

# SOLUS *LISTERIA* *MONOCYTOGENES* ELISA

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

**Número del prospecto:** 42  
**Número de versión:** 1.0  
**Fecha de la versión:** Agosto 2020  
**Códigos del producto:** LISM-0096; LISM-0480  
**Organismo de certificación:** AOAC





El funcionamiento de este método ha sido evaluado por el AOAC Research Institute con el resultado de que su desempeño se ajustaba a las especificaciones del fabricante.

Este método se ha evaluado en el programa *Performance Tested Methods<sub>SM</sub>* del AOAC® para la detección de *Listeria monocytogenes* en lechuga romana embolsada (25 g y 125 g), salchichas (25 g y 125 g), fiambre de jamón en lonchas (25 g y 125 g), queso procesado (25 g y 125 g), gambas crudas congeladas (25 g), carne picada (25 g) y muestras de superficies de acero inoxidable y de poliestireno del entorno de producción. El método Solus *Listeria monocytogenes* ELISA se ha comparado con los métodos de referencia USDA-FSIS MLG 8.11 y FDA/ BAM (capítulo 10), al ser aplicables a matrices. (AOAC® *Performance Tested<sub>SM</sub>* núm. de licencia **082001**).

## 1. INTRODUCCIÓN

El método Solus *Listeria monocytogenes* ELISA proporciona un resultado negativo o presuntamente positivo mediante 2 pasos de enriquecimiento y en un plazo de 51 a 59 horas, incluido el tiempo de análisis.

## 2. USOS PREVISTOS

El método Solus *Listeria monocytogenes* ELISA sirve para la detección de *Listeria monocytogenes* 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 (LISM-0096) o 5 (LISM-0480) 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
		LISM-0096	LISM-0480	
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 monocytogenes</i> .
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 monocytogenes</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. El tampón de lavado concentrado se proporciona en exceso. Tampón de lavado concentrado sobrante debe desecharse. No mezcle los números de lote de los reactivos.
------------------------------	--	--------------	--------------	---

#### 4. MATERIALES Y EQUIPOS NECESARIOS QUE NO SE SUMINISTRAN

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

#### 5. PREPARACIÓN DEL REACTIVO

##### 5.1 Tampón de lavado:

Prepare lo siguiente en un recipiente limpio.

LISM-0096	LISM-0480
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 Solus Palcam enriquecido con el suplemento selectivo PAC 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 de muestras alimentarias

#### Dilución 1:10:

- Muestra de 25 g (lechuga romana embolsada, salchichas, fiambre de jamón en lonchas, queso procesado, gambas crudas congeladas, carne picada). Homogeneice 25 g de la muestra para análisis, con un homogeneizador si fuera necesario, en 225 ml de caldo Half Fraser e incube durante 24-28 horas a  $30\pm 1$  °C.

#### Dilución 1:4:

- Muestras de 125 g (lechuga romana embolsada, salchichas, fiambre de jamón en lonchas, queso procesado). Homogeneice 125g de la muestra para análisis, con un homogeneizador si fuera necesario, en 375ml de caldo Half Fraser e incube durante 24-28 horas a  $30\pm 1$  °C.

### 6.2 Preenriquecimiento para muestras alimentarias

- Tome muestras del entorno de producción con un instrumento de muestreo. Siga las instrucciones de uso, conservación y transporte del fabricante del instrumento de muestreo para utilizarlo correctamente.
- Añada 100 ml de caldo Half Fraser en una torunda de esponja en una bolsa de muestra adecuada. Añada 10 ml de caldo Half Fraser a los hisopos o torundas.
- Masajee (las torundas de esponja con la muestra) manualmente durante 2 minutos o mezcle (los hisopos) en vórtex durante 2 minutos e incube durante 24-28 horas a  $30\pm 1$  °C.

### 6.3 Enriquecimiento selectivo

- Transfiera 0,2 ml de la muestra enriquecida a 10 ml de caldo Solus Palcam suplementado con PAC y ponga a incubar durante 24-28 horas a  $37\pm 1$  °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 37 °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  $37\pm 1$  °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  $37 \pm 1$  °C durante 60 minutos ( $\pm 5$  minutos).
- 8.8. Pipetee 0,1 ml de conjugado (etiqueta naranja) en todos los pocillos menos en el «blanco».
- 8.9. Ponga la placa a incubar a  $37 \pm 1$  °C durante 60 minutos ( $\pm 5$  minutos).
- 8.10. Después de incubar, aspire el contenido de los pocillos eliminando todo el líquido posible. Lave los pocillos entre 5 y 7 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. Se recomienda utilizar un equipo de lavado de microplacas. \*
- 8.11. Pipetee 0,1 ml de sustrato (etiqueta azul) en todos los pocillos, incluido el «blanco».
- 8.12. Incube la placa a temperatura ambiente (18-25°C) durante 30 minutos a oscuras.
- 8.13. Después de incubar pare la reacción añadiendo 0,1 ml de solución stop (etiqueta amarilla) en todos los pocillos, incluido el pocillo «blanco». La solución stop hará que el color azul de los pocillos cambie a amarillo.
- 8.14. 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 correctamente las muestras en la placa de ensayo antes de empezar.

\* Si utiliza un equipo Dynex, se realizará un «superbarrido» después de cada ciclo de lavado. Esta acción aumenta el tiempo de lavado en comparación con los demás protocolos del ensayo Solus pero es necesaria para obtener resultados precisos.

## 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) del resto de los resultados. 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.

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

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

Basándose en los resultados del estudio de validación PTM del AOAC, todas las muestras identificadas como positivas para *Listeria monocytogenes* con el método de ensayo Solus *Listeria monocytogenes* ELISA deben confirmarse mediante los análisis siguientes:

- Ponga 100 µl de muestra no termoinactivada en una placa con agar selectivo para *Listeria* MOX. Las colonias típicas de *Listeria* spp son de color negro rodeadas por un halo negro. Realice las pruebas de la catalasa y de la tinción Gram en colonias típicas aisladas de las placas de agar (la prueba de la catalasa es positiva y las células bacterianas muestran la morfología de bastón Gram positiva), y a continuación haga una siembra por picadura en placas de agar de sangre de oveja (SBA). Incube las placas con SBA durante 24-48 horas a  $35 \pm 2$  °C antes de leer los resultados de hemólisis. Una alternativa a las placas de SBA es realizar una caracterización bioquímica de las colonias mediante galerías bioquímicas específicas de la especie *Listeria*.
- Una alternativa para la confirmación de resultados puede hacerse siguiendo los protocolos de confirmación de los métodos de referencia respectivos, bien usando el método USDA/FSIS-MLG 8.11 «Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* en carnes rojas, aves, Siluriformes listos para consumir (pescado) y huevos, y muestras del entorno de producción» o bien el método de la FDA/BAM Capítulo 10 «Detección y enumeración de *Listeria monocytogenes* en alimentos».

## 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 PARA CONSEGUIR UN FUNCIONAMIENTO ÓPTIMO

- 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 deben utilizarse para lavar equipos, especialmente los equipos de lavado (la azida sódica inactiva la enzima peroxidasa incluida 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: [Solus.info@perkinelmer.com](mailto:Solus.info@perkinelmer.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
Agosto 2020	1	Nuevo documento

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](http://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](http://www.perkinelmer.com)



---

Si desea una lista completa de nuestras oficinas globales visite [www.perkinelmer.com/ContactUs](http://www.perkinelmer.com/ContactUs)