

Read instructions carefully before starting test

Reveal[®]

for

E. coli 0157:H7

AOAC Official Method

No. 2000.13 (8-hour enrichment for 25 g samples, 12-hour enrichment for 375 g samples)

No. 2000.14 (20-hour enrichment for both 25 g and 375 g samples)

Neogen Corporation certifies that Reveal for *E. coli* 0157:H7 meets all the requirements specified in AOAC Official Methods 2000.13 and 2000.14, *Escherichia coli* in selected foods, gold-labeled immunosorbent assay (GLISA).

INTENDED USE

The Reveal[®] for *E. coli* 0157:H7 test system provides for the rapid recovery of *Escherichia coli* 0157:H7 organisms in various foods, allowing detection and presumptive identification of the test organism in as little as 8 hours.

In an AOAC Official Methods study, the Reveal for *E. coli* 0157:H7 8-hour test system was found to be an effective procedure for the detection of *E. coli* 0157:H7 in raw ground beef, raw beef cubes and iceberg lettuce rinse. In a second AOAC Official Method study, the Reveal for *E. coli* 0157:H7 20-hour test system was found to be an effective procedure for the detection of *E. coli* 0157:H7 in raw ground beef, raw beef cubes, apple cider, iceberg lettuce rinse and stainless steel environmental swabs.

ASSAY PRINCIPLES

This system can utilize various enrichment media to provide *E. coli* 0157:H7 with readily available nutrients and other factors required for its survival and rapid growth. Used with Reveal[®] media, the system can provide results within 8 or 20 hours for 25 g samples, or results within 12 or 20 hours for 375 g samples.

A portion (120 µL) of the enrichment culture is placed into the round sample port of the Reveal test device. This sample is wicked through a reagent zone that contains specific antibodies (anti-*E. coli* 0157:H7) conjugated to colloidal gold particles. If target antigens are present in the sample, they will bind to the gold-conjugated antibodies. This antigen-antibody complex then leaves the reagent zone and travels through the nitrocellulose membrane that contains a zone of anti-*E. coli* 0157:H7 antibody. The immune complex with gold conjugate is captured and aggregates in this zone, thus displaying a visible line. The remainder of the sample continues to migrate to the end of the membrane where it will eventually become deposited into a waste reservoir.

The reagent zone also contains gold conjugate of a proprietary antigen (color indicator), which is eluted by the sample solution regardless of the presence of *E. coli* 0157:H7 antigen. The gold-conjugated control indicator migrates through the membrane to the negative control capture zone (antibody to the proprietary antigen), where it is captured and aggregated to form a visible line. Regardless of the presence or absence of the *E. coli* 0157:H7 antigen, the control line will form in the control zone, ensuring the test is working properly.

INTENDED USER

This test system is designed for use by personnel familiar with the appropriate aseptic techniques for the isolation and identification of *E. coli* 0157:H7. Training, which is available through Neogen, is recommended for those without a basic knowledge of microbiology.

MATERIALS PROVIDED

Reveal test kit

1. 20 Reveal for *E. coli* O157:H7 test devices
2. 20 transfer pipettes

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Stomacher-type bags (Neogen item 9736)
2. Sample bags, 3500 mL (Neogen item 9738)
3. Scale (Neogen item 9427)
4. Timer (Neogen item 9426)
5. Sterile water

For 8-hour test system:

1. 13 x 100 mm polypropylene or glass tubes (Neogen item 9438)
2. Incubator capable of maintaining $42 \pm 1^\circ\text{C}$ (Neogen item 9735)
3. Disposable sterile pipettes capable of transferring 5 mL samples (Neogen item 9415)
4. Water bath or equivalent heating source (e.g., Bunsen burner, heater block (Neogen item 9412), microwave oven)

For 20-hour test system:

1. Incubator capable of maintaining $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (Neogen item 9735)

OPTIONAL MATERIALS

1. Stomacher 400 machine or equivalent

STORAGE

Store Reveal devices between $2\text{--}30^\circ\text{C}$ when not in use. Store dry media at room temperature ($15\text{--}30^\circ\text{C}$).

TESTING DIFFERENT COMMODITIES

Reveal for *E. coli* O157:H7 is an effective test for a variety of commodities. Please contact a Neogen representative for an updated list of the validated commodities or a validation study for a specific commodity.

PRECAUTIONS

1. Do not use expired media.
2. Allow test devices to warm to room temperature before opening pouch.
3. Use rehydrated medium within 6 hours of preparation.
4. Use of incubation times or temperatures other than those specified may cause erroneous results.
5. Sample bags must be closed loosely to allow air exchange during incubation, which is vital to survival and antigenic expression by *E. coli* O157:H7.
6. Sterile water should be brought to $42 \pm 1^\circ\text{C}$ before use when using 8 hour medium.
7. Test culture(s) within 4 hours post incubation if using the 8 hour test system, and within 8 hours post-incubation if using the 20 hour test system.
8. Good microbiological laboratory practices should be used where appropriate.

SAMPLE PREPARATION AND CULTIVATION

8 hour test system

1a. 25 g samples

- a. **Media preparation.** Transfer the contents of 1 pouch of unitized Reveal 8 Hour Medium (Neogen item 9760) or 8.9 g of bulk Reveal 8 Hour Medium (Neogen item 9765) into a Stomacher-type bag. Add 225 mL of 42°C sterilized water. Close the bag tightly about 2–3 inches from the top, support bottom, and shake vigorously until medium is dissolved. Place Stomacher-type bag in a rack or other support. The medium can be held at 42°C until used, but no more than **6 hours**. For best results, use media soon after it is prepared.
- b. **Adding sample.** Combine 25 g of sample with the media, grasp bag tightly at top and knead until mixed. Shake bag vigorously using a side-to-side motion to ensure complete mixing.
ALTERNATIVE: Place bag in Stomacher machine and mix for **2 minutes** at normal speed.

- 1b. 375 g samples
 - a. **Media preparation.** Add 133.5 g of Reveal 8 Hour Medium (Neogen items 9765 or 9765B) into a 3500 mL sample bag (Neogen item 9738) and add 3375 mL of 42°C sterile water. Fold the bag over several times 2 or 3 inches from the top, and mix vigorously until dissolved. Place the sample bag in a 2 gallon bucket or other support. The medium can be held at 42°C until used. For best results, use medium soon after it is prepared.
 - b. **Adding sample.** Combine 375 g of sample with the media, grasp bag tightly at top and knead until mixed. Shake bag vigorously using a side-to-side motion to ensure complete mixing.
2. **Incubation.** Close bag loosely. Incubate 25 g samples at $42 \pm 1^\circ\text{C}$ for **8 hours**. Incubate 375 g samples at $42 \pm 1^\circ\text{C}$ for **12 hours**. **Do not close bag tightly, as air exchange is required for optimum growth and antigen expression.**
3. **Mixing.** Remove the bag from the incubator after 8 hours or 12 hours depending on sample size. Grab the bag tightly 2–3 inches from the top, support bottom, and gently mix the contents of the sample bag using a side-to-side motion.
4. **Sample treatment.**
 - a. Using a sterile pipette, transfer about 5 mL of the sample to a polypropylene or glass tube. Heat sample by:
 - Placing tube in boiling water for **20 minutes** if using a polypropylene tube, or **10 minutes** if using a glass tube.

or

 - Securely capping the tube, placing it into a microwave, bringing to a boil, and quickly turning off the power.
 - b. Allow the tube to cool to room temperature (15–30°C). To cool tube faster, place under cool running water. Take care not to let any water get into the tube.

The sample is ready for testing. Proceed to Reveal Device Test Procedure.

20-hour test system

- 1a. 25 g sample
 - a. **Media preparation.** Transfer the contents of 1 pouch of unitized Reveal 20 Hour Medium (Neogen item 9770) or 8.3 g of bulk Reveal 20 Hour Medium (Neogen item 9758) into a Stomacher-type bag. Add 225 mL of $36 \pm 1^\circ\text{C}$ sterilized water. Close the bag tightly about 2–3 inches from the top, support bottom, and mix vigorously until medium is dissolved (about **1 minute**). Place Stomacher-type bag in a rack or other support. The media can be held at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ until used, but no more than **6 hours**. For best results, use media soon after it is prepared.
 - b. **Adding sample.** Combine 25 g of sample with the media, grasp bag tightly at the top and knead until mixed. Shake bag vigorously using a side-to-side motion to ensure complete mixing. **ALTERNATIVE:** Place in a Stomacher machine and mix for **2 minutes** at normal speed.
- 1b. 375 g samples
 - a. **Media preparation.** Add 124.5 g of Reveal 20 Hour Medium (Neogen items 9758 or 9758B) into a 3500 mL sample bag (Neogen item 9738) and add 3375 mL of 36°C sterile water. Fold the bag over several times, 2–3 inches from the top, and mix vigorously until dissolved. Place the sample bag in a 2 gallon bucket or other support. The medium can be held at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ until used, but no more than **6 hours**. For best results, use media soon after it is prepared.
 - b. **Adding sample.** Combine 375 g of sample with the medium, grasp bag tightly at the top and knead until mixed. Shake bag vigorously using a side-to-side motion to ensure complete mixing.
2. **Incubation.** Close bag loosely. Incubate sample bag at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ for **20 hours**. **Do not close bag tightly, as air exchange is required for optimum growth.**
3. **Mixing.** Remove bag from incubator after **20 hours**. Grab the bag tightly 2–3 inches from the top, support the bottom, and gently mix the contents of the sample bag using a side-to-side motion.

Sample types other than ground beef, beef cubes, apple cider, lettuce rinse, and environmental swabs:

Follow above instructions. For samples containing high levels of background microflora, increase incubation temperature to $42 \pm 1^\circ\text{C}$.

ALTERNATIVE ENRICHMENTS: Alternative 20-hour enrichments for the recovery of *E. coli* O157:H7 include Tryptic Soy Broth, Modified with Novobiocin (Neogen item 7694); Tryptic Soy Broth, Modified with Novobiocin and Acid Digest of Casein (Neogen item 7731); and EC Medium, Modified with Novobiocin (Neogen item 7700). All three enrichments have been or are currently being used by the USDA/FSIS and are available as dehydrated culture media from Neogen as part of the Acumedia product line.^{4,5,6,7}

Sample is ready for testing. Proceed to Reveal Device Test Procedure.

REVEAL DEVICE TEST PROCEDURE

1. Allow devices to come to room temperature (if stored refrigerated, about 25°C) prior to use.
2. Remove the required number of Reveal for *E. coli* O157:H7 test devices from the foil pouch(es). Place device on flat surface and label with appropriate sample identification.
3. Squeeze bulb on transfer pipette and insert stem into sample. Release pressure on bulb and draw up sample into stem portion only.

CAUTION: For boiled 8 hour samples:

- **Do not disturb** sample by vortex, stirring or shaking.
 - **Do not disturb** particle matter at base of the sample.
 - Remove **only** the liquid, not debris, from the sample.
4. Hold transfer pipette vertically over the sample port on the device and deliver 5 free falling drops into the port when using either 8- or 20-hour test system. **ALTERNATIVE:** Using a pipettor, add 120 µL of the sample liquid into the port.
 5. Observe and record test results immediately (within 60 seconds) after **15 minutes**.

PROCEDURAL NOTE: IF DEVICE FLOW PROBLEM EXISTS

If there is no flow in the device after adding the appropriate number of drops of sample to the device, add one more drop. Particulate matter may displace some of the needed volume to initiate the chromatographic flow of the test.

INTERPRETATION OF RESULTS

Visual interpretation

Results

Line in C and T zones in 15 minutes Positive
Line in C zone but no line in T zone Negative
If no line appears in the C zone, regardless if there is a line in the T zone Invalid

CONFIRMATION (OPTIONAL)

Neogen recommends that presumptively positive enrichment cultures are verified by plating a sample of the enrichment culture onto media described in BAM¹ or FSIS procedures.^{4,5,6,7}

NOTE: Testing a replicate subsample using BAM or FSIS procedures may not yield the same result as Reveal. Bacteria may not be evenly distributed within a sample (especially in dry or solid samples), hence the replicate subsample may not contain the organism at the onset.

DISPOSAL

Dispose (autoclave, bleach, etc.) of Reveal test devices, pipettes, and media in accordance with all applicable local, state, and federal regulations.

CUSTOMER SERVICE

Neogen Customer Assistance and Technical Services can be reached by using the contact information on the back of this booklet. Training on this product, and all Neogen test kits, is available.

SDS INFORMATION AVAILABLE

Safety data sheets (SDS) are available for this test kit, and all of Neogen's test kits, on Neogen's website at foodsafety.neogen.com, or by calling Neogen at 800/234-5333 or 517/372-9200.

TERMS AND CONDITIONS

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

WARRANTY

Neogen Corporation makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, Neogen will provide a replacement of the product. Buyer assumes all risk and liability resulting from the use of this product. There is no warranty of merchantability of this product or of the fitness of the product for any purpose. Neogen shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

BIBLIOGRAPHY

1. *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*, 8th Edition (1998), published and distributed by AOAC International, 481 N. Frederick Ave., Suite 500, Gaithersburg, MD 20877-2504 USA.
2. Edwards, P.R., and Ewing, W.H., *Identification of Enterobacteriaceae*, 3rd Ed., Burgess Publishing Co., Minneapolis, MN (1972).
3. Gray, L.D., *Manual of Clinical Microbiology*, 6th Ed., Edited by Murray, P.R., Baron, J.B., P.Faller, M.A., Tenover, F.C., and Tenover, R.H., American Society of Microbiology, Washington, D.C. pages 450-456 (1995).
4. Sharar, A. and Rose, B.; *Revision 4 of Laboratory Communication #38 Isolation and Identification of Escherichia coli O157:H7 from Meat*; FSIS publication (1994).
5. Cray Jr., W., et al.; *Revision #1; 9-6-99 of Laboratory Communication, Chapter 5: Isolation and Identification of Escherichia coli O157:H7 from Meat*; FSIS publication (1999).
6. *USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook*, 3rd Ed., Rev. 3 (10/25/02), www.fsis.gov/OPHS/microlab/mlg5.03.pdf.
7. *FSIS Constituent Update, Protecting Public Health Through Food Safety and Food Defense*, Volume 9, Issue 3 (01/25/08).

NOTES

PRODUCTS AVAILABLE

- 9750** **Reveal for *E. coli* O157:H7 8 Hour Complete System** – media and test devices to grow and detect *E. coli* O157:H7 using an 8-hour enrichment. Contains 20 devices and 20 foil pouches for 20 tests.
- 9751** **Reveal for *E. coli* O157:H7 20 Hour Complete System** – media and test devices to grow and detect *E. coli* O157:H7 using a 20 hour enrichment. Contains 20 devices and 20 media pouches for 20 tests.
- 9755** **Reveal for *E. coli* O157:H7** – one-step test providing visual results in 15–20 minutes after enrichment. Kit contains 20 devices.
- 9754** **Multi-Pack Reveal for *E. coli* O157:H7** – contains two 10-packs of devices.
- 9760** **Reveal 8 Hour Medium, unitized** – For 25 g samples (20 foil pouches).
- 9770** **Reveal 20 Hour Medium, unitized** – For 25 g samples (20 foil pouches).
- 9765** **Reveal 8 Hour Medium, 500 g**
- 9765B** **Reveal 8 Hour Medium, 2 kg**
- 9758** **Reveal 20 Hour Medium, 500 g**
- 9758B** **Reveal 20 Hour Medium, 2 kg**
- 9764** **Neogen's *E. coli* O157:H7 Confirmation Kit** – contains *E. coli* O157:H7 magnetic beads, buffer packets and chromogenic agar plates for 5 tests.
- 9764B** **Neogen's Bulk *E. coli* O157:H7 Confirmation Beads** – contains *E. coli* O157:H7 magnetic beads for 50 tests.
- 9735** **Incubator**
- 9427** **Electronic digital scale**
- 9411** **Heater block insert**
- 9412** **Dry bath incubator**
- 9736** **Stomacher®-type sampling bags, 24 oz Whirl-Pak (100)**
- 9738** **Sample bags, 3500 mL (250)**
- 9426** **Timer**
- 9438** **13 x 100 mm glass culture tubes, 1,000**
- 9415** **10 mL sterile serological pipettes, 500**
- 9469** **7 mL polypropylene tubes w/caps, 1,000**
- 9440** **Tube rack, 13 mm**
- 9445** **Incubator basket, large**
- 9277** **Pipette pump**



North America

Neogen Headquarters

800/234-5333 (USA/Canada)
foodsafety@neogen.com
foodsafety.neogen.com/en

Europe, Middle East and Africa

Neogen Europe

+ 44 (0) 1292 525 600
info_uk@neogeneurope.com
foodsafety.neogen.com/uk

Mexico

Neogen Latinoamerica

+52 (55) 5254-8235
informacion@neogenlac.com
foodsafety.neogen.com/sp

Brazil

Neogen do Brasil

+55 19 3935.3727
info@neogendobrasil.com.br
foodsafety.neogen.com/pt

China

Neogen Bio-Scientific Technology

+86 21 6271 7013
info@neogenchina.com.cn
www.neogenchina.com.cn

India

Neogen Food and Animal Security

+91 484 2306598, 2301582
info@neogenindia.com
www.neogenindia.com

Por favor lea las instrucciones cuidadosamente antes de realizar la prueba

Reveal®

para
***E. coli* 0157:H7**

Método Oficial de la AOAC

**No. 2000.13 (enriquecimiento de 8-horas para muestras de 25 g,
enriquecimiento de 12-horas para muestras de 375 g)**

No. 2000.14 (enriquecimiento de 20-horas para muestras de 25 g y 375 g)

Neogen Corporation certifica la conformidad de Reveal para *E. coli* 0157:H7 con los requerimientos especificados en los métodos oficiales de la AOAC (AOAC Official Methods) 2000.13 y 2000.14, *Escherichia coli* en ciertos alimentos, ensayo de inmunoadsorción marcado con oro (GLISA).

PROPÓSITO DE USO

El sistema de prueba de Reveal® para *E. coli* 0157:H7 proporciona una recuperación rápida del organismo *E. coli* 0157:H7 en una variedad de alimentos, permitiendo la detección e identificación presuntiva del organismo de prueba en tan sólo 8 horas.

En un estudio oficial de la AOAC se encontró que la prueba de Reveal para *E. coli* 0157:H7 de 8 horas es un procedimiento efectivo para la detección de *E. coli* 0157:H7 en carne de vaca cruda molida, cubos de carne cruda de vaca y agua de enjuague de lechuga. En un segundo estudio oficial de la AOAC se encontró que la prueba de Reveal para *E. coli* 0157:H7 de 20 horas es un procedimiento efectivo para la detección de *E. coli* 0157:H7 en carne de vaca cruda molida, cubos de carne cruda de vaca, sidra o jugo de manzana, agua de enjuague de lechuga e hisopos usados en pruebas ambientales en superficies de acero inoxidable.

FUNDAMENTO DEL ANÁLISIS

El sistema puede utilizar una variedad de medios de enriquecimiento para proporcionar al *E. coli* 0157:H7 con un suministro de nutrientes fácilmente accesible y otros factores requeridos para la supervivencia y un crecimiento rápido. Con el uso del medio de Reveal, el sistema puede proporcionar resultados para muestras de 25 g dentro de 8 o 20 horas y resultados para muestras de 375 g dentro de 12 o 20 horas.

Una porción (120 µL) del cultivo de enriquecimiento se coloca en el puerto de muestreo redondo del dispositivo de prueba de Reveal. La muestra pasa, por acción capilar, a través de una zona de reacción que contiene anticuerpos específicos (anti-*E. coli* 0157:H7) conjugados con partículas de oro coloidales. Si el antígeno objetivo está presente en la muestra, se unirá a los anticuerpos conjugados con oro. Este complejo de antígeno-anticuerpo fluye hacia la zona de reacción y pasa a través de una membrana de nitrocelulosa que contiene una zona de anticuerpos anti-*E. coli* 0157:H7. El complejo inmune conjugado con oro es capturado y agregado en esta zona, formando una línea visible. El resto de la muestra continúa fluyendo hasta el final de la membrana en donde es almacenada en un depósito de residuos.

La zona de reacción también contiene un conjugado de oro con un antígeno propietario, que es eluido por la solución de muestra independiente de la presencia del antígeno de *E. coli* O157:H7. El indicador de control conjugado con oro migra a través de la membrana hasta la zona de captura negativa (anticuerpo del antígeno propietario), donde es capturado y agregado formando una línea visible. La línea de control se formará en la zona de control independiente de la presencia o ausencia del antígeno de *E. coli* O157:H7, garantizando que la prueba esté funcionando apropiadamente.

USUARIO PREVISTO

Este sistema de prueba está diseñado para ser usado por personal familiarizado con las técnicas asépticas apropiadas para el aislamiento e identificación de *E. coli* O157:H7. Hay disponibilidad de entrenamiento por medio de Neogen, es recomendado para aquellas personas que no tienen un conocimiento básico en el área de microbiología.

MATERIALES SUMINISTRADOS

Kit de prueba de Reveal

1. 20 dispositivos de prueba de Reveal para *E. coli* O157:H7
2. 20 pipetas de transferencia

MATERIALES REQUERIDOS (NO SUMINISTRADOS)

1. Bolsas homogeneizadoras (Producto Neogen 9736)
2. Bolsas de muestra, 3500 mL (Producto Neogen 9738)
3. Balanza o báscula (Producto Neogen 9427)
4. Cronómetro (Producto Neogen 9426)
5. Agua estéril

Para el sistema de prueba de 8 horas:

1. 13 x 100 mm tubos de polipropileno o vidrio (Producto Neogen 9438)
2. Incubadora apta para mantener una temperatura de $42 \pm 1^\circ\text{C}$ (Producto Neogen 9735)
3. Pipetas desechables y estériles aptas para transferir muestras de 5 mL (Producto Neogen 9415)
4. Baño de maría o una fuente de calentamiento equivalente (por ejemplo., mechero Bunsen, bloque de calor (Producto Neogen 9412), horno microondas)

Para el sistema de prueba de 20 horas:

1. Incubadora apta para mantener una temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (Producto Neogen 9735)

MATERIALES OPCIONALES

1. Mezclador o Stomacher 400 (máquina homogeneizadora) o alguna máquina equivalente

ALMACENAMIENTO

Almacene los dispositivos de Reveal entre $2-30^\circ\text{C}$ cuando no estén en uso. Almacene los medios de cultivo deshidratados a una temperatura ambiental entre ($15-30^\circ\text{C}$).

PRUEBAS EN DIFERENTES PRODUCTOS

La prueba de Reveal para *E. coli* O157:H7 es efectiva en una variedad de productos. Por favor, contacte a un representante de Neogen para obtener la lista actualizada de los productos validados para esta prueba, o para los estudios de validación de productos específicos.

PRECAUCIONES

1. No use medios expirados.
2. Permita que los dispositivos de prueba alcancen una temperatura ambiental antes de abrir la bolsa.
3. Use el medio rehidratado dentro de las 6 horas después de su preparación.
4. El uso de períodos de incubación o tiempos diferentes a los especificados puede dar lugar a resultados erróneos.
5. Las bolsas de muestra no deben ser cerradas completamente con el fin de permitir el intercambio de aire durante la incubación, el cual es vital para la supervivencia y expresión antigénica de *E. coli* O157:H7.
6. El agua estéril debe ser precalentada antes de su uso a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ cuando se utiliza el medio de 8 Horas.

7. Realice la prueba de los cultivos dentro de 4 horas después de la incubación cuando se utiliza el sistema de prueba de 8 Horas, y dentro de 8 horas después de la incubación cuando se utiliza el sistema de prueba de 20 Horas.
8. Siga las buenas prácticas de microbiología en el laboratorio.

PREPARACIÓN Y CULTIVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Sistema de prueba de 8 horas

1a. Muestras de 25 g

- a. **Preparación del medio.** Transfiera el contenido de una bolsa de aluminio del medio Reveal de 8 Horas (Producto Neogen 9760) o 8.9 g del medio de Reveal de 8-Horas a granel (Producto Neogen 9765) a una bolsa homogeneizadora. Agregue 225 mL de agua esterilizada a 42°C. Sujete la bolsa firmemente a 2–3 pulgadas de la parte superior, soporte la parte inferior, y mezcle vigorosamente hasta que se disuelva el medio. Coloque la bolsa homogeneizadora en un estante u otro soporte. El medio se puede mantener a 42°C hasta el momento de usarlo, pero por no más de **6 horas**. Para obtener los mejores resultados, use el medio tan pronto como es preparado.
- b. **Adición de la muestra.** Combine 25 g de la muestra con el medio, sujete la bolsa firmemente de la parte superior y amase hasta que se mezcle. Agite la bolsa vigorosamente efectuando movimientos laterales repetitivos para asegurar un completo mezclado. **ALTERNATIVA:** Coloque la bolsa en un homogeneizador y mezcle por **2 minutos** a velocidad normal.

1b. Muestras de 375 g

- a. **Preparación del medio.** Agregue 133,5 g del medio de Reveal de 8 Horas (Productos Neogen 9765, 9765B) a una bolsa de muestra de 3500 mL (Producto Neogen 9738) y agregue 3375 mL de agua estéril a 42°C. Ruede la parte de arriba de la bolsa a 2–3 pulgadas de la parte superior y mezcle vigorosamente hasta que se disuelva. Coloque la bolsa en un balde de 2 galones u otro soporte. El medio se puede mantener a 42°C hasta el momento de usarlo. Para obtener los mejores resultados, use el medio tan pronto como es preparado.
 - b. **Adición de la muestra.** Combine 375 g de la muestra con el medio, sujete la bolsa firmemente en la parte superior y amase hasta que se mezcle. Agite la bolsa vigorosamente efectuando movimientos laterales repetitivos para asegurar un completo mezclado.
2. **Incubación.** Cierre la bolsa (no muy apretada). Incube muestras de 25 g a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ por **8 horas**. Incube muestras de 375 g a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ por **12 horas**. **No apriete mucho la bolsa al cerrarla, para permitir el intercambio de aire quees requerido para un crecimiento óptimo y expresión antigénica.**
 3. **Mezcla.** Retire la bolsa de la incubadora después de 8 horas o 12 horas dependiendo del tamaño de la muestra. Sujete la bolsa firmemente a 2–3 pulgadas de la parte superior, sostenga la parte inferior y mezcle gentilmente el contenido de la bolsa efectuando movimientos laterales repetitivos.
 4. **Tratamiento de la muestra.**
 - a. Usando una pipeta estéril, transfiera 5 mL de la muestra a un tubo de polipropileno o vidrio. Caliente la muestra empleando una de las siguientes maneras:
 - Colocando el tubo en agua hirviendo por **20 minutos** si está usando un tubo de polipropileno, o por **10 minutos** si está usando un tubo de vidrio.
 - o
 - Tapando el tubo firmemente, colóquelo en el microondas hasta que hierva y rápidamente apague el microondas.
 - b. Permita que el tubo alcance una temperatura ambiental entre 15–30°C. Para enfriar el tubo más rápidamente se puede colocar debajo de agua fría. Asegúrese de que no penetre agua en el tubo.

La muestra está lista para realizar la prueba. Proceda al procedimiento de prueba del dispositivo de Reveal.

Sistema de prueba de 20 horas

1a. Muestras de 25 g

- a. **Preparación del medio.** Transfiera el contenido de una bolsa de aluminio del medio Reveal de 20 Horas (Producto Neogen 9770) o 8,3 g del medio Reveal de 20-Horas a granel (Producto Neogen 9758) a una bolsa homogeneizadora. Agregue 225 mL de agua esterilizada a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Sujete la bolsa firmemente a 2–3 pulgadas de la parte superior, soporte la parte inferior, y mezcle vigorosamente hasta que se disuelva el medio (más o menos **1 minuto**). Coloque la bolsa homogeneizadora en un estante u otro soporte. El medio se puede mantener a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta que esté listo para su uso, pero por no sobrepase un tiempo de más de **6 horas**. Para obtener los mejores resultados, use el medio inmediatamente después de su preparación.
- b. **Adición de la muestra.** Combine 25 g de la muestra con el medio, sujete la bolsa firmemente de la parte superior y amase hasta que se mezcle completamente. Agite la bolsa vigorosamente efectuando movimientos laterales repetitivos para asegurar un mezclado completo. **ALTERNATIVA:** Coloque la bolsa en un homogeneizador y mezcle por **2 minutos** a velocidad normal.

1b. Muestras de 375 g

- a. **Preparación del medio.** Agregue 124,5 g del medio de Reveal de 20-Horas (Productos Neogen 9758 o 9758B) a una bolsa de muestra 3500 mL (Producto Neogen 9738) y agregue 3375 mL de agua estéril a 36°C . Ruede la parte de arriba de la bolsa a 2–3 pulgadas de la parte superior y mezcle vigorosamente hasta que se disuelva. Coloque la bolsa en un balde de 2 galones u otro soporte. El medio se puede mantener a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta el momento de usarlo, pero no sobrepase un tiempo de más de **6 horas**. Para obtener los mejores resultados, use el medio inmediatamente después de su preparación.
 - b. **Adición de la muestra.** Combine 375 g de la muestra con el medio, sujete la bolsa firmemente de la parte superior y amase hasta que se mezcle. Agite la bolsa vigorosamente efectuando movimientos laterales repetitivos para asegurar una mezcla completa.
2. **Incubación.** Cierre la bolsa (no muy apretada). Incube la muestra a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ for **20 horas**. **No apriete la bolsa mucho al cerrarla, ya que el intercambio de aire es requerido para un crecimiento óptimo.**
 3. **Mezcla.** Retire la bolsa de la incubadora después de **20 horas**. Sujete la bolsa firmemente a 2–3 pulgadas de la parte superior, soporte la parte inferior, y mezcle gentilmente el contenido de la bolsa efectuando movimientos laterales repetitivos.

Por favor siga las instrucciones que fueron descritas arriba, para muestras que no sean de carne molida, cubos de carne, sidra de manzana o extracto puro de manzanas e hisopados ambientales: Para muestras que contengan altos niveles de microflora, incremente la temperatura de incubación a $42 \pm 1^\circ\text{C}$.

ENRIQUECIMIENTOS ALTERNATIVOS: Enriquecimientos de 20-Horas alternativos para la recuperación de *E. coli* O157:H7 incluye el Caldo Triptona de Soja, Modificado con Novobiocina (Producto Neogen 7694); Caldo Triptona de Soja Modificado con Novobiocina y la Digestión Ácida de Caseína (Producto Neogen 7731); y Medio EC, Modificado con Novobiocina (Producto Neogen 7700). Todos los tres enriquecimientos han sido o están siendo usados por la USDA/FSIS y están disponibles como medios de cultivo deshidratados de Neogen y como parte de la línea de productos de Acumedia.^{4,5,6,7}

La muestra está lista para ser analizada. Proceda con el procedimiento de prueba del dispositivo de Reveal.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA DEL DISPOSITIVO DE REVEAL

1. Permita que los dispositivos alcancen una temperatura ambiental (si están almacenados en el refrigerador, de más o menos a 25°C) antes de uso.
2. Retire el número necesario de dispositivos de prueba de Reveal para *E. coli* O157:H7 de la bolsa de aluminio. Coloque el dispositivo sobre una superficie plana y márkelo con la identificación de muestra apropiada.
3. Apriete la bomba de la pipeta de transferencia e inserte el vástago en la muestra. Libere la presión de la bomba y succione la muestra no más allá del vástago.

PRECAUCIÓN: Para muestras de 8 horas hervidas:

- **No perturbe** la muestra al usar el vortex, o por mezcla o agitación.
 - **No perturbe** las partículas en la base de la muestra.
 - Retire **sólo** el líquido, no los residuos, de la muestra.
4. Sostenga la pipeta de transferencia verticalmente encima del puerto de muestreo en el dispositivo y administre 5 gotas al porte cuando use los sistemas de prueba de 8 o 20 Horas.

ALTERNATIVA: Usando una pipeta, agregue 120 µL del líquido de muestra al puerto de muestreo.

5. Observe y registre los resultados de la prueba inmediatamente (dentro de 60 segundos) después de 15 minutos.

NOTA RESPECTO AL PROCEDIMIENTO: SI EXISTE UN PROBLEMA DE FLUJO EN EL DISPOSITIVO

Si no hay flujo en el dispositivo después de agregar el número de gotas de muestra apropiados al dispositivo, agregue una gota más. El material particulado puede desplazar una parte del volumen necesario para iniciar el flujo cromatográfico de la prueba.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Interpretación visual

Resultados

Línea en las zonas C y T en 15 minutos Positivo

Línea en la zona C pero no aparece una línea en zona T Negativo

No aparece una línea en zona C, independientemente de la línea en la zona T.. Inválido

CONFIRMACIÓN (OPCIONAL)

Neogen sugiere verificar muestras presuntivamente positivas por medio de un cultivo de la muestra enriquecida con el medio siguiendo los procedimientos^{4,5,6,7} descritos en BAM¹ o FSIS.

NOTA: El realizar pruebas en diferentes muestras usando los procedimientos alternativos de BAM o FSIS pueden reflejar resultados diferentes. Las bacterias no están uniformemente distribuidas en una muestra (especialmente en muestras sólidas y secas), por lo tanto su muestra puede que no contenga el organismo objetivo.

ELIMINACIÓN

Deseche (autoclave, cloro, etc.) los dispositivos de Reveal, pipetas, y medio de acuerdo con todas las regulaciones locales, estatales y federales.

SERVICIO DE ATENCIÓN AL CLIENTE

Para obtener mayor información por favor contacte al Departamento de Atención al Cliente y/o al Departamento de Servicios Técnicos localizado en la parte de atrás de este folleto. Hay disponibilidad de entrenamiento para este producto y para todos los kits analíticos de Neogen.

DISPONIBILIDAD DE LAS FICHAS DE SEGURIDAD (SDS)

Usted puede obtener fichas de seguridad para este kit y para todos los kits analíticos de Neogen en www.neogen.com, o llamando a los números +1 800-234-5333 o +1 517-372-9200.

TÉRMINOS Y CONDICIONES

Por favor visite www.neogen.com/Corporate/termsconditions.html para los términos y condiciones completos de Neogen.

GARANTÍA

Neogen Corporation no ofrece ningún tipo de garantía expresa o implícita, excepto que los materiales utilizados en la fabricación de los productos son de calidad estándar. Si cualquiera de sus materiales resulta defectuoso, Neogen proveerá un remplazo del producto. El comprador asume toda la responsabilidad y riesgos resultantes por el uso de este producto. No hay ningún tipo de garantía de comercialización de este producto o del rendimiento del mismo para ningún propósito. Neogen no se hará responsable por daños y perjuicios, incluyendo daños especiales o consecuentes, o gastos derivados directa o indirectamente por el uso de este producto.

BIBLIOGRAFÍA

1. *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*, 8th Edition (1998), published and distributed by AOAC International, 481 N. Frederick Ave., Suite 500, Gaithersburg, MD 20877-2504 USA.
2. Edwards, P.R., and Ewing, W.H., *Identification of Enterobacteriaceae*, 3rd Ed., Burgess Publishing Co., Minneapolis, MN (1972).
3. Gray, L.D., *Manual of Clinical Microbiology*, 6th Ed., Edited by Murray, P.R., Baron, J.B., Tenover, F.C., and Tenover, F.C., and Tenover, R.H., American Society of Microbiology, Washington, D.C. pages 450-456 (1995).
4. Sharar, A. and Rose, B.; *Revision 4 of Laboratory Communication #38 Isolation and Identification of Escherichia coli O157:H7 from Meat*; FSIS publication (1994).
5. Cray Jr., W., et al.; *Revision #1; 9-6-99 of Laboratory Communication, Chapter 5: Isolation and Identification of Escherichia coli O157:H7 from Meat*; FSIS publication (1999).
6. *USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook*, 3rd Ed., Rev. 3 (10/25/02), www.fsis.gov/OPHS/microlab/mlg5.03.pdf.
7. *FSIS Constituent Update, Protecting Public Health Through Food Safety and Food Defense*, Volume 9, Issue 3 (01/25/08).

PRODUCTOS DISPONIBLES

- 9750** Sistema completo de Reveal para *E. coli* O157:H7 de 8-Horas – Sistema completo de Reveal para *E. coli* O157:H7 de 8-Horas – medio y dispositivos de prueba para crecer y detectar *E. coli* O157:H7 usando un enriquecimiento de 8 horas. Contiene 20 dispositivos y 20 bolsas de aluminio con medio para 20 pruebas.
- 9751** Sistema completo de Reveal para *E. coli* O157:H7 de 20-Horas – medio y dispositivos de prueba para crecer y detectar *E. coli* O157:H7 usando un enriquecimiento de 20 horas. Contiene 20 dispositivos y 20 bolsas de aluminio con el medio para 20 pruebas.
- 9755** Reveal para *E. coli* O157:H7 – Prueba de un paso, entrega de resultados visuales en 15–20 minutos después del enriquecimiento. El kit contiene 20 dispositivos.
- 9754** Multipaquete de Reveal para *E. coli* O157:H7 – Contiene dos paquetes de 10 dispositivos cada uno.
- 9760** Medio de Reveal de 8-Horas, unitario – Para muestras de 25 g (20 bolsas de aluminio).
- 9770** Medio de Reveal de 20-Horas, unitario – Para muestras de 25 g (20 bolsas de aluminio)
- 9765** Medio de Reveal de 8-Horas, 500 g
- 9765B** Medio de Reveal de 8-Horas, 2 kg
- 9758** Medio de Reveal de 20-Horas, 500 g
- 9758B** Medio de Reveal de 20-Horas, 2 kg
- 9764** Kit de confirmación para *E. coli* O157:H7 de Neogen – contiene perlas magnéticas de *E. coli* O157:H7, paquetes de tampón y platos de agar cromogénico para 5 pruebas.
- 9764B** Perlas de confirmación de *E. coli* O157:H7 a granel de Neogen – Contiene perlas magnéticas de *E. coli* O157:H7 para 50 muestras.
- 9735** Incubadora
- 9427** Balanza electrónica digital
- 9411** Inserto del bloque de calentamiento
- 9412** Incubadora de baño seco
- 9736** Stomacher®– Bolsas de muestra homogeneizadoras, 24 oz Whirl-Pak (100)
- 9738** Bolsas de muestra, 3500 mL (250)
- 9426** Cronómetro
- 9438** 13 x 100 mm tubos de cultivo de vidrio, 1,000
- 9415** Pipetas serológicas estériles de 10 mL, 500
- 9469** Tubos de polipropileno de 7mL con tapas, 1,000
- 9440** Soporte para tubos, 13 mm
- 9445** Canasta grande para la incubadora
- 9277** Bomba de pipeta



Norteamérica

Oficinas Corporativas de Neogen
+1 800-234-5333 (EEUU/Canadá)
foodsafety@neogen.com
foodsafety.neogen.com/sp

Europa, Medio Oriente y África

Neogen Europe
+ 44 (0) 1292 525 600
info_uk@neogeneurope.com
foodsafety.neogen.com/uk

México

Neogen Latinoamérica
+52 (55) 5254-8235
informacion@neogenlac.com
foodsafety.neogen.com/sp

Brasil

Neogen do Brasil
+55 19 3935.3727
info@neogendobrasil.com.br
foodsafety.neogen.com/pt

China

Neogen Bio-Scientific Technology
+86 21 6271 7013
info@neogenchina.com.cn
www.neogenchina.com.cn

India

Neogen Food and Animal Security
+91 484 2306598, 2301582
info@neogenindia.com
www.neogenindia.com