

SOLUS ONE SALMONELLA

Sistema de análisis por inmunoensayo para
la detección de *Salmonella*
en alimentos seleccionados

Número del prospecto:	39
Número de versión:	1.0
Fecha de la versión:	Enero 2020
Códigos del producto:	SAL1-0096; SAL1-0480
Organismo de certificación:	AFNOR





SOL 37/04-12/18
MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA LA
AGROINDUSTRIA
<http://nf-validation.afnor.org/en>

Este método ha sido certificado por AFNOR para la detección de *Salmonella* en las siguientes categorías: productos de comida preparada lista para comer, comida preparada lista para recalentar (excepto productos ahumados), productos de leche y lácteos termoprocados y productos a base de huevo (núm. de ref. de validación **SOL 37/04-12/18**).

1. INTRODUCCIÓN

El método Solus One *Salmonella* proporciona un resultado negativo o presuntamente positivo a partir de un único paso de enriquecimiento y en un plazo de 24 horas, incluido el tiempo de ensayo.

2. USOS PREVISTOS

El método Solus One *Salmonella* sirve para la detección de *Salmonella* spp en determinados alimentos. 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

Componente	Aspecto	Volumen		Comentarios
		SAL1-0096	SAL1-0480	
Placa de ensayo	Microplaca de 96 pocillos con formato de tira extraíble o rompible	1	5	Los pocillos están recubiertos por anticuerpos contra <i>Salmonella</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>Salmonella</i> 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 plateada.	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.
Tampón de lavado	Sobre de papel de aluminio con polvo granular blanco.	6 (pequeño)	5 (grande)	El activador del tampón de lavado debe disolverse en el volumen requerido de agua desionizada antes de añadir el tampón de lavado concentrado a la solución. Véase el apartado 5.1 para obtener información.

Filtros de frita	Discos blancos y planos de plástico ~12 mm de diámetro	100	500	Los filtros de frita deben aplicarse en cada tubo de muestra después del termotratamiento una vez que la muestra se haya enfriado a temperatura ambiente (18-25 °C). Véase el apartado 7 para obtener información.
------------------	---	-----	-----	--

La mayoría de los componentes del kit se suministran estabilizados y listos para usar en la concentración de trabajo, solo el activador del tampón de lavado y el propio tampón de lavado concentrado requieren dilución. Todos los kits de análisis contienen material suficiente para 1 (SAL1-0096) o 5 (SAL1-0480) x 93 determinaciones, más los controles. La fecha de caducidad del kit de análisis se muestra en la etiqueta del producto.

4. MATERIALES Y EQUIPOS NECESARIOS QUE NO SE SUMINISTRAN

Frigorífico a 2-8 °C	Agitador vórtex
Agua desionizada o destilada	Temporizador
Agua de peptona tamponada (BPW)	Estufa de incubación a 37±1 °C
Suplemento Solus One	Estufa de incubación a 41,5±1 °C
Etanol al 70% v:v	Tubos para ebullición de muestras (p. ej.: tubos de polipropileno sin borde de 5 ml, 12 x 75 mm)
Probetas cilíndricas de varios volúmenes (p. ej.: 2 50 ml, 1 l)	Aparato para calentar (p. ej.: termobloque) capaz de calentar hasta 85-100 °C
Bolsas de filtro	Pipetas y puntas (1 ml; 0,1 ml)
Homogeneizador (o aparato similar)	Dynex DS2 o equipo de limpieza de microplacas y lector de microplacas con filtro de 450 nm
Pipetas de transferencia de 3 ml (estériles)	Autoclave para la descontaminación de las muestras

5. PREPARACIÓN DEL REACTIVO

5.1 Tampón de lavado:

Prepare lo siguiente en un recipiente limpio.

SAL1-0096	SAL1-0480
Añada el contenido de 1 sobre de activador del tampón de lavado en 240 ml de agua desionizada. Mezcle hasta que el activador se disuelva por completo.	Añada el contenido de 1 sobre de activador del tampón de lavado en 1440 ml de agua desionizada. Mezcle hasta que el activador se disuelva por completo.
Añada 10 ml (1 frasco) de tampón de lavado concentrado en el recipiente que contiene la solución activadora y agite en círculos para mezclar.	Añada 60 ml (1 frasco) de tampón de lavado concentrado en el recipiente que contiene la solución activadora y agite en círculos para mezclar.

5.2 Caldo de cultivo (medio de cultivo):

- Prepare el agua de peptona tamponada (BPW) siguiendo las instrucciones del fabricante. Deje enfriar a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de usar en el análisis.
- Reconstituya el suplemento Solus One Supplement siguiendo las instrucciones del fabricante. Prepare la solución BPW suplementada en cantidad apropiada al tamaño del paquete de suplemento que se va a usar.



SALSUPP22.5; SALSUPP112.5	SALSUPP200
Añada 4,44 ml de suplemento por cada litro de BPW	Añada 2,5 ml de suplemento por cada litro de BPW

6. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y ENRIQUECIMIENTO

6.1 Método estándar

- Homogeneice 25 g de la muestra para analizar en 225 ml de solución BPW suplementada e incube durante 20-22 horas a $41,5 \pm 1$ °C. Algunos tipos de muestras enriquecidas pueden contener partículas que dificultan el pipeteo. Recomendamos la utilización de bolsas de filtro para el enriquecimiento, para contener las partículas y reducir los problemas de pipeteo.

En el marco de los análisis de VALIDACIÓN NF las porciones que pesen más de 25 g no se han analizado. Véase EN ISO 6579 para obtener información sobre preparaciones específicas de la suspensión madre para determinados alimentos.

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 $41,5$ °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.
- 7.3. Para evitar problemas con el pipeteado, especialmente con el instrumento Dynex DS2, añada un filtro de frita directamente en cada tubo de muestra y empújelo hacia abajo suavemente para poder pipetear una muestra relativamente clara del nivel superior de la frita.

NOTA: la frita debe insertarse después de la fase de calentamiento y una vez se haya enfriado el tubo a temperatura ambiente ($18-25$ °C).

Algunos tipos de muestras pueden coagularse durante el paso de inactivación térmica lo que puede causar dificultades a la hora de pipetear. Un ejemplo son las muestras de productos a base de huevo y caseinatos. Estas muestras podrían requerir la adición manual al inmunoensayo.

Las muestras que no se han termoinactivado deben conservarse para verificación hasta que se obtengan los resultados del inmunoensayo. Estas muestras deben mantenerse a $41,5 \pm 1$ °C si el inmunoensayo 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 inmunoensayo.

8. PROCEDIMIENTO DEL INMUNOENSAYO

- 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 pocillo «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 correctamente las muestras 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 *Salmonella*. Los resultados positivos deben verificarse utilizando un método de cultivo reconocido.

10. CONFIRMACIÓN DE LOS RESULTADOS POSITIVOS DEL INMUNOENSAYO ONE SALMONELLA

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. El paso de confirmación debe empezar a partir de la muestra BPW suplementada no termoinactivada conservada a $41,5\text{ °C}$ o $2-8\text{ °C}$. Siembre la muestra BPW suplementada ($10\ \mu\text{l}$) en una placa de agar (XLD o agar cromogénico para *Salmonella* como Colorex *Salmonella* de Chromagar). Incube los agares como se especifica en los protocolos de cultivo normalizados para *Salmonella* y, a continuación, realice los análisis de confirmación: análisis en látex F42 de Microgen o galería de identificación bioquímica.
- También, adicionalmente, puede hacer subcultivos a partir de la muestra no termoinactivada ($0,1\ \text{ml} + 10\ \text{ml}$) en caldo RVS e incube durante 21- 27 h a $41,5 \pm 1\text{ °C}$. Siembre en agar XLD o cromogénico para *Salmonella* como Colorex *Salmonella* de Chromagar). Incube el agar como se especifica en los protocolos de cultivo normalizados para *Salmonella* y, a continuación, realice los análisis de confirmación, p. ej.: el análisis en látex F42 de Microgen o con galería de identificación bioquímica directamente en las colonias aisladas sin el paso de purificación; o realice los análisis descritos en los métodos normalizados (CEN o ISO).

NOTA: El análisis en látex F42 utiliza anticuerpos policlonales para detectar los antígenos contra los flagelos, pero no está adaptado para la detección de especies de *Salmonella* sin flagelos. Si las colonias están bien aisladas se pueden realizar las pruebas de confirmación directamente.

En caso de obtener resultados no coincidentes (presunto resultado positivo con el inmunoensayo que no se confirma con ninguno de los métodos descritos anteriormente, y especialmente con el análisis en látex) el laboratorio deberá seguir los pasos necesarios para garantizar la validez del resultado obtenido.

11. CONSERVACIÓN Y VENCIMIENTO DEL KIT DE ANÁLISIS

El kit de análisis y cualquier componente sin utilizar del mismo deberán conservarse a $2-8\text{ °C}$. 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 $2-8\text{ °C}$. 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 $2-8\text{ °C}$.

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.

- 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 entre en contacto con otros reactivos y 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.

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

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 One Salmonella – Prospecto 28 – Versión 1.1 – 09/19 y Solus One Salmonella – Prospecto 21 – Versión 1.2 – 12/18 en un único 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

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