iQ-Check® *Listeria* spp. Kit

Cat #: 357-8113

User Guide

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

BIO-RAD

TABLE OF CONTENTS

I. Introduction

II. The iQ-Check *Listeria* spp. 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: PCR Mix Calculation Guide

 © Bio-Rad

I. INTRODUCTION

Conventional bacteriological methods are often long and tedious. In comparison, iQ-Check *Listeria* spp. is a simple and rapid qualitative test, allowing the detection of specific DNA sequences unique to *Listeria* spp. found in environmental samples and food products. Using real-time polymerase chain reaction (PCR), *Listeria* spp. 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 intended users of this kit are trained laboratory personnel who are performing tests to detect *Listeria* spp. The use of this test allows results to be obtained within a few hours following enrichment of a sample.

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

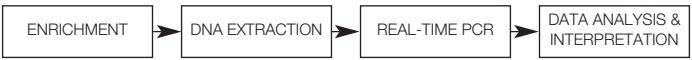
The iQ-Check *Listeria* spp. kit is a test based on gene amplification and detection by real-time PCR. Ready-to-use PCR reagents contain oligonucleotides (primers and probes) specific for *Listeria* spp., as well as DNA polymerase and nucleotides. Detection and data analysis are optimized for use with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

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; FAM is the fluorophore linked to the probe hybridizing to the *Listeria* spp. specific DNA sequence. In the absence of target DNA, no fluorescence will be detected. As the amount of amplicons increases with each round of amplification, fluorescence intensity also increases. During each PCR cycle, at the annealing step, the optical module or detector measures this fluorescence, whereas the associated software plots the fluorescence intensity versus number of cycles. This method allows a simple determination of the presence, or absence, of *Listeria* spp. in a sample.

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* spp. target DNA sequence, and detected by a second fluorophore. It allows for the validation of any negative result.

This test allows the detection of *Listeria* spp. in environmental samples and food products previously enriched by culture in *Listeria* Special Broth (LSB). It includes the following 4 main steps:



III. KIT COMPONENTS

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

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)

IV. SHELF LIFE AND STORAGE

Once received, the kit must be stored between +2°C and +8°C. Reagents stored between at this temperature 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

- Stomacher® masticator or equivalent for homogenizing test samples.
- Incubator for sample microbiological enrichment.
- Specific for extraction in 1.5 ml tube
  - Bench top centrifuge (max. 10,000-12,000 g).
  - Dry heat block (100°C ± 5°C).
  - Cell Disruptor, such as a “Disruptor Genie”* (Scientific Industries).
- Specific for extraction in deepwell plate
  - Centrifuge with rotor for 96-wells plates (max 2,250 g).

- Dry heat block (100°C ± 5°C).
- or agitator-incubator for deepwell plates, such as a “Thermomixer” (Eppendorf).

- Vortex apparatus.
- Magnetic stir plate.
- 20 µl, 200 µl and 1000 µl micropipettes.
- Combitip pipettes or equivalent repeat pipettors.
- Bio-Rad real-time PCR system, eg Chromo4, MiniOpticon, CFX96 or CFX96 Deep Well systems.
  See real-time PCR system user guide for iQ-Check kits (Chromo4, #93269 Rev D - iQ™5, #93270 Rev A - iCycler iQ™, #93271 Rev A - CFX96/MiniOpticon, #93893b V1.1 Rev B and later).
- Bio-Rad iQ-Check Prep System for automated DNA extraction and PCR plate set-up.

* 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

- Enrichment medium LSB, Bio-Rad cat. #: 355-5703, 225 ml x 6 bottles; 356-4703, 500 g; 355-5793, 2 x 5 L ; 356-4753, 5 kg.
- Stomacher bag with incorporated filter.
- Environmental swabs.
- Environmental sponges.
- Neutralizing broth for sponges and swabs, such as Dey-Engley (D/E).
- Specific for extraction in tube
  - 1.5 ml conical screwcap sterile tubes (Eg. Bio-Rad cat.#: 224-0110).
- Specific for extraction in deepwell plate
  - 1 ml deepwell plate, Bio-Rad cat. #: 359-0132.
  - Plastic sealing film, Bio-Rad cat.#: 359-0139.
  - Pre-pierced sealing film, such as “X-Pierce™ Sealing Films”, Bio-Rad cat #: 360-0040, for North America only; cat #. 359-3977, x100.
- Specific for Standard extraction protocol
  - 200 µl wide opening tips.
- RAPID’*Listeria* spp. Agar*, Bio-Rad cat. #: 356-3950, 90 mm x 20 dishes; 356-4744, 500 g plus supplement 1 (10 bottles, cat #. 356-4745) and supplement 2 (10 bottles, cat #. 356-4746).

- RAPID'*L.mono* Agar*, Bio-Rad cat. #: 356-3694, 90 mm x 20 dishes; 355-5294, Kit for 190 ml agar plus 2 supplements.
- For PCR plates, tubes and sealing tape and cap, see real-time PCR system user guide for iQ-Check kits.
- 1 ml and 10 ml pipettes.
- Sterile filter tips, adaptable to 20 µl, 200 µl and 1000 µl micropipettes.
- Tips for Combitip pipettes or equivalent repeat pipettor, 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 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 (for example the EN ISO 7218 standard), 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 and writing 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.

Enrichment conditions are detailed hereafter. DNA extraction can be performed according to two protocols:

- The Easy protocol requires a 100 µl sample volume and can be processed in deepwell plate.
- The Standard protocol requires a 1.5 ml sample volume.

Both protocols include a grinding step.

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

Scope (matrices)	Enrichment	DNA extraction		Certification
		method	format	
All food products and environmental samples	LSB 23 h ± 1 h 30°C	Standard	Tube	NF VALIDATION
All food products and environmental samples	LSB 25 h ± 1 h 30°C	Easy	Tube Deepwell	NF VALIDATION
Stainless steel, plastic, ceramic, sealed concrete, liver pate, hot dogs, raw fermented sausage, slices deli turkey, sliced deli ham	LSB 25 h ± 1 h 30°C	Easy	Tube Deepwell	AOAC-RI
Heat processed RTE meat and poultry and all environmental surfaces	LSB 25 h ± 1 h 30°C	Easy	Tube Deepwell	Health Canada

A. Sample Enrichment

Enrichment media must be at the appropriate incubation temperature (30°C) before use.

Homogenize n g of sample in 9 x n ml of pre-heated LSB (for example 25 g in 225 ml), in a stomacher bag with incorporated filter.
Note: within the scope of the NF VALIDATION mark, test portions weighing more than 25 g have not been tested.

Incubate, without shaking, for times and temperatures indicated in the table above.

Further information:

- Within the scope of the NF VALIDATION certified method 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.

- In the AOAC-RI approved method for environmental sponges, homogenize sponge in 225 ml LSB by stomaching for 2 minutes; for environmental swabs, vortex swab in 10 ml LSB.

- In the Health Canada approved method for environmental sponges, homogenize sponge in 100 ml LSB by stomaching for 2 minutes; for environmental swabs, vortex swab in 10 ml LSB.

B. DNA Extraction

General recommendations:

- Before starting the test, turn on the heat block to preheat it and set it to 95°C - 100°C.
- In general, avoid shaking the enrichment bag and collecting large fragments of food debris. For food samples with a fatty supernatant, collect the sample just below this layer.
- Open tubes and wells carefully to avoid any possible cross contamination.
- Cool the deepwell plate before pipetting directly through the pre-pierced sealing film.
- Gently shake the lysis reagent by hand first to resuspend the resin. Then pipette while it is stirring at medium speed with the magnetic bar contained in the bottle, in order to keep it in suspension.
- Reconstitute the final lysis reagent as follows:
  - Carefully pour all the contents from reagent F (lysis beads) into reagent A (lysis reagent);
  - Use consumables with a wide enough tip to allow pipetting of the homogenized 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 - Collect 1.5 ml of decanted, enriched sample into a tube.
2 - Centrifuge at 10,000-12,000 g for 5 minutes. Discard all the supernatant.
3 - 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 resin.
4 - Resuspend pellet by pipetting the reagent up and down in the tube.
5 - Place tube in the Cell Disruptor for 3 min ± 1min.
6 - Incubate tube in the heat block at 95°C - 100°C for 15 minutes.
7 - Vortex at high speed.
8 - Centrifuge at 10,000-12,000 g for 5 minutes.

If you choose to temporarily stop the procedure, this is the recommended stopping point.
The supernatant can be stored for up to 1 year at -20°C. Before reusing it, always allows it to thaw, homogenize, and then centrifuge at 10,000-12,000 g for 5 minutes.

Easy protocol
1 - Aliquote 100 µl of homogenized lysis reagent (reagents A + F) to tubes or wells of a deepwell plate.
Note: Gently shake the lysis reagent by hand first to resuspend the resin.
2 - Add 100 µl of decanted, enriched sample. Mix by pipetting up and down and close the tubes or seal the deepwell plate with the pre-pierced sealing film.
3 - Place tubes in the Cell Disruptor for 3 min ± 1min (tubes only).
4 - Incubate tubes in the heat block at 95°C - 100°C for 15 minutes or deepwell plate in the plate agitator-incubator under agitation at 1,300 rpm, at 95°C - 100°C for 15 to 20 minutes.
5 - For tubes only, vortex at high speed, centrifuge at 10,000-12,000 g for at least 2 minutes. Centrifugation is not needed for deepwell plates.

If you choose to temporarily stop the procedure, this is the recommended stopping point.
The supernatant can be stored for up to 1 year at -20°C. Before reusing it, always allows it to thaw, homogenize, and then centrifuge tubes at 10,000-12,000 g for 5 minutes.

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**) depending on the number of samples and controls to analyze (at least one positive and one negative control must be included in each PCR run). Use the pipetting table in appendix to find the correct volumes to use for each reagent.

2.2 After preparation, the PCR mix (reagent B + C) must be used immediately or stable for **1 hour maximum at 2°C-8°C**.

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

2.4 Add **5 µl** of sample or reagent **D** (negative control) or reagent **E** (positive control). Do not vortex the sample before pipetting. Seal hermetically the wells of the plate or strips. 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).

2.5 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 the data analysis parameters have been set, results are interpreted by analyzing the Cq 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 system (see Chromo4 User Guide for iQ-Check kits, #93269, Rev D). The CFX Manager™ IDE allows a complete automated analysis for the CFX96 and the Mini Opticon (#93893b V1.1 Rev B and later).

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.

	***Listeria* spp. detection (FAM)**	**Internal Control detection**
Negative control	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Positive control	26 ≤ Cq ≤ 36	Not significant

* The software indicates a Cq 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.

If results of negative and positive controls differ from those in the table above, it is necessary to repeat the PCR.

1.2 Samples

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

If the Cq 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* spp. sample.

If there is no Cq value (Cq=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* spp. sample if there is no Cq value in FAM, and the internal control has a Cq ≥ 28.
- Should the internal control also not have a Cq value (Cq = N/A), this probably indicates an inhibition of the PCR reaction. The sample needs to be diluted (perform a 1/10 dilution in distilled sterile water using 10 µl of DNA extract, then use 5 µl of the dilution for amplification), and the PCR repeated.
- Should the Cq 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:

***Listeria* spp. detection (FAM)**	**Internal control detection**	**Interpretation**
Cq ≥ 10	Not significant	Positive
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negative
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition**

** When both *Listeria* spp. and internal control detection give a Cq 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* spp. results need to be confirmed in one of three ways:

1. Using classic tests described in the standardized methods CEN or ISO.
2. By isolation (streaking 100 µl) on the chromogenic medium RAPID'*Listeria* spp. or RAPID'*L.mono*. The protocol for these validated chromogenic methods used for confirmation should start from the LSB enrichment broth. The presence of characteristic *Listeria* spp. colonies is sufficient to confirm the presence of *Listeria* spp.
3. Using any other method certified by NF VALIDATION based on a principle different from that used in the iQ-Check *Listeria* spp. PCR test. The validated protocol of this second method must be followed entirely.

In the event of results that are not in agreement, between iQ-Check *Listeria* spp. 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 LSB at 2-8°C, for 72 hours maximum following the incubation at 30°C, before carrying out the confirmation.

IX. CONFIRMATION OF SINGLE COLONIES USING iQ-Check

iQ-Check *Listeria* spp. may also be used for confirming single isolated *Listeria* spp. colonies on agar plates.

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* spp. protocol for the data and result interpretation.

X. TEST PERFORMANCES AND VALIDATIONS

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

BRD 07/13 – 05/07

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

NF VALIDATION

iQ-Check *Listeria* spp. is certified NF VALIDATION as an alternative method to the reference method NF EN ISO 11290-1/A1 (2005), for the detection of *Listeria* spp. in all products for human consumption and environmental samples. The validation followed the protocol of the NF EN ISO 16140: 2003 standard, and includes the use of the iCycler iQ, Chromo4, iQ5, 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 iQ5 Optical system software (V1.0 and later) and the CFX Manager IDE (V1.0 and later). Certificate number: **BRD 07/13 – 05/07**. Valid until: refer to the certificate available on the AFNOR Certification website.

AOAC-RI Validation

iQ-Check *Listeria* spp. (Easy Protocol) has been validated by the AOAC-Research Institute under the Performance Tested Method Program for detection of *Listeria* spp. from stainless steel, plastic, ceramic, sealed concrete , liver paté, hot dogs, raw fermented sausage, sliced dely turkey, and sliced dely ham. A positive result with iQ-Check should be considered presumptive and it is recommended it be confirmed by standard reference methods. (See reference 2 in section XI.). Certificate # : 090701.

Health Canada Validation

iQ-Check *Listeria* spp. (Easy Protocol) has been validated by Health Canada (MFLP-39) for detection of *Listeria* spp. from all environmental surfaces and heat processed RTE meat and poultry. A positive result with iQ-Check should be considered presumptive and must be confirmed according to MFHPB-30 (see reference 1 in section XI).

XI. REFERENCES

1 - Health Canada, Health Products and Food Branch (2010) *Compendium of Analytical Methods*, MFHPB – 30, Online at http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/res-rech/mfhpb30-eng.pdf

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 - USDA FSIS Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 8.05, Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples.
Online at www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_8_06.pdf. February 19, 2008

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 - 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 (µl)	Amplification mix Reagent C (µl)	Total number of samples & controls	Probes - Reagent B (µl)	Amplification mix Reagent C (µl)
1	5	40	49	265	2100
2	11	86	50	270	2200
3	16	130	51	275	2200
4	22	173	52	281	2200
5	27	216	53	286	2300
6	32	259	54	292	2300
7	38	302	55	297	2400
8	43	346	56	302	2400
9	49	389	57	308	2500
10	54	432	58	313	2500
11	59	475	59	319	2500
12	65	518	60	324	2600
13	70	562	61	329	2600
14	76	605	62	335	2700
15	81	648	63	340	2700
16	86	691	64	346	2800
17	92	734	65	351	2800
18	97	778	66	356	2900
19	103	821	67	362	2900
20	108	864	68	367	2900
21	113	907	69	373	3000
22	119	950	70	378	3000
23	124	994	71	383	3100
24	130	1000	72	389	3100
25	135	1100	73	394	3200
26	140	1100	74	400	3200
27	146	1200	75	405	3200
28	151	1200	76	410	3300
29	157	1300	77	416	3300
30	162	1300	78	421	3400
31	167	1300	79	427	3400
32	173	1400	80	432	3500
33	178	1400	81	437	3500
34	184	1500	82	443	3500
35	189	1500	83	448	3600
36	194	1600	84	454	3600
37	200	1600	85	459	3700
38	205	1600	86	464	3700
39	211	1700	87	470	3800
40	216	1700	88	475	3800
41	221	1800	89	481	3800
42	227	1800	90	486	3900
43	232	1900	91	491	3900
44	238	1900	92	497	4000
45	243	1900	93	502	4000
46	248	2000	94	508	4100
47	254	2000	95	513	4100
48	259	2100	96	518	4100

iQ-Check® *Listeria* spp. Kit

Réf. : 357-8113

Notice d'utilisation

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

BIO-RAD

SOMMAIRE

I. Introduction

II. La technologie iQ-Check *Listeria* spp.

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 avec iQ-Check

X. Performances du test et validations

XI. Bibliographie

ANNEXE : Tableau de pipetage

I. INTRODUCTION

Face à la méthode bactériologique traditionnelle souvent longue et coûteuse, la méthode iQ-Check *Listeria* spp. est un test qualitatif permettant la détection spécifique de *Listeria* spp. dans les produits alimentaires et les échantillons d'environnement par la technique de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel. Une séquence d'ADN spécifique de *Listeria* spp. 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* spp. La mise en œuvre de ce test permet l'obtention d'un résultat en quelques heures après l'enrichissement d'un échantillon.

II. LA TECHNOLOGIE iQ-Check *Listeria* spp.

Ce test repose sur l'amplification et la détection d'un gène par la technique de PCR en temps réel. Les réactifs PCR, prêts à l'emploi, contiennent des oligonucléotides (amorces et sondes) spécifiques de *Listeria* spp. ainsi que de l'ADN polymérase et les nucléotides. 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™.

La PCR est une technique puissante utilisée pour générer un grand nombre de copies d'un ADN cible. Pendant la réaction de PCR, la succession de cycles de chauffage et refroidissement permet la dénaturation de l'ADN, par la chaleur, suivie de l'hybridation des amorces à la région ciblée. La Taq polymérase permet ensuite l'extension de l'ADN en utilisant ces amorces et les désoxynucléotides triphosphates (dNTPs), créant des copies de l'ADN ciblé. Ces copies sont appelées amplicons.

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* spp. est marquée par le fluorophore FAM. En l'absence de l'ADN cible, aucune fluorescence ne sera détectée. L'intensité de fluorescence augmente proportionnellement à l'augmentation d'amplicons dans le tube de PCR. A chaque cycle PCR, lors de l'étape d'hybridation, 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* spp. 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* spp., mais est détecté par une sonde marquée avec un deuxième fluorophore. Il sert à valider tout résultat négatif.

Ce test permet la détection de *Listeria* spp. dans tous les produits d’alimentation humaine et échantillons d’environnement préalablement enrichis par culture en bouillon spécifique (LSB). La méthode est composée des étapes suivantes :

III. COMPOSITION DU KIT

Le kit iQ-Check *Listeria* spp. contient la quantité de réactif nécessaire pour 96 réactions.

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)

IV. VALIDITÉ ET CONSERVATION

Dès réception, le kit doit être conservé entre +2°C et +8°C. Chaque réactif conservé à cette température 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

Equipement

- Stomacher®, homogénéiseur ou équivalent.
- Etuve pour l’enrichissement microbiologique des échantillons.
- Spécifique pour l’extraction en tube 1,5 ml.
  - Centrifugeuse de paillasse (max. 10.000 à 12.000 g).
  - Bloc chauffant (100°C ± 5°C).
  - Agitateur vibrant, tel que “Disruptor Genie” (Scientific Industries).

- Spécifique pour l'extraction en plaque deepwell
  - Centrifugeuse avec rotor pour plaque 96 puits (max 2.250 g).
  - Bloc chauffant (100°C ± 5°C).
  - ou agitateur-incubateur pour plaques DeepwellI, tel que le "Thermomixer" (Eppendorf).
- Vortex.
- Agitateur magnétique.
- Micropipettes de 20 µl, 200 µl et 1000 µl.
- Multi-distributeur tel que combitip pipettes.
- Thermocycleur Bio-Rad pour la PCR en temps réel, tel que Chromo4, MiniOpticon, CFX96 ou CFX96 Deep Well.
  Cf. manuel utilisateur du thermocycleur Bio-Rad pour les kits iQ-Check (Chromo4 Réf. : 93269, Rev. D - iQ™5 Réf. : 93270, Rev. A - iCycler iQ™ Réf. : 93271, Rev. A - CFX96/MiniOpticon, Réf : 93893b, V1.1 Rev B et versions ultérieures).
- Bio-Rad iQ-Check Prep System pour l'extraction automatisée de l'ADN.

* 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

- Milieu d'enrichissement spécifique LSB, Réf Bio-Rad : 355-5703, 225 ml x 6 flacons; 356-4703, 500 g; 355-5793, 2 x 5 L ; 356-4753, 5 kg.
- Sac à stomacher avec filtre incorporé.
- Eponges d'environnement.
- Spécifique pour l'extraction en tube
  - Tubes à vis coniques de 1,5 ml, stériles, (Exemple Réf. Bio-Rad : 224-0110).
- Spécifique pour l'extraction en plaque deepwell
  - Plaques deepwell 1 ml, Réf. Bio-Rad : 359-0132.
  - Film plastique, Réf. Bio-Rad : 359-0139.
  - Films pré-percés, tels que les films "X-Pierce™ Sealing Films", Réf. Bio-Rad : 360-0040, pour l'Amérique du Nord uniquement ; 359-3977, x100.
- Spécifique pour le protocole d'extraction Standard
  - Embouts de 200 µL, à large ouverture.
- Gélose RAPID'*Listeria* spp.* Réf Bio-Rad : 356-3950 pour 90 mm x 20 boites; 356-4744 pour 500 gr plus supplément 1 (10 flacons, Réf. : 356-4745) et supplément 2 (10 flacons, Réf. : 356-4746).
- Gélose RAPID'*L.mono* *, Réf Bio-Rad : 356-3694, 90 mm x 20 boîtes; 355-5294, Kit pour 190 ml agar plus 2 suppléments.

- Pour les plaques et tubes PCR, et film et capuchons faire référence au manuel utilisateur du thermocycleur Bio-Rad pour les kits iQ-Check.
- Pipettes de 1 ml et 10 ml.
- Embouts à filtre stériles, adaptables sur les micropipettes de 20 µl, 200 µl et 1000 µl.
- Pointes pour Combitip ou multi-distributeur stériles à emballage individuel.
- Tubes stériles de 2 ml et de 5 ml.
- Ecouvillons.
- Bouillon neutralisant pour éponges et écouvillons d'environnement, tel que Dey-Engley (D/E).
- 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 règlementations 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 (par exemple, la norme EN ISO 7218), 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 un autre agent tel que DNA 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.

Les conditions d'enrichissement sont détaillées ci-après. L'extraction d'ADN peut être effectuée selon deux protocoles :

• Le protocole Simplifié nécessite un volume d'échantillon de 100 µl et peut être effectué en plaque deepwell.
• Le protocole Standard nécessite un volume d'échantillon de 1.5 ml.

Les deux protocoles comportent une étape de broyage.

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

Domaine (matrices)	Enrichissement	Extraction ADN		Certification
		méthode	format	
Alimentation humaine et échantillons d'environnement	LSB 23 h ± 1 h 30°C	Standard	Tube	NF VALIDATION
Alimentation humaine et échantillons d'environnement	LSB 25 h ± 1 h 30°C	Simplifié	Tube Deepwell	NF VALIDATION
Surfaces environnementales : acier inoxydable, plastique, céramique, béton, pâté de foie, hot dogs, saucisse fermentée crue, blanc de dinde et tranche de jambon	LSB 25 h ± 1 h 30°C	Simplifié	Tube Deepwell	AOAC-RI
Viandes cuites prêtes à être consommées et toute surface environnementale	LSB 25 h ± 1 h 30°C	Simplifié	Tube Deepwell	Santé Canada

A. Enrichissement de l'échantillon
Les milieux d'enrichissement doivent être portés à la température d'incubation appropriée (30°C) avant utilisation.

Homogénéiser n g d'échantillon dans 9 x n ml de LSB préchauffé (par exemple 25 g dans 225 ml), dans un sac à stomacher avec filtre incorporé.
Remarque: dans le cadre de la marque NF VALIDATION, les prises d'essais supérieures à 25 g n'ont pas été testées.

Incuber, sans agitation, pendant les temps et températures indiqués dans le tableau ci-dessus.

Informations complémentaires :
- Dans le cadre de la méthode certifiée NF VALIDATION il est possible de réaliser le test iQ-Check à partir du LSB conservé à 2°C - 8°C jusqu'à 72 h maximum suivant la fin de l'enrichissement.

- Dans le cadre de la validation AOAC-RI pour les éponges d'environnement, il est préconisé d'homogénéiser dans 225 ml de LSB dans un sac stomacher pendant 2 minutes ; pour les écouvillons, vortexer l'écouvillon dans 10 ml de LSB.

- Dans le cadre de la validation Santé Canada pour les éponges d'environnement, il est préconisé d'homogénéiser dans 100 ml de LSB dans un sac stomacher pendant 2 minutes ; pour les écouvillons, vortexer l'écouvillon dans 10 ml de LSB.

B. Extraction des acides nucléiques

Recommandations générales :
- Avant le début de l'essai, allumer le bloc chauffant pour le préchauffer et le régler à 95°C - 100°C.
- En général, éviter d'agiter le sac d'enrichissement et de prélever de gros débris. Pour les aliments présentant une couche grasse surnageante, prélever juste en dessous de cette couche.
- Ouvrir les tubes et les puits avec précaution, pour éviter les risques de contaminations croisées.
- Refroidir la plaque deepwell avant de pipeter directement à travers le film pré-percé.

- Agiter doucement le flacon de réactif de lyse à la main afin de mettre en suspension les billes. Ensuite, lors du prélèvement, le réactif de lyse doit être homogénéisé à vitesse modérée au moyen du barreau magnétique contenu dans le flacon afin de maintenir le réactif de lyse en suspension.
- Reconstituer le réactif de lyse final :
  - Verser tout le contenu du réactif F (billes de lyse) dans le flacon du réactif A (tampon de lyse).
  - Utiliser des consommables adaptés avec une large ouverture pour un prélèvement homogène du réactif de lyse reconstitué.
  - 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 d'échantillon enrichi décanté dans un tube.
2 - Centrifuger à 10.000-12.000 g pendant 5 minutes. Eliminer le surnageant.
3 - Ajouter 250 µl du réactif de lyse homogénéisé (réactifs A + F) au culot obtenu.
Remarque : Agiter doucement le flacon de réactif de lyse à la main afin de mettre en suspension les billes.
4 - Mélanger par aspiration / refoulement avec la pipette.
5 - Agiter 3 min ± 1min avec l'agitateur vibrant tel que le "Disruptor Genie".
6 - Incuber le tube dans le bloc chauffant à 95°C - 100°C pendant 15 minutes.
7 - Vortexer à grande vitesse.
8 - Centrifuger à 10.000-12.000 g pendant 5 minutes.

Si vous souhaitez vous arrêter dans le protocole, cette étape est la plus appropriée.
Le surnageant peut être conservé jusqu'à un an à -20°C. Avant réutilisation, toujours laisser décongeler, homogénéiser puis centrifuger les tubes 5 minutes à 10.000-12.000 g.

Protocole simplifié

1 - Répartir 100 µl de réactif de lyse homogénéisé (réactifs A + F) dans des tubes ou dans les puits d'une plaque deepwell.
Remarque : Agiter doucement le flacon de réactif de lyse à la main afin de mettre en suspension les billes.
2 - Ajouter 100 µl d'échantillon enrichi décanté. Mélanger par aspiration / refoulement avec la pipette et fermer les tubes ou sceller la plaque deepwell avec un film pré-percé.
3 - Agiter 3 min ± 1min avec l'agitateur vibrant tel que le "Disruptor Genie" (tubes uniquement).

4 - Incuber les tubes à 95°C - 100°C pendant 15 minutes dans un bloc chauffant ou la plaque deepwell sous agitation à 1.300 rpm et à 95°C - 100°C pendant 15 à 20 min dans un agitateur-incubateur pour plaques.
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.

Si vous souhaitez vous arrêter dans le protocole, cette étape est la plus appropriée.
Le surnageant peut être conservé jusqu'à un an à -20°C. Avant réutilisation, toujours laisser décongeler, homogénéiser puis centrifuger les tubes 5 minutes à 10.000-12.000 g.

C. PCR en temps réel

1. Mise en marche de l'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 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 **1 h maximum à 2°C - 8°C**.
2.3 - Répartir **45 µl** de ce mélange réactionnel par puits, selon le plan de plaque défini.
2.4 - Ajouter **5 µl** d'échantillon ou de réactif **D** (contrôle négatif) ou de réactif **E** (contrôle positif). Ne pas vortexer l'échantillon avant de pipetter. Sceller de façon hermétique les puits de la plaque ou des barrettes. 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.

2.5 - 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 Cq (cycle à partir duquel la fluorescence s'élève significativement au-dessus du bruit de fond), une fois réglés 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 automatisée complète pour le système Chromo4 (Cf. Notice d'utilisation du Chromo4 pour les kits iQ-Check, Réf. : 93269, Rev. D). Le logiciel CFX Manager™ IDE permet une analyse automatisée complète pour les systèmes CFX96 et MiniOpticon (Réf. : 93893b V1.1 Rev B et versions ultérieures).

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 *Listeria* spp. (FAM)	**Détection du Contrôle Interne**
Contrôle négatif	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Contrôle positif	26 ≤ Cq ≤ 36	Non significatif

* N/A signifie "Not Applicable". Le logiciel indique N/A pour le Cq 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* spp. si une valeur de Cq ≥ 10 est obtenue pour le fluorophore FAM.

Si une valeur inférieure à 10 est obtenue, vérifier que la courbe, en tant 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* spp. Dans le cas contraire, l'interprétation du résultat dépend de la valeur du contrôle interne, comme il est expliqué dans les paragraphes qui suivent.

Si aucune valeur n'est obtenue pour le Ct_{FAM} (Cq = 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* spp. si aucune valeur de Cq n'est obtenue en FAM et le Cq pour le contrôle interne est ≥ 28.
- Si le contrôle interne aussi n'a aucune valeur de Cq (Cq = N/A), ceci indique qu'un phénomène d'inhibition de la réaction de PCR a probablement eu lieu. Dans ce cas, l'échantillon d'ADN doit être dilué (effectuer une dilution au 1/10, en eau distillée stérile en utilisant 10 µl d'extrait d'ADN, puis utiliser 5 µl de la dilution pour l'amplification), puis soumis à une nouvelle PCR.
- Si le Cq pour le contrôle interne est < 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 *Listeria* spp. (FAM)	**Détection du Contrôle Interne**	**Interprétation**
Cq ≥ 10	Non significatif	Positif
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Négatif
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition**

** : En cas de valeur nulle pour un échantillon et son contrôle interne (Cq = 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* spp. devront être confirmés de l'une des manières suivantes :

1. Mise en œuvre des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO.
2. Par isolement (étalement de 100 µl) sur le milieu chromogénique RAPID'*Listeria* spp. ou RAPID'L.*mono*. La présence de colonies caractéristiques de *Listeria* spp. après isolement du bouillon d'enrichissement LSB suffit à confirmer la présence de *Listeria* spp.
3. Utilisation de toute autre méthode certifiée NF VALIDATION de principe différent de la PCR utilisée par iQ-Check *Listeria* spp. Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble.

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

Pour toutes confirmations de résultats positifs, il est possible de conserver le bouillon d'enrichissement LSB entre +2°C et +8°C pendant 72h maximum suivant la fin de l'incubation à +30°C.

IX. PROTOCOLE DE CONFIRMATION A PARTIR DE COLONIES ISOLEES AVEC iQ-Check

Il est possible d'utiliser le kit iQ-Check *Listeria* spp. pour la confirmation de colonies isolées sur gélose.

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. Transférer 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* spp. pour l'obtention et l'interprétation des résultats.

X. PERFORMANCES DU TEST ET VALIDATIONS

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

BRD 07/13 – 05/07

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

NF VALIDATION

iQ-Check *Listeria* spp. est certifié NF VALIDATION comme méthode alternative à la norme de référence NF EN ISO 11290 – 1/A1 (2005) pour la détection des *Listeria* spp. pour tous produits d'alimentation humaine et les échantillons d'environnement. La validation a suivi le protocole de la norme NF EN ISO 16140 : 2003 et inclut l'utilisation du Chromo4, du MiniOpticon, de l'iQ5, 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'iQ5 Optical system software (V1.0 et suivantes) et le CFX Manager IDE (V1.0 et suivantes). N° d'attestation : BRD : **07/13 – 05/07**. Fin de validité : se référer à l'attestation disponible sur le site web de AFNOR Certification.

Validation AOAC-RI

iQ-Check *Listeria* spp. (protocole Simplifié) est validé par AOAC-Research Institute selon le programme Performance Tested Method pour la détection de *Listeria* spp. sur les surfaces d'acier inoxydable, en plastique, en céramique, en béton, pâté de foie, hot dogs, saucisse fermentée crue, blanc de dinde et tranche de jambon. Un résultat positif avec iQ-Check est considéré présomptif et il est recommandé de confirmer le résultat par les méthodes de références (cf. 2, partie XI). Attestation n° 090701.

Validation Santé Canada

iQ-Check *Listeria* spp. (protocole Simplifié) est validé par Santé Canada (MFLP-39) pour la détection de *Listeria* spp. sur toute surface environnementale et viandes cuites prêtes à être consommées. Un résultat positif avec iQ-Check *Listeria* spp. est considéré présomptif et il est recommandé de confirmer selon la méthode MFHPB-30 (cf. référence 2, paragraphe XI).

XI. BIBLIOGRAPHIE

1 - Norme ISO 11290-1. Microbiologie des aliments - méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Partie 1 – Méthode de recherche. 2004.

2- Santé Canada, Direction Générale des Produits de Santé et des Aliments (2010) *Compendium of Analytical Methods*, MFHPB – 30, En ligne : http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume3/mflp39-fra.php

3 - USDA FSIS Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 8.05, Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples. En ligne : www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_8_06.pdf. 19 février 2008

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 - 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)	Nombre d’échantillons	Sondes fluorescentes (µl) (réactif B)	Mix PCR (µl) (réactif C)
1	5	40	49	265	2100
2	11	86	50	270	2200
3	16	130	51	275	2200
4	22	173	52	281	2200
5	27	216	53	286	2300
6	32	259	54	292	2300
7	38	302	55	297	2400
8	43	346	56	302	2400
9	49	389	57	308	2500
10	54	432	58	313	2500
11	59	475	59	319	2500
12	65	518	60	324	2600
13	70	562	61	329	2600
14	76	605	62	335	2700
15	81	648	63	340	2700
16	86	691	64	346	2800
17	92	734	65	351	2800
18	97	778	66	356	2900
19	103	821	67	362	2900
20	108	864	68	367	2900
21	113	907	69	373	3000
22	119	950	70	378	3000
23	124	994	71	383	3100
24	130	1000	72	389	3100
25	135	1100	73	394	3200
26	140	1100	74	400	3200
27	146	1200	75	405	3200
28	151	1200	76	410	3300
29	157	1300	77	416	3300
30	162	1300	78	421	3400
31	167	1300	79	427	3400
32	173	1400	80	432	3500
33	178	1400	81	437	3500
34	184	1500	82	443	3500
35	189	1500	83	448	3600
36	194	1600	84	454	3600
37	200	1600	85	459	3700
38	205	1600	86	464	3700
39	211	1700	87	470	3800
40	216	1700	88	475	3800
41	221	1800	89	481	3800
42	227	1800	90	486	3900
43	232	1900	91	491	3900
44	238	1900	92	497	4000
45	243	1900	93	502	4000
46	248	2000	94	508	4100
47	254	2000	95	513	4100
48	259	2100	96	518	4100

NOTES

NOTES

 © Bio-Rad

NOTES

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, Inc.
2000 Alfred Nobel Drive
Hercules, California 94547 - USA
Toll-Free Phone: 1-(800) 424-6723
Fax: (510) 741-5800

Rev. F - 02/2015
Code: 808465