
iQ-Check *Listeria* *monocytogenes* II Kit

User Guide

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

Catalog #3578124

BIO-RAD

Table of Contents

Section 1	Introduction.....	1
Section 2	iQ-Check <i>L. monocytogenes</i> II Technology.....	1
Section 3	Kit Components.....	2
Section 4	Shelf Life and Storage.....	2
Section 5	Materials Required but Not Supplied.....	2
	Equipment.....	2
	Supplies.....	3
Section 6	Safety Precautions and Recommendations for Best Results.....	4
Section 7	Protocol.....	5
	Sample Enrichment.....	5
	Free DNA Removal Treatment.....	7
	DNA Extraction.....	7
	Real-Time PCR.....	8
	Data Analysis.....	8
Section 8	Confirmation of Positive Results.....	10
Section 9	Confirmation of Single Colonies Using the iQ-Check Kit.....	10
Section 10	Test Performance and Validations.....	11
Section 11	References.....	12
Section 12	Revision History.....	13
	Appendix — PCR Mix Calculation Guide.....	14

Section 1 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 *L. monocytogenes* found in environmental samples and food products. Using real-time polymerase chain reaction (PCR), *L. 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 intended users of this kit are trained laboratory personnel who are performing tests to detect *L. monocytogenes*. The use of this test allows results to be obtained within a few hours after enrichment.

Section 2 iQ-Check *L. monocytogenes* II Technology

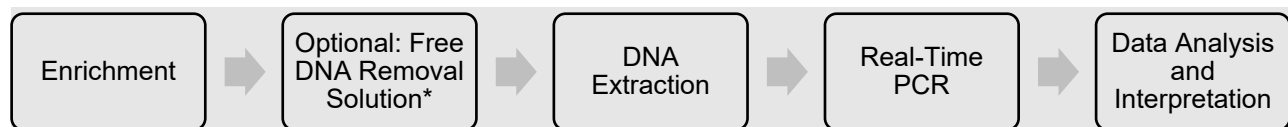
The iQ-Check *L. monocytogenes* II Kit is a test based on gene amplification and detection by real-time PCR. The kit's ready-to-use PCR reagents contain oligonucleotides (primers and probes) specific for *L. monocytogenes*, as well as DNA polymerase and nucleotides. Detection and data analysis are optimized for use with a Bio-Rad real-time PCR instrument, such as the CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System.

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 annealing 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 DNA during the amplification step by hybridizing to the amplicons. These probes are linked to a fluorophore that fluoresces only when hybridized to the target sequence. FAM is the fluorophore linked to the probe hybridizing to the *L. monocytogenes*-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. The optical module measures this fluorescence at the annealing step during each PCR cycle while the associated software plots the fluorescence intensity versus number of cycles.

A synthetic DNA internal control is included in the reaction mix to validate any possible negative results. This control is amplified with a specific probe at the same time as the *L. monocytogenes* target DNA sequence and is detected by a third fluorophore.

This test allows the qualitative detection of *L. monocytogenes* in select foods and environmental samples previously enriched by culture. It includes the following five main steps:



*Please refer to the user guide of the iQ-Check Free DNA Removal Solution (#10000058391) for the conditions of use.

Section 3

Kit Components

The iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit contains sufficient reagents for 96 tests (94 samples).

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

Section 4

Shelf Life and Storage

Once received, the kit must be stored at 2–8°C. Reagents stored at this temperature can be used until the expiration date indicated on the tubes. The shelf life of the lysis reagent is 6 months once it is mixed with lysis beads.

Section 5

Materials Required but Not Supplied

Equipment

- Lab paddle blender for homogenizing test samples
- Incubator for sample microbiological enrichment
- Specific for extraction in sterile 1.5 ml conical screwcap tubes:
 - Benchtop centrifuge (capable of 10,000–12,000 x g)
 - Dry heat block at 37 ± 2°C and/or 95–100°C
- Cell disruptor, such as a Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)
- Specific for extraction in deep well plate:
 - Heating thermoshaker* capable of maintaining 37 ± 2°C and/or 95–100°C, with a mixing speed of at least 1,300 rpm
- Vortexer
- Magnetic stir plate
- 20, 200, and 1,000 µl micropipets
- Bio-Rad real-time PCR system,* for example, the CFX96 Touch Deep Well System (catalog #3600037) or CFX Opus Deepwell (catalog # 17007991) Real-Time PCR Systems
- Bio-Rad iQ-Check Prep System for automated DNA extraction and PCR plate setup (catalog #3594911)

Note: We recommend using an uninterrupted power supply (UPS) with the thermal cycler and iQ-Check Prep System.

* Contact Bio-Rad Technical Support for information about recommended instruments.

Supplies

- Enrichment medium: *Listeria* Special Broth (LSB) (catalog #3555703, 225 ml x 6 bottles; 3564703, dehydrated, 500 g; 3555793, 5 L x 2 bags; 3564753, dehydrated, 5 kg) or Half Fraser Broth (catalog #3564604, dehydrated, 500 g; 3555797, 225 ml x 6 bottles; 3555794, 3 L x 4 bags)
- Enrichment medium: *Listeria* Special Broth II (LSB II) (catalog #12017463, 225 ml x 6 bottles; 12017388, dehydrated, 500 g; 12017378, dehydrated, 5 kg)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (catalog #3594970)
- Specific for environmental samples:
 - Environmental sponges
 - Environmental swabs
 - Neutralizing broth for sponges and swabs, such as Dey-Engley (D/E) or HiCap Neutralizing Broth, or Lethen Broth
- Specific for extraction in tubes:
 - 1.5 ml conical screwcap tubes, sterile (for example, catalog #2240110XTU)
- Specific for extraction in a deep well plate:
 - 96-well deep well plate (catalog #3594900)
 - Plastic sealing film (catalog #3590139)
 - X-Pierce Sealing Films (catalog #3593977) or Pre-Pierced Plate Sealing Film (catalog #3600040, North America only)
- Specific for Standard II and Easy II extraction protocols:
 - iQ-Check Lysis Beads (reagent F) (catalog #3578136)
 - 200 µl wide-opening pipet tips
- Specific for iQ-Check Prep System:
 - 60 ml dilution container (catalog #3594904)
 - Filter tips (catalog #3594902 or 12014486: 50 µl; 3594903 or 12014483: 1,000 µl)
- PCR mix tubes (catalog #12016673, 5 ml x 25)
- RAPID'*Listeria* spp. Agar* (catalog #3564744, dehydrated, 500 g; 3564745, supplement 1; 3564746, supplement 2)
- RAPID'*L.mono* Agar* (catalog #3563694, 90 mm x 20 dishes; 3555294, kit for 190 ml agar plus 2 supplements; 3564293, dehydrated, 500 g; 3564294, supplement 1; 3564746, supplement 2)
- PCR plates, tubes, sealing tape, and caps
- Sterile filter tips adaptable to 20, 200, and 1,000 µl micropipets
- Tips for Combitip Pipets or equivalent repeat pipettors; sterile, individually packaged
- 1 and 10 ml pipets
- 2 and 5 ml sterile test tubes
- Powder-free gloves
- Distilled sterile water
- Bleach, 5%

- Cleaning agent such as DNA AWAY or RNase AWAY

* Can be used outside of the AOAC-PTM validation.

Section 6

Safety Precautions and Recommendations for Best Results

- This test must be performed by trained personnel
- Pregnant women, children, the elderly, and immunocompromised individuals should neither perform this method nor handle *L. monocytogenes* due to the high infection and fatality rate associated with these groups
- Samples and enrichment cultures must be handled as potentially infectious material and discarded according to local rules and regulations
- All potentially infectious material should be autoclaved before disposal
- The quality of results depends on strict compliance with Good Laboratory Practices (for example, the EN ISO 7218 standard), especially concerning PCR:
 - Never circulate laboratory equipment (pipets, tubes, etc.) from one workstation to another
 - Always 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 pipets, as well as the correct functioning of the instruments
 - Change gloves often, especially if you suspect they are contaminated
 - Clean work spaces periodically with 5% bleach and other decontaminating agents, such as DNA AWAY
 - Use powder-free gloves and avoid fingerprints and writing on tube caps. Both 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-borne pathogens — General requirements and definitions)
- iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit:
 - All substances or mixtures in the test kit are classified products, according to the Globally Harmonized System (GHS). Contact with acids may cause release of toxic gases. No special precautions are necessary if used correctly. If the product is inhaled, supply fresh air and consult a doctor in case of complaints. After eye contact with the product, rinse opened eye for several minutes under running water. If the products are swallowed, induce vomiting and call for medical help
- iQ-Check Prep System:
 - Improper use of the iQ-Check Prep System may cause personal injury or damage to the instrument. Some components may pose a risk of personal injury due to excessive heat if improperly handled. For safe use, the iQ-Check Prep System must be operated only by qualified laboratory personnel who have been appropriately trained. Servicing of instrument must be performed only by Bio-Rad field service engineers
- CFX96 Touch Deep Well or CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Detection Systems:

- Improper use of the CFX96 Touch Deep Well System or CFX Opus Deepwell System may cause personal injury or damage to the instrument. Some components may pose a risk of personal injury due to excessive heat if improperly handled. For safe use, the CFX96 Touch Deep Well System and CFX Opus Deepwell System must be operated only by qualified laboratory personnel who have been appropriately trained. Servicing of instrument must be performed only by Bio-Rad Field Service Engineers
- Enrichment:
 - The user should read, understand, and follow all safety information in the instructions for the iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit. Retain the safety instructions for future reference. To reduce the risks associated with exposure to chemicals and biohazards, perform pathogen testing in a properly equipped laboratory under the control of trained personnel. Always follow standard laboratory safety practices, including wearing appropriate protective apparel and eye protection while handling reagents and contaminated samples. Avoid contact with the contents of the enrichment media and reagent tubes after amplification. Dispose of enriched samples according to current industry standards
 - *Listeria* is a Biosafety Level 2 organism. Biological samples such as enrichments have the potential to transmit infectious diseases. Follow all applicable local, state/provincial, and/or national regulations on disposal of biological waste. Wear appropriate protective equipment, which includes, but is not limited to, protective eyewear, face shield, clothing/lab coat, and gloves. All work should be conducted in properly equipped facilities utilizing the appropriate safety equipment (for example, physical containment devices). Individuals should be trained in accordance with applicable regulatory and company/institution requirements before working with potentially infectious materials
 - When testing is complete, all materials and media possibly containing pathogens should be decontaminated following current industry standards for the disposal of contaminated waste (that is, autoclave for 20 min at 121°C). Consult the Safety Data Sheet for additional information and local regulations for disposal

Section 7 Protocol

A. Sample Enrichment

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

Enrichment media must be at the appropriate incubation temperature (ambient or 30°C/37°C when required) before use.

The use of an enrichment bag with incorporated filter is highly recommended.

Within the scope of the NF VALIDATION, test portions weighing more than 25 g have not been tested. Incubate, without shaking, for times and at temperatures indicated in the table below. It is also possible to carry out the iQ-Check test from LSB that has been enriched and then stored at 2–8°C for up to 72 hr.

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

NF VALIDATION BRD 7/10-04/05 and NordVal 037		
Scope (Matrices)	Sample Preparation	Enrichment/DNA Extraction
All food products and environmental samples ¹	Homogenize <i>n</i> g food in 9 x <i>n</i> ml Half Fraser Broth or LSB	Standard II extraction (Half Fraser) <ul style="list-style-type: none"> Incubate 24 – 26 hr at 30 ± 1°C Tube format Standard II extraction (LSB) <ul style="list-style-type: none"> Incubate 22–24 hr at 30 ± 1°C Tube format Easy II extraction (LSB) <ul style="list-style-type: none"> Incubate 24–26 hr at 30 ± 1°C Tube format
Production environment and surfaces ²	Homogenize <i>n</i> g food in 9 x <i>n</i> ml prewarmed LSB or room temperature LSB II	Easy II extraction (LSB) <ul style="list-style-type: none"> Incubate 18–26 hr at 30 ± 1°C Tube/deep well format Easy II extraction (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> Incubate 18–26 hr at 37 ± 1°C Tube/deep well format
Composite food ²	Homogenize <i>n</i> g food in 9 x <i>n</i> ml LSB II	Easy II extraction (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> Incubate 18-26 hr at 37 ± 1°C Deep well format
Dairy products ²	Homogenize <i>n</i> g food in 9 x <i>n</i> ml prewarmed LSB II	Easy II extraction (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> Incubate 20-28 hr at 37 ± 1°C Deep well format
AOAC PTM 010802		
Scope (Matrices) ^{2,3}	Sample Preparation	Enrichment/DNA Extraction
Deli turkey, hot dogs, smoked salmon, cottage cheese	Homogenize <i>n</i> g food in 9 x <i>n</i> ml LSB or LSB II (25 g in 225 ml; 125 g in 1,125 ml)	Easy II extraction (LSB) <ul style="list-style-type: none"> Incubate 24–26 hr at 30 ± 1°C Tube/deep well format Easy II extraction (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> Incubate 18-24 hr at 37 ± 1°C Tube/deep well format
Stainless steel surfaces	Environmental samples <ul style="list-style-type: none"> Moisten swabs and sponges with a neutralizing broth that does not contain aryl sulfonate complex For surfaces being analyzed with swabs, sample a 1 x 1" (2.54 x 2.54 cm) area For surfaces being analyzed with sponges, sample a 4 x 4" (10.16 x 10.16 cm) area Add to enough LSB II to cover the swab (10 ml) or sponge (60-225 ml) 	Easy II extraction <ul style="list-style-type: none"> Incubate 16-24 hr at 37 ± 1°C Tube/deep well format
Refer to MFLP-54 for Health Canada approved matrices and protocols		

¹ Validation includes “Lmono Fast” Application Protocol File for a reduced PCR run time. Contact your Bio-Rad representative for more information.

² Validation includes the use of the iQ-Check Free DNA Removal Solution and of the “Lmono Fast” Application Protocol File for a reduced PCR run time. Contact your Bio-Rad representative for more information.

³ Validation includes direct streak to RAPID *L. mono*, RAPID *Listeria* spp., or Agar *Listeria* plates (excluding natural cheese).

B. Free DNA Removal Treatment

The iQ-Check Free DNA Removal Solution provides an ideal way to remove free DNA.

Follow Bio-Rad's recommendations in the user guide (document #10000058391). This protocol is validated by AFNOR Certification in the production environmental samples category.

C. DNA Extraction

General recommendations:

1. Turn on the heat block or thermoshaker to preheat before starting the test. Set it to 95–100°C. Keep the lysis reagent in suspension while pipetting by stirring at medium speed on a magnetic stir plate.
2. 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.
3. Open tubes and wells carefully to avoid any possible cross-contamination.
4. Cool the deep well plate before pipetting directly through pre-pierced sealing film.
5. Use the magnetic bar to keep the lysis reagent in suspension. Pipet while it is stirring at medium speed.
6. Gently shake the lysis reagent by hand first to resuspend the resin. Then pipet while it is stirring at medium speed with the magnetic bar contained in the bottle, in order to keep it in suspension.
7. Reconstitute the final lysis reagent as follows:
 - a. Carefully pour all the contents from reagent F (lysis beads) into reagent A (lysis reagent).
 - b. Use consumables with a wide enough tip to allow pipetting of the homogenized lysis reagent.
 - c. Lysis reagent mixed with lysis beads (reagents A + F) has a shelf life of 6 months when stored at 4°C.

Standard II Protocol

1. Collect 1.5 ml of decanted enriched sample into a tube.
2. Centrifuge the tube at 10,000–12,000 x g for 5 min. Discard the supernatant.
3. Add 250 µl of homogenized lysis reagent (reagents A + F) to the pellet and resuspend the pellet by pipetting the reagent up and down. Close the tube.

Note: Gently shake the lysis reagent by hand first to resuspend the beads.

4. Place the tube in the thermoshaker or cell disruptor for 3 ± 1 min.
5. Incubate in the appropriate heat block at 95–100°C for 10–15 min.
6. Vortex the tube at high speed and centrifuge at 10,000–12,000 x g for 5 min.

This is the recommended stopping point for temporarily stopping the procedure.

The supernatant can be stored for up to 1 year at –20°C. Always allow it to thaw and homogenize, and then centrifuge at 10,000–12,000 x g for 5 min before reusing.

Easy II Protocol

1. Aliquot 100 µl of homogenized lysis reagent (reagents A + F) to the tubes or wells of a deep well plate.

Note: Gently shake the lysis reagent by hand first to resuspend the beads.

2. Add 100 µl of enriched sample.

Note: Shake the suspension to homogenize the culture and then allow any debris to settle before collecting the sample.

3. Mix the solution by pipetting up and down until homogenized.
4. Close the tubes or seal the deep well plate with pre-pierced sealing film.
5. Place the tubes in the cell disruptor for 3 ± 1 min. Incubate the tubes in the heat block at $95\text{--}100^\circ\text{C}$ for 15–20 min.
6. If using the agitator-incubator for the tube or deep well plate format, incubate the tubes or deep well plate in the agitator-incubator at 1,300 to 1,600 rpm at $95\text{--}100^\circ\text{C}$ for 15–20 min.
7. Vortex the tubes at high speed, and then centrifuge at $10,000\text{--}12,000 \times g$ for at least 2 min.

Centrifugation is not needed for the deep well plate.

This is the recommended stopping point for temporarily stopping the procedure.

The supernatant can be stored for up to 1 year at -20°C . Always allow it to thaw and homogenize, and then centrifuge at $10,000\text{--}12,000 \times g$ for 5 min before reusing.

D. Real-Time PCR

Instrument and Software Setup

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

PCR Mix Preparation

1. Prepare the PCR mix containing the amplification solution (reagent C) and the fluorescent probes (reagent B). The volume of PCR mix needed depends on the number of samples and controls to be analyzed. At least one positive and one negative control must be included in each PCR run. Use the pipetting table in Appendix — PCR Mix Calculation Guide to find the correct volumes to use for each reagent.

Note: Use the PCR mix (reagents B + C) immediately after preparation. It is stable for 1 hr maximum at $2\text{--}8^\circ\text{C}$.

2. Pipet $45 \mu\text{l}$ of the PCR mix into each well according to your plate setup.
3. Add $5 \mu\text{l}$ of DNA extract, reagent D (negative control), or reagent E (positive control). Do not vortex the sample before pipetting. Hermetically seal the wells of the PCR plate or tube strips. It is important to avoid bubbles at the bottom of the wells by pipetting carefully. As an optional step, centrifuge the sealed PCR plate or tube strips (quick spin) to eliminate any bubbles.
4. Place the PCR plate or tube strips in the thermal cycler. Be sure to place the plate correctly, with the A1 well at the upper left corner. Close the reaction module.

Run PCR

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

The “Lmono Fast” Application Protocol File has been NF and AOAC validated.

E. 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 CFX Manager IDE Software User Manual for opening data files and setting the data analysis parameters.

Interpreting Results

Once the data analysis parameters have been set, results are interpreted by analyzing the quantification cycle (C_q) values of each sample (the cycle at which the amplification curve crosses the threshold).

CFX Manager IDE Software allows complete automated analysis for Bio-Rad real-time PCR detection systems. A verification of the typical characteristics of the amplification curves should be performed prior to releasing results. Contact your Bio-Rad technical support team if additional support is required.

Controls

Verify the positive and negative controls before interpreting sample results.

For the experiment to be valid, the controls must have the results summarized in the following table. Otherwise the PCR reaction must be repeated.

Control	<i>L. monocytogenes</i> Detection (FAM Channel)	Internal Control Detection (HEX Channel)
Negative control	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Positive control	26 ≤ Cq ≤ 36	N/A

* The software indicates a Cq value (the cycle at which the amplification curve crosses the threshold) 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 the results of negative and positive controls differ from those in the Controls table (invalid control), repeat the run and analysis described in D. Real-Time PCR and E. Data Analysis in Section 7 Protocol

Samples

A **positive** iQ-Check *Listeria monocytogenes* PCR test must show a typical amplification curve and a Cq value ≥10 for the FAM fluorophore.

- If the Cq value for both channels is below 10, verify the raw data curve is a regular amplification curve (with a flat baseline followed by a rapid exponential increase of fluorescence and then a flattening out). If the curve seems correct, it may be considered a positive *Listeria monocytogenes* test

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

- This sample is considered a **negative** *Listeria monocytogenes* sample if there is no Cq value in the FAM channel 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 (using 10 µl of DNA extract, perform a 1:10 dilution in distilled sterile water, and then test 5 µl of the dilution) 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.

The interpretation of test results is summarized in the following table.

<i>L. monocytogenes</i> Detection (FAM Channel)	Internal Control Detection (HEX Channel)	Interpretation
Cq ≥ 10	N/A	Positive
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negative
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition*

* When both target and internal control detection give a Cq value = N/A, the DNA extract must be diluted 1:10 and tested again.

An invalid interpretation can be given when validation criteria are not met. Check the raw data and proceed as if the sample was inhibited.

Section 8

Confirmation of Positive Results

In the context of the NF VALIDATION certified method, all positive iQ-Check results must be confirmed in the following ways:

1. Using classic tests, described in the standardized methods CEN or ISO, directly from the Half Fraser Broth, or starting back from the sample when using LSB or LSB II.
2. By isolation of enriched LSB or LSB II (streaking 100 µl) on RAPID'*Listeria* spp. or RAPID'*L.mono* chromogenic agar and incubation for 24 hr at 37 ± 1°C. The presence of characteristic colonies on RAPID'*L.mono* is sufficient to confirm the presence of *L. monocytogenes*. Use an identification test to confirm *L. monocytogenes* on RAPID'*Listeria* spp.
3. By isolation of enriched LSB or LSB II (streaking 10 µl) on AL or PALCAM agar and incubation for 24–48 hr at 37 ± 1°C. Typical colonies should be confirmed by the tests described in the ISO method until species is identified.
4. Using any other method certified by NF VALIDATION based on a principle different from that used in the iQ-Check *L. monocytogenes* II PCR test. The validated protocol of this second method must be followed entirely.

In the case of discrepant results between the iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit and any of the confirmation options listed above, follow the necessary steps to ensure valid results.

It is possible to store the enriched LSB or LSB II at 2–8°C for 72 hr maximum, following the incubation at 30°C, before carrying out the confirmation.

In the context of AOAC validation, a positive iQ-Check *L. monocytogenes* result should be considered presumptive positive and confirmed according to an appropriate reference method (for example, USDA MLG, FDA BAM, ISO, MFHPB, etc.) is recommended. Alternatively, for select matrices, streak 10 µl enriched LSB or LSB II directly to RAPID'*L. mono*, RAPID'*Listeria* spp. or Agar *Listeria* chromogenic agar and incubate for 24 hr at 37 ± 1°C. The presence of characteristic *Listeria monocytogenes* colonies should be biochemically confirmed for the presence of *Listeria monocytogenes*.

Section 9

Confirmation of Single Colonies Using the iQ-Check Kit

The iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit may also be used to confirm single isolated *L. monocytogenes* colonies on agar plates. This is officially validated by AFNOR Certification on RAPID'*L.mono* and RAPID'*Listeria* spp. chromogenic media.

1. Pick an isolated colony from a selective or nonselective agar plate with a toothpick, sterile loop, or other adapted consumable (for example, a pipet tip).
2. Resuspend the colony in 100 µl tryptone salt or distilled sterile water in a microcentrifuge tube.
Homogenize using a vortexer.
3. Use 5 µl of the suspension with 45 µl of PCR mix (see D. Real-Time PCR in Section 7 Protocol) and follow the rest of the iQ-Check *L. monocytogenes* II Protocol for the data and results interpretation.

Section 10

Test Performance and Validations

The iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit is specific for the detection of *L. monocytogenes*



BRD 07/10-04/05

ALTERNATIVE
ANALYSIS
METHODS FOR
AGRIBUSINESS

<http://nf-validation.afnor.org>

NF Validation

The iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit is certified NF VALIDATION as an alternative method to the reference method ISO 11290-1:2017 (see reference 4 in Section 11), for the detection of *L. monocytogenes* in all products for human consumption and environmental samples. The validation followed the protocol of ISO 16140-2:2016 (see reference 5 in Section 11) and includes the use of the CFX96 Touch Deep Well and CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Systems. The use of the iQ-Check Free DNA Removal Solution is validated for composite foods, dairy products and production environmental samples. The associated software is CFX Manager IDE Software (version 2. 2 and later). The “Lmono Fast” Application Protocol File is validated. Certificate number: BRD 07/10–04/05. Valid until: Refer to the certificate available on the AFNOR Certification website.



AOAC-Validation

The iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit (Easy II Protocol) is validated by the AOAC Research Institute under the Performance Tested Method Program for the detection of *L. monocytogenes* in deli turkey, hot dogs, smoked salmon, cottage cheese, and stainless steel surfaces. A positive result with iQ-Check should be considered presumptive and it is recommended that it be confirmed following the recommendation in Section 8. LSB, LSB II, the “Lmono Fast” APF, the use of the iQ-Check Free DNA Removal Solution, and the use of CFX96 Touch Deep Well and CFX Opus Deepwell Real-Time PCR Systems are validated for all samples. The associated software is CFX Manager IDE Software (version 2.2 and later). Certificate number: 010802.



Health Canada-Validation

The iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit (Easy II Protocol) has been validated by Health Canada (MFLP-54) for detection of *L. monocytogenes* from RTE meat and poultry, fruit- and vegetable-based products (excluding raw processed vegetables), fish and seafood products (excluding smoked fish), and frozen and fermented dairy products for 25 g and 125 g sample sizes. A positive result with iQ-Check should be considered presumptive and must be confirmed according to MFHPB-30 (see reference 2 in section 11).



NordVal-Validation

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

- Enrichment in Half Fraser Broth followed by the Standard II Lysis Protocol
- Enrichment in *Listeria* Special Broth followed by the Standard II Lysis Protocol
- Enrichment in *Listeria* Special Broth followed by the Easy II Lysis Protocol, no longer requiring the first centrifugation step

Certificate number: 037. Refer to the certificate available on the NordVal website for expiration.

Section 11

References

AOAC Official Method 993. 12-1996(1999). *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. Selective enrichment and isolation method.

Health Canada (2011). Health Products and Food Branch. MFHPB-30. Isolation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. from foods and environmental samples. The Compendium of Analytical Methods, Volume 2, February 2011.

ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 11290-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. — Part 1: Detection method.

ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

ISO 22174. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2021). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 8. 13: Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, ready-to-eat siluriformes (fish) and egg products, and environmental samples.

https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-09/MLG-8.13.pdf, accessed February 14, 2020.

United States Food and Drug Administration (2017). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>, accessed February 14, 2020.

Section 12

Revision History

Release date	Document number	Change
October 2023	10000167776 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Document number change - previous version 10000123535 Ver C iQ-Check <i>L. monocytogenes</i> User Guide- AFNOR Extension: LSB II for composite food, environmental production samples and dairy products

Appendix — PCR Mix Calculation Guide

To find the correct volumes for 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 and Controls	Probes Reagent B, μ l	Amplification Mix Reagent C, μ l	Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, μ l	Amplification Mix Reagent C, μ l	Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, μ l	Amplification Mix Reagent C, μ l
1	5	40	33	178	1,400	65	351	2,800
2	11	86	34	184	1,500	66	356	2,900
3	16	130	35	189	1,500	67	362	2,900
4	22	173	36	194	1,600	68	367	2,900
5	27	216	37	200	1,600	69	373	3,000
6	32	259	38	205	1,600	70	378	3,000
7	38	302	39	211	1,700	71	383	3,100
8	43	346	40	216	1,700	72	389	3,100
9	49	389	41	221	1,800	73	394	3,200
10	54	432	42	227	1,800	74	400	3,200
11	59	475	43	232	1,900	75	405	3,200
12	65	518	44	238	1,900	76	410	3,300
13	70	562	45	243	1,900	77	416	3,300
14	76	605	46	248	2,000	78	421	3,400
15	81	648	47	254	2,000	79	427	3,400
16	86	691	48	259	2,100	80	432	3,500
17	92	734	49	265	2,100	81	437	3,500
18	97	778	50	270	2,200	82	443	3,500
19	103	821	51	275	2,200	83	448	3,600
20	108	864	52	281	2,200	84	454	3,600
21	113	907	53	286	2,300	85	459	3,700
22	119	950	54	292	2,300	86	464	3,700
23	124	994	55	297	2,400	87	470	3,800
24	130	1,000	56	302	2,400	88	475	3,800
25	135	1,100	57	308	2,500	89	481	3,800
26	140	1,100	58	313	2,500	90	486	3,900
27	146	1,200	59	319	2,500	91	491	3,900
28	151	1,200	60	324	2,600	92	497	4,000
29	157	1,300	61	329	2,600	93	502	4,000
30	162	1,300	62	335	2,700	94	508	4,100
31	167	1,300	63	340	2,700	95	513	4,100
32	173	1,400	64	346	2,800	96	518	4,100

Visit [bio-rad.com/iqcheck](https://www.bio-rad.com/iqcheck) for more information.

BIO-RAD is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK is a trademark of Bio-Rad Europe GmbH in certain jurisdictions.

All trademarks used herein are the property of their respective owners.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website [bio-rad.com](https://www.bio-rad.com) **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

iQ-Check *Listeria* *monocytogenes* II Kit

Guide d'utilisation

**Test pour la détection par PCR en temps réel de
L. monocytogenes dans les produits alimentaires et
les échantillons environnementaux**

Référence — N° 3578124

BIO-RAD

Sommaire

Section 1	Introduction.....	1
Section 2	Technologie iQ-Check <i>L. monocytogenes</i> II	1
Section 3	Composants du kit.....	2
Section 4	Durée de conservation et stockage.....	2
Section 5	Matériel requis non fourni.....	2
	Matériel.....	2
	Produits	3
Section 6	Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux.....	4
Section 7	Protocole	5
	Enrichissement de l'échantillon	5
	Traitement de l'ADN libre	7
	Extraction de l'ADN	7
	PCR en temps réel.....	8
	Analyse des données	9
Section 8	Confirmation des résultats positifs	10
Section 9	Confirmation de colonies isolées à l'aide du kit iQ-Check	10
Section 10	Performance du test et validations.....	11
Section 11	Références	12
Section 12	Historique des révisions	13
	Annexe — Guide de calcul du mélange de PCR	1

Section 1

Introduction

Les méthodes bactériologiques traditionnelles sont souvent chronophages et fastidieuses. En comparaison, la méthode iQ-Check *Listeria monocytogenes* II constitue un test qualitatif rapide et simple permettant la détection de séquences d'ADN spécifiques caractéristiques de *L. monocytogenes* dans les échantillons environnementaux et les produits alimentaires. Grâce à la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel, la séquence d'ADN spécifique de *L. monocytogenes* est amplifiée et détectée simultanément au moyen d'une sonde fluorescente. Il est possible de traiter jusqu'à 94 échantillons, avec un risque minimum de contamination et une procédure d'utilisation simple. Ce kit est destiné au personnel de laboratoire qualifié, qui réalise des tests de détection de *L. monocytogenes*. La mise en œuvre de ce test permet l'obtention de résultats en quelques heures après l'enrichissement d'un échantillon.

Section 2

Technologie iQ-Check *L. monocytogenes* II

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit est un test basé sur l'amplification et la détection des gènes par PCR en temps réel. Les réactifs PCR prêts à l'emploi de ce kit contiennent des oligonucléotides (amorces et sondes) propres à *L. monocytogenes*, ainsi que de l'ADN polymérase et des nucléotides. La détection et l'analyse des données sont optimisées pour l'utilisation avec un instrument de PCR en temps réel Bio-Rad, comme CFX96 Touch Deep Well System.

La PCR (amplification en chaîne par polymérase) est une technique puissante utilisée pour générer de nombreuses copies d'ADN cible. Durant la PCR, la succession de cycles de chauffage et de refroidissement permet une dénaturation de l'ADN, suivie par une hybridation des amorces à la région cible, puis un allongement de l'ADN par action de l'ADN polymérase à partir de ces amorces et des désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP), créant ainsi des copies de l'ADN cible. Ces copies sont appelées amplicons.

Au cours de la PCR en temps réel, des sondes spécifiques détectent l'ADN en s'hybridant avec les amplicons. Ces sondes sont liées à un fluorophore qui produit une fluorescence uniquement lors d'une hybridation avec la séquence cible. FAM est le fluorophore lié à la sonde qui s'hybride à la séquence d'ADN propre à *L. monocytogenes*. En l'absence d'ADN cible, aucune fluorescence ne sera détectée. Étant donné que le nombre d'amplicons augmente avec chaque cycle d'amplification, l'intensité de la fluorescence augmente également. Le module optique mesure cette fluorescence à l'étape d'hybridation pour chaque cycle de PCR tandis que le logiciel associé enregistre l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles.

Le mélange réactif comprend un contrôle interne d'ADN synthétique afin de valider tout résultat négatif éventuel. Ce contrôle est amplifié avec une sonde spécifique en même temps que la séquence d'ADN cible de *L. monocytogenes* et est détecté par un autre fluorophore.

Ce test permet la détection qualitative de *L. monocytogenes* dans les échantillons alimentaires et environnementaux préalablement enrichis par culture. Il comprend cinq étapes principales :



*Se référer au guide d'utilisation d'iQ-Check Free DNA Removal Solution (n° de référence 10000058391) pour les conditions d'utilisation.

Section 3

Composants du kit

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit contient la quantité de réactifs suffisante pour 96 tests (94 échantillons).

ID réactif	Réactif	Quantité fournie, ml
A	Réactif de lyse	1 flacon, 20
B	Sondes fluorescentes	1 tube, 0,55
C	Mélange d'amplification	1 tube, 4,4
D	Contrôle négatif PCR	1 tube, 0,5
E	Contrôle positif PCR	1 tube, 0,25
F	Billes de lyse	1 flacon, 17,6 g

Section 4

Durée de conservation et stockage

Après réception, le kit doit être stocké à 2–8 °C. Les réactifs stockés à cette température peuvent être utilisés jusqu'à la date d'expiration indiquée sur les tubes. La durée de conservation du réactif de lyse est de 6 mois après mélange avec les billes.

Section 5

Matériel requis non fourni

Matériel

- Stomacher pour homogénéiser les échantillons de test
- Incubateur pour l'enrichissement microbiologique des échantillons
- Matériel spécifique pour extraction en tubes coniques à bouchon fileté 1,5 ml stériles :
 - Centrifugeuse de paillasse (10 000–12 000 x g)
 - Bloc de chauffage à sec à 37 ± 2 °C et/ou 95–100 °C
- Cell disruptor, tel que Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)
- Matériel spécifique pour extraction en plaque Deep Well :
 - Agitateur-incubateur* capable de maintenir une température de 37 ± 2 °C et/ou 95–100 °C, avec une vitesse de mélange d'au moins 1 300 rpm
- Agitateur-mélangeur vortex
- Plaque d'agitation magnétique
- Micropipettes de 20, 200 et 1 000 µl
- Système de PCR en temps réel de Bio-Rad*, par exemple CFX96 Touch Deep Well System (n° de référence 3600037) ou CFX Opus Deepwell (n° de référence 17007991)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System pour l'extraction automatisée d'ADN et la préparation des plaques de PCR (n° de référence 3594911)

Remarque : nous recommandons d'utiliser une alimentation sans interruption (ASI ou UPS) avec le thermocycleur et le système de préparation iQ-Check Prep System.

* Contacter l'assistance technique de Bio-Rad pour de plus amples informations sur les instruments recommandés.

Produits

- Milieu d'enrichissement : *Listeria* Special Broth (LSB) (n° de référence 3555703, 225 ml x 6 flacons ; 3564703, base déshydratée, 500 g ; 3555793, 5 L x 2 poches ; 3564753, base déshydratée, 5 kg) ou Half Fraser Broth (n° de référence 3564604, base déshydratée, 500 g ; n° de référence 3555797, 225 ml x 6 flacons ; n° de référence 3555794, 3 L x 4 poches)
- Milieu d'enrichissement : *Listeria* Special Broth II (LSB II) (n° de référence 12017463, 225 ml x 6 flacons ; n° de référence 12017388, base déshydratée, 500 g ; n° de référence 12017378, base déshydratée, 5 kg)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (n° de référence 3594970)
- Produits spécifiques pour les échantillons environnementaux :
 - Éponges d'échantillonnage environnemental
 - Écouvillons d'échantillonnage environnemental
 - Bouillon neutralisant pour éponges et écouvillons, tel que Dey-Engley (D/E), HiCap ou bouillon Lethen
- Matériel spécifique pour extraction en tubes :
 - 1. Tubes coniques à bouchon fileté 5 ml, stériles (par exemple, n° de référence 2240110XTU)
- Matériel spécifique pour extraction en plaque Deep Well :
 - Plaque Deep Well de 96 puits (n° de référence 3594900)
 - Film à sceller en plastique (n° de référence 3590139)
 - X-Pierce Sealing Films (n° de référence 3593977) ou Pre-Pierced Plate Sealing Film (n° de référence 3600040, Amérique du Nord uniquement)
- Matériel spécifique pour les protocoles d'extraction Standard II et Easy II :
 - iQ-Check Lysis Beads (réactif F) (n° de référence 3578136)
 - Embouts de pipette à large ouverture 200 µl
- Matériel spécifique pour iQ-Check Prep System :
 - Récipient de dilution 60 ml (n° de référence 3594904)
 - Embouts filtrants (n° de référence 3594902 ou 3594902) : 50 µl ; n° de référence 3594903 : 1 000 µl)
- Tubes de mélange de PCR (n° de référence 12016673, 5 ml x 25)
- RAPID *Listeria* spp. Agar* (n° de référence 3564744, base déshydratée, 500 g ; n° de référence 3564745, Supplement 1 ; n° de référence 3564746, Supplement 2)
- RAPID *L.mono* Agar* (n° de référence 3563694, 90 mm x 20 boîtes ; n° de référence 3555294, kit pour gélose 190 ml plus 2 suppléments ; n° de référence 3564293, base déshydratée, 500 g ; n° de référence 3564294, Supplement 1 ; n° de référence 3564746, Supplement 2)
- Plaques, tubes, ruban à sceller et bouchons pour PCR
- Embouts filtrants stériles adaptables pour micropipettes de 20, 200 et 1 000 µl
- Seringues Combitip ou pipettes à répétition équivalentes ; stériles, emballées individuellement
- Pipettes 1 et 10 ml
- Tubes à essai stériles de 2 et 5 ml
- Gants non poudrés
- Eau distillée stérile
- Eau de Javel, 5 %
- Agent nettoyant tel que DNA AWAY ou RNase AWAY

* Utilisable hors validation AOAC-PTM

Section 6

Mesures de sécurité et recommandations pour des résultats optimaux

- Ce test doit être réalisé par du personnel formé.
- Les femmes enceintes, enfants, personnes âgées et sujets immunodéprimés doivent éviter tout contact avec *L. monocytogenes* en raison du caractère hautement infectieux et létal de la bactérie sur ces catégories de personnes.
- Les échantillons et cultures d'enrichissement doivent être manipulés en tant que substances potentiellement infectieuses et éliminés conformément aux règles et réglementations locales.
- Tous les matériels potentiellement infectieux doivent être soumis à l'autoclave avant élimination.
- La qualité des résultats dépend du respect strict des bonnes pratiques de laboratoire (par exemple, la norme EN ISO 7218), particulièrement en ce qui concerne la PCR :
 - Ne jamais transférer du matériel de laboratoire (pipettes, tubes, etc.) d'un poste de travail à un autre.
 - Toujours utiliser un contrôle positif et un contrôle négatif pour chaque série de réactions d'amplification.
 - Ne pas utiliser les réactifs après leur date d'expiration.
 - Vortexer les réactifs du kit avant de les utiliser afin d'assurer leur homogénéité.
 - Vérifier périodiquement l'exactitude et la précision des pipettes, ainsi que le fonctionnement correct des instruments.
 - Changer de gants fréquemment, surtout si une contamination est suspectée.
 - Nettoyer les postes de travail périodiquement avec de l'eau de Javel à 5 % et d'autres agents de décontamination tels que DNA AWAY.
 - Utiliser des gants non poudrés et éviter les empreintes digitales et l'écriture sur les bouchons des tubes. En effet, l'acquisition des données peut en être affectée.
- Il est fortement recommandé de respecter les exigences générales décrites dans la norme EN ISO 22174:2005 (Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences générales et définitions).
- iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit :
 - Tous les mélanges ou substances du kit de test sont des produits classés conformément au Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). Tout contact avec des acides peut entraîner la libération de gaz toxiques. Aucune précaution particulière n'est nécessaire si le kit est utilisé correctement. Si les produits sont inhalés, apporter de l'air frais et consulter un médecin en cas de troubles. En cas de contact avec les yeux, rincer l'œil ouvert pendant plusieurs minutes sous l'eau courante. Si les produits sont ingérés, provoquer le vomissement et appeler les secours médicaux.
- iQ-Check Prep System :
 - Une utilisation incorrecte d'iQ-Check Prep System peut causer des blessures corporelles ou endommager l'instrument.

En cas de manipulation incorrecte, certains composants peuvent entraîner un risque de blessures corporelles causées par une chaleur excessive. Pour une utilisation en toute sécurité, iQ-Check Prep System doit être uniquement manipulé par du personnel de laboratoire qualifié et ayant reçu une formation adéquate. La maintenance de l'instrument doit être réalisée uniquement par des techniciens de maintenance de Bio-Rad.

- Système de PCR en temps réel CFX96 Touch Deep Well ou CFX Opus Deepwell :
 - Une utilisation incorrecte du CFX96 Touch Deep Well System ou du CFX Opus Deepwell System peut causer des blessures corporelles ou endommager l'instrument. En cas de manipulation incorrecte, certains composants peuvent entraîner un risque de blessures corporelles causées par une chaleur excessive. Pour une utilisation en toute sécurité, CFX96 Touch Deep Well System et CFX Opus Deepwell System doivent être uniquement manipulés par du personnel de laboratoire qualifié et ayant reçu une formation adéquate. La maintenance de l'instrument doit être réalisée uniquement par des techniciens de maintenance de Bio-Rad.
- Enrichissement :
 - L'utilisateur doit lire, comprendre et suivre toutes les informations relatives à la sécurité dans les instructions fournies dans iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit. Conserver les instructions relatives à la sécurité pour référence ultérieure. Afin de réduire les risques associés à l'exposition aux produits chimiques et biologiques, réaliser les analyses d'agents pathogènes dans un laboratoire convenablement équipé, sous le contrôle d'un personnel qualifié. Toujours suivre les pratiques standard en matière de sécurité en laboratoire, notamment porter des vêtements et lunettes/masque de protection appropriés pour manipuler les réactifs et échantillons contaminés. Éviter tout contact avec le contenu du milieu d'enrichissement et des tubes de réactif après amplification. Éliminer les échantillons enrichis conformément aux normes actuelles de l'industrie.
 - *Listeria* est un organisme de niveau de biosécurité 2. Les échantillons biologiques tels que les enrichissements peuvent transmettre des maladies infectieuses. Respecter toutes les réglementations locales, étatiques/provinciales et/ou nationales applicables à l'élimination des déchets biologiques. Porter un équipement de protection approprié, ce qui comprend, sans s'y limiter, lunettes ou masque de protection, écran facial, vêtements de protection/blouse de laboratoire et gants. Tout travail doit être effectué dans des installations convenablement équipées, à l'aide des équipements de sécurité appropriés (par exemple, dispositifs de confinement physique). Le personnel doit être formé conformément aux exigences réglementaires et aux exigences de l'entreprise/de l'institution avant de travailler avec des substances potentiellement infectieuses.
 - Une fois l'analyse terminée, l'ensemble du matériel et les milieux de culture pouvant contenir des agents pathogènes doivent être décontaminés conformément aux normes actuelles de l'industrie pour l'élimination des déchets contaminés (c'est-à-dire, avec un passage à l'autoclave de 20 min à 121 °C). Consulter la fiche de données de sécurité pour obtenir des informations supplémentaires ainsi que les réglementations locales relatives à l'élimination.

Section 7

Protocole

A. Enrichissement de l'échantillon

Il est fortement recommandé de lire le protocole dans son intégralité avant de commencer le test.

Les milieux d'enrichissement doivent être portés à la température d'incubation appropriée (ambiante ou 30 °C/37 °C selon le cas) avant utilisation.

L'utilisation d'une poche d'enrichissement à filtre incorporé est fortement recommandée.

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, les portions d'essai supérieures à 25 g n'ont pas été testées. Incuber, sans agitation, pendant les temps et aux températures indiqués dans le tableau ci-dessus. Il est également possible de réaliser le test iQ-Check à partir du bouillon LSB enrichi conservé à 2–8 °C jusqu'à 72 hr.

Le tableau suivant détaille les différents protocoles utilisables, en fonction de l'application et de l'étendue de l'homologation :

VALIDATION NF BRD 07/10- 07/05 et NordVal 037		
Domaine (matrices)	Préparation des échantillons	Enrichissement/ Extraction de l'ADN
Tous les produits alimentaires et échantillons environnementaux ¹	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml de bouillon Fraser demi ou de LSB	<p>Protocole d'extraction Standard II (Fraser demi)</p> <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 24–26 hr à 30 ± 1 °C. Format tube <p>Protocole d'extraction Standard II (LSB)</p> <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 22–24 hr à 30 ± 1 °C Format tube <p>Protocole d'extraction Easy II (LSB)</p> <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 24–26 hr à 30 ± 1 °C Format tube
Environnement et surfaces de production ²	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml de LSB préchauffée ou à température ambiante de LSB II	<p>Extraction Easy II (LSB)</p> <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 18–26 hr à 30 ± 1 °C Format tube/Deep well <p>Extraction Easy II (LSB II)</p> <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 18–26 hr à 37 ± 1 °C Format tube/Deep well
Aliments composés ²	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml de LSB II	<p>Extraction Easy II (LSB II)</p> <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 18–26 hr à 37 ± 1 °C Format deep well
Produits laitiers ²	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml de LSB II préchauffée	<p>Extraction Easy II (LSB II)</p> <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 20–28 hr à 37 ± 1 °C Format deep well
AOAC PTM 010802		
Domaine (matrices)^{2,3}	Préparation des échantillons	Enrichissement/ Extraction de l'ADN
Viande de dinde transformée, hot-dogs, saumon fumé et fromage frais	Homogénéiser <i>n</i> g d'échantillon alimentaire dans 9 x <i>n</i> ml de LSB ou LSB II (25 g dans 225 ml ; 125 g dans 1 125 ml)	<p>Protocole d'extraction Easy II (LSB)</p> <ul style="list-style-type: none"> Incuber 24–26 hr à 30 ± 1 °C Format Tube/Deep Well <p>Protocole d'extraction Easy II (LSB II)</p> <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 18–24 hr à 37 ± 1 °C Format tube/Deep Well
Surfaces en acier inoxydable	<p>Échantillons environnementaux</p> <ul style="list-style-type: none"> Humidifier les écouvillons et éponges avec un bouillon neutralisant qui ne contient pas de complexe aryle-sulfonate. Pour les surfaces analysées avec un écouvillon, échantillonner une zone de 2,54 x 2,54 cm. Pour les surfaces analysées avec une éponge, échantillonner une zone de 10,16 x 10,16 cm. Ajouter suffisamment de LSB II pour couvrir l'écouvillon (10 ml) ou l'éponge (60–225 ml) 	<p>Extraction Easy II</p> <ul style="list-style-type: none"> Incuber pendant 16–24 hr à 37 ± 1 °C Format tube/Deep Well

Se reporter à MFLP-54 pour les matrices et protocoles validés par Santé Canada

¹ La validation inclut l'utilisation du fichier de protocole d'application « Lmono Fast » pour un temps d'exécution réduit de la PCR. Contacter le représentant Bio-Rad pour obtenir davantage d'informations.

² La validation inclut l'utilisation d'iQ-Check Free DNA Removal Solution et du fichier de protocole d'application « Lmono Fast » pour un temps d'exécution réduit de la PCR. Contacter le représentant Bio-Rad pour obtenir davantage d'informations.

³ La validation inclut la striation directement sur la gélose RAPID'L. *mono*, RAPID'*Listeria* spp. ou sur des plaques gélosées *Listeria* (sauf pour la fromage naturel)

B. Traitement de l'ADN libre

iQ-Check Free DNA Removal Solution est un moyen idéal pour éliminer l'ADN libre.

Suivre les recommandations de Bio-Rad dans le guide d'utilisation (n° de document 10000058391).

Ce protocole est validé par la certification AFNOR dans la catégorie des échantillons environnementaux de production.

C. Extraction de l'ADN

Recommandations générales :

1. Allumer le bloc de chauffage ou l'agitateur thermique afin de préchauffer avant de commencer le test. Le régler sur 95–100 °C. Garder le réactif de lyse en suspension pendant le pipettage en mélangeant à vitesse moyenne sur une plaque d'agitation magnétique.
2. De façon générale, éviter d'agiter la poche d'enrichissement et de prélever de gros fragments d'aliments. Pour les échantillons alimentaires présentant une couche grasse surnageante, prélever juste en dessous de cette couche.
3. Ouvrir les tubes et les puits avec précaution pour éviter les risques de contamination croisée.
4. Refroidir la plaque Deep Well avant de pipetter directement à travers le film préperforé.
5. Utiliser le barreau magnétique afin de maintenir le réactif de lyse en suspension. Pipetter en mélangeant à vitesse moyenne.
6. Dans un premier temps, agiter délicatement le réactif de lyse à la main pour remettre la résine en suspension. Garder le réactif de lyse en suspension pendant le pipettage en mélangeant à vitesse moyenne avec le barreau magnétique contenu dans le flacon.
7. Reconstituer le réactif de lyse final de la façon suivante :
 - a. Verser soigneusement tout le contenu du réactif F (billes de lyse) dans le réactif A (réactif de lyse).
 - b. Utiliser des consommables adaptés, avec un embout à large ouverture, pour permettre le pipettage du réactif de lyse homogénéisé.
 - c. Le réactif de lyse mélangé aux billes de lyse (réactifs A + F) présente une durée de conservation de 6 mois pour un stockage à 4 °C.

Protocole Standard II

1. Prélever 1,5 ml d'échantillon enrichi décanté dans un tube.
2. Centrifuger le tube à 10 000–12 000 x g pendant 5 min. Éliminer le surnageant.
3. Ajouter 250 µl du réactif de lyse homogénéisé (réactifs A + F) au culot obtenu et mélanger par aspiration/refoulement avec la pipette. Fermer le tube.

Remarque : dans un premier temps, agiter doucement à la main le flacon de réactif de lyse afin de remettre en suspension les billes.

4. Placer le tube dans le Cell disruptor pendant 3 ± 1 min.
5. Incuber dans le bloc de chauffage à 95–100 °C pendant 10–15 min.
6. Vortexer le tube à grande vitesse et centrifuger à 10 000–12 000 x g pendant 5 min.

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

Le surnageant peut être stocké jusqu'à 1 an à -20 °C. Avant de le réutiliser, toujours laisser décongeler, homogénéiser, puis centrifuger à 10 000–12 000 x g pendant 5 min.

Protocole Easy II

1. Aliquoter 100 µl du réactif de lyse homogénéisé (réactifs A + F) dans des tubes ou dans les puits d'une plaque à Deep Well.

Remarque : dans un premier temps, agiter doucement à la main le flacon de réactif de lyse afin de remettre en suspension les billes.

2. Ajouter 100 µl d'échantillon enrichi.

Remarque : agiter la suspension pour homogénéiser la culture et attendre le dépôt des débris avant la collecte de l'échantillon.

3. Mélanger la solution par aspiration/refoulement avec la pipette jusqu'à homogénéisation.
4. Fermer les tubes ou sceller la plaque deep well avec un film préperforé.
5. Placer les tubes dans le Cell disruptor pendant 3 ± 1 min. Incuber les tubes dans le bloc de chauffage à 95-100°C pendant 15-20 min.
6. En cas d'utilisation d'un incubateur-agitateur pour tube ou plaque deep well incuber les tubes ou plaques deep well dans l'incubateur -agitateur entre 1300 et 1600rpm à 95-100°C pendant 15-20 min.
7. Vortexer les tubes à grande vitesse et centrifuger à 10 000–12 000 x g pendant 2 min au moins. La centrifugation est inutile pour la plaque deep well.

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

Le surnageant peut être stocké jusqu'à 1 an à -20 °C. Avant de le réutiliser, toujours laisser décongeler, homogénéiser, puis centrifuger à 10 000–12 000 x g pendant 5 min.

D. PCR en temps réel

Configuration de l'instrument et du logiciel

Pour la configuration de l'instrument et du logiciel, suivre les instructions fournies dans le guide d'utilisation du système PCR en temps réel pour les kits iQ-Check.

Préparation du mélange de PCR

1. Préparer le mélange de PCR contenant la solution d'amplification (réactif C) et les sondes fluorescentes (réactif B). Le volume de mélange de PCR nécessaire dépend du nombre d'échantillons et de contrôles à analyser. Au moins un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque PCR. Utiliser le tableau de pipettage de l'annexe (Guide de calcul du mélange de PCR) pour trouver les volumes corrects pour chaque réactif.

Remarque : Le mélange de PCR (réactifs B + C) doit être utilisé immédiatement après la préparation. Il est stable pendant 1 hr maximum à une température de 2–8 °C.

2. Pipetter 45 µl de ce mélange de PCR dans chaque puits en fonction de la plaque préparée.
3. Ajouter 5 µl d'extrait d'ADN, de réactif D (contrôle négatif) ou de réactif E (contrôle positif). Ne pas vortexer l'échantillon avant le pipettage. Sceller hermétiquement les puits de la plaque de PCR ou les bandes de tubes. Pipetter avec précaution afin d'éviter la formation de bulles au fond des puits. Étape facultative : centrifuger la plaque de PCR scellée ou les bandes de tubes (rotation rapide) afin d'éliminer les bulles éventuelles.
4. Placer la plaque PCR ou les bandes de tubes dans le thermocycleur. Veiller à placer la plaque correctement, le puits A1 dans le coin supérieur gauche. Fermer le module réactionnel.

Lancement de la PCR

Pour lancer la PCR, suivre les instructions fournies dans le guide d'utilisation du système PCR en temps réel pour les kits iQ-Check.

Le fichier de protocole d'application « Lmono Fast » a été certifié par NF VALIDATION et AOAC.

E. Analyse des données

Les données peuvent être analysées directement à la fin de la PCR ou ultérieurement en ouvrant le fichier de données enregistré. Suivre les instructions du manuel d'utilisation CFX Manager IDE correspondant pour ouvrir les fichiers de données et régler les paramètres d'analyse des données.

Interprétation des résultats

Une fois que les paramètres d'analyse des données ont été définis, les résultats sont interprétés en analysant les valeurs Cq (cycle de quantification) de chaque échantillon (le cycle auquel la courbe d'amplification dépasse le seuil).

Le logiciel CFX Manager IDE assure une analyse automatisée complète des systèmes de détection par PCR en temps réel de Bio-Rad. Une vérification des caractéristiques typiques des courbes d'amplification doit être réalisée avant la publication des résultats. Contacter l'équipe d'assistance technique de Bio-Rad en cas de besoin.

Contrôles

Vérifier les contrôles positif et négatif avant d'interpréter les résultats de l'échantillon.

Pour que l'expérience soit valide, les contrôles doivent présenter les résultats du tableau ci-dessous. Dans le cas contraire, il faut répéter la réaction de PCR.

Contrôle	Détection de <i>L. monocytogenes</i> (canal FAM)	Détection de contrôle interne (canal HEX)
Contrôle négatif	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Contrôle positif	26 ≤ Cq ≤ 36	N/A

* Le logiciel indique une valeur Cq (le cycle auquel la courbe d'amplification dépasse le seuil) N/A (non applicable) lorsque la fluorescence d'un échantillon ne dépasse pas significativement le bruit de fond, et par conséquent ne croise pas le seuil.

Si les résultats des contrôles négatif et positif diffèrent des résultats indiqués dans le tableau ci-dessus (contrôle non valide), répéter la PCR et l'analyse décrites dans D. PCR en temps réel et E. Analyse des données de la Section 7 Protocole.

Échantillons

Un test PCR iQ-Check *Listeria monocytogenes* **positif** doit présenter une courbe d'amplification typique et une valeur Cq ≥ 10 pour le fluorophore FAM.

- Si la valeur Cq des deux canaux est inférieure à 10, vérifier que la courbe, en tant que données brutes, montre un aspect caractéristique d'amplification exponentielle (une ligne de départ plane, avec une augmentation rapide de la fluorescence, puis une stabilisation). Si la courbe semble correcte, l'échantillon peut être considéré comme positif pour la présence de *Listeria monocytogenes*. S'il n'y a pas de valeur Cq (Cq = N/A) pour FAM, ou si la courbe n'est pas une courbe d'amplification typique, le contrôle interne de cet échantillon doit être analysé :
- Si aucune valeur Cq n'est obtenue pour FAM et si le contrôle interne présente une valeur Cq ≥ 28, l'échantillon est considéré **négatif** pour *Listeria monocytogenes*.
- Un contrôle interne qui n'a pas non plus de valeur Cq (Cq = N/A) indique probablement un phénomène d'inhibition de la réaction de PCR. Diluer l'échantillon (réaliser une dilution à 1:10 dans de l'eau distillée stérile avec 10 µl d'extrait d'ADN, utiliser 5 µl de la dilution) et répéter le test de PCR.
- Si la valeur Cq pour le contrôle interne est < 28, il n'est pas possible d'interpréter le résultat. Vérifier que le seuil a été placé correctement ou que la courbe de données brutes est une courbe d'amplification normale. Si la courbe n'a pas de forme caractéristique, répéter le test de PCR.

L'interprétation des résultats de l'échantillon est résumée dans le tableau suivant.

Détection de <i>L. monocytogenes</i> (canal FAM)	Détection de contrôle interne (canal HEX)	Interprétation
Cq ≥ 10	N/A	Positif
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Négatif
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition*

* Lorsque la détection pour la cible et le contrôle interne donne une valeur Cq = N/A, l'extrait d'ADN doit être dilué au 1:10 et testé à nouveau.

Un non-respect des critères de validation peut entraîner une interprétation non valide. Vérifier les données brutes et continuer de la même façon que pour un cas d'inhibition de l'échantillon.

Section 8

Confirmation des résultats positifs

Dans le contexte de la méthode certifiée NF VALIDATION, tous les résultats iQ-Check positifs doivent être confirmés de l'une des façons suivantes :

1. Mise en œuvre des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées CEN ou ISO, directement à partir du bouillon Fraser demi ou à partir de l'échantillon lors d'un test avec LSB ou LSB II.
2. Isolement en bouillon LSB ou LSB II enrichi (striation de 100 µl) sur gélose chromogène RAPID'*Listeria* spp. ou RAPID'*L.mono* et incubation pendant 24 hr à 37 ± 1 °C. La présence de colonies caractéristiques sur la gélose RAPID'*L.mono* suffit à confirmer la présence de *L. monocytogenes*. Utiliser un test d'identification pour confirmer la présence de *L. monocytogenes* sur le milieu de culture RAPID'*Listeria* spp.
3. Isolement en bouillon LSB ou LSB II enrichi (striation de 10 µl) sur gélose AL ou PALCAM et incubation pendant 24–48 hr à 37 ± 1 °C. Les colonies caractéristiques doivent être confirmées avec les tests décrits dans la méthode ISO jusqu'à ce que les espèces soient identifiées.
4. Utilisation de toute autre méthode certifiée par NF VALIDATION basée sur un principe différent de celui utilisé dans le test PCR iQ-Check *L. monocytogenes* II. Le protocole validé de cette seconde méthode doit être suivi dans sa totalité.

En cas de résultats discordants entre iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit et l'une des options de confirmation énumérées ci-dessus, mettre en œuvre les étapes nécessaires pour garantir la validité du résultat.

Avant d'effectuer la confirmation, il est possible de stocker le bouillon LSB ou LSB II enrichi à 2–8 °C pendant 72 hr maximum, à la suite de l'incubation à 30 °C.

Dans le contexte de la validation AOAC, un résultat iQ-Check *L. monocytogenes* positif est présumé positif, et une confirmation selon une méthode de référence appropriée (par exemple, USDA MLG, FDA BAM, ISO, MFHPB, etc.) est recommandée. Sinon, pour des matrices sélectionnées, strier 10 µl de LSB ou LSB II enrichi directement sur la gélose chromogène RAPID'*L.mono*, RAPID'*Listeria* spp. ou *Listeria* et incuber pendant 24 hr à 37 ± 1 °C. La présence de colonies caractéristiques *Listeria monocytogenes* doit être confirmée par un test biochimique pour la présence avérée de *Listeria monocytogenes*.

Section 9

Confirmation de colonies isolées à l'aide du kit iQ-Check

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit peut également être utilisé pour confirmer des colonies isolées de *Listeria monocytogenes* sur plaques gélosées. Cette méthode est officiellement validée par la certification AFNOR des milieux de culture chromogènes RAPID'*L.mono* et RAPID'*Listeria* spp.

1. Choisir une colonie isolée sur un milieu de culture gélosé sélectif ou non sélectif, avec un cure-dent, une anse stérile ou un autre consommable adapté (par exemple, un embout de pipette).
2. Remettre en suspension la colonie dans 100 µl de tryptone-sel ou d'eau distillée stérile dans un microtube à centrifuger. Vortexer pour homogénéiser.
3. Utiliser 5 µl de la suspension avec 45 µl de mélange de PCR (voir D. PCR en temps réel, Section 7 Protocole) et suivre le reste du protocole iQ-Check *L. monocytogenes* II pour l'interprétation des données et des résultats.

Section 10

Performance du test et validations

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit est spécifiquement destiné à la détection de *L. monocytogenes*



BRD 07/10-04/05

MÉTHODES
D'ANALYSE
ALTERNATIVES
POUR LE SECTEUR
AGROALIMENTAIRE

<http://nf-validation.afnor.org>

NF VALIDATION

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit est certifié NF VALIDATION comme méthode alternative à la méthode de référence ISO 11290-1:2017 (voir référence 4, Section 11) pour la détection de *L. monocytogenes* dans tous les produits destinés à la consommation humaine et dans les échantillons environnementaux. La validation respecte le protocole de la norme ISO 16140-2:2016 (voir référence 5, Section 11) et inclut l'utilisation du système PCR en temps réel CFX96 Touch Deep Well System et CFX Opus Deepwell System. L'utilisation de la solution d'élimination de l'ADN libre « iQ-Check Free DNA Removal Solution » est validée pour aliments composés, produits laitiers et les échantillons environnementaux de production. Le logiciel associé est CFX Manager IDE (version 2.2 et ultérieure). Le fichier de protocole d'application « Lmono Fast » est validé. Numéro de certificat : BRD 07/10-04/05. Fin de validité : se reporter au certificat disponible sur le site Web AFNOR Certification.



Validation AOAC

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit (protocole Easy II) a été validé par AOAC Research Institute dans le cadre du programme « Performance Tested Methods » pour la détection de *L. monocytogenes* sur les produits de viande de dinde transformée, les hot-dogs, le saumon fumé et le fromage frais. Il convient de considérer un résultat positif avec iQ-Check comme étant présumé positif et il est recommandé de le confirmer conformément aux recommandations de la section 8. LSB, LSB II, le fichier de protocole d'application « Lmono Fast », l'utilisation d'iQ-Check Free DNA Removal Solution et des systèmes de PCR en temps réel CFX96 Touch Deep Well System et CFX Opus Deepwell System sont validés pour tous les échantillons. Le logiciel associé est CFX Manager IDE (version 2.2 et ultérieure). Numéro de certificat : 010802.



Validation Santé Canada

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit (protocole Easy II) a été validé par Santé Canada (MFLP-54) pour la détection de *L. monocytogenes* sur les produits de viande et volaille prêtes-à-manger traitées thermiquement, fruits et légumes (à l'exception des légumes transformés crus), poissons et produits de la mer (à l'exception du poisson fumé), produits laitiers glacés et fermentés (25 g et 125 g). Il convient de considérer un résultat positif avec iQ-Check comme étant présumé positif et il est nécessaire de le confirmer selon le document MFHPB-30 (voir référence 2, Section 11).



Validation NordVal

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

- Enrichissement en bouillon Fraser demi suivi du protocole Standard II Lysis
- Enrichissement en bouillon *Listeria* Special Broth suivi du protocole Standard II Lysis
- Enrichissement en bouillon *Listeria* Special Broth (LSB), suivi du protocole Easy II Lysis, sans la première étape de centrifugation

Numéro de certificat : 037. Se reporter au certificat disponible sur le site Web NordVal pour obtenir la date d'expiration.

Section 11

Références

AOAC Official Method 993 .12-1996(1999). *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. Selective enrichment and isolation method.

Health Canada (2011). Health Products and Food Branch. MFHPB-30. Isolation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. from foods and environmental samples. The Compendium of Analytical Methods, Volume 2, February 2011.

ISO 7218. Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations.

ISO 11290-1:2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp. — Partie 1 : Méthode de recherche.

ISO 16140-2:2016. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Validation des méthodes — Partie 2 : Protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence.

ISO 22174. Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences générales et définitions.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2021). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 8 .13: Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, ready-to-eat siluriformes (fish) and egg products, and environmental samples.
https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-09/MLG-8.13.pdf, accessed February 14, 2020.

United States Food and Drug Administration (2017). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>, accessed February 14, 2020.

Section 12

Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Octobre 2023	10000167776 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Modification du numéros de document - version précédente 10000123535 Ver C iQ-Check <i>Listeria monocytogenes</i> II- Extension de la validation AFNOR : LSB II pour les aliments composés, les échantillon d'environnement de production et les produits laitiers

Annexe — Guide de calcul du mélange de PCR

Pour trouver les volumes corrects de la préparation du mélange de PCR, additionner le nombre total d'échantillons et de contrôles à analyser et trouver les volumes correspondants de réactif B et de réactif C dans le tableau.

Nombre total d'échantillons et de contrôles	Sondes réactif B, µl	Mélange d'amplification Réactif C, µl	Nombre total d'échantillons et de contrôles	Sondes réactif B, µl	Mélange d'amplification Réactif C, µl	Nombre total d'échantillons et de contrôles	Sondes réactif B, µl	Mélange d'amplification Réactif C, µl
1	5	40	33	178	1 400	65	351	2 800
2	11	86	34	184	1 500	66	356	2 900
3	16	130	35	189	1 500	67	362	2 900
4	22	173	36	194	1 600	68	367	2 900
5	27	216	37	200	1 600	69	373	3 000
6	32	259	38	205	1 600	70	378	3 000
7	38	302	39	211	1 700	71	383	3 100
8	43	346	40	216	1 700	72	389	3 100
9	49	389	41	221	1 800	73	394	3 200
10	54	432	42	227	1 800	74	400	3 200
11	59	475	43	232	1 900	75	405	3 200
12	65	518	44	238	1 900	76	410	3 300
13	70	562	45	243	1 900	77	416	3 300
14	76	605	46	248	2 000	78	421	3 400
15	81	648	47	254	2 000	79	427	3 400
16	86	691	48	259	2 100	80	432	3 500
17	92	734	49	265	2 100	81	437	3 500
18	97	778	50	270	2 200	82	443	3 500
19	103	821	51	275	2 200	83	448	3 600
20	108	864	52	281	2 200	84	454	3 600
21	113	907	53	286	2 300	85	459	3 700
22	119	950	54	292	2 300	86	464	3 700
23	124	994	55	297	2 400	87	470	3 800
24	130	1 000	56	302	2 400	88	475	3 800
25	135	1 100	57	308	2 500	89	481	3 800
26	140	1 100	58	313	2 500	90	486	3 900
27	146	1 200	59	319	2 500	91	491	3 900
28	151	1 200	60	324	2 600	92	497	4 000
29	157	1 300	61	329	2 600	93	502	4 000
30	162	1 300	62	335	2 700	94	508	4 100
31	167	1 300	63	340	2 700	95	513	4 100
32	173	1 400	64	346	2 800	96	518	4 100

Visitez bio-rad.com/iqcheck pour plus d'informations

BIO-RAD est une marque déposée de Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK est une marque déposée de Bio-Rad Europe GmbH dans certaines juridictions.

Toutes les marques déposées utilisées dans ce document appartiennent à leurs propriétaires respectif



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23 **Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23 **Finland** 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300 **Hungary** 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000 **Korea** 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23 **Russian Federation** 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23 **Sweden** 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311 **United Arab Emirates** 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

iQ-Check *Listeria* *monocytogenes* II Kit

Anwenderhandbuch

**Test zum Nachweis von *L. monocytogenes* in Lebensmittel-
und Umgebungsproben durch die Real-Time PCR**

Katalog-Nr. 3578124

BIO-RAD

Inhaltsverzeichnis

Abschnitt 1.	Einleitung.....	1
Abschnitt 2.	Die iQ-Check <i>L. monocytogenes</i> II-Technologie	1
Abschnitt 3.	Zusammensetzung des Kits	2
Abschnitt 4.	Haltbarkeit und Lagerung	2
Abschnitt 5.	Zusätzlich benötigtes Material	2
	Geräte.....	2
	Zubehör	3
Abschnitt 6.	Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse	4
Abschnitt 7.	Protokoll.....	6
	Probenanreicherung	6
	Behandlung zur Entfernung freier DNA	7
	DNA-Extraktion	8
	Real-Time PCR	9
	Datenanalyse.....	10
Abschnitt 8.	Bestätigung positiver Ergebnisse	11
Abschnitt 9.	Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit	12
Abschnitt 10.	Testleistung und Testvalidierungen	12
Abschnitt 11.	Literatur	14
Abschnitt 12.	Revisionshistorie	15
	Anhang — Pipettiertabelle für das PCR-Reaktionsgemisch	16

Abschnitt 1

Einleitung

Herkömmliche bakteriologische Methoden sind oft langwierig und aufwändig. Bei iQ-Check *Listeria monocytogenes* II handelt es sich dagegen um einen einfachen und schnellen qualitativen Test zum Nachweis *L. monocytogenes* spezifischer DNA-Sequenzen in Umgebungsproben und Nahrungsmittelerzeugnissen. Mithilfe der Real-Time Polymerasekettenreaktion (PCR) werden *L. monocytogenes* spezifische DNA Sequenzen amplifiziert und gleichzeitig durch fluoreszierende Sonden nachgewiesen. In einem einfach durchzuführenden Verfahren können bei minimalem Kontaminationsrisiko bis zu 94 Proben bearbeitet werden. Die Anwenderzielgruppe ist geschultes Laborpersonal, das Tests zum Nachweis von *L. monocytogenes* durchführt. Mit diesem Test können Ergebnisse innerhalb weniger Stunden nach Anreicherung erhalten werden.

Abschnitt 2

Die iQ-Check *L. monocytogenes* II-Technologie

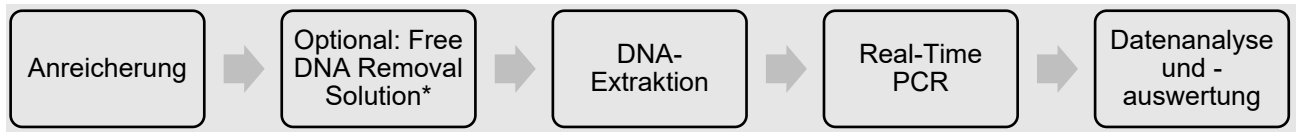
Das iQ-Check *L. monocytogenes* II Kit ist ein Test, der auf der Amplifizierung und dem Nachweis von Genen mittels Real-Time PCR beruht. Die gebrauchsfertigen PCR-Reagenzien im Kit enthalten *L. monocytogenes* spezifische Oligonukleotide (Primer und Sonden) sowie DNA-Polymerase und Nukleotide. Der Nachweis und die Datenanalyse sind für die Verwendung eines Real-Time PCR Gerätes von Bio-Rad, z. B. des CFX96 Touch Deep Well Systems, optimiert.

Die PCR ist eine leistungsstarke Technik, mit der viele Kopien der Ziel-DNA erzeugt werden können. Während der PCR-Reaktion wird die DNA in mehreren Erwärmungs- und Abkühlzyklen durch Hitze denaturiert. Danach binden Primer an die Zielregion. Die DNA-Polymerase verwendet diese Primer und die Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) zur Verlängerung der DNA, wodurch Kopien der Ziel-DNA erzeugt werden. Diese Kopien werden als Amplikons bezeichnet.

Bei der Real-Time PCR beruht der DNA-Nachweis auf der Hybridisierung spezifischer Sonden während der Amplifikation an die Amplikons. An diese Sonden ist ein Fluorophor gebunden, der nur fluoresziert, wenn die Sonde an die Zielsequenz hybridisiert. Bei dem Fluorophor, der an die Sonde gebunden ist, die mit der *L. monocytogenes* spezifischen DNA-Sequenz hybridisiert, handelt es sich um FAM. Wenn keine Ziel-DNA vorhanden ist, ist keine Fluoreszenz nachweisbar. Da sich die Zahl der Amplikons mit jeder Amplifizierungsrunde erhöht, verstärkt sich auch die Fluoreszenzintensität. Beim Annealing-Schritt jedes PCR-Zyklus misst das optische Modul diese Fluoreszenz, während die zugehörige Software die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zyklen aufträgt.

Das Reaktionsgemisch enthält eine synthetische interne DNA-Kontrolle, um jedes etwaige negative Ergebnis zu validieren. Diese Kontrolle wird gleichzeitig mit der *L. monocytogenes* -DNA-Zielsequenz mit einer spezifischen Sonde amplifiziert und durch einen zweiten Fluorophor nachgewiesen.

Dieser Test gestattet den qualitativen Nachweis von *L. monocytogenes* in ausgewählten Lebensmittel- und Umgebungsproben, die zuvor durch Kultur angereichert wurden. Er umfasst die folgenden fünf Hauptschritte:



* Hinsichtlich der Verwendungsbedingungen ist das Anwenderhandbuch für die iQ-Check Free DNA Removal Solution (Katalog-Nr. 1000058391) zu beachten.

Abschnitt 3

Zusammensetzung des Kits

Das iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit enthält ausreichende Reagenzien für 96 Tests (94 Proben).

Reagenz-ID	Reagenz	Menge
A	Lysereagenz	1 Flasche, 20 ml
B	Fluoreszenzsonden	1 Röhrchen, 0,55 ml
C	Amplifikationsmix	1 Röhrchen, 4,4 ml
D	PCR-Negativkontrolle	1 Röhrchen, 0,5 ml
E	PCR-Positivkontrolle	1 Röhrchen, 0,25 ml
F	Lysis Beads	1 Flasche, 17,6 g

Abschnitt 4

Haltbarkeit und Lagerung

Nach dem Erhalt muss das Kit bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Bei Aufbewahrung bei dieser Temperatur können die Reagenzien bis zu dem auf den Röhrchen angegebenen Verfallsdaten verwendet werden. Die Haltbarkeit des Lyse-Reagenzes beträgt 6 Monate, nachdem es mit den Lysis Beads gemischt worden ist.

Abschnitt 5

Zusätzlich benötigtes Material

Geräte

- Labor-Paddel-Blender zum Homogenisieren von Testproben
- Inkubator zur mikrobiologischen Anreicherung der Proben
- Speziell für die Extraktion in sterilen konischen 1,5 ml Röhrchen mit Schraubdeckel:
 - Tischzentrifuge (10.000–12.000 x g)
 - Heitzrockenblock mit 37 ± 2 °C und/oder 95–100 °C

- Zellaufschlussgerät, z. B. Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)
- Speziell für die Extraktion in einer Deep Well Platte:
 - Thermoshaker mit Heizfunktion*, der eine Temperatur von 37 ± 2 °C und/oder 95–100 °C aufrecht erhalten kann, mit einer Mischgeschwindigkeit von mindestens 1.300 rpm
- Vortex
- Magnetrührer
- Mikropipetten für 20 µl, 200 µl, 1.000 µl
- Bio-Rad Real-Time PCR System,* zum Beispiel das Real-Time PCR System CFX96 Touch Deep Well (Katalog-Nr. 3600037) oder CFX Opus Deep Well (Katalog-Nr. 17007991)
- iQ-Check Prep System von Bio-Rad für die automatisierte DNA-Extraktion und PCR-Plattenvorbereitung (Katalog-Nr. 3594911)

Hinweis: Wir empfehlen die Verwendung einer unterbrechungsfreien Stromversorgung (USV) mit dem Thermocycler und dem iQ-Check Prep System.

* Informationen zu empfohlenen Geräten erhalten Sie vom technischen Kundendienst von Bio-Rad.

Zubehör

- Anreicherungsmedium: Listeria Special Broth (LSB) (Katalog-Nr. 3555703, 6 Flaschen x 225 ml; Katalog-Nr. 3564703, dehydriert, 500 g; Katalog-Nr. 3555793, 2 Beutel x 5 L; Katalog-Nr. 3564753, dehydriert, 5 kg) oder Half Fraser Broth (Katalog-Nr. 3564604, dehydriert, 500 g; Katalog-Nr. 3555797, 6 Flaschen x 225 ml; Katalog-Nr. 3555794, 4 Beutel x 3 L)
- Anreicherungsmedium: Listeria Special Broth II (LSB II) (Katalog-Nr. 12017463, 6 Flaschen x 225 ml; Katalog-Nr. 12017388, dehydriert, 500 g; Katalog-Nr. 12017378, dehydriert, 5 kg)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (Lösung zur Entfernung von freier DNA, Katalog-Nr. 3594970)
- Speziell für die Untersuchung von Umgebungsproben:
 - Schwämme zur Gewinnung von Umgebungsproben
 - Tupfer zur Gewinnung von Umgebungsproben
 - Neutralisierungsmedium für Probennahme-Schwämme und -Tupfer, z. B. Dey-Engley (D/E) oder HiCap Neutralizing Broth oder Lethen Broth
- Speziell für die Extraktion in Röhrchen:
 - Konische sterile 1,5 ml Röhrchen mit Schraubdeckel (z. B. Katalog-Nr. 2240110XTU)
- Speziell für die Extraktion in einer Deep Well Platte:
 - Deep Well Platte mit 96 Wells (Katalog-Nr. 3594900)
 - Abdichtungsfolie aus Kunststoff (Katalog-Nr. 3590139)
 - X-Pierce Abdichtungsfolien (Katalog-Nr. 3593977) oder vorgestanzte Plattenabdichtungsfolie (Katalog-Nr. 3600040, nur in Nordamerika)
- Speziell für die Extraktionsprotokolle Standard II und Easy II:
 - iQ-Check Lysis Beads (Reagenz F) (Katalog-Nr. 3578136)
 - 200 µl Pipettenspitzen mit weiter Öffnung

- Speziell für das iQ-Check Prep System:
 - 60 ml Verdünnungsbehältnis (Katalog-Nr. 3594904)
 - Filterspitzen (Katalog-Nr. 3594902 oder 12014486: 50 µl; Katalog-Nr. 3594903 oder 12014483: 1.000 µl)
- PCR-Mix Röhrchen (Katalog-Nr. 12016673, 25 x 5 ml)
- RAPID'*Listeria* spp. Agar* (Katalog-Nr. 3564744, dehydriert, 500 g; Katalog-Nr. 3564745, Supplement 1; Katalog-Nr. 3564746, Supplement 2)
- RAPID'*L.mono* Agar* (Katalog-Nr. 3563694, 20 Agarplatten x 90 mm; Katalog-Nr. 3555294, Kit für 190 ml Agar plus 2 Supplements; Katalog-Nr. 3564293, dehydriert, 500 g; Katalog-Nr. 3564294, Supplement 1; Katalog-Nr. 3564746, Supplement 2)
- PCR-Platten, -Röhrchen, -Abdichtungsfolie und -Deckel
- Sterile Filterspitzen für 20 µl, 200 µl und 1.000 µl Mikropipetten
- Sterile, einzeln verpackte Spitzen für Combitip-Pipetten oder äquivalente Mehrfachpipetten
- 1 ml und 10 ml Pipetten
- Sterile 2 ml und 5 ml Teströhrchen
- Ungepuderte Handschuhe
- Destilliertes steriles Wasser
- 5%ige Bleichlösung
- Reinigungsmittel wie DNA AWAY oder RNase AWAY

* Kann außerhalb der AOAC-PTM-Validierung verwendet werden.

Abschnitt 6

Vorsichtsmaßnahmen und Empfehlungen für optimale Ergebnisse

- Dieser Test muss von geschultem Personal durchgeführt werden.
- Schwangere, Kinder, ältere Menschen und immungeschwächte Personen sollten diese Methode aufgrund der mit diesen Gruppen verbundenen hohen Infektions- und Sterberaten weder durchführen noch mit *L. monocytogenes* in Kontakt gelangen.
- Proben und Anreicherungskulturen sind bei der Handhabung als potenziell infektiös zu betrachten und im Einklang mit vor Ort geltenden Verordnungen und Bestimmungen zu entsorgen.
- Alle potenziell infektiösen Materialien sollten vor dem Entsorgen autoklaviert werden.
- Die Ergebnisqualität hängt von der strikten Einhaltung der guten Laborpraxis ab (zum Beispiel der Norm EN ISO 7218). In Bezug auf die PCR ist vor allem Folgendes zu beachten:
 - Laborgeräte (Pipetten, Röhrchen usw.) nie von einem Arbeitsplatz zu einem anderen bringen.
 - Bei jeder Serie von Amplifikationsreaktionen eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle verwenden.
 - Die Reagenzien nach Ablauf ihres Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

- Die Reagenzien aus dem Kit vor dem Gebrauch auf dem Vortex mischen, um ihre Homogenität sicherzustellen.
- Die Genauigkeit und Präzision der Pipetten sowie die ordnungsgemäße Funktion der Geräte regelmäßig überprüfen.
- Handschuhe häufig wechseln, vor allem dann, wenn vermutet wird, dass sie kontaminiert sein könnten.
- Die Arbeitsplätze regelmäßig mit 5%iger Bleichlösung und anderen Dekontaminationsmitteln, z. B. DNA AWAY, reinigen.
- Ungepuderte Handschuhe verwenden, und Fingerabdrücke und Beschriftungen auf Röhrchendeckeln vermeiden, da dies die Datenerfassung beeinträchtigen würde.
- Es wird dringend empfohlen, die in der Norm EN ISO 22174:2005 „Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Allgemeine Anforderungen und Begriffe“ beschriebenen Anforderungen einzuhalten.
- iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit:
 - Alle Substanzen oder Mischungen in dem Testkit sind klassifizierte Produkte gemäß dem globalen vereinheitlichten System (Global Harmonized System, GHS). Der Kontakt mit Säuren kann zur Freisetzung giftiger Gase führen. Bei korrekter Anwendung sind keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen erforderlich. Bei Einatmen des Produktes Frischluft zuführen und bei Beschwerden einen Arzt hinzuziehen. Nach Augenkontakt mit dem Produkt das geöffnete Auge mehrere Minuten unter fließendem Wasser ausspülen. Wenn die Produkte verschluckt werden, Erbrechen herbeiführen und ärztliche Hilfe anfordern.
- iQ-Check Prep System:
 - Die unsachgemäße Verwendung des iQ-Check Prep Systems kann zu Personenverletzungen oder Schäden am Gerät führen.
Einige Komponenten können bei unsachgemäßer Handhabung aufgrund übermäßiger Hitze zu Personenverletzungen führen. Zur sicheren Verwendung darf das iQ-Check Prep System nur von qualifiziertem Laborpersonal verwendet werden, das entsprechend geschult wurde. Die Wartung des Geräts darf nur von Außendiensttechnikern von Bio-Rad durchgeführt werden.
- Real-Time PCR Nachweissystem CFX96 Touch Deep Well oder CFX Opus Deep Well:
 - Die unsachgemäße Verwendung des CFX96 Touch Deep Well Systems oder des CFX Opus Deep Well Systems kann zu Personenverletzungen oder Schäden am Gerät führen. Einige Komponenten können bei unsachgemäßer Handhabung aufgrund übermäßiger Hitze zu Personenverletzungen führen. Für eine sichere Nutzung darf das CFX96 Touch Deep Well System und das CFX Opus Deep Well System nur von qualifiziertem Laborpersonal bedient werden, das entsprechend geschult wurde. Die Wartung des Geräts darf nur von Außendiensttechnikern von Bio-Rad durchgeführt werden.
- Anreicherung:
 - Der Benutzer sollte alle Sicherheitshinweise in den Anweisungen des iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kits lesen, verstanden haben und befolgen. Die Sicherheitshinweise zum späteren Nachschlagen aufbewahren. Um die mit der Exposition gegenüber Chemikalien und biologischen Gefahren verbundenen Risiken zu verringern, sind Pathogentests in einem ordnungsgemäß ausgestatteten Labor unter der Kontrolle von geschultem Personal durchzuführen. Beim Umgang mit Reagenzien und kontaminierten Proben sind stets die üblichen Laborsicherheitspraktiken einzuhalten, beispielsweise sind geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille zu tragen. Den Kontakt mit dem Inhalt des Anreicherungsmediums und der

Reagenzröhrchen nach der Anreicherung vermeiden. Angereicherte Proben im Einklang mit den aktuellen Branchenstandards entsorgen.

- *Listeria* ist ein Organismus der Biosicherheitsstufe 2. Biologische Proben, z. B. Anreicherungen, können Infektionskrankheiten übertragen. Es sind alle geltenden lokalen, staatlichen/regionalen und/oder nationalen Vorschriften zur Entsorgung von biologischen Abfällen einzuhalten. Geeignete Schutzausrüstung tragen, einschließlich unter anderem Schutzbrille, Gesichtsschutz, Kleidung/Laborkittel und Handschuhe. Alle Arbeiten sollten in ordnungsgemäß ausgestatteten Einrichtungen unter Verwendung der entsprechenden Sicherheitsausrüstung (z. B. physikalische Eindämmungsvorrichtungen) durchgeführt werden. Mitarbeiter sollten vor der Arbeit mit potenziell infektiösen Materialien nach den geltenden Bestimmungen und Anforderungen der Firma/Institution geschult werden.
- Nach Abschluss der Tests sind alle Materialien und Medien, die möglicherweise Krankheitserreger enthalten, im Einklang mit den geltenden Industriestandards für die Entsorgung kontaminierter Abfälle zu dekontaminieren (d. h. 20 min bei 121 °C autoklavieren). Weitere Informationen und vor Ort geltende Entsorgungsvorschriften sind im Sicherheitsdatenblatt aufgeführt.

Abschnitt 7

Protokoll

A. Probenanreicherung

Es wird dringend empfohlen, vor Beginn des Tests das gesamte Protokoll durchzulesen.

Das Anreicherungsmedium muss vor der Verwendung die geeignete Inkubationstemperatur (Umgebungstemperatur oder 30 °C/37 °C, falls erforderlich) aufweisen.

Die Verwendung eines Anreicherungsbeutels mit eingebautem Filter wird dringend empfohlen.

Im Rahmen der NF VALIDATION wurden keine Mengen über 25 g getestet. Ohne Schütteln inkubieren, wobei die Zeit- und Temperaturangaben in der nachstehenden Tabelle zu beachten sind. Es ist auch möglich, den iQ-Check Test mit LSB durchzuführen, die angereichert und anschließend bis zu 72 hr bei 2–8 °C gelagert wurde.

In der folgenden Tabelle sind die verschiedenen Protokolle angeführt, die je nach Anwendung und Umfang der Validierung verwendet werden:

NF VALIDATION BRD 7/10-04/05 und NordVal 037		
Umfang (Matrices)	Probenvorbereitung	Anreicherung/DNA-Extraktion
Alle Lebensmittelzeugnisse und Umgebungsproben ¹	<i>n</i> g Lebensmittel in 9 x <i>n</i> ml Half Fraser Broth oder LSB homogenisieren.	<p>Standard II Extraktion (Half Fraser)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 24–26 hr bei 30 ± 1 °C inkubieren ▪ Röhrchenformat <p>Standard II Extraktion (LSB)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Für 22–24 hr bei 30 ± 1 °C inkubieren ▪ Röhrchenformat <p>Easy II Extraktion (LSB)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Für 24–26 hr bei 30 ± 1 °C inkubieren ▪ Röhrchenformat

Produktionsumgebung und -flächen ²	<i>n</i> g Lebensmittel in 9 x <i>n</i> ml vorgewärmtem LSB oder LSB II bei Raumtemperatur homogenisieren.	Easy II Extraktion (LSB) <ul style="list-style-type: none"> Für 18–26 hr bei 30 ± 1 °C inkubieren Röhrchen/Deep Well-Format Easy II Extraktion (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> Für 18–26 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren Röhrchen/Deep Well-Format
Zusammengesetzte Lebensmittel ²	<i>n</i> g Lebensmittel in 9 x <i>n</i> ml LSB II homogenisieren.	Easy II Extraktion (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> Für 18–26 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren Deep Well-Format
Milchprodukte ²	<i>n</i> g Lebensmittel in 9 x <i>n</i> ml vorgewärmtem LSB II homogenisieren.	Easy II Extraktion (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> Für 20–28 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren Deep Well-Format
AOAC PTM 010802		
Umfang (Matrices)^{2,3}	Probenvorbereitung	Anreicherung/DNA-Extraktion
Truthahn-Aufschnitt, Hotdogs, Räucherlachs, Hüttenkäse	<i>n</i> g Lebensmittel in 9 x <i>n</i> ml LSB oder LSB II homogenisieren (25 g in 225 ml; 125 g in 1.125 ml)	Easy II Extraktion (LSB) <ul style="list-style-type: none"> Für 24–26 hr bei 30 ± 1 °C inkubieren Röhrchen/Deep Well-Format Easy II Extraktion (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> Für 18–24 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format
Edelstahloberflächen	Umgebungsproben <ul style="list-style-type: none"> Tupfer und Schwämme mit einer neutralisierenden Nährlösung befeuchten, die keinen Arylsulfonatkomplex enthält. Bei Verwendung eines Tupfers sollte die Probe von einer Fläche der Größe 2,54 x 2,54 cm genommen werden. Bei Verwendung eines Schwamms sollte die Probe von einer Fläche der Größe 10,16 x 10,16 cm genommen werden. Ausreichend LSB II zugeben, um den Tupfer oder den Schwamm zu bedecken (10 ml bzw. 60–225 ml). 	Easy II Extraktion <ul style="list-style-type: none"> Für 16–24 hr bei 37 ± 1 °C inkubieren. Röhrchen/Deep Well-Format
Siehe MFLP-54 bezüglich Matrices und Protokollen mit Freigabe von Health Canada		

¹ Die Validierung umfasst die Verwendung der Anwendungsprotokolldatei „Lmono Fast“ für eine kürzere PCR-Laufzeit. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihre Bio-Rad-Vertretung.

² Die Validierung umfasst die Verwendung der iQ-Check Free DNA Removal Solution und der Anwendungsprotokolldatei „Lmono Fast“ für eine kürzere PCR-Laufzeit. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Ihre Bio-Rad-Vertretung.

³ Die Validierung umfasst den direkten Ausstrich auf RAPID'L. *mono*-, RAPID'L *Listeria* spp.- oder Agar *Listeria* -Platten (ausgenommen Rohmilchkäse)

B. Behandlung zur Entfernung freier DNA

Die iQ-Check Free DNA Removal Solution ist speziell dafür vorgesehen, freie DNA zu entfernen.

Es sind die Empfehlungen von Bio-Rad im Anwenderhandbuch zu beachten (Dokument-Nr. 10000058391). Dieses Protokoll wurde im Rahmen der AFNOR-Zertifizierung in der Kategorie „Umgebungsproben aus dem Bereich Produktion“ validiert.

C. DNA-Extraktion

Allgemeine Empfehlungen:

1. Den Heizblock oder den Thermoshaker zum Vorheizen einschalten, bevor mit dem Test begonnen wird. Auf 95–100 °C einstellen. Das Lysereagenz während des Pipettierens durch Rühren bei mittlerer Geschwindigkeit auf einer Magnetrührplatte in Suspension halten.
2. Generell sollte vermieden werden, den Anreicherungsbeutel zu schütteln und große Lebensmittelfragmente in der Probe zu entnehmen. Bei Lebensmittelproben mit fettigem Überstand sollte die Probe knapp unterhalb dieser Schicht entnommen werden.
3. Beim Öffnen von Röhrcchen und Wells vorsichtig vorgehen, um eine mögliche Kreuzkontamination zu vermeiden.
4. Die Deep Well Platte kühlen, bevor direkt durch die vorgestanzte Abdichtungsfolie pipettiert wird.
5. Den Magnetrührer verwenden, um das Lysereagenz in Suspension zu halten. Den Pipettiervorgang durchführen, während es bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt wird.
6. Das Lysereagenz zuerst vorsichtig per Hand schütteln, um das Harz zu resuspendieren. Das Lysereagenz pipettieren, während es bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt wird (Magnetrührstab befindet sich in der Flasche), damit es in Suspension bleibt.
7. Das Lysereagenz wie folgt zur Verwendung rekonstituieren:
 - a. Den Inhalt von Reagenz F (Lysis Beads) vollständig zu Reagenz A (Lysereagenz) geben.
 - b. Zum Pipettieren des homogenisierten Lysereagenzes Pipettenspitzen mit ausreichend großer Öffnung verwenden.
 - c. Das mit Lysis Beads gemischte Lysereagenz (Reagenz A + F) ist bei 4 °C für 6 Monate haltbar.

Protokoll Standard II

1. 1,5 ml dekantierte angereicherte Probe in ein Röhrcchen überführen.
2. Das Röhrcchen bei 10.000–12.000 x g 5 min zentrifugieren. Den Überstand verwerfen.
3. 250 µl homogenisiertes Lysereagenz (Reagenz A + F) zu dem Pellet geben und das Pellet durch Auf- und Abpipettieren des Reagenzes resuspendieren. Das Röhrcchen verschließen.

Hinweis: Das Lysereagenz zuerst vorsichtig per Hand schütteln, um die Beads zu resuspendieren.

4. Das Röhrcchen für 3 ± 1 min in den Thermoshaker oder das Zellaufschlussgerät geben.
5. Für 10–15 min in den jeweiligen auf 95–100 °C vorgeheizten Heizblock stellen.
6. Das Röhrcchen bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortex mischen und dann 5 min bei 10.000–12.000 x g zentrifugieren.

Dies ist der empfohlene Zeitpunkt, um die Probenaufbereitungen vorübergehend zu unterbrechen. Der Überstand kann bis zu 1 Jahr bei -20 °C gelagert werden. Vor der erneuten Verwendung stets auftauen und homogenisieren und anschließend 5 min bei 10.000–12.000 x g zentrifugieren.

Protokoll Easy II

1. 100 µl homogenisiertes Lysereagenz (Reagenz A + F) in Röhrcchen oder Wells einer Deep Well Platte aliquotieren.

Hinweis: Das Lysereagenz zuerst vorsichtig per Hand schütteln, um die Beads zu resuspendieren.

2. 100 µl der angereicherten Probe zugeben.

Hinweis: Die Suspension schütteln, um die Kultur zu homogenisieren, und dann vor der Probenentnahme alle Partikel absetzen lassen.

3. Die Lösung durch Auf- und Abpipettieren mischen, bis sie homogen ist.
4. Die Röhrrchen verschließen bzw. die Deep Well Platte mit orgestanzter Abdichtungsfolie verschließen.
5. Die Röhrrchen für 3 ± 1 min in den Cell Disruptor geben. Inkubieren Sie die Röhrrchen im Heizblock bei $95-100^{\circ}\text{C}$ für 15-20 min.
6. Bei Verwendung eines Thermoschüttlers im Röhrrchen oder Deep Well Plattenformat werden die Röhrrchen oder Deep Well Platten bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 1300 bis 1600 rpm und einer Temperatur von $95-100^{\circ}\text{C}$ für 15-20 min inkubiert.
7. Die Röhrrchen bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortex mischen und dann mindestens 2 min bei $10.000-12.000 \times g$ zentrifugieren.

Deep Well Platten brauchen nicht zentrifugiert zu werden.

Dies ist der empfohlene Zeitpunkt, um die Probenaufbereitungen vorübergehend zu unterbrechen.

Der Überstand kann bis zu 1 Jahr bei -20°C gelagert werden. Vor der erneuten Verwendung stets auftauen und homogenisieren und anschließend 5 min bei $10.000-12.000 \times g$ zentrifugieren.

D. Real-Time PCR

Konfiguration des Geräts und der Software

Zur Konfiguration von Gerät und Software sind die Anleitungen im Anwenderhandbuch des Real-Time PCR Systems für iQ-Check Kits zu beachten.

Vorbereitung des PCR-Reaktionsgemisches

1. Das PCR-Reaktionsgemisch mit der Amplifikationslösung (Reagenz C) und den fluoreszierenden Sonden (Reagenz B) vorbereiten. Das benötigte Volumen des PCR-Reaktionsgemisches hängt von der Anzahl der zu analysierenden Proben und Kontrollen ab. In jedem PCR-Lauf müssen mindestens eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden. Die korrekten Volumina für jedes Reagenz sind zur Berechnung des PCR-Reaktionsgemisches in der Pipettiertabelle im Anhang angegeben.

Hinweis: Das PCR-Reaktionsgemisch (Reagenz B + C) sofort nach der Zubereitung verwenden. Es ist bei $2-8^{\circ}\text{C}$ maximal 1 hr stabil.

2. Aus diesem PCR-Reaktionsgemisch dem jeweils verwendeten Platten-Layout entsprechend $45 \mu\text{l}$ in jedes Well pipettieren.
3. $5 \mu\text{l}$ DNA-Extrakt, Reagenz D (Negativkontrolle) oder Reagenz E (Positivkontrolle) zugeben. Die Probe vor dem Pipettieren nicht vortexen. Die Wells der PCR-Platte oder der PCR-Röhrrchenstreifens hermetisch abdichten. Es ist wichtig, Luftblasen am Boden der Wells zu vermeiden, indem behutsam pipettiert wird. Optional kann die verschlossene PCR-Platte bzw. können die verschlossenen PCR-Röhrrchenstreifen zur Beseitigung etwaiger Luftblasen kurz zentrifugiert werden.
4. Die PCR-Platte bzw. die PCR-Röhrrchenstreifen in den Thermocycler stellen. Auf die korrekte Ausrichtung der Platte achten, d. h. das Well A1 muss sich oben links befinden. Das Reaktionsmodul schließen.

Die PCR durchführen

Zum Starten des PCR-Laufs ist die Anleitung im Anwenderhandbuch des Real-Time PCR Systems für die iQ-Check Kits zu beachten.

Die Anwendungsprotokolldatei „Lmono Fast“ ist NF- und AOAC-validiert.

E. Datenanalyse

Die Datenanalyse kann direkt am Ende des PCR-Laufs oder später durch Öffnen der gespeicherten Datendatei durchgeführt werden. Für das Öffnen von Datendateien und die Festlegung der Datenanalyseparameter sind die Anweisungen im Benutzerhandbuch der Software CFX Manager IDE befolgen.

Ergebnisinterpretation

Nach Festlegung der Datenanalyseparameter werden die Ergebnisse durch Analyse der Quantifizierungszyklus-Werte (Cq-Werte) jeder Probe (des Zyklus, in dem die Amplifikationskurve den Schwellenwert übersteigt) interpretiert.

Die CFX Manager IDE Software ermöglicht eine vollständige automatisierte Analyse bei Verwendung von Real-Time PCR Nachweissystemen von Bio-Rad. Vor der Freigabe der Ergebnisse sollten die typischen Charakteristika der Amplifikationskurven verifiziert werden. Wenn zusätzlicher Support gewünscht wird, ist der technische Kundendienst von Bio-Rad zu kontaktieren.

Kontrollen

Vor der Interpretation der Probenergebnisse sind die Positiv- und die Negativkontrolle zu verifizieren.

Damit das Experiment gültig ist, müssen für die Kontrollen die in der folgenden Tabelle zusammengefassten Ergebnisse erhalten werden. Andernfalls muss die PCR-Reaktion wiederholt werden.

Kontrolle	Nachweis von <i>L. monocytogenes</i> (FAM-Kanal)	Nachweis der internen Kontrolle (HEX-Kanal)
Negativkontrolle	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Positivkontrolle	26 ≤ Cq ≤ 36	N/A

* Die Software gibt als Cq-Wert (der Zyklus, in dem die Amplifikationskurve den Schwellenwert schneidet) das Ergebnis N/A (Not Applicable; nicht zutreffend) an, wenn die Fluoreszenz der Probe nicht signifikant höher ist als die des Leerwerts und daher den Schwellenwert nicht übersteigt.

Wenn sich die Ergebnisse der Negativ- und der Positivkontrolle von denen in der Tabelle für die Kontrollen unterscheiden (ungültige Kontrolle), sind der in „D. Real-Time PCR“ und „E. Datenanalyse“ in Abschnitt 7 „Protokoll“ beschriebene Lauf und die Analyse zu wiederholen

Proben

Ein **positiver** iQ-Check *Listeria monocytogenes* PCR-Test muss eine typische Amplifikationskurve und für den FAM-Fluorophor einen Cq-Wert von ≥ 10 ergeben.

- Liegt der Cq-Wert für beide Kanäle unter 10, muss in den Rohdaten überprüft werden, ob es sich bei der Kurve um eine normale Amplifikationskurve handelt (d. h. um eine Kurve mit flacher Basislinie, gefolgt von einem raschen exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz und anschließender Abflachung). Wenn die Kurve korrekt aussieht, ist die Probe möglicherweise positiv auf *Listeria monocytogenes*.

Wenn kein Cq-Wert für FAM vorliegt (Cq = N/A) oder es sich bei der Kurve nicht um eine typische Amplifikationskurve handelt, muss die interne Kontrolle für die entsprechende Probe analysiert werden:

- Die Probe gilt als **negativ** auf *Listeria monocytogenes*, wenn kein Cq-Wert im FAM-Kanal vorliegt und die interne Kontrolle einen Cq-Wert ≥ 28 aufweist.
- Falls auch für die interne Kontrolle kein Cq-Wert vorliegt (Cq = N/A), bedeutet dies, dass die PCR-Reaktion vermutlich gehemmt war. Die Probe muss verdünnt (mit 10 µl DNA-Extrakt eine 1:10-Verdünnung in destilliertem sterilem Wasser durchführen und dann 5 µl der Verdünnung testen) und die PCR wiederholt werden.

- Falls der Cq-Wert für die interne Kontrolle < 28 liegt, ist keine Interpretation des Ergebnisses möglich. Es ist zu überprüfen ob der Schwellenwert korrekt platziert wurde oder ob es sich bei der Kurve aus den Rohdaten um eine normale Amplifikationskurve handelt. Wenn die Kurve keine charakteristische Form aufweist, muss der PCR-Test wiederholt werden.

Die Interpretation der Testergebnisse ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Nachweis von <i>L. monocytogenes</i> (FAM-Kanal)	Nachweis der internen Kontrolle (HEX-Kanal)	Auswertung
Cq ≥ 10	N/A	Positiv
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negativ
Cq = N/A	Cq = N/A	Hemmung*

* Wenn sowohl beim Ziel-Nachweis als auch beim Nachweis der internen Kontrolle ein Cq-Wert = N/A erhalten wird, muss der DNA-Extrakt erneut getestet werden, jedoch im verdünnten Zustand (1:10).

Wenn Validierungskriterien nicht erfüllt sind, wird das Ergebnis unter Umständen als ungültig bezeichnet. Die Rohdaten überprüfen und wie bei einer inhibierten Probe weiter verfahren.

Abschnitt 8

Bestätigung positiver Ergebnisse

Im Kontext der NF VALIDATION-zertifizierten Methode müssen alle positiven iQ-Check Ergebnisse bestätigt werden. Dazu gibt es folgende Möglichkeiten:

- Verwendung klassischer Tests, die in den standardisierten CEN- oder ISO-Methoden beschrieben sind, direkt aus der Half Fraser Nährbouillon oder ausgehend von der Ausgangsprobe bei Verwendung von LSB oder LSB II.
- Durch Isolierung von angereichertem LSB oder LSB II (Ausstreichen von 100 µl) auf chromogenem RAPID'*Listeria* spp.- oder RAPID'*L.mono*-Agar und Inkubation für 24 hr bei 37 ± 1 °C. Das Vorhandensein charakteristischer Kolonien auf RAPID'*L.mono* ist ausreichend, um das Vorhandensein von *L. monocytogenes* zu bestätigen. Zur Bestätigung von *L. monocytogenes* auf RAPID'*Listeria* spp. einen Identifizierungstest verwenden.
- Durch Isolation von angereichertem LSB oder LSB II (Ausstreichen von 10 µl) auf AL- oder PALCAM-Agar und Inkubation für 24–48 hr bei 37 ± 1 °C. Typische Kolonien sollten mit den im ISO-Verfahren beschriebenen Tests bestätigt werden, bis die Spezies identifiziert worden ist.
- Verwendung einer anderen von NF VALIDATION zertifizierten Methode, die auf einem anderen Prinzip als dem des iQ-Check *L. monocytogenes* II PCR-Tests beruht. Das validierte Protokoll dieser zweiten Methode muss vollständig durchgeführt werden.

Bei abweichenden Ergebnissen zwischen dem iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit und einer der oben aufgeführten Bestätigungsmethoden sind die erforderlichen Schritte zu befolgen, um gültige Ergebnisse sicherzustellen.

Die angereicherte LSB oder LSB II kann nach der Inkubation bei 30 °C maximal 72 hr bei 2–8 °C aufbewahrt werden, bevor die Bestätigung durchgeführt wird.

Im Rahmen der AOAC-Validierung gilt ein positives iQ-Check *L. monocytogenes* Ergebnis als vermutlich positiv, und es wird die Bestätigung mit einer geeigneten Referenzmethode (z. B. USDA MLG, FDA BAM, ISO, MFHPB usw.) empfohlen. Alternativ werden bei bestimmten Matrices 10 µl angereicherte LSB oder LSB II direkt auf chromogenem RAPID'*L. mono*-, RAPID'*Listeria* spp.- oder Agar *Listeria*-Agar ausgestrichen und

24 hr bei 37 ± 1 °C inkubiert. Bei Vorhandensein charakteristischer *Listeria monocytogenes*-Kolonien sollte das Vorhandensein von *Listeria monocytogenes* biochemisch bestätigt werden.

Abschnitt 9

Bestätigung von Einzelkolonien mit dem iQ-Check Kit

Das iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit kann auch zur Bestätigung isolierter *L. monocytogenes*-Einzelkolonien auf Agarplatten verwendet werden. Dies wurde im Rahmen der AFNOR-Zertifizierung auf den chromogenen Medien RAPID'*L.mono* und RAPID'*Listeria* spp. offiziell validiert.

1. Mit einem Zahnstocher, einer sterilen Impföse oder einem anderen geeigneten Verbrauchsartikel (z. B. einer Pipettenspitze) eine isolierte Kolonie aus einer Platte mit selektivem oder nichtselektivem Agar aufnehmen.
2. Die Kolonie in 100 µl Tryptonsalz-Medium oder destilliertem, sterilem Wasser in einem Mikrozentrifugenröhrchen resuspendieren.
Auf dem Vortex homogenisieren.
3. 5 µl der Suspension zu 45 µl PCR-Reaktionsgemisch geben (siehe „D. Real-Time PCR“ in Abschnitt 7 „Protokoll“) und die übrigen Schritte des iQ-Check *L. monocytogenes* II Protokolls zur Daten- und Ergebnisinterpretation befolgen.

Abschnitt 10

Testleistung und Testvalidierungen

Das iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit ist speziell für den Nachweis von *L. monocytogenes* bestimmt



BRD 07/10-04/05

ALTERNATIVE
ANALYSIS
METHODS FOR
AGRIBUSINESS

<http://nf-validation.afnor.org>

NF Validation

Das iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit ist von NF VALIDATION als alternative Methode zur Referenzmethode ISO 11290-1:2017 (siehe Referenz 4 in Abschnitt 11) zum Nachweis von *L. monocytogenes* in allen Erzeugnissen für den menschlichen Verzehr sowie in Umgebungsproben zertifiziert. Die Validierung erfolgte nach dem Protokoll von ISO 16140-2:2016 (siehe Referenz 5 in Abschnitt 11) und umfasst die Verwendung der Real-Time PCR Systeme CFX96 Touch Deep Well und CFX Opus DeepWell. Die Verwendung der Free DNA Removal Solution ist für zusammengesetzte Lebensmittel, Milchprodukte und Umgebungsproben aus dem Bereich Produktion validiert. Die zugehörige Software ist die CFX Manager IDE Software (ab Version 2.2). Die Anwendungsprotokolldatei „Lmono Fast“ ist validiert. Zertifikatnummer: BRD 07/10–04/05. Gültig bis: Entsprechend den Angaben auf dem Zertifikat auf der Website von AFNOR CERTIFICATION.



AOAC-Validierung

Das iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit (Protokoll Easy II) wurde vom AOAC Research Institute im Rahmen des Performance Tested Method-Programms zum Nachweis von *L. monocytogenes* in Truthahnaufschnitt, Hotdogs, Räucherlachs und Hüttenkäse sowie auf Edelstahlflächen validiert. Ein positives Ergebnis mit dem iQ-Check Kit ist als vorläufig positiv zu betrachten und sollte mit der in Abschnitt 8 empfohlenen Methode bestätigt werden. LSB, LSB II, die „Lmono Fast“ APF, die Verwendung der iQ-Check Free DNA Removal Solution sowie die Verwendung der Real-Time PCR Systeme CFX96 Touch Deep Well und CFX Opus Deep Well sind für alle Proben validiert. Die zugehörige Software ist die CFX Manager IDE Software (ab Version 2.2). Zertifikatnummer: 010802.



Health Canada-Validierung

Das iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit (Protokoll Easy II) wurde von Health Canada (MFLP-54) für den Nachweis von *L. monocytogenes* in verzehfertigen Fleisch- und Geflügelerzeugnissen, in Erzeugnissen auf Obst- und Gemüsebasis (ausgenommen rohes verarbeitetes Gemüse), in Fisch- und Meeresfrüchteerzeugnissen (ausgenommen geräucherter Fisch) sowie in gefrorenen und fermentierten Milchprodukten mit Probengrößen von 25 g und 125 g validiert. Ein positives Ergebnis mit dem iQ-Check Kit ist als vorläufig positiv zu betrachten und muss gemäß MFHPB-30 bestätigt werden (siehe Referenz 2 in Abschnitt 11).



NordVal-Validierung

Das iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit ist von NordVal validiert für:

- Anreicherung in Half Fraser Nährbouillon und anschließende Anwendung des Lyseprotokolls Standard II
- Anreicherung in *Listeria* Special Broth und anschließende Anwendung des Lyseprotokolls Standard II
- Anreicherung in *Listeria* Special Broth und anschließende Anwendung des Lyseprotokolls Easy II, bei dem der erste Zentrifugationsschritt nicht mehr erforderlich ist

Zertifikatnummer: 037. Gültigkeitsdauer entsprechend den Angaben auf dem Zertifikat auf der Website von NordVal.

Abschnitt 11

Literatur

AOAC Official Method 993 .12-1996(1999). *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. Selective enrichment and isolation method.

Health Canada (2011). Health Products and Food Branch. MFHPB-30. Isolation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. from foods and environmental samples. The Compendium of Analytical Methods, Volume 2, February 2011.

ISO 7218. Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen.

ISO 11290-1:2017. Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes* und von *Listeria* spp. – Teil 1: Nachweisverfahren.

ISO 16140-2:2016. Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Verfahrensvalidierung – Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines Referenzverfahrens.

ISO 22174. Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln – Allgemeine Anforderungen und Begriffe.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2021). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 8 .13: Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, ready-to-eat siluriformes (fish) and egg products, and environmental samples.

https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-09/MLG-8.13.pdf, accessed February 14, 2020.

United States Food and Drug Administration (2017). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>, accessed February 14, 2020.

Abschnitt 12

Revisionshistorie

Freigabedatum	Dokumentnummer	Änderung
Oktober 2023	10000167776 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Änderung der Dokumentnummer - vorherige Version 10000123535 Ver C iQ-Check <i>Listeria monocytogenes</i> II Benutzerhandbuch- AFNOR-Erweiterung: LSB II für zusammengesetzte Lebensmittel, Umweltproben und Milchprodukte

Anhang — Pipettiertabelle für das PCR-Reaktionsgemisch

Die Tabelle gibt Aufschluss über die entsprechenden korrekten Mengen von Reagenz B und C zur Herstellung des PCR-Reaktionsgemisches je nach der Gesamtzahl der zu analysierenden Proben und Kontrollen.

Gesamtzahl an Proben und Kontrollen	Sonden Reagenz B, µl	Amplifikationsmix Reagenz C, µl	Gesamtzahl an Proben und Kontrollen	Sonden Reagenz B, µl	Amplifikationsmix Reagenz C, µl	Gesamtzahl an Proben und Kontrollen	Sonden Reagenz B, µl	Amplifikationsmix Reagenz C, µl
1	5	40	33	178	1.400	65	351	2.800
2	11	86	34	184	1.500	66	356	2.900
3	16	130	35	189	1.500	67	362	2.900
4	22	173	36	194	1.600	68	367	2.900
5	27	216	37	200	1.600	69	373	3.000
6	32	259	38	205	1.600	70	378	3.000
7	38	302	39	211	1.700	71	383	3.100
8	43	346	40	216	1.700	72	389	3.100
9	49	389	41	221	1.800	73	394	3.200
10	54	432	42	227	1.800	74	400	3.200
11	59	475	43	232	1.900	75	405	3.200
12	65	518	44	238	1.900	76	410	3.300
13	70	562	45	243	1.900	77	416	3.300
14	76	605	46	248	2.000	78	421	3.400
15	81	648	47	254	2.000	79	427	3.400
16	86	691	48	259	2.100	80	432	3.500
17	92	734	49	265	2.100	81	437	3.500
18	97	778	50	270	2.200	82	443	3.500
19	103	821	51	275	2.200	83	448	3.600
20	108	864	52	281	2.200	84	454	3.600
21	113	907	53	286	2.300	85	459	3.700
22	119	950	54	292	2.300	86	464	3.700
23	124	994	55	297	2.400	87	470	3.800
24	130	1.000	56	302	2.400	88	475	3.800
25	135	1.100	57	308	2.500	89	481	3.800
26	140	1.100	58	313	2.500	90	486	3.900
27	146	1.200	59	319	2.500	91	491	3.900
28	151	1.200	60	324	2.600	92	497	4.000
29	157	1.300	61	329	2.600	93	502	4.000
30	162	1.300	62	335	2.700	94	508	4.100
31	167	1.300	63	340	2.700	95	513	4.100
32	173	1.400	64	346	2.800	96	518	4.100

Nähere Informationen finden Sie auf bio-rad.com/iqcheck.

BIO-RAD ist eine Marke der Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK ist in bestimmten Ländern eine Marke der Bio-Rad Europe GmbH. Alle hier genannten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

iQ-Check *Listeria* *monocytogenes* II Kit

Manuale d'uso

**Test per la rilevazione mediante PCR real-time di
L. monocytogenes in prodotti alimentari e campioni
ambientali**

N. catalogo 3578124

BIO-RAD

Indice

Sezione 1	Introduzione.....	1
Sezione 2	Tecnologia iQ-Check <i>L. monocytogenes</i> II	1
Sezione 3	Componenti del kit.....	2
Sezione 4	Validità e conservazione	2
Sezione 5	Materiali necessari ma non inclusi	2
	Apparecchiatura	2
	Materiali.....	3
Sezione 6	Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali	4
Sezione 7	Protocollo	5
	Arricchimento del campione.....	5
	Trattamento per la rimozione del DNA libero.....	7
	Estrazione del DNA.....	7
	PCR real-time.....	8
	Analisi dei dati	9
Sezione 8	Conferma dei risultati positivi	10
Sezione 9	Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check	11
Sezione 10	Esecuzione e convalida del test.....	11
Sezione 11	Riferimenti bibliografici	12
Sezione 12	Cronologia delle revisioni	13
	Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR.....	14

Sezione 1

Introduzione

I metodi batteriologici convenzionali sono spesso lunghi e noiosi. A confronto, iQ-Check *Listeria monocytogenes* II è un semplice e rapido test qualitativo che permette la rilevazione di sequenze specifiche di DNA esclusive di *L. monocytogenes* ritrovate in campioni ambientali e prodotti alimentari. Mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR) real-time, le sequenze specifiche di DNA di *L. monocytogenes* vengono amplificate e rilevate simultaneamente tramite sonde fluorescenti. È possibile processare un numero massimo di 94 campioni, con un rischio di contaminazione minimizzato e una procedura intuitiva. Questo kit è destinato al personale di laboratorio qualificato, incaricato di eseguire test per la rilevazione di *L. monocytogenes*. I risultati del test si ottengono entro poche ore dall'arricchimento.

Sezione 2

Tecnologia iQ-Check *L. monocytogenes* II

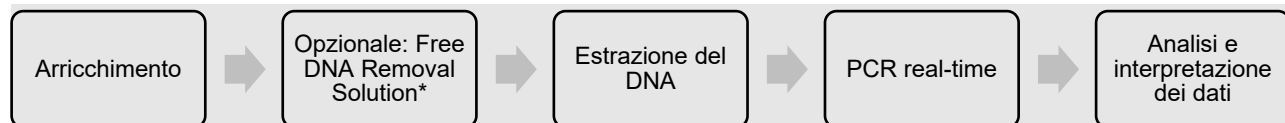
iQ-Check *L. monocytogenes* II Kit è un test basato sull'amplificazione e sulla rilevazione genica mediante PCR real-time. I reagenti PCR pronti all'uso inclusi nel kit contengono oligonucleotidi (primer e sonde) specifici per *L. monocytogenes*, oltre a DNA polimerasi e nucleotidi. La rilevazione e l'analisi dei dati sono ottimizzati per l'impiego con uno strumento PCR real-time Bio-Rad, come il sistema di rilevazione tramite PCR real-time CFX96 Touch Deep Well System.

La PCR è una tecnica di grande efficacia impiegata per generare molteplici copie di DNA target. Durante la reazione PCR, diversi cicli di riscaldamento e raffreddamento consentono la denaturazione del DNA per mezzo del calore, con successivo appaiamento dei primer ad una regione target specifica. La DNA polimerasi si serve di tali primer e deossinucleosidi trifosfati (dNTP) per estendere il DNA, creando copie del DNA target. Queste copie vengono denominate ampliconi.

Nella PCR real-time, vengono utilizzate specifiche sonde per rilevare il DNA durante la fase di amplificazione tramite ibridazione degli ampliconi. Queste sonde sono collegate a un fluoroforo che emette fluorescenza solo se ibridato alla sequenza target. FAM è il fluoroforo collegato alla sonda ibridata alla sequenza specifica di DNA di *L. monocytogenes*. In assenza di DNA target, non verrà rilevata alcuna fluorescenza. Man mano che la quantità di ampliconi aumenta ad ogni ciclo di amplificazione, l'intensità della fluorescenza aumenta a sua volta. Il modulo ottico misura questa fluorescenza nella fase di appaiamento durante ogni ciclo PCR, mentre il software associato traccia l'intensità della fluorescenza rispetto al numero di cicli.

Nella miscela di reazione è incluso un DNA sintetico come controllo interno per la convalida degli eventuali risultati negativi. Il controllo viene amplificato con una sonda specifica simultaneamente rispetto alla sequenza di DNA target di *L. monocytogenes* e viene rilevato da un terzo fluoroforo.

Questo test consente la rilevazione qualitativa di *L. monocytogenes* in determinati prodotti alimentari e campioni ambientali precedentemente arricchiti mediante coltura. Prevede le cinque fasi principali seguenti:



* Per le condizioni d'uso, fare riferimento al manuale d'uso di iQ-Check Free DNA Removal Solution (n. catalogo 10000058391).

Sezione 3

Componenti del kit

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit contiene reagenti sufficienti per eseguire 96 test (94 campioni).

ID reagente	Reagente	Quantità in ml
A	Reagente di lisi	1 flacone, 20
B	Sonde fluorescenti	1 provetta, 0,55
C	Miscela di amplificazione	1 provetta, 4,4
D	Controllo negativo PCR	1 provetta, 0,5
E	Controllo positivo PCR	1 provetta, 0,25
F	Sfere di lisi	1 flacone, 17,6 g

Sezione 4

Validità e conservazione

Una volta ricevuto, il kit deve essere conservato a 2-8 °C. I reagenti conservati a questa temperatura possono essere utilizzati fino alla data di scadenza riportata sulle provette. Una volta miscelati con sfere di lisi, i reagenti di lisi hanno una validità pari a 6 mesi.

Sezione 5

Materiali necessari ma non inclusi

Apparecchiatura

- Omogeneizzatore da laboratorio per i campioni dei test
- Incubatore per l'arricchimento microbiologico dei campioni
- Materiali specifici per l'estrazione in provette da 1 0,5 ml coniche, sterili e con tappo a vite:
 - Centrifuga da banco (10.000-12.000 x g)
 - Blocco termico a secco a 37 ± 2 °C e/o 95-100 °C
- Dispositivo per il frazionamento cellulare, come Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)
- Materiali specifici per l'estrazione in una piastra Deep Well:
 - Termoagitatore* in grado di mantenere 37 ± 2 °C e/o 95-100 °C con una velocità di miscelazione di almeno 1300 rpm
- Vortex
- Piastra di agitazione magnetica
- Micropipette da 20 µl, 200 µl e 1000 µl
- Sistema PCR real-time di Bio-Rad;* ad esempio, il sistema PCR real-time CFX96 Touch Deep Well System (n. catalogo 3600037) o CFX Opus Deepwell System (n. catalogo 17007991)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System per l'estrazione automatizzata del DNA e il setup delle piastre PCR (n. catalogo 3594911)

Nota: Si raccomanda l'utilizzo di alimentazione continua (UPS) con il termociclatore e iQ-Check Prep System.

* Per informazioni sugli strumenti raccomandati, contattare il Supporto Tecnico di Bio-Rad.

Materiali

- Terreno di arricchimento: *Listeria* Special Broth (LSB) (n. catalogo 3555703, 225 ml x 6 flaconi; 3564703, in forma disidratata, 500 g; 3555793, 5 L x 2 sacche; 3564753, in forma disidratata, 5 kg) oppure Half Fraser Broth (n. catalogo 3564604, in forma disidratata, 500 g; 3555797, 225 ml x 6 flaconi; 3555794, 3 L x 4 sacche)
- Terreno di arricchimento: *Listeria* Special Broth II (LSB II) (n. catalogo 12017463, 225 ml x 6 flaconi; 12017388, in forma disidratata, 500 g; 12017378, in forma disidratata, 5 kg)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (n. catalogo 3594970)
- Specifici per campioni ambientali:
 - Spugne ambientali
 - Tamponi ambientali
 - Brodo neutralizzante per spugne e tamponi come Dey-Engley (D/E), HiCap Neutralizing Broth, o Lethen Broth
- Specifici per l'estrazione in provetta:
 - Provette coniche sterili con tappo a vite da 1 0,5 ml (ad esempio, n. catalogo 2240110XTU)
- Specifici per l'estrazione in una piastra Deep Well:
 - Piastra da 96 Deep Well (n. catalogo 3594900)
 - Pellicola sigillante in plastica (n. catalogo 3590139)
 - X-Pierce Sealing Films (n. catalogo 3593977) o Pre-Pierced Plate Sealing Film (n. catalogo 3600040, solo Nord America)
- Specifici per i protocolli di estrazione Standard II e Easy II:
 - iQ-Check Lysis Beads (reagent F) (n. catalogo 3578136)
 - Puntali per pipette ad ampia apertura da 200 µl
- Specifici per iQ-Check Prep System:
 - Contenitore per la diluizione da 60 ml (n. catalogo 3594904)
 - Puntali con filtro (n. catalogo 3594902 o 12014486: 50 µl; 3594903 o 12014483: 1000 µl)
- Provette per miscela di PCR (n. catalogo 12016673, 5 ml x 25)
- RAPID'*Listeria* spp. Agar* (n. catalogo 3564744, in forma disidratata, 500 g; 3564745, Supplement 1; 3564746, Supplement 2)
- RAPID'*L.mono* Agar* (n. catalogo 3563694, 90 mm x 20 piastre; 3555294, kit per 190 ml agar più 2 supplementi; 3564293, in forma disidratata, 500 g; 3564294, Supplement 1; 3564746, Supplement 2)
- Piastre PCR, provette, nastro isolante e tappi
- Puntali sterili con filtro adattabili a micropipette da 20, 200 e 1.000 µl
- Puntali per pipette Combipip o pipettatori a ripetizione equivalenti, sterili e confezionati singolarmente
- Pipette da 1 e 10 ml
- Provette sterili per test da 2 e 5 ml
- Guanti senza polvere
- Acqua distillata sterile
- Candeggina, 5%
- Detergenti come DNA AWAY o RNase AWAY

* Può essere utilizzato al di fuori della convalida AOAC-PTM.

Sezione 6

Sicurezza, precauzioni e raccomandazioni per ottenere risultati ottimali

- Il presente test deve essere eseguito da personale addestrato
- Le donne in gravidanza, i bambini, gli anziani e i soggetti immunodepressi non devono eseguire questo metodo né manipolare *L. monocytogenes* per via dell'alto tasso di infezione e mortalità associati a tali gruppi
- I campioni e le colture di arricchimento devono essere manipolati come materiali potenzialmente infetti ed eliminati nel rispetto delle regole e normative locali
- Tutti i materiali potenzialmente infetti devono essere collocati in autoclave prima dello smaltimento
- La qualità dei risultati si basa sulla rigorosa osservanza delle buone pratiche di laboratorio (ad esempio, la norma EN ISO 7218), soprattutto in materia di PCR:
 - Non spostare mai apparecchiature da laboratorio (pipette, provette, ecc.) da una postazione di lavoro all'altra
 - Utilizzare sempre un controllo positivo e un controllo negativo per ciascuna serie di reazioni di amplificazione
 - Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza
 - Per garantire l'omogeneità dei reagenti del kit, miscelarli nel vortex prima di utilizzarli
 - Verificare periodicamente l'accuratezza e la precisione delle pipette, nonché il corretto funzionamento degli strumenti
 - Cambiare i guanti di frequente, in particolare se si sospetta la presenza di contaminazione
 - Pulire gli spazi di lavoro periodicamente con candeggina al 5% e altri prodotti disinfettanti come DNA AWAY
 - Utilizzare guanti senza polvere e non lasciare impronte digitali e scritte sui tappi delle provette. Entrambi interferiscono con l'acquisizione dei dati
- Si consiglia vivamente di osservare i requisiti generali illustrati nella norma EN ISO 22174:2005 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions)
- iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit:
 - Tutte le sostanze o miscele contenute nel kit per il test sono classificate come prodotti in conformità al sistema mondiale armonizzato (GHS). Il contatto con acidi potrebbe causare il rilascio di gas tossici. Se utilizzato correttamente, non sono necessarie precauzioni particolari. Se il prodotto viene inalato, portare il soggetto in una zona ben aerata e in caso di disturbi consultare un medico. Se il prodotto viene a contatto con gli occhi, sciacquarli mantenendoli aperti sotto l'acqua corrente per diversi minuti. In caso di ingestione del prodotto, indurre il vomito e contattare un medico
- iQ-Check Prep System:
 - L'utilizzo improprio dell'iQ-Check Prep System potrebbe causare lesioni personali o danni allo strumento.
Se manipolati in modo improprio, alcuni componenti potrebbero presentare il rischio di lesioni personali dovuto al calore eccessivo. Per garantire sicurezza, iQ-Check Prep System deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato e opportunamente addestrato. La manutenzione dello strumento deve essere eseguita solo dai tecnici di assistenza Bio-Rad

- Sistemi di rilevazione tramite PCR real-time CFX96 Touch Deep Well System o CFX Opus Deepwell System:
 - L'utilizzo improprio del sistema CFX96 Touch Deep Well System o CFX Opus Deepwell System potrebbe causare lesioni personali o danni allo strumento. Se manipolati in modo improprio, alcuni componenti potrebbero presentare il rischio di lesioni personali dovuto al calore eccessivo. Per garantire sicurezza, i sistemi CFX96 Touch Deep Well System e CFX Opus Deepwell System devono essere utilizzati esclusivamente da personale di laboratorio qualificato e opportunamente addestrato. La manutenzione dello strumento deve essere eseguita solo dai tecnici di assistenza Bio-Rad
- Arricchimento:
 - L'utente è tenuto a leggere, comprendere e osservare le informazioni relative alla sicurezza contenute nelle istruzioni dell'iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit. Conservare le istruzioni di sicurezza per consultazioni future. Per ridurre i rischi biologici e i rischi legati all'esposizione ai prodotti chimici, eseguire il test dei patogeni in un laboratorio adeguatamente attrezzato sotto il controllo di personale qualificato. Seguire sempre le pratiche di laboratorio standard sulla sicurezza, tra cui indossare gli indumenti protettivi e la protezione per gli occhi durante la manipolazione di reagenti e campioni contaminati. Evitare il contatto con il contenuto dei terreni di arricchimento e delle provette con i reagenti al termine dell'amplificazione. Smaltire i campioni arricchiti in conformità alle attuali norme industriali
 - *Listeria* è un organismo che richiede il livello di biosicurezza 2. I campioni biologici come gli arricchimenti sono potenzialmente infettivi. Osservare ogni normativa locale, statale/provinciale e/o nazionale applicabile in materia di smaltimento di rifiuti biologici. Indossare i dispositivi di protezione individuale inclusi, senza però ad essi limitarsi, protezioni per gli occhi, visiere per il viso, camice da laboratorio e guanti. Tutte le operazioni devono essere eseguite in strutture adeguatamente attrezzate utilizzando gli idonei dispositivi di sicurezza (ad esempio, i dispositivi di contenimento fisico). Prima di lavorare con materiali potenzialmente infettivi, gli addetti devono ricevere una formazione che sia conforme alle disposizioni regolamentari in vigore e ai requisiti dell'azienda/ente
 - Al termine del test, tutti i materiali che potrebbero contenere agenti patogeni devono essere decontaminati in linea con le attuali norme industriali in materia di smaltimento dei rifiuti contaminati (ovvero, collocarli in autoclave per 20 min a 121 °C). Per maggiori informazioni relative alle normative locali in materia di smaltimento, consultare la scheda di sicurezza

Sezione 7

Protocollo

A. Arricchimento del campione

Si raccomanda vivamente di leggere l'intero protocollo prima di iniziare il test.

Prima dell'uso i mezzi di arricchimento devono trovarsi alla giusta temperatura di incubazione (temperatura ambiente o 30 °C/37 °C ove richiesto).

Si consiglia vivamente di utilizzare un sacco di arricchimento con filtro incorporato.

Nell'ambito della VALIDAZIONE NF, le aliquote di peso superiore a 25 g non sono state testate. Incubare, senza agitare, per il tempo e la temperatura indicati nella tabella riportata di seguito. È inoltre possibile eseguire il test iQ-Check da LSB precedentemente arricchito e in seguito conservato a 2-8 °C per un tempo massimo di 72 hr.

La tabella seguente riporta i diversi protocolli utilizzabili, a seconda dell'applicazione e dell'oggetto della validazione:

VALIDAZIONE NF BRD 7/10-04/05 e NordVal 037		
Oggetto (matrici)	Preparazione dei campioni	Arricchimento/Estrazione del DNA
Tutti i prodotti alimentari e campioni ambientali ¹	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 9 x <i>n</i> ml di Half Fraser Broth o LSB	Estrazione Standard II (Half Fraser) <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 24-26 hr a 30 ± 1 °C Formato provetta Estrazione Standard II (LSB) <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 22-24 hr a 30 ± 1 °C Formato provetta Estrazione Easy II (LSB) <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 24-26 hr a 30 ± 1 °C Formato provetta
Ambiente e superfici di produzione ²	Omogeneizzare <i>n</i> g di alimento in 9 x <i>n</i> ml di LSB preriscaldato o di LSB II a temperatura ambiente	Estrazione Easy II (LSB) <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 18-26 hr a 30 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well Estrazione Easy II (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 18-26 hr a 37 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well
Alimenti preparati ²	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 9 x <i>n</i> ml di LSB II	Estrazione Easy II (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 18-26 hr a 37 ± 1 °C Formato Deep Well
Prodotti a base di latte ²	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 9 x <i>n</i> ml di LSB II preriscaldato	Estrazione Easy II (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 20-28 hr a 37 ± 1 °C Formato Deep Well
AOAC PTM 010802		
Oggetto (matrici)^{2,3}	Preparazione dei campioni	Arricchimento/Estrazione del DNA
Tacchino, hot dog, salmone affumicato, focchi di latte	Omogeneizzare <i>n</i> g di campione alimentare in 9 x <i>n</i> ml di LSB o LSB II (25 g in 225 ml; 125 g in 1.125 ml)	Estrazione Easy II (LSB) <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 24-26 hr a 30 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well Estrazione Easy II (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 18-24 hr a 37 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well
Superfici in acciaio inossidabile	Campioni ambientali <ul style="list-style-type: none"> Bagnare leggermente i tamponi e le spugne con un brodo neutralizzante che non contenga un complesso di aril solfonato Per le superfici analizzate mediante tamponi, campionare un'area di 2,54 x 2,54 cm (1 x 1") Per le superfici analizzate mediante spugne, campionare un'area di 10,16 x 10,16 cm (4 x 4") Aggiungere a LSB II sufficiente per ricoprire il tampone (10 ml) o la spugna (60-225 ml) 	Estrazione Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubare per 16-24 hr a 37 ± 1 °C Formato provetta/Deep Well
Fare riferimento a MFLP-54 per le matrici e i protocolli approvati da Health Canada		

¹ La validazione comprende il file di protocollo di applicazione "Lmono Fast" per un tempo di ciclo PCR ridotto. Per ulteriori informazioni contattare il rappresentante Bio-Rad locale.

² La validazione comprende l'utilizzo di iQ-Check Free DNA Removal Solution e del file di protocollo di applicazione "Lmono Fast" per un tempo di ciclo PCR ridotto. Per ulteriori informazioni contattare il rappresentante Bio-Rad locale.

³ La validazione include una strisciatura diretta sulle piastre RAPID'L. *mono*, RAPID'*Listeria* spp. o Agar *Listeria* (escluso il formaggio naturale)

B. Trattamento per la rimozione del DNA libero

iQ-Check Free DNA Removal Solution offre il metodo ideale per rimuovere il DNA libero.

Seguire le raccomandazioni di Bio-Rad contenute nel manuale d'uso (documento 10000058391). Il presente protocollo è validato dal certificato AFNOR nella categoria dei campioni ambientali di produzione.

C. Estrazione del DNA

Raccomandazioni generali:

1. Prima di iniziare il test, accendere il blocco termico o il thermoshaker per la funzione di preriscaldamento. Impostare a 95-100 °C. Durante il pipettaggio, mantenere in sospensione il reagente di lisi agitando a media velocità su una piastra di agitazione magnetica.
2. Di norma, evitare l'agitazione del sacco di arricchimento e la raccolta di grossi frammenti di residui alimentari. Per i campioni alimentari aventi un surnatante grasso, raccogliere il campione appena al di sotto di questo strato.
3. Aprire le provette e i pozzetti con attenzione per evitare eventuali contaminazioni crociate.
4. Raffreddare la piastra Deep Well prima di effettuare il pipettaggio direttamente nella pellicola sigillante preforata.
5. Utilizzare la barra magnetica per mantenere in sospensione il reagente di lisi. Effettuare il pipettaggio mentre è in atto un'agitazione a media velocità.
6. Per risospendere la resina, per prima cosa agitare delicatamente a mano il reagente di lisi. Al fine di mantenerlo in sospensione, effettuare il pipettaggio mentre è in atto un'agitazione a media velocità mediante la barra magnetica contenuta nel flacone.
7. Ricostituire il reagente di lisi finale come segue:
 - a. Versare con attenzione tutto il contenuto del reagente F (sfere di lisi) nel reagente A (reagente di lisi).
 - b. Utilizzare materiali di consumo con un puntale largo abbastanza da consentire il pipettaggio del reagente di lisi omogeneizzato.
 - c. Se conservato a 4 °C, il reagente di lisi miscelato con le sfere di lisi (reagente A + F) ha una validità pari a 6 mesi.

Protocollo Standard II

1. Aliquotare 1,5 ml di campione decantato arricchito in una provetta.
2. Centrifugare la provetta a 10.000-12.000 x g per 5 min. Eliminare il surnatante.
3. Aggiungere 250 µl di reagente di lisi omogeneizzato (reagente A + F) al pellet e risospendere quest'ultimo pipettando il reagente in alto e in basso. Chiudere la provetta.

Nota: prima agitare delicatamente a mano il reagente di lisi per risospendere le sfere.

4. Posizionare la provetta nel termoagitatore o nel dispositivo per il frazionamento cellulare per 3 ± 1 min.
5. Incubare le provette nel blocco termico indicato a 95-100 °C per 10-15 min.
6. Miscelare la provetta nel vortex ad alta velocità e centrifugare a 10.000-12.000 x g per 5 min. Questo è il momento raccomandato per l'interruzione temporanea della procedura.

Il surnatante può essere conservato per 1 anno a -20 °C. Lasciare sempre il tempo necessario per lo scongelamento e l'omogeneizzazione, in seguito centrifugare a 10.000-12.000 x g per 5 min prima di utilizzarlo nuovamente.

Protocollo Easy II

1. Aliquotare 100 µl di reagente di lisi omogeneizzato (reagenti A + F) nelle provette o nei pozzetti di una piastra Deep Well.

Nota: prima agitare delicatamente a mano il reagente di lisi per risospendere le sfere.

2. Aggiungere 100 µl di campione arricchito.

Nota: agitare la sospensione per omogeneizzare la coltura, quindi evitare che eventuali residui si depositino prima di raccogliere il campione.

3. Miscelare la soluzione pipettando su e giù fino a ottenere l'omogeneizzazione.
4. Chiudere le provette o sigillare la piastra a pozzetti profondi con la pellicola sigillante preforata.
5. Posizionare le provette nel dispositivo per il frazionamento cellulare per 3 ± 1 min. Incubare le provette nel termoblocco a 95-100°C per 15-20 min.
6. In caso di utilizzo dell'incubatore-agitatore per le provette o le piastre deepwell, incubare le provette o le deepwell a 1300 o 1600 rpm, 95-100°C per 15-20 min.
7. Miscelare le provette nel vortex ad alta velocità e centrifugare a 10.000-12.000 x g per almeno 2 min.

La centrifugazione non è necessaria per la piastra Deep Well.

Questo è il momento raccomandato per l'interruzione temporanea della procedura.

Il surnatante può essere conservato per 1 anno a -20 °C. Lasciare sempre il tempo necessario per lo scongelamento e l'omogeneizzazione, in seguito centrifugare a 10.000-12.000 x g per 5 min prima di utilizzarlo nuovamente.

D. PCR real-time

Installazione strumento e software

Per installare strumento e software, fare riferimento alle istruzioni contenute nel manuale utente del sistema PCR real-time per i kit iQ-Check.

Preparazione della miscela di PCR

1. Preparare la miscela di PCR contenente la soluzione di amplificazione (reagente C) e le sonde fluorescenti (reagente B). Il volume della miscela di PCR necessario dipende dal numero di campioni e controlli da analizzare. In ogni ciclo PCR devono essere inclusi almeno un controllo positivo e un controllo negativo. Utilizzare la tabella relativa al pipettaggio riportata nell'Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR per verificare i corretti volumi da impiegare per ogni reagente.

Nota: Utilizzare la miscela di PCR (reagenti B + C) immediatamente in seguito alla preparazione. Essa rimane stabile per massimo 1 hr a 2-8 °C.

2. Pipettare 45 µl della miscela di PCR in ogni pozzetto secondo lo schema analitico scelto.
3. Aggiungere 5 µl di estratto di DNA, reagente D (controllo negativo) o reagente E (controllo positivo). Non miscelare nel vortex il campione prima del pipettaggio. Sigillare ermeticamente i pozzetti della piastra PCR o le strip delle provette. Pipettare con attenzione per evitare la formazione di bolle sul fondo dei pozzetti. Come fase facoltativa, per eliminare eventuali bolle centrifugare la piastra PCR o le strip delle provette sigillate (centrifuga rapida).
4. Posizionare la piastra PCR o le strip delle provette nel termociclatore. Accertarsi di posizionare la piastra correttamente, con il pozzetto A1 rivolto all'angolo superiore sinistro. Chiudere il modulo di reazione.

Eseguire un ciclo PCR

Per avviare un ciclo PCR, seguire le istruzioni contenute nel manuale d'uso del sistema PCR real-time per i kit iQ-Check.

Il file di protocollo di applicazione "Lmono Fast" è stato validato per NF e AOAC.

E. Analisi dei dati

È possibile analizzare i dati direttamente al termine del ciclo PCR o in un secondo momento tramite l'apertura del file di dati memorizzato. Per aprire i file di dati e impostare i parametri dell'analisi, seguire le istruzioni contenute nel manuale d'uso del software CFX Manager IDE Software.

Interpretazione dei risultati

Dopo aver impostato i parametri dell'analisi dati, i risultati vengono interpretati analizzando i valori del ciclo di quantificazione (Cq) di ogni campione (il ciclo nel quale la curva di amplificazione supera la soglia).

Il software CFX Manager IDE Software consente di completare un'analisi automatizzata per i sistemi di rilevazione PCR real-time Bio-Rad. È necessario eseguire una verifica delle caratteristiche tipiche della curva di amplificazione prima di rilasciare i risultati. Nel caso in cui sia necessario ulteriore supporto, contattare il proprio team di supporto tecnico Bio-Rad.

Controlli

Prima di interpretare i risultati dei campioni, verificare i controlli positivo e negativo.

Al fine di assicurare la validità dell'esperimento, i controlli devono avere i risultati riepilogati nella tabella seguente. In caso contrario, è necessario ripetere la reazione PCR.

Controllo	Rilevazione <i>L. monocytogenes</i> (canale FAM)	Rilevazione controllo interno (canale HEX)
Controllo negativo	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Controllo positivo	26 ≤ Cq ≤ 36	N/A

* Il software indica un valore Cq (il ciclo in cui la curva di amplificazione supera la soglia) di N/A (non applicabile) quando la fluorescenza di un campione non aumenta in modo significativo al di sopra del rumore di fondo e di conseguenza non supera la soglia.

Se i risultati dei controlli positivo e negativo differiscono da quelli riportati nella tabella Controlli (controllo non valido) ripetere il ciclo e l'analisi descritti nei paragrafi D: PCR real-time ed E: Analisi dei dati nel protocollo della Sezione 7

Campioni

Un test di PCR **positivo** iQ-Check *Listeria monocytogenes* deve mostrare una curva di amplificazione tipica e un valore Cq ≥ 10 per il fluoroforo FAM.

- Se il valore Cq è inferiore a 10 per entrambi i canali, verificare che la curva dei dati non elaborati sia una curva di amplificazione regolare (con linea di base piatta, seguita da un rapido aumento esponenziale della fluorescenza e infine da un secondo appiattimento). Se la curva sembra corretta, potrebbe essere considerata come campione positivo al test *Listeria monocytogenes*

In assenza di valore Cq (Cq = N/A) per FAM, o se il risultato non è una tipica curva di amplificazione, il controllo interno per il campione in questione deve essere analizzato:

- Questo campione di *Listeria monocytogenes* viene considerato **negativo** se non è presente alcun valore Cq nel canale FAM e il controllo interno ha un Cq ≥ 28
- Se anche il controllo interno non ha un valore Cq (Cq = N/A), ciò probabilmente indica un'inibizione della reazione PCR. È necessario diluire il campione (utilizzando 10 µl di estratto di DNA, effettuare una diluizione 1:10 in acqua distillata sterile e quindi analizzare 5 µl di diluizione) e ripetere la PCR

- Se il valore Cq per il controllo interno è <28, non è possibile interpretare il risultato. Verificare che la soglia sia posizionata correttamente o che la curva dei dati non elaborati sia una curva di amplificazione regolare. Se la curva non possiede una forma caratteristica, sarà necessario ripetere il test PCR.

L'interpretazione dei risultati del test viene riepilogata nella tabella seguente:

Rilevazione <i>L. monocytogenes</i> (canale FAM)	Rilevazione controllo interno (canale HEX)	Interpretazione
Cq ≥ 10	N/A	Positivo
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Inibizione*

* Qualora la rilevazione produca un valore Cq = N/A sia per il target, sia per il controllo interno, l'estratto di DNA deve essere diluito (1:10) e testato nuovamente.

Il mancato rispetto dei criteri di convalida può portare a un'interpretazione non valida. Verificare i dati non elaborati e procedere come se il campione fosse inibito.

Sezione 8

Conferma dei risultati positivi

Nell'ambito del metodo certificato della VALIDAZIONE NF, tutti i risultati iQ-Check positivi devono essere confermati come segue:

- Mediante test classici illustrati nei metodi standardizzati CEN o ISO, direttamente dall'Half Fraser Broth, o ricominciando dal campione durante l'utilizzo di LSB o LSB II.
- Tramite isolamento dell'LSB o LSB II arricchito (strisciare 100 µl) su agar cromogenico RAPID'*Listeria* spp. O RAPID'*L.mono* e incubazione per 24 hr a 37 ± 1 °C. La presenza di colonie caratteristiche su RAPID'*L.mono* è sufficiente a confermare la presenza di *L. monocytogenes*. Per confermare *L. monocytogenes* su RAPID'*Listeria* spp, utilizzare un test di identificazione.
- Tramite isolamento di LSB o LSB II (strisciare 10 µl) su agar AL o PALCAM e incubazione per 24-48 hr a 37 ± 1 °C. Le colonie tipiche devono essere confermate dai test descritti nel metodo ISO fino all'identificazione della specie.
- Tramite qualunque metodo alternativo certificato dalla VALIDAZIONE NF in base a un principio diverso da quello impiegato nel test PCR iQ-Check *L. monocytogenes* II. Il protocollo validato di questo secondo metodo deve essere seguito interamente.

In caso di risultati discrepanti tra iQ-Check *L. monocytogenes* II Kit e una qualunque delle opzioni di conferma sopraelencate, seguire le fasi necessarie al fine di garantire risultati validi.

Successivamente all'incubazione a 30 °C, è possibile conservare l'LSB o LSB II arricchito a 2-8 °C per un massimo di 72 hr prima di eseguire la conferma.

Nell'ambito della validazione AOAC, il risultato positivo di iQ-Check *L. monocytogenes* deve essere considerato presuntivo positivo e confermato in conformità a un metodo di riferimento opportuno (ad esempio, USDA MLG, FDA BAM, ISO, MFHPB, ecc.). In alternativa, per matrici selezionate, strisciare 10 µl di LSB o LSB II arricchito su agar cromogenico RAPID'*L. mono*, RAPID'*Listeria* spp. o Agar *Listeria* e incubare per 24 hr a 37 ± 1 °C. La presenza di colonie caratteristiche di *Listeria monocytogenes* deve essere confermata biochimicamente per la presenza di *Listeria monocytogenes*.

Sezione 9

Conferma di singole colonie tramite il kit iQ-Check

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit può essere utilizzato anche per la conferma di singole colonie isolate di *L. monocytogenes* su piastre agar. Quanto segue è ufficialmente validato dal certificato AFNOR in materia di terreni cromogenici RAPID'*L.mono* e RAPID'*Listeria spp.*

1. Scegliere una colonia isolata da una piastra agar selettiva o non selettiva servendosi di uno stuzzicadenti, un'ansa sterile o altri prodotti di consumo adattati (ad esempio, un puntale per pipetta).
2. Risospendere la colonia in 100 µl di sale triptone o acqua distillata sterile in una provetta per microcentrifuga. Omogeneizzare il tutto mediante un miscelatore vortex.
3. Utilizzare 5 µl della sospensione con 45 µl di miscela di PCR (vedere il paragrafo D: PCR real-time nel protocollo della Sezione 7) e seguire il resto del protocollo iQ-Check *L. monocytogenes* II per l'interpretazione di dati e risultati.

Sezione 10

Esecuzione e convalida del test

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit è specificamente indicato per la rilevazione di *L. monocytogenes*



BRD 07/10-04/05

METODI DI ANALISI
ALTERNATIVI PER
IL SETTORE
AGROALIMENTARE

<http://nf-validation.afnor.org>

Validazione NF

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit è certificato ai sensi della VALIDAZIONE NF come metodo alternativo rispetto a quello di riferimento ISO 11290-1:2017 (vedere riferimento 4 nella Sezione 11) per la rilevazione di *L. monocytogenes* in tutti i prodotti destinati al consumo umano e nei campioni ambientali. La validazione osserva il protocollo ISO 16140-2:2016 (vedere riferimento 5 nella Sezione 11) e comprende l'utilizzo dei sistemi PCR Real-Time CFX96 Touch Deep Well System e CFX Opus Deepwell System. L'utilizzo di iQ-Check Free DNA Removal Solution è validato per alimenti preparati, prodotti a base di latte e superfici campioni ambientali di produzione. Il software associato è CFX Manager Software IDE Software (versione 2.2 e successive). Il file di protocollo di applicazione "Lmono Fast" è stato validato. Numero di certificato: BRD 07/10-04/05. Periodo di validità: Fare riferimento al certificato disponibile sul sito web di AFNOR.



Validazione AOAC

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit (protocollo Easy II) ha ottenuto la validazione di AOAC Research Institute in linea con il Performance Tested Method Program (programma metodo testato per le prestazioni) per la rilevazione di *L. monocytogenes* in tacchino, hot dog, salmone affumicato, fiocchi di latte e superfici in acciaio inossidabile. Un risultato positivo con iQ-Check deve essere considerato come presunto, si raccomanda pertanto di effettuare la conferma seguendo le raccomandazioni nella Sezione 8. LSB, LSB II, l'APF "Lmono Fast", l'uso dell' iQ-Check Free DNA Removal Solution e l'uso dei sistemi PCR real-time CFX96 Touch Deep Well System e CFX Opus Deepwell System sono validati per tutti i campioni. Il software associato è CFX Manager Software IDE Software (versione 2.2 e successive). Numero di certificato: 010802.



Validazione Health Canada

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit (protocollo Easy II) ha ottenuto la validazione di Health Canada (MFLP-54) per la rilevazione di *L. monocytogenes* da carne e pollame pronti al consumo (RTE), frutta e prodotti a base di verdura (escluse le materie prime vegetali lavorate), pesce (non affumicato), latticini congelati e fermentati come campioni da 25 e 125 g. Un risultato positivo con iQ-Check deve essere considerato come presunto, si raccomanda pertanto di effettuare la conferma in linea con MFHPB-30 (vedere riferimento 2 nella Sezione 11).



Validazione NordVal

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit ha ottenuto la validazione di NordVal per:

- Arricchimento in Half Fraser Broth seguito dal protocollo di lisi Standard II
- Arricchimento in *Listeria* Special Broth seguito dal protocollo di lisi Standard II
- Arricchimento in *Listeria* Special Broth seguito dal protocollo di lisi Easy II, che non richiede più la prima fase di centrifugazione

Numero di certificato: 037. Per informazioni sul periodo di validità, fare riferimento al certificato disponibile sul sito web di NordVal.

Sezione 11

Riferimenti bibliografici

AOAC Official Method 993.12-1996(1999). *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. Selective enrichment and isolation method.

Health Canada (2011). Health Products and Food Branch. MFHPB-30. Isolation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. from foods and environmental samples. The Compendium of Analytical Methods, Volume 2, February 2011.

ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 11290-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. — Part 1: Detection method.

ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

ISO 22174. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2021). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 8 .13: Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, ready-to-eat siluriformes (fish) and egg products, and environmental samples.

https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-09/MLG-8.13.pdf, accessed February 14, 2020.

United States Food and Drug Administration (2017). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>, accessed February 14, 2020.

Sezione 12

Cronologia delle revisioni

Data di rilascio	Numero di documento	Modifica
Ottobre 2023	10000167776 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Cambiamento del numero di documento - versione precedente Manuale d'uso 10000123535 Ver C iQ-Check <i>Listeria monocytogenes</i> II- Estensione AFNOR: LSB II per gli alimenti preparati, prodotti a base di latte e superfici campioni ambientali di produzione

Appendice — Guida al calcolo della miscela di PCR

Al fine di trovare i volumi corretti per la preparazione della miscela di PCR, aggiungere il numero totale di campioni e controlli da analizzare e trovare i volumi corrispondenti dei reagenti B e C nella tabella.

Numero totale di campioni e controlli	Sonde reagente B, µl	Miscela di amplificazione Reagente C, µl	Numero totale di campioni e controlli	Sonde reagente B, µl	Miscela di amplificazione Reagente C, µl	Numero totale di campioni e controlli	Sonde reagente B, µl	Miscela di amplificazione Reagente C, µl
1	5	40	33	178	1.400	65	351	2.800
2	11	86	34	184	1.500	66	356	2.900
3	16	130	35	189	1.500	67	362	2.900
4	22	173	36	194	1.600	68	367	2.900
5	27	216	37	200	1.600	69	373	3.000
6	32	259	38	205	1.600	70	378	3.000
7	38	302	39	211	1.700	71	383	3.100
8	43	346	40	216	1.700	72	389	3.100
9	49	389	41	221	1.800	73	394	3.200
10	54	432	42	227	1.800	74	400	3.200
11	59	475	43	232	1.900	75	405	3.200
12	65	518	44	238	1.900	76	410	3.300
13	70	562	45	243	1.900	77	416	3.300
14	76	605	46	248	2.000	78	421	3.400
15	81	648	47	254	2.000	79	427	3.400
16	86	691	48	259	2.100	80	432	3.500
17	92	734	49	265	2.100	81	437	3.500
18	97	778	50	270	2.200	82	443	3.500
19	103	821	51	275	2.200	83	448	3.600
20	108	864	52	281	2.200	84	454	3.600
21	113	907	53	286	2.300	85	459	3.700
22	119	950	54	292	2.300	86	464	3.700
23	124	994	55	297	2.400	87	470	3.800
24	130	1.000	56	302	2.400	88	475	3.800
25	135	1.100	57	308	2.500	89	481	3.800
26	140	1.100	58	313	2.500	90	486	3.900
27	146	1.200	59	319	2.500	91	491	3.900
28	151	1.200	60	324	2.600	92	497	4.000
29	157	1.300	61	329	2.600	93	502	4.000
30	162	1.300	62	335	2.700	94	508	4.100
31	167	1.300	63	340	2.700	95	513	4.100
32	173	1.400	64	346	2.800	96	518	4.100

Per ulteriori informazioni visitare il sito bio-rad.com/iqcheck.

BIO-RAD è un marchio registrato di Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK è un marchio registrato di Bio-Rad Europe GmbH in determinate giurisdizioni.

Tutti i marchi registrati qui utilizzati sono di proprietà dei rispettivi proprietari.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

iQ-Check *Listeria* *monocytogenes* II Kit

Guia do usuário

**Teste para a detecção do PCR em tempo real de
L. monocytogenes em amostras alimentares e ambientais**

Nº do catálogo 3578124

BIO-RAD

Índice

Seção 1	Introdução.....	1
Seção 2	Tecnologia iQ-Check <i>L. monocytogenes</i> II	1
Seção 3	Componentes do kit.....	2
Seção 4	Prazo de validade e armazenamento	2
Seção 5	Materiais necessários, mas não fornecidos	2
	Equipamento.....	2
	Suprimentos.....	3
Seção 6	Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados.....	4
Seção 7	Protocolo.....	6
	Enriquecimento da amostra	6
	Tratamento de remoção de DNA livre.....	7
	Extração de DNA	7
	PCR em Tempo Real.....	8
	Análise de dados	9
Seção 8	Confirmação de Resultados Positivos	10
Seção 9	Confirmação de Colônias Únicas usando o iQ-Check Kit	10
Seção 10	Desempenho e validação do teste.....	11
Seção 11	Referências.....	12
Seção 12	Histórico de Revisão	13
	Apêndice – Guia de Cálculo da Mistura de PCR	14

Seção 1

Introdução

Os métodos bacteriológicos convencionais são, muitas vezes, longos e entediantes. Em comparação, o iQ-Check *Listeria monocytogenes* II é um teste qualitativo simples e rápido, permitindo a detecção de sequências específicas de DNA exclusivas de *L. monocytogenes* encontradas em amostras ambientais e produtos alimentícios. Utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), as sequências de DNA específicas da *L. monocytogenes* são amplificadas e detectadas simultaneamente através de sondas fluorescentes. Podem ser processadas até 94 amostras, com risco minimizado de contaminação e um procedimento fácil de usar. Os usuários pretendidos deste kit são técnicos de laboratório treinados que estão realizando testes para detectar *L. monocytogenes*. A utilização deste teste permite que os resultados sejam obtidos poucas horas após o enriquecimento.

Seção 2

Tecnologia iQ-Check *L. monocytogenes* II

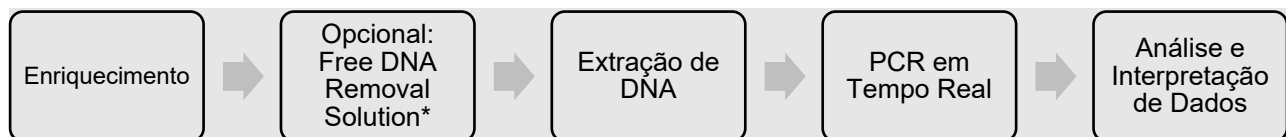
O iQ-Check *L. monocytogenes* II Kit é um teste baseado na amplificação e detecção genética através de PCR em tempo real. Os reagentes de PCR prontos para uso do kit contêm oligonucleotídeos (iniciadores e sondas) específicos para *L. monocytogenes*, bem como DNA polimerase e nucleotídeos. A detecção e a análise de dados são otimizadas para uso com um instrumento de PCR em tempo real da Bio-Rad, como o sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well.

A PCR é uma poderosa técnica utilizada para gerar muitas cópias do DNA alvo. Durante a reação de PCR, os vários ciclos de aquecimento e resfriamento permitem a desnaturação do DNA, seguido pelos primers ligando-se à região-alvo. O DNA polimerase utiliza esses primers e desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) para estender o DNA, criando cópias do DNA-alvo. Essas cópias se chamam amplicons.

Na PCR em tempo real, são utilizadas sondas específicas para detectar o DNA durante a etapa de amplificação, através da hibridização dos amplicons. Estas sondas estão ligadas a um fluoróforo, que apresenta fluorescência apenas quando hibridizado à sequência-alvo. FAM é o fluoróforo ligado às sondas que estão hibridizando nas sequências de DNA exclusivas da *L. monocytogenes*. Na ausência de DNA-alvo, não será observada fluorescência. Como a quantidade de amplicons aumenta em cada rodada de amplificação, a intensidade da fluorescência aumenta também. O módulo óptico mede essa fluorescência em cada ciclo de PCR, na fase de hibridação (annealing), e o software associado plota a intensidade da fluorescência em função do número de ciclos.

Um controle interno de DNA sintético é incluído na mistura da reação para validar quaisquer possíveis resultados negativos. Este controle é amplificado com uma sonda específica ao mesmo tempo que a sequência-alvo de DNA *L. monocytogenes*, e é detectado por um segundo fluoróforo.

Esse teste permite a detecção qualitativa de *L. monocytogenes* em alimentos selecionados e amostras ambientais previamente enriquecidas por cultura. Inclui as cinco etapas principais seguintes:



* Consulte o guia do usuário da solução de iQ-Check Free DNA Removal Solution (#10000058391) para as condições de uso.

Seção 3

Componentes do kit

O iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit contém reagentes suficientes para 96 testes (94 amostras).

ID do reagente	Reagente	Quantidade fornecida, ml
A	Reagente de lise	1 ampola, 20
B	Sondas fluorescentes	1 tubo, 0,55
C	Mistura de amplificação	1 tubo, 4,4
D	Controle de PCR negativo	1 tubo, 0,5
E	Controle de PCR positivo	1 tubo, 0,25
F	Microesferas de lise	1 ampola, 17,6 g

Seção 4

Prazo de validade e armazenamento

Uma vez recebido, o kit deve ser armazenado a 2–8°C. Os reagentes armazenados a esta temperatura podem ser utilizados até o prazo de validade indicado nos tubos. O prazo de validade do reagente de lise é de 6 meses, uma vez misturado com as microesferas de lise.

Seção 5

Materiais necessários, mas não fornecidos

A. Equipamento

- Liquidificador de laboratório para homogeneizar amostras de teste
- Incubadora para enriquecimento microbiológico de amostras
- Específico para extração em tubos estéreis de tampa de rosca cônica de 1,5 ml:
 - Centrífuga de bancada (capaz de 10.000–12.000 x g)
 - Bloco para banho seco a 37 ± 2°C e/ou 95–100°C
- Disruptor celular, como um Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)
- Específico para extração em placa Deep Well:
 - Agitador térmico de aquecimento* capaz de manter 37 ± 2°C e/ou 95–100°C, com uma velocidade de mistura de pelo menos 1.300 rpm
- Vortexer
- Placa de agitação magnética
- Micropipetas de 20, 200 e 1.000 µl
- Sistema de PCR em tempo real da Bio-Rad*; por exemplo, os sistemas de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well (nº do catálogo 3600037) ou CFX Opus Deepwell (nº do catálogo 17007991)
- Bio-Rad iQ-Check Prep System para extração automatizada de DNA e configuração de placas de PCR (nº do catálogo 3594911)

Nota: Recomendamos o uso de uma fonte de alimentação ininterrupta (UPS) com o termociclador e iQ-Check Prep System.

* Entre em contato com o suporte técnico da Bio-Rad para obter informações sobre os instrumentos recomendados.

B. Suprimentos

- Meio de enriquecimento: *Listeria* Special Broth (LSB) (nº do catálogo 3555703, 225 ml x 6 frascos; 3564703, desidratado, 500 g; 3555793, 5 L x 2 sacos; 3564753, desidratado, 5 kg) ou Half Fraser Broth (nº do catálogo 3564604, desidratado, 500 g; 3555797, 225 ml x 6 frascos; 3555794, 3 L x 4 sacos)
- Meio de enriquecimento: *Listeria* Special Broth II (LSB II) (nº do catálogo 12017463, 225 ml x 6 frascos; 12017388, desidratado, 500 g; 12017378, desidratado, 5 kg)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (nº do catálogo 3594970)
- Específico para amostras ambientais:
 - Esponjas ambientais
 - Esfregãos ambientais
 - Caldo neutralizante para esponjas e cotonetes, como Dey-Engley (D/E) ou HiCap Neutralizing Broth ou Lethen Broth
- Específico para extração em tubos:
 - Tubos com tampa cônica de rosca de 1,5 ml, estéreis (por exemplo, nº do catálogo 2240110XTU)
- Específico para extração em placa Deep Well:
 - Placa Deep Well de 96 poços (nº do catálogo 3594900)
 - Filme plástico de vedação (nº do catálogo 3590139)
 - X-Pierce Sealing Films (nº do catálogo 3593977) ou Pre-Pierced Plate Sealing Film (nº do catálogo 3600040, apenas América do Norte)
- Específico para os protocolos de extração Standard II e Easy II:
 - iQ-Check Lysis Beads (reagente F) (nº do catálogo 3578136)
 - Pontas de pipete com abertura ampla, 200 µl
- Específico para o sistema iQ-Check Prep:
 - Recipiente de diluição de 60 ml (nº do catálogo 3594904)
 - Ponteiras com filtro (nº do catálogo 3594902 ou 12014486: 50 µl; 3594903 ou 12014483: 1.000 µl)
- Tubos de mistura de PCR (nº do catálogo 12016673, 5 ml x 25)
- RAPID'*Listeria* spp. Agar* (nº do catálogo 3564744, desidratado, 500 g; 3564745, suplemento 1; 3564746, suplemento 2)
- RAPID'*L.mono* Agar (nº do catálogo 3563694, 90 mm x 20 placas; 3555294, kit para 190 ml de ágar mais 2 suplementos; 3564293, desidratado, 500 g; 3564294, suplemento 1; 3564746, suplemento 2)
- Placas de PCR, tubos, fitas e tampas de vedação
- Pontas de filtro estéreis adaptáveis a micropipetas de 20, 200 e 1.000 µl
- Ponteiras para pipetas Combitip ou pipetadores de repetição equivalentes, estéreis, embalados individualmente
- Pipetas de 1 e 10 ml
- Tubos de ensaio estéreis de 2 e 5 ml
- Luvas sem talco
- Água estéril destilada
- Alvejante, 5%
- Agente de limpeza, como o DNA AWAY ou o RNase AWAY

* Pode ser usado fora da validação AOAC-PTM.

Seção 6

Precauções e recomendações de segurança para melhores resultados

- Este teste deve ser realizado por pessoal treinado
- Gestantes, crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos não devem realizar esse método nem lidar com *L. monocytogenes* devido à alta taxa de infecção e fatalidade associada a esses grupos
- Amostras e culturas de enriquecimento devem ser manuseadas como material potencialmente infeccioso e descartadas de acordo com as regras e regulamentos locais
- Todos os materiais potencialmente infecciosos devem passar por autoclavagem antes do descarte
- A qualidade dos resultados depende do estrito cumprimento das Boas Práticas de Laboratório (por exemplo, a norma EN ISO 7218), especialmente em relação ao PCR:
 - Nunca circule equipamentos de laboratório (pipetas, tubos etc.) de uma estação de trabalho para outra
 - Sempre use um controle positivo e um controle negativo para cada série de reações de amplificação
 - Não utilize reagentes após a expiração de suas datas de validade
 - Agite os reagentes do kit antes de utilizá-los, de modo a garantir a homogeneidade
 - Verifique periodicamente a exatidão e precisão das pipetas, bem como o correto funcionamento dos instrumentos
 - Troque frequentemente de luvas, especialmente se suspeitar que estão contaminadas
 - Limpe os espaços de trabalho periodicamente com alvejante a 5% e outros agentes descontaminantes, como o DNA AWAY
 - Utilize luvas sem talco e evite escrever ou deixar impressões digitais nas tampas dos tubos. Ambos interferem na aquisição de dados
- Recomenda-se fortemente seguir os requisitos gerais descritos na norma EN ISO 22174:2005 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions)
- iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit:
 - Todas as substâncias ou misturas no kit de teste são produtos classificados, de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado (GHS). O contato com ácidos pode causar a liberação de gases tóxicos. Nenhuma precaução especial é necessária, se usado corretamente. Se o produto for inalado, forneça ar fresco e consulte um médico em caso de queixas. Após o contato dos olhos com o produto, enxágue os olhos abertos por vários minutos em água corrente. Se os produtos forem ingeridos, provoque vômito e procure ajuda médica
- iQ-Check Prep System:
 - O uso inadequado do iQ-Check Prep System pode causar ferimentos ou danos ao instrumento. Alguns componentes podem representar um risco de ferimentos pessoais devido ao calor excessivo, se manuseados incorretamente. Para uso seguro, o iQ-Check Prep System deve ser operado somente por pessoal qualificado do laboratório que tenha sido treinado adequadamente. A manutenção do instrumento deve ser realizada apenas pelos engenheiros de serviço de campo da Bio-Rad

- Sistemas de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well ou CFX Opus Deepwell:
 - O uso inadequado do Sistema CFX96 Touch Deep Well ou CFX Opus Deepwell System pode causar ferimentos ou danos ao instrumento. Alguns componentes podem representar um risco de ferimentos pessoais devido ao calor excessivo, se manuseados incorretamente. Para uso seguro, o Sistema CFX96 Touch Deep Well e CFX Opus Deepwell deve ser operado somente por pessoal qualificado do laboratório que tenha sido treinado adequadamente. A manutenção do instrumento deve ser realizada apenas pelos engenheiros de serviço de campo da Bio-Rad
- Enriquecimento:
 - O usuário deve ler, entender e seguir todas as informações de segurança nas instruções do iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit. Guarde as instruções de segurança para referência futura. Para reduzir os riscos associados à exposição a produtos químicos e riscos biológicos, realize testes de patógenos em um laboratório devidamente equipado, sob o controle de pessoal treinado. Sempre siga as práticas padrão de segurança do laboratório, incluindo o uso de vestuário de proteção e proteção ocular adequados ao manusear reagentes e amostras contaminadas. Evite o contato com o conteúdo do meio de enriquecimento e dos tubos de reagentes após a amplificação. Descarte amostras enriquecidas de acordo com as normas atuais do setor
 - A *Listeria* é um organismo de nível 2 de biossegurança. Amostras biológicas, como enriquecimentos, têm o potencial de transmitir doenças infecciosas. Siga todos os regulamentos locais, estaduais/provinciais e/ou nacionais aplicáveis sobre o descarte de resíduos biológicos. Use equipamento de proteção adequado, que inclua, entre outros, óculos de proteção, proteção facial, roupas/jaleco e luvas. Todo o trabalho deve ser realizado em instalações adequadamente equipadas, utilizando o equipamento de segurança apropriado (por exemplo, dispositivos de contenção física). Os indivíduos devem ser treinados de acordo com os requisitos regulamentares e da empresa/instituição aplicáveis antes de trabalhar com materiais potencialmente infecciosos
 - Quando o teste estiver concluído, todos os materiais e meios possivelmente contendo patógenos devem ser descontaminados, seguindo as normas atuais da indústria para o descarte de resíduos contaminados (ou seja, autoclave por 20 min a 121°C). Consulte a folha de dados de segurança para obter informações adicionais e regulamentos locais para descarte

Seção 7

Protocolo

A. Enriquecimento da amostra

É altamente recomendável ler o protocolo inteiro antes de iniciar o teste.

O meio de enriquecimento deve estar na temperatura de incubação adequada (ambiente ou 30°C/37°C, quando necessário) antes do uso.

O uso de um saco de enriquecimento com filtro incorporado é altamente recomendado.

No âmbito da NF VALIDATION, porções de teste com peso superior a 25 g não foram testadas. Incubar, sem mexer, várias vezes e nas temperaturas indicadas na tabela abaixo. Também é possível realizar o teste iQ-Check a partir do LSB que foi enriquecido e armazenado a 2–8°C por até 72 hr.

A tabela a seguir descreve os diferentes protocolos que podem ser usados, dependendo do aplicativo e do escopo da validação:

NF VALIDATION BRD 7/10-04/05 e NordVal 037		
Escopo (Matrizes)	Preparação da amostra	Enriquecimento/Extração de DNA
Todos os produtos alimentares e amostras ambientais ¹	Homogeneíze <i>n</i> g de alimento em 9 x <i>n</i> ml de Half Fraser Broth ou LSB	Extração Standard II (Half Fraser) <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 24–26 hr a 30 ± 1°C Formato do tubo Extração Standard II (LSB) <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 22–24 hr a 30 ± 1°C Formato do tubo Extração Easy II (LSB) <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 24–26 hr a 30 ± 1°C Formato do tubo
Ambiente e superfícies de produção ²	Homogeneíze <i>n</i> g de alimento em 9 x <i>n</i> ml de LSB pré-aquecido ou LSB II em temperatura ambiente	Extração Easy II (LSB) <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 18–26 hr a 30 ± 1°C Formato do tubo/Deep Well Extração Easy II (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 18–26 hr a 37 ± 1°C Formato do tubo/Deep Well
Alimentos compostos ²	Homogeneíze <i>n</i> g de alimento em 9 x <i>n</i> ml de LSB II	Extração Easy II (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 18–26 hr a 37 ± 1°C Formato do deep well
Laticínios ²	Homogeneíze <i>n</i> g de alimento em 9 x <i>n</i> ml de LSB II pré-aquecido	Extração Easy II (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 20–28 hr a 37 ± 1°C Formato do deep well
AOAC PTM 010802		
Escopo (Matrizes) ²⁻³	Preparação da amostra	Enriquecimento/Extração de DNA
Peru fatiado, cachorro-quente, salmão defumado, queijo cottage	Homogeneíze <i>n</i> g de alimento em 9 x <i>n</i> ml de LSB ou LSB II (25 g em 225 ml; 125 g em 1.125 ml)	Extração Easy II (LSB) <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 24–26 hr a 30 ± 1°C Formato do tubo/Deep Well Extração Easy II (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 18–24 hr a 37 ± 1°C Formato do tubo/Deep Well
Superfícies de aço inoxidável	Amostras ambientais <ul style="list-style-type: none"> Umedeça os cotonetes e esponjas com um caldo neutralizante que não contenha complexo aril sulfonato Para superfícies sendo analisadas com swabs, faça a amostragem de uma área de 1 x 1" (2,54 x 2,54 cm) Para superfícies sendo analisadas com esponjas, faça a amostragem de uma área de 4 x 4" (10,16 x 10,16 cm) 	Extração Easy II <ul style="list-style-type: none"> Incubar por 16–24 hr a 37 ± 1°C Formato do tubo/Deep Well

- | | | |
|--|---|--|
| | <ul style="list-style-type: none">▪ Adicionar LSB II suficiente para cobrir o swab (10 ml) ou a esponja (60–225 ml) | |
|--|---|--|

Consulte o MFLP-54 para matrizes e protocolos aprovados pela Health Canada

¹ A validação também inclui o uso do arquivo de protocolo de aplicação “Lmono Fast” para um tempo de execução de PCR reduzido. Entre em contato com seu representante da Bio-Rad para obter mais informações.

² A validação também inclui o uso do iQ-Check Free DNA Removal Solution e do arquivo de protocolo de aplicação “Lmono Fast” para um tempo de execução de PCR reduzido. Entre em contato com seu representante da Bio-Rad para obter mais informações.

³ A validação inclui estriar direto placas de RAPID'L. *mono*, RAPID'*Listeria* spp., ou *Listeria* ágar (excluindo queijo natural)

B. Tratamento de remoção de DNA livre

A iQ-Check Free DNA Removal Solution fornece uma maneira ideal de remover DNA livre.

Siga as recomendações da Bio-Rad no guia do usuário (nº do documento 10000058391). Este protocolo é validado pela Certificação AFNOR na categoria de amostras ambientais de produção.

C. Extração de DNA

Recomendações gerais:

1. Ligue o bloco de calor ou o agitador térmico para pré-aquecer antes de iniciar o teste. Defina para 95–100°C. Mantenha o reagente de lise em suspensão enquanto pipeta, agitando em velocidade média em uma placa de agitação magnética.
2. Em geral, evite agitar o saco de enriquecimento e coletar fragmentos de grande dimensão de resíduos alimentares. Para amostras alimentares com um sobrenadante gorduroso, colete a amostra logo abaixo desta camada.
3. Abra os tubos e os poços com cuidado para evitar possíveis contaminações cruzadas.
4. Resfrie a placa Deep Well antes de pipetar diretamente através do filme de vedação pré-perfurado.
5. Use a barra magnética para manter o reagente de lise em suspensão. Pipete enquanto estiver mexendo em velocidade média.
6. Agite suavemente o reagente de lise manualmente primeiro para ressuspender a resina. Pipete enquanto estiver mexendo em velocidade média com a barra magnética contida na ampola, para mantê-lo em suspensão.
7. Reconstitua o reagente final de lise da seguinte maneira:
 - a. Despeje cuidadosamente todo o conteúdo do reagente F (beads de lise) no reagente A (reagente de lise).
 - b. Use consumíveis com uma ponta larga o suficiente para permitir a pipetagem do reagente de lise homogeneizado.
 - c. O reagente de lise misturado com as esferas de lise (reagentes A + F) tem um prazo de validade de 6 meses quando armazenado a 4°C.

Protocolo Standard II

1. Colete 1,5 ml de amostra enriquecida decantada em um tubo.
2. Centrifugue o tubo a 10.000–12.000 x g por 5 min. Descarte o sobrenadante.
3. Adicione 250 µl de reagente de lise homogeneizado (reagentes A + F) ao sedimento e ressuspenda o sedimento pipetando o reagente para cima e para baixo. Feche o tubo.

Nota: Agite suavemente o reagente de lise manualmente com a mão para ressuspender as microesferas.

4. Coloque o tubo no agitador térmico ou disruptor celular por 3 ± 1 min.

5. Incube no bloco de calor apropriado a 95–100°C por 10–15 min.
6. Agite no vortex o tubo em alta velocidade e centrifugue a 10.000–12.000 x g por 5 min.

Este é o ponto de parada recomendado para interromper temporariamente o procedimento.

O sobrenadante pode ser armazenado por até 1 ano a –20°C. Sempre deixe descongelar e homogeneizar e depois centrifugue a 10.000–12.000 x g por 5 min antes de reutilizar.

Protocolo Easy II

1. Alíquota de 100 µl de reagente de lise homogeneizado (reagentes A + F) aos tubos ou poços de uma placa Deep Well.

Nota: Agite suavemente o reagente de lise manualmente com a mão para ressuspender as microesferas.

2. Adicione 100 µl de amostra enriquecida.

Nota: Agite a suspensão para homogeneizar a cultura e, em seguida, permita que os detritos se depositem antes de coletar a amostra.

3. Misture a solução pipetando para cima e para baixo até homogeneizar.
4. Feche os tubos ou sele a placa Deep Well com filme de vedação pré-perfurado.
5. Coloque os tubos no Cell disruptor por 3 ± 1 min. Encubar os tubos em bloco térmico a 95-100°C por 15-20 min.
6. Se estiver usando um agitador térmico para tubos ou placas de poço profundo, encubar os tubos ou placas de poço profundo no agitador térmico a 1.300 a 1.600 rpm a 95-100°C por 15-20 min.
7. Agite no vortex os tubos em alta velocidade e em seguida centrifugue a 10.000–12.000 x g por 2 min.

A centrifugação não é necessária para a placa Deep Well.

Este é o ponto de parada recomendado para interromper temporariamente o procedimento.

O sobrenadante pode ser armazenado por até 1 ano a –20°C. Sempre deixe descongelar e homogeneizar e depois centrifugue a 10.000–12.000 x g por 5 min antes de reutilizar.

D. PCR em Tempo Real

Configuração do instrumento e do software

Para a configuração do instrumento e do software, siga as instruções do guia do usuário do sistema PCR em tempo real para iQ-Check kits.

Preparação da mistura de PCR

1. Prepare a mistura de PCR contendo a solução de amplificação (reagente C) e as sondas fluorescentes (reagente B). O volume de mistura de PCR necessário depende do número de amostras e controles a serem analisados. Devem ser incluídos pelo menos um controle positivo e um controle negativo em cada execução da PCR. Use a tabela de pipetagem no Apêndice — Guia de cálculo da mistura de PCR para encontrar os volumes corretos a serem usados para cada reagente.

Nota: Use a mistura de PCR (reagentes B + C) imediatamente após a preparação. Ela é estável por 1 hr no máximo a 2–8°C.

2. Pipete 45 µl da mistura de PCR para cada poço, de acordo com a configuração da placa.
3. Adicione 5 µl de extrato de DNA, reagente D (controle negativo) ou reagente E (controle positivo). Não agite a amostra em vortex antes da pipetagem. Vede hermeticamente os poços da placa de PCR ou tiras de tubo. É importante evitar a formação de bolhas no fundo dos poços, o que é conseguido fazendo a pipetagem cuidadosamente. Como uma etapa opcional, centrifugue a placa de PCR selada ou as tiras de tubo (rotação rápida) para eliminar quaisquer bolhas.

- Coloque a placa de PCR ou as tiras de tubo no termociclador. Certifique-se de colocar a placa corretamente, com o poço A1 no canto superior esquerdo. Feche o módulo de reação.

Execute o PCR

Para iniciar a execução do PCR, siga as instruções do guia do usuário do sistema PCR em tempo real para os iQ-Check kits.

O arquivo de protocolo de aplicação "Lmono Fast" foi validado pela NF e AOAC.

E. Análise de dados

Os dados podem ser analisados diretamente no final da execução da PCR ou posteriormente, abrindo o arquivo de dados armazenados. Siga as instruções no manual do usuário do software CFX Manager IDE correspondente para abrir arquivos de dados e definir os parâmetros de análise de dados.

Interpretação de resultados

Depois que os parâmetros de análise de dados forem definidos, os resultados serão interpretados através da análise dos valores do ciclo de quantificação (Cq) de cada amostra (o ciclo no qual a curva de amplificação cruza o limite).

O software CFX Manager IDE permite análises automatizadas completas para sistemas de detecção de PCR em tempo real da Bio-Rad. Uma verificação das características típicas das curvas de amplificação deve ser realizada antes da liberação dos resultados. Entre em contato com a equipe de suporte técnico da Bio-Rad se for necessário suporte adicional.

Controles

Verifique os controles positivo e negativo antes de interpretar os resultados da amostra.

Para que a experiência seja válida, os controles devem ter os resultados resumidos na tabela a seguir.

Caso contrário, a reação de PCR deve ser repetida.

Controle	Deteção de <i>L. monocytogenes</i> (Canal FAM)	Deteção de controle interno (Canal HEX)
Controle negativo	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
Controle positivo	26 ≤ Cq ≤ 36	N/A

* O software indica um valor de Cq (o ciclo no qual a curva de amplificação ultrapassa o limite) de N/A (não aplicável) quando a fluorescência de uma amostra não aumenta significativamente acima do ruído de fundo e, portanto, não ultrapassa o limite.

Se os resultados dos controles negativos e positivos diferirem dos da tabela Controles (controle inválido), repita a execução e a análise descritas em D. PCR em tempo real e E. Análise de dados na Seção 7 Protocolo

Amostras

Um teste de PCR positivo iQ-Check *Listeria monocytogenes* deve mostrar uma curva de amplificação típica e um valor de Cq ≥ 10 para o fluoróforo FAM.

- Se o valor de Cq para ambos os canais estiver abaixo de 10, verifique se a curva de dados brutos é uma curva de amplificação regular (com uma linha de base plana, seguida de um rápido aumento exponencial da fluorescência e depois de um achatamento). Se a curva parecer correta, considere estar diante de uma amostra positiva para *Listeria monocytogenes*

Caso não haja valor Cq (Cq = N/A) para a FAM, ou caso a curva não seja uma curva de amplificação típica, deve-se analisar o controle interno dessa amostra:

- Essa amostra é considerada **negativa para *Listeria monocytogenes*** se não houver valor Cq no canal FAM e o controle interno tiver um valor Cq ≥ 28
- Caso o controle interno também não tenha um valor Cq (Cq = N/A), provavelmente isso indica a inibição da reação de PCR. A amostra precisa ser diluída (usando 10 µl de extrato de DNA, realizar uma diluição de 1:10 em água estéril destilada e depois testar 5 µl da diluição) e a PCR repetida
- Se o valor Cq para o controle interno for <28, não será possível interpretar o resultado. Confirme se o limite foi corretamente colocado, ou se a curva, como dados brutos, é uma curva regular de amplificação. Caso a curva não apresente uma forma característica, será necessário repetir o teste de PCR.

A interpretação dos resultados do teste é resumida na tabela a seguir.

Detecção de <i>L. monocytogenes</i> (Canal FAM)	Detecção de controle interno (Canal HEX)	Interpretação
Cq ≥ 10	N/A	Positivo
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Inibição*

* Quando a detecção do alvo e do controle interno fornecer um valor Cq = N/A, o extrato de DNA deve ser diluído em 1:10 e testado novamente.

Uma interpretação inválida pode ser fornecida quando os critérios de validação não são atendidos. Verifique os dados brutos e proceda como se a amostra estivesse inibida.

Seção 8

Confirmação de Resultados Positivos

No contexto do método certificado pela NF VALIDATION, todos os resultados positivos do iQ-Check devem ser confirmados das seguintes maneiras:

1. Utilizando testes clássicos, descritos nos métodos padronizados CEN ou ISO, diretamente do Half Fraser Broth, ou partindo da amostra ao usar LSB ou LSB II.
2. Por isolamento de LSB ou LSB II enriquecido (faixa de 100 µl) em ágar cromogênico RAPID'*Listeria* spp. ou RAPID'*L. mono* e incubação por 24 hr a 37 ± 1°C. A presença de colônias características no RAPID'*L. mono* é suficiente para confirmar a presença de *L. monocytogenes*. Use um teste de identificação para confirmar *L. monocytogenes* no meio RAPID'*Listeria* spp.
3. Por isolamento de LSB ou LSB II enriquecido (estriamento 10 µl) em ágar AL ou PALCAM e incubação por 24–48 hr a 37 ± 1°C. Colônias típicas devem ser confirmadas pelos testes descritos no método ISO até que as espécies sejam identificadas.
4. Utilizando qualquer outro método certificado pela NF VALIDATION, com base em um princípio diferente daquele usado no Teste de PCR iQ-Check *L. monocytogenes* II. O protocolo validado deste segundo método deve ser seguido inteiramente.

No caso de resultados discrepantes entre o iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit e qualquer uma das opções de confirmação listadas acima, siga as etapas necessárias para garantir resultados válidos.

É possível armazenar o LSB ou LSB II enriquecido a 2–8°C por 72 hr no máximo, após a incubação a 30°C, antes de realizar a confirmação.

No contexto da validação da AOAC, presume-se que um resultado positivo para iQ-Check *L. monocytogenes* seja positivo e recomenda-se a confirmação de acordo com um método de referência apropriado (por exemplo, USDA MLG, FDA BAM, ISO, MFHPB etc.). Como alternativa, para matrizes seletas, estriar 10 µl enriquecido LSB ou LSB II diretamente para ágar cromogênico RAPID'*L. mono*, RAPID'*Listeria* spp. ou *Listeria* e incubar por 24 hr a 37 ± 1°C. A presença da característica de colônias *Listeria monocytogenes* deve ser bioquimicamente confirmada para a presença de *Listeria monocytogenes*.

Seção 9

Confirmação de Colônias Únicas usando o iQ-Check Kit

O iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit também pode ser usado para confirmar colônias isoladas de *L. monocytogenes* em placas de ágar. Isso é validado oficialmente pela certificação AFNOR no RAPID'*L. mono* e RAPID'*Listeria* spp. meio cromogênico.

1. Escolha uma colônia isolada de uma placa de cultura de ágar seletivo ou não seletivo com um palito de dente, alça estéril ou outro consumível adaptado (por exemplo, uma ponta de pipeta).

2. Ressuspenda a colônia em 100 µl de sal de triptona ou água estéril destilada em um tubo de microcentrífuga.

Homogeneíze usando um vortexer.

3. Use 5 µl da suspensão com 45 µl de mistura de PCR (consulte D. PCR em tempo real na Seção 7 Protocolo) e siga o restante do iQ-Check *L. monocytogenes* II Protocolo para interpretação de dados e resultados.

Seção 10

Desempenho e validação do teste

O iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit é específico para a detecção de *L. monocytogenes*



BRD 07/10-04/05

MÉTODOS DE
ANÁLISE
ALTERNATIVA
PARA
O AGRONEGÓCIO

<http://nf-validation.afnor.org>

NF Validation

O iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit é certificado pela NF VALIDATION como um método alternativo ao método de referência ISO 11290-1:2017 (consulte a referência 4 na Seção 11), para a detecção de *L. monocytogenes* em todos os produtos para consumo humano e amostras ambientais. A validação seguiu o protocolo da ISO 16140-2:2016 (veja referência 5 na Seção 11) e inclui o uso dos sistemas de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well e CFX Opus Deepwell. O uso da iQ-Check Free DNA Removal Solution é validado para alimentos compostos, laticínios e amostras ambientais de produção. O software associado é CFX Manager IDE Software (Versão 2 0,2 e posterior). O Arquivo de Protocolo de Aplicação “Lmono Fast” é validado. Número do certificado: BRD 07/10–04/05. Válido até: Consulte o certificado disponível no site de certificação da AFNOR.



Validação AOAC

O iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit (protocolo Easy II) é validado pelo AOAC Research Institute no âmbito do Performance Tested Method Program para a detecção de *L. monocytogenes* em peru fatiado, cachorro-quente, salmão defumado, queijo cottage e superfícies de aço inoxidável. Um resultado positivo com o iQ-Check deve ser considerado como presumido e recomenda-se que seja confirmado seguindo os métodos de referência na Seção 8. LSB, LSB II, the “Lmono spp Fast” APF, o uso da iQ-Check Free DNA Removal Solution e dos sistemas de PCR em tempo real CFX96 Touch Deep Well e CFX Opus Deepwell são validados para todas as amostras. O software associado é o CFX Manager IDE Software (versão 2.2 e posterior). Número do certificado: 010802.



Validação Health Canada

O iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit (protocolo Easy II) foi validado pela Health Canada (MFLP-54) para a detecção de *L. monocytogenes* de carne e aves RTE, produtos à base de frutas e vegetais (excluindo vegetais crus processados), produtos de peixe e frutos do mar (excluindo peixe defumado) e laticínios congelados e fermentados para amostras de 25 e 125 g. Um resultado positivo com o iQ-Check deve ser considerado presumido e deve ser confirmado de acordo com o MFHPB-30 (consulte a referência 2 na Seção 11).



Validação NordVal

O iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit é validado pela NordVal para:

- Enriquecimento em Half Fraser Broth seguido pelo protocolo de Lise Standard II
- Enriquecimento em *Listeria* Special Broth, seguido do protocolo de Lise Standard II
- Enriquecimento em *Listeria* Special Broth seguido do protocolo de Lise Easy II, não exigindo mais a primeira etapa de centrifugação

Número do certificado: 037. Consulte o certificado disponível no site da NordVal para validade.

Seção 11

Referências

AOAC Official Method 993 .12-1996(1999). *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. Selective enrichment and isolation method.

Health Canada (2011). Health Products and Food Branch. MFHPB-30. Isolation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. from foods and environmental samples. The Compendium of Analytical Methods, Volume 2, February 2011.

ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 11290-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. — Parte 1: Detection method.

ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

ISO 22174. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2021). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 8 .13: Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, ready-to-eat siluriformes (fish) and egg products, and environmental samples. https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-09/MLG-8.13.pdf, accessed February 14, 2020.

United States Food and Drug Administration (2017). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>, accessed February 14, 2020.

Seção 12

Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Outubro de 2023	10000167776 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Alteração do número do documento - versão anterior Guia do Usuário 10000123535 Ver C iQ-Check <i>Listeria monocytogenes</i> II- Extensão AFNOR: LSB II alimentos compostos, amostras de ambientes de produção e laticínios

Apêndice – Guia de Cálculo da Mistura de PCR

Para encontrar os volumes corretos para a preparação da mistura de PCR, adicione o número total de amostras e de controles a serem analisados e encontre os volumes correspondentes de reagente B e de reagente C na tabela.

Número Total de Amostras e Controles	Reagente de sondas B, μ l	Mistura de amplificação Reagente C, μ l	Número Total de Amostras e Controles	Reagente de sondas B, μ l	Mistura de amplificação Reagente C, μ l	Número Total de Amostras e Controles	Reagente de sondas B, μ l	Mistura de amplificação Reagente C, μ l
1	5	40	33	178	1.400	65	351	2.800
2	11	86	34	184	1.500	66	356	2.900
3	16	130	35	189	1.500	67	362	2.900
4	22	173	36	194	1.600	68	367	2.900
5	27	216	37	200	1.600	69	373	3.000
6	32	259	38	205	1.600	70	378	3.000
7	38	302	39	211	1.700	71	383	3.100
8	43	346	40	216	1.700	72	389	3.100
9	49	389	41	221	1.800	73	394	3.200
10	54	432	42	227	1.800	74	400	3.200
11	59	475	43	232	1.900	75	405	3.200
12	65	518	44	238	1.900	76	410	3.300
13	70	562	45	243	1.900	77	416	3.300
14	76	605	46	248	2.000	78	421	3.400
15	81	648	47	254	2.000	79	427	3.400
16	86	691	48	259	2.100	80	432	3.500
17	92	734	49	265	2.100	81	437	3.500
18	97	778	50	270	2.200	82	443	3.500
19	103	821	51	275	2.200	83	448	3.600
20	108	864	52	281	2.200	84	454	3.600
21	113	907	53	286	2.300	85	459	3.700
22	119	950	54	292	2.300	86	464	3.700
23	124	994	55	297	2.400	87	470	3.800
24	130	1.000	56	302	2.400	88	475	3.800
25	135	1.100	57	308	2.500	89	481	3.800
26	140	1.100	58	313	2.500	90	486	3.900
27	146	1.200	59	319	2.500	91	491	3.900
28	151	1.200	60	324	2.600	92	497	4.000
29	157	1.300	61	329	2.600	93	502	4.000
30	162	1.300	62	335	2.700	94	508	4.100
31	167	1.300	63	340	2.700	95	513	4.100
32	173	1.400	64	346	2.800	96	518	4.100

Visite bio-rad.com/iqcheck para mais informações.

BIO-RAD é uma marca comercial da Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK é uma marca comercial da Bio-Rad Europe GmbH em certas jurisdições.

Todas as marcas comerciais usadas neste documento são de propriedade de seus respectivos proprietários.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

iQ-Check *Listeria* *monocytogenes* II Kit

Manual de usuario

**Análisis para la detección por PCR en tiempo real de
L. monocytogenes en muestras de alimentos y ambientales**

Catálogo #3578124



Tabla de Contenidos

Apartado 1	Introducción	1
Apartado 2	Tecnología de iQ-Check <i>L. monocytogenes</i> II	1
Apartado 3	Componentes del kit	2
Apartado 4	Vida útil y conservación	2
Apartado 5	Materiales necesarios, no suministrados	2
	Equipos	2
	Consumibles	3
Apartado 6	Seguridad, precauciones y recomendaciones para la obtención de resultados óptimos	4
Apartado 7	Protocolo	5
	Enriquecimiento de la muestra	5
	Tratamiento de eliminación de ADN libre	7
	Extracción de ADN	7
	PCR en tiempo real	8
	Análisis de los datos	9
Apartado 8	Confirmación de resultados positivos	10
Apartado 9	Confirmación de colonias aisladas mediante el kit iQ-Check	11
Apartado 10	Aplicación del análisis y validaciones	11
Apartado 11	Referencias	12
Apartado 12	Historial de revisiones	13
	Apéndice — Tabla de cálculo de la mix de PCR	14

Apartado 1

Introducción

Los métodos bacteriológicos convencionales suelen ser largos y tediosos. En comparación, iQ-Check *Listeria monocytogenes* II es un ensayo cualitativo simple y rápido, que permite la detección de secuencias específicas de ADN exclusivas de *L. monocytogenes* que se encuentran en muestras ambientales y productos alimenticios. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, las secuencias de ADN específicas de *L. monocytogenes* se amplifican y se detectan simultáneamente por medio de sondas fluorescentes. Se pueden procesar hasta 94 muestras, con un riesgo mínimo de contaminación y un procedimiento fácil de usar. Los usuarios previstos de este kit de detección son personal de laboratorio capacitado que está realizando ensayos para detectar la bacteria *L. monocytogenes*. El uso de este ensayo permite obtener resultados pocas horas después del enriquecimiento.

Apartado 2

Tecnología de iQ-Check *L. monocytogenes* II

iQ-Check *L. monocytogenes* II Kit es un ensayo basado en la amplificación y detección de genes mediante PCR en tiempo real. Los reactivos de PCR listos para su uso incluidos en el kit contienen oligonucleótidos (cebadores y sondas) específicos para *L. monocytogenes*, así como ADN polimerasa y nucleótidos. La detección y el análisis de datos están optimizados para su uso con un instrumento de PCR en tiempo real de Bio-Rad, como el sistema de detección en tiempo real CFX96 Touch Deep Well System.

La PCR es una técnica potente que se utiliza para generar múltiples copias del ADN diana. Durante la reacción de PCR, varios ciclos de calentamiento y enfriamiento permiten la desnaturalización del ADN por calor, seguida de la hibridación de los cebadores en la región objetivo. La ADN polimerasa utiliza estos cebadores y desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) para extender el ADN, creando copias del ADN diana. Estas copias se llaman amplicones.

En la PCR en tiempo real, se utilizan sondas específicas para detectar el ADN durante la fase de amplificación, mediante la hibridación de los amplicones. Estas sondas están unidas a un fluoróforo que sólo se vuelve fluorescente cuando se hibrida con la secuencia diana. FAM es el fluoróforo unido a la sonda que hibrida con la secuencia de ADN específica de *L. monocytogenes*. En ausencia de ADN diana, no se detectará ninguna fluorescencia. A medida que la cantidad de amplicones aumenta con cada ciclo de amplificación, la intensidad de la fluorescencia también aumenta. El módulo óptico mide esta fluorescencia en la fase de lectura durante cada ciclo de PCR mientras que el software correspondiente traza la intensidad de la fluorescencia en función del número de ciclos.

En la mix de reacción se incluye un control interno de ADN sintético para validar cualquier posible resultado negativo. Este control se amplifica con una sonda específica al mismo tiempo que la secuencia de ADN diana de *L. monocytogenes* y se detecta por un tercer fluoróforo.

Este ensayo permite la detección cualitativa de *L. monocytogenes* en muestras de alimentos y ambientales seleccionadas, previamente enriquecidas por cultivo. Consta de los siguientes cinco pasos principales:



* Por favor, consulte el manual del usuario del producto iQ-Check Free DNA Removal Solution (#10000058391), para conocer las condiciones de uso.

Apartado 3

Componentes del kit

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit contiene suficientes reactivos para 96 ensayos (94 muestras).

ID de reactivo	Reactivo	Cantidad proporcionada, ml
A	Reactivo de lisis	1 frasco, 20
B	Sondas de fluorescencia	1 tubo, 0,55
C	Mix de amplificación	1 tubo, 4,4
D	Control negativo PCR	1 tubo, 0,5
E	Control positivo PCR	1 tubo, 0,25
F	Perlas de lisis	1 frasco, 17,6 g

Apartado 4

Vida útil y conservación

Una vez recibido, el kit debe ser almacenado a 2-8 °C. Los reactivos almacenados a esta temperatura pueden usarse hasta la fecha de caducidad indicada en los tubos. La vida útil del reactivo de lisis es de 6 meses una vez que se mezcla con las perlas de lisis.

Apartado 5

Materiales necesarios, no suministrados

Equipos

- Mezcladora de paletas de laboratorio para homogeneizar las muestras de ensayo
- Incubadora para el enriquecimiento microbiológico de muestras
- Materiales específicos para la extracción en tubos estériles de tapón de rosca cónico de 1,5 ml:
 - Centrifuga de sobremesa (capacidad de 10.000-12.000 x g)
 - Calentador de bloque seco a 37 ± 2 °C y/o 95-100 °C
- Disruptor celular, como el Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)
- Materiales específicos para la extracción en la placa Deep Well:
 - Calefactor térmico con agitación* con capacidad para mantener 37 ± 2 °C y/o 95-100 °C, con una velocidad de agitación de al menos 1.300 rpm
- Agitador vórtex
- Placa agitadora magnética
- Micropipetas de 20, 200 y 1.000 µl
- Sistema de PCR en tiempo real de Bio-Rad*, por ejemplo, los sistemas de PCR en tiempo real CFX96 Touch Deep Well System (referencia #3600037) o CFX Opus Deepwell System (referencia #17007991)
- iQ-Check Prep System de Bio-Rad para el procedimiento de extracción automático de ADN y configuración de la placa PCR (referencia #3594911)

Nota: Recomendamos usar una fuente de alimentación ininterrumpida (SAI) con el termociclador y el iQ-Check Prep System.

* Contacte con el Servicio Técnico de Bio-Rad para obtener información sobre los instrumentos recomendados.

Consumibles

- Caldo de enriquecimiento: Listeria Special Broth (LSB) (referencia #3555703, 225 ml x 6 frascos; 3564703, deshidratado, 500 g; 3555793, 5 L x 2 bolsas; 3564753, deshidratado, 5 kg) o caldo Half Fraser Broth (referencia #3564604, deshidratado, 500 g; 3555797, 225 ml x 6 frascos; 3555794, 3 L x 4 bolsas)
- Caldo de enriquecimiento: Listeria Special Broth II (LSB II) (referencia #12017463, 225 ml x 6 frascos; 12017388, deshidratado, 500 g; 12017378, deshidratado, 5 kg)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (referencia #3594970)
- Materiales específicos para muestras ambientales:
 - Esponjas ambientales
 - Hisopos ambientales
 - Caldo neutralizante para esponjas e hisopos, como el caldo neutralizante Dey-Engley (D/E) o HiCap Neutralizing Broth o Lethen Broth
- Materiales específicos para la extracción en tubos
 - Tubos cónicos estériles de 1,5 ml y tapa de rosca (por ejemplo, referencia #2240110XTU)
- Materiales específicos para la extracción en placa Deep Well:
 - Placa Deep Well de 96 pocillos (referencia #3594900)
 - Película de sellado de plástico (referencia #3590139)
 - X-Pierce Sealing Films (referencia #3593977) o Pre-Pierced Plate Sealing Film (referencia #3600040, sólo en América del Norte)
- Materiales específicos para protocolos de extracción Standard II y Easy II:
 - iQ-Check Lysis Beads (reactivo F) (referencia #3578136)
 - Puntas de pipeta de 200 µl con apertura ancha
- Materiales específicos para el iQ-Check Prep System:
 - Recipiente de 60 ml para dilución (referencia #3594904)
 - Puntas con filtro (referencia #3594902 o 12014486: 50 µl; 3594903 o 12014483: 1.000 µl)
- Tubos de mix de PCR (referencia #12016673, 5 ml x 25)
- RAPID'*Listeria* spp. Agar* (referencia #3564744, deshidratado, 500 g; 3564745, suplemento 1; 3564746, suplemento 2)
- RAPID'*L.mono* Agar* (referencia #3563694, 90 mm x 20 placas; 3555294, kit para 190 ml agar plus 2 Suplementos; 3564293, deshidratado, 500 g; 3564294, suplemento 1; 3564746, suplemento 2)
- Placas PCR, tubos, film adhesivo y tapas
- Puntas estériles con filtro adaptables a micropipetas de 20, 200 y 1.000 µl
- Puntas de pipetas Combitip o pipetadores de repetición equivalente; estériles, empaquetadas individualmente
- Pipetas de 1 y 10 ml
- Tubos de ensayo estériles de 2 y 5 ml
- Guantes sin talco
- Agua destilada estéril
- Lejía, 5 %
- Agente descontaminante, como DNA AWAY o RNase AWAY

* Puede utilizarse fuera de la validación de AOAC-PTM.

Apartado 6

Seguridad, precauciones y recomendaciones para la obtención de resultados óptimos

- Este análisis debe ser realizado por personal capacitado
- Las mujeres embarazadas, los niños, los ancianos y los individuos inmunocomprometidos no deben realizar este método ni manipular *L. monocytogenes* debido a la alta tasa de infección y mortalidad asociada con estos grupos
- Las muestras y los cultivos enriquecidos deben manipularse como material potencialmente infeccioso y desecharse de acuerdo con las normas y reglamentos locales
- Todo el material potencialmente infeccioso debe ser esterilizado en autoclave antes de su eliminación
- La calidad de los resultados depende del estricto cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio (por ejemplo, la norma EN ISO 7218), especialmente en lo que respecta a la PCR:
 - Nunca haga circular el material de laboratorio (pipetas, tubos, etc.) de una estación de trabajo a otra
 - Utilice siempre un control positivo y un control negativo para cada serie de reacciones de amplificación
 - No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad
 - Agite (mediante vórtex) los reactivos del kit antes de usarlos para asegurar su homogeneidad
 - Verificar periódicamente la exactitud y la precisión de las pipetas, así como el correcto funcionamiento de los instrumentos
 - Cámbiese los guantes a menudo, especialmente si sospecha que están contaminados
 - Limpie los espacios de trabajo periódicamente con un 5 % de lejía y otros agentes descontaminantes, como DNA AWAY
 - Use guantes sin talco y evite las huellas dactilares y escribir en los tapones de los tubos. Ello podría interferir en la correcta adquisición de datos
- Se recomienda encarecidamente seguir los requisitos generales descritos en la norma EN ISO 22174:2005 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions)
- iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit:
 - Todas las sustancias o mezclas del equipo de ensayo son productos clasificados, según el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS en inglés por el acrónimo de Globally Harmonized System). El contacto con ácidos puede causar la liberación de gases tóxicos. No es necesario tomar precauciones especiales si se utiliza correctamente. Si se inhala el producto, suministre aire fresco y consulte a un médico en caso de presentar molestias. En caso de contacto del producto con los ojos, enjuague el ojo abierto durante varios minutos con agua corriente. En caso de ingestión de los productos, induzca el vómito y solicite ayuda médica.
- iQ-Check Prep System:
 - El uso inadecuado del sistema de preparación iQ-Check Prep System puede causar lesiones personales o daños en el instrumento. Algunos componentes pueden suponer un riesgo de lesiones personales debido al calor excesivo si se manejan de forma inadecuada. Para un uso seguro, el iQ-Check Prep System debe ser manipulado y utilizado sólo por personal de laboratorio calificado que haya sido instruido para tal fin. El mantenimiento del instrumento debe ser realizado sólo por los ingenieros del servicio de campo de Bio-Rad.

- Sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch Deep Well System o CFX Opus Deepwell System:
 - El uso inadecuado del sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch Deep Well System o CFX Opus Deepwell System puede causar lesiones personales o daños en el instrumento. Algunos componentes pueden suponer un riesgo de lesiones personales debido al calor excesivo si se manejan de forma inadecuada. Para un uso seguro, el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch Deep Well System y CFX Opus Deepwell System deben ser manipulados y utilizados sólo por personal de laboratorio cualificado y que haya sido instruido para tal fin. El mantenimiento del instrumento debe ser realizado sólo por los ingenieros del servicio de técnico de Bio-Rad.
- Enriquecimiento:
 - El usuario debe leer, comprender y seguir toda la información de seguridad en las instrucciones del iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit. Conserve las instrucciones de seguridad para futuras consultas. Para reducir los riesgos asociados a la exposición a productos químicos y a riesgos biológicos, los análisis de patógenos deben ser realizados en un laboratorio debidamente equipado y bajo el control de personal capacitado. Siga siempre las prácticas normalizadas de seguridad de los laboratorios, incluido el uso de vestimenta protectora adecuada y protección ocular al manipular reactivos y muestras contaminadas. Evite el contacto con el contenido de los medios de enriquecimiento y los tubos de reactivos después de la amplificación. Deseche las muestras enriquecidas de acuerdo con las normas vigentes aplicables a la industria.
 - La *Listeria* es un organismo de bioseguridad de nivel 2. Las muestras biológicas como los enriquecimientos tienen un potencial de transmitir enfermedades infecciosas. Siga todos los reglamentos locales, estatales/provinciales y/o nacionales aplicables para la eliminación de desechos biológicos. Use el equipo de protección apropiado, que incluya, pero no se limite a, gafas protectoras, protector facial, ropa/bata de laboratorio y guantes. Todos los trabajos deben realizarse en instalaciones debidamente equipadas, utilizando el equipo de seguridad adecuado (por ejemplo, dispositivos de contención física). Las personas deben ser instruidas y estar capacitadas de acuerdo con los requisitos reglamentarios y de la empresa/institución aplicables antes de trabajar con materiales potencialmente infecciosos.
 - Una vez finalizados los análisis, todos los materiales y medios que puedan contener patógenos deberán descontaminarse siguiendo las normas actuales de la industria para la eliminación de desechos contaminados (es decir, en autoclave durante 20 min a 121 °C). Consulte la Ficha de Datos de Seguridad para obtener información adicional y los reglamentos locales para la eliminación.

Apartado 7 Protocolo

A. Enriquecimiento de la muestra

Altamente recomendable leer completa y detenidamente el protocolo antes de iniciar el ensayo.

El medio de enriquecimiento debe encontrarse a la temperatura de incubación apropiada (ambiente o 30 °C/ 37 °C cuando sea necesario) antes de su uso.

Se recomienda encarecidamente el uso de una bolsa de enriquecimiento con filtro incorporado.

En el ámbito de la VALIDACIÓN NF, las porciones que pesan más de 25 g no han sido probadas. Incube, sin agitar, durante los tiempos y a las temperaturas indicados en la tabla siguiente. También es posible llevar a cabo el ensayo iQ-Check a partir de LSB que haya sido enriquecido y luego almacenado a 2-8 °C durante 72 hr.

En el cuadro que figura a continuación se esbozan los diferentes protocolos que pueden utilizarse, según la aplicación y el alcance de la validación:

VALIDACIÓN NF BRD 7/10-04/05 y NordVal 037		
Alcance (matrices)	Preparación de las muestras	Enriquecimiento/Extracción de ADN
Todos los productos alimentarios y las muestras ambientales ¹	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de Half Fraser Broth o LSB	Extracción Standard II (Half Fraser) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 24-26 hr a 30 ± 1 °C. ▪ Formato de tubo Extracción Standard II (LSB) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 22-24 hr a 30 ± 1 °C ▪ Formato de tubo Extracción Easy II (LSB) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 24-26 hr a 30 ± 1 °C ▪ Formato de tubo
Entorno y superficies de producción ²	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de LSB precalentado o LSB II a temperatura ambiente	Extracción Easy II (LSB) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 18-26 hr a 30 ± 1 °C ▪ Formato de tubo/Deep Well Extracción Easy II (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 18-26 hr a 37 ± 1 °C ▪ Formato de tubo/Deep Well
Alimentos compuestos ²	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de LSB II	Extracción Easy II (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 18-26 hr a 37 ± 1 °C ▪ Formato de Deep Well
Productos lácteos ²	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de LSB II precalentado	Extracción Easy II (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 20-28 hr a 37 ± 1 °C ▪ Formato de Deep Well
AOAC PTM 010802		
Alcance (matrices)^{2,3}	Preparación de las muestras	Enriquecimiento/Extracción de ADN
Pavo de la charcutería, perritos calientes, salmón ahumado y requesón	Homogeneizar <i>n</i> g de alimento en 9 x <i>n</i> ml de LSB o LSB II (25 g en 225 ml; 125 g en 1.125 ml)	Extracción Easy II (LSB) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 24-26 hr a 30 ± 1 °C formato de tubo/Deep Well Extracción Easy II (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 18-24 hr a 37 ± 1 °C ▪ Formato de tubo/Deep Well
Superficies de acero inoxidable	Muestras ambientales <ul style="list-style-type: none"> ▪ Humedecer los hisopos y las esponjas con un caldo neutralizante que no contenga complejo de sulfonato de arilo. ▪ Para las superficies que se analizan con hisopos, tome una muestra de una superficie de 1 x 1" (2,54 x 2,54 cm). ▪ Para las superficies que se analizan con esponjas, tome una muestra de una superficie de 4 x 4" (10,16 x 10,16 cm). ▪ Añadir una cantidad suficiente de LSB II para cubrir el hisopo (10 ml) o la esponja (60-225 ml) 	Extracción Easy II <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar durante 16-24 hr a 37 ± 1 °C ▪ Formato de tubo/Deep Well

Consulte MFLP-54 para conocer las matrices y protocolos aprobados por el Ministerio de Sanidad de Canadá

¹ La validación también incluye el uso del archivo de aplicación del protocolo "Lmono Fast" para un tiempo de run de PCR reducido. Póngase en contacto con su representante de Bio-Rad para más información.

² La validación también incluye el uso de iQ-Check Free DNA Removal Solution y el archivo de aplicación del protocolo "Lmono Fast" para un tiempo de run de PCR reducido. Póngase en contacto con su representante de Bio-Rad para más información.

³ La validación incluye la siembra directa a RAPID'L. *Mono*, *RAPID'Listeria spp.*, o *placas de agar Listeria (excluido el queso natural)*

B. Tratamiento de eliminación de ADN libre

iQ-Check Free DNA Removal Solution es la mejor forma de eliminar el ADN libre.

Siga las recomendaciones de Bio-Rad descritas en el manual del usuario (documento #10000058391). Este protocolo está validado por la certificación AFNOR en la categoría de muestras ambientales de producción.

C. Extracción de ADN

Recomendaciones generales:

1. Precaliente el bloque calefactor o mezclador térmico antes de iniciar el ensayo. Póngalo a 95-100 °C. Mantenga el reactivo de lisis en suspensión mientras pipetea agitando a velocidad media en una placa agitadora magnética.
2. En general, evite agitar la bolsa de enriquecimiento y recoger grandes fragmentos de restos de muestra. Para muestras de alimentos con un sobrenadante graso, recoja la muestra justo debajo de esta capa.
3. Abra los tubos y pocillos con cuidado para evitar cualquier posible contaminación cruzada.
4. Enfríe la placa Deep Well antes de pipetear directamente a través de la película para sellado perforada.
5. Utilice la barra magnética para mantener el reactivo de lisis en suspensión. Pipetee mientras agita a velocidad media.
6. En primer lugar, agite el reactivo de lisis manualmente para resuspender la resina. Seguidamente, pipetee mientras se agita a media velocidad con la barra magnética contenida en la botella, para mantener el reactivo en suspensión.
7. Reconstituya el reactivo de lisis final de las siguientes maneras:
 - a. Vierta cuidadosamente todo el contenido del reactivo F (perlas de lisis) en el reactivo A (reactivo de lisis).
 - b. Utilice consumibles con una punta suficientemente ancha para permitir el pipeteo del reactivo de lisis homogeneizado.
 - c. Los reactivos de lisis mezclados con perlas de lisis (reactivos A + F) tienen una vida útil de 6 meses si se almacenan a una temperatura de 4 °C.

Protocolo Standard II

1. Recoja 1,5 ml de muestra enriquecida decantada en un tubo.
2. Centrifugue el tubo a 10.000-12.000 x g durante 5 min. Descarte el sobrenadante.
3. Añada 250 µl de reactivo de lisis homogeneizado (reactivos A + F) al decantado o pellet y resuspéndalo pipeteando el reactivo hacia arriba y hacia abajo. Cierre el tubo.

Nota: en primer lugar, agite el reactivo de lisis manualmente para resuspender las perlas.

4. Coloque el tubo en el disruptor celular durante 3 ± 1 min.
5. Incube en el bloque calefactor apropiado a 95-100 °C durante 10-15 min.
6. Agite (agitador vórtex) el tubo a alta velocidad y centrifugue a 10.000-12.000 x g durante 5 min.

Este es el punto de parada recomendado para detener temporalmente el procedimiento.

El sobrenadante puede ser almacenado hasta 1 año a -20 °C. Antes de volver a utilizarlo, déjelo descongelar, homogenícelo y a continuación centrifúguelo a 10.000-12.000 x g durante 5 min.

Protocolo Easy II

1. Introduzca una alícuota de 100 µl de reactivo de lisis homogeneizado (reactivos A + F) en los tubos o pocillos de una placa Deep Well.

Nota: en primer lugar, agite el reactivo de lisis manualmente para resuspender las perlas.

2. Añada 100 µl de muestra enriquecida.

Nota: agite la suspensión para homogeneizar el cultivo y seguidamente deje que los restos se asienten antes de recoger la muestra.

3. Homogeneice la solución pipeteando hacia arriba y hacia abajo hasta que se homogeneice.
4. Cierre los tubos o selle la placa Deep Well mediante la película pre-perforada de sellado.
5. Coloque el tubo en el disruptor celular durante 3 ± 1 min. Incubar los tubos en el bloque térmico a 95–100°C durante 15–20 min.
6. Si se emplea un termoagitador para tubos o placa de pocillo profundo (placa deep well), incubar los tubos o la placa a 95-100°C programando una agitación de 1,300 a 1,600 rpm durante 15–20 min.
7. Agite (agitador vórtex) el tubo a alta velocidad y centrifugue a 10.000-12.000 x g durante 2 min.

La centrifugación no es necesaria para la placa Deep Well.

Este es el punto de parada recomendado para detener temporalmente el procedimiento.

El sobrenadante puede ser almacenado hasta 1 año a –20 °C. Antes de volver a utilizarlo, déjelo descongelar, homogenícelo y a continuación centrifúguelo a 10.000-12.000 x g durante 5 min.

D. PCR en tiempo real

Configuración del software e instrumento

Para la configuración del instrumento y del software, siga las instrucciones del manual del usuario del sistema de PCR en tiempo real para los kits iQ-Check.

Preparación de la mix de PCR

1. Prepare la mix de PCR que contiene la solución de amplificación (reactivo C) y las sondas fluorescentes (reactivo B). El volumen de mix de PCR necesario depende del número de muestras y controles a analizar. Se debe incluir al menos un control positivo y uno negativo en cada ejecución de PCR. Utilice la tabla de pipeteo del Apéndice – Guía de cálculo de la mix de PCR para encontrar los volúmenes correctos a utilizar para cada reactivo.

Nota: Utilice la mix de PCR (reactivos B + C) inmediatamente después de su preparación. La mix permanecerá estable durante 1 hr como máximo a 2-8 °C.

2. Pipetee 45 µl de mix de PCR en cada pocillo según la configuración de su placa.
3. Añada 5 µl de extracto de ADN, reactivo D (control negativo) o reactivo E (control positivo). No agite con vórtex la muestra antes del pipeteo. Selle herméticamente los pocillos de la placa de PCR o las tiras de tubos. Es importante evitar las burbujas en el fondo de los pocillos pipeteando con cuidado. Como paso opcional, centrifugue la placa sellada de PCR o las tiras de tubos (quick spin) para eliminar cualquier burbuja.
4. Coloque la placa de PCR o las tiras de tubos en el termociclador. Asegúrese de colocar la placa correctamente, con el pocillo A1 en la esquina superior izquierda. Cierre el módulo de reacción.

Ejecución de la PCR

Para iniciar la ejecución de la PCR, siga las instrucciones del manual del usuario del sistema de PCR en tiempo real del kit iQ-Check.

El archivo de protocolo de aplicación “Lmono Fast” ha sido validado por NF y AOAC.

E. Análisis de los datos

Los datos pueden ser analizados directamente al final de la ejecución de PCR o en un momento posterior abriendo el archivo de datos almacenados. Siga las instrucciones del correspondiente manual de usuario del software CFX Manager IDE para abrir los archivos de datos y configurar los parámetros de análisis de datos.

Interpretación de los resultados

Una vez establecidos los parámetros de análisis de los datos, los resultados se interpretan analizando los valores del ciclo de cuantificación (Cq) de cada muestra (el ciclo en el que la curva de amplificación cruza el umbral).

El software CFX Manager IDE permite un análisis completamente automatizado para los sistemas de detección de PCR en tiempo real de Bio-Rad. Antes de publicar los resultados, debe realizarse una verificación de las características típicas de las curvas de amplificación. Póngase en contacto con el equipo de asistencia técnica de Bio-Rad si necesita ayuda adicional.

Controles

Verifique los controles positivos y negativos antes de interpretar los resultados de las muestras.

Para poder validar el experimento, los controles deben tener los resultados que se resumen en el siguiente cuadro. De lo contrario, deberá repetirse la reacción.

Control	Detección de <i>L. monocytogenes</i> (Canal FAM)	Detección de control interno (Canal HEX)
Control negativo	Cq = N/A*	$28 \leq Cq \leq 40$
Control positivo	$26 \leq Cq \leq 36$	N/A

* El programa informático indica un valor Cq (el ciclo en el que la curva de amplificación cruza el umbral) de N/A (no aplicable) cuando la fluorescencia de una muestra no se eleva significativamente por encima del ruido de fondo, y por lo tanto no cruza el umbral.

Si los resultados de los controles negativos y positivos difieren de los de la tabla de controles (control inválido), repita la ejecución y el análisis descritos en D. PCR en tiempo real y E. Análisis de datos en el apartado 7 Protocolo

Muestras

Un resultado **positivo** de PCR iQ-Check *Listeria monocytogenes* debe mostrar una curva de amplificación típica y un valor Cq ≥ 10 para el fluoróforo FAM.

- Si el valor Cq de ambos canales está por debajo de 10, verifique que la curva presente una amplificación normal (con una línea de base plana, seguida de un rápido aumento exponencial de la fluorescencia, y luego un aplanamiento o fase meseta). Si la curva parece correcta, puede considerarse una muestra positiva para el ensayo de *Listeria monocytogenes*.

Si no hay un valor Cq (Cq = N/A) para FAM, o si la curva no es una curva de amplificación típica, debe analizarse el control interno de esa muestra:

- Si no hay un valor Cq para el canal FAM y el control interno tiene un valor Cq ≥ 28 , esta muestra se considera como una muestra **negativa** de *Listeria monocytogenes*.
- Si el control interno tampoco tiene un valor Cq (Cq = N/A), esto probablemente indica la inhibición de la reacción de PCR. Diluya la muestra (realice una dilución 1:10 en agua destilada estéril utilizando 10 μ l de extracto de ADN y a continuación analice 5 μ l de la dilución) y repita la PCR.
- Si el valor Cq del control interno es < 28 , no es posible interpretar el resultado. Verifique el posicionamiento correcto del umbral, y que la curva presente una amplificación típica. Si la curva no tiene una forma característica, será necesario repetir el ensayo de PCR.

La interpretación de los resultados de las muestras se resume en el siguiente tabla.

Detección de <i>L. monocytogenes</i> (Canal FAM)	Detección de control interno (Canal HEX)	Interpretación
Cq ≥ 10	N/A	Positivo
Cq = N/A	Cq ≥ 28	Negativo
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibición*

* Si tanto la detección de la diana como del control interno dan un valor Cq = N/A, el extracto de ADN debe diluirse 1:10 y analizarse de nuevo.

Se puede dar una interpretación inválida cuando no se cumplen los criterios de validación. Compruebe los datos en bruto y proceda como si la muestra se hubiera inhibido.

Apartado 8

Confirmación de resultados positivos

En el contexto del método certificado de validación NF, todos los resultados positivos del iQ-Check deben confirmarse de la siguiente manera:

1. Utilizando ensayos clásicos, descritos en los métodos estandarizados CEN o ISO, directamente del caldo Half Fraser Broth, o partiendo de la muestra cuando se utiliza LSB o LSB II.
2. Mediante aislamiento de LSB o LSB II enriquecido (por siembra de 100 µl) en RAPID'*Listeria* spp. o RAPID'*L. mono* chromogenic agar e incubación por 24 hr a 37 ± 1 °C. La presencia de colonias características en RAPID'*L. mono* es suficiente para confirmar la presencia de *L. monocytogenes*. Utilizando un ensayo de identificación para confirmar *L. monocytogenes* en RAPID'*Listeria* spp.
3. Mediante aislamiento de LSB o LSB II enriquecido (por siembra de 10 µl) en AL o agar PALCAM e incubación por 24-48 hr a 37 ± 1 °C. Las colonias típicas deben confirmarse mediante los ensayos descritos en el método ISO hasta que se identifique la especie.
4. Utilizando cualquier otro método certificado por la validación NF basado en un principio diferente al utilizado en el ensayo de PCR iQ-Check *L. monocytogenes* II. El protocolo validado de este segundo método debe ser seguido en su totalidad.

En caso de resultados discrepantes entre el iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit y cualquiera de las opciones de confirmación enumeradas anteriormente, siga los pasos necesarios para asegurar resultados válidos.

Antes de llevar a cabo la confirmación, es posible almacenar el LSB o LSB II enriquecido a 2-8 °C durante 72 hr como máximo, después de la incubación a 30 °C.

En el contexto de la validación AOAC, un resultado positivo de iQ-Check *L. monocytogenes*, es presuntivo de ser positivo y se recomienda su confirmación según un método de referencia apropiado (por ejemplo, USDA MLG, FDA BAM, ISO, MFHPB, etc.). Como alternativa, para matrices seleccionadas, vierta 10 µl de LSB o LSB II enriquecido directamente en RAPID'*L. mono*, RAPID'*Listeria* spp. o *Listeria* chromogenic agar e incube durante 24 hr a 37 ± 1 °C. La presencia de colonias características de *Listeria monocytogenes* debe confirmarse químicamente para detectar la presencia de *Listeria monocytogenes*.

Apartado 9

Confirmación de colonias aisladas mediante el kit iQ-Check

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit puede utilizarse también para confirmar colonias *L. monocytogenes* aisladas en las placas de agar. Esto está validado oficialmente bajo certificación AFNOR para el medio cromogénico RAPID'L. *mono* y RAPID'*Listeria* spp.

1. Recoja una colonia aislada en una placa de agar selectivo o no selectivo con un palillo, un lazo estéril u otro consumible adaptado (por ejemplo, una punta de pipeta).
2. Resuspenda la colonia en 100 µl de sal triptona o agua destilada estéril en un tubo de microcentrífuga. Homogenice con vórtex.
3. Analice 5 µl de la suspensión con 45 µl de mix de PCR (véase D. PCR en tiempo real en el apartado 7 Protocolo) y siga el resto del protocolo iQ-Check *L. monocytogenes* II para la interpretación de los datos y los resultados.

Apartado 10

Aplicación del análisis y validaciones

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit es específico para la detección de *L. monocytogenes*



BRD 07/10-04/05

MÉTODOS DE
ANÁLISIS
ALTERNATIVOS
PARA LA
AGROINDUSTRIA

<http://nf-validation.afnor.org>

NF Validation

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit cuenta con la certificación NF VALIDATION como un método alternativo al método de referencia ISO 11290-1:2017 (véase la referencia 4 en el apartado 11) para la detección de *L. monocytogenes* en todos los productos para el consumo humano y muestras ambientales. La validación siguió el protocolo de la norma ISO 16140-2:2016 (véase la referencia 5 en el apartado 11) e incluye el uso del sistema de PCR en tiempo real CFX96 Touch Deep Well System y CFX Opus Deepwell System. El uso de iQ-Check Free DNA Removal Solution está validado para alimentos compuestos, productos lácteos y muestras ambientales de producción. El software asociado es el CFX Manager IDE (versión 2. 2 y posterior). El archivo de aplicación del protocolo "Lmono Fast" ha sido validado. Número de certificado: BRD 07/10-04/05. Válido hasta: consulte el certificado disponible en el sitio web de AFNOR Certification.



Validación AOAC

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit (protocolo Easy II) está validado por el Instituto de Investigación de la AOAC en el marco del programa de la AOAC "Performance Tested Methods" para la detección de *L. monocytogenes* en fiambre de pavo, perritos calientes, salmón ahumado, requesón y superficies de acero inoxidable. Un resultado positivo con iQ-Check debe considerarse como no definitivo y se recomienda que se confirme siguiendo las recomendaciones del apartado 8. LSB, LSB II, el "Lmono Fast" APF, el uso de la solución iQ-Check Free DNA Removal Solution, y el uso de los sistemas de PCR en tiempo real CFX96 Touch Deep Well System y CFX Opus Deepwell System están validados en todas las muestras. El software asociado es el CFX Manager IDE (versión 2.2 y posterior). Número de certificado: 010802.



Validación Health Canada

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit (protocolo Easy II) ha sido validado por el departamento Health Canada del Ministerio de Salud de Canadá (MFLP-54) para la detección de *L. monocytogenes* en carne y aves de corral listos para su consumo (RTE), productos a base de frutas y verduras (excluidas las verduras crudas procesadas), pescado y productos del mar (excluido el pescado ahumado), y productos lácteos congelados y fermentados para tamaños de muestra de 25 g y 125 g. Un resultado positivo con iQ-Check debe considerarse como no definitivo y se recomienda que se confirme mediante el método MFHPB-30 (véase la referencia 2 en el apartado 11).



Validación NordVal

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit está validado por el certificado NordVal para:

- El enriquecimiento en caldo Half-Fraser Broth seguido por el protocolo de lisis Standard II
- El enriquecimiento en caldo *Listeria* Special Broth seguido por el protocolo de lisis Standard II
- El enriquecimiento en caldo *Listeria* Special Broth seguido por el protocolo de lisis Easy II, que ya no requiere el primer paso de centrifugación

Número de certificado: 037. Consulte el certificado disponible en la página web de NordVal para conocer su caducidad.

Apartado 11 Referencias

AOAC Official Method 993 .12-1996(1999). *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. Selective enrichment and isolation method.

Health Canada (2011). Health Products and Food Branch. MFHPB-30. Isolation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. from foods and environmental samples. The Compendium of Analytical Methods, Volume 2, February 2011.

ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 11290-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. — Part 1: Detection Method.

ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

ISO 22174. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2021). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 8 .13: Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, ready-to-eat siluriformes (fish) and egg products, and environmental samples.

https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-09/MLG-8.13.pdf, accessed February 14, 2020.

United States Food and Drug Administration (2017). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>, accessed February 14, 2020.

Apartado 12

Historial de revisiones

Fecha de lanzamiento	Número de documento	Modificación
Octubre de 2023	10000167776 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Cambio de número de documento - versión anterior 10000123536 Ver C iQ-Check <i>Listeria monocytogenes</i> II manual de usuario- Extensión AFNOR: LSB II para alimentos compuestos, muestras de ambientes de producción y productos lácteos

Apéndice — Tabla de cálculo de la mix de PCR

Para encontrar los volúmenes correctos para preparar la mix de PCR, sume el número total de muestras y controles a analizar y encuentre los volúmenes correspondientes del reactivo B y del reactivo C en la tabla.

Número total de muestras y controles	Sondas reactivo B, µl	Mix de amplificación Reactivo C, µl	Número total de muestras y controles	Sondas reactivo B, µl	Mix de amplificación Reactivo C, µl	Número total de muestras y controles	Sondas reactivo B, µl	Mix de amplificación Reactivo C, µl
1	5	40	33	178	1.400	65	351	2.800
2	11	86	34	184	1.500	66	356	2.900
3	16	130	35	189	1.500	67	362	2.900
4	22	173	36	194	1.600	68	367	2.900
5	27	216	37	200	1.600	69	373	3.000
6	32	259	38	205	1.600	70	378	3.000
7	38	302	39	211	1.700	71	383	3.100
8	43	346	40	216	1.700	72	389	3.100
9	49	389	41	221	1.800	73	394	3.200
10	54	432	42	227	1.800	74	400	3.200
11	59	475	43	232	1.900	75	405	3.200
12	65	518	44	238	1.900	76	410	3.300
13	70	562	45	243	1.900	77	416	3.300
14	76	605	46	248	2.000	78	421	3.400
15	81	648	47	254	2.000	79	427	3.400
16	86	691	48	259	2.100	80	432	3.500
17	92	734	49	265	2.100	81	437	3.500
18	97	778	50	270	2.200	82	443	3.500
19	103	821	51	275	2.200	83	448	3.600
20	108	864	52	281	2.200	84	454	3.600
21	113	907	53	286	2.300	85	459	3.700
22	119	950	54	292	2.300	86	464	3.700
23	124	994	55	297	2.400	87	470	3.800
24	130	1.000	56	302	2.400	88	475	3.800
25	135	1.100	57	308	2.500	89	481	3.800
26	140	1.100	58	313	2.500	90	486	3.900
27	146	1.200	59	319	2.500	91	491	3.900
28	151	1.200	60	324	2.600	92	497	4.000
29	157	1.300	61	329	2.600	93	502	4.000
30	162	1.300	62	335	2.700	94	508	4.100
31	167	1.300	63	340	2.700	95	513	4.100
32	173	1.400	64	346	2.800	96	518	4.100

Visite bio-rad.com/iqcheck para más información.

BIO-RAD es una marca registrada de Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK es una marca registrada de Bio-Rad Europe GmbH en diversos países.

Todas las marcas comerciales aquí indicadas son propiedad de sus respectivos propietarios.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

*Life Science
Group*

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit

用户指南

可用于食物和环境样本中 *单核细胞增生李斯特菌* 的实时荧光定量
PCR 检测

目录号 3578124

BIO-RAD

目录

第 1 部分	简介	1
第 2 部分	iQ-Check <i>L. monocytogenes</i> II 技术	1
第 3 部分	成分列表	2
第 4 部分	保质期及储存条件	2
第 5 部分	其他仪器、试剂与耗材	2
	仪器	2
	试剂和耗材	3
第 6 部分	最佳实验结果的安全预防措施及建议	4
第 7 部分	操作方案	6
	样本增菌	6
	去除游离 DNA 处理	7
	DNA 提取	7
	实时荧光定量 PCR	8
	数据分析	9
第 8 部分	阳性结果的确认	10
第 9 部分	使用 iQ-Check Kit 确认单菌落	11
第 10 部分	测试性能和验证	11
第 11 部分	参考资料	12
第 12 部分	修订记录	13
	附录 — PCR 混合物计算指南	14

第 1 部分

简介

传统的细菌学方法往往耗时较长且复杂繁琐。相比之下，iQ-Check *Listeria monocytogenes* II 是一种简单且快速的定性检测方法，可以检测在环境样本和食物产品中发现的单核细胞增生李斯特菌特有的特异性 DNA 序列。利用实时聚合酶链反应 (PCR)，利用荧光探针可以同时扩增和检测单核细胞增生李斯特菌的特异性 DNA 序列。可以处理多达 94 个样本，污染风险极低，流程简单方便。该试剂盒的预期用户是经过专门培训的负责检测单核细胞增生李斯特菌的实验室人员。采用这种检测方法在增菌后数小时内即可获得结果。

第 2 部分

iQ-Check L. monocytogenes II 技术

iQ-Check *L. monocytogenes* II Kit 是一种基于基因扩增和实时 PCR 检测的检测方法。该试剂盒为即用型 PCR 试剂，包含针对单核细胞增生李斯特菌的寡核苷酸（引物和探针），以及 DNA 聚合酶和核苷酸。我们将检测过程和数据进行了优化，可与 Bio-Rad 的实时荧光定量 PCR 仪器（如 CFX96 Touch Deep Well 实时 PCR 检测系统）配合使用。

PCR 是分子生物学中使用最广泛的技术，它能在短时间内大量扩增目标 DNA。在 PCR 反应过程中，经过多次加热和冷却，可使 DNA 受热变性，然后退火，引物与目标 DNA 互补区结合，DNA 聚合酶使用这些引物和三磷酸脱氧核苷酸 (dNTP) 来扩增 DNA，从而生成目标 DNA 的扩增产物，也称“扩增子”。

在实时 PCR 中，特异性探针用于在扩增过程中与扩增子杂交，从而检测目标 DNA。这些探针与荧光基团相连，仅在与目标序列杂交时才会发出荧光。探针可与单核细胞增生李斯特菌特异性 DNA 序列杂交，与该探针连接的荧光基团为 FAM。当不存在目标 DNA 时，无法检测到荧光。随着每轮扩增后扩增量的增加，荧光强度也随之增强。光模块可以在每个 PCR 周期的退火步骤中测量荧光基团，而相关的软件可以绘制荧光强度与周期数的关系图。

反应混合物中包含合成的 DNA 内部质控，可验证任何可能的阴性结果。当单核细胞增生李斯特菌的对照在与单增李斯特菌目标 DNA 序列同时使用特定探针扩增，并由第三种荧光基团检测。

该检测方法可对培养增菌后的选定食品和环境样本中的单核细胞增生李斯特菌进行定性检测。其中主要包括以下五个步骤：



*使用条件请参阅 iQ-Check Free DNA Removal Solution (#1000058391) 的用户指南。

第 3 部分

成分列表

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit 所含试剂可进行 96 次检测（共 94 个样本）。

试剂编号	试剂	数量, ml
A	裂解液	1 瓶, 20
B	荧光探针	1 管, 0.55
C	扩增混合液	1 管, 4.4
D	PCR 阴性对照	1 管, 0.5
E	PCR 阳性对照	1 管, 0.25
F	裂解珠	1 瓶, 17.6 g

第 4 部分

保质期及储存条件

请将该试剂盒置于 2-8° C 条件下储存。在该条件下储存的试剂在有效期内均可使用。裂解液与裂解珠混合后的保质期为 6 个月。

第 5 部分

其他仪器、试剂与耗材

仪器

- 实验室专用拍打式无菌均质器：用于检测样本的混匀处理
- 恒温箱：用于微生物增菌
- 专用于在无菌 1.5 ml 锥形螺帽管中提取：
 - 台式离心机（可调至 10000–12000 x g）
 - 干式恒温器（可调至 37 ± 2° C 和/或 95–100° C）
- 细胞破碎器，如 Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.)
- 提取专用 Deep Well 板：
 - 加热振荡混合仪（可维持 37 ± 2° C 和/或 95–100° C 恒温，混合速度至少为 1300 rpm）
- 涡旋振荡器
- 磁力搅拌板

- 微量移液枪 (20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)
- Bio-Rad 实时 PCR 系统, * 例如 CFX96 Touch Deep Well (目录号 3600037) 或 CFX Opus Deepwell (目录号 17007991) 实时 PCR 系统
- Bio-Rad iQ-Check Prep System : 用于全自动 DNA 提取和 PCR 板设置 (目录号 3594911)

注意：推荐使用不间断电源 (UPS)、热循环仪和 iQ-Check Prep System。

* 请联系 Bio-Rad 技术支持中心获取推荐仪器的信息。

试剂和耗材

- 培养基：*Listeria* Special Broth (李斯特氏菌特制肉汤) (LSB) (产品目录号 3555703, 225 ml x 6 瓶；3564703, 干粉, 500 g；3555793, 5 L x 2 袋；3564753, 干粉, 5 kg) 或者 Half Fraser Broth (产品目录号 3564604, 干粉, 500 g；3555797, 225 ml x 6 瓶；3555794, 3 L x 4 袋)
- 培养基：*Listeria* Special Broth (李斯特氏菌特制肉汤) II (LSB II) (产品目录号 12017463, 225 ml x 6 瓶；12017388, 干粉, 500 g；12017378, 干粉, 5 kg)
- iQ-Check Free DNA Removal Solution (目录号 3594970)
- 专用于环境样本：
 - 采样海绵
 - 采样棉签
 - 用于海绵和拭子的中和肉汤, 例如 Dey-Engley (D/E) 或 HiCap Neutralizing Broth, 或 Letheen Broth
- 专用于管中提取：
 - 1.5 ml 锥形螺旋盖管, 无菌 (例如产品目录号 2240110XTU 的产品)
- 专用于在 Deep Well 板内提取：
 - 96-well deep well plate (产品目录号 3594900)
 - Plastic sealing film (产品目录号 3590139)
 - X-Pierce Sealing Films (产品目录号 3593977) 或 Pre-Pierced Plate Sealing Film (产品目录号 3600040, 仅限北美地区)
- 专用于 Standard II 和 Easy II 提取流程：
 - iQ-Check Lysis Beads (试剂 F) (产品目录号 3578136)
 - 200 μ l 宽口移液器吸头
- 专用于 iQ-Check Prep System：
 - 60 ml 稀释容器 (目录号 3594904)
 - 移液器滤芯枪头 (产品目录号 3594902 或 12014486 : 50 μ l ; 3594903 或 12014483 : 1000 μ l)
- PCR 混合管 (目录号 12016673, 5 ml x 25)

- RAPID[®]*Listeria* spp. Agar* (产品目录号 3564744, 干粉, 500 g ; 3564745, 添加剂 1 ; 3564746, 添加剂 2)
- RAPID[®]*L.mono* Agar* (产品目录号 3563694, 90 mm x 20 个 ; 3555294, 190 ml 琼脂加 2 份添加剂 ; 3564293, 干粉, 500 g ; 3564294, Supplement 1 ; 3564746, Supplement 2)
- PCR 板、管子、密封胶带和盖子
- 适用于 20、200 和 1000 μ l 微量移液管的无菌带滤芯移液器枪头
- Combitip 移液器或等效重复移液器的吸头 ; 无菌, 独立包装
- 1 ml 和 10 ml 移液器
- 2 ml 和 5 ml 无菌试管
- 无粉手套
- 蒸馏无菌水
- 漂白剂, 5%
- DNA AWAY 或 RNase AWAY 等清洁剂

* 可用于 AOAC-PTM 验证以外的用途。

第 6 部分

最佳实验结果的安全预防措施及建议

- 此测试必须由经过专门培训的人员操作
- 孕妇、儿童、老人和免疫功能受损人群的李斯特菌感染几率和死亡率较高, 不建议操作此方法和处理 *单核细胞增生李斯特菌*。
- 样品和增菌培养物必须作为潜在传染性材料处理, 并根据当地法规和规定进行废弃物处理
- 所有具有潜在传染性的材料在处置前都应进行高压灭菌
- 最后的实验结果取决于严格遵守良好实验室规范 (例如, EN ISO 7218 标准), 尤其是 PCR 操作 :
 - 切勿将实验室设备 (移液管、试管等) 在工作站之间重复使用
 - 对于每个系列的扩增反应, 始终使用阳性对照及阴性对照
 - 试剂过期后请勿使用
 - 使用前涡旋试剂盒中的试剂以确保均匀
 - 定期验证移液器的准确度和精密度, 以及仪器的正常功能
 - 经常更换手套, 尤其是当您怀疑它们被污染时
 - 使用 5% 的漂白剂和其他去污剂 (例如 DNA AWAY) 定期清洁工作空间
 - 使用无粉手套并避免在管帽上留下指纹和墨迹。两者都会干扰数据采集
- 强烈建议遵守标准 EN ISO 22174:2005 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and

definitions, 食品和动物饲料微生物学 — 用于检测食源性病原体的聚合酶链反应 (PCR) — 一般要求和定义) 中描述的一般要求

■ **iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit:**

- 根据全球化学品统一分类和标签制度 (GHS), 测试试剂盒中的所有物质或混合物均属于分类产品。与酸接触可能会释放有毒气体。如果使用得当, 则不需要特别的预防措施。如果产品被吸入, 请马上吸入新鲜空气并在出现投诉时咨询医生。眼睛接触产品后, 用流水冲洗睁开的眼睛几分钟。如果吞下产品, 请催吐并寻求医疗帮助。

■ **iQ-Check Prep System :**

- iQ-Check Prep System 的不当使用可能会导致身体伤害或仪器损坏。如果处理不当, 某些组件可能会有因过热而造成人身伤害的风险。为安全使用, iQ-Check Prep System 只能由经过适当培训的合格实验室人员操作。只能由 Bio-Rad 现场服务工程师执行仪器维修

■ **CFX96 Touch Deep Well 或 CFX Opus Deepwell 实时 PCR 检测系统 :**

- CFX96 Touch Deep Well 系统或 CFX Opus Deepwell 系统使用不当可能会导致人身伤害或仪器损坏。如果处理不当, 某些组件可能会有因过热而造成人身伤害的风险。为安全使用, CFX96 Touch Deep Well 系统或 CFX Opus Deepwell 系统只能由经过适当培训的合格实验室人员操作。只能由 Bio-Rad 现场服务工程师执行仪器维修

■ **增菌条件 :**

- 用户应阅读、理解和遵循 iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit 说明中的所有安全信息。保留安全说明以备将来参考。为降低与接触化学品和生物危害相关的风险, 请在经过培训的人员控制下, 在配备适当的实验室进行病原体检测。始终遵循标准的实验室安全规范, 包括在处理试剂和受污染的样品时穿戴适当的防护服和护目镜。扩增后避免接触增菌培养液和试剂管。根据当前行业标准处理增菌样品。
- 李斯特菌属于生物安全 2 级微生物。增菌生物样本具有传播传染病的潜力。遵守所有适用的地方、州/省和/或国家有关生物废物处置的法规。穿戴合适的防护设备, 包括但不限于: 防护眼镜、面罩、衣服/实验服和手套。所有工作都应在配备适当安全设备 (例如隔离装置) 的设施中进行。在处理潜在传染性材料之前, 个人应根据适用的法规和公司/机构要求接受培训
- 测试完成后, 所有可能含有病原体的材料和介质都应按照当前处理污染废弃物的行业标准进行净化 (即在 121° C 下高压灭菌 20 min)。有关更多信息和当地处理法规, 请参阅安全数据表

第 7 部分

操作方案

A. 样本增菌

强烈建议您在阅读完全部操作流程后才开始进行检测。

使用前请将增菌液根据需求放置于适当的孵育温度下（室温或 30° C/37° C）。

强烈建议使用带有过滤功能的增菌袋。

在 **NF 验证** 范围内，尚未对重量超过 25 g 的样本进行过测试。按照下表所示的时间和温度进行培养，无需晃动。也可以对增菌后在 2-8° C 条件下存放长达 72 hr 的 LSB 进行 iQ-Check 检测。

下表概述了可供使用的不同方案，具体取决于应用和验证范围：

NF 验证 BRD 7/10-04/05 和 NordVal 037		
范围（食品基质）	样本制备	增菌/DNA 提取
所有食物产品和环境样本 ¹	在 9 x n ml Half Fraser 肉汤中或 LSB 中均匀混合 n g 食品	Standard II 提取 (Half Fraser) <ul style="list-style-type: none"> 在 30 ± 1° C 下培养 24 – 26 hr 管 Standard II 提取 (LSB) <ul style="list-style-type: none"> 在 30 ± 1° C 下培养 22 – 24 hr 管 Easy II 提取 (LSB) <ul style="list-style-type: none"> 在 30 ± 1° C 下培养 24 – 26 hr 管
生产环境和表面 ²	将 n g 食物放入 9 x n ml 预热的 LSB 增菌液或室温的 LSB II 增菌液中均质化	Easy II 提取 (LSB) <ul style="list-style-type: none"> 在 30 ± 1° C 下培养 18 – 26 hr 管/Deep Well Easy II 提取 (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> 在 37 ± 1° C 下培养 18 – 26 hr 管/Deep Well
合成食物 ²	在 9 x n ml LSB II 肉汤中 中均匀混合 n g 食品	Easy II 提取 (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> 在 37 ± 1° C 下培养 18 – 26 hr Deep Well
乳制品 ²	在 9 x n ml 预热的 LSB II 肉汤中 中均匀混合 n g 食品	Easy II 提取 (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> 在 37 ± 1° C 下培养 20 – 28 hr Deep Well
AOAC PTM 010802		
范围（食品基质） ^{2,3}	样本制备	增菌/DNA 提取
熟食火鸡，热狗，烟熏鲑鱼，白软干酪	在 9 x n ml LSB 或 LSB II 中均匀混合 n g 食品 (225 ml 中混合 25 g ; 1125 ml 中混合 125 g)	Easy II 提取 (LSB) <ul style="list-style-type: none"> 在 30 ± 1° C 下培养 24 – 26 hr 管/Deep Well Easy II 提取 (LSB II) <ul style="list-style-type: none"> 在 37 ± 1° C 下培养 18 – 24 hr 管/Deep Well

不锈钢表面	环境样本 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 用不含芳基磺酸盐复合物的中和肉汤润湿棉签和海绵 ▪ 对于用棉签分析的表面，取样面积为 1 x 1 英寸 (2.54 x 2.54 cm) ▪ 对于用棉签分析的表面，取样面积为 4 x 4 英寸 (10.16 x 10.16 cm) ▪ 加入足够的 LSB II 覆盖拭子 (10 ml) 或海绵 (60-225 ml) 	Easy II 提取 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 在 37 ± 1° C 下培养 16 – 24 hr ▪ 管/Deep Well
有关加拿大卫生部批准的基质和方案，请参考 MFLP-54		

¹验证中需使用“Lmono Fast” Application Protocol File，以缩短 PCR 扩增时间。可联系您的 Bio-Rad 销售代表获取更多信息。

²验证时也需用到 iQ-Check Free DNA Removal Solution 和“Lmono Fast” Application Protocol File 以缩短 PCR 扩增时间。可联系您的 Bio-Rad 销售代表获取更多信息。

³验证包括直接划线至 RAPID'L. *mono*、RAPID'*Listeria* spp.，或琼脂 *李斯特菌* 培养皿（不包括天然奶酪）

B. 去除游离 DNA 处理

iQ-Check Free DNA Removal Solution 是去除游离 DNA 的最佳选择。

使用过程中请遵守 Bio-Rad 用户指南（文件编号 10000058391）中的建议。本流程在生产环境样本类别中通过了 AFNOR 认证的验证。

C. DNA 提取

以下是我们的建议：

1. 检测开始前，预热恒温器或加热振荡混合仪。将其设置为 95–100° C。移液时将裂解液置于磁力搅拌板上以中等速度搅拌，使其保持悬浮状态。
2. 避免晃动增菌袋和采集大块食品碎屑。若食品样本中含有脂肪上清液，只需收集脂肪层以下的样本。
3. 小心打开离心管和孔板，避免交叉污染。
4. 在直接移液到预穿孔密封膜前，冷却 Deep Well 板。
5. 使用磁力搅拌棒使裂解剂保持悬浮状态。以中等速度搅拌时进行移液。
6. 使用裂解液时，首先用手轻轻晃动裂解液。然后，瓶中磁力搅拌棒以中速搅拌液体时移液，使液体保持呈悬浮状态。
7. 按照以下步骤重组最终裂解液：
 - a. 小心将 F 试剂（裂解珠）中的所有内容物倒入 A 试剂（裂解液）中。
 - b. 使用带有足够宽枪头的耗材，以便对均质后的裂解液进行移液。
 - c. 裂解液与裂解珠混合后（试剂 A + F），在 4°C 条件下保存可具有 6 个月保质期。

Standard II 流程

1. 收集 1.5 ml 的增菌样本到试管中。
2. 以 10000 - -12000 x g 的标准对试管进行离心操作 5 min。弃置上层清液。

- 向试剂丸中加入 250 μ l 均质后的裂解液（试剂 A + F），对试剂进行上下移液，使试剂丸重新悬浮。盖上试管盖。

注意：首先用手轻轻晃动裂解剂，使珠子悬浮。

- 将试管置于热振荡器或细胞破碎器中 3 ± 1 min。
- 在 95–100° C 的适当恒温器中培养 10–15 min。
- 以较高的速度对试管进行涡流操作，并以 10000–12000 x g 的标准离心操作 5 min。

如需暂时停止检测，推荐在此步骤暂停。

上清液可在 -20° C 条件下保存长达 1 年。再次使用前，将其解冻、混匀，然后离心 10000–12000 x g 5 min。

Easy II 流程

- 向离心管或 Deep Well 板中加入 100 μ l 混匀的裂解液（试剂 A + F）。

注意：首先用手轻轻晃动裂解剂，使珠子悬浮。

- 加入 100 μ l 增菌后的样本。

注意：晃动悬浮液使培养物混匀，然后等碎片沉淀后再采集样本。

- 用移液枪上下吹打溶液，直至安全混合均匀。
- 盖上离心管盖，或用预穿孔密封膜将 Deep Well 板密封。
- 将试管置于细胞破碎器中 3 ± 1 min。将试管放在加热块中于 95–100°C 下孵育 15–20 分钟。
- 如果使用试管或深孔板形式的搅拌培养箱，请先将试管或深孔板放在搅拌培养箱中以 1,300 至 1,600 rpm, 95–100°C 孵育 15–20 分钟。
- 以较高的速度对试管进行涡流操作，然后以 10000–12000 x g 的标准离心操作至少 2 min。

Deep Well 板不需要进行离心。

如需暂时停止检测，推荐在此步骤暂停。

上清液可在 -20° C 条件下保存长达 1 年。再次使用前，将其解冻、混匀，然后离心 10000–12000 x g 5 min。

D. 实时荧光定量 PCR

仪器和软件设置

请参阅 iQ-Check Kits 的实时荧光定量 PCR 系统用户指南中的说明进行仪器和软件设置。

PCR 混合物的准备

- 制备 PCR 混合物需用到扩增液（C 试剂）和荧光探针（B 试剂）。所需 PCR 混合物的体积取决于待分析的样本和对照的数目。每次运行的 PCR 中必须至少包含阳性对照和阴性对照各一个。利用“附录 — PCR 混合物计算指南”中的移液概览表，即可确定每种试剂的所需体积。

注意：PCR 混合物（B 试剂 + C 试剂）准备完后，应立即使用。在 2–8° C 条件下最多可稳定保存 1 hr。

2. 根据您的实验设计方案，向每孔中加入 45 μ l PCR 混合物。
3. 加入 5 μ l DNA 提取物，或试剂 D（阴性对照）或试剂 E（阳性对照）。移液前不要涡旋振荡样品。将 PCR 板或联管上的孔密封。请小心移液，避免孔底部产生气泡。可选步骤：对密封后的 PCR 板或联管进行离心操作（快速旋转），以消除气泡。
4. 将 PCR 板或联管放入热循环仪中。确保正确放置板，即 A1 孔位于左上角。最后关上 PCR 仪器盖。

运行 PCR

要开始运行 PCR，请参阅 iQ-Check Kits 的实时荧光定量 PCR 系统用户指南中的说明。

“Lmono Fast” Application Protocol File 已通过 NF 和 AOAC 验证。

E. 数据分析

可在 PCR 运行结束后直接进行数据分析，或稍后打开存储的数据文件进行分析。请参阅 CFX Manager IDE 软件用户手册中的说明，来打开数据文件并设置数据分析参数。

结果解释

设置数据分析参数后，可通过分析每个样本的量化周期 (Cq) 值（扩增曲线与阈值相交的循环）来解读检测结果。

CFX Manager IDE 软件可对 Bio-Rad 实时荧光定量 PCR 检测系统进行完整的自动化分析。在发布结果之前，应验证扩增曲线的典型特征。如果需要额外支持，请联系您的 Bio-Rad 技术支持团队。

对照

在解释样本结果之前，需核实阳性和阴性对照。

对照必须获得下表所示结果，才能表示实验有效。否则必须重新进行 PCR 反应。

对照	单核细胞增生李斯特菌检测 (FAM 通道)	内部对照检测 (HEX 通道)
阴性对照	Cq = N/A*	28 ≤ Cq ≤ 40
阳性对照	26 ≤ Cq ≤ 36	N/A

* 当样本的荧光信号并未显著高于背景干扰，并因此没有跨越阈值时，软件会显示 Cq 值为 N/A（不适用）。

如果阴性和阳性对照的结果与对照表中的结果不同（无效对照），则重复第 7 部分“操作流程”中“D. 实时 PCR”和“E. 数据分析”中描述的操作和分析

样本

阳性 iQ-Check *Listeria monocytogenes* PCR 检测必须显示典型的扩增曲线，并且 FAM 荧光团的 Cq 值 ≥ 10。

- 如果两个通道的 Cq 值均小于 10，请核实原始数据曲线是否是正常的扩增曲线（具有平坦的基线，随后荧光发射呈指数快速增加，最后趋于平坦）。如果曲线正常，则可视为单核细胞增生李斯特菌检测阳性
- 如果没有 FAM Cq 值（Cq = N/A），或曲线不是典型扩增曲线，则必须分析该样本的内部质控：

- 如果无 FAM Cq 值但内部对照 Cq 值 ≥ 28 ，则可将样本视为**阴性单核细胞增生李斯特菌**样本。
- 如果内部对照也无 Cq 值（Cq = N/A），说明 PCR 反应未正常进行。需将样本进行稀释（将 10 μ l DNA 提取物用无菌蒸馏水 1:10 稀释后，取 5 μ l 稀释液进行检测）并重新进行 PCR。
- 如果内部对照 Cq 值 <28 ，则无法解释结果。需核实阈值是否设置正确，或原始数据曲线是否为正常扩增曲线。如果曲线不具有典型形状，则需重新进行 PCR 检测。
- 检测结果解释如下表所示。

单核细胞增生李斯特菌检测 (FAM 通道)	内部对照检测 (HEX 通道)	结果解释
Cq ≥ 10	N/A	阳性
Cq = N/A	Cq ≥ 28	阴性
Cq = N/A	Cq = N/A	反应抑制*

* 当目标检测和内部对照检测均为 Cq 值 = N/A 时，必须将 DNA 提取物按 1:10 稀释并再次进行检测。

当不满足验证标准时，可视为无效结果。如果样本的反应被抑制，需检查原始数据并重新进行检测。

第 8 部分

阳性结果的确认

在 NF 验证认证方法的情况下，所有 iQ-Check 阳性检测结果必须通过下列方法证实：

1. 使用 CEN 或 ISO 标准方法描述的经典检测方法，直接在 Half Fraser 肉汤中进行检测，或者在使用 LSB 或 LSB II 的情况下从样本开始检测。
2. 对在 RAPID'*Listeria* spp.或 RAPID'*L.mono* 显色平板中增菌后的 LSB 或 LSB II 进行分离（划线分离 100 μ l），并在 $37 \pm 1^\circ$ C 条件下培养 24 hr。RAPID'*L.mono* 中出现特有的菌落，足以证实**单核细胞增生李斯特菌**的存在。使用鉴别试验确认 RAPID'*Listeria* spp 上是否存在**单核细胞增生李斯特菌**。
3. 对在 AL 或 PALCAM 平板中增菌后的 LSB 或 LSB II 进行分离（划线分离 10 μ l），并在 $37 \pm 1^\circ$ C 条件下培养 24-48 hr。典型菌落应当通过 ISO 方法中描述的检测方法进行证实，直到确定存在该菌种。
4. 使用经 NF 验证认证的不同于 iQ-Check *L. monocytogenes* II PCR 检测原理的其他方法。必须完全遵循第二种方法的验证方案。

如果 iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit 和上面列出的任何确认选项之间的结果不一致，则遵循必要的步骤以确保有效的结果。

在进行确认之前，在 30° C 条件下培养之后，增菌后的 LSB 或 LSB II 可以在 $2-8^\circ$ C 条件下最多存放 72 hr。如果是 AOAC 验证，iQ-Check *L. monocytogenes* 阳性结果应视为假定阳性，并建议按照适当的参考方法（例如 USDA MLG、FDA BAM、ISO、MFHPB 等方法）进行确认。或者，对于选定培养基，将 10 μ l 增菌后的 LSB 或 LSB II 直接划线到 RAPID'*L. mono*、RAPID'*Listeria* spp.，或琼脂李斯特菌显色平板上，并

在

37 ± 1° C 条件下培养 24 hr。特有的单核细胞增生李斯特菌菌落的存在应通过生化方法来证实单核细胞增生李斯特菌是否存在。

第 9 部分

使用 iQ-Check Kit 确认单菌落

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit 也可用于确认平板培养基上的单核细胞增生李斯特菌单菌落。该方法已获得 AFNOR 对 RAPID'*L.mono* 和 RAPID'*Listeria spp.* 显色培养基的正式确认。

1. 用牙签、无菌环或其他合适耗材（如移液枪枪头）从选择性或非选择性琼脂培养基上挑取一个单菌落。
2. 用 100 μl 胰蛋白胍盐或无菌蒸馏水在微量离心管中重悬菌落，并使用涡旋振荡器混匀。
3. 取 5 微升悬浮液，加入 45 μl PCR 混合物（参见第 7 部分“操作流程”中的“D. 实时 PCR”），并按照 iQ-Check *L. monocytogenes* II 操作流程进行后续操作，获取数据并进行结果解释。

第 10 部分

测试性能和验证

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit 专用于检测单核细胞增生李斯特菌



BRD 07/10-04/05

农业企业的替代分析方法

<http://nf-validation.afnor.org>

NF 验证

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit 已通过 NF 验证认证，作为参考方法 ISO 11290-1:2017（请参见第 11 部分中的参考资料 4）的替代方法，用于所有人类消费产品和环境样本中李斯特菌的检测。验证遵循 ISO 16140-2:2016 中的操作流程（请参见第 11 部分中的参考资料 5），并且使用了 CFX96 Touch Deep Well 和 CFX Opus Deepwell 实时 PCR 系统。iQ-Check Free DNA Removal Solution 的使用针对生产环境样本进行了验证，合成食物，乳制品。相关软件是 CFX Manager IDE 软件（版本 2.2 及更高版本）。“Lmono Fast” Application Protocol File 已通过验证。证书编号：BRD 07/10-04/05。有效期至：请参见 AFNOR 认证网站上提供的证书。



AOAC 验证

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit (Easy II 流程) 已由 AOAC 研究所根据性能测试法程序进行了验证，用于熟食火鸡、热狗、烟熏鲑鱼、白软干酪和不锈钢表面中单核细胞增生李斯特菌的检测。iQ-Check 阳性检测结果应视为推定结果，建议按照第 8 部分中的建议进行确认。LSB、LSB II、“Lmono Fast” APF、iQ-Check Free DNA Removal Solution 的使用以及 CFX96 Touch Deep Well 和 CFX Opus Deepwell Real-Time PCR System 的使

用针对所有样本进行了验证。相关软件是 CFX Manager IDE 软件（版本 2.2 及更高版本）。证书编号：010802。



加拿大卫生部验证

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit (Easy II 流程) 已通过加拿大卫生部 (MFLP-54) 验证, 作为即食肉类和禽肉、水果和蔬菜源性产品 (不包括未经加工的蔬菜)、鱼类和海鲜产品 (不包括熏鱼) 以及冷冻和发酵乳制品 (25 g 和 125 g 样本) 中单核细胞增生李斯特菌的检测。iQ-Check 阳性检测结果应视为推定结果, 必须按照 MFHPB-30 (请参见第 11 部分中的参考资料 2) 进行确认。



NordVal 验证

The iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Kit 已通过 NordVal 针对以下方面的验证：

- 在 Half Fraser 肉汤中增菌后按照 Standard II 裂解流程操作
- 在 *Listeria* Special 肉汤中增菌后按照 Standard II 裂解流程操作
- 在 *Listeria* Special 肉汤中增菌后按照 Easy II 裂解流程操作, 不再需要操作第一个离心步骤

证书编号：037.关于有效期, 请参见 NordVal 网站上提供的证书。

第 11 部分

参考资料

AOAC Official Method 993 .12-1996(1999). *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. Selective enrichment and isolation method.

Health Canada (2011). Health Products and Food Branch. MFHPB-30. Isolation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. from foods and environmental samples. The Compendium of Analytical Methods, Volume 2, February 2011.

ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 11290-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. — Part 1: Detection method.

ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.

ISO 22174. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions.

United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2021). Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 8 .13: Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, ready-to-eat siluriformes (fish) and egg products, and environmental samples.

https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-09/MLG-8.13.pdf, accessed February 14, 2020.

United States Food and Drug Administration (2017). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>, accessed February 14, 2020.

第 12 部分

修订记录

发布日期	文件编号	变更
2023 年 10 月	10000167776 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- 文件编号变更 – 之前版本 10000123536 Ver C- iQ-Check <i>Listeria monocytogenes</i> II 用户指南- AFNOR 扩展：LSB II 增菌液适用于合成食物,环境生产样品及乳制品

附录 — PCR 混合物计算指南

添加待分析的样本和对照总数并在表中找到相应 B 试剂和 C 试剂的体积，即可确定准备 PCR 混合物所需的正确体积。

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

请访问 bio-rad.com/iqcheck 了解更多信息。

BIO-RAD 是 Bio-Rad Laboratories, Inc. 的商标。

IQ-CHECK 是 Bio-Rad Europe GmbH 在某些
司法管辖区的商标。 此处使用的所有商标均为
其各自所有者的财产。



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 080 007 7373 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23