

Instrucciones del producto

Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria*

Descripción del producto y uso previsto

El Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* 3M™ se usa junto con el Sistema de Detección Molecular 3M™ para la detección rápida y específica de especies de *Listeria* en muestras enriquecidas ambientales y de alimentos.

Los Ensayos de Detección Molecular 3M usan una amplificación isotérmica mediada por asas para amplificar rápidamente secuencias de ácidos nucleicos con alta especificidad y sensibilidad, combinada con bioluminiscencia para detectar la amplificación. Los resultados presuntivos positivos se reportan en tiempo real, mientras que los resultados negativos se revelan una vez terminado el ensayo. Los resultados presuntivos positivos se deben confirmar utilizando el método que usted prefiera o según lo especifiquen las regulaciones locales^(1, 2, 3).

El Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* 3M está previsto para su uso en laboratorios por profesionales capacitados en el empleo de técnicas de laboratorio. 3M no documentó el uso de este producto en otras industrias que no sean la alimentaria o la de bebidas. Por ejemplo, 3M no documentó este producto para el análisis de muestras clínicas, veterinarias, cosméticas, farmacéuticas ni de agua. El Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* 3M no ha sido evaluado con todos los protocolos de pruebas ni con todas las cepas de bacterias posibles.

Como sucede con todos los métodos de prueba, el tipo de medio de enriquecimiento puede afectar los resultados.

Factores como los métodos de toma de muestra, los protocolos de prueba, la preparación de las muestras, su manipulación y las técnicas del laboratorio pueden influir en los resultados. 3M recomienda que se realice una evaluación del método, incluido el medio de enriquecimiento, en el entorno del usuario a través de una cantidad suficiente de muestras con alimentos específicos o muestras ambientales y retos microbianos para garantizar que el método cumple con los criterios del usuario.

3M ha evaluado el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* 3M con Caldo Demi-Fraser y caldo Fraser que contiene citrato de amonio férrico. A continuación se presenta una fórmula típica de este medio.

Fórmula típica de la Base de Caldo Demi-Fraser (g/L)

Cloruro de sodio	20 g
Fosfato de sodio, dibásico, anhidro *	9,6 g
Extracto de carne	5 g
Digerido pancreático de caseína	5 g
Digerido péptico de tejido animal	5 g
Extracto de levaduras	5 g
Cloruro de litio	3 g
Fosfato de potasio, monobásico	1,35 g
Esculina	1 g
Clorhidrato de acriflavina	0,0125 g
Ácido nalidíxico	0,01 g
* Sustituto: Fosfato de sodio, dibásico, deshidratado	12 g

Fórmula típica de la base de Caldo Demi-Fraser (g/L)

Cloruro de sodio	20 g
Fosfato de sodio, dibásico, anhidro	9,6 g
Extracto de carne	5 g
Digerido pancreático de caseína	5 g
Digerido péptico de tejido animal	5 g
Extracto de levaduras	5 g
Cloruro de litio	3 g
Fosfato de potasio, monobásico	1,35 g
Esculina	1 g
Clorhidrato de acriflavina	0,025 g
Ácido nalidíxico	0,02 g

Suplemento para Caldo Fraser

(Ingredientes por vial de 10 ml. Se agrega un vial a un litro de medio basal.)

Citrato de amonio férrico 0,5 g/10 ml

pH final 7,2 ± 0,2 a 25 °C

El Equipo de Detección Molecular 3M™ está previsto para ser utilizado con muestras que hayan sido tratadas con calor durante el paso de lisis del ensayo, que se diseñó para destruir los organismos presentes en la muestra. Las muestras que no se hayan tratado debidamente con calor durante el paso de lisis del ensayo pueden considerarse un posible riesgo biológico y NO deben introducirse en el Equipo de Detección Molecular 3M.

3M Food Safety cuenta con certificación de la Organización internacional para la estandarización (ISO) 9001 de diseño y fabricación.

El kit de prueba para el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* 3M contiene 96 pruebas, que se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Componentes del kit

Artículo	Identificación	Cantidad	Contenido	Comentarios
Tubos de Solución para la Lisis (LS)	Solución rosada en tubos transparentes	96 (12 tiras de 8 tubos)	580 µl de LS por tubo	En gradillas y listos para usar
Tubos de reactivo para <i>Listeria</i>	Tubos azules	96 (12 tiras de 8 tubos)	Mezcla de detección y amplificación específica liofilizada	Listo para usar
Tapas adicionales	Tapas azules	96 (12 tiras de 8 tapas)		Listo para usar
Control de reactivos (RC)	Tubos transparentes con tapa de bisagra	16 (2 bolsas de 8 tubos individuales)	Mezcla de detección y amplificación de control liofilizado de ADN	Listo para usar
Guía de Inicio Rápido		1		

El Control negativo, no provisto en el kit, es el medio de enriquecimiento estéril, por ejemplo, el Caldo Demi-Fraser. No use agua como un Control negativo.

Seguridad

El usuario debe leer, comprender y proceder de acuerdo con toda la información sobre seguridad incluida en las instrucciones para el Sistema de Detección Molecular 3M y el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* 3M. Guarde las instrucciones de seguridad para referencia futura.

⚠ ADVERTENCIA: Indica una situación peligrosa que, si no se evita, podría ocasionar la muerte o lesiones graves, o daños a la propiedad.

⚠ PRECAUCIÓN: Indica una situación peligrosa que, si no se evita, podría ocasionar lesiones menores o moderadas, o daños a la propiedad.

AVISO: Indica una situación potencialmente peligrosa que, si no se evita, podría ocasionar daños a la propiedad.

⚠ ADVERTENCIA

No use el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* 3M para el diagnóstico de afecciones en seres humanos ni animales.

El método de Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* 3M puede generar niveles de *Listeria monocytogenes* suficientemente elevados como para provocar, en caso de exposición, nacimientos de niños muertos y muertes en mujeres embarazadas y en las personas inmunocomprometidas.

El usuario debe capacitar a su personal en lo que respecta a las técnicas de prueba adecuadas actuales: por ejemplo, Buenas Prácticas de Laboratorio, la norma ISO 17025⁽⁴⁾ o la norma ISO 7218⁽⁵⁾.

Para reducir los riesgos asociados con un resultado falso negativo que provoque la diseminación de productos contaminados:

- Siga el protocolo y realice las pruebas exactamente como se indica en las instrucciones del producto.
- Almacene el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* 3M como se indica en el embalaje y en las Instrucciones del producto.
- Siempre use el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* 3M antes de su fecha de vencimiento.
- Use el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* 3M con muestras ambientales y de alimentos que hayan sido validadas internamente o por un tercero.
- Use el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* 3M solo con superficies, desinfectantes, protocolos y cepas bacterianas que hayan sido validados internamente o por un tercero.
- En el caso de muestras ambientales que contengan una solución amortiguadora neutralizante con complejo de aril sulfonato, prepare una dilución 1:2 antes de la prueba (1 parte de la muestra en 1 parte de caldo de enriquecimiento estéril). Otra opción es la transferencia de 10 µl del caldo de enriquecimiento NB en los tubos de LS. Productos de manejo de muestras de 3M™ que incluyen una solución amortiguadora con complejo de aril sulfonato: BPPFV10NB, RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, XLSL10NB, HS10NB y HS119510NB.

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

- Es altamente recomendable que el personal femenino de los laboratorios conozca cuál es el riesgo para el feto en desarrollo que representa la infección de la madre resultante de la exposición a *Listeria monocytogenes*.
- Realice las pruebas de patógenos en un laboratorio debidamente equipado, bajo la supervisión de personal capacitado.
- Siempre siga las prácticas estándares de seguridad en laboratorio. Eso incluye usar la ropa de protección adecuada y protección para los ojos al manipular reactivos y muestras contaminadas.
- Evite el contacto con el contenido del medio de enriquecimiento y de los tubos de reactivo después de la amplificación.
- Deseche las muestras enriquecidas según la normativa actual local/regional/nacional y los estándares de la industria.



- Las muestras que no se hayan tratado debidamente con calor durante el paso de lisis del ensayo pueden considerarse un posible riesgo biológico y NO deben introducirse en el Equipo de Detección Molecular 3M.

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

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

⚠ PRECAUCIÓN

- No exceda la temperatura recomendada al configurar el calentador.
- No exceda el tiempo de calentamiento recomendado.
- Use un termómetro calibrado adecuado para verificar la temperatura del Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular 3M™ (por ej., un termómetro de inmersión parcial o un termómetro digital termopar, no un termómetro de inmersión total). El termómetro debe colocarse en la ubicación designada en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular 3M.

AVISO**Para reducir los riesgos relacionados con la contaminación cruzada, incluido un resultado falso positivo:**

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

Para reducir los riesgos relacionados con un resultado falso positivo:

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

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

Si tiene preguntas acerca de los procedimientos o las aplicaciones específicas, visite nuestro sitio web en www.3M.com/foodsafety o comuníquese con su representante o distribuidor local de 3M.

Limitación de garantías/Recurso limitado

SALVO LO EXPRESAMENTE ESTIPULADO EN UNA SECCIÓN DE GARANTÍA LIMITADA O EN EL EMBALAJE DE UN PRODUCTO ESPECÍFICO, 3M RENUNCIA A TODAS LAS GARANTÍAS EXPRESAS Y TÁCITAS INCLUIDA, ENTRE OTRAS, CUALQUIER GARANTÍA DE COMERCIABILIDAD O IDONEIDAD PARA UN USO EN PARTICULAR. Si un producto de 3M Food Safety es defectuoso, 3M o su distribuidor autorizado reemplazará el producto o reembolsará el precio de compra del producto, a su elección. Estos son sus recursos exclusivos. Deberá notificar inmediatamente a 3M en un lapso de sesenta días a partir del descubrimiento de cualquier sospecha de defecto en un producto y devolver dicho producto a 3M. Llame al Servicio de atención al cliente (1-800-328-1671 en EE. UU.) o su representante oficial de 3M Food Safety para obtener una Autorización de devolución de productos.

Limitación de la responsabilidad de 3M

3M NO SERÁ RESPONSABLE DE NINGUNA PÉRDIDA O DAÑO, YA SEA DIRECTO, INDIRECTO, ESPECIAL, DAÑOS ACCIDENTALES O CONSECUENCIAS, INCLUIDOS ENTRE OTROS, LA PÉRDIDA DE BENEFICIOS. En ningún caso la responsabilidad de 3M conforme a ninguna teoría legal excederá el precio de compra del producto supuestamente defectuoso.

Responsabilidad del usuario

Los usuarios son responsables de familiarizarse con las instrucciones e información del producto. Visite nuestro sitio web en www.3M.com/foodsafety o póngase en contacto con su representante o distribuidor local de 3M para obtener más información.

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

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

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

Como sucede con cualquier método de prueba, los resultados obtenidos del uso de cualquier producto de 3M Food Safety no constituyen una garantía de calidad de las matrices ni de los procesos analizados.

Para ayudar a los clientes a evaluar el método para las diferentes matrices de alimentos, 3M desarrolló el kit de Control de Matriz para Detección Molecular 3M™. Cuando sea necesario, utilice el Control de Matriz (MC) para determinar si la matriz tiene la capacidad de impactar en los resultados del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* 3M. Analice varias muestras representativas de la matriz, es decir, las muestras obtenidas de diferente origen, durante cualquier periodo de validación al adoptar el método de 3M o al analizar matrices nuevas o desconocidas, o matrices que hayan sido sometidas a cambios en el proceso o la materia prima.

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

Almacenamiento y desecho

Almacene el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* 3M a una temperatura entre 2 °C y 8 °C. No lo congele. Durante el almacenamiento, mantenga el kit fuera del alcance de la luz. Después de abrir el kit, verifique que la bolsa de aluminio no esté dañada. Si la bolsa está dañada, no use el producto. Después de abrir el embalaje, los tubos de reactivo no utilizados se deberán guardar siempre en la bolsa resellable junto con el desecante para conservar la estabilidad de los reactivos liofilizados. Almacene las bolsas reselladas a una temperatura entre 2 °C y 8 °C durante 60 días como máximo.

Nunca use el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* 3M después de su fecha de vencimiento. La fecha de vencimiento y el número de lote están impresos en la etiqueta externa de la caja. Después de usarlos, el medio de enriquecimiento y los tubos del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* 3M podrían contener materiales patógenos. Una vez terminada la prueba, proceda de acuerdo con los estándares actuales de la industria para el desecho de residuos contaminados. Consulte la Hoja de Datos de Seguridad para obtener más información y conocer las regulaciones locales para el desecho de materiales.

Instrucciones de uso

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

El usuario debe realizar y finalizar la capacitación para calificación como operador del Sistema de Detección Molecular 3M, tal como se describe en el documento "Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for 3M Molecular Detection System" (Instrucciones y protocolos de Calificación para instalación (IQ)/ Calificación operativa (OQ) para Sistemas de Detección Molecular 3M)⁽⁶⁾.

Realice periódicamente la descontaminación de los bancos y equipos de laboratorio (pipetas, herramientas para tapar/ destapar, etc.) con una solución de cloro de uso doméstico del 1 % al 5 % (v:v en agua) o una solución para eliminación de ADN.

Consulte la sección "Instrucciones específicas para métodos validados" para conocer los requisitos específicos:

Tabla 3 para los protocolos de enriquecimiento según AOAC® Official MethodSM 2016.07 y el certificado Performance TestedSM n.º 111501

Tabla 4 para los protocolos de enriquecimiento según el certificado de validación NF 3M 01/14-05/16

Enriquecimiento de la muestra

En las Tablas 2, 3 o 4 se ofrece una guía para el enriquecimiento de muestras de alimentos y ambientales. Es responsabilidad del usuario validar protocolos de muestreo o proporciones de dilución alternativos para garantizar que este método de prueba satisface los criterios del usuario.

Alimentos

1. Permita que el medio de enriquecimiento de Caldo Demi-Fraser (que incluye citrato de amonio férrico) se equilibre a la temperatura ambiente del laboratorio.
2. Combine el medio de enriquecimiento y la muestra de forma aséptica según las Tablas 2, 3 o 4. Para todo tipo de carnes y muestras con alto contenido de partículas, se recomienda utilizar bolsas con filtro.
3. Homogeneice totalmente mediante mezclado, un homogeneizador peristáltico o a mano durante $2 \pm 0,2$ minutos. Incube a 37 ± 1 °C según las Tablas 2, 3 o 4.
4. Para productos lácteos crudos, transfiera 0,1 ml del enriquecimiento primario a 10 ml de Caldo Fraser. Incube a 37 ± 1 °C durante 20 a 24 horas.

Muestras ambientales

Puede usarse como dispositivo para recolección de muestras una esponja hidratada con una solución neutralizante para inactivar los efectos de los desinfectantes. 3M recomienda usar una esponja de celulosa libre de biocida. La solución neutralizante puede ser Caldo Neutralizante Dey-Engley (D/E) o Caldo Lethen. Se recomienda desinfectar el área después del muestreo.

ADVERTENCIA: Si decidiera usar una Solución Amortiguadora Neutralizante (NB) que contenga el complejo aril sulfonato como solución hidratante para la esponja, deberá preparar una dilución 1:2 (1 parte de muestra en 1 parte de caldo de enriquecimiento estéril) de la muestra ambiental enriquecida antes de realizar la prueba para reducir los riesgos asociados con un resultado falso negativo que provoque la diseminación del producto contaminado.

Se recomienda que el tamaño del área de muestreo para verificar la presencia o ausencia de patógenos en la superficie sea de no menos de 100 cm² (10 cm x 10 cm o 4" x 4"). Al hacer el muestreo con una esponja, cubra toda el área moviéndose en dos direcciones (de izquierda a derecha y luego desde arriba hacia abajo) o recolecte muestras ambientales según su protocolo de muestreo actual o de acuerdo con los lineamientos del Manual de Bacteriología Analítica (BAM) de la FDA⁽¹⁾, de la guía de Laboratorio de Microbiología (MLG) de la agencia de Servicio de Seguridad e Inspección de los Alimentos (FSIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA)⁽²⁾ o de la norma ISO 18593⁽⁷⁾.

1. Permita que el medio de enriquecimiento de Caldo Demi-Fraser (que incluye citrato de amonio férrico) se equilibre a la temperatura ambiente del laboratorio.
2. Combine el medio de enriquecimiento y la muestra de forma aséptica según las Tablas 2, 3 o 4.
3. Homogeneice totalmente mediante mezclado, un homogeneizador peristáltico, agitación excéntrica o a mano durante 2 ± 0,2 minutos. Incube a 37 ± 1 °C durante 24 a 30 horas según las Tablas 2, 3 o 4.

Tabla 2: Protocolos generales de enriquecimiento mediante enriquecimiento con Caldo Demi-Fraser a 37 ± 1 °C Caldo Fraser según sea necesario.

Matriz de la muestra	Tamaño de la muestra	Volumen del Caldo de enriquecimiento (ml)	Temperatura de enriquecimiento (±1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (h)				
Carnes, aves, mariscos y pescados procesadas con calor, cocidos, curados Productos lácteos procesados con calor/pasteurizados Productos agrícolas y vegetales Alimentos con múltiples componentes	25 g	225	37	24 a 30				
Muestras ambientales	1 esponja	100 o 225	37	24 a 30				
	1 hisopo	10	37	24 a 30				
Carnes, aves, mariscos y pescados crudos	25 g	475	37	28 a 32				
Matriz de la muestra	Enriquecimiento primario (Caldo Demi-Fraser) ^(a)				Enriquecimiento secundario (Caldo Fraser) ^(a)			Volumen de análisis de la muestra ^(b)
	Tamaño de la muestra	Volumen del Caldo de enriquecimiento (ml)	Temperatura de enriquecimiento (±1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (h)	Tamaño de la muestra	Temperatura de enriquecimiento (±1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (h)	
Productos lácteos crudos	25 g	225	37	20 a 24	Transfiera 0,1 ml a 10 ml de Caldo Fraser	37	20 a 24	10 µl

- (a) El Caldo Demi-Fraser y el Caldo Fraser siempre deben estar complementados con suplemento para Caldo Fraser (citrato de amonio férrico) durante el enriquecimiento primario o secundario.
- (b) Volumen de la muestra transferida a los tubos de solución de Lisis. Consulte el paso 4.6 de la sección Lisis.

Instrucciones específicas para métodos validados

AOAC® Official MethodSM 2016.07

AOAC® Performance Tested MethodSM n.º 111501



En los estudios de AOAC OMA y PTM, se descubrió que el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* 3M era un método eficaz de detección de la especie *Listeria*. En la Tabla 3 se muestran las matrices usadas en el estudio.

Tabla 3. Protocolos de enriquecimiento que usan Caldo Demi-Fraser (a) a 37 ± 1 °C según AOAC® Official MethodSM 2016.07 y el certificado Performance TestedSM n.º 111501

Matriz de la muestra		Tamaño de la muestra	Volumen del Caldo de enriquecimiento (ml)	Tiempo de enriquecimiento (h)
Salchichas de res, queso fresco, helado de vainilla, queso cottage con leche con un 4 % de grasa, leche entera con 3 % de chocolate, lechuga romana, espinaca cruda en bolsas, salmón ahumado frío		25 g	225	24 a 30
Pollo crudo		25 g	475	28 a 32
Pavo estilo deli		125 g	1125	24 a 30
Melón ^(b)		Melón entero	Volumen suficiente para que el melón flote	26 a 30
Muestras ambientales:	Acero inoxidable	1 esponja	225	24 a 30
	Concreto sellado	1 esponja	100	24 a 30
	Plástico ^(c)	1 hisopo	10	24 a 30

Todas las muestras para la validación de AOAC se homogeneizaron mediante un homogeneizador peristáltico excepto donde se indica otra cosa.

- (a) El Caldo Demi-Fraser y el Caldo Fraser siempre deben estar complementados con suplemento para Caldo Fraser (citrato de amonio férrico) durante el enriquecimiento primario o secundario.
- (b) Homogeneice la muestra mediante mezclado a mano.
- (c) Homogeneice la muestra mediante agitación excéntrica.

Validación NF con Certificación AFNOR



3M 01/14-05/16

Métodos alternativos de análisis para los agronegocios
<http://nf-validation.afnor.org/en>

Para obtener más información sobre la finalización de la validez, consulte el certificado de validación NF disponible en el sitio web indicado arriba.

Método certificado de validación NF que cumple con la norma ISO 16140-2⁽⁸⁾ en comparación con la norma ISO 11290-1⁽³⁾

Alcance de la validación: Todas las muestras ambientales y de alimentos para humanos (no se incluyen muestras de producción primaria)

Preparación de la muestra: Las muestras deben prepararse de acuerdo con la norma EN ISO 11290-1⁽³⁾ y la norma EN ISO 6887⁽⁹⁾

Versión de software: Consultar certificado



Tabla 4. Protocolos de enriquecimiento según el método certificado de validación NF 3M 01/14-05/16

Protocolo general	Tamaño de la muestra	Volumen del Caldo de enriquecimiento (ml)	Temperatura de enriquecimiento (±1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (h)	Volumen de análisis de la muestra ^(a)	Punto de interrupción recomendado			
Todas las muestras de alimentos (excepto carnes crudas, mariscos crudos y productos lácteos crudos)	25 g	225	37	24 a 30	20 µL	<ul style="list-style-type: none"> • Caldo Demi-Fraser hasta 72 h • lisato a -20 °C • lisato a 4 °C hasta 72 h 			
Muestras ambientales	25 g, 1 hisopo o 1 paño	225	37	24 a 30	20 µL	<ul style="list-style-type: none"> • lisato a -20 °C 			
Protocolo específico 1	Tamaño de la muestra	Volumen del Caldo de enriquecimiento (ml)	Temperatura de enriquecimiento (±1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (h)	Volumen de análisis de la muestra ^(a) (µL)	Punto de interrupción recomendado			
Carnes crudas y mariscos crudos	25 g	475	37	28 a 32	20 µL	<ul style="list-style-type: none"> • Caldo Demi-Fraser hasta 72 h • lisato a -20 °C • lisato a 4 °C hasta 72 h 			
Protocolo específico 2	Enriquecimiento primario (Caldo Demi-Fraser) ^(b)				Enriquecimiento secundario (Caldo Fraser) ^(b)				
	Tamaño de la muestra	Volumen del Caldo de enriquecimiento (ml)	Temperatura de enriquecimiento (±1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (h)	Tamaño de la muestra	Temperatura de enriquecimiento (±1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (h)	Volumen de análisis de la muestra ^(c)	Punto de interrupción recomendado
Productos lácteos crudos	25 g	225	37	20 a 24	Transfiera 0,1 ml a 10 ml de Caldo Fraser	37	20 a 24	10 µL	<ul style="list-style-type: none"> • Caldo Demi-Fraser hasta 72 h • lisato a -20 °C

(a) Volumen de la muestra transferida a los tubos de solución de Lisis. Consulte el paso 4.6 de la sección Lisis.

(b) El Caldo Demi-Fraser y el Caldo Fraser siempre deben estar complementados con suplemento para Caldo Fraser (citrato de amonio férrico) durante el enriquecimiento primario o secundario.

(c) Volumen de la muestra transferida a los tubos de solución de Lisis. Consulte el paso 4.6 de la sección Lisis.



Nota: No se probaron las muestras con un tamaño superior a 25 g en el estudio de validación NF.

Preparación de la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular 3M™

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

Preparación de la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular 3M™

Coloque el Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular 3M directamente sobre el banco de laboratorio (la Bandeja para el Bloque de Frío del Sistema de Detección Molecular 3M™ no se usa). Use el bloque de frío a temperatura ambiente del laboratorio (20 a 25 °C).

Preparación del Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular 3M™

Coloque el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular 3M en una unidad de calentamiento de bloques. Encienda la unidad de calentamiento de bloques y ajuste la temperatura para permitir que el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular 3M alcance y mantenga una temperatura de 100 ±1 °C.

Nota: Según la unidad de calentamiento, espere aproximadamente 30 minutos para que el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular 3M alcance la temperatura deseada. Con un termómetro calibrado apropiado (por ej., un termómetro de inmersión parcial o un termómetro digital termopar, no un termómetro de inmersión total) colocado en la ubicación designada, verifique que el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular 3M se encuentre a 100 ±1 °C.

Preparación del Equipo de Detección Molecular 3M

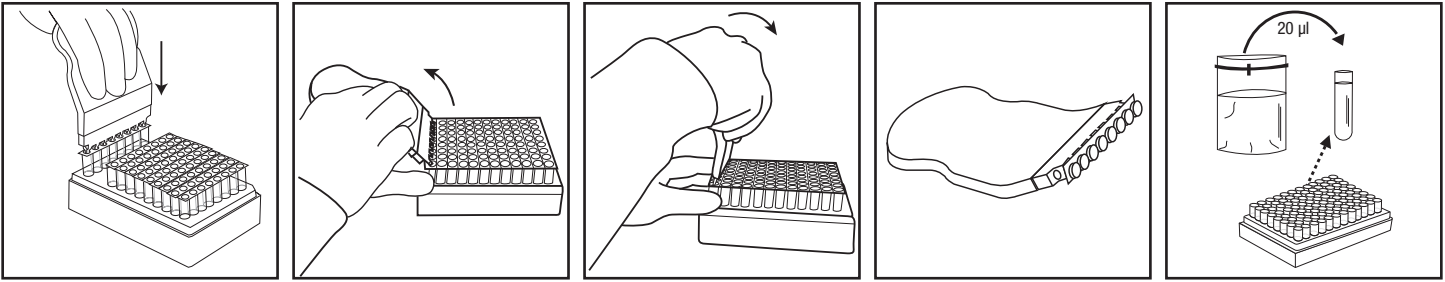
1. Inicie el Software de Detección Molecular 3M™ e inicie sesión. Comuníquese con su representante de 3M Food Safety para asegurarse de tener la versión más actualizada del software.
2. Encienda el Equipo de Detección Molecular 3M.
3. Cree o edite una corrida con datos para cada muestra. Para obtener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

Nota: El Equipo de Detección Molecular 3M debe alcanzar y mantener una temperatura de 60 °C antes de insertar la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular 3M con los tubos de reacción. Este paso de calentamiento lleva unos 20 minutos y aparece indicado por una luz de color ANARANJADO en la barra de estado del equipo. Una vez que el equipo esté listo para iniciar una corrida, la barra de estado se cambiará a color VERDE.

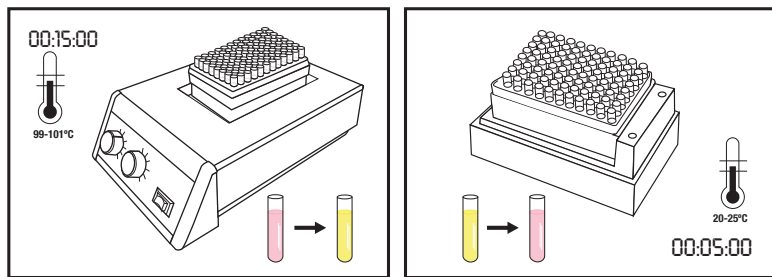
Lisis

1. Permita que los tubos de Solución para la Lisis (LS) se calienten colocando la gradilla a temperatura ambiente (20 a 25 °C) durante la noche (16 a 18 horas). Las alternativas para que los tubos de LS alcancen temperatura ambiente son colocarlos sobre el banco de laboratorio durante por lo menos 2 horas, incubarlos en una incubadora a 37 ±1 °C durante 1 hora o colocarlos en una unidad de calentamiento de dos bloques durante 30 segundos a 100 °C.
2. Invierta los tubos tapados para mezclarlos. En un plazo de 4 horas, proceda al paso siguiente.
3. Retire el Caldo de enriquecimiento de la incubadora.
4. Se requiere utilizar un tubo de LS para cada muestra y la muestra de Control Negativo (NC) (medio de enriquecimiento estéril).
 - 4.1 Las tiras de tubos de LS pueden cortarse para obtener la cantidad de tubos de LS deseada. Seleccione la cantidad de tubos de LS individuales o de tiras de 8 tubos necesarias. Coloque los tubos de LS en una gradilla vacía.
 - 4.2 Para evitar la contaminación cruzada, destape una tira de tubos de LS por vez y use una nueva punta de pipeta para cada paso de transferencia.
 - 4.3 Transfiera la muestra enriquecida a los tubos de LS como se describe a continuación:

Primero, transfiera cada muestra enriquecida a un tubo de LS. Transfiera el NC al final.
 - 4.4 Utilice la Herramienta para Encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular - Lisis 3M™ para destapar una tira de tubos de LS, una tira por vez.
 - 4.5 Deseche la tapa del tubo de LS; si se conservará el lisato para una repetición de prueba, coloque las tapas en un envase limpio para su reapiación luego de la lisis. Para procesar el lisato conservado, consulte el Apéndice A.
 - 4.6 Transfiera 20 µl de la muestra a un tubo de LS a menos que se indique algo diferente en la tabla de protocolo.
5. Repita el paso 4.2 hasta que cada muestra individual se haya agregado al correspondiente tubo de LS de la tira.



6. Repita los pasos 4.1 a 4.6 según sea necesario para la cantidad de muestras que se deben analizar.
7. Cuando ya haya transferido todas las muestras, transfiera 20 µL de NC (medio de enriquecimiento estéril, por ejemplo, Caldo Demi-Fraser) a un tubo de LS. No use agua como un NC.
8. Verifique que la temperatura del Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular 3M sea de $100 \pm 1^\circ\text{C}$.
9. Coloque la gradilla descubierta de tubos de LS en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular 3M y caliente durante 15 ± 1 minutos. Durante el calentamiento, la solución de LS cambiará de rosado (frío) a amarillo (calor).
Las muestras que no se hayan tratado debidamente con calor durante el paso de lisis del ensayo pueden considerarse un posible riesgo biológico y NO deben introducirse en el Equipo de Detección Molecular 3M.
10. Retire la gradilla descubierta de tubos de LS del bloque de calentamiento y deje que se enfríe en la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular 3M al menos durante 5 minutos y por un máximo de 10 minutos. Cuando se usa el Bloque de Enfriamiento para el Sistema de Detección Molecular 3M a temperatura ambiente sin la Bandeja para el Bloque de Frío del Sistema de Detección Molecular 3M, debe colocarse directamente sobre el banco de laboratorio. Cuando esté frío, la solución para la lisis volverá a un color rosado.
11. Retire la gradilla de tubos de LS de la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular 3M.

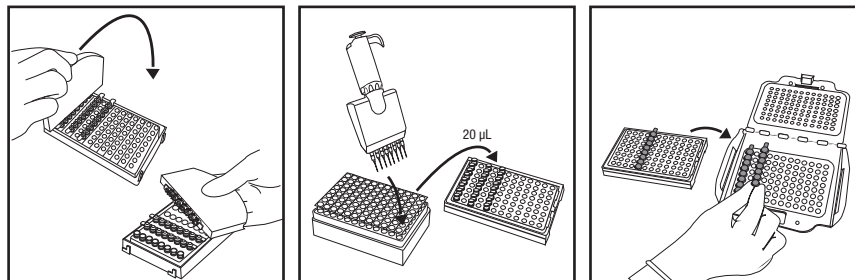


Amplificación

1. Se requiere un tubo de reactivo para cada muestra y el NC.
 - 1.1 Las tiras de tubos de reactivo pueden cortarse para obtener la cantidad de tubos deseada. Seleccione la cantidad de tubos de reactivo individuales o de tiras de 8 tubos necesaria.
 - 1.2 Coloque los tubos de reactivo en una gradilla vacía.
 - 1.3 Evite mover las perlas de reactivo en el fondo de los tubos.
2. Seleccione 1 tubo de control de reactivos (RC) y colóquelo en la gradilla.
3. Para evitar la contaminación cruzada, destape una tira de tubos de reactivo por vez y use una nueva punta de pipeta para cada paso de transferencia.
4. Transfiera el lisato a los tubos de reactivo y al tubo de RC como se indica a continuación:

Transfiera cada lisato de muestra a un tubo de reactivo individual **primero** y luego el NC. Hidrate el tubo de RC al **final**.
5. Utilice la Herramienta para Encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular - Reactivo 3M™ para destapar una tira de tubos de reactivo, una tira por vez. Deseche la tapa.
 - 5.1 **Transfiera 20 µL de lisato de muestra en el tubo de LS al tubo de reactivo correspondiente. Viértalo en ángulo para evitar que se muevan las perlas. Mezcle pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.**
 - 5.2 Repita el paso 5.1 hasta que cada lisato de muestra individual se haya agregado al correspondiente tubo de reactivo de la tira.
 - 5.3 Cubra los tubos de reactivo con la tapa adicional provista y utilice el lado redondeado de la Herramienta para Encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular – Reactivo 3M para aplicar presión con un movimiento hacia adelante y hacia atrás para asegurarse de que la tapa quede bien ajustada.

- 5.4 Repita el paso 5.1 según sea necesario para la cantidad de muestras que se deben analizar.
- 5.5 Cuando ya haya transferido todos los lisatos de muestra, repita el paso 4.1 para transferir 20 µl de lisato de NC a un tubo de reactivo.
- 5.6 Transfiera **20 µl de lisato de NC a un tubo de RC**. Viértalo en ángulo para evitar que se muevan las perlas. Mezcle pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.
6. Cargue los tubos tapados en una Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular 3M limpia y descontaminada. Cierre y trabe la tapa de la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular 3M.



7. Revise y confirme la corrida configurada en el Software de Detección Molecular 3M.
8. Haga clic en el botón de inicio del software y seleccione el equipo que usará. La tapa del equipo seleccionado se abrirá automáticamente.
9. Coloque la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular 3M en el Equipo de Detección Molecular 3M y cierre la tapa para comenzar con el ensayo. Obtendrá los resultados al cabo de 75 minutos, aunque los positivos pueden detectarse antes.
10. Una vez terminado el ensayo, retire la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular 3M del Equipo de Detección Molecular 3M y deseche los tubos embebiéndolos en una solución de cloro de uso doméstico del 1% al 5% (v:v en agua) durante 1 hora y lejos del área en que se prepara el ensayo.

Aviso: Para minimizar el riesgo de falsos positivos a causa de contaminación cruzada, nunca abra tubos de reactivo que contengan ADN amplificado. Esto incluye tubos de control de reactivos, reactivos y control de matriz. Siempre deseche los tubos de reactivo sellados embebiéndolos en una solución de cloro de uso doméstico del 1% al 5% (v:v en agua) durante 1 hora y lejos del área en que se prepara el ensayo.

Resultados e interpretación

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

Las muestras con resultados presuntivos positivos deben ser confirmadas de acuerdo con los procedimientos de operación estándares del laboratorio o mediante la confirmación del método de referencia apropiado^(1, 2, 3), comenzando con la transferencia del enriquecimiento primario al Caldo de enriquecimiento secundario (si se aplica), seguido del subsiguiente sembrado en placa y la confirmación de cepas, utilizando métodos serológicos y bioquímicos apropiados.

En el contexto de la VALIDACIÓN NF, todas las muestras identificadas como positivas por el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* deben confirmarse mediante una de las siguientes pruebas:

Opción 1: Uso de la norma ISO 11290-1⁽³⁾ a partir del enriquecimiento del Caldo Demi-Fraser

Opción 2: Implementación de un método de confirmación que conste de lo siguiente: Transferencia de 0,1 ml del Caldo Demi-Fraser. Estriar directamente en el agar selectivo que se describe en la norma ISO 11290-1⁽³⁾.

Opción 3: Uso de sondas de ácido nucleico como se describe en la norma EN ISO 7218⁽⁵⁾, realizado en colonias aisladas, de agar selectivo (consultar opciones 1 o 2).

Opción 4: Uso de cualquier otro método de VALIDACIÓN NF certificado, cuyo principio debe ser diferente del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria*. Se debe usar el protocolo completo que se describe para este segundo método validado. Todos los pasos anteriores al inicio de la confirmación deben ser comunes a ambos métodos.

En el caso de obtenerse resultados discordantes (presuntivos positivos con el método alternativo, no confirmados por uno de los medios que se describen arriba) el laboratorio debe seguir los pasos necesarios para garantizar la validez del resultado obtenido.

Nota: Incluso una muestra negativa no arrojará una lectura de cero, ya que los reactivos de amplificación del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria* 3M tienen unidades relativas de luz de fondo (URL).



En el extraño caso de que se produjera una cantidad de luz inusual, el algoritmo lo etiquetará como "Inspeccionar". 3M recomienda al usuario repetir el ensayo para aquellas muestras etiquetadas como Inspeccionar. Si el resultado continúa siendo Inspeccionar, proceda con la prueba de confirmación utilizando el método que usted prefiera o según lo especifiquen las regulaciones locales.

Si tiene preguntas acerca de los procedimientos o las aplicaciones específicas, visite nuestro sitio web en www.3M.com/foodsafety o comuníquese con su representante o distribuidor local de 3M.

Apéndice A. Interrupción por protocolo: Almacenamiento y repetición de pruebas de lisatos tratados con calor

1. Para almacenar un lisato tratado con calor, vuelva a taponar el tubo de lisis con una tapa limpia (consulte "LISIS", 4.5)
2. Almacene de 4 °C a 8 °C por hasta 72 horas.
3. Prepare una muestra almacenada para amplificación invirtiéndola 2 a 3 veces para mezclar.
4. Destape los tubos.
5. Coloque los tubos de lisato mezclados en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular 3M y caliéntelos a 100 ±1 °C durante 5 ±1 minutos.
6. Retire la gradilla de tubos de LS del bloque de calentamiento y deje que se enfríe en la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular 3M al menos durante 5 minutos y por un máximo de 10 minutos.
7. Siga el protocolo en la sección "Amplificación" que se detalla arriba.

Referencias:

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analysis Manual. Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. January 2016 Version.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.08. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Effective Date: May 1, 2013.
3. ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Amendment 1, 2004-10-15.
4. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination.
6. 3M. Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for 3M Molecular Detection System.
7. ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. ISO 16140-2 Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
9. ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

Explicación de símbolos

www.3M.com/foodsafety/symbols

3M Food Safety

3M United States

3M Center
Bldg. 275-5W-05
St. Paul, MN 55144-1000
USA
1-800-328-6553

3M Canada

Post Office Box 5757
London, Ontario N6A 4T1
Canada
1-800-563-2921

3M Latin America

3M Center
Bldg. 275-5W-05
St. Paul, MN 55144-1000
USA
1-954-340-8263

3M Europe and MEA

3M Deutschland GmbH
Carl-Shurz - Strasse 1
D41453 Neuss/Germany
+49-2131-14-3000

3M United Kingdom PLC

Morley Street,
Loughborough
Leicestershire
LE11 1EP
United Kingdom
+(44) 1509 611 611

3M Österreich GmbH

Euro Plaza
Gebäude J, A-1120 Wien
Kranichberggasse 4
Austria
+(43) 1 86 686-0

3M Asia Pacific

No 1, Yishun Avenue 7
Singapore, 768923
65-64508869

3M Japan

3M Health Care Limited
6-7-29, Kita-Shinagawa
Shinagawa-ku, Tokyo
141-8684 Japan
81-570-011-321

3M Australia

Bldg A, 1 Rivett Road
North Ryde, NSW 2113
Australia
61 1300 363 878



3M Health Care

2510 Conway Ave
St. Paul, MN 55144 USA
www.3M.com/foodsafety