Read instructions carefully before starting test

GeneQuence® *Listeria*

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE
LICENSCE NUMBER 010403

DNA Hybridization Test for Detection of *Listeria* spp.

INTENDED USE

This test is intended to qualitatively detect *Listeria* spp. in food and environmental samples, and should be used by personnel with appropriate laboratory training in microbiology.

TESTING DIFFERENT COMMODITIES

GeneQuence *Listeria* is an effective screening tool for a variety of commodities. Through evaluation by the AOAC Research Institute, this test has been shown to detect *Listeria* spp. in the following food products. 48-hour methods (methods 1 and 2): raw ground beef, raw ground pork, deli turkey, deli ham, hot dogs, pasteurized milk, ice cream, Parmesan cheese, brie cheese, cottage cheese, mayonnaise, raw shrimp, cooked crab meat, smoked salmon, lettuce, frozen vegetables, cabbage, alfalfa sprouts, and soy flour; 27-30 hour method (method 3): deli turkey, ham, hot dogs, pepperoni, frozen hamburgers, raw ground beef, pasteurized liquid egg, pasteurized milk, cottage cheese, Parmesan cheese, ice cream, cooked crab meat, smoked salmon, and lettuce. This test has also been validated for the following types of environmental samples: swabs or sponge samples taken from stainless steel, plastic, concrete, cast iron, or ceramic surfaces.

BIOLOGICAL PRINCIPLES OF THE TEST

This DNA hybridization test employs *Listeria*-specific DNA probes directly labeled with horseradish peroxidase, and a colorimetric endpoint to detect as little as one colony forming unit (CFU) of *Listeria* in a 25 g food sample when the specified enrichment protocols are used. A sample is considered negative for the presence of *Listeria* if the absorbance value (A_{450}) obtained is less than 0.10. A sample is considered positive for the presence of *Listeria* if the absorbance value obtained is greater than or equal to 0.10. Positive samples should be confirmed by standard culture procedures, followed by biochemical identification.

MATERIALS PROVIDED

1. 1 bottle of pretreatment concentrate (labeled 1a)
2. 1 bottle of 12 mL pretreatment buffer (labeled 1b)
3. 1 bottle of lysis reagent concentrate (labeled 2a)
4. 1 bottle of 12 mL lysis reagent buffer (labeled 2b)
5. 1 bottle of 18 mL hybridization solution (labeled 3)
6. 1 bottle of 5 mL *Listeria* probe solution (labeled 4)
7. 1 bottle of 50 mL wash solution 20X concentrate (labeled 5)
8. 1 bottle of 15 mL substrate chromogen solution (labeled 6)
9. 1 bottle of 5 mL stop solution (labeled 7)
10. 1 bottle of 5 mL positive control (labeled +)
11. 1 bottle of 5 mL negative control (labeled -)
12. 1 96-well microwell plate in divisible strips
13. Hybridization/probe mixture dilution chart

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Available from Neogen

Equipment

1. Angled thermometer for digital heat block (item #9382)
2. Apparatus for plate washing with vacuum source (Manual item #9348, Automated item #6718 or #6718A)
3. Automated plate wash assembly: vacuum tubing assembly (item #9387), side arm flask assembly (item #6822), vacuum pump (item #6824)
4. Carboy w/spigot (2) (item #9349)
5. Digital heat block (item #9386)
6. Heated block cover (item #9383)
7. Incubators at 30°C ± 1° and 35°C ± 1° (item #9735)
8. Microwell reader to read at 450 nm with discrimination of 0.01 absorbance unit (item #6704, #6704A or #9302)
9. Modular heating block titer plate (item #9384)
10. Water bath at 37°C (item # 9346)

Optional Equipment

1. Dry heater base incubator (item #9412)
2. 8-channel pipettor & tips to dispense 50-300 µL (item #9385, #9407)
3. Heater block at 37°C ± 1° (item #9411)

Lab Supplies & Consumables

1. Micropipette & tips to dispense 20-200 µL volumes (item #9276, #9407)
2. Micropipette & tips to dispense 200-1000 µL volumes (item #9342, #9343)
3. Minute timer (item #9426)
4. Test tubes, 12 x 75 mm borosilicate glass, and rack (items #9439 and #9440)
5. Stomacher bags(100) (item #9736)
6. 50 mL culture tubes for sample pre-enrichment (item #9381)
7. 1000 mL graduated cylinder (item #9345)
8. 500 mL wash bottle (item #9366)
9. 10 mL pipette pump (item #9277)

10. 10 mL sterile serological pipettes, 0.1 mL graduations (item #9415)
11. Eppendorf reservoir (item #4018)
12. Centrifuge tube racks (item #9479)

Media

1. BLEB Base Supplements (item #7980)
2. Buffered Listeria Enrichment Broth Base (BLEB Base, item #7675)
3. LESS Enrichment Broth (item #9790A)
4. Oxford Listeria Agar Base (item #7428)
5. Oxford Medium Antimicrobics, FDA (ref. 1, item #7986)
6. PALCAM Broth Base (ref. 3, item #7670)
7. PALCAM Supplement (ref. 3, item #7987)
8. UVM Modified Listeria Enrichment Broth, UVM (ref. 2, item #7409)
9. Modified Oxford Agar (MOX; ref. 2) with Moxalactam Supplement (item #7428, 7991)

Starter Kits

1. GeneQuence Starter Kit, includes all items (item #9268)
2. GeneQuence Starter Kit, without water bath (item #9268a)
3. GeneQuence Consumables Starter Kit (item #9266)
4. GeneQuence Small Wash Starter Kit (item #9267)

Not available from Neogen

1. Homogenizer (e.g., Stomacher)
2. Petri plates, 100 x 15 mm
3. Phosphate-Buffered Saline (PBS), 10 mM sodium phosphate, 0.85% sodium chloride, pH 7.4
4. Sodium Pyruvate Supplement (10% aqueous solution, ref. 1)
5. Sterile cotton swabs and absorbent paper
6. 2 mL disposable graduated pipettes

STORAGE REQUIREMENTS

1. Store microwell plate, positive control, negative control, and reagents 1a, 2a, 3, 4 and 6 at 2-8°C.
2. Other reagents may be stored at 2-30°C.
3. The entire kit may be stored at 2-8°C.
4. Once reagents 1a and 2a have been reconstituted, they must be stored at -20°C and are stable for 60 days in this form. Optionally, the reconstituted reagents may be combined into bottle 2a and stored at -20°C for up to 60 days.
5. Refrigerated kit reagents should be equilibrated to room temperature before use, but should not be left unrefrigerated for long periods of time.

PRECAUTIONS

1. Reagents are for laboratory use only.
2. Stop solution contains 4.0N sulfuric acid. Hybridization solution contains formamide. Avoid contact with skin and mucous membranes. Refer to Material Safety Data Sheet available from Neogen for more information.

3. Reagents from different kit lots should not be interchanged. GeneQuence *Listeria* reagents are not interchangeable with other GeneQuence assay reagents.
4. Reagents should not be used beyond their expiration dates.
5. Enrichment cultures should be handled and disposed of as potentially infectious material.
6. The preferred method for disposal of contaminated materials, including cultures, pipettes, etc., is autoclaving.
7. Items that cannot be autoclaved should be decontaminated by treatment with a disinfectant solution and rinsing with water.
8. This test should be performed in a normal laboratory environment with respect to humidity, lighting, etc. Steps requiring room temperature incubation should be performed at 18-30°C.
9. Pregnant women and immunocompromised individuals should exercise caution when working with materials that may contain *Listeria* spp. Consult with the safety director of your facility for specific instructions.

SAMPLE PREPARATION AND ENRICHMENT

Note: *Food samples should be obtained and handled according to standard practices appropriate to analysis for* Listeria *spp. (refs. 1-2). All enrichment media should be prewarmed to room temperature or incubation temperature before inoculation. If needed, media formulations are available from Neogen.*

Method 1 (OXA plate secondary enrichment)

1. **For red meat and poultry:** Homogenize (Stomacher, 1-2 min.) 25 g sample in 225 mL UVM Broth. Incubate 24 ± 2 hours at 30°C. Remove UVM culture from incubation and mix well.

   For dairy products, raw and cooked seafoods, and fruits and vegetables: Homogenize (Stomacher, 1-2 min.) 25 g sample in 225 mL Buffered *Listeria* Enrichment Broth Base (BLEB base) supplemented with 0.1% (w/v) Sodium Pyruvate. Incubate 4 hours at 30°C. Add BLEB Base Supplements and incubate 20 ± 1 hour at 30°C. Remove culture from incubation and mix well.

   Environmental swab samples: Place swab in 10 mL UVM Broth. Vortex or mix vigorously for 10 seconds. Leave swab in broth. Incubate 24 ± 4 hours at 30-35°C. Remove UVM culture from incubation and mix well.

   Environmental sponge samples: Place sponge in appropriate volume (e.g., 100-200 mL) of UVM Broth. Stomach or mix vigorously for 10 seconds. Leave sponge in broth. Incubate 24 ± 4 hours at 30–35°C. Remove UVM culture from incubation and mix well.

For all samples:

2. Dip a sterile cotton swab into culture and swab onto the entire surface of an Oxford Agar Plate (OXA), expressing as much liquid from the swab as possible. Incubate plate 24 ± 2 hours at 35°C.
3. With a sterile cotton swab, swab off growth from the plate (swab entire surface of plate, removing as much growth as possible) and suspend in 1 mL Phosphate-Buffered Saline in a sterile, capped tube by swirling swab vigorously for 5 seconds. Express as much liquid as possible before discarding the swab.

4. Perform GeneQuence assay on 0.4 mL aliquot of growth suspension. Save remaining growth suspension at 4°C for possible culture confirmation.

Method 2 (Broth secondary enrichment)

Raw and cooked meats and poultry:
1. Homogenize (Stomacher, 1-2 min.) 25 g sample in 225 mL UVM Broth. Incubate 24 ± 2 hours at 30°C.
2. Remove UVM culture from incubation and mix well. Transfer 0.1 mL UVM culture to 10 mL PALCAM Broth. Incubate 24 ± 2 hours at 35°C.
3. Perform assay on 0.4 mL aliquot of PALCAM culture. Save PALCAM culture for possible confirmation.

Dairy products, cooked seafoods, and fruits and vegetables:
1. Homogenize (Stomacher, 1-2 minutes) 25 g sample in 225 mL Buffered *Listeria* Enrichment Broth Base (BLEB base) supplemented with 0.1% (w/v) Sodium Pyruvate. Incubate 4 hours at 30°C. Add BLEB supplements and incubate 20 ± 1 hour at 30°C.
2. Remove BLEB culture from incubation and mix well. Transfer 1 mL BLEB culture to a fresh tube of 9 mL BLEB with supplements. Incubate 24 ± 2 hours at 35°C.
3. Perform assay on 0.4 mL aliquot of secondary BLEB culture. Save secondary BLEB culture for possible confirmation.

Raw seafoods: Use Method 1.

Method 3 (Single-step enrichment)

All foods:
1. Homogenize (Stomacher, 1-2 minutes) 25 g sample in 225 mL LESS Enrichment Broth. Incubate 27-30 hours at 30°C (minimum 30 hours for ice cream, crab meat, and lettuce).
2. Perform assay on 0.4 mL aliquot of LESS Broth culture. Save culture for possible confirmation.

Environmental swab samples:
1. Place swab in 10 mL LESS Enrichment Broth. Vortex or mix vigorously for 10 seconds. Leave swab in broth. Incubate 24-48 hours at 30°C.
2. Perform assay on 0.4 mL aliquot of LESS Broth culture. Save culture for possible confirmation.

Environmental sponge samples:
1. Place sponge in appropriate volume (e.g., 100-200 mL) LESS Enrichment Broth. Stomach or mix vigorously for 10 seconds. Leave sponge in broth. Incubate 24-48 hours at 30°C.
2. Perform assay on 0.4 mL aliquot of LESS Broth culture. Save culture for possible confirmation.

PRIOR TO STARTING THE TEST
1. Allow the refrigerated reagents to equilibrate to room temperature.
2. Turn on the water bath or heater block and adjust to 37°C ± 1°. Fill the water bath to a level of approximately 1.5 inches, or fill the heater block wells about $^1/_3$ with deionized water.

3. Prepare pretreatment reagent by adding 12 mL of pretreatment buffer (bottle 1b) directly to the pretreatment concentrate (bottle 1a). Dissolve contents by gently swirling.
4. Prepare lysis reagent by adding 12 mL of lysis reagent buffer (bottle 2b) directly to the bottle of lysis reagent concentrate (bottle 2a). Dissolve contents by gently swirling.
   Note: *The pretreatment reagent prepared in step 3 and lysis reagent prepared in step 4 may be combined in bottle 2a. Separate pretreatment and lysis reagents, or the reagents combined in bottle 2a, are stable in the reconstituted form for 60 days when stored at -20°C. To thaw, place bottles at room temperature. When thawed, gently swirl contents.* ***Return reconstituted reagents to storage at -20°C immediately after each use.***
5. For each sample to be tested, label a 12 x 75 mm borosilicate glass test tube with the appropriate sample designation and place in a rack. Include tubes for 1 positive control and 1 negative control per experimental run.
6. Prepare the wash solution by mixing entire contents of wash solution concentrate (bottle 5) with 950 mL of distilled or deionized water (if washing manually with a 500 mL wash bottle, use 25 mL of concentrate with 475 mL of water). Fill the buffer reservoir of the plate-washing device (see manufacturer's instructions for set-up and use). **Note:** *Wash solution can be stored in a closed bottle at room temperature for up to 60 days.*
7. Without touching the bottoms of the wells, place the appropriate number of microwells in the plate frame, filling the frame front to back, left to right, in rows of 8. Include wells for the reagent blank, negative control and positive control. **Note:** *If the last row has fewer than 8 wells and a plate-washing device is used, fill the last row with colored wells (colored wells are available free of charge from Neogen).*

TEST PROCEDURE

Note: *This test is adaptable to automation. Contact Neogen for further information.*

1. Mix the test samples by gently shaking the test tubes. **Shake the positive and negative control solutions by inverting the bottles several times.** Add 0.4 mL of each control and test sample to the appropriately labeled tubes.
2. Add 0.1 mL of reconstituted pretreatment reagent (bottle 1a) and 0.1 mL of reconstituted lysis reagent (bottle 2a) to each tube, or add 0.2 mL of the combined pretreatment/lysis solution (bottle 2a) to each tube. Mix by gently shaking the rack of tubes by hand for 5 seconds. The resulting solution should be green (level depends upon food commodity). If any tubes are not green, check for proper reagent addition. Incubate the tubes in the 37°C water bath or heater block for 5 minutes.
3. Prepare a 4:1 hybridization/probe mixture by mixing hybridization solution (bottle 3) and probe solution (bottle 4) in a plastic container. For mixture guidelines, refer to the mixing chart provided with this test kit or use the formula below. (N = number of test samples + controls).

   Volume hybridization solution (bottle 3) = [(N x 0.1) + 1.6] mL
   Volume probe solution (bottle 4) = [(N x 0.025) + 0.4] mL
4. Remove the tubes from heat source. Transfer 0.150 mL of each lysed sample, including the controls, to designated microwells. The first well should be reserved for the reagent blank and receives no sample. The second well should be used for the negative control, and the third for the positive control.

5. Vigorously mix the hybridization/probe solution prepared earlier. Add 0.125 mL to each microwell, and mix each well 5-10 times with the pipettor (a multichannel pipettor is recommended). Do not add hybridization/probe solution to the reagent blank microwell.
6. Cover the heater block and incubate the plate at 45°C for 60 minutes.
7. Wash the wells using one of the following procedures:
   a) **Plate-washing device:** Wash 5 times at room temperature. For each wash, process one 8-well strip at a time by aspirating the liquid, filling the wells, and then proceeding to the next strip. After the last wash, aspirate the liquid from the wells, then remove any residual liquid by inverting the plate and tapping it onto absorbent paper. Hold the plate by gently squeezing on the sides of the frame to keep the strips in place. Be sure to not touch the bottom or sides of wells with plate washer.
   b) **Manual:** Thoroughly wash the microwells at least 5 times using a plastic wash bottle filled with the wash solution prepared earlier. Wash by emptying the wells into a suitable container, tapping the inverted plate on absorbent paper, completely filling the wells with wash solution, and vigorously shaking out the contents.

   Note: *All air bubbles MUST be removed before proceeding to the next step. If air bubbles remain, repeat vigorous striking of the wells onto an absorbent paper towel on a flat surface until eliminated.*
8. Add 0.150 mL of substrate chromogen solution (bottle 6) to each microwell, including the reagent blank microwell. Incubate the plate at room temperature for 20 minutes.
9. Add 0.050 mL of stop solution (bottle 7) to each microwell, including the blank microwell.
10. Gently tap the side of the frame a few times to ensure mixing.
11. Read absorbance at 450 nm using a plate or strip reader according to the manufacturer's instructions. Blank using the first microwell that contains the mixture of substrate chromogen and stop solution (do not blank with air).
    If your plate or strip reader doesn't automatically blank against the first microwell, calculate the values for the negative control, positive control, and all other sample wells, by subtracting the absorbance value of the reagent blank (well A1) from the absorbance values registered in all other wells.

INTERPRETATION OF RESULTS

Control values: The absorbance value for the negative control must be $\leq$ 0.15, and absorbance value for the positive control must be $\geq$ 1.00. If either control falls out of the acceptable range, the test is invalid and should be repeated.

Negative criterion: Tests producing absorbance values < 0.10 are negative for the presence of *Listeria* spp. in the test samples.

Positive criterion: Tests producing absorbance values $\geq$ 0.10 are positive for the presence of *Listeria* spp. in the test samples. A positive test result should be confirmed by standard culture procedures.

RECOMMENDED CONFIRMATION PROCEDURE

Neogen recommends that positive results be confirmed culturally by streaking from the final enrichment broth culture or from the growth resuspension from the secondary enrichment plate to *Listeria* selective/differential agar media (MOX agar, ref. 2, is recommended) and continuing with biochemical identification of presumptive *Listeria* isolates using standard procedures (refs. 1-2).

REFERENCES

1. U. S. Food and Drug Administration. 2003. *Listeria monocytogenes. Bacteriological Analytical Manual*, chapter 10, http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html
2. USDA-FSIS. 2008. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples. *Microbiology Laboratory Guidebook*, chapter 8, http://www.fsis.usda.gov/pdf/mlg_8_06.pdf
3. Van Netten, P., Perales, I., van de Moosdijk, A., Curtis, G.D., and Mossel, D.A. 1989. Intl. J. Food Microbiol. 8:299-316.

CUSTOMER SERVICE

Neogen Customer Assistance and Technical Service can be reached between 8 a.m. and 6 p.m. Eastern time by calling 800/234-5333 or 517/372-9200 and asking for a Neogen sales representative or Technical Services. Assistance is available on a 24-hour basis by calling 800/867-0308.

MSDS INFORMATION AVAILABLE

Material safety data sheets (MSDS) are available for this test kit, and all of Neogen's test kits, on Neogen's Web site at www.neogen.com.

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 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.

Purchase of this product licenses its use under U.S. Patent Nos. 5,089,386; 5,376,528; and 5,851,767.

NEOGEN® CORPORATION

620 Lesher Place, Lansing, MI 48912
800/234-5333 (USA/Canada) or 517/372-9200 • fax: 517/372-2006
e-mail: foodsafety@neogen.com • www.neogen.com

©Neogen Corporation, 2009. Neogen and GeneQuence are registered trademarks of Neogen Corp., Lansing, MI 48912.

608013D GQ-List-AOAC-ENSP_0309

Lea las instrucciones detenidamente antes de comenzar el análisis

GeneQuence® *Listeria*

PERFORMANCE TESTED
AOAC
RESEARCH INSTITUTE
LICENSCE NUMBER 010403

Prueba de hibridación de ADN para detección de especies de *Listeria*

USO PREVISTO

Esta prueba ha sido diseñada para la detección cualitativa de especies de *Listeria* en muestras de alimentos y ambientales, y solo debe ser utilizada por personal con la adecuada capacitación de laboratorio en microbiología.

ANÁLISIS DE DIVERSOS PRODUCTOS

GeneQuence *Listeria* es una herramienta de evaluación efectiva para una variedad de productos. La evaluación efectuada por el AOAC Research Institute ha demostrado que este análisis detecta especies de *Listeria* en los siguientes productos alimenticios: métodos de 48 horas (métodos 1 y 2): carne de res molida cruda, carne de cerdo molida cruda, embutido de pavo, embutido de jamón, salchichas, leche pasteurizada, helado, queso parmesano, queso brie, requesón, mayonesa, camarones crudos, carne de cangrejo cocida, salmón ahumado, lechuga, vegetales congelados, repollo, brotes de alfalfa y harina de soja; método de 27 a 30 horas (método 3): embutido de pavo, jamón, salchichas, pepperoni, hamburguesas congeladas, carne de vaca molida cruda, huevo líquido pasteurizado, leche pasteurizado, requesón, queso parmesano, helado, carne de cangrejo cocinada, salmón ahumado y lechuga. Esta prueba también ha sido validada para los siguientes tipos de muestras ambientales: muestras de hisopo o esponja tomadas de superficies de cerámica, hierro fundido, hormigón, plástico o acero inoxidable.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS DE LA MUESTRA

Esta prueba de hibridación de ADN emplea sondas de ADN específicas para *Listeria* directamente etiquetadas con peroxidasa de rábano picante y un criterio de valoración colorimétrica para detectar hasta una sola unidad formadora de colonia (“colony forming unit”, CFU) de *Listeria* en una muestra de alimento de 25 g cuando se utilizan los protocolos de enriquecimiento especificados. Se considera que una muestra es negativa para la presencia de *Listeria* si el valor de absorbancia (A_{450}) obtenido es inferior a 0,10. Se considera que una muestra es positiva para la presencia de *Listeria* si el valor de absorbancia obtenido es superior o igual a 0,10. Las muestras positivas deben confirmarse mediante procedimientos de cultivo estándar, seguido de una identificación bioquímica.

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. 1 frasco de concentrado para pretratamiento (etiquetado como 1a)
2. 1 frasco de 12 ml de buffer para pretratamiento (etiquetado como 1b)
3. 1 frasco de concentrado de reactivo para lisis (etiquetado como 2a)
4. 1 frasco de 12 ml de reactivo buffer para lisis (etiquetado como 2b)
5. 1 frasco de 18 ml de solución para hibridación (etiquetado como 3)
6. 1 frasco de 5 ml de solución para sonda de *Listeria* (etiquetado como 4)
7. 1 frasco de 50 ml solución de lavado concentrado 20X (etiquetado como 5)
8. 1 frasco de 15 ml de solución sustrato-cromógeno (etiquetado como 6)
9. 1 frasco de 5 ml de solución de detención (etiquetado como 7)
10. 1 frasco de 5 ml de control positivo (etiquetado con el signo +)
11. 1 frasco de 5 ml de control negativo (etiquetado con el signo -)
12. 1 placa de micropocillos de 96 pocillos en tiras divisibles
13. Cuadro de dilución de mezcla de sonda/hibridación

MATERIALES NECESARIOS QUE NO SE INCLUYEN

Disponibles en Neogen

Equipo

1. Termómetro angular para bloque calefactor digital (artículo Nº 9382)
2. Aparato para lavado de placa con fuente de vacío (artículo manual Nº 9348, artículo automático Nº 6718 o Nº 6718A)
3. Conjunto de lavado de placa automático: conjunto de tubos de vacío (artículo Nº 9387), conjunto de frasco con brazo lateral (artículo Nº 6822), bomba de vacío (artículo Nº 6824)
4. Bidón con grifo (2) (artículo Nº 9349)
5. Bloque calefactor digital (artículo Nº 9386)
6. Cubierta para bloque calefactor (artículo Nº 9383)
7. Estufas de incubación a 30 °C ± 1° y 35 °C ± 1° (artículo Nº 9735)
8. Lector de pocillos para leer a 450 nm con discriminación de 0,01 para la unidad de absorbancia (artículo Nº 6704, artículo Nº 6704A, o artículo Nº 9302)
9. Placa de titulación de bloque calefactor modular (artículo Nº 9384)
10. Baño Maria a 37 °C (artículo Nº 9346)

Equipo opcional

1. Estufa de incubación con base de calefactor seco (artículo Nº 9412)
2. Pipeta de 8 canales y puntas para dispensar de 50 a 300 µl (artículo Nº 9385, artículo Nº 9407)
3. Bloque calefactor a 37 °C ± 1° (artículo Nº 9411)

Productos e insumos de laboratorio

1. Micropipeta y puntas para dispensar volúmenes de 20 a 200 µl (artículo Nº 9276, artículo Nº 9407)
2. Micropipeta y puntas para dispensar volúmenes de 200 a 1000 µl (artículo Nº 9342, artículo Nº 9343)
3. Temporizador en minutos (artículo Nº 9426)
4. Probetas de vidrio de borosilicato de 12 x 75 mm y soporte (artículo Nº 9439 y artículo Nº 9440)
5. Bolsas tipo Stomacher (100) (artículo Nº 9736)
6. Tubos de cultivo de 50 ml para preenriquecimiento de muestras (artículo Nº 9381)
7. Probeta graduada de 1000 ml (artículo Nº 9345)
8. Frasco de lavado de 500 ml (artículo Nº 9366)
9. Bomba de pipetas de 10 ml (artículo Nº 9277)
10. Pipetas serológicas de 10 ml esterilizadas, graduaciones de 0,1 ml (artículo Nº 9415)
11. Depósito Eppendorf (artículo Nº 4018)
12. Soportes para tubos de centrífuga (artículo Nº 9479)

Medios
1. Suplementos para base BLEB (artículo Nº 7980)
2. Base para caldo de enriquecimiento de Listeria, con buffer (base BLEB, artículo Nº 7675)
3. Caldo de enriquecimiento LESS (artículo Nº 9790A)
4. Base de agar para Listeria (Oxford) (artículo Nº 7428)
5. Medio antimicróbico Oxford, FDA (ref. 1, artículo Nº 7986)
6. Base para caldo PALCAM (ref. 3, artículo Nº 7670)
7. Suplemento PALCAM (ref. 3, artículo Nº 7987)
8. Caldo de enriquecimiento de Listeria UVM modificado, UVM (ref. 2, artículo Nº 7409)
9. Agar Oxford modificado (MOX; ref. 2) con suplemento moxalactam (artículo Nº 7428, 7991)

Equipos básicos
1. Equipo básico GeneQuence, incluye todos los artículos (artículo Nº 9268)
2. Equipo básico GeneQuence, sin baño Maria (artículo Nº 9268a)
3. Equipo básico de productos GeneQuence (artículo Nº 9266)
4. Equipo básico de lavado GeneQuence pequeño (artículo Nº 9267)

No disponibles en Neogen
1. Homogenizador (por ej., Stomacher)
2. Placas de Petri, 100 x 15 mm
3. Solución salina con buffer de fosfato (PBS), fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 0,85%, pH 7,4
4. Suplemento de piruvato de sodio (solución acuosa al 10%, ref. 1)
5. Hisopos de algodón esterilizados y papel absorbente
6. Pipetas graduadas desechables de 2 ml

REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO
1. Guarde la placa de micropocillos, el control positivo, el control negativo y los reactivos 1a, 2a, 3, 4 y 6 a 2-8 °C.
2. Los demás reactivos pueden guardarse a 2-30 °C.
3. El equipo completo puede guardarse a 2-8 °C.
4. Una vez que se han reconstituido los reactivos 1a y 2a, deben guardarse a -20 °C y permanecen estables por 60 días de esta forma. Opcionalmente, los reactivos reconstituidos pueden combinarse en el frasco 2a y almacenarse a -20 °C por hasta 60 días.
5. Los reactivos del equipo refrigerados deben equilibrarse a la temperatura ambiente antes de su uso, pero no deben dejarse sin refrigeración por períodos prolongados de tiempo.

PRECAUCIONES
1. Los reactivos son solo para uso en laboratorio.
2. La solución de detención es 4,0 N de ácido sulfúrico. La solución para hibridación contiene formamida. Evite el contacto con la piel y las membranas mucosas. Para obtener más información consulte la ficha de seguridad de los materiales provista por Neogen.
3. No deben intercambiarse los reactivos de lotes de equipos diferentes. Los reactivos para GeneQuence *Listeria* no son intercambiables con otros reactivos para ensayos GeneQuence.
4. No deben usarse los reactivos una vez alcanzadas las fechas de caducidad.
5. Los cultivos de enriquecimiento deben manipularse y desecharse como material potencialmente infeccioso.
6. El método preferido para la eliminación de materiales contaminados, entre ellos cultivos, pipetas, etc. es el autoclave.
7. Los artículos que no pueden eliminarse en autoclave deben ser descontaminados mediante tratamiento con una solución desinfectante y enjuagados con agua.

8. La prueba debe realizarse en un entorno normal de laboratorio en lo que respecta a la humedad, la iluminación, etc. Los pasos que requieren incubación a temperatura ambiente deben realizarse a 18-30 °C.
9. Las mujeres embarazadas y las personas inmunodeficientes deben extremar las precauciones cuando trabajen con materiales que puedan contener especies de *Listeria*. Solicite instrucciones específicas al responsable de seguridad de su lugar de trabajo.

PREPARACIÓN Y ENRIQUECIMIENTO DE LAS MUESTRAS

Nota: *las muestras de alimentos deben obtenerse y manipularse según las prácticas estándar adecuadas para el análisis de especies de Listeria. (ref. 1-2). Todos los medios de enriquecimiento deben ser precalentados a temperatura ambiente o a temperatura de incubación antes de la inoculación. De ser necesario, Neogen pone a disposición las formulaciones de los medios.*

Método 1 (enriquecimiento secundario en placas con OXA)

1. **Para carnes rojas y carne de aves:** homogenice (Stomacher, 1-2 minutos) muestras de 25 g en 225 ml de caldo UVM. Incube 24 ± 2 horas a 30 °C. Retire el cultivo UVM de la incubación y mezcle bien.

   Para productos lácteos, mariscos crudos o cocidos, y frutas y vegetales: homogenice (Stomacher, 1-2 minutos) una muestra de 25 g en 225 ml de base para caldo de enriquecimiento de *Listeria,* con buffer (base BLEB) complementada con piruvato de sodio al 0,1% (w/v). Incube 4 horas a 30 °C. Agregue suplementos de base BLEB e incube durante 20 ± 1 horas a 30 °C. Retire el cultivo de la incubación y mezcle bien.

   Muestras ambientales tomadas con hisopo: coloque el hisopo en 10 ml de caldo UVM. Utilice una agitadora vorticial o mezcle vigorosamente durante 10 segundos. Deje el hisopo en el caldo. Incube 24 ± 4 horas a 30-35 °C. Retire el cultivo UVM de la incubación y mezcle bien.

   Muestras ambientales tomadas con esponja: coloque la esponja en el volumen apropiado (por ej., 100-200 ml) de caldo UVM. Utilice un homogeneizador Stomacher o mezcle vigorosamente durante 10 segundos. Deje la esponja en el caldo. Incube 24 ± 4 horas a 30-35 °C. Retire el cultivo UVM de la incubación y mezcle bien.

Para todas las muestras:

2. Sumerja un hisopo de algodón esterilizado en el cultivo y aplíquelo en toda la superficie de una placa con agar Oxford (OXA), extrayendo la mayor cantidad de líquido posible. Incube la placa durante 24 ± 2 horas a 35 °C.
3. Con un hisopo de algodón esterilizado, retire el crecimiento que se haya desarrollado en la placa (aplique el hisopo en toda la superficie de una placa extrayendo la mayor cantidad de crecimiento posible) y suspenda en 1 ml de solución salina con buffer de fosfato en un tubo tapado y esterilizado agitando el hisopo vigorosamente durante 5 segundos. Retire la mayor cantidad de líquido posible antes de desechar el hisopo.
4. Realice el ensayo GeneQuence en una alícuota de 0,4 ml de suspensión de crecimiento. Guarde la suspensión de crecimiento restante a 4 °C para la posible confirmación del cultivo.

Método 2 (enriquecimiento secundario en caldo)

Carnes rojas y carne de ave cruda y cocida:

1. Homogenice (Stomacher, 1-2 minutos) muestras de 25 g en 225 ml de caldo UVM. Incube durante 24 ± 2 horas a 30 °C.
2. Retire el cultivo UVM de la incubación y mezcle bien. Transfiera 0,1 ml de cultivo UVM a 10 ml de caldo PALCAM. Incube durante 24 ± 2 horas a 35 °C.
3. Realice el ensayo a una alícuota de 0,4 ml de cultivo PALCAM. Guarde el cultivo PALCAM para su posible confirmación.

Productos lácteos, mariscos cocidos, y frutas y vegetales:

1. Homogenice (Stomacher, 1-2 minutos) una muestra de 25 g en 225 ml de base para caldo de enriquecimiento de *Listeria,* con buffer (base BLEB) complementada con piruvato de sodio al 0,1% (w/v). Incube 4 horas a 30 °C. Agregue suplementos de BLEB e incube durante 20 ± 1 horas a 30 °C.
2. Retire el cultivo BLEB de la incubación y mezcle bien. Transfiera 1 ml de cultivo BLEB a un tubo nuevo de 9 ml de BLEB con suplementos. Incube durante 24 ± 2 horas a 35 °C.
3. Realice el ensayo a una alícuota de 0,4 ml de cultivo BLEB secundario. Guarde el cultivo BLEB secundario para su posible confirmación.

Mariscos crudos: use el método 1.

Método 3 (enriquecimiento en un solo paso)

Todos los alimentos:

1. Homogenice (Stomacher, 1-2 minutos) una muestra de 25 g en 225 ml de caldo de enriquecimiento LESS. Incube durante 27-30 horas a 30 °C (un mínimo de 30 horas para helado, carne de cangrejo y lechuga).
2. Realice el ensayo a una alícuota de 0,4 ml de cultivo de caldo LESS. Guarde el cultivo para su posible confirmación.

Muestras ambientales tomadas con hisopo:

1. Coloque un hisopo en 10 ml de caldo de enriquecimiento LESS. Utilice una agitadora vorticial o mezcle vigorosamente durante 10 segundos. Deje el hisopo en el caldo. Incube durante 24-48 horas a 30 °C.
2. Realice el ensayo a una alícuota de 0,4 ml de cultivo de caldo LESS. Guarde el cultivo para su posible confirmación.

Muestras ambientales tomadas con esponja:

1. Coloque una esponja en el volumen apropiado (por ej., 100-200 ml) de caldo de enriquecimiento LESS. Utilice un homogeneizador Stomacher o mezcle vigorosamente durante 10 segundos. Deje la esponja en el caldo. Incube durante 24-48 horas a 30 °C.
2. Realice el ensayo a una alícuota de 0,4 ml de cultivo de caldo LESS. Guarde el cultivo para su posible confirmación.

ANTES DE COMENZAR LA PRUEBA

1. Permita que los reactivos refrigerados se equilibren a la temperatura ambiente.
2. Encienda el baño Maria o el bloque calefactor y ajuste la temperatura a 37 °C ± 1°. Llene el baño Maria a un nivel de aproximadamente 1,5 pulgadas, o llene los pocillos del bloque calefactor cerca 1/3 de un tercio con agua desionizada.
3. Prepare el reactivo para pretratamiento agregando 12 ml de buffer para pretratamiento (frasco 1b) directamente en el concentrado para pretratamiento (frasco 1a). Agite suavemente para disolver el contenido.
4. Prepare el reactivo para lisis agregando 12 ml de reactivo buffer para lisis (frasco 2b) directamente en el frasco de concentrado de reactivo para lisis (frasco 2a). Agite suavemente para disolver el contenido.
   Nota: *el reactivo para pretratamiento preparado en el paso 3 y el reactivo para lisis preparado en el paso 4 pueden combinarse en el frasco 2a. Los reactivos para pretratamiento y lisis por separado, o los reactivos combinados en el frasco 2a, permanecen estables en la forma reconstituida durante 60 días cuando se los guarda a -20 °C. Para descongelarlos, coloque los frascos a temperatura ambiente. Una vez que se hayan descongelado, agite el contenido suavemente.* ***Vuelva a colocar los reactivos reconstituidos en su lugar de almacenamiento a -20 °C inmediatamente después de cada uso.***
5. Para cada muestra que deba ser analizada, etiquete un tubo de ensayo de vidrio de borosilicato de 12 x 75 mm con la designación de muestra correspondiente en un soporte. Incluya tubos para 1 control positivo y 1 control negativo en cada análisis experimental.

6. Prepare la solución de lavado mezclando el contenido completo del concentrado de solución de lavado (frasco 5) con 950 ml de agua destilada o desionizada (si se hace el lavado de forma manual con un frasco de lavado de 500 ml, use 25 ml de concentrado con 475 ml de agua). Llene el depósito de buffer del dispositivo de lavado de placa (consulte las instrucciones del fabricante relacionadas con la configuración y el uso).
   Nota: *la solución de lavado puede guardarse en un frasco cerrado a temperatura ambiente por hasta 60 días.*
7. Sin tocar el fondo de los pocillos, coloque la cantidad apropiada de micropocillos en el bastidor de la placa, a la vez que llena el bastidor de adelante hacia atrás y de izquierda a derecha, en filas de 8. Incluya pocillos para el blanco de reactivos, el control negativo y el control positivo.
   Nota: *si la última fila tiene menos de 8 pocillos y se usa un dispositivo para lavado de placas, llene la última fila con pocillos de diferentes colores (Neogen ofrece pocillos de diferentes colores sin cargo).*

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Nota: *esta prueba puede adaptarse a equipos automáticos. Para obtener más información comuníquese con Neogen.*

1. Mezcle las muestras de prueba agitando suavemente los tubos de ensayo. **Agite las soluciones de los controles positivo y negativo invirtiendo los frascos varias veces.** Agregue 0,4 ml de cada control y muestra de prueba a los tubos correspondientemente etiquetados.
2. Agregue 0,1 ml de reactivo para pretratamiento reconstituido (frasco 1a) y 0,1 ml de reactivo para lisis reconstituido (frasco 2a) a cada tubo, o agregue 0,2 ml de la solución para pretratamiento/lisis combinada (frasco 2a) a cada tubo. Mezcle agitando suavemente el soporte de tubos a mano durante 5 segundos. La solución resultante debe ser verde (el nivel depende el producto alimenticio). Si alguno de los tubos no está verde, verifique si se haya agregado el reactivo adecuado. Incube los tubos en el bloque calefactor o el baño Maria a 37 °C durante 5 minutos.
3. Prepare la mezcla de sonda/hibridación a una proporción de 4:1 mezclando la solución de hibridación (frasco 3) y la solución de sonda (frasco 4) en un recipiente de plástico. Para obtener información sobre las pautas de mezclado, consulte el cuadro de mezclas que se proporciona con este equipo analítico o use la fórmula que se indica a continuación. (N = número de muestras de prueba + controles).
   Volumen de la solución de hibridación (frasco 3) = [(N x 0,1) + 1,6] ml
   Volumen de la solución de sonda (frasco 4) = [(N x 0,025) + 0,4] ml
4. Retire los tubos de la fuente de calor. Transfiera 0,150 ml de cada muestra lisada, incluidos los controles, a los micropocillos designados. El primer pocillo debe reservarse para el blanco de reactivos y no recibe muestras. El segundo pocillo debe usarse para el control negativo, y el tercero para el control positivo.
5. Mezcle vigorosamente la solución de sonda/hibridación preparada anteriormente. Agregue 0,125 ml a cada micropocillo y mezcle cada pocillo de 5 a 10 veces con la pipeta (se recomienda una pipeta multicanal). No agregue solución de sonda/hibridación al micropocillo de blanco de reactivos.
6. Cubra el bloque calefactor e incube la placa a 45 °C durante 60 minutos.
7. Lave los pocillos mediante alguno de los siguientes procedimientos:
   a) **Dispositivo para lavado de placas:** lave 5 veces a temperatura ambiente. Para cada lavado, procese una tira de 8 pocillos por vez aspirando el líquido y llenando los pocillos, y luego prosiga con la siguiente tira. Después del último lavado, aspire el líquido de los pocillos y luego retire todo líquido residual invirtiendo la placa y golpeándola suavemente sobre papel absorbente. Sostenga la placa apretando suavemente los lados del bastidor para mantener las tiras en su lugar. Asegúrese de no tocar el fondo o los lados de los pocillos con el lavador de placa.

b) **Manual:** lave bien los micropocillos al menos 5 veces usando una botella de lavado de plástico con la solución de lavado preparada anteriormente. Para realizar el lavado, vacíe el contenido de los pocillos en un recipiente adecuado, golpee suavemente la placa invertida sobre papel absorbente, llene completamente los pocillos con solución de lavado y agite vigorosamente para que salga el contenido.
Nota: *antes de pasar al paso siguiente, DEBEN retirarse todas las burbujas de aire antes. Si no es posible retirar todas las burbujas, vuelva a golpear vigorosamente los pocillos sobre una toalla de papel absorbente colocada sobre una superficie plana hasta que las burbujas desaparezcan.*

8. Agregue 0,150 ml de solución sustrato-cromógeno (frasco 6) en cada micropocillo, incluido el micropocillo de blanco de reactivos. Incube la placa a temperatura ambiente durante 20 minutos.
9. Agregue 0,050 ml de solución de detención (frasco 7) en cada micropocillo, incluido el micropocillo de blanco de reactivos.
10. Para asegurar que se produzca la mezcla, golpee suavemente el lado del bastidor varias veces.
11. Lea la absorbancia a 450 nm usando un lector de placa o tiras según las instrucciones del fabricante. Programe a cero el primer micropocillo que contiene la mezcla de sustrato-cromógeno y solución de detención (no programar a cero con aire). Si su lector de placa o tiras no se programa a cero con respecto al primer micropocillo, calcule los valores del control negativo, el control positivo y todos los otros pocillos de muestras, restando el valor de absorbancia del blanco de reactivos (pocillo A1) de los valores de absorbancia registrados en todos los otros pocillos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Valores de control: el valor de absorbancia para el control negativo debe ser $\leq$ 0,15 y el valor de absorbancia para el control positivo debe ser $\geq$ 1,00. Si alguno de los controles no se encuentra dentro del rango aceptable, la prueba no es válida y debe repetirse.

Criterio negativo: las pruebas que producen valores de absorbancia $<$ 0,10 son negativas para la presencia de especies de *Listeria* en las muestras de prueba.

Criterio positivo: las pruebas que producen valores de absorbancia $\geq$ 0,10 son positivas para la presencia de especies de *Listeria* en las muestras de prueba. Los resultados de pruebas positivos deben confirmarse mediante procedimientos de cultivo estándar.

PROCEDIMIENTO DE CONFIRMACIÓN RECOMENDADO

Neogen recomienda confirmar los resultados positivos mediante cultivo sembrando desde el cultivo de caldo de enriquecimiento final o de la resuspensión de crecimiento desde la placa de enriquecimiento secundaria al medio agar selectivo/diferencial para *Listeria* (se recomienda el agar MOX, ref. 2) y continuando con la identificación bioquímica de los presuntos aislados de *Listeria* mediante procedimientos estándar (ref. 1-2).

REFERENCIAS

1. U. S. Food and Drug Administration. 2003. *Listeria monocytogenes. Bacteriological Analytical Manual*, chapter 10, http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html
2. USDA-FSIS. 2008. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples. *Microbiology Laboratory Guidebook*, chapter 8, http://www.fsis.usda.gov/pdf/mlg_8_06.pdf
3. Van Netten, P., Perales, I., van de Moosdijk, A., Curtis, G.D., and Mossel, D.A. 1989. Intl. J. Food Microbiol. 8:299-316.

SERVICIO AL CLIENTE
Puede acceder al Servicio Técnico y de Asistencia al Cliente de Neogen entre las 8:00 a.m. y las 6:00 p.m. (hora del Este de los EE.UU.); llame a los números 800-234-5333 ó 517-372-9200 y pida hablar con un representante de ventas o con los Servicios Técnicos. Puede obtener asistencia 24 horas diarias, llamando al +1 800-867-0308.

INFORMACIÓN DISPONIBLE SOBRE FICHAS DE SEGURIDAD DE LOS MATERIALES
Puede obtener fichas de seguridad de los materiales para este equipo analítico y para todos los equipos analíticos de Neogen en www.neogen.com.

GARANTÍA
Neogen Corporation no ofrece garantía de ninguna especie, explícita o implícita, salvo la de que los materiales utilizados en sus productos son de calidad satisfactoria. Si algún material es defectuoso, Neogen facilitará un producto sustitutivo. El comprador asume todo el riesgo y toda la responsabilidad dimanantes del uso de este producto. No hay garantía de comerciabilidad de este producto, ni de la adecuación del mismo a ningún propósito. Neogen no se hace responsable de ningún daño, con inclusión de daños especiales o consecuentes, ni de gastos derivados directa o indirectamente del uso de este producto.

La compra de este producto autoriza su uso bajo las patentes de los Estados Unidos números 5,089,386; 5,376,528; y 5,851,767.

NEOGEN® CORPORATION

620 Lesher Place, Lansing, MI 48912
800/234-5333 (EE.UU./Canadá) o 517/372-9200 • fax: 517/372-2006
correo electrónico: foodsafety@neogen.com • www.neogen.com

©Neogen Corporation, 2009. Neogen y GeneQuence son marcas registradas de Neogen Corp., Lansing, MI 48912

608013D GQ-List-AOAC-ENSP_0309