



Simultaneous Multiplex Real Time PCR (SIMUL-qPCR)

Listeria species & monocytogenes Assay

Inserto del kit acorde al flujo de trabajo AOAC PTM

USO PREVISTO Y APLICACIONES

El ensayo SIMUL-qPCR puede ser utilizado por productores de alimentos y laboratorios asociados para la detección rápida y confiable de *Listeria* spp. y *Listeria* Monocytogenes en muestras ambientales y de alimentos. Todos los ensayos del sistema SIMUL-qPCR están diseñados para tener el mismo tiempo de ejecución, lo que permite la identificación simultánea de todos los ensayos SIMUL-qPCR. Además, cada ensayo utiliza la técnica "Multiplex" lo que permite la amplificación de múltiples objetivos durante la misma corrida. El ensayo SIMUL-qPCR *Listeria* spp. & *Listeria* Monocytogenes incorpora un enfoque "Multiplex" para detectar de manera simultánea *Listeria* spp. y *Listeria* Monocytogenes.

El ensayo "Simultaneous Multiplex Real Time PCR (SIMUL-qPCR) *Listeria* species & monocytogenes" ha sido validado por AOACTM Research Institute Performance Test MethodsTM para la detección de *Listeria* spp. y *Listeria* Monocytogenes en salchichas, jamón de pavo listo para comer, huevos cocidos, queso fresco crudo, ensalada de pollo, helado (sorbete), leche pasteurizada y camarones congelados / cocinados así como muestras ambientales de acero inoxidable, baldosas de cerámica, caucho, plástico y concreto armado. Los métodos USDA FSIS y FDA BAM fueron utilizados como métodos de comparación. El ensayo "SIMUL-qPCR *Listeria* spp. and monocytogenes" demostró ser equivalente a los métodos de referencia. El límite de detección del presente ensayo "SIMUL-qPCR" es 1,000 UFC/mL post-enriquecimiento.

INFORMACION DEL PRODUCTO

SKU	DESCRIPCION	UM / CANTIDAD
SMRT-LSLM-096	SIMUL-qPCR <i>Listeria</i> species and monocytogenes Assay Kit	1 KIT 96 Tests/Kit

COMPONENTES DEL KIT

SKU	DESCRIPCION	CANTIDAD
KC-SMRT-LYB-25	Buffer de Lisis	96 reacciones 2 frascos 1 pouch
KC-SMRT-LSLM-8S	Tubos para PCR	96 tests 12 tiras de 8 tubos con tapas 1 pouch



p 972 213 6032 | appliedfooddiagnostics.com

387 Hazle Street, Nuremberg, PA 18241

FUNDAMENTO

El presente protocolo contiene un enfoque multifacético para la detección de *Listeria* spp. en una variedad de alimentos y muestras ambientales. Se utiliza un medio específicamente formulado para enriquecer las muestras seguido por procedimientos de detección por cultivo (detección por placa) o detección rápida (qPCR). El caldo de recuperación y enriquecimiento para *Listeria* (LREB) combina componentes nutricionales e ingredientes adicionales que son necesarios para la recuperación y enriquecimiento de *Listeria* de forma selectiva. Los agentes selectivos presentes en el medio LREB han sido optimizados para inhibir eficientemente la normal competencia bacteriana sin afectar el crecimiento de *Listeria*. El medio LREB incluye agentes "buffer" para garantizar el crecimiento en una variedad de matrices.

Durante la amplificación por PCR, los "primers" directos e inversos se hibridan con secuencias de ADN genómico de *Listeria* spp. Y *Listeria* monocytogenes. Se incluye una sonda fluorogénica en la misma mezcla de reacción que consiste en una sonda de ADN marcada con un indicador en la posición 5' y una molécula de inhibición en la posición 3'. Durante la amplificación por PCR, la sonda es cortada y tanto el indicador como la molécula de inhibición son separadas emitiendo fluorescencia. El aumento en la fluorescencia puede ser detectado en un instrumento para PCR tiempo real. Dos sondas únicas y específicas están presentes en este ensayo. La sonda objetivo para *Listeria* spp. se encuentra en la longitud del canal FAMTM. La sonda objetivo para *Listeria* monocytogenes se encuentra en la longitud del canal CAL Fluor® Orange 560. Un control de amplificación interno (IAC) se encuentra incluido en la longitud del canal CAL Fluor® Red 610.

La combinación de detecciones múltiples garantiza eficiencia y optimiza la relación costo-beneficio.

MATERIALES ADICIONALES REQUERIDOS

Otros materiales necesarios No proporcionados incluyen:

PARA TODAS LAS MUESTRAS

- AFD caldo de recuperación y enriquecimiento para *Listeria* (LREB)
- Sistema PCR tiempo-real MyGo Pro y software MyGo Pro v3.4
- Autoclave
- Agua Destilada / desionizada
- Bolsas estériles tipo Stomacher
- Stomacher
- Incubadora: a 30 ± 1°C
- Incubadora: a 35 ± 1°C
- Bloques térmicos con insertos
- Vortex
- Termómetros calibrados
- Herramienta de Apertura / Cierre de tubos PCR (opcional)
- Mini-centrífuga (opcional)
- Pipeta Monocanal ajustable
- Pipeta Multi-canal ajustable
- Tubos para centrifuga de 1.5 ml o equivalente grado PCR para lisis
- Rack para tubos de microcentrífuga
- Guantes sin polvo
- Equipo de laboratorio de rutina
- Control Positivo (Opcional)
- Control Negativo (Opcional)

MUESTRAS AMBIENTALES

- AFD Quick Release Sampler Hydrated with Neutralizing and Recovery Buffer (SKU#: SC-SQRS-NRB-100)
- AFD Quick Release Sampler Hydrated with Neutralizing Buffer (SKU#: SC-SQRS-NB-100)
- AFD Quick Release Sampler Hydrated with Lethen Broth (SKU#: SC-SQRS-LB-100)
- AFD MEMP Swab Kit (SKU#: MEMP-SWB-032)
- Otros hisopos comerciales disponibles

PRECAUCIONES

Este producto es solo para uso diagnóstico in vitro. No ingerir, inhalar ni permitir que entren en contacto con la piel. Observe las precauciones de riesgo biológico aprobadas y las técnicas asépticas. Se deben ejercer procedimientos de nivel 2 de bioseguridad (BMBL, <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/bml.pdf> o sitio actual). Se debe tener mucho cuidado al manipular muestras de prueba y caldos de enriquecimiento. Todos los caldos de enriquecimiento, platos y otros artículos pueden contener varios patógenos, ya sea que contengan o no especies de *Listeria*. Este kit debe ser utilizado únicamente por personal de laboratorio debidamente capacitado y calificado en un entorno de laboratorio. Todas las muestras de laboratorio deben considerarse infecciosas y manejarse adecuadamente.

PROCEDIMIENTO

Preparación del Medio – Método con Autoclave

1. Use un recipiente limpio para cada litro de preparación de medio.
2. Agite el recipiente del LREB antes de cada uso.
3. Pese 37.0 g del medio dentro del recipiente limpio y agregue 1 litro de agua destilada / desionizada.
4. Revuelva constantemente y caliente la solución hasta que el polvo se disuelva. El rango aceptable de pH es 7.2 ± 0.2.
5. Esterilice los recipientes con el medio preparado en autoclave a 121°C por 15 min.
6. Enfríe los recipientes a temperatura ambiente. El medio es estable a temperatura ambiente o puede almacenarse a 2–8°C por hasta 45 días. Mantenga alejado de la luz.

Preparación del Medio – Método sin Autoclave

1. Use un recipiente limpio y estéril por cada litro de medio a preparar.
2. Agite el recipiente del LREB antes de cada uso.
3. Pese 37.0 g del medio dentro del recipiente limpio y agregue 1 litro de agua estéril destilada / desionizada.
4. Revuelva constantemente y caliente la solución hasta que el polvo se disuelva. El rango aceptable de pH es 7.2 ± 0.2.
5. Enfríe el medio preparado a la temperatura adecuada (35 ± 1°C) y use inmediatamente.

Preparación del Medio – Medio Listo para Usar

1. Coloque en una bolsa estéril agua tipo 2 (grado laboratorio ASTM D1193) pre-calentada (35 ± 1°C) con el volumen adecuado acorde al tamaño del pouch del medio.
2. Golpee con el dedo en la parte de arriba de la línea de corte del pouch para eliminar el medio en esa zona. Abra el pouch en la línea de pre-corte y vacíe el contenido en la bolsa con agua.
3. Agite manualmente o con medios mecánicos (Stomacher) hasta que el polvo se disuelva.
4. Use dentro de tres a cuatro horas manteniendo la temperatura a 35 ± 1°C.

PREPARACION DE MUESTRAS AMBIENTALES

Espanja

1. Cuando esté listo para la prueba, pre-caliente el medio LREB preparado a 35 ± 1°C.
2. Agregue el LREB precalentado a cada esponja. Consulte la tabla de enriquecimiento de muestras para conocer los volúmenes aceptables de medio.
3. Homogenice la muestra durante 30 segundos en un Stomacher o equivalente. La mezcla manual es una alternativa aceptable para sustituir el Stomacher. Para mezclar a mano, masajee cada esponja que está en la bolsa cerrada durante aproximadamente un minuto.
4. Incube la muestra. Consulte la tabla de enriquecimiento de muestras para conocer las condiciones de enriquecimiento.

Hisopo / Torunda

1. Cuando esté listo para la prueba, pre-caliente el medio LREB preparado a 35 ± 1°C.
2. Agregue 9 ml de LREB precalentado a cada muestra de hisopo en su vial.
3. Incube las muestras. Consulte la tabla de enriquecimiento de muestras para conocer las condiciones de enriquecimiento.

Ensayo MEMP para Hisopado

1. Refiérase al inserto del kit de ensayo Molecular Environmental Monitoring Program (MEMP) para detección de *Listeria*.
2. Muestree y procese el lisado directamente como se indica en el ensayo AFD MEMP.
3. Proceda con el ensayo AFD MEMP.
4. Cualquier muestra que resulte positiva en el ensayo AFD MEMP debe ser enriquecida y analizada en el ensayo SIMUL-qPCR *Listeria* para confirmación. Agregue el hisopo retenido y la solución de muestra a 9 mL de LREB e incube por 30-36 horas a 30 ± 1°C.

PREPARACION DE MUESTRAS DE ALIMENTOS

1. Muestree asépticamente el producto y colóquelo en una bolsa estéril.
2. Cuando este listo para la prueba, pre-caliente el medio LREB preparado a 35 ± 1°C.
3. Agregue el LREB precalentado a la muestra. Consulte la tabla de enriquecimiento de muestras para conocer los volúmenes de medios aceptables.
4. Homogenice la muestra durante 30 segundos en un stomacher o equivalente. La mezcla manual es una alternativa aceptable para sustituir el stomacher. Para mezclar a mano, masajee cada muestra que está en la bolsa cerrada durante aproximadamente un minuto.
5. Incube la muestra. Consulte la tabla de enriquecimiento de muestras para conocer las condiciones de enriquecimiento.

MEDIO LREB - ENRIQUECIMIENTO DE MUESTRAS		
Incubación: 30 ± 1°C por 30-36 horas		
MATRIZ	TAMAÑO DE MUESTRA / UNIDAD	VOLUMEN DE MEDIO
Hisopado Ambiental*	/Hisopo	9 mL ± 1 mL
AFD MEMP Hisopo retenido*	/Hisopo	9 mL ± 1 mL
Esponja Ambiental*	/Esponja	90 mL ± 10 mL
Salchichas	/125 g	1 L ± 50 mL
Jamón de Pavo	/125 g	1 L ± 50 mL
Queso Fresco (Crudo)	/25 g	225 mL ± 15 mL
Ensalada de Pollo	/25 g	225 mL ± 15 mL
Helado (Sorbete)	/25 g	225 mL ± 15 mL
Huevos Cocidos	/25 g	225 mL ± 15 mL
Leche Pasteurizada	/25 g	225 mL ± 15 mL
Leche Pasteurizada	/25 g	225 mL ± 15 mL

*Superficies Validadas son acero inoxidable, plástico, caucho, baldosas de cerámica y concreto armado.

PREPARACION DEL ENSAYO

- Al final de la fase de enriquecimiento, proceda con el protocolo de lisis para muestras simples.
- La configuración del qPCR y el ingreso de datos deben completarse antes de transferir las muestras.
- Preparación del equipo:
 - Encienda los bloques de calentamiento a 95 ± 3°C verificado con un termómetro calibrado.
 - Encienda el instrumento qPCR y cree el archivo de ejecución desde la plantilla SIMUL-qPCR. La plantilla SIMUL-qPCR contiene el ciclo requerido. Para *Listeria* spp. seleccione como objetivo *Listeria* spp. Para *Listeria monocytogenes* seleccione como objetivo *Listeria monocytogenes*. Para analizar ambos, *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes* seleccione ambos.
- Después de tomar la alícuota requerida para la lisis regrese el (los) enriquecimiento (s) a la incubadora.

CONFIGURACION DEL INSTRUMENTO qPCR

- Consulte la guía de configuración y el manual del software Mygo Pro PCR para obtener instrucciones más detalladas.
- Seleccione los archivos de la plantilla AFD para comenzar a ejecutar la configuración. La plantilla AFD contiene todos los ajustes del instrumento qPCR necesarios para realizar el análisis. No cambie ninguna configuración en las pestañas "Experiment", "Run Profile", o "Data".
- En la pestaña "Samples", complete los campos de muestras de acuerdo con la ubicación del tubo al que corresponda.
- Incluya el número del lote del kit en el campo "Notes".
- Agregue los objetivos a cada muestra.
- Después de colocar los lisados haga clic en "Start Run".

PROTOCOLO DE LISIS DE MUESTRAS ENRIQUECIDAS

Posterior a la incubación, siga los siguientes pasos para el lisado de las muestras:

- Etiquete un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL o un tubo de plástico grado PCR por muestra.
- Pipetee asépticamente 400 µL de buffer de lisis en cada tubo, Regrese el buffer de lisis a refrigeración (2-8°C).
- Pipetee 5 µL de la muestra enriquecida en cada tubo preparado. Tape los tubos y agite en vortex.
- Caliente los tubos cerrados durante 10 minutos a 95 ± 3°C en el bloque de calentamiento.
- Retire los tubos cerrados del bloque de calentamiento.
- Deje que los tubos se enfríen durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Proceda directamente con el ensayo de *Listeria* SIMUL-qPCR o mantenga el lisado en el refrigerador (2-8°C) hasta 48 horas antes de proceder al ensayo SIMUL-qPCR *Listeria*.

CONFIGURACION DEL ENSAYO SIMUL-qPCR

- Organice las tiras de tubos de PCR de acuerdo con su archivo de ejecución.
- Con precaución, retire las tapas de la tira de tubos.
- Pipetee 20 µL de lisado en los tubos de las tiras para PCR, asegúrese que el pellet esté hidratado. Los pellets para PCR deben hidratarse y re-sellarse dentro de 10 minutos después de la apertura de las tapas de los tubos para PCR.
- Coloque las tapas en cada tubo y presione hacia abajo para sellar cada tapa.
- Asegúrese de que cada tapa esté bien asegurada antes de ejecutar la prueba.
- Si hay burbujas de aire, mueva cuidadosamente los tubos de reacción hasta que no queden burbujas de aire.
- Gire brevemente los tubos de reacción en una minicentrífuga.
- Coloque los tubos en el instrumento qPCR e inicie el ensayo.

RESULTADOS DEL ENSAYO SIMUL-qPCR

Una vez que se complete el ensayo SIMUL-qPCR, el software analiza los datos automáticamente. El software analiza cualquier dato de amplificación de ADN y mostrará un valor Cq para cualquier muestra que se amplifique. La amplificación en el canal FAMTM indica *Listeria* spp. La amplificación en el canal CAL Fluor® Orange 560 indica *Listeria monocytogenes*. Solo un valor Cq que tenga una curva sigmoidal típica o el inicio de la curva se considera positivo para el objetivo. Cuando no se obtiene un valor Cq, el resultado es negativo para el objetivo. Cuando no se obtiene un valor Cq, el resultado es negativo para el objetivo siempre que haya un valor Cq presente en el canal CAL Fluor® Red 610 para el IAC (Control Interno de Amplificación).

Todas las muestras positivas deben ser confirmadas por los métodos FDA BAM <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/Laboratory-Methods/ucm071418.htm> o USDA FSIS MLG <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/MLG-8.pdf?MOD=AJPERES>.

ALMACENAMIENTO Y VENCIMIENTO DEL PRODUCTO

Almacene el kit sellado a 2 - 8°C. Una vez abierto, proteja los componentes del kit de la humedad y la luz manteniendo los recipientes bien cerrados después de cada uso. Vuelva a sellar los tubos qPCR en una bolsa de aluminio con cierre hermético. La fecha de caducidad se indica en el paquete.

DESCARTE

Deseche todos los materiales utilizados y el medio de enriquecimiento en autoclave o de acuerdo con las prácticas aprobadas.

Asegúrese de que todos los desechos de riesgo biológico se eliminen de acuerdo con las reglamentaciones locales, municipales, provinciales, estatales y / o federales.

INFORMACION TECNICA

Si tiene alguna pregunta o problemas de experiencia con este kit, comuníquese con nuestro personal de soporte por correo electrónico. (support@appliedfooddiagnostics.com). Para más información relacionada con Applied Food Diagnostics, Inc., por favor visite nuestra página web (www.appliedfooddiagnostics.com).

CONTROL DE CALIDAD

Todos los productos fabricados por Applied Food Diagnostics, Inc. se encuentran incluidos dentro del programa de aseguramiento de calidad desde el momento en que las materias primas llegan a la fábrica hasta la comercialización del producto final. Cada lote de producto final se somete a un control de calidad y solo se comercializa si cumple con los criterios de aceptación. Se archiva la documentación relativa a la producción y verificación de cada lote. Un certificado de análisis de control de calidad y las hojas de datos de seguridad están disponibles en la página web www.appliedfooddiagnostics.com.

TERMINOS Y CONDICIONES

Applied Food Diagnostics, Inc. no hace representaciones y garantías con respecto a sus productos que no sean los establecidos en este documento. Todos los productos entregados a continuación por Applied Food Diagnostics, Inc., sus afiliados, o cualquier otra persona en su nombre, serán fabricados al momento de la entrega para cumplir con las especificaciones de Applied Food Diagnostics, Inc. y todas las leyes aplicables. Todos los demás términos, condiciones y garantías, incluida cualquier garantía de comerciabilidad, calidad, idoneidad o idoneidad para un propósito particular o previsto, implícito en la ley o estatuto común (garantías implícitas) están expresamente excluidos.

RENUNCIA DE RESPONSABILIDAD

Este kit y sus características de rendimiento fueron desarrollados por Applied Food Diagnostics, Inc., para uso en laboratorio. Cualquier desviación de este protocolo no está autorizada por Applied Food Diagnostics, Inc.

LICENCIA DE ETIQUETA DE USO LIMITADO

Este producto está cubierto por al menos uno o más claims de solicitudes de patentes de EE. UU., que tienen licencia de Applied Food Diagnostics, Inc. Este producto se vende estrictamente para uso del comprador, y el comprador no está autorizado para transferir este producto, o cualquier material que use este producto, a cualquier tercero.

* Todas las marcas registradas son propiedad de sus respectivos dueños.



p 972 213 6032 | appliedfooddiagnostics.com
387 Hazle Street, Nuremberg, PA 18241



p 972 213 6032 | appliedfooddiagnostics.com
387 Hazle Street, Nuremberg, PA 18241