

**Read instructions carefully before starting test**

# **GeneQuence®** **for Salmonella**



**DNA hybridization test  
for detection of *Salmonella* spp.**

**AOAC Official Method**  
**No. 2007.02 (24-hour enrichment)**

## **INTENDED USE**

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

## **TESTING DIFFERENT COMMODITIES**

GeneQuence for *Salmonella* (48-hour enrichment) is an effective tool for a variety of commodities. Through evaluation by the AOAC Research Institute, this test has been shown to detect *Salmonella* in the following food products: raw whole egg, dried whole egg, nonfat dry milk, chocolate, refrigerated dough, soy flour, egg noodles, cheese powder, cake mix, walnuts, food dye, black pepper, dried fruit, frozen fruit, mushrooms, surimi, raw ground beef, raw pork, raw fish, raw turkey, raw chicken, beef franks, dry pet food, and peanut butter.

GeneQuence for *Salmonella* (24-hour enrichment) has been shown to detect *Salmonella* spp. in the following food products: raw poultry, pasteurized egg products (dried, liquid and frozen), milk chocolate, and dry pet food.

## **BIOLOGICAL PRINCIPLES OF THE TEST**

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

## **MATERIALS PROVIDED**

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

## **MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

### **24-hour and 48-hour Enrichments**

#### **Equipment**

1. Angled thermometer for digital heat block (Neogen item 9382)
2. Apparatus for plate washing with vacuum source (Neogen item 9348 (manual), Neogen items 6718 or 6718A (automated))
3. Automated plate wash assembly: vacuum tubing assembly (Neogen item 9387), side arm flask assembly (Neogen item 6822), vacuum pump (Neogen item 6824)
4. Carboy with spigot (2) (Neogen item 9349)
5. Digital heat block (Neogen item 9386)
6. Heated block cover (Neogen item 9383)
7. Incubators at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $42 \pm 0.2^\circ\text{C}$  (Neogen item 9735)
8. Microwell reader to read at 450 nm with discrimination of 0.01 absorbance unit (Neogen items 6704, 6704A or 9303)
9. Modular heating block titer plate (Neogen item 9384)

#### **Optional equipment**

1. Dry heater base incubator (Neogen item 9412)
2. 8-channel pipettor and tips to dispense 50–300  $\mu\text{L}$  (Neogen items 9385, 9407)
3. Heater block at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  (Neogen item 9411)

#### **Lab supplies and consumables**

1. Micropipette and tips to dispense 20–200  $\mu\text{L}$  volumes (Neogen items 9276, 9407)
2. Micropipette and tips to dispense 200–1000  $\mu\text{L}$  volumes (Neogen items 9342, 9343)
3. Minute timer (Neogen item 9426)
4. Test tubes, 12 x 75 mm borosilicate glass, and rack (Neogen items 9439, 9440)
5. Stomacher bags (100) (Neogen item 9736)
6. 50 mL culture tubes for sample pre-enrichment (Neogen item 9381)
7. 1000 mL graduated cylinder (Neogen item 9345)
8. 500 mL wash bottle (Neogen item 9366)
9. 10 mL pipette pump (Neogen item 9277)
10. 10 mL sterile serological pipettes, 0.1 mL graduations (Neogen item 9415)
11. Eppendorf reservoir (Neogen item 4018)
12. Centrifuge tube racks (Neogen item 9479)

## Media

1. Lactose Broth and/or other pre-enrichment media (Neogen item 7141)
2. Rappaport-Vassiliadis (RV) Broth (ref. 2, Neogen item 7512)
3. Gram Negative (GN) Broth (ref. 3, Neogen item 7218)

## 24-hour enrichment only

1. Buffered Peptone Water (ref. 1, Neogen item 7418)
2. Brain Heart Infusion (BHI) Broth (ref. 1, Neogen item 7116)

## 48-hour enrichment only

1. Tetrathionate (TT) Broth (ref. 2, Neogen item 7241)

## Starter kits

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

## Other equipment needed

### 24-hour and 48-hour enrichments

1. Homogenizer (e.g., Stomacher)
2. Small orbital platform shaker capable of 150 rpm
3. Sterile cotton swabs and absorbent paper
4. 2 mL disposable graduated pipettes
5. Diagnostic reagents as necessary for culture confirmation of positive DNA hybridization assay (ref 2.)

## STORAGE REQUIREMENTS

1. Store microwell plate, positive control, negative control, and reagents 1a, 2, 3, and 5 at 2–8°C.
2. Other reagents may be stored at 2–25°C.
3. The entire kit may be stored at 2–8°C.
4. Once reagent 1a has been reconstituted, it must be stored at -20°C and is stable for 60 days in this form.
5. Refrigerated kit reagents should be equilibrated to room temperature before use, but should not be left unrefrigerated for long periods of time.

## PRECAUTIONS

1. Reagents are for laboratory use only.
2. Stop solution contains 4.0 N sulfuric acid. Hybridization solution contains formamide. Avoid contact with skin and mucous membranes. Refer to the Material Safety Data Sheet available from Neogen for more information.
3. Reagents from different kit lots should not be interchanged. GeneQuence for *Salmonella* reagents are not interchangeable with other GeneQuence assay reagents.
4. Reagents should not be used beyond their expiration dates.
5. Enriched cultures should be handled/disposed of as potentially infectious material.
6. The preferred method for disposal of contaminated materials, including cultures, pipettes, etc., is autoclaving.
7. Items that cannot be autoclaved should be decontaminated by treatment with a disinfectant solution and rinsing with water.

- This test should be performed in a normal laboratory environment with respect to humidity, lighting, etc. Steps requiring room temperature incubation should be performed at 18–30°C.

## **SAMPLE PREPARATION AND ENRICHMENT**

**NOTE:** Food samples should be obtained and handled according to standard practices appropriate to analysis for *Salmonella* (ref. 4). **All enrichment media should be prewarmed to room temperature before inoculation.** Samples must be tested when the final GN or BHI incubation period is complete. Do not hold cultures for testing with GeneQuence at a later time.

### **A. 48-HOUR enrichment procedures for select foods**

#### **• For raw foods with a high microbial load**

- Homogenize food sample in 9 volumes Lactose Broth. Incubate **22 ± 2 hours** at 35 ± 1°C.
- Remove pre-enriched culture from incubation and mix well. Transfer 1 mL of pre-enrichment culture to 10 mL Tetrathionate (TT) Broth. Transfer another 0.1 mL of pre-enrichment culture to 10 mL Rappaport-Vassiliadis (RV) Broth. Incubate TT and RV cultures **16–18 hours** at 42 ± 0.2°C.
- Remove TT and RV cultures from incubation and mix well. Transfer 1 mL of TT culture to 10 mL Gram Negative (GN) Broth. Transfer 1 mL of RV culture to 10 mL GN. Incubate both GN cultures **6 hours** at 35 ± 1°C. Save TT and RV cultures for possible confirmation.
- Perform GeneQuence for *Salmonella* using a pooled sample containing 0.2 mL of each GN culture. Save GN cultures for possible confirmation.

#### **• For all foods other than raw foods or foods with a high microbial load**

- Prepare pre-enrichment culture in accordance with BAM/AOAC guidelines (ref. 4). Incubate **22 ± 2 hours** at 35 ± 1°C.
- Remove pre-enrichment culture from incubation and mix well. Transfer 1 mL of pre-enrichment culture to 10 mL Tetrathionate (TT) Broth. Transfer another 0.1 mL of pre-enrichment culture to 10 mL Rappaport-Vassiliadis (RV) broth. Incubate TT culture **6 hours** at 35 ± 1°C and RV culture **6 hours** at 42 ± 0.2°C.
- Remove TT and RV cultures from incubation and mix well. Transfer 1 mL TT culture to 10 mL Gram Negative (GN) Broth. Transfer 1 mL of RV culture to a second 10 mL of GN. Incubate GN cultures **16–18 hours** at 35 ± 1°C. Save TT and RV cultures for possible confirmation.
- Perform GeneQuence for *Salmonella* using a pooled sample containing 0.2 mL of each GN culture. Save GN cultures for possible confirmation.

### **B. 24-HOUR enrichment procedures for select foods**

#### **• For dried, liquid and liquid frozen pasteurized eggs**

- Homogenize sample in 9 volumes Buffered Peptone Water. **NOTE:** The standard sample size as specified by USDA-FSIS is 100 g (ref. 3). For dried egg samples, add BPW to the sample gradually and mix to produce a homogeneous suspension free of lumps. Incubate **18–20 hours** at 35 ± 1°C.
- Remove BPW culture from incubation and mix well. Transfer 10 mL BPW culture to 10 mL **pre-warmed** to 35–37°C **double-strength** Gram Negative Broth (GN) in a 50 mL tube. Incubate **6–7 hours** at 35 ± 1°C.
- Remove GN culture from incubation and mix. Perform GeneQuence for *Salmonella* using 0.4 mL of GN culture. Save GN culture at 4°C for possible confirmation.

### • For dry pet food

1. Prepare pre-enrichment culture in accordance with BAM/AOAC guidelines (ref. 2). Incubate **18–20 hours** at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ .
2. Remove pre-enrichment culture from incubation and mix well. Transfer 10 mL pre-enrichment culture to 10 mL **pre-warmed** to  $35\text{--}37^\circ\text{C}$  **double-strength** Gram Negative broth (GN) in a 50 mL tube. Incubate **6–7 hours** at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ .
3. Remove GN culture from incubation and mix. Perform GeneQuence for *Salmonella* using 0.4 mL of GN culture. Save GN culture at  $4^\circ\text{C}$  for possible confirmation.

### • For milk chocolate

1. Prepare pre-enrichment culture in accordance with BAM/AOAC guidelines (ref. 2). Incubate **22–24 hours** at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ .
2. Remove pre-enrichment culture from incubation and mix well. Transfer 10 mL pre-enrichment culture to 10 mL **pre-warmed** to  $35\text{--}37^\circ\text{C}$  **double-strength** Brain Heart Infusion Broth (BHI) in a 50 mL tube. Incubate **6–7 hours** at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ .
3. Remove BHI culture from incubation and mix. Perform GeneQuence for *Salmonella* using 0.4 mL of BHI culture. Save BHI culture at  $4^\circ\text{C}$  for possible confirmation.

### • For raw meats and poultry

1. Homogenize sample in 9 volumes Rappaport-Vassiliadis Broth (RV). Incubate **18–20 hours** at  $42 \pm 0.2^\circ\text{C}$ .
2. Remove RV culture from incubation and mix well. Transfer 1 mL RV culture to 10 mL **pre-warmed** to  $35\text{--}37^\circ\text{C}$  Gram Negative Broth (GN) in a 50 mL tube. Incubate **6–7 hours** at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ .
3. Remove GN culture from incubation and mix. Perform GeneQuence *Salmonella* using 0.4 mL of GN culture. Save GN culture at  $4^\circ\text{C}$  for possible confirmation.

## PRIOR TO STARTING THE TEST

1. Turn on the water bath or heater block and adjust to  $65 \pm 1^\circ\text{C}$ . Fill a water bath to a level of approximately 1.5 inches, or fill the heater block wells about 1/3 with deionized water.
2. Prepare pretreatment reagent by adding 6 mL of lysis reagent buffer (bottle **1b**) directly to one bottle of lysis reagent concentrate (bottle **1a**). Dissolve contents by gently swirling, and place the bottle on ice. **NOTE:** Lysis reagent is stable in the reconstituted form for 60 days when stored at  $-20^\circ\text{C}$ . To thaw, place bottle at room temperature. When thawed, place on ice (freeze-thawing does not adversely affect the reconstituted reagent).
3. For each sample to be tested, label a 12 x 75 mm glass test tube with the appropriate sample designation and place in a rack. Include tubes for 1 positive control and 1 negative control per experimental run.
4. Prepare the wash solution by mixing entire contents of wash solution concentrate (bottle 4) with 950 mL of distilled or deionized water (if washing manually with a 500 mL wash bottle, use 25 mL of concentrate with 475 mL of water). Fill the buffer reservoir of the plate-washing device (see manufacturer's instructions for set-up and use). **NOTE:** Wash solution can be stored in a closed bottle at room temperature for up to 60 days.
5. Without touching the bottoms of the wells, place the appropriate number of coated microwells in the plate frame, filling the frame left to right and front to back in rows of 8. Include wells for the reagent blank, negative control and positive control. **NOTE:** If the last row has fewer than 8 wells and a plate-washing device is used, fill the last row with colored wells (colored wells are available free of charge from Neogen).

## TEST PROCEDURE

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

- 1a. **If using the 48-hour enrichment**, combine the two GN cultures for each sample by adding 0.2 mL of each to the appropriate tube (i.e., 0.2 mL of each of the two GN cultures for each sample pooled into one tube).
- 1b. **If using the 24-hour enrichment**, add 0.4 mL of each sample to the appropriate tubes.
2. Mix the positive and negative control solutions by inverting the bottles several times. Add 0.4 mL of each control to the appropriate tube.
3. Add 0.1 mL of reconstituted lysis reagent (bottle **1a**) to each tube. Mix by gently shaking the rack of tubes by hand for **5 seconds**. The resulting solution should be blue. If any tubes are not blue, check for proper reagent addition. Incubate the rack of tubes in the 65°C water bath or heater block for **5 minutes**.
4. Prepare a 4:1 hybridization/probe mixture by mixing hybridization solution (bottle **2**) and probe solution (bottle **3**) in a plastic or glass container. For mixture guidelines, refer to the mixing chart provided with this test kit or use the formula below. (N = number of test samples + controls)  
Volume hybridization solution (bottle 2) =  $[(N \times 0.1) + 1.6]$  mL  
Volume probe solution (bottle 3) =  $[(N \times 0.025) + 0.4]$  mL
5. Remove the tubes from the heat source and shake briefly. Transfer 0.150 mL of each lysed sample, including the controls, to a designated microwell. The first well should be reserved for the reagent blank and receives no sample. The second well should be used for the negative control, and the third for the positive control.
6. Vigorously mix the hybridization/probe solution prepared earlier. Add 0.125 mL to each microwell, except the reagent blank microwell.
7. Shake the plate on an orbital shaker at 150 rpm for **2 minutes** at room temperature.  
**NOTE:** If using a multichannel pipettor, the contents of the wells may be mixed by drawing up and dispensing back into the wells at least 5 times.
8. Incubate the plate at 45 ± 1°C for **60 minutes** on the covered heater block.
9. Wash the wells using one of the following procedures:
  - a) **Plate-washing device:** Wash 5 times at room temperature. For each wash, process one 8-well strip at a time by aspirating the liquid, filling the wells, and then proceeding to the next strip. After the last wash, aspirate the liquid from the wells, then remove any residual liquid by inverting the plate and tapping it onto absorbent paper. Hold the plate by gently squeezing on the sides of the frame to keep the strips in place. Be sure **not** to touch the bottom or sides of wells with platemasher.
  - b) **Manual:** Thoroughly wash the microwells at least 5 times using a plastic wash bottle filled with the wash solution prepared earlier. Wash by emptying the wells into a suitable container, tapping the inverted plate on absorbent paper, completely filling the wells with wash solution, and vigorously shaking out the contents. **NOTES:** All air bubbles must be removed before proceeding to the next step. If air bubbles remain, repeat vigorous striking of the wells onto an absorbent paper towel on a flat surface until eliminated.
10. Add 0.150 mL of substrate chromogen solution (bottle **5**) to each microwell, including the reagent blank microwell. Incubate the plate at room temperature for **20 minutes**.

11. Add 0.05 mL of stop solution (bottle **6**) to each microwell, including the blank microwell.
12. Gently tap the side of the frame a few times to ensure mixing.
13. Read absorbance at 450 nm using a plate or strip reader according to the manufacturer's instructions. Blank using the first microwell that contains the mixture of substrate chromogen and stop solution (do not blank with air). If the plate or strip reader doesn't automatically blank against the first microwell, calculate the values for the negative control, positive control, and all other sample wells, by subtracting the absorbance value of the reagent blank (well **A1**) from the absorbance values registered in all other wells.

## INTERPRETATION OF RESULTS

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

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

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

## RECOMMENDED CONFIRMATION PROCEDURE

Neogen recommends that positive results be verified by plating the sample's GN or BHI culture and/or selective enrichment cultures onto media as described in BAM or FSIS procedures (refs. 2, 3), depending upon the sample type.

## LIMITATIONS

The DNA probes used in this kit are not reactive with serovars of the species *Salmonella bongori*.

## REFERENCES

1. Atlas, R.M. 1997. Handbook of Microbiological Media, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, FL, pg. 606.
2. US FDA. 2003. Bacteriological Analytical Manual online, chapter 5. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>
3. USDA-FSIS. 2004. Microbiology Laboratory Guidebook, chapter 4. [http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG\\_4\\_03.pdf](http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_4_03.pdf)
4. US FDA. 2003. Bacteriological Analytical Manual online, chapter 1. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>

## CUSTOMER SERVICE

Neogen Customer Assistance and Technical Services can be reached by using the contact information on the back of this booklet. Training on this product, and all Neogen test kits, is available.

## SDS INFORMATION AVAILABLE

Safety data sheets (SDS) are available for this test kit, and all of Neogen's Food Safety test kits, at [foodsafety.neogen.com](http://foodsafety.neogen.com), or by calling Neogen at 800.234.5333 or 517.372.9200.

## TERMS AND CONDITIONS

For Neogen's full terms and conditions, please visit [www.neogen.com/Corporate/termsconditions.html](http://www.neogen.com/Corporate/termsconditions.html).

## **WARRANTY**

Neogen Corporation makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, Neogen will provide a replacement of the product. Buyer assumes all risk and liability resulting from the use of this product. There is no warranty of merchantability of this product or of the fitness of the product for any purpose. Neogen shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.



### **North America**

#### **Neogen Headquarters**

800/234-5333 (USA/Canada)

[foodsafety@neogen.com](mailto:foodsafety@neogen.com)

[foodsafety.neogen.com](http://foodsafety.neogen.com)

### **Europe, Middle East and Africa**

#### **Neogen Europe**

+ 44 (0) 1292 525 600

[info\\_uk@neogeneurope.com](mailto:info_uk@neogeneurope.com)

[www.neogeneurope.com](http://www.neogeneurope.com)

### **Mexico**

#### **Neogen Latinoamerica**

+52 (55) 5254-8235

[informacion@neogenlac.com](mailto:informacion@neogenlac.com)

[www.neogenlac.com](http://www.neogenlac.com)

### **Brazil**

#### **Neogen do Brasil**

+55 19 3935.3727

[info@neogendobrasil.com.br](mailto:info@neogendobrasil.com.br)

[www.neogendobrasil.com.br](http://www.neogendobrasil.com.br)

### **China**

#### **Neogen Bio-Scientific Technology**

+86 21 6271 7013

[info@neogenchina.com.cn](mailto:info@neogenchina.com.cn)

[www.neogenchina.com.cn](http://www.neogenchina.com.cn)

### **India**

#### **Neogen Food and Animal Security**

**+91 484 2306598, 2301582**

[info@neogenindia.com](mailto:info@neogenindia.com)

[www.neogenindia.com](http://www.neogenindia.com)



**Por favor lea las instrucciones cuidadosamente antes de realizar la prueba**



**GeneQuence®**  
**para Salmonella**



**Prueba de hibridación de ADN para la detección de *Salmonella* spp.**

**Método oficial de la AOAC**

**Nº 2007.02 (enriquecimiento de 24 horas)**

**USO PREVISTO**

Esta prueba está destinada para detectar cualitativamente *Salmonella* spp. en muestras alimentarias y debe ser usada por personal con entrenamiento adecuado de laboratorio de microbiología.

**PRUEBAS DE DIFERENTES PRODUCTOS**

GeneQuence para *Salmonella* (enriquecimiento de 48 horas) es una herramienta eficaz para una variedad de productos. A través de la evaluación realizada por el Instituto de Investigación AOAC, se ha demostrado que esta prueba detecta *Salmonella* en los siguientes productos alimenticios: huevo entero crudo, huevo entero en polvo, leche descremada en polvo, chocolate, masa refrigerada, harina de soya, fideos de huevo, queso en polvo, mezcla para pastel, nueces de nogal, colorante para alimentos, pimienta negra, frutas secas, frutas congeladas, setas, surimi, carne cruda molida, carne de cerdo cruda, pescado crudo, pavo crudo, pollo crudo, salchichas de res, alimento seco para mascotas y mantequilla de maní.

Se ha demostrado que GeneQuence para *Salmonella* (enriquecimiento de 24 horas) detecta *Salmonella* spp. en los siguientes productos alimenticios: carne de ave cruda, productos de huevos pasteurizados (en polvo, líquido y congelados), chocolate con leche y alimento seco para mascotas.

**FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS DE LA PRUEBA**

Esta prueba de hibridación de ADN emplea sondas de ADN específicas para *Salmonella*, directamente marcadas con peroxidasa de rábano picante y un extremo colorimétrico, para detectar tan solo una UFC de *Salmonella* en una muestra alimentaria de 25 g cuando se usan los protocolos de enriquecimiento especificados. Una muestra se considera negativa para la presencia de *Salmonella* spp. si el valor de absorbancia ( $A_{450}$ ) es inferior a 0.10. Una muestra se considera positiva para la presencia de *Salmonella* spp. si el valor de absorbancia obtenido es mayor o igual a 0.10. Las muestras positivas deben confirmarse mediante procedimientos de cultivo estándar, seguidos de una identificación bioquímica y serológica.

## **MATERIALES PROPORCIONADOS**

1. 2 botellas de reactivo de lisis concentrado (etiquetadas como **1a**)
2. 1 botella con 12 mL de buffer de reactivo lisis (etiquetada como **1b**)
3. 1 botella con 18 mL de solución de hibridación (etiquetada como **2**)
4. 1 botella con 6 mL de solución de sonda de *Salmonella* (etiquetada como **3**)
5. 1 botella con 50 mL de solución de lavado 20X concentrada (etiquetada como **4**)
6. 1 botella con 15 mL de solución de sustrato-cromógeno (etiquetada como **5**)
7. 1 botella con 5 mL de solución de parada (etiquetada como **6**)
8. 1 botella con 5 mL de control positivo (etiquetada como **+**)
9. 1 botella con 5 mL de control negativo (etiquetada como **-**)
10. 1 placa de 96 micropocillos con tiras divisibles
11. Tabla de mezcla de solución de sonda/hibridación

## **MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO PROPORCIONADOS**

### **Enriquecimientos de 24 horas y de 48 horas**

#### **Equipo**

1. Termómetro angular para el bloque térmico digital (producto Neogen 9382)
2. Aparato para el lavado de placas con fuente de vacío (producto Neogen 9348(manual); producto Neogen 6718 o 6718A (automático))
3. Conjunto de lavado de placas automatizado: conjunto de tubos de vacío (producto Neogen 9387), conjunto de matraz con brazo lateral (producto Neogen 6822), bomba de vacío (producto Neogen 6824)
4. Garrafón con grifo (2) (producto Neogen 9349)
5. Bloque térmico digital (producto Neogen 9386)
6. Tapa para bloque térmico (producto Neogen 9383)
7. Incubadoras a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  y a  $42 \pm 0.2^\circ\text{C}$  (producto Neogen 9735)
8. Lector de micropocillos para leer a 450 nm con una discriminación de 0.01 unidades de absorbancia (productos Neogen 6704, 6704A o 9303)
9. Bloque térmico intercambiable para microplacas (producto Neogen 9384)

#### **Equipo opcional**

1. Incubadora de base con calentador en seco (producto Neogen 9412)
2. Pipeta de 8 canales y puntas para dispensar 50–300  $\mu\text{L}$  (productos Neogen 9385, 9407)
3. Bloque térmico a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  (producto Neogen 9411)

#### **Suministros de laboratorio y consumibles**

1. Micropipeta y puntas para dispensar volúmenes de 20–200  $\mu\text{L}$  (producto Neogen 9276, 9407)
2. Micropipeta y puntas para dispensar volúmenes de 200–1000  $\mu\text{L}$  (productos Neogen 9342, 9343)
3. Cronómetro (producto Neogen 9426)
4. Tubos de ensayo, vidrio borosilicato de 12 x 75 mm y gradilla (productos Neogen 9439, 9440)
5. Bolsas Stomacher (100) (producto Neogen 9736)
6. Tubos de cultivo, 50 mL para el pre-enriquecimiento de muestras (producto Neogen 9381)
7. Cilindro graduado, 1000 mL (producto Neogen 9345)
8. Piseta de lavado, 500 mL (producto Neogen 9366)
9. Bomba para pipeta, 10 mL (producto Neogen 9277)
10. Pipetas serológicas estériles 10 mL, graduaciones de 0.1 mL (producto Neogen 9415)
11. Reservorio Eppendorf (producto Neogen 4018)
12. Gradillas para tubos de centrifuga (producto Neogen 9479)

## Medios

1. Caldo de lactosa y/u otros medios de pre-enriquecimiento (producto Neogen 7141)
2. Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (ref. 2, producto Neogen 7512)
3. Caldo Gram negativo (GN) (ref. 3, producto Neogen 7218)

## Solo para el enriquecimiento de 24 horas

1. Agua de peptona tamponada (BPW) (ref. 1, producto Neogen 7418)
2. Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) (ref. 1, producto Neogen 7116)

## Solo para el enriquecimiento de 48 horas

1. Caldo de tetratonato (TT) (ref. 2, producto Neogen 7241)

## Kits básicos

1. Kit básico de GeneQuence, incluye todos los componentes (producto Neogen 9268)
2. Kit básico de GeneQuence, no incluye el baño de María (producto Neogen 9268a)
3. Kit básico de consumibles de GeneQuence (producto Neogen 9266)
4. Kit básico de lavado pequeño de GeneQuence (producto Neogen 9267)

## Otros equipos necesarios

### Enriquecimientos de 24 horas y 48 horas

1. Homogeneizador (p. ej., Stomacher)
2. Agitador orbital pequeño, capaz de alcanzar una velocidad de 150 rpm
3. Hisopos de algodón estériles y papel absorbente
4. Pipetas graduadas desechables, 2 mL
5. Reactivos de diagnóstico según sean necesarios para la confirmación de cultivos de pruebas de hibridación de ADN (ref. 2) positivas

## REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO

1. Almacene la placa de micropocillos, control positivo, control negativo y los reactivos 1a, 2, 3 y 5 entre 2–8°C.
2. Los otros reactivos pueden almacenarse entre 2–25°C.
3. Puede almacenar el kit completo entre 2–8°C.
4. Una vez que el reactivo 1a se ha reconstituido, debe almacenarse a -20°C y permance estable durante 60 días en esta forma.
5. Los reactivos del kit refrigerado deben equilibrarse a temperatura ambiente antes de su uso, pero no deben dejarse sin refrigerar durante largos periodos de tiempo.

## PRECAUCIONES

1. Los reactivos son solo para uso en laboratorio.
2. La solución de parada contiene ácido sulfúrico 4.0 N. La solución de hibridación contiene formamida. Evite el contacto con la piel y las membranas mucosas. Consulte la Hoja de Seguridad disponible de Neogen para obtener más información.
3. Los reactivos de diferentes lotes de kits no deben intercambiarse. Los reactivos de GeneQuence para *Salmonella* no son intercambiables con otros reactivos de ensayos GeneQuence.
4. No utilice los reactivos después de su fecha de vencimiento.
5. Los cultivos enriquecidos deben manejarse/eliminarse como material potencialmente infeccioso.
6. El método preferido para la eliminación de materiales contaminados, incluidos cultivos, pipetas, etc., es el autoclave.
7. Los artículos que no pueden ser autoclavados deben descontaminarse con un tratamiento de una solución desinfectante y enjuagando con agua.
8. Esta prueba debe realizarse en un entorno de laboratorio normal con respecto a la humedad, iluminación, etc. Los pasos que requieren una incubación a temperatura ambiente deben realizarse entre 18–30°C.

## PREPARACIÓN Y ENRIQUECIMIENTO DE MUESTRAS

**NOTA:** Las muestras alimentarias deben obtenerse y manipularse de acuerdo con las prácticas estándar apropiadas para el análisis de *Salmonella* (ref. 4). **Todos los medios de enriquecimiento deben precalentarse a temperatura ambiente antes de la inoculación.** Las muestras deben analizarse cuando se completa el periodo final de incubación de GN o BHI. No retrase el análisis de los cultivos con GeneQuence.

### A. Procedimiento de enriquecimiento de 48 HORAS para ciertos alimentos

#### • Para alimentos crudos con una alta carga microbiana

1. Homogenice la muestra alimentaria en 9 volúmenes de caldo de lactosa. Incube durante **22 ± 2 horas** a 35 ± 1°C.
2. Retire el cultivo pre-enriquecido de la incubación y mézclelo bien. Transfiera 1 mL de cultivo pre-enriquecido a 10 mL de caldo de tetrionato (TT). Transfiera otro 0.1 mL de cultivo pre-enriquecido a 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV). Incube los cultivos de TT y RV durante **16–18 horas** a 42 ± 0.2°C.
3. Retire los cultivos de TT y RV de la incubación y mézclelo bien. Transfiera 1 mL del cultivo de TT a 10 mL de caldo Gram negativo (GN). Transfiera 1 mL del cultivo de RV a 10 mL de caldo GN. Incube ambos cultivos de GN durante **6 horas** a 35 ± 1°C. Guarde los cultivos de TT y RV en caso de que sea necesaria su confirmación.
4. Realice la prueba GeneQuence para *Salmonella* usando una muestra colectiva que contenga 0.2 mL de cada cultivo GN. Guarde los cultivos GN en caso de que sea necesaria su confirmación.

#### • Para todos los alimentos que no sean alimentos crudos o alimentos que contengan una alta carga microbiana

1. Prepare un cultivo pre-enriquecido de acuerdo con las pautas del BAM/AOAC (ref. 4). Incube durante **22 ± 2 horas** a 35 ± 1°C.
2. Retire el cultivo pre-enriquecido de la incubación y mézclelo bien. Transfiera 1 mL de cultivo pre-enriquecido a 10 mL de caldo de tetrionato (TT). Transfiera otro 0.1 mL de cultivo pre-enriquecido a 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV). Incube el cultivo de TT durante **6 horas** a 35 ± 1°C y el cultivo RV durante **6 horas** a 42 ± 0.2°C.
3. Retire los cultivos TT y RV de la incubación y mézclelos bien. Transfiera 1 mL de cultivo TT a 10 mL de caldo Gram negativo (GN). Transfiera 1 mL de cultivo RV a otros 10 mL de caldo GN. Incube los cultivos GN durante **16–18 horas** a 35 ± 1°C. Guarde los cultivos TT y RV en caso de que sean necesarios para su confirmación.
4. Realice la prueba GeneQuence para *Salmonella* usando una muestra colectiva que contenga 0.2 mL de cada cultivo GN. Guarde los cultivos GN en caso de que sea necesaria su confirmación.

### B. Procedimientos de enriquecimiento de 24 horas para ciertos alimentos

#### • Para huevos en polvo, líquidos y líquidos pasteurizados congelados

1. Homogenice una muestra en 9 volúmenes de agua de peptona tamponada (BPW). **NOTA:** El tamaño de muestra estándar especificado por el USDA-FSIS es de 100 g (ref. 3). Para muestras de huevo en polvo, añada BPW a la muestra gradualmente y mézclelo para producir una suspensión homogénea sin grumos. Incube durante **18–20 horas** a 35 ± 1°C.
2. Retire el cultivo de BPW de la incubación y mézclelo bien. Transfiera 10 mL de cultivo de BPW a 10 mL de caldo Gram negativo (GN) de **doble potencia, pre-calentado** a 35–37 °C, en un tubo de 50 mL. Incube durante **6–7 horas** a 35 ± 1°C.
3. Retire el cultivo GN de la incubación y mézclelo bien. Realice el análisis de GeneQuence para *Salmonella* usando 0.4 mL de cultivo GN. Guarde el cultivo GN a 4°C en caso de que sea necesario para su confirmación.

#### • Para alimento seco para mascotas

1. Prepare un cultivo pre-enriquecido de acuerdo con las pautas del BAM/AOAC (ref. 2). Incube durante **18–20 horas** a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ .
2. Retire el cultivo pre-enriquecido de la incubación y mézclelo bien. Transfiera 10 mL del cultivo pre-enriquecido a 10 mL de caldo Gram negativo (GN) de **doble potencia, pre-calentado** a  $35\text{--}37^\circ\text{C}$  en un tubo de 50 mL. Incube durante **6–7 horas** a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ .
3. Retire el cultivo GN de la incubación y mézclelo. Realice el análisis de GeneQuence para *Salmonella* usando 0.4 mL de cultivo GN. Guarde el cultivo GN a  $4^\circ\text{C}$  en caso de que sea necesario para su confirmación.

#### • Para chocolate con leche

1. Prepare un cultivo pre-enriquecido de acuerdo con las pautas del BAM/AOAC (ref. 2). Incube durante **22–24 horas** a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ .
2. Retire el cultivo pre-enriquecido de la incubación y mézclelo bien. Transfiera 10 mL del cultivo pre-enriquecido a 10 mL de caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) de **doble potencia, pre-calentado** a  $35\text{--}37^\circ\text{C}$  en un tubo de 50 mL. Incube durante **6–7 horas** a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ .
3. Retire el cultivo de BHI de la incubación y mézclelo. Realice el análisis de GeneQuence para *Salmonella* usando 0.4 mL de cultivo de BHI. Guarde el cultivo de BHI a  $4^\circ\text{C}$  en caso de que sea necesario para su confirmación.

#### • Para carnes de aves y carnes rojas crudas

1. Homogenice la muestra en 9 volúmenes de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV). Incube durante **18–20 horas** a  $42 \pm 0.2^\circ\text{C}$ .
2. Retire el cultivo RV de la incubación y mézclelo bien. Transfiera 1 mL del cultivo RV a 10 mL de caldo Gram negativo (GN) de **doble potencia, pre-calentado** a  $35\text{--}37^\circ\text{C}$  en un tubo de 50 mL. Incube durante **6–7 horas** a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ .
3. Retire el cultivo GN de la incubación y mézclelo. Realice el análisis de GeneQuence para *Salmonella* usando 0.4 mL de cultivo GN. Guarde el cultivo GN a  $4^\circ\text{C}$  en caso de que sea necesario para su confirmación.

### ANTES DE COMENZAR LA PRUEBA

1. Encienda el baño de María o el bloque térmico y ajústelo a  $65 \pm 1^\circ\text{C}$ . Llene un baño de María a un nivel de aproximadamente 1.5 pulgadas, o llene los micropocillos del bloque térmico a aproximadamente 1/3 con agua desionizada.
2. Prepare el reactivo de pretratamiento añadiendo 6 mL del buffer de lisis (botella **1b**) directamente a una botella de reactivo de lisis concentrado (botella **1a**). Disuelva el contenido agítandolo suavemente y coloque la botella en hielo. **NOTA:** El reactivo de lisis permanece estable en la forma reconstituida durante 60 días si se almacena a  $-20^\circ\text{C}$ . Para descongelar, coloque la botella a temperatura ambiente. Cuando se descongele, coloque en hielo (la congelación y descongelación no afecta negativamente al reactivo reconstituido).
3. Para cada muestra a ser analizada, etiquete un tubo de ensayo de vidrio de 12 x 75 mm con la designación de muestra adecuada y colóquelo en una gradilla. Incluya tubos para 1 control positivo y 1 control negativo por cada análisis ejecutado.
4. Prepare la solución de lavado mezclando el contenido completo de la solución de lavado concentrada (botella **4**) con 950 mL de agua destilada o desionizada (si se lava manualmente con una pisseta de lavado de 500 mL, use 25 mL de concentrado con 475 mL de agua). Llene el reservorio del buffer del dispositivo de lavado de placas (consulte las instrucciones del fabricante para la configuración y el uso). **NOTA:** La solución de lavado se puede almacenar a temperatura ambiente en una botella cerrada por un máximo de 60 días.

5. Sin tocar el fondo de los micropocillos, coloque la cantidad apropiada de micropocillos recubiertos en el marco de la placa, llenando el marco de izquierda a derecha y de adelante hacia atrás, en filas de 8. Incluya micropocillos para el blanco de reactivo, control negativo y control positivo. **NOTA:** Si la última fila tiene menos de 8 micropocillos y se usa un dispositivo de lavado de placas, llene la última fila con micropocillos de colores (Los micropocillos de colores están disponibles de forma gratuita en Neogen).

### PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

**NOTA:** Esta prueba puede ser automatizada. Comuníquese con Neogen para obtener más información.

- 1a. **Si usa el enriquecimiento de 48 horas**, combine los dos cultivos GN para cada muestra añadiendo 0.2 mL de cada uno al tubo apropiado (es decir, 0.2 mL de cada uno de los dos cultivos GN para cada muestra colectiva en un tubo).
- 1b. **Si usa el enriquecimiento de 24 horas**, añada 0.4 mL de cada muestra a los tubos apropiados.
2. Mezcle las soluciones de los controles positivos y negativos invirtiendo las botellas varias veces. Añada 0.4 mL de cada control al tubo apropiado.
3. Añada 0.1 mL del reactivo de lisis reconstituido (botella **1a**) a cada tubo. Mezcle agitando suavemente la gradilla de tubos a mano durante **5 segundos**. La solución resultante debe ser azul. Si alguno de los tubos no está azul, verifique que se hayan añadido los reactivos adecuadamente. Incube la gradilla de tubos en el bloque térmico o el baño de María a 65°C durante **5 minutos**.
4. Prepare una mezcla de sonda/hibridación a una proporción de 4:1 mezclando la solución de hibridación (botella **2**) y la solución de sonda (botella **3**) en un recipiente de vidrio o plástico. Para obtener las especificaciones de las mezclas, consulte la tabla de mezcla que se incluye con este kit de prueba o use la fórmula a continuación. (N = número de muestras de prueba + controles)  
Volumen de solución de hibridación (botella **2**) =  $[(N \times 0.1) + 1.6]$  mL  
Volumen de solución de sonda (botella **3**) =  $[(N \times 0.025) + 0.4]$  mL
5. Retire los tubos de la fuente de calor y agítelos brevemente. Transfiera 0.150 mL de cada muestra lisada, incluidos los controles, a un micropocillo designado. El primer micropocillo debe reservarse para el blanco de reactivo y no recibe ninguna muestra. El segundo micropocillo debe usarse para el control negativo y el tercero para el control positivo.
6. Mezcle vigorosamente la solución de sonda/hibridación preparada anteriormente. Añada 0.125 mL a cada micropocillo, excepto el micropocillo para el blanco de reactivo.
7. Agite la placa en un agitador orbital a 150 rpm durante **2 minutos** a temperatura ambiente. **NOTA:** Si usa una pipeta multicanal, el contenido de los micropocillos puede mezclarse pipeteando de arriba hacia abajo al menos 5 veces.
8. Incube la placa a  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  durante **60 minutos** en el bloque térmico cubierto.
9. Lave los micropocillos usando uno de los siguientes procedimientos:
  - a) **Dispositivo para el lavado de placas:** Lave 5 veces a temperatura ambiente. Para cada lavado, procese una tira de 8 micropocillos, aspirando el líquido, llenando los micropocillos y luego procediendo con la siguiente tira. Después del último lavado, aspire el líquido de los micropocillos y luego elimine cualquier líquido residual invirtiendo la placa y golpeándola sobre papel absorbente. Sostenga la placa apretando suavemente bordes del marco para mantener las tiras en su sitio. Asegúrese de **no tocar** la parte inferior o los lados de los micropocillos con el lavador de placas.

- b) **Manual:** Lave completamente los micropocillos al menos 5 veces usando la pisseta de plástico con la solución de lavado preparada anteriormente. Lave vaciando los micropocillos en un recipiente adecuado, golpeando la placa invertida en un papel absorbente, llenando completamente los micropocillos con solución de lavado y sacudiendo vigorosamente el contenido. **NOTAS:** Todas las burbujas de aire deben eliminarse antes de continuar con el siguiente paso. Si quedan burbujas de aire, vuelva a golpear los micropocillos vigorosamente sobre una toalla de papel absorbente en una superficie plana hasta que se eliminen.
10. Añada 0.150 mL de solución de sustrato-cromógeno (botella **5**) a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo. Incube la placa a temperatura ambiente durante **20 minutos**.
  11. Añada 0.05 mL de la solución de parada (botella **6**) en cada micropocillo, incluyendo en el micropocillo del blanco de reactivo.
  12. Golpee suavemente el lado del marco varias veces para asegurar la mezcla.
  13. Lea la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas o tiras de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Ponga en blanco el primer micropocillo que contiene la mezcla de sustrato-cromógeno y la solución de parada (no lo ponga en blanco con aire). Si el lector de placas o tiras no se pone en blanco automáticamente contra el primer micropocillo, calcule los valores para el control negativo y todos los demás micropocillos de muestra, restando el valor de absorbancia del blanco de reactivo (micropocillo A1) de los valores de absorbancia registrados en todos los otros micropocillos.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

**Valores de control:** El valor de absorbancia para el control negativo debe ser  $\leq 0.15$  y el valor de absorbancia para el control positivo debe ser  $\geq 1.00$ . Si cualquiera de los controles cae fuera del rango aceptable, la prueba no es válida y debe repetirse.

**Criterio negativo:** Las pruebas que producen valores de absorbancia  $< 0.10$  son negativas para la presencia de *Salmonella* spp. en las muestras de prueba.

**Criterio positivo:** Las pruebas que producen valores de absorbancia  $\geq 0.10$  son positivas para la presencia de *Salmonella* spp. en las muestras de prueba. Un resultado positivo de la prueba debe ser confirmado por procedimientos de cultivo estándar.

## PROCEDIMIENTO DE CONFIRMACIÓN RECOMENDADO

Neogen recomienda verificar los resultados positivos colocando en placas los cultivos GN o de BHI de la muestra y/o cultivos de enriquecimiento selectivos como se describe en los procedimientos de BAM o FSIS (referencias 2 y 3), dependiendo del tipo de muestra.

## LIMITACIONES

Las sondas de ADN usadas en este kit no reaccionan con serotipos de la especie *Salmonella bongori*.

## REFERENCIAS

1. Atlas, R.M. 1997. Handbook of Microbiological Media, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, FL, pg. 606.
2. US FDA. 2003. Bacteriological Analytical Manual online, chapter 5. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>
3. USDA-FSIS. 2004. Microbiology Laboratory Guidebook, chapter 4. [http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG\\_4\\_03.pdf](http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_4_03.pdf)
4. US FDA. 2003. Bacteriological Analytical Manual online, chapter 1. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>

## SERVICIO AL CLIENTE

Puede contactar los Servicios Técnicos y Asistencia al Cliente de Neogen usando la información de contacto en la parte posterior de este folleto. Entrenamiento para este producto, y para todos los kits de Neogen, está disponible.

## DISPONIBILIDAD DE LAS HOJAS DE SEGURIDAD (SDS)

Usted puede obtener las hojas de seguridad (SDS) para este kit, y para todos los kits de prueba de Neogen, en [foodsafety.neogen.com/sp](http://foodsafety.neogen.com/sp), o llamando al Neogen a +1 800.234.5333 o +1 517.372.9200.

## TÉRMINOS Y CONDICIONES

Por favor visite [www.neogen.com/sp/terms-and-conditions](http://www.neogen.com/sp/terms-and-conditions) para los términos y condiciones completos de Neogen.

## GARANTÍA

Neogen Corporation no ofrece ningún tipo de garantía expresa o implícita, excepto que los materiales utilizados en la fabricación de los productos son de calidad estándar. Si cualquiera de sus materiales resulta defectuoso, Neogen proveerá un reemplazo del producto. El comprador asume toda la responsabilidad y riesgos resultantes por el uso de este producto. No hay ningún tipo de garantía de comerciabilidad de este producto o de la idoneidad de éste para cualquier propósito. Neogen no será responsable de ningún daño, incluyendo daños especiales o consecuenciales, o de gastos derivados directa o indirectamente del uso del producto.



### Norteamérica

#### Oficinas corporativas de Neogen

+1 800-234-5333 (EEUU/Canadá)  
[foodsafety@neogen.com](mailto:foodsafety@neogen.com)  
[foodsafety.neogen.com/sp](http://foodsafety.neogen.com/sp)

### Europa, Medio Oriente y África

#### Neogen Europe

+ 44 (0) 1292 525 600  
[info\\_uk@neogeneurope.com](mailto:info_uk@neogeneurope.com)  
[www.neogeneurope.com](http://www.neogeneurope.com)

### México

#### Neogen Latinoamérica

+52 (55) 5254-8235  
[informacion@neogenlac.com](mailto:informacion@neogenlac.com)  
[www.neogenlac.com](http://www.neogenlac.com)

### Brasil

#### Neogen do Brasil

+55 19 3935.3727  
[info@neogendobrasil.com.br](mailto:info@neogendobrasil.com.br)  
[www.neogendobrasil.com.br](http://www.neogendobrasil.com.br)

### China

#### Neogen Bio-Scientific Technology

+86 21 6271 7013  
[info@neogenchina.com.cn](mailto:info@neogenchina.com.cn)  
[www.neogenchina.com.cn](http://www.neogenchina.com.cn)

### India

#### Neogen Food and Animal Security

+91 484 2306598, 2301582  
[info@neogenindia.com](mailto:info@neogenindia.com)  
[www.neogenindia.com](http://www.neogenindia.com)