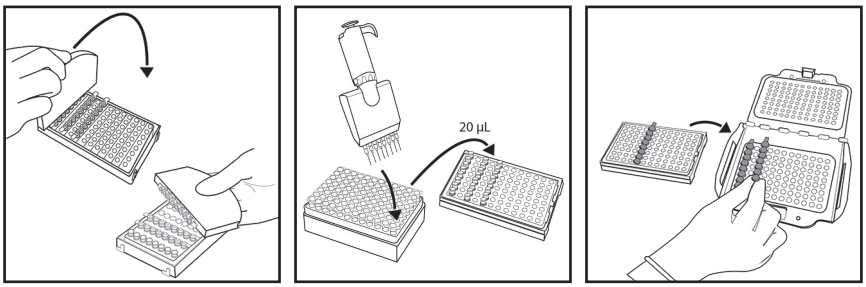
5.3 제공된 여분의 마개로 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터* Reagent 튜브를 덮고, Neogen 분자 검출 Reagent Cap/Decap Tool을의 둥근 면을 사용하여 앞뒤로 압력을 가하여 캡이 단단히 닫혀 있는지 확인하십시오.

5.4 시험할 시료 수에 대해, 필요한 만큼 5.1~5.3단계를 반복합니다.

5.5 모든 시료 용해물을 옮긴 후 5.1~5.3단계를 반복하여 NC 용해물 20µL를 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터* Reagent 튜브로 옮깁니다.

5.6 **NC 용해물 20µL를 Neogen Reagent 컨트롤 튜브**로 옮깁니다. 알갱이가 휘저어져 섞이지 않도록 기울여 붓습니다. 위아래로 가볍게 5번을 피펫팅하여 섞습니다.

6. 캡이 씌워진 튜브를 깨끗하고 오염되지 않은 Neogen 분자 검출 간편 장착 트레이에 내려 놓습니다. Neogen 분자 검출 간편 장착 트레이 뚜껑을 닫고 걸쇠로 잠급니다.



7. Neogen 분자 검출 소프트웨어에서 구성된 실행을 검토하고 확인합니다.
8. 소프트웨어에서 시작 버튼을 클릭하고 사용할 기기를 선택합니다. 선택한 기기의 뚜껑이 자동으로 열립니다.
9. Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이를 Neogen 분자 검출기에 놓고 뚜껑을 닫으면 시험이 시작됩니다. 결과는 60분 이내에 제공되지만 양성 여부는 더 일찍 검출할 수 있습니다.
10. 시험이 완료되었으면 Neogen 분자 검출기에서 Neogen 분자 검출 스피드 로더 트레이를 꺼내고 1-5%(v: v 물) 가정용 표백 용액에 1시간 동안 담갔다가 시검 준비 영역에서 떨어진 곳에 폐기하십시오.

알림: 교차 오염으로 인한 위양성의 위험을 최소화하려면 증폭된 DNA를 함유한 Reagent 튜브를 절대 열지 마십시오. 여기에는 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터* Reagent, Neogen Reagent 컨트롤 및 Neogen 매트릭스 컨트롤 튜브가 포함됩니다. 항상 밀봉된 시약 튜브를 1-5%(v: v 물) 가정용 표백 용액에 1시간 동안 담갔다가 시검 준비 영역에서 떨어진 곳에 폐기하십시오.

결과 및 해석

알고리즘은 핵산증폭을 탐지할 때 생성되는 빛 출력 곡선을 해석합니다. 결과는 소프트웨어에 의해 자동으로 분석되고 결과에 기반하여 색상으로 구분됩니다. 양성 또는 음성 결과는 다양한 고유 곡선 매개변수의 분석으로 판별됩니다. 추정 양성 결과는 실시간으로 보고되는 반면, 음성 결과는 실행이 완료된 후 표시됩니다.

참고: 시스템과 Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터*용 증폭 시약은 "배경" RLU(Relative Light Unit)를 가지므로 음성 시료도 0을 기록값으로 제공하지 않습니다.

확정

- NF Validation 인증 방법에 따른 결과 확정

NF VALIDATION의 경우 모든 추정 양성 증균은 1차 증균(10mg/L 반코마이신으로 보완된 BPW ISO 또는 BPW ISO)에서 옮기는 것에서 시작하여 다음의 참고 방법 확정[2]에 따라 확인해야 합니다.

- 다른 확정 프로토콜

추정 양성 증균은 1차 증균(10mg/L 반코마이신으로 보완된 BPW ISO 또는 BPW ISO)에서 2차 증균 배지로 옮기는 것에서 시작하여 적절한 생화학, 혈청학적 및/또는 분자학적 방법으로 이후 플레이팅 및 분리균 확정을 실시하는 등 실험실 표준 운영 절차 또는 적절한 참고 방법 확정[1, 2]에 따라 확인해야 합니다.

이례적인 빛 출력이 나타나는 경우, 알고리즘은 이를 검사(Inspect)로 분류합니다. 모든 검사 시료에 대해 시검을 반복하는 것이 좋습니다. 결과가 계속 검사인 경우, 기본 설정한 방법을 사용하거나 현지 규정에 따라 확정 시험을 진행하십시오[1,2].

결과가 불일치하는 경우(Neogen 분자 검출 키트 2 - *크로노박터* 사용 시 추정 양성, 상기 방법 중 한 가지로 확인 불가 등) 실험실은 확립된 표준 운영 절차에 따라 결과를 보고해야 합니다.

구체적인 용도나 절차에 대하여 궁금한 점이 있으면 당사 웹 사이트(www.neogen.com)를 방문하거나 현지 Neogen 또는 판매업체로 문의하십시오.

부록 A. 시험 계획서 중단: 열처리된 용해물 보관 및 재시험

1. 열처리된 용해물을 보관하려면 깨끗한 캡으로 용해 튜브를 다시 씌웁니다(**Lysis** 섹션 4.5 참조).
2. 2-8°C에서 최대 72시간 동안 보관합니다.
3. 2-3번 뒤집어서 혼합하여 보관된 시료를 증폭하도록 준비합니다.
4. 튜브의 캡을 벗깁니다.
5. Neogen 분자 검출 히팅 블록 인서트에 혼합된 용해물 튜브를 놓고 100±1°C에서 5±1분 간 가열합니다.
6. Neogen Lysis Solution 튜브의 랙을 히팅 블록에서 제거하고 Neogen 분자 검출 냉각 블록 인서트에 최소 5분, 최대 10분 냉각시킵니다.
7. 위에서 상세히 설명한 **증폭** 섹션의 프로토콜을 계속합니다.

참조:

1. 미국 식품의약국 박테리아 분석 매뉴얼(BAM) 29장, 2012년 3월
2. ISO 22964:2017 식품 사슬의 미생물학 -- *크로노박터* 종의 수평 검출법
3. 미국 식품의약국. 미 연방 규정, 타이틀 21, 파트 58. 비임상 실험 연구에 대한 우수 실험실 기준.
4. ISO/IEC 17025:2017. 시험 및 캘리브레이션 실험실 역량에 대한 일반 요구 사항.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. 식품 및 동물 사료류의 미생물학 - 미생물학적 조사를 위한 일반 요건 및 지침.
6. 설치 적격성 평가(IQ)/작동 적격성 평가(OQ) Neogen® 분자 검출 시스템. 본 문서의 사본을 얻으려면 Neogen Food Safety 담당자에게 문의하십시오.
7. ISO 6887-5:2010. 식품 및 동물 사료류의 미생물학 – 미생물학적 시험을 위한 시험 시료, 초기 현탁액 및 십진희석법 준비 -- 파트 5: 우유 및 유제품 준비 관련 특수 규정
8. ISO 6887-4:2017. 식품 및 동물 사료류의 미생물학 – 미생물학적 시험을 위한 시험 시료, 초기 현탁액 및 십진희석법 준비 -- 파트 4: 기타 제품 준비 관련 특수 규정.
9. ISO 16140-2:2016. 식품 사슬의 미생물학 – 방법 검증 – 파트 2: 참조 방법에 대한 대체(독점) 방법 검증 프로토콜.

위에 열거된 표준 방법의 최신 버전을 참고하십시오.

기호 설명

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A

Tanggal Penerbitan: 2024-01

NEOGEN

Petunjuk Produk

Deteksi Molekuler 2 - untuk Pengujian *Cronobacter*

Deskripsi Produk dan Maksud Penggunaan

Neogen® Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* digunakan dengan Sistem Deteksi Molekuler Neogen® untuk mendeteksi *Cronobacter* secara cepat dan spesifik, dalam sampel makanan yang diperkaya, sampel lingkungan pemrosesan pakan dan makanan.

Neogen Deteksi Molekuler untuk Pengujian menggunakan amplifikasi isotermal termediasi loop untuk menguatkan secara cepat rangkaian asam nukleat dengan kekhususan dan kepekaan tinggi, dikombinasikan dengan bioluminesens untuk mendeteksi amplifikasi. Hasil yang dianggap positif dilaporkan dalam waktu nyata sedangkan hasil yang negatif akan ditampilkan setelah pengujian selesai. Hasil yang diduga positif harus dikonfirmasi menggunakan metode pilihan atau yang sesuai dengan peraturan setempat[1, 2].

Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* dimaksudkan untuk penggunaan dalam lingkungan laboratorium oleh tenaga profesional terlatih dalam teknik laboratorium. Neogen tidak mendokumentasikan penggunaan produk ini dalam industri selain makanan atau minuman. Misalnya, Neogen tidak mendokumentasikan produk ini untuk menguji sampel farmasetikal, kosmetik, sampel klinis atau veteriner. Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* belum dievaluasi untuk semua produk makanan, pemrosesan makanan, protokol pengujian atau semua strain bakteri yang mungkin ada.

Seperti semua metode uji, sumber, formulasi dan kualitas medium pengayaan bisa memengaruhi hasil. Faktor seperti metode pengambilan sampel, protokol pengujian, penyiapan sampel termasuk homogenisasi dan pencampuran, penanganan, dan teknik laboratorium juga dapat memengaruhi hasil. Neogen merekomendasikan untuk melakukan evaluasi metode termasuk medium pengayaan, dalam lingkungan pengguna dengan menggunakan sejumlah sampel yang memadai dengan uji makanan dan/atau sampel lingkungan dan mikroba tertentu untuk memastikan bahwa metode memenuhi kriteria pengguna.

Neogen telah mengevaluasi Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* dengan medium pengayaan ISO Air Pepton Berpenyangga.

Instrumen Deteksi Molekuler Neogen® dimaksudkan untuk digunakan pada sampel yang telah mendapatkan perlakuan pemanasan selama tahap pengujian lisis, yang dirancang untuk mematikan organisme yang ada di dalam sampel tersebut. Sampel yang belum mendapatkan perlakuan pemanasan dengan benar selama tahap pengujian lisis dapat dianggap sebagai potensi bahaya biologis dan TIDAK boleh dimasukkan ke dalam Instrumen Deteksi Molekuler Neogen.

Penguji Keamanan Makanan Neogen sesuai dengan sertifikasi ISO (International Organization for Standardization) 9001 dalam hal desain dan manufaktur.

Kit uji Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* berisikan 96 tes, diuraikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Komponen Neogen Deteksi Molekuler untuk pengujian

Alat	Identifikasi	Jumlah	Kandungan	Komentar
Larutan Lisis Neogen® (LS)	Larutan merah muda dalam tabung bening	96 (12 strip kali 8 tabung)	580 µL LS per tabung	Tersusun dalam rak dan siap digunakan
Tabung Reagen Neogen® Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter*	Tabung berwarna oranye-merah	96 (12 strip kali 8 tabung)	Campuran amplifikasi dan deteksi spesifik terliofilisasi	Siap digunakan
Kapsul tambahan	Kasul oranye-merah	96 (12 strip kali 8 kapsul)		Siap digunakan
Kontrol Reagen Neogen® (RC)	Tabung flip-top transparan	16 (2 kantung dari 8 tabung tersendiri)	Campuran kontrol DNA, amplifikasi dan deteksi terliofilisasi	Siap digunakan

Kontrol Negatif, tidak disediakan dalam kit, merupakan medium pengayaan steril, yaitu BPW ISO. Jangan gunakan air sebagai Kontrol Negatif.

Keselamatan

Pengguna harus membaca, mengerti dan mengikuti semua informasi keselamatan dalam petunjuk untuk Sistem Deteksi Molekuler Neogen dan Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter*. Simpanlah petunjuk keselamatan untuk referensi mendatang.

⚠**PERINGATAN:** Menandakan situasi berbahaya, yang, apabila tidak dihindari, dapat menyebabkan kematian atau cedera serius dan/atau kerusakan harta benda.

PERHATIAN: Menandakan situasi yang berpotensi berbahaya yang, apabila tidak dihindari, dapat menyebabkan kerusakan harta benda.

⚠ PERINGATAN

Jangan menggunakan Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* untuk mendiagnosis kondisi manusia atau hewan.

Pengguna harus melatih personelnya dalam teknik pengujian yang benar: Misalnya, Praktik Laboratorium yang Baik[3], ISO/IEC 17025[4], atau ISO 7218[5].

Untuk memperkecil risiko dalam kaitannya dengan hasil yang negatif salah yang dapat menyebabkan pelepasan produk yang terkontaminasi:

- Patuhi protokol dan lakukan pengujian dengan tepat seperti yang tercantum dalam petunjuk produk.
- Simpan Neogen Deteksi Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* sesuai yang tercantum pada kemasan dan petunjuk produk.
- Selalu gunakan Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* sebelum tanggal kedaluwarsa.
- Gunakan Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* dalam sampel makanan dan sampel lingkungan pemrosesan pakan yang sudah divalidasi secara internal atau oleh pihak ketiga.
- Gunakan Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* hanya pada permukaan, sanitiser, protokol dan strain bakteri yang telah divalidasi secara internal atau oleh pihak ketiga.
- Untuk sampel lingkungan yang berisi Penyangga Penetral dengan kompleks aril sulfonat, lakukan pelarutan 1:2 sebelum pengujian (1 perbandingan sampel dilarutkan dengan 1 perbandingan agar pengaya steril). Opsi lain adalah mentransfer 10 µL pengayaan NB ke dalam tabung Larutan Lisis Neogen. Produk Penanganan Sampel Neogen® yang memuat Penyangga Penetral dengan kompleks aril sulfonat: RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2G, dan HS2410NB2G. Protokol ini telah diuji selama studi NF Validation.

Untuk memperkecil risiko dalam kaitannya dengan paparan terhadap bahan kimia dan bahaya biologis:

- Lakukan pengujian patogen di laboratorium yang memiliki peralatan lengkap di bawah kontrol personel yang telah terlatih. Media pengayaan terinkubasi dan perlengkapan atau permukaan yang telah bersentuhan dengan media pengayaan terinkubasi dapat mengandung patogen pada tingkat yang cukup untuk menimbulkan risiko bagi kesehatan manusia.
- Selalu patuhi praktik keselamatan standar laboratorium, termasuk memakai peralatan pelindung yang benar dan pelindung mata saat menangani reagen dan sampel yang terkontaminasi.
- Hindari kontak dengan isi media pengayaan dan tabung reagen setelah amplifikasi.
- Buang sampel yang diperkaya dan limbah terkontaminasi yang terkait sesuai dengan standar lokal/regional/nasiona/industri yang berlaku.
- Jangan mengatur suhu pada alat pemanas melebihi batas yang direkomendasikan.
- Jangan melebihi waktu pemanasan yang direkomendasikan.
- Gunakan termometer yang dikalibrasi dan tepat untuk memverifikasi suhu Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen® (misalnya, termometer yang dimasukkan sebagian atau termometer digital ganda, bukan termometer yang dimasukkan keseluruhan). Termometer harus ditempatkan pada lokasi yang ditentukan dalam Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen.

Untuk memperkecil risiko dalam kaitannya dengan kontaminasi silang saat persiapan pengujian:

- Selalu gunakan sarung tangan (untuk melindungi pengguna dan mencegah timbulnya nuklease).

Untuk memperkecil risiko dalam kaitannya dengan paparan terhadap cairan panas:

- Jangan mengatur suhu pada alat pemanas melebihi batas yang direkomendasikan.
- Jangan melebihi waktu pemanasan yang direkomendasikan.

- Gunakan termometer yang dikalibrasi dan tepat untuk memverifikasi suhu Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen® (misalnya, termometer yang dimasukkan sebagian atau termometer digital ganda, bukan termometer yang dimasukkan keseluruhan). Termometer harus ditempatkan pada lokasi yang ditentukan dalam Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen.

PERHATIAN

Untuk memperkecil risiko dalam kaitannya dengan kontaminasi silang saat persiapan pengujian:

- Ganti sarung tangan sebelum hidrasi pelet reagen.
- Dianjurkan untuk menggunakan ujung pipet halang aerosol ujung runcing (berfilter) dengan derajat molekuler biologi yang steril.
- Gunakan ujung pipet yang baru setiap kali memindahkan sampel.
- Gunakan Praktik Laboratorium yang Baik untuk memindahkan sampel dari tabung pengayaan ke tabung lisis. Untuk mencegah kontaminasi pipet, pengguna boleh memilih untuk menambahkan langkah perantara dalam proses pemindahan. Misalnya, pengguna dapat memindahkan masing-masing sampel yang diperkaya ke dalam tabung steril.
- Gunakan stasiun kerja biologi molekuler yang memiliki lampu germisida, jika tersedia.
- Secara berkala bersihkan kontaminasi pada meja dan peralatan laboratorium (pipet, alat pembuka/penutup, dsb.) dengan larutan pemutih rumah tangga 1-5% (v:v dalam air) atau larutan penghilang DNA.

Untuk memperkecil risiko dalam kaitannya dengan hasil yang positif salah:

- Jangan pernah membuka tabung setelah amplifikasi.
- Buang tabung yang terkontaminasi dengan merendamnya ke dalam larutan pemutih rumah tangga 1-5% (v:v dalam air) selama 1 jam dan jauhkan dari tempat persiapan pengujian.
- Jangan sekali-kali mengautoklaf tabung reagen setelah amplifikasi.
- Jika sampel diduga mengandung DNA *Cronobacter* dalam jumlah besar (yaitu DNA dari sel-sel *Cronobacter* yang sudah mati setelah melewati fase pelumpuhan/inaktivasi), pengayaan yang dianggap positif harus ditangani dengan DNase sebelum langkah **Lisis**. Hubungi Perwakilan Neogen Anda untuk petunjuk tambahan. Protokol ini telah diuji selama studi NF Validation.

Baca Lembar Data Keselamatan untuk informasi tambahan dan peraturan setempat tentang pembuangan.

Apabila Anda memiliki pertanyaan yang spesifik tentang penerapan atau prosedur, silakan kunjungi situs web kami di www.neogen.com atau hubungi perwakilan atau distributor Neogen setempat.

Tanggung Jawab Pengguna

Pengguna bertanggung jawab untuk memahami instruksi dan informasi produk. Kunjungi situs web kami di **www.neogen.com** atau hubungi perwakilan atau distributor Neogen setempat untuk informasi selengkapnya.

Saat memilih metode pengujian, penting untuk diketahui bahwa faktor eksternal seperti metode pengambilan sampel, protokol pengujian, penyiapan sampel termasuk homogenisasi dan pencampuran, penanganan, dan teknik laboratorium dapat memengaruhi hasilnya.

Pengguna bertanggung jawab untuk memilih metode atau produk pengujian untuk mengevaluasi sejumlah sampel yang memadai dengan matriks dan ketentuan mikrobial yang tepat untuk memastikan bahwa metode pengujian memenuhi kriteria pengguna.

Pengguna juga bertanggung jawab untuk menentukan bahwa semua metode dan hasil pengujian memenuhi persyaratan pelanggan dan pemasok.

Untuk semua metode pengujian, hasil yang diperoleh dari penggunaan produk Neogen Food Safety apa pun bukan merupakan jaminan kualitas terhadap matriks atau proses yang diuji.

Untuk membantu pelanggan mengevaluasi metode untuk berbagai matriks, Neogen telah mengembangkan kit Kontrol Matriks Deteksi Molekuler Neogen®. Jika diperlukan, gunakan Kontrol Matriks (KM) untuk menentukan apakah matriks memengaruhi hasil Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter*. Uji beberapa contoh sampel, yang mewakili matriks, yaitu sampel yang diperoleh dari sumber yang berbeda, selama periode validasi manapun bila mengadopsi metode Neogen atau bila menguji matriks baru atau tidak dikenal atau matriks yang sudah mengalami perubahan bahan mentah atau perubahan proses.

Matriks dapat didefinisikan sebagai suatu tipe produk dengan properti intrinsik seperti komposisi dan proses. Perbedaan antara matriks bisa sama sederhananya dengan dampak yang ditimbulkan karena perbedaan tersebut dalam pemrosesan atau presentasi, misalnya mentah vs. dipasteurisasi; segar vs. dikeringkan, dll.

Batasan Garansi / Penggantian Terbatas

KECUALI SEBAGAIMANA DITENTUKAN DI BAGIAN GARANSI TERBATAS UNTUK SETIAP KEMASAN PRODUK, NEOGEN TIDAK BERTANGGUNG JAWAB TERHADAP SEMUA GARANSI SECARA TERTULIS MAUPUN SECARA TERSIRAT, TERMASUK NAMUN TIDAK TERBATAS PADA, JAMINAN KELAYAKAN JUAL ATAU KESESUAIAN UNTUK PENGGUNAAN TERTENTU. Apabila ada Produk Neogen Food Safety yang cacat, Neogen atau distributor resminya, sesuai kebijakannya, akan mengganti atau membayar kembali harga pembelian produk. Penggantian ini ditawarkan kepada Anda secara eksklusif. Silakan hubungi perwakilan Neogen Anda atau distributor resmi Neogen untuk pertanyaan lebih lanjut.

Batasan Pertanggungjawaban Neogen

NEOGEN TIDAK BERTANGGUNG JAWAB ATAS SEGALA BENTUK KEHILANGAN ATAU KERUSAKAN, BAIK KERUSAKAN SECARA LANGSUNG, TIDAK LANGSUNG, KHUSUS, INSIDENTAL MAUPUN KONSEKUENSIAL, TERMASUK NAMUN TIDAK TERBATAS PADA HILANGNYA KEUNTUNGAN. Bagaimanapun juga, sesuai teori hukum mana pun, Neogen tidak bertanggung jawab melebihi dari harga pembelian produk yang dinyatakan sebagai cacat.

Penyimpanan dan Pembuangan

Simpanlah Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* pada suhu 2-8°C. Jangan dibekukan. Jauhkan kit dari cahaya selama penyimpanan. Setelah membuka kit, periksa apakah kantung foil masih utuh. Jangan digunakan jika kantung tersebut rusak. Setelah dibuka, tabung reagen yang tidak digunakan harus selalu disimpan dalam kantung yang dapat direkatkan kembali dan diberi penyerap kelembaban (desiccant) untuk menjaga stabilitas reagen terliofilisasi. Simpan kantung yang telah dibuka pada suhu 2-8°C, selama tidak lebih dari 60 hari.

Jangan gunakan Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* setelah tanggal kedaluwarsa. Tanggal kedaluwarsa dan nomor lot tercantum pada label di bagian luar kotak. Setelah penggunaan, medium pengayaan dan tabung Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* berpotensi mengandung bahan patogen. Setelah pengujian selesai, patuhi standar industri pembuangan limbah yang terkontaminasi yang berlaku saat ini. Baca Lembar Data Keselamatan untuk informasi tambahan dan peraturan setempat tentang pembuangan.

Petunjuk Penggunaan

Patuhi semua petunjuk dengan saksama. kegagalan dalam mematuhinya dapat menyebabkan hasil tidak akurat.

Secara berkala bersihkan kontaminasi pada meja dan peralatan laboratorium (pipet, alat pembuka/penutup, dsb.) dengan larutan pemutih rumah tangga 1-5% (v:v dalam air) atau larutan penghilang DNA.

Pengguna harus menyelesaikan pelatihan kualifikasi operator (OQ) Sistem Deteksi Molekuler Neogen, sebagaimana dijelaskan dalam dokumen “Protokol dan Instruksi Kualifikasi Pemasangan (IQ) / Kualifikasi Operasional (OQ) untuk Sistem Deteksi Molekuler Neogen”[6].

Lihat Bagian “Instruksi Spesifik untuk metode tervalidasi” untuk persyaratan spesifik:

Tabel 3 untuk protokol pengayaan berdasarkan AOAC® *Official Method of Analysis*℠ 2018.01 dan *Performance Tested*℠ Nomor sertifikat 101703

Tabel 4 untuk protokol pengayaan sesuai dengan sertifikat NF VALIDATION 3M 01/20-03/18

Pengayaan Sampel

Tabel 2, 3 atau 4 menyajikan panduan untuk protokol pengayaan untuk sampel makanan dan lingkungan.

Pengguna bertanggung jawab untuk memvalidasi protokol pengambilan sampel atau rasio pengayaan atau pengenceran alternatif guna memastikan bahwa metode pengujian ini memenuhi kriteria pengguna.

Makanan, Bubuk Lingkungan, Debu, Apusan dan Spons

1. Ekuilibrasi medium pengayaan ke suhu ruangan sekitar (20-25°C) kecuali dinyatakan lain dalam protokol pengayaan (Lihat Tabel 2, 3, atau 4).
2. Campurkan media yang diperkaya dan sampel lalu homogenisasikan sepenuhnya dengan blender, stomaching, vorteks, atau tangan selama 2 ± 0,2 menit **atau sampai semua gumpalan larut dan suspensi pengayaan homogen**[7, 8].
   a. Faktor seperti penyiapan sampel termasuk homogenisasi dan pencampuran, penanganan, dan teknik laboratorium juga dapat memengaruhi hasil.
   b. Untuk sampel yang mengandung banyak partikel, disarankan untuk menggunakan kantung filter.
   c. Untuk matriks yang melayang di air dan sangat pekat (misalnya sereal, kanji), disarankan untuk melarutkan lagi (> 1:10) sampai viskositasnya berkurang atau tambahkan 1% (w/v) alpha-amylase steril ke BPW (ISO)[8].
   d. Untuk sampel sereal berukuran besar, tambahkan bubuk seral secara perlahan ke dalam cairan dan seing diaduk untuk mencegah gumpalan.

3. Inkubasikan sebagaimana diuraikan dalam tabel protokol yang sesuai (Lihat Tabel 2, 3, dan 4).

Tabel 2. Protokol Pengayaan Umum

Matriks Sampel	Ukuran Sampel[1]	Volume Kaldu Pengayaan[1, 2]	Suhu Pengayaan (± 1°C)	Waktu Pengayaan (jam)	Volume Analisis Sampel
Susu formula bayi bubuk (PIF) dan bahan mentah seperti susu bubuk kering, kedelai bubuk, bubuk whey, laktose, tepung beras dan maltodekstrin	1X gram sampel	9X mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
Bahan mentah seperti garam, mineral, asam amino, DHA (docosahexaenoic acid), dan vitamin	1X gram Sampel/contoh	99X mL BPW (ISO) (1:100)	37	18-24	20 µL
Sampel lingkungan kering seperti debu, apusan, debu hasil vakum	1X gram sampel	9X mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
Spons lingkungan dengan 10 mL Kaldu Letheen atau Kaldu Penetral D/E	1 alat pengambil sampel	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL

1. Neogen telah mengevaluasi Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* menggunakan rasio pengenceran dalam Tabel 2 hingga 300 g. Pengguna bertanggung jawab untuk memvalidasi protokol atau rasio pengenceran alternatif guna memastikan bahwa metode tersebut memenuhi kriteria pengguna.
2. Gunakan BPW **yang telah dihangatkan** (ISO) jika volume kaldu pengayaan > 300 mL (misalnya sampel > 30 gram).

Instruksi Spesifik untuk Metode Divalidasi

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

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

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 101703

Dalam program AOAC Research Institute OMA℠ dan PTM℠, Neogen Deteksi Molekuler 2 untuk Pengujian - *Cronobacter* diketahui sebagai metode yang efektif untuk mendeteksi *Cronobacter.* Matriks yang diuji dalam kajian ditunjukkan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Protokol pengayaan berdasarkan AOAC® *OMA℠* 2018.01 dan *PTM℠* 101703

Matriks Sampel	Ukuran Sampel	Volume Kaldu Pengayaan[1]	Suhu Pengayaan (± 1°C)	Waktu Pengayaan (jam)	Volume Analisis Sampel
Susu Formula Bayi Bubuk dan Sereal Bayi Bubuk	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
Sereal Bayi Bubuk nonprobioti	300 g	2700 mL BPW (ISO) (1:10)	Prapemanasan 37	18-24	20 µL
Susu Formula Bayi Bubuk dan Sereal Bayi Bubuk dengan probiotik	300 g	2700 mL BPW (ISO) + 10 mg/L Vancomycin	Prapemanasan 37	22-24	20 µL
Laktosa	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL
Spons lingkungan dengan 10 mL Kaldu Penetral D/E	1 alat pengambil sampel	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL

1. Gunakan BPW ISO **yang telah dihangatkan** jika volume kaldu pengayaan > 300 mL.

NF VALIDATION dengan AFNOR Certification

3M 01/20-03/18

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

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

Untuk informasi selengkapnya mengenai berakhirnya validitas, silakan merujuk pada sertifikat NF VALIDATION yang tersedia pada situs web yang disebutkan di atas.

Metode sertifikasi NF VALIDATION tunduk pada ISO 16140-2[9] dibandingkan dengan ISO 22964.

Ruang Lingkup validasi: Susu formula bayi bukuk dan sereal bayi dengan dan tanpa probiotik, bahan mentah, dan sampel lingkungan.

Persiapan sampel: Sampel harus disiapkan sesuai dengan EN ISO 22694[2] dan EN ISO 6887[7, 8].

Versi perangkat lunak: Lihat sertifikat.

Tabel 4. Protokol Pengayaan Sesuai dengan Metode Sertifikasi NF VALIDATION 3M 01/20-03/18

Matriks Sampel	Ukuran Sampel	Volume Kaldu Pengayaan[1]	Suhu Pengayaan (± 1°C)	Waktu Pengayaan (jam)	Volume Analisis Sampel	Titik Interupsi yang Disarankan[2, 3]
• Susu formula bayi bubuk • Sereal bayi bubuk • Bahan seperti susu bubuk kering, bubuk kedelai, bubuk gandum, laktosa, telung beras, maltodekstrin • Sampel lingkungan kering seperti debu, apusan, debu hasil vakum,	10 g	90 mL BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL	Agar pengayaan atau sampel lisat dapat disimpan pada suhu 2-8°C sampai selama 72 jam
• Spons, air bilas, lap	1 alat pengambil sampel atau 10 mL					Agar pengayaan atau sampel lisat dapat disimpan pada suhu 2-8°C sampai selama 72 jam
Susu formula bayi bubuk dan sereal bayi bubuk (nonprobiotik)	30-300 g	BPW (ISO) (1:10)	37	18-24	20 µL	Agar pengayaan atau sampel lisat dapat disimpan pada suhu 2-8°C sampai selama 72 jam
Susu formula bayi bubuk dan sereal bayi bubuk (termasuk probiotik)	30-300 g	BPW (ISO) + 10 mg/L vancomycin (1:10)	37	22-24	20 µL	Nihil

1. Gunakan BPW yang telah dihangatkan (ISO) jika volume kaldu pengayaan > 300 mL (misalnya sampel > 30 gram).

2. Setelah mengeluarkan kaldu pengayaan dari tempat penyimpanan, lakukan kembali pengujian mulai dari Langkah 1 pada bagian Lisis. Setelah mengeluarkan sampel lisat dari tempat penyimpanan, lanjutkan pengujian dari Langkah 7 dalam bagian Lisis.
3. Lihat Apendiks A untuk pengujian ulang lisat tersimpan yang telah dipanaskan.

Persiapan Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen®

1. Basahi kain atau handuk sekali pakai dengan larutan pemutih rumah tangga 1-5% (v:v dalam air) dan seka Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen.
2. Bilas Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen dengan air.
3. Gunakan handuk sekali pakai untuk menyeka Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen hingga kering.
4. Pastikan Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen dalam kondisi kering sebelum digunakan.

Persiapan Sisipan Blok Pendingin Deteksi Molekuler Neogen®

Tempatkan Sisipan Blok Pendingin Deteksi Molekuler Neogen langsung pada meja laboratorium: Baki Blok Pendingin Deteksi Molekuler Neogen tidak digunakan. Gunakan blok pada suhu ruangan laboratorium (20-25°C).

Persiapan Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen®

Letakkan Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen dalam unit pemanas blok ganda kering. Nyalakan unit pemanas blok kering dan atur suhu agar Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen dapat mencapai dan mempertahankan suhu 100 ± 1°C.

CATATAN: Tergantung pada unit pemanas, tunggu selama sekitar 30 menit hingga Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen mencapai suhu yang diinginkan. Gunakan termometer yang dikalibrasi dan tepat (misalnya, termometer yang dimasukkan sebagian, termometer digital ganda, bukan termometer yang dimasukkan keseluruhan) yang diletakkan di lokasi yang ditentukan, lakukan verifikasi bahwa Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen berada pada 100 ± 1°C.

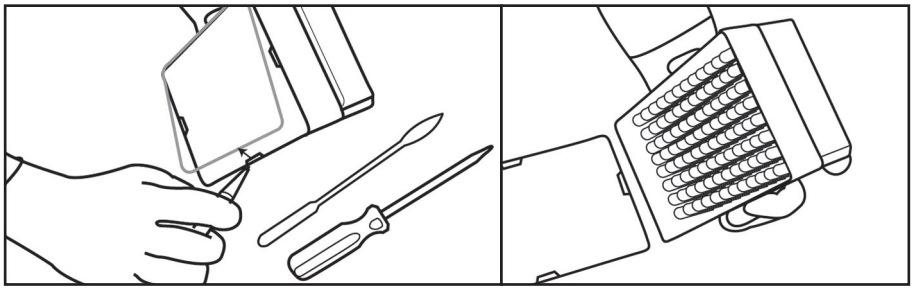
Persiapan Instrumen Deteksi Molekuler Neogen®

1. Buka Perangkat Lunak Deteksi Molekuler Neogen® kemudian login. Hubungi perwakilan Neogen Food Safety Anda guna memastikan Anda memiliki versi perangkat lunak paling mutakhir.
2. Hidupkan Instrumen Deteksi Molekuler Neogen.
3. Buat atau edit proses dengan data untuk setiap sampel. Baca Panduan Pengguna Sistem Deteksi Molekuler Neogen untuk keterangan lengkap.

CATATAN: Instrumen Deteksi Molekuler Neogen harus mencapai dan tetap berada pada status Siaga sebelum memasukkan Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen dengan tabung reaksi. Tahap pemanasan ini memerlukan waktu sekitar 20 menit dan ditandai dengan nyala lampu ORANYE pada bilah status instrumen. Setelah instrumen siap digunakan, bilah status akan berubah menjadi HIJAU.

Lisis

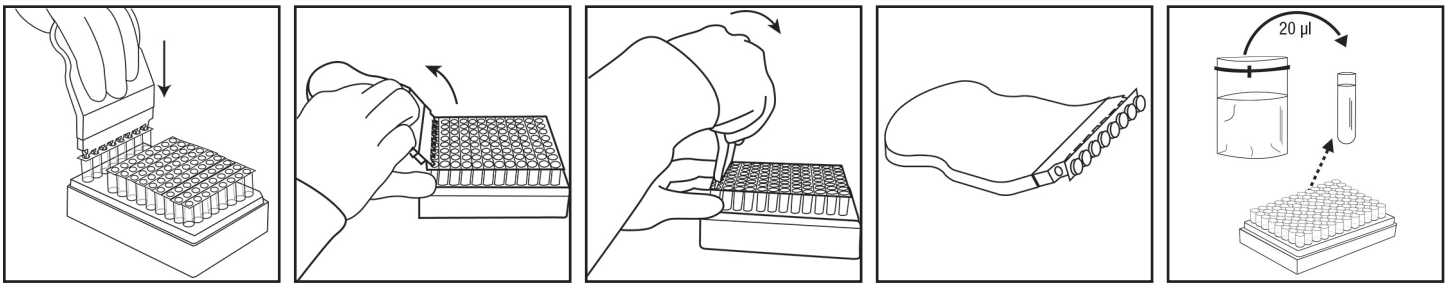
Lepaskan bagian bawah Rak Larutan Lisis Neogen dengan obeng sebelum meletakkannya dalam Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen.



1. Biarkan tabung Larutan Lisis Neogen hangat dengan menyetel rak pada suhu kamar (20-25°C) semalam (16-18 jam). Alternatif untuk menyeimbangkan tabung Larutan Lisis Neogen pada suhu kamar adalah meletakkan tabung Larutan Lisis Neogen di meja laboratorium sedikitnya selama 2 jam, inkubasi tabung Larutan Lisis Neogen dalam inkubator 37 ± 1°C selama 1 jam atau letakkan di dalam pemanas blok ganda kering selama 30 detik pada suhu 100 ± 1°C.
2. Balikkan tabung dalam kondisi tertutup untuk mencampur. Lanjutkan ke langkah berikutnya dalam waktu 4 jam setelah dibalik.

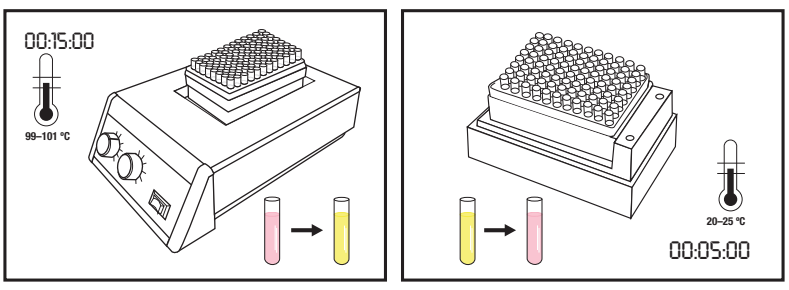
3. Buang kaldu pengayaan dari inkubator.
4. Satu tabung Larutan Lisis Neogen dibutuhkan untuk setiap sampel dan sampel NC (media pengayaan steril).
   - 4.1 Strip tabung Larutan Lisis Neogen dapat dipotong sesuai jumlah yang diinginkan. Pilih jumlah tabung Larutan Lisis Neogen tersendiri atau strip 8 tabung yang diperlukan. Letakkan tabung Larutan Lisis Neogen pada rak kosong.
   - 4.2 Untuk menghindari kontaminasi silang, buka tutup satu strip tabung Larutan Lisis Neogen satu per satu dan gunakan ganti ujung pipet untuk setiap tahap pemindahan.
   - 4.3 Pindahkan sampel yang diperkaya ke tabung Larutan Lisis Neogen sesuai petunjuk di bawah ini:

     Pindahkan setiap sampel yang diperkaya ke tabung Larutan Lisis Neogen tersendiri **terlebih dahulu.** Pindahkan NC **paling akhir.**
   - 4.4 Gunakan Alat Penutup/Pembuka Deteksi Molekuler Neogen®–Lisis untuk membuka tabung Larutan Lisis Neogen - satu per satu strip.
   - 4.5 Buang penutup tabung Larutan Lisis Neogen – Jika lisat akan disimpan untuk pengujian ulang, letakkan penutup ke dalam wadah bersih untuk penggunaan ulang setelah lisis.
     - 4.5.1. Untuk memroses lisat yang disimpan, lihat Apendiks A.
   - 4.6 Kocok kantong pengayaan sebelum mengumpulkan sampel dari sisi yang difilter ketika bekerja dengan sampel pekat.
   - 4.7 Pindahkan 20 µL sampel ke dalam tabung Larutan Lisis Neogen kecuali diindikasikan lain dalam tabel protokol.
5. Ulangi langkah 4.4 hingga 4.7 sampai masing-masing sampel telah ditambahkan pada tabung Larutan Lisis Neogen yang sesuai dalam strip.



6. Setelah semua sampel dipindahkan, transfer 20 µL NC (media pengayaan steril, misalnya BPW) ke dalam tabung Larutan Lisis Neogen. Jangan gunakan air sebagai NC.
7. Pastikan bahwa suhu Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen berada pada 100 ± 1°C.
8. Letakkan rak tabung Larutan Lisis Neogen yang tidak tertutup di dalam Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen lalu panaskan selama 15 ±1 menit. Selama pemanasan, Larutan Lisis Neogen akan berubah dari merah muda (dingin) menjadi kuning (panas).

   Sampel yang belum mendapatkan perlakuan pemanasan dengan benar selama tahap pengujian lisis dapat dianggap sebagai potensi bahaya biologis dan TIDAK boleh dimasukkan ke dalam Instrumen Deteksi Molekuler Neogen.
9. Keluarkan rak tabung Larutan Lisis Neogen yang tidak tertutup dari Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen lalu biarkan sampai dingin di dalam Sisipan Blok Pendingin Deteksi Molekuler Neogen selama minimal 5 menit dan maksimal 10 menit. Sisipan Blok Pendingin Deteksi Molekuler Neogen, yang digunakan pada suhu kamar tanpa Baki Blok Pendingin Deteksi Molekuler Neogen®, harus diletakkan langsung di meja laboratorium. Ketika dingin, larutan Neogen lisis akan kembali berwarna merah muda.
10. Keluarkan rak tabung Larutan Lisis Neogen dari Sisipan Blok Pendingin Deteksi Molekuler Neogen.

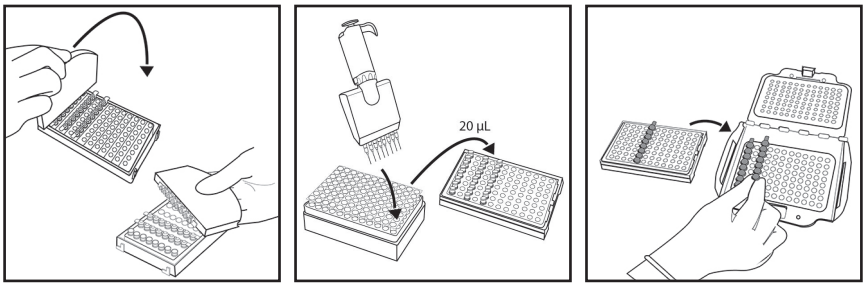


Amplifikasi

1. Satu Tabung Reagen Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* diperlukan untuk setiap sampel dan NC.
   1.1 Strip tabung SR dapat dipotong sesuai jumlah tabung yang diinginkan. Pilih jumlah Tabung Reagen Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* atau strip 8 tabung yang dibutuhkan.
   1.2 Letakkan Tabung Reagen Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* di rak yang kosong.
   1.3 Jangan sampai mengguncang pelet reagen di bagian bawah tabung.
2. Pilih satu Tabung Kontrol Reagen Neogen lalu letakkan di rak.
3. Untuk menghindari kontaminasi silang, buka tutup satu strip Tabung Reagen Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* satu per satu dan gunakan ujung pipet baru untuk setiap tahap pemindahan.
4. Pindahkan setiap lisat ke Tabung Reagen Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* dan Tabung Kontrol Reagen Neogen sebagaimana dijelaskan di bawah:

Transfer setiap sampel lisat ke masing-masing Tabung Reagen Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* terlebih dahulu diikuti dengan NC. Basahi Tabung Kontrol Reagen Neogen **paling akhir**.

5. Gunakan Alat Penutup/Pembuka Deteksi Molekuler Neogen® - Reagen untuk membuka Tabung Reagen Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* strip demi strip. Buang penutup.
   5.1 **Pindahkan 20 µL sampel lisat dari bagian atas 1/2 dari cairan (hindari pengendapan) dalam tabung Larutan Lisis Neogen ke dalam Tabung Reagen Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* yang terkait. Semprotkan dengan kemiringan tertentu sehingga tidak mengganggu pelet. Campurkan dengan cara menyedot dan menyemprotkan perlahan-lahan sebanyak 5 kali.**
   5.2 Ulangi langkah 5.1 sampai sampel lisat tersendiri telah ditambahkan ke Tabung Reagen Neogen Deteksi Molekuler 2 untuk Pengujian *Cronobacter* dalam strip.
   5.3 Tutup Tabung Reagen Neogen Deteksi Molekuler 2 - untuk pengujian *Cronobacter* dengan tutup tambahan yang tersedia dan gunakan sisi bulat pada Reagen-Alat Penutup/Pembuka Deteksi Molekuler Neogen untuk memberikan tekanan dengan bergerak maju-mundur guna memastikan bahwa tutup sudah terpasang rapat.
   5.4 Ulangi langkah 5.1 hingga 5.3 sesuai keperluan, sesuai jumlah sampel yang akan diuji.
   5.5 Setelah semua sampel lisat dipindahkan, ulangi 5.1 sampai 5.3 untuk mentransfer 20 µL lisat NC ke dalam Tabung Reagen Neogen Deteksi Molekuler 2 untuk Pengujian - *Cronobacter*.
   5.6 Transfer **20 µL lisat NC ke dalam Tabung Kontrol Reagen Neogen.** Semprotkan dengan kemiringan tertentu sehingga tidak mengganggu pelet. Campurkan dengan cara menyedot dan menyemprotkan perlahan-lahan sebanyak 5 kali.
6. Masukkan tabung tertutup ke dalam Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen yang bersih dan yang telah didekontaminasi. Tutup dan segel tutup Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen.



7. Periksa dan konfirmasi proses yang telah dikonfigurasi di Perangkat Lunak Deteksi Molekuler Neogen.
8. Klik tombol Start di perangkat lunak dan pilih instrumen yang akan digunakan. Tutup instrumen yang dipilih akan membuka secara otomatis.
9. Masukkan Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen ke Instrumen Deteksi Molekuler Neogen dan tutup dengan rapat untuk memulai pengujian. Hasilnya akan ditampilkan setelah 60 menit, meskipun hasil positif dapat terdeteksi lebih cepat.
10. Setelah pengujian selesai, keluarkan Baki Pemuat Kecepatan Deteksi Molekuler Neogen dari Instrumen Deteksi Molekuler Neogen dan buang tabung dengan merendamnya ke dalam larutan pemutih rumah tangga 1-5% (v:v dalam air) selama 1 jam dan jauhkan dari area persiapan untuk pengujian.

PERHATIAN: Untuk meminimalkan risiko yang positif salah karena kontaminasi silang, jangan membuka tabung reagen yang berisi DNA hasil amplifikasi. Ini termasuk Tabung Reagen Neogen Deteksi Molekuler 2 untuk Pengujian - *Cronobacter*, Tabung Kontrol Reagen Neogen, dan Tabung Kontrol Matriks Neogen. Buang tabung reagen yang tersegel dengan merendamnya ke dalam larutan pemutih rumah tangga 1-5% (v:v dalam air) selama 1 jam dan jauhkan dari tempat persiapan pengujian.

Hasil dan Interpretasi

Algoritma menginterpretasikan kurva keluaran cahaya yang dihasilkan dari deteksi amplifikasi asam nukleat. Hasil dianalisis secara otomatis oleh perangkat lunak dan diberi kode warna berdasarkan hasil tersebut. Hasil yang Positif atau Negatif ditentukan dari analisis sejumlah parameter kurva khusus. Hasil yang dianggap positif dilaporkan dalam waktu nyata sedangkan hasil Negatif dan perlu Pemeriksaan akan ditampilkan setelah pengujian selesai.

CATATAN: Sampel yang negatif tidak akan memberikan hasil pembacaan nol karena sistem dan reagen amplifikasi Neogen Deteksi Molekuler 2 untuk Pengujian *Cronobacter* memiliki pembacaan unit cahaya relatif (RLU) "latar belakang".

Konfirmasi

- Konfirmasi hasil sesuai dengan Metode Sertifikasi NF VALIDATION

Dalam konteks NF VALIDATION, semua dugaan pengayaan positif harus dikonfirmasi dengan konfirmasi metode referensi berikut[(2)], dimulai dengan transfer dari pengayaan primer (BPW ISO atau BPW ISO dengan suplemen 10 mg/L vancomycin).

- Protokol konfirmasi lainnya

Pngayaan yang dianggap positif harus dikonfirmasi sesuai dengan standar prosedur pengoperasian laboratorium atau dengan mematuhi metode konfirmasi rujukan yang sesuai[(1,2)], dimulai dengan memindahkan dari pengayaan primer (BPW ISO atau BPW ISO dengan suplemen 10 mg/L vancomycin) hingga ke media pengayaan sekunder, dilanjutkan dengan pengusapan dan konfirmasi isolat menggunakan metode biokimia, serologi, dan/atau molekuler.

Meskipun jarang terjadi, jika output cahaya tidak normal, algoritma akan memberi label perlu Pemeriksaan. Neogen menyarankan pengguna mengulang pengujian untuk sampel yang perlu Pemeriksaan. Jika hasil tetap menunjukkan perlu Pemeriksaan, lanjutkan ke pengujian konfirmasi dengan menggunakan metode pilihan Anda atau sebagaimana ditentukan oleh peraturan setempat[(1,2)].

Dalam hal terjadi hasil yang tidak sesuai (dianggap positif dengan Neogen Deteksi Molekuler 2 untuk Pengujian *Cronobacter*, yang tidak dikonfirmasi oleh salah satu cara yang diuraikan di atas), laboratorium harus mematuhi prosedur operasi standar yang ditetapkan untuk melaporkan hasilnya.

Apabila Anda memiliki pertanyaan yang spesifik tentang penerapan atau prosedur, silakan kunjungi situs web kami di www.neogen.com atau hubungi perwakilan atau distributor Neogen setempat.

Apendiks A. Interupsi Protokol: Penyimpanan dan pengujian ulang lisat yang dipanaskan

1. Untuk menyimpan lisat yang dipanaskan, tutup ulang tabung **Lisis** dengan penutup bersih (lihat bagian Lisis, 4.5)
2. Simpan pada 2 hingga 8°C sampai 72 jam.
3. Siapkan sampel yang disimpan untuk amplifikasi dengan membalik 2-3 kali untuk menyampur.
4. Lepas penutup tabung.
5. Letakkan tabung lisat campuran pada Sisipan Blok Pemanas Deteksi Molekuler Neogen dan panaskan pada suhu 100 ±1°C selama 5 ±1 menit.
6. Lepaskan rak tidak tertutup Tabung Larutan Lisis Neogen dari blok pemanasan dan biarkan dingin dalam Sisipan Blok Pendingin Deteksi Molekuler Neogen paling sedikit 5 menit dan maksimum 10 menit.
7. Lanjutkan protokol pada bagian **Amplifikasi** yang dijelaskan di atas.

Referensi:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) Ch. 29; MAR 2012
2. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.
3. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
4. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218:2007/Amd. 1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.
6. Installation Qualification (IQ)/Operational Qualification (OQ) Neogen® Molecular Detection System. Contact your Neogen Food Safety representative to obtain a copy of this document.
7. ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-- Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
8. ISO 6887-4:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.
9. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

Rujuk ke versi terbaru metode standar yang dicantumkan di atas.

Penjelasan Simbol

info.neogen.com/symbols

Neogen Food Safety

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

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

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



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

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.
Neogen is a trademark of Neogen Corporation.
FS00879A