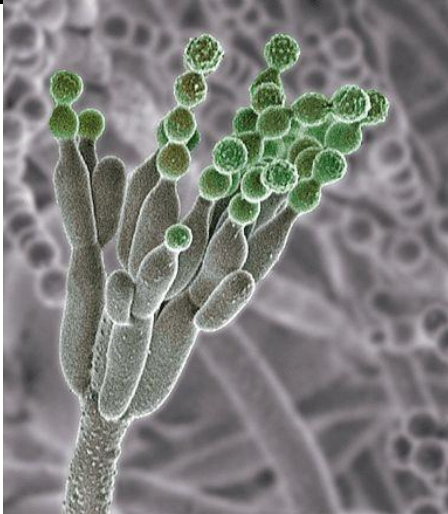


## Soluciones Rápidas para *Listeria*:

ANSR – Más sensible que ISO

*Listeria* Right Now  
Resultados en 1 hora



**Antonio Debán Valles**

*Microbiology Application Specialist*

# Neogen Corporation

**The World's leading Animal and Food Safety Company**

Fundado en  
1982

## Localizaciones

Michigan,  
Kentucky,  
Nebraska,  
Wisconsin,  
Mexico, Brasil,  
China, India,  
Escocia,  
Inglaterra

Empleados:  
1100+

Nasdaq: NEOG

Capitalización  
de mercado:  
\$2B



Neogen Canada  
Guelph, ON



Neogen Europe  
Ayr, Scotland  
Lab M  
Heywood, England  
Quat-Chem  
Rochdale, England



Neogen Latinoamerica  
Mexico City, Mexico



Neogen China  
Shanghai, China



Neogen India  
Cochin, India



Neogen do Brasil  
Sao Paulo, Brazil  
Deoxi Biotecnologia  
Araçatuba, Brazil  
Rogama  
Pindamonhangaba, Brazil

Corporate Headquarters  
Food Safety Division,  
Lansing, MI

Animal Safety Division  
Lexington, KY

Hacco, Inc.  
Randolph, WI

GeneSeek  
Lincoln, NE

Prima Tech  
Kenansville, NC

Chem-Tech  
Pleasantville, IA

Preserve International  
Memphis, TN  
Turlock, CA



# DCCASA

Animal Health

Food Quality Control

Public Animal Health Labs

Food Industry

Veterinary Pharma Industries

Public Health Institutes

Animal Production Industries

Food Technology Universities

Veterinary Universities

Private External QC Labs

Private External Veterinary Labs

Dairy QC Labs

  
Diagnóstico & Investigación

Investigación  
Biomédica



Control de Calidad  
Agroalimentario



Terapias  
Avanzadas





# Neogen a lo largo de la cadena alimentaria



# Soluciones Seguridad Alimentaria

**Microbiología  
general y  
Esterilidad  
comercial**



**Control de Procesos**



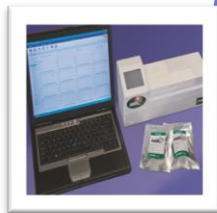
**Monitorización  
ambiental**

**Especiación y  
adulteración**



**Materias  
primas**

**Patógenos  
Producto final**



# Neogen – Detección rápida de patógenos

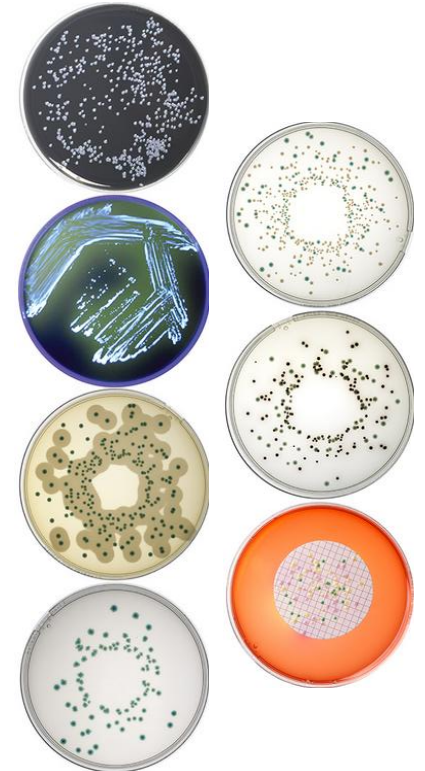
**Reveal 2.0**



NEOGEN<sup>®</sup>  
**ANSR**<sup>™</sup>  
Pathogen Diagnostics

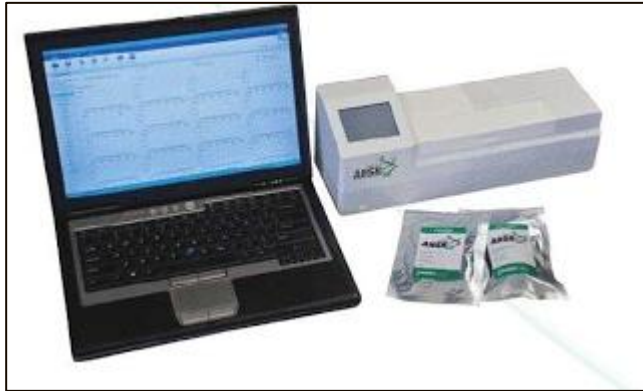


**LAB** <sup>™</sup>  
A Neogen<sup>®</sup> Company



 **NEOGEN**<sup>®</sup>

# ANSR





# Nuevo metodo molecular: ANSR

## Amplified Nucleic Single-Temperature Reaction

For rapid detection of pathogens

### Nueva tecnologia

- Basado en **amplificación isoterma del ADN**
- Detecta ADN o ARN
- Muy sensible

### Simple

3 pasos:  
Enriquecimiento, Lisis y  
Amplificación/Lectura

### Mas rapido

- No son necesarios ciclos de termociclado
- **Amplificación/Lectura en 10 – 18 min**
- Resultados en solo 24h

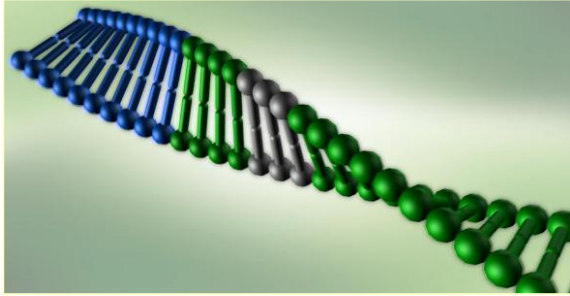
### Bajo coste y espacio

- Equipo compacto para que quepa fácilmente en cualquier laboratorio
- Instrumentos y equipos no muy caros

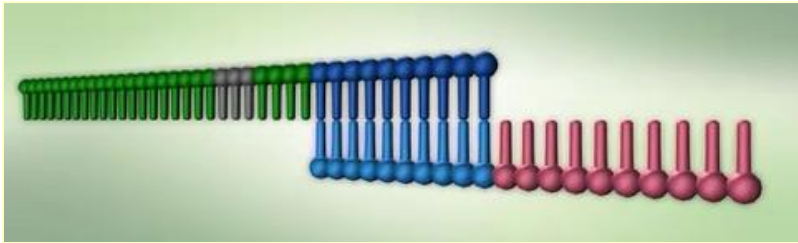
### Fácil de usar

- Fácil de llevar a cabo
- Resultados fáciles de interpretar, exportar o imprimir

# ¿Cómo funciona ANSR?



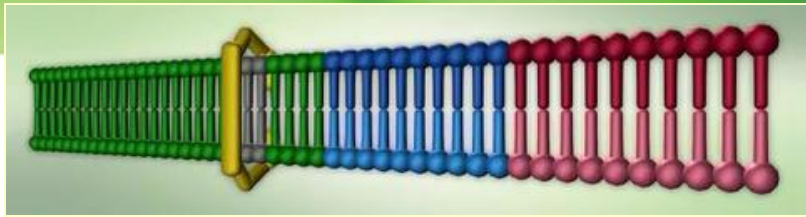
El ADN se libera mediante la lisis de las bacterias que hay en la muestra tras el enriquecimiento



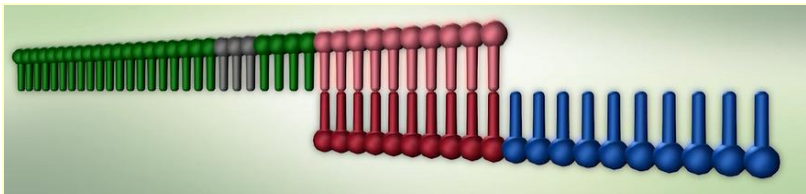
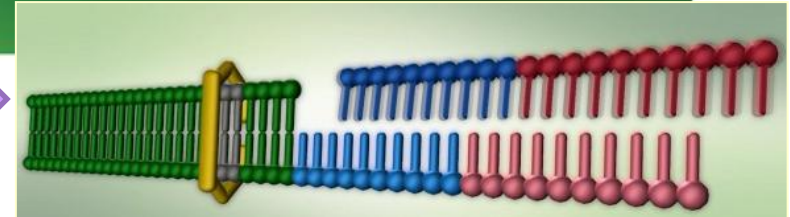
Un pequeño primer formado por oligonucleótidos se une a su ADN complementario (el del patógeno)



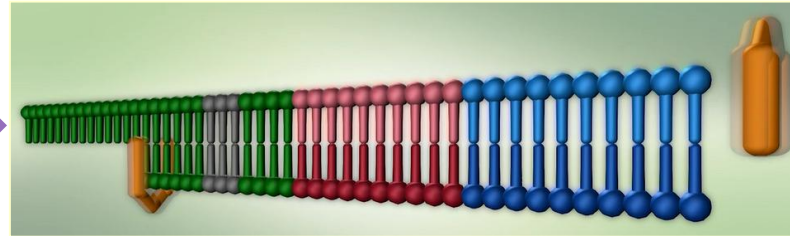
La DNA-polimerasa reconoce el sobrante como si el ADN estuviese dañado y extiende la cadena a ambos lados, creando una nueva pieza de ADN



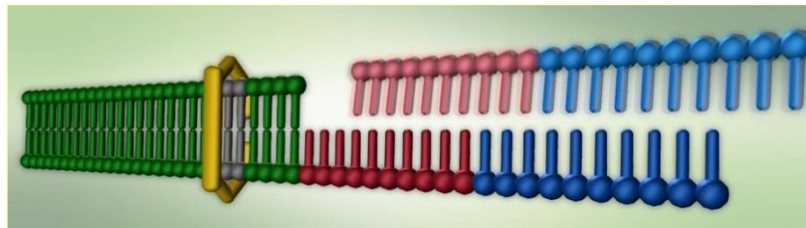
Una “nicking enzyme” se engancha al ADN, cortando y liberando una parte



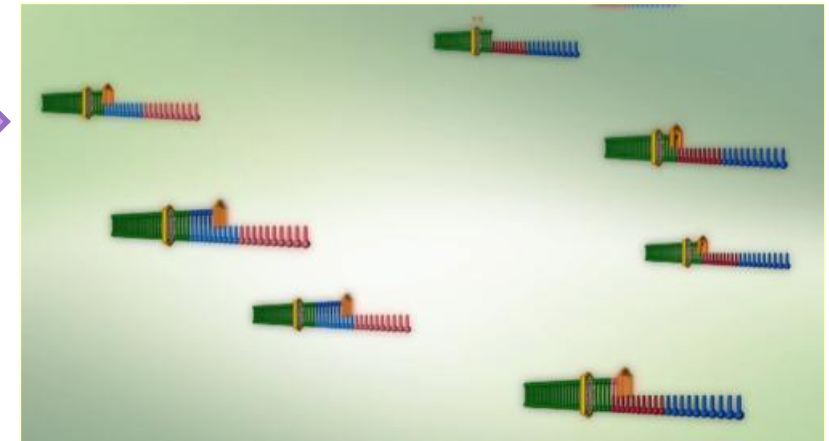
El producto de la primera reacción se une al segundo “primer” (cebador)



La polimerasa repite el mismo paso que anteriormente, creando una nueva pieza de ADN

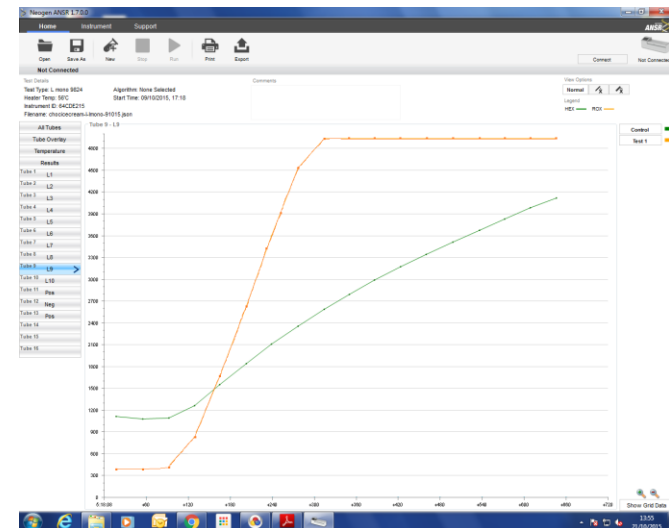
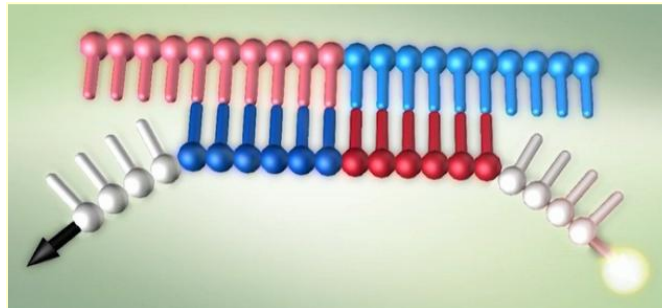
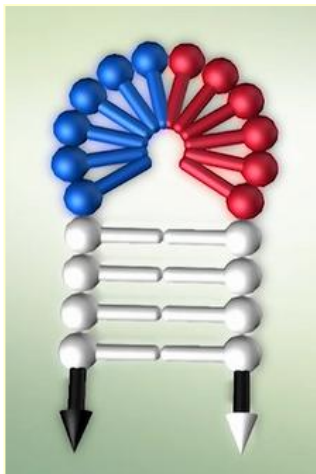


Una “nicking enzyme” se engancha a esta nueva pieza de ADN y libera el nuevo fragmento



# Cómo funciona ANSR?

- Los fragmentos amplificados del ADN del patógeno se unen a balizas moleculares especiales
- Las balizas moleculares producen fluorescencia cuando se unen al ADN del patógeno. Ésta fluorescencia es lo que se detecta en ANSR



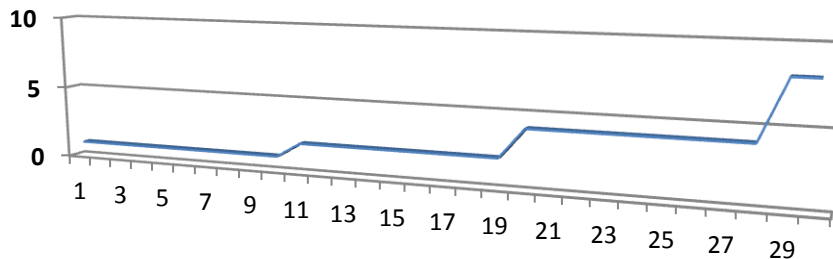


# Comparación: ANSR vs PCR - Amplificación

## Polymerase Chain Reaction - PCR

- Una única (o unas pocas) muestra de ADN necesitan ser amplificadas mediante termociclado para generar millones de copias de una secuencia de ADN específica
- La repetición de ciclos de termociclado es necesaria
- La replicación exponencial solo ocurre una vez por cada ciclo

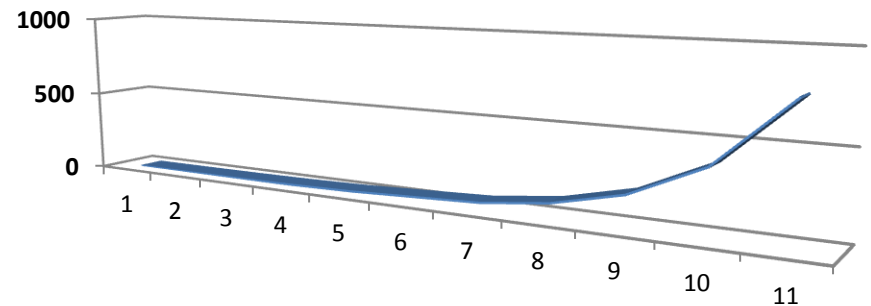
**PCR Cycle Replication**



## Amplified Nucleic Single-Temperature Reaction - ANSR

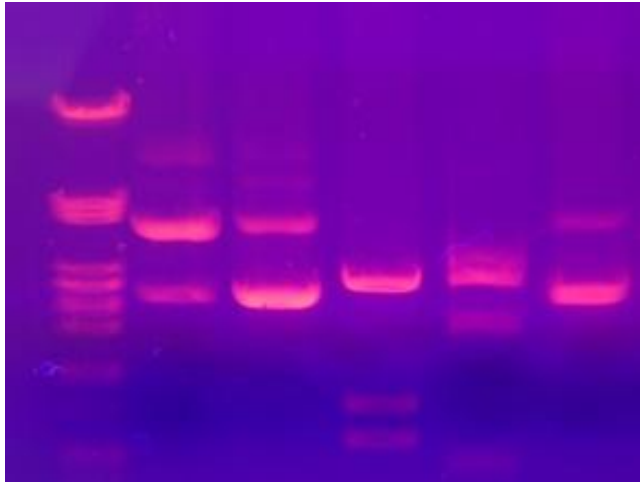
- Continua y exponencial reacción en cadena isotérmica en la que el producto de una reacción cataliza las reacciones siguientes
- La repetición de ciclos de termociclado no es necesaria

**ANSR Continuous Replication**

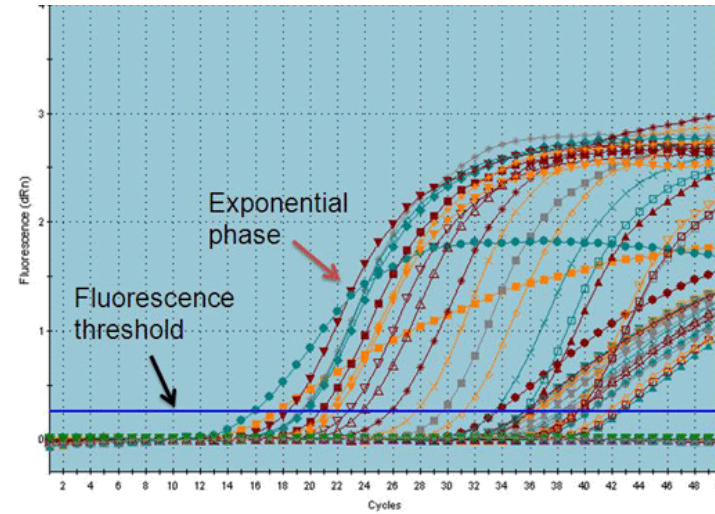


# Comparación: ANSR vs PCR – Resultados

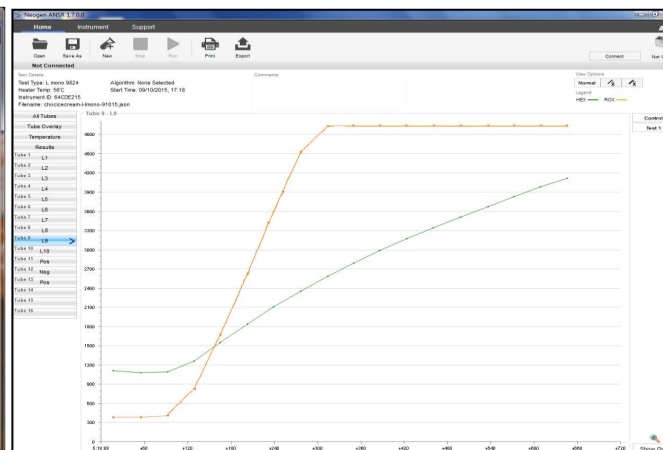
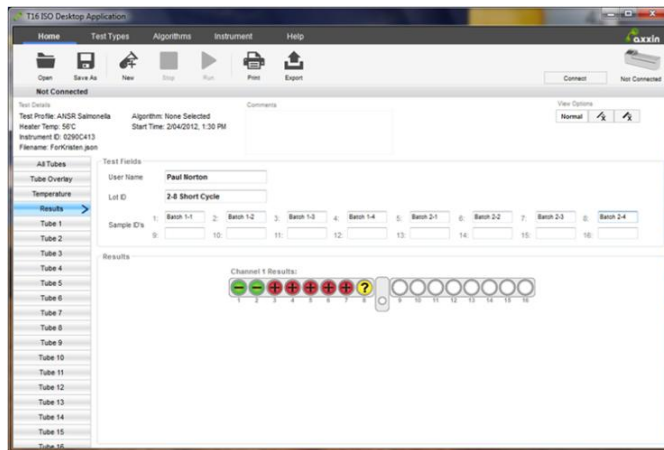
PCR tradicional



rt-PCR



ANSR



# ANSR vs PCR – Tiempo para Resultados

## REACCIÓN MOLECULAR

PCR Tradicional: varias horas

rt-PCR: Hasta 1 hora

ANSR: 10 – 18 minutos

## TODO EL PROCESO

PCR Tradicional: hasta 30h

rt-PCR: tan solo 26h

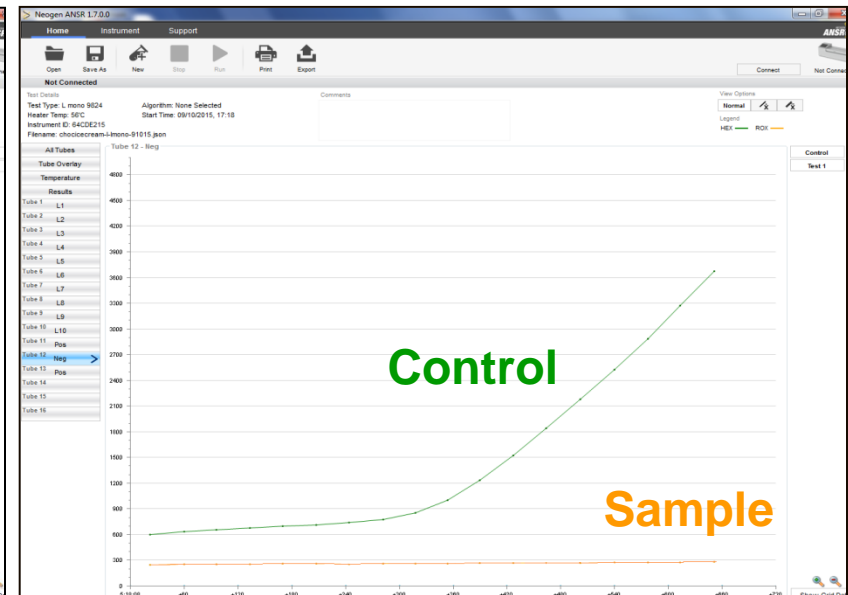
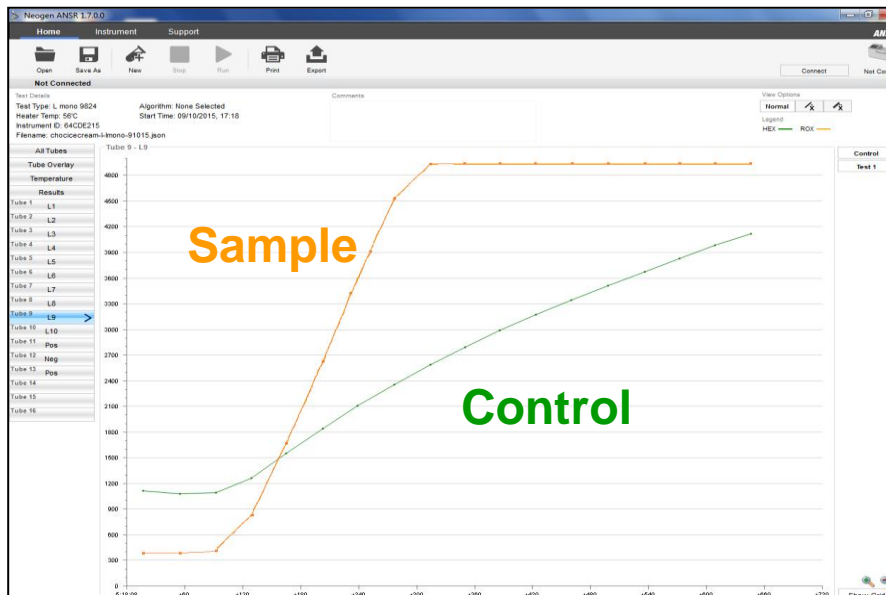
ANSR: tan solo 24h

# La importancia de un Control Interno

El usuario puede ver claramente si se ha producido inhibición durante el análisis. Diferentes productos alimentarios pueden contener compuestos que provocan inhibición.

Un colorante denominado SYTO 82 se inserta dentro de la doble hélice de ADN produciendo una señal luminosa a una longitud de onda diferente a la de la baliza.

La señal puede ser mas fuerte en muestras positivas porque hay mas posibilidades de que los componentes de la reacción se encuentren.





# ANSR kits

- Un solo pre-enriquecimiento
- Válido para todas las muestras alimentarias y ambientales

## **ANSR *Salmonella***

- Sensitivity: 1 cfu/analytical unit
- Sensitivity:  $10^4$  cfu/mL post enrichment
- Duración del test: 10 minutos
- Basado en ADN

## **ANSR *Listeria spp***

- Sensitivity: 1 cfu/analytical unit
- Sensitivity:  $10^2$  cfu/mL post enrichment
- Duración del test: 18 minutes
- Basado en ARN

## **ANSR *E. coli* O157:H7**

- Sensitivity: 1 cfu/analytical unit
- Sensitivity:  $10^4$  cfu/mL post enrichment
- Basado en ADN

## **ANSR *Listeria monocytogenes***

- Sensitivity: 1 cfu/analytical unit
- Sensitivity:  $10^4$  cfu/mL post enrichment
- Duración del test : 10 minutes
- Basado en ADN

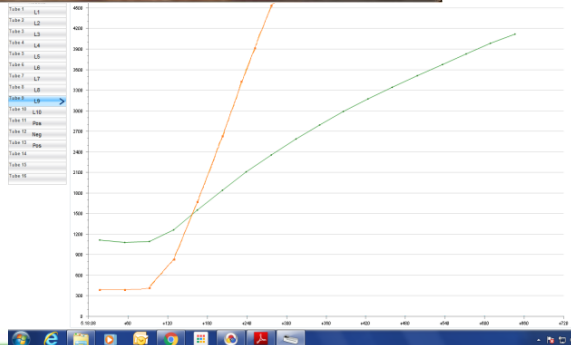
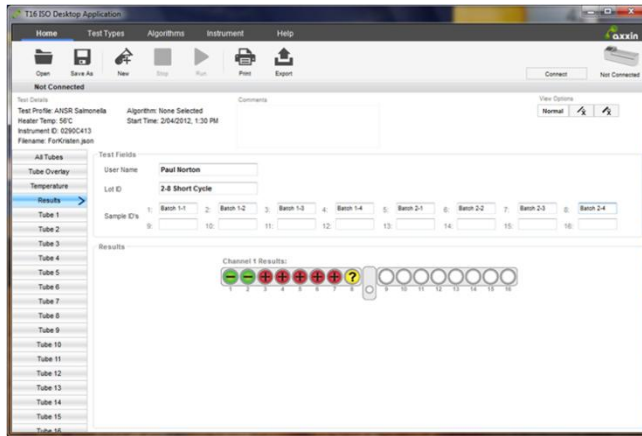
# Protocolo sencillo



80°C durante



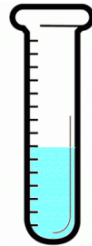
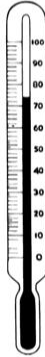
Resultados en tan solo 24 horas desde el enriquecimiento



# Protocolo para muestras individuales

50 $\mu$ L de muestra

25+/-3h \*  
en LESS+  
a 30°C



Añadir 450 $\mu$ L  
del lisis-buffer  
a la muestra



Bloque calentador  
a 37°C -10 minutos

Bloque calentador  
a 80°C -20 minutos



Pipetear 50 $\mu$ L al los tubos de ANSR (precalentados a 56°C) en el lector. Tapar los tubos y agitar en el vortex. Poner de nuevo los tubos en el lector. Resultados en 10 minutos.



NEO 35/03-01/16  
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS  
FOR AGRIBUSINESS  
<http://nf-validation.afnor.org/en>

# Protocolo para « Pooled Samples »



25+/-3h \*  
en LESS+  
a 30°C



De 1 a 10  
muestras

1mL

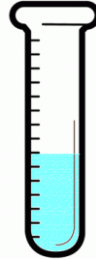
1mL

1mL

50µL de muestra



Añadir 450µL  
del lisis-buffer  
a la muestra



Bloque calentador  
a 37°C -10 minutos

Bloque calentador  
a 80°C -20 minutos



Pipetear 50µL al los tubos de  
ANSR (precalentados a 56°C)  
en el lector. Tapar los tubos y  
agitar en el vortex. Poner de  
nuevo los tubos en el lector.  
Resultados en 10 minutos.



NEO 35/03-01/16  
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS  
FOR AGRIBUSINESS  
<http://nf-validation.afnor.org/en>



# Validación ANSR ISO 16140

- Resultados ANSR *Listeria spp*

- i. Pooled samples

	ISO +	ISO -
ANSR +	119	38
ANSR -	31	261

$\Delta = 7$

- ii. Single

	ISO +	ISO -
ANSR +	120	40
ANSR -	30	259

$\Delta = 10$

ANSR *Listeria*  
es mas  
sensible que  
el método ISO

# ANSR *Listeria* spp - Sensibilidad

Sensibilidad = (positivo con el nuevo método)  
/(resultados positivos totales)

Sensibilidad	Pooling	Single
ANSR <i>Listeria</i>	83.5 %	84.2 %
ISO (oficial)	79.8 %	78.9%



¿Qué novedades hay?

## *Listeria* RIGHT NOW



# ANSR solutions – *Listeria* Right Now

An enrichment-free environmental monitoring tool for *Listeria* spp detection providing results in less than 60 minutes.



# ANSR kits – *Listeria* Right Now

**Resultados en menos de una hora ¿cómo es posible?**

No se necesita pre-enriquecimiento

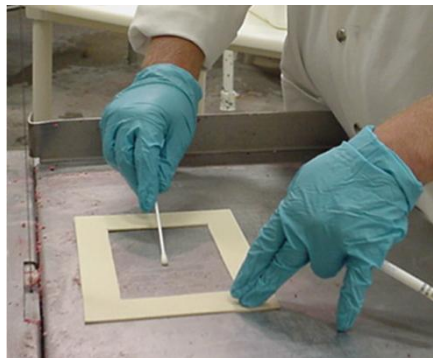
Solo dos pasos de calentamiento: 10 min a 37°C + 20 min a 80°C

Reacción ANSR *Listeria* spp : 18 min



# Protocolo kit ANSR LRN

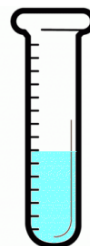
Introducir el hisopo



1mL de buffer

Remover el hisopo

500µL



37°C bloque calentador  
10 minutos

80°C bloque calentador  
20 minutos



Pipetear 50µL al los tubos de ANSR (precalentados a 56°C) en el lector. Tapar los tubos y agitar en el vortex. Poner de nuevo los tubos en el lector

Resultados en 10 minutos



# ANSR kits – *Listeria* Right Now

## Validación – Neogen Corporation

- Superficies analizadas durante el estudio: Hormigón sellado

Acero inoxidable



Plástico



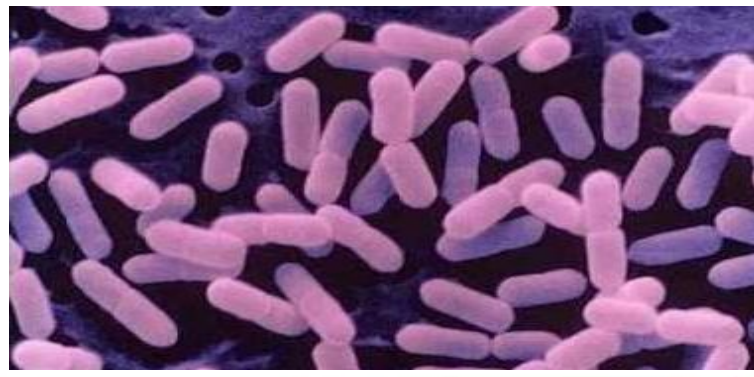
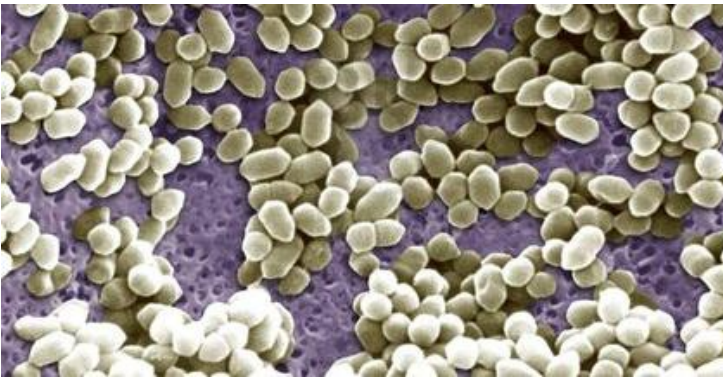
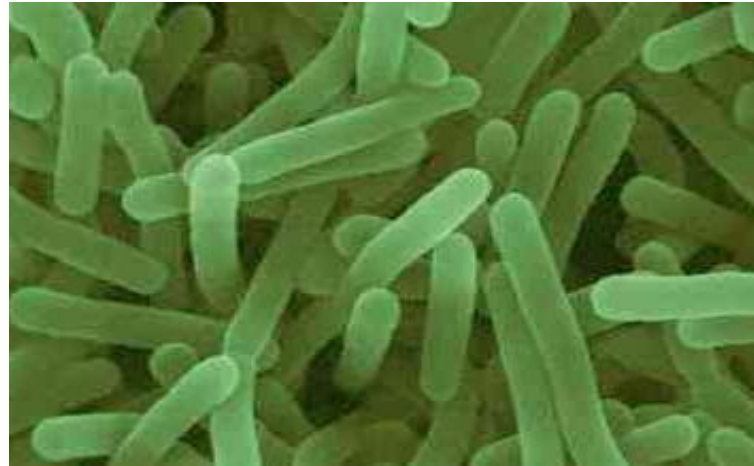
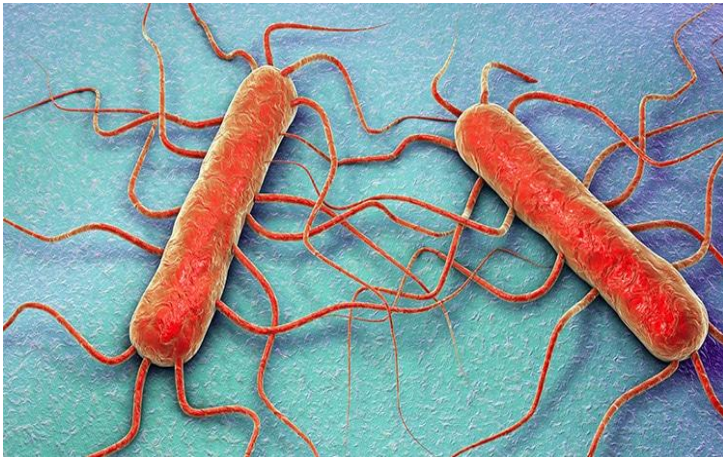
Baldosas de cerámica



# ANSR kitss – *Listeria* Right Now

## Validación – Neogen Corporation

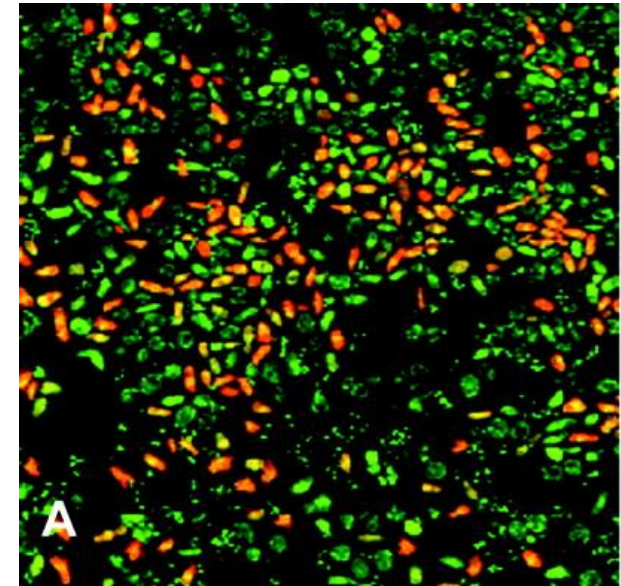
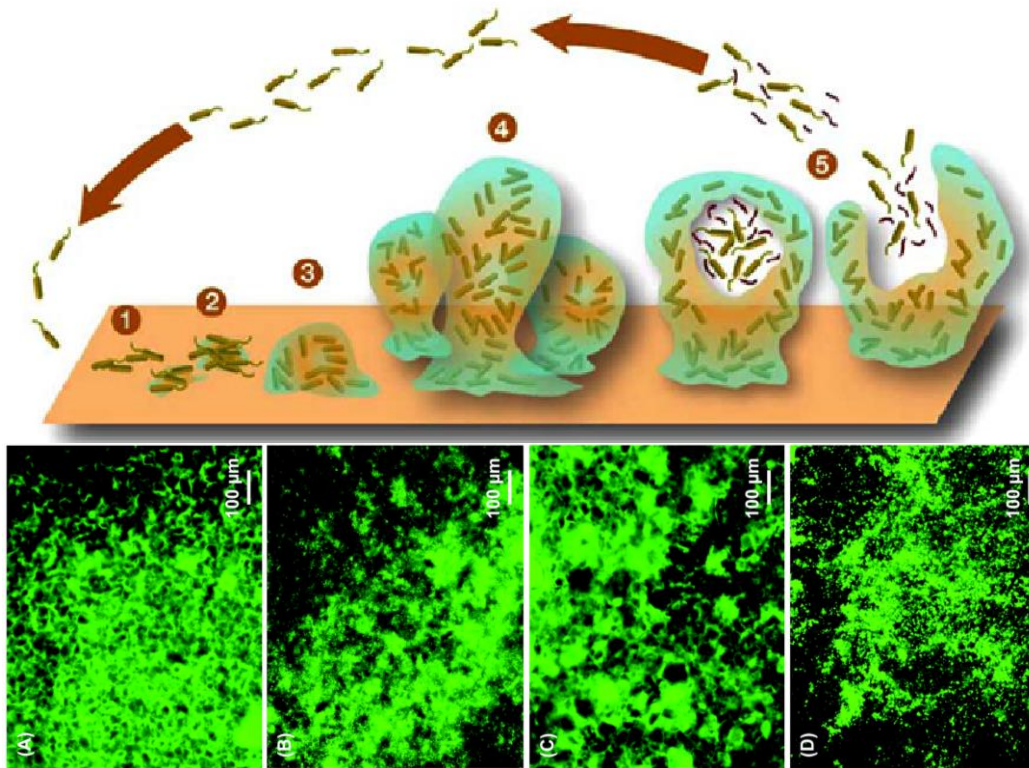
- Diferentes cepas de *Listeria* spp fueron analizadas: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*



# ANSR kits – *Listeria* Right Now

## Validación – Neogen Corporation

- Análisis realizados con *Listeria* spp únicamente y en combinación con flora de fondo: *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

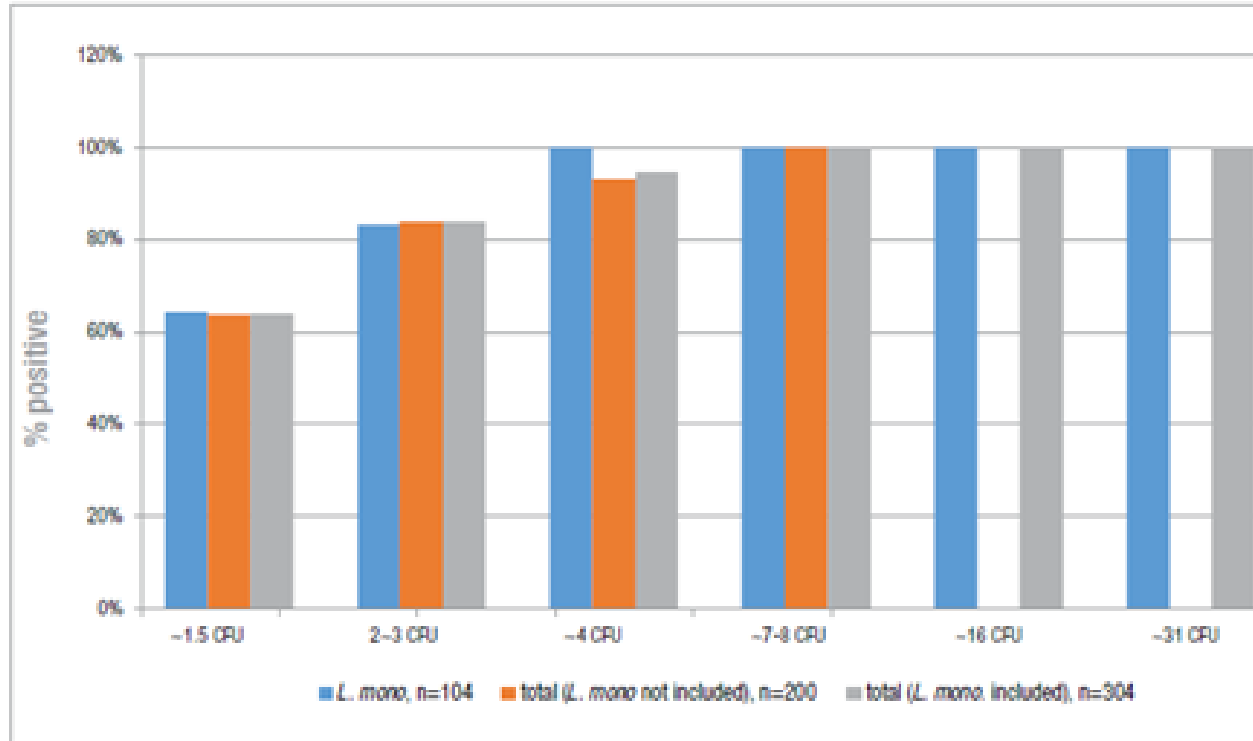




# ANSR kits – *Listeria* Right Now

## Validación – Neogen Corporation

- Resultados:
- LOD de ~4 CFU / superficie



Method: Inoculated directly onto swab



## ¿Y SI PUDIERAS TENERLO TODO?



**GREATER  
ACCURACY**



**FASTER  
TIME TO RESULTS**



**MINIMAL  
INVESTMENT**



NEO 35/03-01/16  
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS  
FOR AGRIBUSINESS  
<http://nf-validation.afnor.org/en>

**GRACIAS POR SU  
ATENCIÓN**

**¿PREGUNTAS?**





The logo for nirco consists of a blue icon of three leaves or petals above the word "nirco" in a lowercase, blue, rounded sans-serif font.  
**nirco**  
Diagnóstico & Investigación

