

SOLUS *LISTERIA* ELISA

Sistema de análisis por inmunoensayo para
la detección de *Listeria* spp.
en muestras de alimentos y del entorno de producción

Número del prospecto: 36
Número de versión: 1.0
Fecha de la versión: Enero 2020
Códigos del producto: LIS-0096S; LIS-0480S
Organismo de certificación: AFNOR





SOL 37/02-06/13
MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA LA
AGROINDUSTRIA
<http://nf-validation.afnor.org/en>

Este método ha sido certificado por AFNOR para la detección de *Listeria* spp. en todos los productos alimentarios para humanos (se han realizado ensayos de validación en una amplia gama de alimentos) y en muestras del entorno de producción (núm. de ref. de validación **SOL 37/02-06/13**).

1. INTRODUCCIÓN

El método Solus *Listeria* ELISA proporciona un resultado negativo o presuntamente positivo mediante 2 pasos de enriquecimiento y en un plazo de 44 a 52 horas, incluido el tiempo de análisis.

2. USOS PREVISTOS

El método Solus *Listeria* ELISA sirve para la detección de *Listeria* spp en determinados alimentos y muestras del entorno. El análisis es fácil de realizar aunque requiere instalaciones de laboratorio y personal cualificado y formado. Se recomienda que los nuevos usuarios realicen el curso de formación básico impartido por Solus Scientific Solutions Ltd.

La utilización de este método incluye el cumplimiento de las normas de buena práctica de laboratorio (GLP) (véase EN ISO 7218).

3. REACTIVOS SUMINISTRADOS

La mayoría de los componentes del kit de análisis se suministran estabilizados y listos para usar en la concentración de trabajo, solo el tampón de lavado concentrado requiere dilución. Todos los kits de análisis contienen material suficiente para 1 (LIS-0096S) o 5 (LIS-0480S) x 93 determinaciones, más los controles. La fecha de caducidad del kit de análisis se muestra en la etiqueta del producto.

Componente	Aspecto	Volumen		Comentarios
		LIS-0096S	LIS-0480S	
Placa de ensayo	Microplaca de 96 pocillos con formato de tira extraíble o rompible	1	5	Los pocillos están recubiertos por anticuerpos contra <i>Listeria</i> spp.
Control negativo	Líquido de color naranja pálido. Etiqueta verde.	3 ml	10 ml	Concentración de trabajo. Contiene diluyente con conservante.
Control positivo	Líquido negro. Etiqueta roja.	3 ml	10 ml	Concentración de trabajo. Contiene <i>Listeria</i> termoinactivada en diluyente con conservante.
Conjugado	Líquido incoloro o con coloración pajiza muy pálida. Etiqueta naranja.	11 ml	60 ml	Concentración de trabajo. Contiene un conjugado de anticuerpo-peroxidasa de rábano picante en el diluyente con conservante.
Sustrato	Líquido incoloro o de color azul muy pálido. Etiqueta azul.	11 ml	60 ml	Concentración de trabajo. Contiene 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB), peróxido de hidrógeno y estabilizadores.
Solución stop	Líquido incoloro. Etiqueta amarilla.	11 ml	60 ml	Concentración de trabajo. Contiene 0,2 M de ácido sulfúrico.
Tampón de lavado concentrado	Líquido incoloro/amarillo/naranja. Etiqueta blanca.	10 ml x 6	60 ml x 5	Concentrado. Diluir antes de usar.

4. MATERIALES Y EQUIPOS NECESARIOS QUE NO SE SUMINISTRAN

Frigorífico a 2-8 °C	Temporizador
Agua desionizada o destilada	Estufa de incubación a 37±1 °C
Medio de cultivo Half Fraser	Estufa de incubación a 30±1 °C
Medio de cultivo selectivo RELM	Tubos para ebullición de muestras (p. ej.: tubos de polipropileno sin borde de 5 ml, 12 x 75 mm)
Torundas de esponja o hisopos empapados con la solución neutralizante adecuada (p. ej.: medio de agar Lethen o tampón HiCap)	Aparato para calentar (p. ej.: termobloque) capaz de calentar hasta 85-100 °C
Probetas cilíndricas de varios volúmenes (p. ej.: 250 ml, 1 l)	Pipetas y puntas (1 ml; 0,1 ml)
Tubos de ensayo estériles de 10 ml aptos para enriquecimiento selectivo	Dynex DS2 o equipo de limpieza de microplacas y lector de microplacas con filtro de 450 nm
Homogenizador (o aparato similar) y bolsas de filtro	Autoclave para la descontaminación de las muestras
Pipetas de transferencia de 3 ml (estériles)	Placas de agar y equipos de análisis de confirmación estándar.
Agitador vórtex	Véase el apartado 10 para obtener información.

5. PREPARACIÓN DEL REACTIVO

5.1 Tampón de lavado:

Prepare lo siguiente en un recipiente limpio.

LIS-0096S	LIS-0480S
Añada 10 ml (1 frasco) de tampón de lavado concentrado en 240 ml de agua desionizada y agite en círculos para mezclar.	Añada 60 ml (1 frasco) de tampón de lavado concentrado en 1440ml de agua desionizada y agite en círculos para mezclar.

5.2 Caldo de cultivo (medio de cultivo):

- prepare el caldo Half Fraser siguiendo las instrucciones del fabricante. Deje enfriar a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de usar en el análisis.
- Prepare el caldo RELM siguiendo las instrucciones del fabricante y distribúyalo en tubos estériles de 10 ml. Deje enfriar a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de usar en el análisis.

6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y ENRIQUECIMIENTO: método estándar

6.1 Preenriquecimiento (todas las muestras menos las de superficies del entorno)

- Homogeneice X g de la muestra para análisis, con un homogeneizador si fuera necesario, en 9*X ml de caldo Half Fraser e incube durante 22-26 horas a 30±1 °C. En el marco de la VALIDACIÓN NF, las porciones de prueba que pesen más de 25 g no se han analizado.

6.2 Preenriquecimiento de muestras de superficies del entorno

- Utilice hisopos o torundas de esponja estériles prehumedecidos en un caldo neutralizante. Tome muestras de la superficie del entorno y, a continuación, enriquezca el hisopo en 10 ml, o la esponja en 100 ml, de caldo Half Fraser durante 22-26 horas a 30±1 °C.



6.3 Enriquecimiento selectivo

- Transfiera 0,2 ml de la muestra enriquecida a 10 ml de caldo RELM e incube durante 22-26 horas a 30 ± 1 °C.

Asegúrese de que el tiempo de procesamiento de las muestras en la poyata se mantiene al mínimo y que el traslado a la estufa de incubación a 30 °C se hace lo antes posible. Es importante evitar la proliferación excesiva de organismos competidores.

7. TERMOINACTIVACIÓN POSENRIQUECIMIENTO

- 7.1. Cuando el periodo de incubación de una muestra finalice, transfiera una alícuota de 1-2 ml (evitar partículas) a un tubo para ebullición de muestras (p. ej.: un tubo de polipropileno de 5 ml).
- 7.2. Caliente la alícuota a 85-100 °C durante 15-20 minutos en el tubo. Después de calentar deje enfriar la muestra a temperatura ambiente (18-25°C). El proceso se puede acelerar colocando los tubos en agua fría del grifo durante ~5 minutos.

Las muestras que no se han termoinactivado deben conservarse para verificación hasta que se obtengan los resultados del análisis ELISA. Estas muestras deben mantenerse a 30 ± 1 °C si el análisis ELISA se va a realizar en un plazo de 2 horas. Si no es posible, mantenga los caldos hasta un máximo de 72 horas a 2-8 °C antes del análisis ELISA.

8. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO ELISA

Procedimiento manual

- 8.1. Saque uno de los kits de análisis al menos una hora antes de usar para que sus componentes alcancen la temperatura ambiente (18-25°C). Determine el número de pocillos que necesita para el análisis. Saque el número de tiras que necesite del sobre y colóquelas en el soporte proporcionado. Las tiras que no se usen se pueden volver a meter en el sobre y guardar a 2-8 °C.
- 8.2. Prepare el tampón de lavado como se ha explicado en el apartado 5.1 para el tamaño de kit de análisis que se vaya a utilizar.
- 8.3. Deje el primer pocillo de la tira vacío para usar como «blanco» para medir la absorbancia del sustrato.
- 8.4. Pipetee 0,1 ml de control negativo (etiqueta verde) en el segundo pocillo.
- 8.5. Pipetee 0,1 ml de control positivo (etiqueta roja) en el tercer pocillo.
- 8.6. Pipetee 0,1 ml de cada muestra termoinactivada por separado en pocillos consecutivos de la tira. Si quedan pocillos vacíos al final de la tira de análisis, puede repetir los controles positivo y negativo. †
- 8.7. Ponga la placa a incubar (con las tiras) a 37 ± 1 °C durante 30-35 minutos.
- 8.8. Después de incubar, aspire el contenido de los pocillos eliminando todo el líquido posible. Lave los pocillos 5 veces con el tampón de lavado asegurándose de que llena y vacía los pocillos durante cada ciclo de lavado. La técnica de lavado es crítica para el funcionamiento del ensayo por lo que se recomienda usar un instrumento de lavado de microplacas.
- 8.9. Pipetee 0,1 ml de conjugado (etiqueta naranja) en todos los pocillos menos en el «blanco».
- 8.10. Ponga la placa a incubar a 37 ± 1 °C durante 30-35 minutos.
- 8.11. Repita los ciclos de lavado como se describe en el apartado 8.8.
- 8.12. Pipetee 0,1 ml de sustrato (etiqueta azul) en todos los pocillos, incluido el «blanco».
- 8.13. Incube la placa a temperatura ambiente (18-25°C) durante 30 minutos a oscuras.

- 8.14. Después de incubar pare la reacción añadiendo 0,1 ml de solución stop (etiqueta amarilla) en todos los pocillos, incluido el «blanco». La solución stop hará que el color azul de los pocillos cambie a amarillo.
- 8.15. Lea las densidades ópticas de los pocillos en un plazo de 10 minutos en un lector de placas utilizando un filtro de 450 nm. Antes de proceder con la lectura inspeccione los pocillos para ver si se han formado burbujas de aire y, si las hubiera, elimínelas con una aguja. El lector debe ponerse a cero con el pocillo «blanco» antes de leer el resto de los pocillos. No utilice el filtro de referencia. Es preferible usar equipos ELISA automáticos y deben configurarse y validarse en conformidad con este protocolo.

† Si se va a utilizar un equipo Dynex, deberá tenerse cuidado y evitar que se formen burbujas en la muestra y en los tubos de reactivos, o la formación de películas en el tubo por encima del nivel del líquido. Es esencial comprobar que el sistema ha pipeteado las muestras correctamente en la placa de ensayo antes de empezar.

9. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresan en medidas de densidad óptica (DO_{450}) utilizando un lector de microplacas.

Criterios de aceptación:

DO_{450} del control negativo	<0,100
DO_{450} del control positivo	>0,500

Siempre debe sustraerse el valor del pocillo «blanco» (normalmente en A1 cuando se procesa manualmente). Si el valor de los controles positivo o negativo no cumple estos criterios, el análisis no se considera válido y debe repetirse.

Las muestras con lecturas de DO_{450} <0,200 se consideran negativas y en este caso el análisis ha concluido; los resultados se pueden notificar y las muestras que no se han inactivado térmicamente se pueden desechar siguiendo la normativa o las directrices locales.

Los pocillos de muestra con $DO_{450} \geq 0,200$ se consideran presuntamente positivos para *Listeria*. Los resultados positivos deben verificarse utilizando un método de cultivo reconocido.

10. CONFIRMACIÓN DE LOS RESULTADOS POSITIVOS DEL ENSAYO ELISA PARA *LISTERIA*

En el marco de la VALIDACIÓN NF, todas las muestras identificadas como positivas con un método alternativo deben confirmarse utilizando uno de los análisis siguientes:

- Utilizando los análisis descritos en los métodos normalizados CEN o ISO, incluido el paso de purificación. El paso de confirmación debe empezar a partir del caldo RELM no termoinactivado guardado a 30 °C o a 2-8 °C.
- Siembre el caldo RELM (10 µl) en 1 placa de agar (formulación ISO acreditada por OAA, Palcam o Oxford). Incube los agares como se especifica en los protocolos de cultivo normalizados para *Listeria* y, a continuación, realice las pruebas de confirmación: Tinción de Gram y catalasa. Si las colonias están bien aisladas se pueden realizar las pruebas de confirmación directamente (sin purificación previa). Para la confirmación deben analizarse entre una y cinco colonias.

En caso de obtener resultados no coincidentes (presunto resultado positivo con ELISA que no se confirma con ninguno de los métodos descritos anteriormente) el laboratorio deberá seguir los pasos necesarios para garantizar la validez del resultado obtenido. Por ejemplo, se pueden realizar más siembras del medio de cultivo sobrante y también se puede reanalizar la muestra alimentaria original para garantizar la calidad del resultado.

11. CONSERVACIÓN Y VENCIMIENTO DEL KIT DE ANÁLISIS

El kit de análisis y cualquier componente sin utilizar del mismo deberán conservarse a 2-8 °C. NO CONGELAR. La fecha de vencimiento del kit se muestra en la caja y en todos los componentes incluidos en la caja. El tampón de lavado diluido sobrante se puede conservar durante 10 días si se mantiene a 2-8 °C. Todas las tiras de microplaca sin utilizar deberán devolverse al sobre de papel metalizado con el sobrecito de desecante cerrando bien el precinto y, a continuación, guardar a 2-8 °C.

12. SEGURIDAD

Aunque los procedimientos detallados son sencillos y fáciles de realizar, requieren instalaciones de laboratorio con personal cualificado formado en la manipulación de organismos potencialmente patógenos. Se recomienda que los nuevos usuarios realicen el curso de formación básico impartido por Solus Scientific Solutions Ltd.

- La solución stop contiene ácido sulfúrico que es un compuesto corrosivo. Si la solución entra en contacto con la piel o con las membranas mucosas, lávese inmediatamente con agua abundante.

Como guía, se deberán tomar las precauciones siguientes como mínimo:

- Se deberá utilizar ropa de protección, incluida la bata de laboratorio, gafas de seguridad, máscara y guantes cuando sea apropiado.
- No pipetee con la boca.
- Evite contacto con la piel.
- No coma, beba o utilice cosméticos en el laboratorio.
- Siga todas las normativas aplicables locales, estatales/provinciales y/o nacionales relacionadas con la eliminación de residuos biológicos.

13. PRECAUCIONES

- Los reactivos se suministran con una concentración de trabajo fija. La sensibilidad y especificidad óptimas disminuirán si los reactivos se modifican o no se conservan en las condiciones recomendadas.
- No mezcle lotes de reactivos distintos.
- Evite la contaminación microbiana en los frascos de reactivos abiertos.
- Asegúrese de que no se produce contaminación cruzada entre los pocillos.
- Para que el funcionamiento del análisis sea correcto, es esencial que el anticuerpo conjugado con enzimas no contamine otros reactivos o equipos.
- Asegúrese de que los componentes del kit no se exponen a temperaturas superiores a 40 °C.
- Las soluciones que contienen azida sódica no se deben utilizar para limpiar equipos, especialmente los de lavado (la azida sódica inactiva la enzima peroxidasa utilizada en el kit).
- No utilice este análisis para usos diagnósticos de muestras clínicas.

14. INFORMACIÓN FDSM

Las fichas de datos de seguridad de materiales (FDSM) para este análisis están disponibles previa solicitud.

15. GARANTÍA

La precisión de los resultados depende del uso correcto del kit y de haber seguido las instrucciones de uso detenidamente. Si el desempeño del kit no se ajusta a la especificación, póngase en contacto con:

Solus Scientific Solutions Ltd

9 Mansfield Networkcentre

Millennium Business Park

Concorde Way

Mansfield

Nottinghamshire

NG19 7JZ

Tel - +44 (0)1623 429701

Fax - +44 (0)1623 620977

Correo electrónico: info@solusscientific.com

Información de *copyright*

Este documento, incluidas las fotografías e ilustraciones, contiene información patentada protegida por *copyright*. Se prohíbe la reproducción total o parcial de esta publicación, de ninguna forma ni por cualquier medio, y la traducción a cualquier idioma sin el permiso previo y por escrito de PerkinElmer. ©2020 PerkinElmer, Inc. Todos los derechos reservados.

Marcas comerciales

PerkinElmer es una marca registrada de PerkinElmer, Inc. El resto de las marcas comerciales son propiedad de sus propietarios respectivos.

Resumen de cambios

Fecha del cambio	Número de versión	Resumen del cambio
Enero 2020	1	Reposicionamiento de marca y combinación de Solus Listeria ELISA – QCF 18 – Versión 1.4 – 08/17 y Solus Listeria ELISA – QCF 19 – Versión 1.6 – 08/17

NOTA: Los cambios menores (p. ej.: de formato, gramática, tipográficos) no se incluyen en el resumen de cambios.

Si desea más información visite www.solusscientific.com

Fabricado en:

Solus Scientific Solutions Ltd.

9 Mansfield Networkcentre,
Millennium Business Park, Concorde Way,
Mansfield, Nottinghamshire
NG19 7JZ
Reino Unido
Tel - +44 (0)1623 429701

PerkinElmer, Inc

940 Winter Street,
Waltham, MA 02451 USA
P: (800) 762-4000 o
(+1) 203-925-4602
www.perkinelmer.com



Si desea una lista completa de nuestras oficinas globales visite www.perkinelmer.com/ContactUs