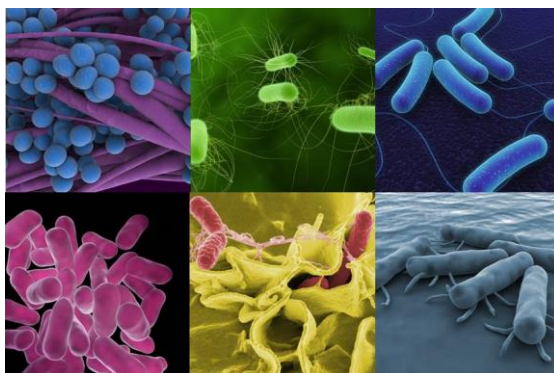


CONGEN

# SureFast® Listeria 3plex ONE

Art. No. F5217  
100 rxn

## User Manual



September 2025

 **Inhalt**

|       |                                                    |    |
|-------|----------------------------------------------------|----|
| 1     | Allgemeines .....                                  | 3  |
| 1.1   | Beschreibung .....                                 | 3  |
| 1.2   | Nachweisgrenze .....                               | 3  |
| 1.3   | Kit-Inhalt und Lagerung .....                      | 4  |
| 1.4   | Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien ..... | 4  |
| 1.5   | Vorsichtsmaßnahmen .....                           | 4  |
| 1.6   | Geräteeinstellungen .....                          | 5  |
| 1.7   | Detektionskanaleinstellungen .....                 | 5  |
| 2     | Qualitative Analyse .....                          | 6  |
| 2.1   | Protokoll .....                                    | 6  |
| 2.1.1 | Kulturelle Anreicherung .....                      | 6  |
| 2.1.2 | DNA-Präparation .....                              | 7  |
| 2.1.3 | Herstellen des Master-Mix .....                    | 8  |
| 2.1.4 | Herstellen des real-time PCR-Mix .....             | 8  |
| 2.2   | Interpretation der Ergebnisse .....                | 9  |
| 2.3   | Kulturelle Bestätigung .....                       | 9  |
| 3     | Validierung .....                                  | 10 |
| 4     | Grenzen der Methode .....                          | 12 |
| 5     | Weitere Informationen .....                        | 12 |
| 5.1   | Weitere Dokumente und Hilfsmittel .....            | 12 |
| 5.2   | Technischer Support .....                          | 12 |



## **Content**

|       |                                                     |    |
|-------|-----------------------------------------------------|----|
| 1     | General Information .....                           | 13 |
| 1.1   | Description .....                                   | 13 |
| 1.2   | Limit of Detection.....                             | 13 |
| 1.3   | Kit components and storage.....                     | 14 |
| 1.4   | Additionally required equipment and materials ..... | 14 |
| 1.5   | Precautions for users.....                          | 14 |
| 1.6   | Setup .....                                         | 15 |
| 1.7   | Detection channel Set-up.....                       | 15 |
| 2     | Qualitative Analysis .....                          | 16 |
| 2.1   | Protocol.....                                       | 16 |
| 2.1.1 | Cultural Enrichment .....                           | 16 |
| 2.1.2 | DNA-preparation.....                                | 17 |
| 2.1.3 | Preparation of the master-mix .....                 | 18 |
| 2.1.4 | Preparation of the real-time PCR-mix .....          | 18 |
| 2.2   | Interpretation of results.....                      | 19 |
| 2.3   | Cultural Confirmation.....                          | 19 |
| 3     | Validation .....                                    | 20 |
| 4     | Limitations of the method .....                     | 22 |
| 5     | Further Information.....                            | 22 |
| 5.1   | Product Information .....                           | 22 |
| 5.2   | Technical Support .....                             | 22 |

## 1 Allgemeines

### 1.1 Beschreibung

Das SureFast® Listeria 3plex ONE dient der einfachen und zeitsparenden Extraktion und Differenzierung von *Listeria* spp. (alle *sensu stricto* und ausgewählte *sensu lato* Stämme: *L. grayi*, *L. fleischmannii subsp. fleischmannii*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, und *L. weihenstephanensis*) und *Listeria monocytogenes* in verschiedenen Lebensmitteln. Zudem eignet es sich zur Anwendung in der Diagnostik von Laboratorien für Lebensmittelanalytik.

Im Hinblick auf die Lebensmittelsicherheit sind *sensu stricto* Listerien-Stämme das primäre Ziel. Diese Gruppe beinhaltet *L. monocytogenes* und Stämme, die genotypisch und phylogenetisch ähnlich zu *L. monocytogenes* sind. Im Gegensatz dazu sind *sensu lato* Listerien-Stämme phylogenetisch weiter von *L. monocytogenes* entfernt und weisen möglicherweise nicht die charakteristischen Merkmale auf, die der Gattung *Listeria* zugeschrieben werden. Es wird vorausgesetzt, dass alle *sensu stricto* Stämme nachgewiesen werden, während es bei *sensu lato* Stämmen zu gewissen Abweichungen im Nachweis kommen kann.

Die Methode setzt sich aus den folgenden Einzelschritten zusammen: 1) kulturelle Anreicherung, 2) DNA-Extraktion, 3) spezifische real-time PCR und 4) Interpretation der Ergebnisse. Schritt 2) DNA-Extraktion kann ebenfalls mit SureFast® PREP Bacteria (F1021) erfolgen.

SureFast® Listeria 3plex ONE wurde von MicroVal (Lizenz-Nr. 2023LR114) und AOAC (Lizenz-Nr. 062501) einzeln und im Zusammenhang mit einer Extraktion mittels SureFast® PREP Bacteria (F1021) validiert und zertifiziert.

Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle (IAC) ausgestattet. Bei Anwesenheit von inhibitorischen Substanzen in der DNA wird das Signal der Amplifikationskontrolle gestört oder die Amplifikation unterdrückt. Einige Beispiele für PCR-inhibitorische Substanzen sind Alkohole (z.B. Ethanol, Isopropanol), Tenside (z.B. CTAB, SDS, Triton X100) und Salze (z.B. Natriumchlorid). Des Weiteren können Gewürze, Kräuter, Algen, Kakao und andere Probenmatrizes inhibierend wirken.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens vier Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen **VIC/HEX**, **ROX** und **Cy5** detektieren können, verwendet werden.

Die externe technische Gerätevalidierung (AOAC, MicroVal) erfolgte am Bio-Rad CFX96 Deep Well Dx, Bio-Rad CFX96 Opus Deep Well und R-Biopharm RIDA®CYCLER.

Die interne technische Geräteverifizierung (nicht Teil der PTM Validierung) erfolgte zusätzlich am Bio-Rad CFX96 DX, Roche LightCycler® 480 Instrument II, Qiagen Rotor-Gene Q und Agilent AriaDx.

### 1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® Listeria 3plex ONE real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien pro Reaktion.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

Die SureFast® PCR Systeme sind sehr sensitiv. Demzufolge sind bereits sehr geringe Ziel-DNA Gehalte für eine Analyse ausreichend. Über die Bestimmung der Gesamt-DNA in der Probe werden keine Informationen über die Menge und die Qualität an Ziel-DNA erhalten.

## 1.3 Kit-Inhalt und Lagerung

| Kit Code | Reagenz          | Menge       | Deckelfarbe |
|----------|------------------|-------------|-------------|
| 1        | Reaction Mix     | 2 x 1050 µl | Gelb        |
| 2        | Taq Polymerase   | 1 x 80 µl   | Dunkelrot   |
| 3        | Positive Control | 1 x 200 µl  | Hellblau    |
| L        | Lysis Buffer     | 2 x 25 ml   | Klar        |

**Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -28 bis -16°C zu lagern. Die Taq Polymerase kann bei mehrfacher Verwendung am selben Tag bei +2 bis +8°C gelagert werden.**

Der Lysis Buffer soll bei -28 bis +8°C gelagert werden. Die Reagenzien können bis zum Erreichen des auf den Etiketten aufgedruckten Haltbarkeitsdatums verwendet werden. Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 20 Mal beeinträchtigt nicht die Performance.

**Hinweis: Die Taq Polymerase kann in gefrorenem oder nicht gefrorenem Zustand vorliegen. Dies hat keinen Einfluss auf die Qualität der Taq Polymerase oder die Performance der real-time PCR.**

## 1.4 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- Real-time PCR Gerät mit mindestens **vier** Detektionskanälen (510 nm, **580 nm, 610 nm und 660 nm**)
- SureFast® PREP Bacteria (Art. Nr. F1021), optional
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Inkubator (bis 37°C)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern, für Volumina von 0,7 µL – 1000 µL
- 2 ml Reaktionsgefäße mit Verschlussdeckel
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Microzentrifuge (bis 12.000 rpm) mit Rotor für Reaktionsgefäße
- Thermomixer/Heizblock (bis 99°C)
- Anreicherungsflüssigkeit (empfohlen: Half Fraser)
- Geeignete Geräte für die Probenzerkleinerung und -homogenisierung
- Waage und Spatel zum Einwiegen der Proben
- Autoklav
- Sicherheitswerkbank

## 1.5 Vorsichtsmaßnahmen

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Während des Umgangs mit Proben Einmalhandschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In den Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Lebensmittelproben und Anreicherungskulturen müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Aufgrund des deutlich erhöhten Infektions- und Sterberisikos wird Schwangeren und Menschen mit geschwächtem Immunsystem vom direkten Kontakt mit *Listeria monocytogenes* Probenmaterial ausdrücklich abgeraten.
- Inhalt gemäß der örtlichen, regionalen, nationalen und/oder internationalen Vorschriften bei einer Sammelstelle für gefährliche Abfälle oder Sondermüll entsorgen.

## 1.6 Geräteeinstellungen

|                                        | Blockcycler <sup>1</sup> &<br>R-Biopharm RIDA®CYCLER <sup>1</sup> | Rotorcycler <sup>2</sup> &<br>LightCycler® 480<br>Instrument II <sup>2</sup> |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Initial Denaturation (HOLD)            | 1 min, 95°C                                                       | 1 min, 95°C                                                                  |
| Cycles                                 | 45                                                                | 45                                                                           |
| Denaturation                           | 15 sec, 95°C                                                      | 10 sec, 95°C                                                                 |
| Annealing/Extension (CYCLE)            | 30 sec, 60°C                                                      | 15 sec, 60°C                                                                 |
| Temperature Transition Rate/ Ramp Rate | Maximum                                                           | Maximum                                                                      |

## 1.7 Detektionskanaleinstellungen

Für zusätzliche Informationen wird auf die jeweilige Cycler-Bedienungsanleitung verwiesen.

| Real-time PCR<br>Gerät                                              | Nachweis                          | Detektions-<br>kanal | Quencher | Bemerkung                                                                                                                                                                                                                              |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Agilent<br/>AriaDx/Mx<sup>1</sup></b>                            | IAC                               | VIC/HEX              | +        |                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                                                     | <i>Listeria</i> spp.              | ROX                  | +        |                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                                                     | <i>Listeria<br/>monocytogenes</i> | Cy5                  | +        |                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Qiagen Rotor-<br/>Gene Q<sup>2</sup></b>                         | IAC                               | yellow               | +        | Achtung: Nur 0,1 ml<br>Reaktionsgefäße verwenden.<br>Die Gain-Einstellungen<br>müssen für alle Kanäle auf 5<br>(Werkeinstellung) eingestellt<br>sein.                                                                                  |
|                                                                     | <i>Listeria</i> spp.              | orange               | +        |                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                                                     | <i>Listeria<br/>monocytogenes</i> | red                  | +        |                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Bio-Rad<br/>CFX96/Dx/Opus<br/>(incl. Deep Well) <sup>1</sup></b> | IAC                               | VIC/HEX              | +        | Baseline Einstellungen:<br>• Baseline subtracted<br>curve fit<br>• Apply fluorescence drift<br>correction                                                                                                                              |
|                                                                     | <i>Listeria</i> spp.              | ROX                  | +        |                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                                                     | <i>Listeria<br/>monocytogenes</i> | Cy5                  | +        |                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>R-Biopharm<br/>RIDA®CYCLER<sup>1</sup></b>                       | IAC                               | yellow               | +        | <b>Ignore cycles before</b> , wenn<br>zu Beginn des Laufs eine<br>signifikante Abweichung in<br>der Grundlinie vorliegt.<br>Siehe Seite 47 Bedienungs-<br>anleitung des Cyclers,<br>Abschnitt 12.1.2 Parameter<br>der Cycling-Analyse. |
|                                                                     | <i>Listeria</i> spp.              | orange               | +        |                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                                                     | <i>Listeria<br/>monocytogenes</i> | red                  | +        |                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Roche<br/>LightCycler® 480<br/>Instrument II<sup>2</sup></b>     | IAC                               | 533-580              | +        | Das SureCC Color<br>Compensation Kit I (Art. Nr.<br>F4009) wird benötigt.<br>In ROX Kanal mit Fit Point<br>auswerten.                                                                                                                  |
|                                                                     | <i>Listeria</i> spp.              | 533-610              | +        |                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                                                     | <i>Listeria<br/>monocytogenes</i> | 618-660              | +        |                                                                                                                                                                                                                                        |

## 2 Qualitative Analyse

### 2.1 Protokoll

#### 2.1.1 Kulturelle Anreicherung

Für die Probenvorbereitung von Lebens- und Futtermitteln gelten die Vorgaben von ISO 6887.

Die Probenahme bei Oberflächen soll gemäß DIN EN ISO 18593:2018 - Probenahme Techniken von Oberflächen erfolgen.

Zur Vorbereitung der Anreicherung werden 25 g - bzw. 25 ml Probemenge in 225 ml einer Anreicherungsflüssigkeit (Half Fraser, Raumtemperatur) eingewogen, für 30 Sekunden homogenisiert (z.B. mit einem Stomacher Laborhomogenisator) und anschließend wie untenstehend inkubiert.

Weicht die Probenmenge von 25 g ab, sollte das Volumen des Mediums in einem 1:10-Verhältnis gewählt werden.

#### Anreicherungsbedingungen

| Probenart                                      | Anreicherung                                                                                                                                                                                                                                                                 | Inkubation                                                                     |                                                                                |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
|                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                              | SureFast® Listeria 3plex ONE Lysis                                             | SureFast® PREP Bacteria                                                        |
| Lebens- und Futtermittel, außer Milchprodukte  | 25g Probe + 225 ml Half Fraser Broth                                                                                                                                                                                                                                         | 37°C ± 1°C<br>für 26-28 h                                                      | 37°C ± 1°C<br>für 18-20 h                                                      |
| Umgebungsproben                                | <ul style="list-style-type: none"><li>• 25 ml Prozesswasser + 225 ml Anreicherungsflüssigkeit (Half Fraser)</li><li>• 1 steriler Abstrichtupfer* + 9 ml Anreicherungsflüssigkeit (Half Fraser)</li><li>• 1 Schwamm* + 90 ml Anreicherungsflüssigkeit (Half Fraser)</li></ul> | 37°C ± 1°C<br>für 26-28 h                                                      | 37°C ± 1°C<br>für 18-20 h                                                      |
| Hitzebehandelter Käse, Rohmilch, Milchprodukte | 25g Probe + 225 ml Half Fraser Broth<br><br>Zusätzliche Inkubation von 0,1 ml der Primäranreicherung in 10 ml in Fraser Broth                                                                                                                                                | 37°C ± 1°C<br>für 26-28 h<br>+<br>37°C ± 1°C<br>for 22- 26 h<br>(Fraser Broth) | 37°C ± 1°C<br>für 18-20 h<br>+<br>37°C ± 1°C<br>for 22- 26 h<br>(Fraser Broth) |

#### Hinweis:

\*Abstrichtupfer beinhalten 1 ml Hi-Cap Neutralisierungspuffer, Schwämme beinhalten 10 ml Hi-Cap Neutralisierungspuffer

Um das Wachstumspotenzial des Bakteriums besser beurteilen zu können, wird empfohlen, die Proben zu Beginn und am Ende der kulturellen Anreicherung zu analysieren (Wachstum ab einer Cp-Wert Differenz von > 3).

## 2.1.2 DNA-Präparation

Die DNA-Präparation kann mit den in diesem Kit enthaltenen Materialien gemäß dem unten stehen Protokoll oder mit dem SureFast® PREP Bacteria (F1021) Kit gemäß Kit Anweisungen durchgeführt werden.

Wenn die Anreicherungskultur geschüttelt oder durchmischt wurde, soll diese für 5 bis 10 min sedimentieren.

500 µL Lysis Buffer (**Code L**) in ein 2,0 ml Tube (nicht im Kit enthalten) vorlegen.

Dann aus dem oberen Drittel der Anreicherungskultur 200 µl entnehmen und zu den 500 µl Lysis Buffer (**Code L**) geben.

Im Anschluss das Tube vortexen.

Die Inkubation erfolgt bei 95°C für 10 min in einem Heizblock ohne Schütteln.

Das Tube aus dem Heizblock entnehmen und 1 min bei Raumtemperatur stehen lassen.

**Achtung: Bei der weiteren Verwendung des Lysates muss beachtet werden, dass das Sediment nicht aufgewirbelt wird und keine Partikel in den PCR Ansatz pipettiert werden. Falls die Partikel nicht sedimentieren, sollte das Lysat für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert werden. Im Anschluss 100 µl des Überstandes in ein neues Tube (nicht im Kit enthalten) überführen.**

Das Lysat kann direkt in der PCR eingesetzt werden. Wird das Lysat nicht direkt in der PCR eingesetzt, kann es bis zu 4 Stunden bei 2-8°C gelagert werden. Ist eine längere Lagerung vorgesehen, werden 100 µL des Überstandes in ein neues Tube (nicht im Kit enthalten) überführt und bei -20°C gelagert.

## 2.1.3 Herstellen des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen.

Folgende Kontrollen werden benötigt: Negativkontrolle, Extraktionskontrolle und Positive Control.

Bei Analysen von Anreicherungen sind weitere Kontrollen erforderlich: Nullkontrolle und Mediumkontrolle.

Der Reaction Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion.

**Benötigte Reaktionen für den qualitativen *Listeria* spp. und *Listeria monocytogenes* – Nachweis:**  
(z.B. bei Extraktion von nicht angereicherten Proben, wie gepickten Kolonien oder Abtrichupfern - nicht Teil der PTM Validierung\*):

3 Reaktionen für Kontrollen\*\* (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positive Control)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

**Benötigte Reaktionen für den qualitativen *Listeria* spp. und *Listeria monocytogenes* - Nachweis in Anreicherungen:**

5 Reaktionen für Kontrollen\*\* (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positive Control,  
1x Nullkontrolle, 1x Mediumkontrolle)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Des Weiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, mischen und zentrifugieren.

**Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:**

| Komponenten des Master-Mix | Menge pro Reaktion | 10 Reaktionen (zusätzlich 10 %) |
|----------------------------|--------------------|---------------------------------|
| Reaction Mix               | 19,3 µl            | 212,3 µl                        |
| Taq Polymerase             | 0,7 µl             | 7,7 µl                          |
| <b>Gesamtvolumen</b>       | <b>20 µl</b>       | <b>220 µl</b>                   |

**Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.**

\*Nach DNA-Extraktion mittels SureFast® PREP Bacteria (F1021), entsprechend der Kit Anweisungen

### \*\*Beschreibung der einzelnen Kontrollen

- Negativkontrolle: besteht nur aus dem Master-Mix
- Extraktionskontrolle: die Extraktion wird ohne Probe durchgeführt – nur Lysis Buffer
- Positive Control: Master-Mix und die im Kit beigefügte Positive Control
- Nullkontrolle: Master-Mix und Probe vor Anreicherung (eine Analyse wird empfohlen, um falsch-positive Ergebnisse bei Proben mit späten Cps auszuschließen)
- Mediumkontrolle: nur Medium – keine Probe (eine Analyse wird empfohlen, um eine Kontamination auszuschließen)

## 2.1.4 Herstellen des real-time PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß.
- Verschließen der Negativkontrolle.
- Pipettieren von 5 µl der Proben-DNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße und verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl Positive Control in die vorgesehenen Reaktionsgefäße und verschließen der Gefäße.
- Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
- Reaktionsgefäße in das real-time PCR Gerät einsetzen und entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

## 2.2 Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analyse Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Kontrollreaktionen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Im ROX-Kanal wird der Parameter *Listeria* spp. und im Cy5-Kanal wird der Parameter *Listeria monocytogenes* detektiert. Im VIC/HEX-Kanal wird eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt. Hohe Konzentrationen des Amplikons können zu einem schwachen oder fehlenden Signal der IAC führen.

Ein Cp-Wert für die IAC ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positive Control zu erhalten.

Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt und die zugehörige interne Kontrolle (VIC/HEX-Kanal) **positiv** ist.

Sollte die Proben-DNA im VIC/HEX-Kanal keine Amplifikation oder keinen sigmoidalen Kurvenverlauf zeigen, weist dies auf das mögliche Vorhandensein von PCR Inhibitoren in der Probe hin. In diesem Fall muss die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe verbessert werden. Es wird empfohlen das Lysat vor der PCR abzuzentrifugieren oder den Extraktionsprozess zu wiederholen. Alternativ kann die DNA verdünnt (Empfehlung 1:2 in PCR-Wasser) und wiederholt auf Inhibition getestet werden. Beachten Sie bitte, dass sich die Nachweisgrenze für die Probe im spezifischen Nachweissystem für *Listeria* spp. oder *Listeria monocytogenes* mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

| Ergebnis im jeweiligen Kanal      |                                                      |                        | Interpretation                                                    |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| ROX-Kanal<br><i>Listeria</i> spp. | Cy5-Kanal<br><i>Listeria</i><br><i>monocytogenes</i> | VIC/HEX-Kanal<br>IAC   |                                                                   |
| <b>positiv</b>                    | negativ                                              | <b>positiv/negativ</b> | <i>Listeria</i> spp. - DNA nachweisbar                            |
| <b>positiv</b>                    | <b>positiv</b>                                       | <b>positiv/negativ</b> | <i>Listeria monocytogenes</i> - DNA nachweisbar                   |
| negativ                           | <b>positiv</b>                                       | <b>positiv</b>         | <i>Listeria monocytogenes</i> - DNA nicht eindeutig nachweisbar * |
| negativ                           | <b>positiv</b>                                       | <b>negativ</b>         | nicht auswertbar                                                  |
| negativ                           | negativ                                              | <b>positiv</b>         | Negativ, <i>Listeria</i> - DNA nicht nachweisbar                  |
| negativ                           | negativ                                              | negativ                | nicht auswertbar                                                  |

\* *Listeria monocytogenes* -DNA ist nicht eindeutig nachweisbar und das Ergebnis sollte wiederholt werden. Das kann bei Konzentrationen der Zielsequenz an der Nachweisgrenze auftreten.

## 2.3 Kulturelle Bestätigung

Positive PCR Ergebnisse sollten mittels kultureller Nachweismethoden gemäß ISO 11290-1:2017 bestätigt werden.

3 Validierung

MicroVal Zertifizierung (Lizenz-Nr. 2023LR114)

Die externe MicroVal Validierung (Lizenz-Nr. 2023LR114) von SureFast® Listeria 3plex ONE erfolgte für ein breites Spektrum von Lebensmitteln und Umweltproben nach 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].

In der Matrixstudie wurde die Referenzmethode ISO 11290-1:2017 [Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp.] angewendet.

Übersicht der getesteten Matrices im Rahmen der MicroVal Zertifizierung (2023LR114)

MicroVal Nachweis von *Listeria* spp und / oder *Listeria monocytogenes*.

| Kategorie                                                   | Anreicherung                                                                                                             | Proben-<br>größe                             | SureFast® Listeria<br>3plex ONE Lyse                                                  | SureFast® PREP<br>Bacteria                                                            |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Hitzebehandelte und<br>rohe Milch und<br>Milcherzeugnisse   | 1:10 in<br>Half Fraser Broth.<br>Zusätzliche Inkubation<br>von 0,1 ml der<br>Primäranreicherung in<br>10 ml Fraser Broth | 25 g                                         | 37 ± 1°C<br>26-28 h (Half Fraser<br>Broth) +<br>37 ± 1°C<br>22-26 h<br>(Fraser Broth) | 37 ± 1°C<br>18-20 h (Half Fraser<br>Broth) +<br>37 ± 1°C<br>22-26 h<br>(Fraser Broth) |
| Rohe und verzehrfertige<br>Fleischerzeugnisse               | 1:10 in<br>Half Fraser Broth<br><br>(25g Probe + 225 ml<br>Half Fraser Broth)                                            | 25 g                                         | 37 ± 1°C<br>26-28 h                                                                   | 37 ± 1°C<br>18-20 h                                                                   |
| Verzehrfertige<br>Geflügelerzeugnisse                       |                                                                                                                          |                                              |                                                                                       |                                                                                       |
| Verzehrfertige und<br>aufzuwärmende<br>Fischereierzeugnisse |                                                                                                                          |                                              |                                                                                       |                                                                                       |
| Frisches Obst und<br>Gemüse                                 |                                                                                                                          |                                              |                                                                                       |                                                                                       |
| Mehrkomponentige<br>Lebensmittel oder<br>Mahlzeikomponenten |                                                                                                                          |                                              |                                                                                       |                                                                                       |
| Umweltproben                                                | 1:10 in<br>Half Fraser Broth<br>(1 steriler<br>Abstrichtupfer +<br>9 ml Half Fraser<br>1 Schwamm +<br>90 ml Half Fraser) | Abstrich-<br>tupfer,<br>Schwamm<br>oder 25 g |                                                                                       |                                                                                       |

Die externe Validierung erfolgte auf den Thermocyclern Bio-Rad CFX96 Deep Well DX (Maestro software Version 2.0), Bio-Rad CFX96 Opus Deep Well (Maestro software Version 2.0) und R-Biopharm RIDA®CYCLER (RIDA®CYCLER Software Version 1.2.1).

## AOAC PTM (Lizenz-Nr. 062501)

Die externe Validierung von SureFast® Listeria 3plex ONE erfolgte nach AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces und der 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].

In der Matrixstudie wurde die Referenzmethode ISO 11290-1:2017 [Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp.] angewendet.

## Übersicht der getesteten Matrices im Rahmen der AOAC Zertifizierung (062501)

AOAC Nachweis von *Listeria* spp und / oder *Listeria monocytogenes*.

| Matrix                                    | Anreicherung                                                                                                                | SureFast® Listeria 3plex ONE Lysis                                                        | SureFast® PREP Bacteria                                                                   | <i>L. spp.</i> | <i>L. mono.</i> |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------|
| Rohmilch                                  | 1:10 in<br>Half Fraser Broth.<br>Zusätzliche<br>Inkubation von<br>0,1 ml der<br>Primäranreicherung<br>in 10 ml Fraser Broth | 37 ± 1°C<br>26-28 h (Half<br>Fraser Broth)<br>+<br>37 ± 1°C<br>22- 26 H<br>(Fraser Broth) | 37 ± 1°C<br>18-20 h (Half<br>Fraser Broth)<br>+<br>37 ± 1°C<br>22- 26 H<br>(Fraser Broth) | X              | X               |
| Brie                                      |                                                                                                                             |                                                                                           |                                                                                           | X              | X               |
| Gorgonzola                                |                                                                                                                             |                                                                                           |                                                                                           | X              |                 |
| Pasteurisierte Milch                      |                                                                                                                             |                                                                                           |                                                                                           | X              | X               |
| Gouda                                     |                                                                                                                             |                                                                                           |                                                                                           | X              | X               |
| Eiskrem                                   |                                                                                                                             |                                                                                           |                                                                                           | X              |                 |
| Flüssiges Vollei                          | (25 g / 25 ml Probe<br>+<br>225 ml Half Fraser<br>Broth)                                                                    | 37 ± 1°C<br>26-28 h                                                                       | 37 ± 1°C<br>18-20 h                                                                       | X              | X               |
| Frankfurter Würstchen                     |                                                                                                                             |                                                                                           |                                                                                           | X              | X               |
| Feinkostschinken                          |                                                                                                                             |                                                                                           |                                                                                           | X              | X               |
| Geräucherter<br>Putenaufschnitt           |                                                                                                                             |                                                                                           |                                                                                           | X              | X               |
| Räucherlachs                              |                                                                                                                             |                                                                                           |                                                                                           | X              |                 |
| Gefrorene Garnelen                        |                                                                                                                             |                                                                                           |                                                                                           | X              | X               |
| Tütensalat                                |                                                                                                                             |                                                                                           |                                                                                           | X              | X               |
| Veganes Sojahack                          |                                                                                                                             |                                                                                           |                                                                                           | X              | X               |
| Enoki in der Dose                         |                                                                                                                             |                                                                                           |                                                                                           | X              | X               |
| Guacamole                                 |                                                                                                                             |                                                                                           |                                                                                           | X              |                 |
| Prozesswasser                             |                                                                                                                             |                                                                                           |                                                                                           | X              |                 |
| Umweltproben aus<br>Edelstahl (Abstriche) | 1:10 in<br>Half Fraser Broth                                                                                                |                                                                                           |                                                                                           | X              | X               |
| Umweltproben aus<br>Edelstahl (Schwämme)  | (1 steriler<br>Abstrichtupfer +<br>9 ml Half Fraser<br>1 Schwamm +<br>90 ml Half Fraser)                                    |                                                                                           |                                                                                           | X              | X               |

Die externe Validierung erfolgte auf den Thermocyclern Bio-Rad CFX96 Deep Well DX (Maestro software Version 2.0), Bio-Rad CFX96 Opus Deep Well (Maestro software Version 2.0) und R-Biopharm RIDA®CYCLER (RIDA®CYCLER Software Version 1.2.1).

## 4 Grenzen der Methode

- Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
- Äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, können zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen.
- Bei Proben an der Nachweisgrenze kann es vorkommen, dass im *Listeria monocytogenes* Kanal ein positives Signal detektiert wird und im *Listeria* spp Kanal nicht. Die Analyse sollte wiederholt werden.
- Folgende *Listeria* spp sensu lato Stämme, welche vorrangig als Umweltbakterien bekannt sind und nicht als Krankheitserreger, werden nicht detektiert: *Listeria grandensis*, *Listeria floridensis*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria cornellensis*, *Listeria aquatica*, and *Listeria portnoyi*.
- Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Es deutet darauf hin, dass die Ziel DNA (*Listeria*-DNA) vorhanden ist.
- Bei stark prozessierten Proben kann es zu einer Verschiebung der Nachweisgrenze kommen. Faktoren wie hohe Drücke, mechanische Belastungen, chemische Behandlung, extreme Temperaturen und/oder extreme pH-Werte während des Verarbeitungsprozesses – wie z.B. bei der Konservenherstellung – können Nukleinsäuren beschädigen oder abbauen. Das bedeutet, dass die Empfindlichkeit des Testkits verringert sein kann und möglicherweise nicht alle ursprünglichen Bestandteile erfasst werden.

## 5 Weitere Informationen

### 5.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: [www.congen.de/download](http://www.congen.de/download))
- Produktbegleitende Unterlagen (Download: [www.congen.de/eifu/](http://www.congen.de/eifu/))
- AOAC und MicroVal Zertifikate (Download: [www.congen.de/qualitaetsstandards/](http://www.congen.de/qualitaetsstandards/))
- Validierungsdaten auf Anfrage

### 5.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte per E-Mail an [info@congen.de](mailto:info@congen.de).

## 1 General Information

### 1.1 Description

The SureFast® Listeria 3plex ONE can be applied for the fast and simple isolation and differentiation of *Listeria* species (all *sensu stricto* and selected *sensu lato* strains: *L. grayi*, *L. fleischmannii* subsp. *fleischmannii*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, and *L. weihenstephanensis*) and *Listeria monocytogenes* in different types of food and is intended to be used by all kinds of food testing laboratories.

*Listeria sensu stricto* species are the primary targets for food safety. This group includes *L. monocytogenes* and the species that are genotypically and phenotypically similar to *L. monocytogenes*. Conversely, the *Listeria sensu lato* are more distantly related to *L. monocytogenes*; many lack the hallmark characteristics attributed to the *Listeria* genus. It is expected that all *Listeria sensu stricto* are detected, while some variation in detection may occur with the *Listeria sensu lato* species.

The method consists of the following four steps: 1) cultural enrichment, 2) DNA preparation, 3) specific real-time PCR detection and 4) interpretation of results. Step 2) DNA preparation can also be performed using SureFast® PREP Bacteria (F1021).

SureFast® Listeria 3plex ONE has been validated and certified both individually and in the context of an extraction using SureFast® PREP Bacteria (F1021) by MicroVal (License-No. 2023LR114) and AOAC (License-No. 062501).

Each reaction contains an internal amplification control (IAC). If the DNA contains PCR-inhibiting substances, the signal of the amplification control can be affected, or the amplification will be suppressed. Examples for PCR inhibiting substances are alcohols (e.g. ethanol, isopropanol), surfactants (e.g. CTAB, SDS, Triton X100) and salts (e.g. sodium chloride). In addition, spices, herbs, algae, cocoa and further sample matrices might have PCR inhibiting effects.

The real-time PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments, equipped for detection of four fluorescence emissions at the channels **VIC/HEX**, **ROX** and **Cy5** at the same time.

The external technical validations of instruments (AOAC, MicroVal) were performed on Bio-Rad CFX96 Deep Well DX, Bio-Rad CFX96 Opus Deep Well and R-Biopharm RIDA®CYCLER.

The internal technical verification of instruments (not part of the PTM validation) was additionally performed on Bio-Rad CFX96 DX, Roche LightCycler® 480 Instrument II, Qiagen Rotor-Gene Q and Agilent AriaDx.

### 1.2 Limit of Detection

The SureFast® Listeria 3plex ONE real-time PCR has a limit of detection of  $\leq 5$  DNA copies per reaction.

The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

The SureFast® PCR systems are very sensitive and therefore even a small amount of target DNA is sufficient for a successful analysis. The concentration of total DNA in the sample does not allow a conclusion on the quantity and quality of the target DNA.

**1.3 Kit components and storage**

| Kit Code | Reagent          | Amount      | Lid Color  |
|----------|------------------|-------------|------------|
| 1        | Reaction Mix     | 2 x 1050 µl | Yellow     |
| 2        | Taq Polymerase   | 1 x 80 µl   | Dark Red   |
| 3        | Positive Control | 1 x 200 µl  | Light Blue |
| L        | Lysis Buffer     | 2 x 25 ml   | Clear      |

**Store all reagents at -28 to -16°C and protected from light. The Taq Polymerase can be stored at +2 to +8°C for multiple uses on the same day.**

The Lysis Buffer should be stored at -28 to +8°C. Reagents should be used until the expiration date indicated on the label. Reagents can sustain up to 20 freeze/thaw cycles without influencing the assay performance.

**Note: The Taq Polymerase may be in a frozen or unfrozen state. This does not affect the quality of the Taq Polymerase or the performance of the real-time PCR.**

**1.4 Additionally required equipment and materials**

- real-time PCR instrument with **four** detection channels (510 nm, **580 nm, 610 nm and 660nm**)
- SureFast® PREP Bacteria (Art. No. F1021), optional
- real-time PCR consumables (plates, tubes, foils, caps)
- incubator (up to 37°C)
- pipettes with filter tips, for volumes from 0.7 µL – 1000 µL
- microcentrifuge tubes - 2 ml tubes with lock cap
- powder-free disposable gloves
- vortex mixer
- microcentrifuge (up to 12,000 rpm) with a rotor for the reaction tubes
- thermomixer/heating block (up 99°C)
- enrichment broth (i.e. Half Fraser)
- suitable equipment for sample comminution and homogenization
- balance and spatula for weighing the samples
- autoclave
- biological safety cabinet

**1.5 Precautions for users**

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- This test must only be performed by laboratory personnel trained in molecular biology methods.
- Strictly follow the working instructions.
- When handling samples, wear disposable gloves. After finishing the test, wash your hands.
- Do not smoke, eat or drink in areas where samples or test reagents are being used.
- Food samples and enrichment cultures must be treated as potentially infectious, as well as all reagents and materials being exposed to the samples and must be handled according to the national safety regulations.
- Do not use the kit after the expiration date.
- Due to the significantly increased risk of infection and mortality, direct contact with *L. monocytogenes* samples is strongly discouraged for pregnant women and people with weakened immune system.
- Dispose of contents to hazardous or special waste collection point, in accordance with local, regional, national and/or international regulations.

## 1.6 Setup

|                                        | Blockcycler <sup>1</sup> &<br>R-Biopharm RIDA®CYCLER <sup>1</sup> | Rotorcycler <sup>2</sup> &<br>LightCycler® 480<br>Instrument II <sup>2</sup> |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Initial Denaturation (HOLD)            | 1 min, 95°C                                                       | 1 min, 95°C                                                                  |
| Cycles                                 | 45                                                                | 45                                                                           |
| Denaturation                           | 15 sec, 95°C                                                      | 10 sec, 95°C                                                                 |
| Annealing/Extension (CYCLE)            | 30 sec, 60°C                                                      | 15 sec, 60°C                                                                 |
| Temperature Transition Rate/ Ramp Rate | Maximum                                                           | Maximum                                                                      |

## 1.7 Detection channel Set-up

For additional details see cycler operating instructions for real-time PCR device

| Real-time PCR device                                        | Detection                     | Detection channel | Quencher | Note                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Agilent AriaDx/Mx</b> <sup>1</sup>                       | IAC                           | VIC/HEX           | +        |                                                                                                                                                                                                                |
|                                                             | <i>Listeria</i> spp.          | ROX               | +        |                                                                                                                                                                                                                |
|                                                             | <i>Listeria monocytogenes</i> | Cy5               | +        |                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Qiagen Rotor-Gene Q</b> <sup>2</sup>                     | IAC                           | yellow            | +        | <b>Note:</b> Please use only 0.1 ml reaction tubes. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.                                                                                     |
|                                                             | <i>Listeria</i> spp.          | orange            | +        |                                                                                                                                                                                                                |
|                                                             | <i>Listeria monocytogenes</i> | red               | +        |                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Bio-Rad CFX96/Dx/Opus (incl. Deep Well)</b> <sup>1</sup> | IAC                           | VIC/HEX           | +        | Baseline Settings:<br><ul style="list-style-type: none"> <li>Baseline subtracted curve fit</li> <li>Apply fluorescence drift correction</li> </ul>                                                             |
|                                                             | <i>Listeria</i> spp.          | ROX               | +        |                                                                                                                                                                                                                |
|                                                             | <i>Listeria monocytogenes</i> | Cy5               | +        |                                                                                                                                                                                                                |
| <b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b> <sup>1</sup>                  | IAC                           | yellow            | +        | <b>Ignore cycles before</b> , if there is a significant deviation in the baseline at the start of the run. Please see page 45 of the cycler operating instructions, section 12.1.2 Cycling analysis parameter. |
|                                                             | <i>Listeria</i> spp.          | orange            | +        |                                                                                                                                                                                                                |
|                                                             | <i>Listeria monocytogenes</i> | red               | +        |                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Roche LightCycler® 480 Instrument II</b> <sup>2</sup>    | IAC                           | 533-580           | +        | The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required. Evaluate the ROX channel with Fit Point.                                                                                                     |
|                                                             | <i>Listeria</i> spp.          | 533-610           | +        |                                                                                                                                                                                                                |
|                                                             | <i>Listeria monocytogenes</i> | 618-660           | +        |                                                                                                                                                                                                                |

## 2 Qualitative Analysis

### 2.1 Protocol

#### 2.1.1 Cultural Enrichment

Sample preparation of food and feed matrices should apply to ISO 6887. Sampling for surface samples should be according to DIN EN ISO 18593:2018 - Microbiology of the food chain - Horizontal methods for surface sampling.

For enrichment, a volume of 25 g or 25 ml sample material is mixed with 225 ml of enrichment broth (Half Fraser, room temperature), homogenized for 30 seconds (e.g. in a Stomacher homogenizer) and incubated as indicated below.

If test portions deviate from 25 g, the enrichment broth volume should be chosen in a 1:10 ratio.

#### Enrichment conditions

| Sample type                                         | Enrichment                                                                                                                                                                                | Incubation                                                                                           |                                                                                                      |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                     |                                                                                                                                                                                           | SureFast® Listeria 3plex ONE Lysis                                                                   | SureFast® PREP Bacteria                                                                              |
| Food and feed matrices, except dairy                | 25g sample + 225 ml Half Fraser Broth                                                                                                                                                     | 37°C ± 1°C<br>for 26-28 h                                                                            | 37°C ± 1°C<br>for 18-20 h                                                                            |
| Environmental samples                               | <ul style="list-style-type: none"><li>• 25ml Process Rinse Water + 225ml Half Fraser Broth</li><li>• swab* + 9 ml Half Fraser Broth</li><li>• sponge* + 90 ml Half Fraser Broth</li></ul> | 37°C ± 1°C<br>for 26-28 h                                                                            | 37°C ± 1°C<br>for 18-20 h                                                                            |
| Heat processed cheeses, raw milk and dairy products | 25g sample + 225 ml Half Fraser Broth<br><br>Following incubation, transfer of 0.1 ml of primary enrichment to 10 mL of Fraser Broth and further incubate                                 | 37°C ± 1°C<br>for 26-28 h<br>(Half Fraser Broth)<br>+<br>37°C ± 1°C<br>for 22-26 h<br>(Fraser Broth) | 37°C ± 1°C<br>for 18-20 h<br>(Half Fraser Broth)<br>+<br>37°C ± 1°C<br>for 22-26 h<br>(Fraser Broth) |

#### Note:

\*Swabs containing 1 ml Hi-Cap neutralizing broth; Sponges containing 10 mL Hi-Cap neutralizing broth.

To assess the process of bacterial growth, it is recommended to compare samples before enrichment (zero control) and at the end of the culturing (bacterial growth at Cp difference > 3 to zero control).

## 2.1.2 DNA-preparation

The DNA preparation can be conducted with the materials included in this kit following the protocol below or with the SureFast® PREP Bacteria (F1021) Kit according to the kit instructions.

If the enrichment culture has been shaken or stirred, let the solids settle out for 5 to 10 min.

Pipette 500 µl of Lysis Buffer (**Code L**) into a 2.0 ml reaction tube (not provided with the kit).

Afterwards, transfer 200 µl of the upper third from the enrichment culture to the Lysis Buffer (**Code L**).

Vortex the reaction tube briefly.

Incubate in a heating block for 10 minutes at 95°C without shaking.

Remove the reaction tube from the heating block and leave it at room temperature for 1 minute.

**Note: It is necessary to ensure that the sediment is not stirred up and no particles are pipetted in the PCR reaction. If the particles do not sediment, the lysate should be centrifuged for 1 minute at 12,000 rpm. Afterwards transfer 100 µl of the supernatant into a new reaction tube (not provided with the kit).**

The lysate is ready-to-use for PCR. If it is not used immediately, it can be stored at 2-8°C for up to 4h. If it is intended for a longer storage, transfer 100 µl of the lysate in a new tube (not provided with the kit) and store at -20°C

**2.1.3 Preparation of the master-mix**

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions) for the specific PCR assay.

Required control reactions for the specific PCR assay: negative control, extraction control, and Positive Control.

For the analysis of enrichments, additional controls are needed: zero control and medium control.

The reaction mix contains an internal amplification control (Inhibition Control) per reaction.

**Reactions needed for the qualitative *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* detection:** (e.g. when using samples without enrichment a.o. picked colonies or swabs - not part of the PTM validation\*):

3 reactions for controls\*\* (1x negative control, 1x extraction control, 1x Positive Control)

For each sample: at least 1 reaction for each sample DNA

**Reactions needed for the qualitative *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* detection in enrichments:**

5 reactions for controls\*\* (1x negative control, 1x extraction control, 1x Positive Control, 1x zero control, 1x medium control)

For each sample: at least 1 reaction for each sample DNA

It is also recommended to prepare the master-mix with 10% additional volume in order to compensate reagent loss. Allow the reagents to thaw, mix and centrifuge before opening and use.

**Example for the calculation and preparation of 10 reactions:**

| Components of the master-mix | Amount per reaction | 10 reactions (with 10% excess) |
|------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| Reaction Mix                 | 19.3 µl             | 212.3 µl                       |
| Taq Polymerase               | 0.7 µl              | 7.7 µl                         |
| <b>Total volume</b>          | <b>20 µl</b>        | <b>220 µl</b>                  |

**Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.**

\* After DNA extraction with SureFast® PREP Bacteria (F1021), according to kit instructions

**\*\* Description of the controls**

- Negative control: only master-mix
- Extraction control: the extraction is performed without the sample – use only Lysis Buffer
- Positive Control: master-mix and within the kit's provided Positive Control
- Zero control: master-mix and sample prior incubate enrichment (analysis is recommended to rule out false positives in samples with late Cps)
- Medium control: only medium - no sample (analysis recommended to rule out contamination)

**2.1.4 Preparation of the real-time PCR-mix**

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells.
- Close the negative control.
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes/wells and close them.
- Pipette 5 µl of Positive Control into the designated tubes/wells and close them.
- Centrifuge all tubes/plates (depending on the thermocycler used) briefly at low speed.
- Place tubes/plates into the real-time PCR instrument and start the run according to the setup.

## 2.2 Interpretation of results

The evaluation shall be made according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer.

The control reactions must show the correct results.

*Listeria* spp. is detected in the ROX-channel and *Listeria monocytogenes* DNA is detected in the Cy5-channel. In the VIC/HEX-channel the internal amplification control (IAC) is detected.

A sample is stated **positive** for the respective parameter, if the sample DNA shows amplification in the respective channel. High amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the IAC.

A Cp value for the IAC is not needed to obtain a positive result of the Positive Control.

A sample is stated **negative** for the respective parameter, if the sample DNA shows no amplification in the respective channel and if the internal control (VIC/HEX-channel) of the sample is **positive**.

If the sample DNA shows no amplification or sigmoidal amplification curve in the VIC/HEX channel, this indicates that inhibitors are present in the sample DNA that inhibit the PCR. Under these circumstances DNA isolation and purification of the sample need to be improved. It is recommended to centrifuge the lysate before the PCR or to repeat the extraction process. Alternatively, the DNA can be diluted (recommendation 1:2 in PCR-water) and analysed again for inhibition. Please note that the dilution factor also affects the detection limit of the specific *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* PCR assay.

| Result in the respective channel    |                                                        |                          | Interpretation                                                |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------------|
| ROX channel<br><i>Listeria</i> spp. | Cy5 channel<br><i>Listeria</i><br><i>monocytogenes</i> | VIC/HEX channel<br>IAC   |                                                               |
| <b>positive</b>                     | negative                                               | <b>positive/negative</b> | <i>Listeria</i> spp. DNA detected                             |
| <b>positive</b>                     | <b>positive</b>                                        | <b>positive/negative</b> | <i>Listeria monocytogenes</i><br>DNA detected                 |
| negative                            | <b>positive</b>                                        | <b>positive</b>          | questionable* for <i>Listeria</i><br><i>monocytogenes</i> DNA |
| negative                            | <b>positive</b>                                        | <b>negative</b>          | invalid                                                       |
| negative                            | negative                                               | <b>positive</b>          | negative, <i>Listeria</i> DNA<br>is not detected              |
| negative                            | negative                                               | negative                 | invalid                                                       |

\*Result for *Listeria monocytogenes* is questionable and analysis for this sample shall be repeated. This can appear with low levels of target at the limit of detection.

## 2.3 Cultural Confirmation

Positive PCR results should be confirmed by cultural detection methods according to the ISO 11290-1:2017 reference standard.

### 3 Validation

#### MicroVal certification (License no. 2023LR114)

SureFast® Listeria 3plex ONE was MicroVal validated (License No. 2023LR114) for a broad range of food and environmental samples per 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].

The reference method for the matrix study was ISO 11290-1:2017 (Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp.).

#### Summary of Validation Claims for MicroVal certification 2023LR114

MicroVal claim for the detection of *Listeria* spp. and / or *Listeria monocytogenes*

| Category                                                       | Enrichment                                                                                                                           | Sample size                | SureFast® Listeria 3plex ONE Lysis                                                     | SureFast® PREP Bacteria                                                                |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Heat-Processed Cheeses/ Raw Milk and Dairy Products            | 1:10 dilution<br>Half Fraser Broth.<br>Following incubation,<br>transfer of 0.1 ml of<br>primary enrichment to<br>10 ml Fraser Broth | 25 g                       | 37 ± 1°C<br>26-28 h (Half Fraser<br>Broth) +<br>37 ± 1°C<br>22- 26 H<br>(Fraser Broth) | 37 ± 1°C<br>18-20 h (Half Fraser<br>Broth) +<br>37 ± 1°C<br>22- 26 H<br>(Fraser Broth) |
| Raw and Ready-to-eat (RTE) Meat Products                       | 1:10 dilution<br>Half Fraser Broth<br><br>(25 g sample enriched<br>with 225 mL of Half<br>Fraser Broth)                              | 25 g                       | 37 ± 1°C<br>26-28 h                                                                    | 37 ± 1°C<br>18-20 h                                                                    |
| Ready- to- eat (RTE) Poultry Products                          |                                                                                                                                      |                            |                                                                                        |                                                                                        |
| Ready- to- eat (RTE), Ready- to-reheat (RTRH) Fishery Products |                                                                                                                                      |                            |                                                                                        |                                                                                        |
| Fresh Produce and Fruits                                       |                                                                                                                                      |                            |                                                                                        |                                                                                        |
| Multi-component Foods or Meal Components                       |                                                                                                                                      |                            |                                                                                        |                                                                                        |
| Environmental Samples                                          | 1:10 dilution<br>Half Fraser Broth<br><br>(1 sterile swab +<br>9 ml Half Fraser<br>1 sponge +<br>90 ml Half Fraser)                  | Sponge,<br>swab or<br>25 g |                                                                                        |                                                                                        |

Certification was performed on Bio-Rad CFX96 Deep Well DX (Maestro software version 2.0), Bio-Rad CFX96 Opus Deep Well (Maestro software version 2.0) and R-Biopharm RIDA®CYCLER (RIDA®CYCLER software version 1.2.1).

## AOAC PTM certification (License no. 062501)

SureFast® Listeria 3plex ONE was validated per the AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces and the 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].

The reference method for the matrix study was ISO 11290-1:2017 (Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp.).

## Summary of Validation Claims for AOAC certification 062501

AOAC claim for the detection of *Listeria* spp. and / or *Listeria monocytogenes*

| Matrix                                         | Enrichment                                                                                                | SureFast® Listeria 3plex ONE Lysis | SureFast® PREP Bacteria       | <i>L. spp</i> | <i>L. mono</i> |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|---------------|----------------|
| Raw Milk                                       | 1:10 dilution                                                                                             | 37 ± 1°C                           | 37 ± 1°C                      | X             | X              |
| Brie Cheese                                    | Half Fraser Broth.                                                                                        | 26-28 h (Half Fraser Broth) +      | 18-20 h (Half Fraser Broth) + | X             | X              |
| Gorgonzola Cheese                              | Following                                                                                                 | 37 ± 1°C                           | 37 ± 1°C                      | X             | X              |
| Pasteurized Milk                               | incubation, transfer of 0.1 ml of primary                                                                 | 22- 26 h                           | 22- 26 h                      | X             | X              |
| Gouda Cheese                                   | enrichment to 10 ml                                                                                       | (Fraser Broth)                     | (Fraser Broth)                | X             | X              |
| Ice Cream                                      | Fraser Broth                                                                                              |                                    |                               | X             |                |
| Liquid Whole Egg                               | 1:10 dilution<br>Half Fraser Broth<br><br>(25 g / 25 ml sample enriched with 225 ml of Half Fraser Broth) | 37 ± 1°C<br>26-28 h                | 37 ± 1°C<br>18-20 h           | X             | X              |
| Frankfurter Sausage                            |                                                                                                           |                                    |                               | X             | X              |
| Deli Ham                                       |                                                                                                           |                                    |                               | X             | X              |
| Smoked Deli Turkey                             |                                                                                                           |                                    |                               | X             | X              |
| Smoked Salmon                                  |                                                                                                           |                                    |                               | X             |                |
| Frozen cooked Shrimp                           |                                                                                                           |                                    |                               | X             | X              |
| Bagged Salad                                   |                                                                                                           |                                    |                               | X             | X              |
| Ground Soy Vegan Meat Substitute               |                                                                                                           |                                    |                               | X             | X              |
| Canned Enoki Mushrooms                         |                                                                                                           |                                    |                               | X             | X              |
| Guacamole                                      |                                                                                                           |                                    |                               | X             |                |
| Process Rinse Water                            |                                                                                                           |                                    |                               | X             |                |
| Stainless Steel Environmental Sample (Swabs)   | 1:10 dilution<br>Half Fraser Broth                                                                        |                                    |                               | X             | X              |
| Stainless Steel Environmental Sample (Sponges) | (1 sterile swab + 9 ml Half Fraser<br>1 sponge + 90 ml Half Fraser)                                       |                                    |                               | X             | X              |

Certification was performed on Bio-Rad CFX96 Deep Well DX (Maestro software Version 2.0), Bio-Rad CFX96 Opus Deep Well (Maestro software Version 2.0) and R-Biopharm RIDA®CYCLER (RIDA®CYCLER software version 1.2.1).

## **4 Limitations of the method**

- The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
- For samples at the LoD, a positive signal may occur in the *Listeria monocytogenes* channel and not in the *Listeria* spp. channel. Analysis should be repeated.
- The following *Listeria* spp. sensu lato strains, which are primarily known as environmental bacteria and not as pathogens, are not detected: *Listeria grandensis*, *Listeria floridensis*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria cornellensis*, *Listeria aquatica*, and *Listeria portnoyi*.
- A positive test result does not necessary indicate the presence of viable organisms. It is indicative for the presence of the target DNA (*Listeria*-DNA).
- In highly processed samples, the limit of detection may be shifted. Factors such as high pressures, mechanical stresses, chemical treatment, extreme temperatures and/or extreme pH values during manufacturing process – such as in canning production – can damage or degrade nucleic acids. This means that the sensitivity of the test kit may be reduced and not all original components may be detected.

## **5 Further Information**

### **5.1 Product Information**

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices (Download: [www.congen.de/en/downloads](http://www.congen.de/en/downloads))
- Product-related documents (Download: [www.congen.de/en/eifu/](http://www.congen.de/en/eifu/))
- AOAC and MicroVal certificates (Download: [www.congen.de/en/quality-standards/](http://www.congen.de/en/quality-standards/))
- Validation Report upon request

### **5.2 Technical Support**

For further questions please send an e-mail to [info@congen.de](mailto:info@congen.de).