

iQ-Check®

***Listeria monocytogenes* II Kit**

Catalog #: 357-8124

User Guide

Test for the real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples.

BIO-RAD

TABLE OF CONTENTS

- I. Introduction
 - II. iQ-Check *Listeria monocytogenes* II technology
 - III. Kit components
 - IV. Shelf life and storage
 - V. Material required but not supplied
 - VI. Precautions and recommendations
 - VII. Protocol
 - A. Sample enrichment
 - B. DNA extraction
 - C. Real-time PCR
 - D. Data analysis
 - VIII. Confirmation of positive results
 - IX. Confirmation of single colonies using iQ-Check
 - X. Test performances and validations
 - XI. References
- APPENDIX A: PCR Mix Calculation Guide

I. INTRODUCTION

Conventional bacteriological methods are often long and tedious. In comparison, iQ-Check *Listeria monocytogenes* II is a simple and rapid qualitative test, allowing the detection of specific DNA sequences unique to *Listeria monocytogenes* found in environmental samples and food products. Using real-time polymerase chain reaction (PCR), *Listeria monocytogenes* specific DNA sequences are amplified and detected simultaneously by means of fluorescent probes. Up to 94 samples can be processed, with a minimized risk of contamination and an easy to use procedure. The use of this test allows results to be obtained within a few hours following pre-enrichment of a sample. The intended users of this kit are trained laboratory personnel who are performing tests to detect *Listeria monocytogenes*.

II. THE iQ-Check *Listeria monocytogenes* II TECHNOLOGY

The iQ-Check *Listeria monocytogenes* II kit is a test based on gene amplification and detection by real-time PCR. Ready-to-use PCR reagents contain DNA primers and a DNA probe specific for *Listeria monocytogenes*, as well as DNA polymerase and nucleotides. Detection and data analysis are optimized for use with a Bio-Rad real-time PCR instrument, such as the Chromo4™ System, the MiniOpticon™ or the CFX96™.

PCR is a powerful technique used to generate many copies of target DNA. During the PCR reaction, several cycles of heating and cooling allow DNA denaturation, by heat, followed by primers binding to the target region. The DNA polymerase then uses these primers and deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) to extend the DNA, creating copies of the target DNA. These copies are called amplicons.

In real-time PCR, specific probes are used to detect the DNA during the amplification, by hybridizing to the amplicons. These probes are linked to a fluorophore which fluoresces only when hybridized to the target sequence; in the iQ-Check *Listeria monocytogenes* kits, FAM is the fluorophore linked to the probe hybridizing to the *Listeria monocytogenes* specific DNA sequence. In the absence of target DNA, no fluorescence will be detected, and the sample determined to be negative. As the amount of amplicons increases with each round of amplification, fluorescence intensity also increases. During each PCR cycle, at the annealing step, the real-time PCR system measures this fluorescence, whereas the associated software plots the fluorescence intensity versus number of cycles. This method allows a simple determination of the presence of *Listeria monocytogenes* in a sample.

To monitor for a successful DNA amplification in each reaction tube, a synthetic DNA “internal control” is included in the reaction mix. This control is amplified with a specific probe at the same time as the *Listeria monocytogenes* target DNA sequence, and detected by a second fluorophore.

This test allows the detection of *Listeria monocytogenes* in environmental samples and food products previously enriched by culture (23h ± 1h, at 30°C) in Listeria Special Broth (LSB) broth or (25h ± 1h at 30°C) in half fraser broth. It includes the following 4 main steps:



III. KIT COMPONENTS

Reference ID	Reagent	Quantity Provided
A	Lysis reagent	1 bottle (20 ml)
B	Fluorescent probes	1 tube (0.55 ml)
C	Amplification mix	1 tube (4.4 ml)
D	PCR negative control	1 tube (0.5 ml)
E	PCR positive control	1 tube (0.25 ml)
F	Lysis beads	1 bottle (17.6 g)

The iQ-Check *Listeria monocytogenes* II kit contains sufficient reagents for 96 tests.

IV. SHELF LIFE AND STORAGE

Once received, the kit must be stored between +2°C and +8°C. Reagents stored between +2°C and +8°C can be used until the expiration date indicated on the reagent tube. Shelf life of lysis reagent is 6 months once mixed with lysis beads.

V. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Equipment:

- Bio-Rad real-time PCR system, eg Chromo4™ or MiniOpticon™ Systems. See real-time PCR user guide for iQ-Check kits (Chromo4™/MiniOpticon™, #: 93269, Rev. C - iQ™5, #: 93270, Rev. A - iCycler iQ™, #: 93271, Rev. A, CFX96™/MiniOpticon™, #: 93893b V1.0 Rev A).
- Stomacher®, masticator or equivalent for homogenizing test samples.
- Incubator, capable of maintaining 30°C ± 2°C.

- Dry Heat block, for 1.5 ml tubes (100°C ± 5°C) and Cell Disruptor, such as a “Disruptor Genie”* (Scientific Industries), Bio-Rad cat #: 359-1456 or agitator-incubator* for Deepwell plates, such as a “Thermomixer” (Eppendorf).
- Bench top centrifuge (maximum 10,000-12,000 g, for 1.5 ml tubes).
- Vortex apparatus.
- Magnetic stir plate.
- 20 µl, 200 µl and 1000 µl Micropipettes.
- Combitip pipettes, or equivalent repeat pipettors.

* Contact Bio-Rad for detailed information on instruments recommended by our technical department.

Note: We recommend using a universal power source (UPS) with the thermal cycler.

Supplies

- For PCR plates, tubes and sealing tape and caps, see real-time PCR system user guide for iQ-Check kits.
- Pre-enrichment medium: half fraser broth* (Eg. Bio-Rad cat #: 356-4604 for 500 g; 355-5797 for 225 ml x 6 bottles; 355-5788 for 2.3 L x 5 bags).
- Pre-enrichment medium: LSB broth (Bio-Rad cat. #: 355-5703 for 225 ml x 6 bottles, 356-4703 for 500 g).
- Pre-enrichment medium (optional): TCS (Tryptone-casein-soya) broth (Eg. Bio-Rad cat.#: 355-3454 for 10 ml x 25 tubes).
- RAPID[®]L.mono agar* (Bio-Rad cat. #: 356-3694 for 90 mm x 20 dishes; 355-5294 for 190 ml plus supplement).
- Stomacher bag with incorporated filter.
- 1 ml and 10 ml pipettes.
- Sterile filter tips, adaptable to 20 µl, 200 µl and 1000 µl micropipettes.
- 1.5 ml conical screwcap sterile tubes (Eg. Bio-Rad cat.#: 224-0110).
- 1 ml Deepwell plate, Bio-Rad cat. #: 359-0132.
- Pre-pierced sealing film, such as “X-Pierce™ Sealing Films” (Excell Scientific).
- Tips for Combitip pipettes or equivalent repeat pipettors, sterile, individual package.
- 2 ml and 5 ml sterile test tubes.
- Powder-free gloves.
- Sterile distilled water.
- Bleach 5%.
- Decontaminating agent, such as DNA AWAY[®] or RNase AWAY[®].

* can be used outside the scope of AOAC-RI validation.

VI. PRECAUTIONS AND RECOMMENDATIONS FOR BEST RESULTS

- This test must be performed by adequately trained personnel.
- Food samples and enrichment cultures must be handled as potentially infectious material and eliminated according to local rules and regulations.
- Pregnant women, children, the elderly and immuno-compromised individuals should not handle *Listeria monocytogenes* due to the high infection and fatality rate associated with these groups.
- All potentially infectious material should be autoclaved before disposal.
- The quality of results depends on strict compliance with the following Good Laboratory Practice, especially concerning PCR:
 - The laboratory equipment (pipettes, tubes, etc.) must not circulate from one work station to another.
 - It is essential to use a positive control and a negative control for each series of amplification reactions.
 - Do not use reagents after their expiration date.
 - Vortex reagents from the kit before using them to ensure homogeneity.
 - Periodically, verify the accuracy and precision of pipettes, as well as correct functioning of the instruments.
 - Change gloves often, especially if you suspect they are contaminated.
 - Clean work spaces periodically with at least 5% bleach and a decontaminating agent like DNA AWAY®.
 - Use powder-free gloves and avoid fingerprints on optical sealing tape. Do not write on caps of tubes. Both cases will interfere with data acquisition.
- It is strongly advised to follow the general requirements described in the standard EN ISO 22174:2005 "Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food pathogens – General requirements and definitions".

VII. PROTOCOL

It is strongly recommended to read the entire protocol before starting the test.

The following table outlines the different protocols that can be used depending on the application and the scope of the validation:

Protocol	Enrichment	Broth	Certification	Scope
Standard	25h ± 1h, 30°C	Half Fraser	NF VALIDATION	All food products and environmental samples
Standard	23h ± 1h, 30°C	LSB	NF VALIDATION	All food products and environmental samples
Easy	25h ± 1h, 30°C	LSB	NF VALIDATION	All food products and environmental samples
Easy	23h ± 1h, 30°C, 3h -5h, 30°C	Half Fraser, TCS	NF VALIDATION	Environmental samples
Easy	25h ± 1h, 30°C	LSB	AOAC-RI	Deli turkey, hot dogs, smoked salmon, and cottage cheese

A. Sample Enrichment

Enrichment media must be at the appropriate incubation temperature before use.

Standard protocol

- Homogenize 25 g of sample in 225 ml of pre-warmed LSB broth or half fraser broth, in a stomacher bag with incorporated filter.
- Incubate without shaking for **25 hours ± 1 hour in half fraser** or **23 hours ± 1 hour in LSB***, at 30° C.
- Collect **1.5 ml** of decanted, enriched sample using a disposable 1 ml pipette, into a 1.5 ml conical tube with screw cap. See DNA Extraction below.

Easy protocol, for use only with LSB (all samples)

- Homogenize 25 g of sample in 225 ml of pre-warmed LSB broth, in a stomacher bag with incorporated filter.
- Incubate without shaking for **25 hours ± 1 hour in LSB***, at 30° C
- Collect **100 µl** of decanted, enriched sample into a 1.5 ml conical tube with screw cap, containing the lysis reagent. See DNA Extraction below.

** In the method certified by NF VALIDATION, it is also possible to carry out the iQ-Check test from enriched LSB that has then been stored at 2°C - 8°C for up to 72 hours.*

Easy protocol for environmental samples only

- Homogenize 25 g of sample in 225 ml of pre-warmed half fraser broth, in a stomacher bag with incorporated filter.
- Incubate without shaking for **23 hours ± 1 hour in half fraser** at 30° C.
- Mix the suspension, collect 1ml and add it to 10 ml of TCS broth (pre-warmed to 30°C).
- Incubate without shaking for 3h to 5h at 30°C.
- Collect **100 µl** of decanted, enriched sample into a 1.5 ml conical tube with screw cap, or in a well of a Deepwell plate, containing the lysis reagent. See DNA Extraction “Easy protocol” below.

Note: Do not shake the suspension before collecting sample, and avoid collecting large fragments of food debris. For food samples with a fatty supernatant, collect the sample just below this layer.

B. DNA Extraction

Before starting the test:

Preheat dry heat block	Turn on heat block and set it to 95°C - 100°C
Prepare lysis reagent	Reconstitute the final lysis reagent as follows: <ul style="list-style-type: none">• Carefully pour all the contents from reagent F (lysis beads) into reagent A (lysis reagent).• The lysis reagent mixed with lysis beads (reagents A + F) has a shelf life of 6 months, when stored at 4°C.

Standard protocol

- 1 - Centrifuge collected 1.5 ml enriched sample at 10,000-12,000 g for 5 minutes. Discard all the supernatant.
- 2 - Add 250 µl of the final lysis reagent (reagents A +F) to the pellet.

Note: Gently shake the lysis reagent by hand first to resuspend the beads. Pipette the lysis reagent while it is stirring at medium speed on a magnetic stir plate, in order to keep it in suspension and collect the beads. Use consumables with a wide enough tip to allow pipetting of the homogenized lysis reagent.

- 3 - Resuspend pellet by pipetting the reagent up and down in the tube.
- 4 - Place tube in the Cell Disruptor for 3 min ± 1min.
- 5 - Place tube in the heat block at 95°C - 100°C for 15 minutes.
- 6 - Vortex at high speed.
- 7 - Centrifuge at 10,000-12,000 g for 5 minutes.

Easy protocol

1 - Aliquote **100 µl of homogenized lysis reagent** (reagents A + F) to the 1.5 ml screw cap tubes or in a Deepwell plate that will be used for the DNA extraction.

Note: Gently shake the lysis reagent by hand first to resuspend the resin. Pipette the lysis reagent while it is stirring at medium speed on a magnetic stir plate, in order to keep it in suspension and collect the beads. Use consumables with a wide enough tip to allow pipetting of the homogenized lysis reagent.

- 2 - Add 100 µl of the enriched sample. Mix the solution by pipetting up and down in the tube. Seal the Deepwell plate with the pre-pierced sealing film.
- 3 - Place tube in the Cell Disruptor for 3 min ± 1min (tubes only).
- 4 - Place tube in the heat block at 95°C - 100°C for 15 minutes or the Deepwell in the agitator-incubator at 1,300 rpm at 95°C - 100°C for 15 to 20 minutes.
- 5 - For tubes only, vortex at high speed, for a few seconds then, centrifuge at 10,000-12,000 g for at least 2 minutes. Centrifugation is not needed for Deepwell plate.

For both extraction protocols:

- Open tubes carefully to avoid any possible cross contamination.
- Cool the Deepwell plate before pipeting directly through pre-pierced sealing film.
- For the amplification reaction, use **5 µl** of the supernatant obtained, containing the DNA extract* (do not vortex before collecting 5 µl sample).
- The remaining supernatant and/or its dilution can be stored for up to 1 year at -20°C. Before reusing the supernatant or its dilution, always allow it to thaw, then centrifuge the tube at 10,000-12,000 g for 5 minutes.

*At this step:

For samples showing inhibition on a previous test, perform a 1/10 dilution, in sterile distilled water using 10 µl of DNA extract. Then use 5 µl of the appropriate dilution for amplification.

If you choose to temporarily stop the procedure, this is the recommended stopping point.

C. Real-time PCR

1. Instrument and software setup

For instrument and software setup, follow instructions in the real-time PCR system user guide for iQ-Check kits.

2. PCR mix preparation

2.1 Prepare a PCR mix containing the amplification solution (reagent **C**) and the fluorescent probes (reagent **B**) according to the PCR mix calculation guide found in Appendix A. To find the correct volumes to use, add the total number of samples and controls to be analyzed, and find the corresponding volumes in the table. At least one positive and one negative control must be included in each PCR run.

2.2 After preparation, the PCR mix (reagent B + C) must be used immediately, otherwise it is stable for **1 hour at 4°C**.

2.3 Pipette **45 µl** of this PCR mix in each well according to your plate setup.

Add **5 µl** of sample or reagent **D** (negative control) or reagent **E** (positive control).

Seal the wells with the optical film or optical caps.

It is important to avoid bubbles at the bottom of the wells by pipetting carefully. To eliminate any bubbles, centrifuge the sealed PCR plate or the PCR strips (quick spin).

2.4 Place the plate or strips in the thermal cycler. Be sure to place the plate correctly: A1 well at the upper left corner.

Close the reaction module.

3. PCR Start

To start the PCR run, follow instructions in the real-time PCR system user guide for iQ-Check kits.

D. Data Analysis

Data can be analyzed directly at the end of the PCR run or at a later time by opening the stored data file. Follow instructions in the corresponding real-time PCR system user guide for iQ-Check kits, for opening data files and setting the data analysis parameters.

1. Interpreting Results

Once data analysis parameters have been set, results are interpreted by analyzing the Ct values of each sample (the cycle at which the amplification curve crosses the threshold). It is also possible to use the software iQ-Check Analysis (cat. #: 359-3135) for an automated interpretation and report generation of all data (see iQ-Check Analysis user guide). A complete automated analysis is available with the Opticon Monitor Software, for the Chromo4™ and MiniOpticon™ systems (see Chromo4™ and MiniOpticon™ User Guide for iQ-Check kits, #: 93269, Rev. C). The CFX Manager™ IDE allows a complete automated analysis for the CFX 96™ and the Mini Opticon™, #: 93893b V1.0 Rev A.

1.1 Controls:

Before interpreting sample results, it is necessary to verify the positive and negative controls.

For the experiment to be valid, the controls must have the following results, as summarized in the table below, otherwise the PCR reaction needs to be repeated.

	<i>Listeria monocytogenes</i> detection (FAM)	Internal Control detection
Negative control	Ct = N/A*	$28 \leq Ct \leq 40$
Positive control	$26 \leq Ct \leq 36$	Not significant

* The software indicates a Ct value of N/A (not applicable) when the fluorescence of a sample does not rise significantly above the background noise, and hence does not cross the threshold.

1.2 Samples:

A **positive** *Listeria monocytogenes* sample must have a Ct value ≥ 10 for the FAM fluorophore.

If the Ct value is below 10, verify that as raw data the curve is a regular amplification curve (with a flat base line, followed by a rapid increase of fluorescence and then a flattening out). If the curve seems correct, it may be considered a positive *Listeria monocytogenes* sample.

If there is no Ct value (Ct=N/A) for FAM, or the curve is not a typical amplification curve, the internal control for that sample must then be analyzed.

- This sample is considered as a **negative** *Listeria monocytogenes* sample if there is no Ct value in FAM, and the internal control has a Ct \geq 28.
- Should the internal control also not have a Ct value (Ct = N/A), then it is not possible to interpret the result. Such a result probably indicates an inhibition of the PCR reaction. The sample needs to be diluted (1/10 in sterile distilled water), and the PCR repeated (see section VII.B. DNA extraction).
- Should the Ct value for the internal control be $<$ 28 it is not possible to interpret the result. Verify that the threshold was correctly placed, or that the curve as raw data is a regular amplification curve. If the curve does not have a characteristic shape, it will be necessary to repeat the PCR test.

Interpretation of sample results is summarized in the following table:

<i>Listeria monocytogenes</i> detection (FAM)	Internal control detection	Interpretation
Ct \geq 10	Not significant	Positive
Ct = N/A	Ct \geq 28	Negative
Ct = N/A	Ct = N/A	Inhibition**

** When both *Listeria monocytogenes* and internal control detection give a Ct value = N/A, the sample must be tested again but diluted 1/10.

VIII. CONFIRMATION OF POSITIVE RESULTS

In the context of the NF VALIDATION certified method, all positive iQ-Check *Listeria monocytogenes* II results need to be confirmed in one of three ways:

- 1 - Using standard tests described in the standardized CEN or ISO methods from colonies (including the purification step). For the confirmation test, it is necessary to start from the enrichment broth.
- 2 - Using the chromogenic medium RAPID'*L.mono*. Isolate 100 μ l of the enriched (Half Fraser or LSB) broth on RAPID'*L.mono*. The presence of characteristic *Listeria monocytogenes* colonies is sufficient to confirm the presence of *Listeria monocytogenes*.

3 - Using any other method certified by NF VALIDATION based on a principle different from that used in the iQ-Check *Listeria monocytogenes* II PCR test. The validated protocol of this second method must be followed entirely; the confirmation is carried out from the enrichment broth, when using the half Fraser Broth.

In the event of results that are not in agreement, between iQ-Check *Listeria monocytogenes* II and one of the confirmation options listed above, the laboratory should follow the necessary steps to ensure the validity of their results.

It is possible to store the enriched broth at 2°C - 8°C, LSB for up to 72 hours and half fraser for up to 48 hours, following the incubation at 30°C, before carrying out the confirmations.

In the context of AOAC-RI validation, a positive iQ-Check *Listeria monocytogenes* II result is considered presumptive positive and it is recommended it be confirmed according to the USDA MLG standard method (available online at http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_8_05.pdf) or FDA BAM standard method (available online at <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071400.htm>).

IX. CONFIRMATION OF SINGLE COLONIES USING iQ-Check

iQ-Check *Listeria monocytogenes* may also be used for confirming single isolated *Listeria monocytogenes* colonies on agar plates, such as RAPID'L.mono.

1. Pick an isolated colony, from an agar plate, selective or non-selective, with a tooth-pick or sterile loop, or other adapted consumable (e.g. pipette tip).
2. Resuspend the colony in 100 µl tryptone salt or distilled sterile water in a microfuge tube. Homogenize using a vortex.
3. Use 5 µl of the supernatant with 45 µl of PCR mix (see section VII.C Real-time PCR) and follow the rest of the iQ-Check *Listeria monocytogenes* protocol for the data and result interpretation.

X. TEST PERFORMANCES AND VALIDATIONS

The iQ-Check *Listeria monocytogenes* II kit is specific for the detection of *Listeria monocytogenes*. With this kit it is possible to detect 1-10 CFU/25 g sample, according to the enrichment recommended.

NF VALIDATION



BRD 07/10 – 04/05

ALTERNATIVE ANALYSIS
METHODS FOR AGRIBUSINESS
<http://nf-validation.afnor.org>

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II is validated by NF VALIDATION as an alternative method to the reference method NF EN ISO 11290-1/A1 (2005), for the detection of *Listeria monocytogenes* in all products for human consumption, as well as environmental samples. In the scope of the AFNOR certification, sample sizes greater than 25 g were not tested. The validation followed the protocol of the NF EN ISO 16140: 2003 standard, and includes the use of the iCycler iQ™, Chromo4™, iQ™5, MiniOpticon™ and of the CFX96™ systems.

The associated software are the Opticon Monitor (V3.1 and later), the iCycler iQ™ Optical system software (V2.0 and later), the iQ™5 Optical system software (V1.0 and later) and the CFX Manager IDE (V1.0 and later). Certificate number: BRD 07/10 – 04/05 Valid until: refer to the certificate available on the AFNOR Certification website.

AOAC-RI Validation



iQ-Check *Listeria monocytogenes* II (Easy protocol) is validated by the AOAC-Research Institute under the Performance Tested Method Program for the detection of *Listeria monocytogenes* in deli turkey, hot dogs, smoked salmon, and cottage cheese. A positive result with iQ-Check should be considered a presumptive and it is recommended it be confirmed by standard reference methods (see 3, 4 and 5 in section XI.). Certificate no. 010802.

NordVal Validation



iQ-Check *Listeria monocytogenes* II is validated by NordVal for:

- Enrichment in half Fraser followed by the standard lysis protocol.
- Enrichment in Listeria Specific Broth (LSB) followed by the standard lysis protocol.
- Enrichment in Listeria Specific Broth (LSB) followed by a simplified extraction protocol, no longer requiring the first centrifugation step.

Certificate number: 037. Valid until: refer to the certificate available on the NordVal website: <http://www.nmkl.org/NordVal/NordValMetoder.htm>

XI. REFERENCES

- 1 - Mengaud, J., Vicente, M.F., Chenevert, J., Pereira, J.M., Geoffrey, C., Gicquel-Sanzey, B., Baquero, F., Perez-Diaz, J.C. and Cossart, P. 1988. Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the lysteriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 56, 766-772.
- 2 - Standard ISO 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method. 2004.
- 3 - AOAC International. AOAC Official Method 993.12 – *Listeria monocytogenes* in Milk and Dairy Products – Selective Enrichment and Isolation Method (Final Action 1996).
- 4 - United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. Microbiology Laboratory Guidebook – Chapter 8.05. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples (August 1, 2006). Available online at www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_8_05.pdf.
- 5 - United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Bacteriological Analytical Manual - Chapter 10. *Listeria monocytogenes* (January 2003). Online at <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>

Notice to purchaser: limited license

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,079,352, 5,789,224, 5,618,711, 6,127,155, 5,677,152 (claims 1 to 23 only) and 5,773,258 (claims 1 and 6 only), and claims outside the US corresponding to US Patent No. 4,889,818. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product solely in Food testing, Environmental testing, and Industrial microbiology, including reporting results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, and also for the purchaser's own research. No right under any patent claim (such as the 5' Nuclease Process claims in US Patent Nos. 5,210,015 and 5,487,972) is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

APPENDIX A - PCR Mix Calculation Guide

To find the correct volumes to use when preparing the PCR mix, add the total number of samples and controls to be analyzed, and find the corresponding volumes of reagent B and reagent C in the table.

Total number of samples & controls	Probes Reagent B (μ l)	Amplification mix Reagent C (μ l)
1	5	40
2	11	86
3	16	130
4	22	173
5	27	216
6	32	259
7	38	302
8	43	346
9	49	389
10	54	432
11	59	475
12	65	518
13	70	562
14	76	605
15	81	648
16	86	691
17	92	734
18	97	778
19	103	821
20	108	864
21	113	907
22	119	950
23	124	994
24	130	1000
25	135	1100
26	140	1100
27	146	1200
28	151	1200
29	157	1300
30	162	1300
31	167	1300
32	173	1400
33	178	1400
34	184	1500
35	189	1500
36	194	1600
37	200	1600
38	205	1600
39	211	1700
40	216	1700
41	221	1800
42	227	1800
43	232	1900
44	238	1900
45	243	1900
46	248	2000
47	254	2000
48	259	2100

Total number of samples & controls	Probes Reagent B (μ l)	Amplification mix Reagent C (μ l)
49	265	2100
50	270	2200
51	275	2200
52	281	2200
53	286	2300
54	292	2300
55	297	2400
56	302	2400
57	308	2500
58	313	2500
59	319	2500
60	324	2600
61	329	2600
62	335	2700
63	340	2700
64	346	2800
65	351	2800
66	356	2900
67	362	2900
68	367	2900
69	373	3000
70	378	3000
71	383	3100
72	389	3100
73	394	3200
74	400	3200
75	405	3200
76	410	3300
77	416	3300
78	421	3400
79	427	3400
80	432	3500
81	437	3500
82	443	3500
83	448	3600
84	454	3600
85	459	3700
86	464	3700
87	470	3800
88	475	3800
89	481	3800
90	486	3900
91	491	3900
92	497	4000
93	502	4000
94	508	4100
95	513	4100
96	518	4100

iQ-Check®

***Listeria monocytogenes* II Kit**

Réf. : 357-8124

Notice d'utilisation

**Test pour la détection par PCR en temps réel
des *Listeria monocytogenes* dans les aliments
et échantillons d'environnement**

BIO-RAD

SOMMAIRE

- I. Introduction
 - II. Principe
 - III. Composition du kit
 - IV. Validité et conservation
 - V. Matériel nécessaire non fourni
 - VI. Précautions et recommandations
 - VII. Protocole
 - A. Enrichissement de l'échantillon
 - B. Extraction de l'ADN
 - C. PCR en temps réel
 - D. Analyse des données
 - VIII. Confirmation des résultats positifs
 - IX. Protocole de confirmation à partir de colonies isolées
 - X. Performances du test et validations
 - XI. Bibliographie
- ANNEXE A : Tableau de pipetage

I. INTRODUCTION

Face à la méthode bactériologique traditionnelle souvent longue et coûteuse, la méthode iQ-Check *Listeria monocytogenes* II est un test qualitatif permettant la détection spécifique de *Listeria monocytogenes* dans les produits alimentaires et les échantillons d'environnement par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) en temps réel. Une séquence d'ADN spécifique de *Listeria monocytogenes* est amplifiée et détectée simultanément grâce à une sonde fluorescente. Jusqu'à 94 échantillons peuvent être analysés avec un risque minimum de contamination et une procédure facile d'utilisation. L'utilisation de ce test est destinée au personnel de laboratoire qualifié, dans le cadre de la recherche de *Listeria monocytogenes*. La mise en œuvre de ce test permet l'obtention d'un résultat dès le lendemain de la mise en pré-enrichissement.

II. PRINCIPE

Ce test repose sur l'amplification génique et la détection par la technique de PCR en temps réel. Il utilise des amorces et une sonde d'ADN spécifiques de *Listeria monocytogenes*. La détection et l'analyse des résultats sont optimisées pour l'utilisation avec un thermocycleur pour la PCR en temps réel Bio-Rad, tel que le Chromo4™, le MiniOpticon™ ou le CFX96™.

Au cours de la réaction de PCR, les amorces vont se lier à la région cible, puis la polymérase catalyse leur extension dans le sens 5'-3' en utilisant les désoxynucléotides triphosphates (dNTPs), créant ainsi une séquence complémentaire d'ADN, appelée un "amplicon".

Pendant la PCR, des sondes spécifiques vont s'hybrider aux amplicons. Ces sondes, marquées par des fluorophores, émettent de la fluorescence uniquement quand l'hybridation a lieu. La sonde qui se lie à la séquence cible de *Listeria monocytogenes* est marquée par le fluorophore FAM. L'intensité de fluorescence augmente proportionnellement à l'augmentation de la quantité des produits d'amplification dans le tube de PCR. La fluorescence est mesurée directement par le module optique du thermocycleur. Le logiciel associé à l'appareil calcule automatiquement la relation entre l'intensité de la fluorescence et le cycle d'amplification. Cette relation indique la présence, ou l'absence, de *Listeria monocytogenes* dans l'échantillon.

Un ADN synthétique appelé "Contrôle interne" est ajouté à chaque réaction. Il est amplifié en même temps que la séquence cible de *Listeria monocytogenes*, mais est détecté par une sonde marquée avec un deuxième fluorophore.

Ce test permet la détection de *Listeria monocytogenes* dans tous les produits d'alimentation humaine et échantillons d'environnement préalablement enrichis par culture (25h ± 1h à +30°C) en Fraser demi ou (23h ± 1h à +30°C) en bouillon spécifique *Listeria* Special Broth (LSB). La méthode est composée des étapes suivantes :



III. COMPOSITION DU KIT

Référence	Réactif	Volume
A	Réactif de lyse	1 flacon (20 ml)
B	Sondes fluorescentes	1 tube (0,55 ml)
C	Solution d'amplification	1 tube (4,4 ml)
D	Contrôle PCR négatif	1 tube (0,5 ml)
E	Contrôle PCR positif	1 tube (0,25 ml)
F	Billes de lyse	1 flacon (17,6 g)

Ce kit contient la quantité de réactif nécessaire pour 96 réactions.

IV. VALIDITÉ ET CONSERVATION

Dès réception, le kit doit être conservé entre +2°C et +8°C. Chaque réactif conservé entre +2°C et +8°C peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée sur le tube. La validité du réactif de lyse est de 6 mois après reconstitution.

V. EQUIPEMENTS ET MATERIEL NECESSAIRES NON FOURNIS DANS LE KIT

Equipement

- Thermocycleur Bio-Rad pour la PCR en temps réel, tel que Chromo4™ ou MiniOpticon™. Cf. manuel utilisateur du thermocycleur Bio-Rad pour les kits iQ-Check (Chromo4™/MiniOpticon™ Réf. : 93269, Rev. C - iQ™5 Réf. : 93270, Rev. A - iCycler iQ™ Réf. : 93271, Rev. A, CFX96™/MiniOpticon™ Réf. : 93893b V1.0 Rev A).
- Stomacher®, homogénéiseur ou équivalent.
- Etuve (30°C ± 2°C).
- Bloc chauffant (100°C ± 5°C), pour tubes coniques de 1,5 ml et agitateur vibrant, tel que "Disruptor Genie"* (Scientific Industries), réf. Bio-Rad : 359-1456 ou agitateur-incubateur* pour plaques Deepwell, tel que le "Thermomixer" (Eppendorf).

- Centrifugeuse de paillasse (max. 10.000 à 12.000 g, pour tubes 1,5 ml).
- Agitateur magnétique.
- Vortex.
- Multi-distributeur, tel que Combitip pipettes.
- Micropipettes de 20 µl, 200 µl et 1000 µl.

* Nous consulter pour une information précise concernant les appareils recommandés par nos services techniques.

Remarque : Nous recommandons l'utilisation d'un onduleur électrique avec le thermocycleur.

Consommables

- Pour les plaques et tubes PCR, et film et capuchons se reporter au manuel utilisateur du thermocycleur Bio-Rad pour les kits iQ-Check.
- Milieu de pré-enrichissement : LSB (réf. Bio-Rad: 355-5703 pour 6 flacons de 225 ml, 356-4703 pour 500 g).
- Milieu de pré-enrichissement : Fraser demi*, 225 ml (Exemple réf. Bio-Rad: 356-4604 pour 500 g, 355-5797 pour 6 flacons de 225 ml, 355-5788 pour 5 poches de 2,3 l).
- Milieu de pré-enrichissement (optionel) : TCS (Tryptone-caseine-soja) bouillon (Exemple réf. Bio-Rad: 355-3454 pour 25 tubes de 10 ml).
- Gélose RAPID'*L.mono** (réf. Bio-Rad : 356-3694 pour 20 boîtes x 90 mm; 355-5294 pour 190 ml plus supplément).
- Sac à stomacher avec filtre incorporé.
- Pipettes de 1 ml et 10 ml.
- Embouts à filtre stériles, adaptables sur les micropipettes de 20 µl, 200 µl et 1000 µl.
- Tubes à vis coniques de 1,5 ml, stériles, (Exemple réf. Bio-Rad: 224-0110).
- Plaques Deepwell 1 ml, Réf. Bio-Rad : 359-0132.
- Films pré-percés, tels que les films "X-Pierce™ Sealing Films" (Excell Scientific).
- Pointes pour Combitip ou multi-distributeur, stériles à emballage individuel
- Tubes stériles de 2 ml et de 5 ml.
- Gants non poudrés.
- Eau distillée stérile.
- Eau de javel 5%.
- Agent décontaminant tel que DNA AWAY® ou RNase AWAY®.

* Utilisable hors du cadre de la validation AOAC-RI.

VI. PRECAUTIONS ET RECOMMANDATIONS

- Cet essai doit être réalisé par des personnes ayant reçu une formation adéquate.
- Les échantillons d'aliments et les cultures d'enrichissement doivent être manipulés comme des matières potentiellement infectieuses et éliminés selon les réglementations locales.
- Femmes enceintes, enfants, personnes âgées et sujets immunodéprimés doivent éviter tout contact avec la *Listeria monocytogenes* en raison du caractère infectieux et létal de cette bactérie sur ces catégories de personnes.
- Tous les déchets potentiellement infectieux doivent être autoclavés avant élimination.
- La qualité des résultats dépend du respect scrupuleux des Bonnes Pratiques de Laboratoire, en particulier en matière de PCR :
 - Le matériel (pipettes, tubes etc...) ne doit pas circuler d'un poste à l'autre.
 - Il est indispensable d'utiliser un contrôle positif et un contrôle négatif pour chaque série de réactions d'amplification.
 - Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption.
 - Vortexer les réactifs du kit avant leur utilisation pour travailler avec des solutions homogènes.
 - Vérifier l'exactitude et la précision des pipettes ainsi que le bon fonctionnement des instruments.
 - Changer de gants régulièrement et dès que vous soupçonnez qu'ils peuvent être contaminés.
 - Nettoyer les surfaces de travail régulièrement avec de l'eau de javel 5% et autre agent tel que DNA AWAY® ou RNase AWAY®.
 - Porter des gants non poudrés pour ne pas laisser de traces de doigts sur le film optique utilisé pour sceller les microplaques. Ne pas écrire sur les bouchons des tubes PCR. Dans les deux cas, l'enregistrement des données par l'appareil peut être perturbé.
- Il est recommandé aux utilisateurs d'être conforme aux exigences générales pour la méthode PCR décrites dans la norme EN ISO 22174 : 2005 "Microbiologie des aliments – Réaction de polymérase en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments – Exigences générales et définitions".

VII. PROTOCOLE

Nous vous recommandons vivement de lire l'ensemble du protocole avant de commencer l'essai. Respecter scrupuleusement le protocole proposé.

Le tableau suivant liste les différents protocoles disponibles selon le cadre de validation et l'application utilisé :

Protocole	Enrichissement	Bouillon	Certification	Domaine
Standard	25h ± 1h, 30°C	Fraser demi	NF VALIDATION	Alimentation humaine et échantillons d'environnement
Standard	23h ± 1h, 30°C	LSB	NF VALIDATION	Alimentation humaine et échantillons d'environnement
Simplifié	25h ± 1h, 30°C	LSB	NF VALIDATION	Alimentation humaine et échantillons d'environnement
Simplifié	23h ± 1h, 30°C, 3h - 5h, 30°C	Fraser demi, TCS	NF VALIDATION	Echantillons d'environnement
Simplifié	25h ± 1h, 30°C	LSB	AOAC-RI	Blanc de dinde, hot dogs, saumon fumé, et fromage blanc

A. Enrichissement de l'échantillon

Les milieux d'enrichissement doivent être portés à la température d'incubation apprôpriée avant utilisation.

Protocole Standard

- Homogénéiser 25 g d'échantillon dans 225 ml de Fraser demi ou LSB préchauffé dans un sac à stomacher avec filtre incorporé.
- Incuber sans agitation pendant **25h ± 1h pour le Fraser demi**, ou **23h ± 1h pour le LSB***, à **30°C**. Une décantation naturelle a lieu lors de cette incubation.
- Réaliser le test iQ-Check sur **1,5 ml** de la suspension alimentaire ou échantillon d'environnement enrichie décantée (pour éviter la prise de gros débris alimentaires) en suivant le Protocole Standard pour l'extraction de l'ADN.

Protocole Simplifié avec bouillon LSB* uniquement (toutes matrices)

- Homogénéiser 25 g d'échantillon dans 225 ml de bouillon spécifique LSB préchauffé dans un sac à stomacher avec filtre incorporé.
- Incuber sans agitation pendant **25h ± 1h à 30°C**. Une décantation naturelle a lieu lors de cette incubation.
- Réaliser le test iQ-Check sur **100 µl** de la suspension enrichie décantée (pour éviter la prise de gros débris alimentaires) en suivant le Protocole Simplifié pour l'extraction de l'ADN.

* Dans le cadre de la méthode iQ-Check certifié par AFNOR VALIDATION, il est possible de réaliser le test iQ-Check à partir du bouillon LSB conservé entre +2°C et +8°C jusqu'à 72h maximum suivant la fin de l'enrichissement.

Protocole Simplifié pour échantillons d'environnement uniquement

- Homogénéiser 25 g d'échantillon dans 225 ml de Fraser demi préchauffé dans un sac à stomacher avec filtre incorporé.
- Incuber sans agitation pendant **23h ± 1h à 30°C**.
- Bien agiter le sac, prélever 1 ml de la suspension et les rajouter à 10 ml de bouillon TCS (prechauffé à 30°C)
- Incuber sans agitation pendant **3h à 5h** à 30°C.
- Réaliser le test iQ-Check sur **100 µl** de la suspension enrichie décantée en suivant le Protocole Simplifié pour l'extraction de l'ADN.

Remarque : Ne pas agiter les sacs avant de prélever l'échantillon pour le test iQ-Check. Pour les aliments présentant une couche grasse surnageante, prélever juste en dessous de cette couche.

B. Extraction des acides nucléiques

Avant le début de l'essai :

Pré-chauffer le bloc chauffant	Allumer le bloc chauffant et le régler à 95°C - 100°C
Préparer le réactif de lyse	Reconstituer le réactif de lyse : <ul style="list-style-type: none">• Verser tout le contenu du réactif F (billes de lyse) dans le flacon du réactif A (tampon de lyse).• Le réactif de lyse mélangé avec les billes de lyse (réactifs A + F) peut être conservé jusqu'à 6 mois à 4°C.

Protocole Standard

- 1 - Introduire 1,5 ml de suspension enrichie dans un tube à centrifuger à vis de 1,5 ml.
- 2 - Centrifuger à 10.000-12.000 g pendant 5 minutes et éliminer le surnageant.
- 3 - Ajouter 250 µl du réactif de lyse reconstitué au culot obtenu, et mélanger par aspiration/refoulement avec la pipette

Remarque : Agiter doucement le flacon de réactif de lyse à la main afin de mettre en suspension les billes. Lors du prélèvement, maintenir le réactif de lyse homogénéisé à vitesse modérée au moyen du barreau magnétique

contenu dans le flacon. Utiliser des consommables adaptés pour un prélèvement homogène du réactif de lyse reconstitué.

- 4 - Agiter 3 min \pm 1min avec l'agitateur vibrant tel que le "Disruptor Genie".
- 5 - Incuber le tube dans le bloc chauffant à 95°C - 100°C pendant 15 minutes.
- 6 - Vortexer à grande vitesse.
- 7 - Centrifuger à 10.000-12.000 g pendant 5 minutes.

Protocole Simplifié

- 1 - Pré-répartir, selon le nombre d'échantillons à tester, 100 μ l de réactif de lyse reconstitué et homogénéisé dans des tubes à centrifuger à vis de 1,5 ml.

Remarque : Agiter doucement le flacon de réactif de lyse à la main afin de mettre en suspension les billes. Lors du prélèvement, maintenir le réactif de lyse homogénéisé à vitesse modérée au moyen du barreau magnétique contenu dans le flacon. Utiliser des consommables adaptés pour un prélèvement homogène du réactif de lyse reconstitué.

- 2 - Ajouter 100 μ l de suspension enrichie et mélanger par aspiration / refoulement avec la pipette. Sceller les plaques Deepwell avec un film pré-percé.
- 3 - Agiter 3 min \pm 1min avec l'agitateur vibrant tel que le "Disruptor Genie" (tubes uniquement).
- 4 - Incuber à 95°C - 100°C pendant 15 minutes dans un bloc chauffant (tubes) ou sous agitation à 1.300 rpm et à 95°C - 100°C pendant 15 à 20 min dans un agitateur-incubateur pour plaques (plaques Deepwell).
- 5 - Pour tubes uniquement : vortexer à grande vitesse, centrifuger au minimum 2 minutes à 10.000 - 12.000 g. La centrifugation est inutile pour les plaques Deepwell.

Pour les deux protocoles :

- Ouvrir les tubes avec précaution, pour éviter les risques de contaminations croisées.
- Refroidir la plaque Deepwell avant de pipetter directement à travers le film pré-percé.
- Utiliser **5 μ l** du surnageant obtenu (contenant l'ADN extrait) pour la réaction d'amplification* (ne pas vortexer avant de prélever les 5 μ l).

* A cette étape :

Procéder à une dilution au 1/10, en eau distillée stérile, des échantillons ayant présenté une inhibition lors d'un test précédent, en utilisant 10 µl du surnageant obtenu. 5 µl de la dilution seront utilisés pour l'amplification.

- Le surnageant restant peut être conservé jusqu'à un an à -20°C. Après une éventuelle décongélation en vue d'une réutilisation du surnageant et/ou de sa dilution, toujours centrifuger les tubes 5 minutes à 10.000-12.000 g.

Si vous souhaitez vous arrêter dans le protocole, cette étape est la plus appropriée.

C. PCR en temps réel

1. Mise en marche appareil PCR

Pour la mise en marche et la définition des paramètres du logiciel consulter le manuel utilisateur du thermocycleur Bio-Rad pour les kits iQ-Check.

2. Préparation des réactions PCR

2.1 Préparer le mélange réactionnel PCR en mélangeant la solution d'amplification (réactif **C**) et les sondes fluorescentes (réactif **B**) en fonction du nombre d'échantillons et des contrôles à analyser (au minimum un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être utilisés par plaque). Utiliser le tableau de pipetage en annexe A pour connaître les quantités nécessaires de chaque réactif.

2.2 Après préparation, le mélange réactionnel (réactif B +C) doit être utilisé immédiatement ou peut être conservé pendant **1h à 4°C**.

2.3 Répartir **45 µl** de ce mélange réactionnel par puits, selon le plan de plaque défini.

Ajouter **5 µl** d'échantillon ou de réactif **D** (contrôle négatif) ou de réactif **E** (contrôle positif).

Sceller de façon hermétique les puits de la plaque ou des barrettes avec les capuchons ou le film optique.

Il est important d'éviter la présence de bulles au fond des puits en pipetant précautionneusement. Pour éliminer des bulles, centrifuger brièvement la plaque scellée ou les barrettes PCR.

2.4 Placer la plaque ou les barrettes PCR dans le thermocycleur.
S'assurer de leur bonne orientation (puits A1 en haut à gauche).
Fermer le module réactionnel.

3. Lancement de la réaction d'amplification

Pour le lancement de la PCR, consulter le manuel utilisateur du thermocycleur Bio-Rad pour les kits iQ-Check.

D. Analyse des données

L'analyse des données peut être réalisée directement à la fin de la réaction d'amplification ou ultérieurement en re-ouvrant le fichier de données. Pour ouvrir des fichiers de données et régler les paramètres d'analyse consulter le manuel utilisateur du thermocycleur Bio-Rad pour les kits iQ-Check.

1. Interprétation des résultats :

Pour obtenir les résultats de l'analyse, il suffit de lire les valeurs de Ct (cycle à partir duquel la fluorescence s'élève significativement au-dessus du bruit de fond), une fois réglé les paramètres d'analyse.

Il est également possible d'utiliser le logiciel iQ-Check Analysis (réf. 359-3135) pour une interprétation automatisée et l'impression d'un rapport complet (Cf. Notice d'utilisation de iQ-Check Analysis). Le logiciel Opticon Monitor permet une analyse complète pour les systèmes Chromo4™ et MiniOpticon™ (Cf. Manuel utilisateur du Chromo4™ et MiniOpticon™ pour les kits iQ-Check, Réf : 93269, Rev. C. Le logiciel CFX Manager™ IDE permet une analyse automatisée complète pour les systèmes CFX96™ et MiniOpticon™, Réf : 93893b V1.0 Rev A.

1.1 Contrôles :

Avant l'interprétation finale des résultats il est nécessaire de vérifier les résultats des contrôles négatifs et positifs.

Pour que le test soit valide, les résultats des contrôles négatifs et positifs doivent être les suivants :

	Détection de <i>Listeria monocytogenes</i> (FAM)	Détection du contrôle interne
Contrôle négatif	Ct = N/A*	$28 \leq Ct \leq 40$
Contrôle positif	$26 \leq Ct \leq 36$	Non significatif

* N/A signifie « Not Applicable ». Le logiciel indique N/A pour le Ct d'un échantillon quand la courbe de fluorescence ne croise pas le seuil.

Si les résultats des contrôles positifs et négatifs sont différents de ceux décrits dans le tableau ci-dessus, il est nécessaire de recommencer la PCR.

1.2 Echantillons :

Un échantillon est considéré **positif** pour *Listeria monocytogenes* si une valeur de Ct ≥ 10 est obtenue pour le fluorophore FAM.

Si une valeur inférieure à 10 est obtenue, vérifier que la courbe en temps que donnée brute montre un aspect caractéristique d'amplification exponentielle (ligne de base plate, puis augmentation régulière de la fluorescence, suivi par un plateau). Si la courbe observée est correcte, on peut considérer l'échantillon positif pour la présence de *Listeria monocytogenes*.

Si aucune valeur n'est obtenue pour le Ct_{FAM} (Ct = N/A), ou si la courbe observée n'est pas caractéristique, l'interprétation du résultat dépend de la valeur du contrôle interne :

- Un échantillon est considéré **négatif** pour *Listeria monocytogenes* si aucune valeur de Ct n'est obtenue pour le fluorophore FAM (Ct_{FAM}=N/A) et le Ct pour le contrôle interne est supérieur ou égal à 28.
- Une valeur N/A pour le Ct du contrôle interne indique, lorsque son Ct en FAM est également N/A, qu'un phénomène d'inhibition de la réaction de PCR a probablement eu lieu. Dans ce cas, l'échantillon d'ADN doit être dilué au 1/10, en eau distillée stérile, puis soumis à une nouvelle PCR. (cf. partie VII.B. Extraction des acides nucléiques).
- Si le Ct pour le contrôle interne est inférieure à 28 il n'est pas possible d'interpréter le résultat. Vérifier que le seuil a été correctement placé ou que la courbe brute montre un aspect caractéristique d'amplification exponentielle. Si la courbe observée n'est pas correcte, il sera nécessaire de répéter le test PCR pour cet échantillon.

Interprétation des résultats obtenus sur les échantillons :

Détection de <i>Listeria monocytogenes</i> (FAM)	Détection du contrôle interne	Interprétation
Ct ≥ 10	Non significatif	Positif
Ct = N/A	Ct ≥ 28	Négatif
Ct = N/A	Ct = N/A	Inhibition**

** : En cas de valeur nulle pour un échantillon et son contrôle interne (Ct = N/A), l'analyse doit être renouvelée avec l'échantillon d'ADN dilué au 1/10.

VIII. CONFIRMATION DES RESULTATS POSITIFS

Dans le cadre de la certification NF VALIDATION, , tous les résultats positifs iQ-Check *Listeria monocytogenes* II devront être confirmés de l'une des manières suivantes :

- 1 - Mise en oeuvre des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO à partir de colonies (en incluant l'étape de purification).
Pour effectuer la confirmation, il faut repartir du bouillon d'enrichissement, lors de l'utilisation du Fraser demi.
- 2 - Utilisation du milieu chromogénique RAPID'*L.mono*. Isoler 100 µl de bouillon enrichi (Fraser 1/2 ou LSB) sur RAPID'*L.mono*. La présence de colonies caractéristiques de *Listeria monocytogenes* suffit à confirmer la présence de *Listeria monocytogenes*.
- 3 - Utilisation de toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION de principe différent de la PCR utilisée par iQ-Check *Listeria monocytogenes* II. Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble. La confirmation s'effectuera à partir du bouillon d'enrichissement, lors de l'utilisation du Fraser demi, cette étape étant commune aux deux méthodes.

En cas de résultats discordants entre iQ-Check *Listeria monocytogenes* II et l'une des options de confirmation décrites ci-dessus, le laboratoire devra mettre en oeuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

Il est possible de conserver le bouillon d'enrichissement entre +2°C et +8°C, Fraser demi pendant 48 h et LSB pendant 72 h maximum, suivant la fin de l'incubation à 30°C, avant de procéder aux confirmations.

Dans le cadre de la validation AOAC-RI, un résultat positif avec iQ-Check *Listeria monocytogenes* II est considéré présomptif et il est recommandé de le confirmer par la méthode de référence USDA MLG (disponible en ligne à http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_8_05.pdf) ou la méthode de référence FDA BAM (disponible en ligne à

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071400.htm>), selon l'échantillon utilisé.

IX. PROTOCOLE DE CONFIRMATION A PARTIR DE COLONIES ISOLEES

Il est possible d'utiliser le kit iQ-Check *Listeria monocytogenes* pour la confirmation de colonies isolées sur gélose, tel que RAPID'L.mono.

1. Piquer une colonie isolée, à partir d'un milieu sélectif ou non, à l'aide d'un cure-dent ou d'une öse de 1 µl, ou autre consommable adapté (cône pipette par exemple).
2. Resuspendre la colonie dans 100 µl de tryptone sel ou eau distillée stérile dans un tube de type Eppendorf. Bien homogénéiser la suspension à l'aide d'un vortex.
3. Intégrer 5 µl du surnageant dans 45 µl du mélange réactionnel PCR (Cf. partie VII.C PCR en temps réel) et suivre le reste de la méthode iQ-Check *Listeria monocytogenes* pour l'obtention et l'interprétation des résultats.

X. PERFORMANCES DU TEST ET VALIDATIONS

Le kit iQ-Check *Listeria monocytogenes* Il est spécifique pour la détection de *Listeria monocytogenes*. Il est possible de détecter de 1 à 10 UFC/25 g d'échantillon selon l'enrichissement recommandé.

NF VALIDATION



BRD 07/10 – 04/05

Méthodes alternatives d'analyse
pour l'agroalimentaire
<http://nf-validation.afnor.org>

iQ-Check *Listeria monocytogenes* Il est certifié NF VALIDATION comme méthode alternative à la norme de référence NF EN ISO 11290-1/A1 (2005), pour la détection des *Listeria monocytogenes* pour tous produits d'alimentation humaine et les échantillons d'environnement. Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, les prises d'essai supérieures à 25 g n'ont pas été testées. La validation a suivi le protocole de la norme NF EN ISO 16140 : 2003 et inclut l'utilisation du Chromo4™, du MiniOpticon™, de l'iQ™5, de l'iCycler iQ™ et du CFX96™. Les logiciels associés sont l'Opticon Monitor (V3.1 et suivantes), l'iCycler iQ™ Optical system software (V2.0 et suivantes), l'iQ™5 Optical system software (V1.0 et suivantes) et le CFX Manager IDE (V1.0 et suivantes). N° d'attestation : BRD 07/10 – 04/05.

Fin de validité : se referer à l'attestation disponible sur le site web de AFNOR Certification.

Validation AOAC-RI



iQ-Check *Listeria monocytogenes* II (protocole simplifié) est validé par AOAC-Research Institute selon le programme Performance Tested Method pour la détection de *Listeria monocytogenes* dans le blanc de dinde, hot dogs, saumon fumé, et fromage blanc. Un résultat positif avec iQ-Check est considéré présomptif et il est recommandé de confirmer le résultat par les méthodes de références. (cf 3, 4 et 5, partie XI.). Attestation n° 010802.

NordVal Validation



iQ-Check *Listeria monocytogenes* II est validé par NordVal pour :

- Enrichissement en Faser 1/2 suivi du protocole de lyse Standard
- Enrichissement en Listeria Specific Broth (LSB) suivi du protocole de lyse Standard
- Enrichissement en Listeria Specific Broth (LSB) suivi du protocole d'extraction simplifié, ne nécessitant plus la première étape de centrifugation. Certificate number: 037. Fin de validité: se referer au certificat disponible sur le site web de NordVal : <http://www.nmkl.org/NordVal/NordValMetoder.htm>

X. BIBLIOGRAPHIE

- 1 - Mengaud, J., Vicente, M.F., Chenevert, J., Pereira, J.M., Geoffrey, C., Gicquel-Sanzey, B., Baquero, F., Perez-Diaz, J.C. and Cossart, P. 1988. Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the lysteriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. Infection and Immunity, 56, 766-772.
- 2 - Norme ISO 11290-1. Microbiologie des aliments - méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Partie 1 – Méthode de recherche. 2004.
- 3 - AOAC International. AOAC Official Method 993.12 – *Listeria monocytogenes* in Milk and Dairy Products – Selective Enrichment and Isolation Method (Final Action 1996).

- 4 - United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. Microbiology Laboratory Guidebook – Chapter 8.05. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples (August 1, 2006). Available online at www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_8_05.pdf.
- 5 - United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Bacteriological Analytical Manual - Chapter 10. *Listeria monocytogenes* (January 2003). Online at <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>

Avis concernant l'acheteur : licence limitée

L'utilisation de ce produit est couverte par un ou plusieurs des brevets US suivants et les revendications de brevet correspondantes hors Etats-Unis : 5 079 352, 5 789 224, 5 618 711, 6 127 155, 5 677 152 (revendications 1 à 23 seulement) et 5 773 258 (revendications 1 et 6 seulement) et par les revendications hors Etats-Unis correspondant au brevet US n° 4 889 818. L'achat de ce produit comprend une immunité de poursuite restreinte et non transférable selon les revendications de brevet précédentes lorsque cette quantité de produit est uniquement utilisée à des fins d'analyse alimentaire, d'analyse environnementale et en microbiologie industrielle, y compris la publication des résultats des activités de l'acheteur moyennant paiement ou toute autre contrepartie commerciale, et lorsqu'elle est également utilisée aux fins des propres recherches de l'acheteur. Aucun droit selon une quelconque revendication de brevet (comme les revendications de la méthode 5'-nucléase dans les brevets US n° 5 210 015 et 5 487 972) n'est expressément cédé, que ce soit par implication ou par préclusion. De plus amples informations concernant l'achat de licences peuvent être obtenues en contactant le Directeur des Licences, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, Californie, 94404, Etats-Unis.

ANNEXE A - Tableau de Pipetage

Utiliser ce tableau pour trouver les quantités nécessaire de réactif B et réactif C pour préparer le mélange réactionnel. Le “nombre d'échantillons” inclut les contrôles positif et négatif.

Nombre d'échantillons	Sondes fluorescentes (µl) Réactif B	Mix PCR (µl) Réactif C
1	5	40
2	11	86
3	16	130
4	22	173
5	27	216
6	32	259
7	38	302
8	43	346
9	49	389
10	54	432
11	59	475
12	65	518
13	70	562
14	76	605
15	81	648
16	86	691
17	92	734
18	97	778
19	103	821
20	108	864
21	113	907
22	119	950
23	124	994
24	130	1000
25	135	1100
26	140	1100
27	146	1200
28	151	1200
29	157	1300
30	162	1300
31	167	1300
32	173	1400
33	178	1400
34	184	1500
35	189	1500
36	194	1600
37	200	1600
38	205	1600
39	211	1700
40	216	1700
41	221	1800
42	227	1800
43	232	1900
44	238	1900
45	243	1900
46	248	2000
47	254	2000
48	259	2100

Nombre d'échantillons	Sondes fluorescentes (µl) Réactif B	Mix PCR (µl) Réactif C
49	265	2100
50	270	2200
51	275	2200
52	281	2200
53	286	2300
54	292	2300
55	297	2400
56	302	2400
57	308	2500
58	313	2500
59	319	2500
60	324	2600
61	329	2600
62	335	2700
63	340	2700
64	346	2800
65	351	2800
66	356	2900
67	362	2900
68	367	2900
69	373	3000
70	378	3000
71	383	3100
72	389	3100
73	394	3200
74	400	3200
75	405	3200
76	410	3300
77	416	3300
78	421	3400
79	427	3400
80	432	3500
81	437	3500
82	443	3500
83	448	3600
84	454	3600
85	459	3700
86	464	3700
87	470	3800
88	475	3800
89	481	3800
90	486	3900
91	491	3900
92	497	4000
93	502	4000
94	508	4100
95	513	4100
96	518	4100

In the United States, for technical assistance, please call (800) 4BIORAD. Select option 2 for technical support and option 2 again for the Food Science Division. To place an order, please call (800) 4BIORAD and press option 1 for customer service. Orders can also be faxed to (800) 879-2289.

Bio-Rad Laboratories

2000 Alfred Nobel Drive Hercules

California 94547 - USA

Toll-Free Phone: 1-(800) 424-6723

Fax: (510) 741-5800



Rev. F - 02/2015

Code: 808464