

SOLUS *LISTERIA* ELISA

Systeme de test immunologique pour
la detection des especes de *Listeria*
dans les aliments et les echantillons
environnementaux

Numero du supplement : 37
Numero de publication : 1,0
Date de publication : Janvier 2020
Code(s) de produit : LIS-0096S; LIS-0480S
Organisme de certification : AOAC





La performance de cette méthode a été examinée par l'Institut de recherche de l'AOAC et a été jugée conforme aux spécifications du fabricant.

Cette méthode a été évaluée par le programme AOAC® *Performance Tested Methods*SM pour la détection des espèces de *Listeria* dans la laitue romaine emballée, les hot dogs, les crevettes crues congelées, le saumon fumé, le fromage à pâte molle (Brie), l'acier inoxydable et le polystyrène.

La méthode Solus *Listeria* ELISA a été comparée aux méthodes de référence USDA-FSISmIG 8.09 et FDA/BAM, chapitre 10, applicables aux matrices.
(AOAC® *Performance testées*SM Licence no. **041601**).

1. INTRODUCTION

Le Solus *E. coli* ELISA fournit un résultat négatif ou présumé positif à partir de 2 étapes d'enrichissement en 44 à 52 heures, durée du test comprise.

2. UTILISATION PRÉVUE

Le test Solus *Listeria* ELISA est destiné à la détection des espèces de *Listeria* dans des aliments sélectionnés et des échantillons d'environnements de production. La méthode de test est facile à réaliser mais elle nécessite des installations de laboratoire ainsi qu'un personnel qualifié et formé. Une formation de base est recommandée aux utilisateurs débutants. Elle est fournie par Solus Scientific Solutions Ltd.

L'utilisation de cette méthode inclut la conformité aux bonnes pratiques de laboratoire (voir ISO 7218).

3. RÉACTIFS FOURNIS

La plupart des composants du kit sont fournis stabilisés et prêts à l'emploi à une concentration de travail, seul le concentré de tampon de lavage nécessitant une dilution. Chaque kit contient suffisamment de matériel pour 1 détermination (LIS-0096S) ou 5 déterminations (LIS-0480S) x 93, plus les contrôles. La date de péremption du kit est indiquée sur l'étiquette de chaque produit.

Composant	Apparence	Volume		Commentaires
		LIS-0096S	LIS-0480S	
Plaque de test	Microplaque à 96 puits au format barrette amovible/cassable	1	5	Puits revêtus d'anticorps contre les espèces de <i>Listeria</i>
Contrôle négatif	Liquide orange pâle. Étiquette verte.	3 ml	10ml	Concentration de travail. Contient un diluant avec conservateur.
Contrôle positif	Liquide noir. Étiquette rouge.	3 ml	10ml	Concentration de travail. Contient de la <i>Listeria</i> inactivée par la chaleur dans un diluant avec conservateur.
Conjugué	Liquide incolore/de couleur paille très pâle. Étiquette orange.	11ml	60ml	Concentration de travail. Contient un anticorps conjugué contre la peroxydase de raifort dans un diluant avec conservateur.
Substrat	Liquide incolore/bleu très pâle. Étiquette bleue.	11ml	60ml	Concentration de travail. Contient du 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), du peroxyde d'hydrogène et des stabilisateurs.
Solution d'arrêt	Liquide incolore. Étiquette jaune.	11ml	60ml	Concentration de travail. Contient 0,2 M d'acide sulfurique.
Concentré de tampon de lavage	Liquide incolore/jaune/orange. Étiquette blanche.	10ml x 6	60ml x 5	Concentré. À diluer avant utilisation.

4. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRE QUI NE SONT PAS FOURNIS

Réfrigérateur entre 2 et 8 °C.	Minuteur
Eau déionisée ou distillée (DI)	Incubateur à 37±1°C.
Bouillon de Fraser-demi	Incubateur à 30±1°C.
Bouillon sélectif RELM (molécule similaire à la résisitine)	Tubes pour l'ébullition des échantillons (par ex. tubes sans col en polypropylène de 5ml) - 12x75 mm)
Éponges d'échantillonnage ou écouvillons trempés dans un tampon neutralisant approprié (p. ex. bouillon Lethen ou HiCap)	Appareil de chauffage (par exemple, bloc de chauffage) capable de chauffer à 85-100°C.
Éprouvettes graduées pour différents volumes (par ex. 250ml, 1 l)	Pipettes et pointes (1ml ; 0,1ml)
Tubes à essai stériles de 10ml adaptés à l'enrichissement sélectif	Laveur et lecteur de microplaques DyneX DS2 ou Microplate avec filtre 450 nm
Homogénéiseur (ou appareil similaire) et sachets	Autoclave pour la décontamination des échantillons
Pipettes de transfert de 3ml (stériles)	Plaques de gélose et équipement de test de confirmation standard.
Mélangeur de type vortex	Voir la section 9 pour plus de détails.

5. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

5.1 Tampon de lavage :

Préparer les éléments suivants dans un récipient propre.

LIS-0096S	LIS-0480S
Ajouter 10ml (1 flacon) de concentré de tampon de lavage à 240ml d'eau déionisée et agiter pour mélanger.	Ajouter 60ml (1 flacon) de concentré de tampon de lavage à 1440ml d'eau déionisée et agiter pour mélanger.

5.2 Bouillon de culture (milieu de croissance) :

- Préparer un bouillon de Fraser-demi en suivant les consignes du fabricant. Le laisser refroidir à la température ambiante (18-25°C) avant de l'utiliser pour les tests.
- Préparer le bouillon d'enrichissement rapide RELM en suivant les consignes du fabricant et le distribuer dans des tubes stériles de 10ml. Le laisser refroidir à la température ambiante (18-25°C) avant de l'utiliser pour les tests.

6. PRÉPARATION ET ENRICHISSEMENT DES ÉCHANTILLONS - méthode standard

6.1 Pré-enrichissement (tous les échantillons sauf les surfaces environnementales)

- Homogénéiser 25g de l'échantillon à tester, si nécessaire à l'aide d'un homogénéisateur, dans 225ml de bouillon Fraser-demi et laisser incubé pendant 22-26 heures à 30±1°C.

6.2 Pré-enrichissement pour les surfaces environnementales

- Utilisez des écouvillons ou des éponges stériles, pré-humidifiés dans un bouillon neutralisant. Échantillonner la surface environnementale puis enrichir l'écouvillon dans 10ml, ou l'éponge dans 100ml, de bouillon Fraser-demi pendant 22-26 heures à 30±1°C.



6.3 Enrichissement sélectif

- Transférer 0,2ml de l'échantillon enrichi dans 10ml de bouillon RELM et laisser incuber pendant 22-26 heures à $30\pm 1^{\circ}\text{C}$.

S'assurer que le temps de traitement des échantillons sur paillasse soit maintenu au minimum et que le transfert dans l'incubateur à 30°C se produise dès que possible. Ceci est important pour éviter une croissance importante des organismes concurrents.

7. INACTIVATION THERMIQUE APRÈS ENRICHISSEMENT

- 7.1. Lorsque la période d'incubation de l'échantillon est terminée, transférer une aliquote de 1-2ml (en évitant les particules) dans un tube à essai pour l'ébullition (par ex. un tube de 5ml en polypropylène).
- 7.2. Chauffer l'aliquote à $85-100^{\circ}\text{C}$ pendant 15-20 minutes dans le tube. Après le chauffage, laisser refroidir l'échantillon à température ambiante ($18-25^{\circ}\text{C}$). Cette opération peut être accélérée en plaçant les tubes dans de l'eau du robinet froide pendant environ 5 minutes.

Les échantillons qui n'ont pas été inactivés par la chaleur doivent être conservés à des fins de vérification jusqu'à ce que les résultats des tests ELISA aient été obtenus. Ces échantillons doivent être conservés à $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ si le test ELISA doit être effectué dans les 2 heures. Si cela n'est pas possible, conserver les bouillons pendant 72 heures maximum à $2-8^{\circ}\text{C}$ avant le test ELISA.

8. PROCÉDURE DE TEST ELISA

- 8.1. Sortir le kit de test de son lieu de conservation au moins une heure avant utilisation pour permettre aux composants d'atteindre la température ambiante ($18-25^{\circ}\text{C}$). Déterminer le nombre de puits requis pour le test. Retirer le nombre de barrettes requis de la pochette et les fixer au cadre fourni. Les barrettes inutilisées doivent être remises dans la pochette et conservées entre 2 et 8°C .
- 8.2. Préparer le tampon de lavage comme indiqué dans la section 5.1 en fonction de la taille du kit utilisé.
- 8.3. Laisser le premier puits de la barrette vide pour servir de « blanc » afin de mesurer l'absorbance du substrat.
- 8.4. Pipeter 0,1ml de contrôle négatif (étiquette verte) dans le deuxième puits.
- 8.5. Pipeter 0,1ml de contrôle positif (étiquette rouge) dans le troisième puits.
- 8.6. Pipeter 0,1ml de chaque échantillon inactivé par la chaleur séparément dans des puits consécutifs de la barrette. S'il reste des puits à la fin d'une barrette de test, les contrôles positifs ou négatifs peuvent être répétés. †
- 8.7. Incuber la plaque (contenant les barrettes) à $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 30-35 minutes.
- 8.8. Après incubation, aspirer le contenu des puits, en éliminant autant de liquide que possible. Laver les puits 5 fois avec le tampon de lavage en veillant à remplir et à vider complètement les puits à chaque cycle de lavage. La technique de lavage est essentielle pour les performances de dosage. Il est donc recommandé d'utiliser un laveur de microplaques.
- 8.9. Pipeter 0,1ml de conjugué (étiquette orange) dans tous les puits, à l'exception du puits « vide ».
- 8.10. Incuber la plaque à $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 30-35 minutes.
- 8.11. Répéter les cycles de lavage comme indiqué à la section 8.8
- 8.12. Pipeter 0,1ml de conjugué (étiquette bleue) dans tous les puits, à l'exception du puits « vide ».

- 8.13. Incuber la plaque à température ambiante (18-25°C) pendant 30- 35 minutes, dans l'obscurité.
- 8.14. Après incubation, arrêter la réaction en ajoutant 0,1ml de solution d'arrêt (étiquette jaune) à tous les puits, y compris le puits « vide ». Les puits contenant du bleu deviendront jaunes après l'ajout de la solution d'arrêt.
- 8.15. Lire les densités optiques des puits dans les 10 minutes dans un lecteur de plaques à l'aide d'un filtre 450 nm. Avant la lecture, vérifier qu'il n'y ait pas de bulles d'air dans les puits et, le cas échéant, les faire éclater avec une aiguille. Le lecteur doit être remis à zéro par rapport au puits « vide » bien avant la lecture des autres puits. Ne pas utiliser de filtre de référence. L'utilisation d'un équipement ELISA automatique est préférable. Il doit être configuré et validé selon ce protocole.

† En cas d'utilisation de l'instrumentation Dynex, veiller à éviter la formation de bulles dans les tubes contenant les échantillons et le réactif ou la formation de films dans les tubes, au-dessus du niveau du liquide. Il est impératif de vérifier que le système ait correctement pipeté les échantillons dans la plaque de test avant de continuer.

9. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats sont exprimés sous forme de mesures de densité optique (DO₄₅₀) à l'aide d'un lecteur de microplaques.

Critères d'acceptation :

DO du contrôle négatif ₄₅₀	< 0,100
DO du contrôle positif ₄₅₀	> 0,500

La valeur du puits vide (généralement A1 lors d'un traitement manuel) doit toujours être soustraite de tous les autres résultats obtenus. Si la valeur des contrôles négatifs ou positifs ne répond pas à ces critères, le test n'est pas considéré comme valide et doit être effectué à nouveau.

Les échantillons dont les relevés de DO₄₅₀ sont < 0,200 sont considérés comme négatifs. Dans ce cas, l'analyse est terminée, les résultats peuvent être rapportés et les échantillons correspondants qui n'ont pas été inactivés par la chaleur peuvent être éliminés conformément aux réglementations/directives locales.

Les échantillons ayant une DO₄₅₀ ≥ 0,200 sont présumés positifs pour la *Listeria*. Les résultats présumés positifs doivent être vérifiés à l'aide d'une méthode de culture reconnue.

10. CONFIRMATION DES RÉSULTATS POSITIFS DE *LISTERIA* ELISA

Selon l'étude de validation AOAC-PTM, tous les échantillons identifiés comme positifs pour la *Listeria* par le test Solus *Listeria* ELISA doivent être confirmés par les tests suivants :

- Placer 100 µl d'échantillon non-inactivé par la chaleur sur une plaque de gélose sélective MOX pour *Listeria* . Les colonies typiques d'espèces de *Listeria* sont noires entourées d'un halo noir. Effectuer un test de la catalase et une coloration de Gram sur des colonies typiques isolées issues des plaques de gélose (le test de la catalase est positif et les cellules bactériennes montrent une morphologie en bâtonnets Gram positive), puis les placer dans des plaques de gélose de sang de mouton (GSM). Incuber la GSM pendant 18-24 heures à 35±2°C avant de lire les résultats d'hémolyse. Alternativement à la plaque GSM, les colonies peuvent être biochimiquement caractérisées en effectuant des galeries biochimiques spécifiques à l'espèce *Listeria* .

- Les résultats peuvent également être confirmés selon les protocoles de confirmation des méthodes de référence respectives, à savoir soit la méthode USDA/FSIS-MLG 8.09 « Isolement et identification de la *Listeria* dans les viandes rouges, les volailles et les produits à base d'œufs, ainsi que les échantillons environnementaux », soit le Chapitre 10 « Détection et énumération des *Listeria monocytogenes* dans les aliments » du BAM de la FDA.

11. CONSERVATION ET EXPIRATION DU KIT

Le kit et tous les composants inutilisés doivent être conservés entre 2 et 8 °C. NE PAS CONGELER. La date d'expiration du kit est indiquée sur la boîte, ainsi que sur tous les composants du kit contenus dans celle-ci. Tout tampon de lavage dilué non utilisé peut être conservé pendant 10 jours maximum entre 2 et 8 °C. Toutes les barrettes de microplaques inutilisées doivent être remises dans la pochette en aluminium avec le sachet de dessiccant en veillant à bien la refermée et en la conservant entre 2 et 8 °C.

12. SÉCURITÉ

Bien que les procédures détaillées soient simples et faciles à réaliser, elles nécessitent des installations de laboratoire dotées d'un personnel qualifié dûment formé à la manipulation d'organismes potentiellement pathogènes. Une formation de base est recommandée aux utilisateurs débutants. Elle est fournie par Solus Scientific Solutions Ltd.

- La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique corrosif. La peau ou les muqueuses qui entrent en contact avec la solution doivent être lavée(s) immédiatement avec de grandes quantités d'eau.

À titre indicatif, les précautions minimum suivantes doivent être prises :

- Des vêtements de protection doivent être portés, notamment une blouse de laboratoire, des lunettes de sécurité, un masque et des gants, le cas échéant.
- Ne pas pipeter en utilisant la bouche.
- Éviter tout contact avec la peau.
- Ne pas manger, boire ou appliquer de cosmétiques dans le laboratoire.
- Respecter toutes les réglementations locales, provinciales et/ou nationales applicables en matière d'élimination des déchets biologiques.

13. PRÉCAUTIONS POUR DES PERFORMANCES OPTIMALES

- Les réactifs sont fournis à une concentration de travail fixe. La sensibilité et la spécificité optimales seront réduites si les réactifs sont modifiés ou ne sont pas conservés dans les conditions recommandées.
- Ne pas mélanger différents lots de réactifs.
- Éviter la contamination microbienne des flacons de réactif ouverts.
- S'assurer qu'aucune contamination croisée ne se produise entre les puits.
- Il est essentiel au bon déroulement du test que l'anticorps conjugué aux enzymes ne puisse pas contaminer les autres réactifs et équipements.
- S'assurer que les composants du kit ne soient pas exposés à des températures supérieures à 40 °C.
- Les solutions contenant de l'azoture de sodium ne doivent pas être utilisées pour nettoyer les équipements, en particulier les dispositifs de lavage (l'enzyme peroxydase utilisée dans le kit est inactivée par l'azoture de sodium).
- Ne pas utiliser à des fins de diagnostic d'échantillons médicaux.



14. INFORMATIONS DES FDS

Des fiches de données de sécurité (FDS) relatives à ce test sont disponibles sur demande.

15. GARANTIE

La précision des résultats dépend de l'utilisation correcte du kit en suivant attentivement les consignes d'utilisation. Si le kit ne fonctionne pas conformément aux spécifications, veuillez contacter :

Solus Scientific Solutions Ltd

9 Mansfield Networkcentre

Millennium Business Park

Concorde Way

Mansfield

Nottinghamshire

NG19 7JZ

Tél. - +44 (0)1623 429701

Fax - +44 (0)1623 620977

E-mail : info@solusscientific.com

Informations sur les droits d'auteur

Le présent document, y compris toutes ses photographies et illustrations, contient des informations propriétaires protégées par le droit d'auteur. Aucune partie de cette publication ne peut être reproduite sous quelque forme que ce soit niu traduite dans une langue quelconque sans l'autorisation écrite préalable de PerkinElmer. ©2020 PerkinElmer, Inc. Tous droits réservés.

Marques commerciales

PerkinElmer est une marque déposée de PerkinElmer, Inc. Toutes les autres marques commerciales appartiennent à leurs propriétaires respectifs.

Résumé des modifications

Date de la modification	Numéro de publication :	Résumé des modifications
Jan2020	1	Nouvelle marque et combinaison de Solus Listeria ELISA – Supplément 24 – Numéro 4 – 11/18 (AOAC) et Solus Listeria ELISA – Supplément 25 – Numéro 3 – 11/18 (AOAC)

NOTE : Les modifications mineures (par exemple, formatage, grammaire, correction d'erreurs typographiques) ne sont pas incluses dans le résumé des modifications.

Pour plus d'informations, veuillez cons le site www.solusscientific.com

Fabriqué à :

Solus Scientific Solutions Ltd

9 Mansfield Networkcentre,
Millennium Business Park, Concorde Way,
Mansfield, Nottinghamshire
NG19 7JZ
Royaume-Uni
Tél. - +44 (0)1623 429701

PerkinElmer, Inc

940 Winter Street,
Waltham, MA 02451
États-Unis T : (800) 762-
4000 ou
(+1) 203-925-4602
www.perkinelmer.com



Pour voir lae liste complète de nos bureaux mondiaux, veuillez consulter nous consulter la pagewww.perkinelmer.com/ContactUs