



Health Products and Food Branch

Ottawa

Detection of *Listeria* spp. from Environmental Surfaces and Heat Processed Ready to Eat Meat  
and Poultry Using iQ-Check™ *Listeria* spp. Real-Time PCR Test Kit

Microbiological Methods Committee  
Microbiology Evaluation Division  
Bureau of Microbial Hazards, Food Directorate,  
Health Products and Food Branch, Health Canada  
Postal Locator: 2204E  
Ottawa, Ontario K1A 0K9

Contact the Microbiological Methods Committee: [mmc-cmm@hc-sc.gc.ca](mailto:mmc-cmm@hc-sc.gc.ca)

1. Application

This method is applicable to the rapid detection of *Listeria* spp. to determine compliance with the requirements of Section 4 and 7 of the *Food and Drugs Act*. This method has been validated for use in environmental samples and the heat processed food type of the ready-to-eat meat and poultry food category. This revised method replaces MFLP-39, dated April 2011.

**Note:** While this method is only approved for environmental surfaces and heat processed ready-to-eat meat and poultry, it is assumed that this method could be used with other foods. To ensure the method is fit for purpose for commodities outside the application, it is imperative that other commodities be properly validated following the criteria in the *Compendium of Analytical Methods*. It is requested that these validation data be forwarded to the Microbiological Methods Committee so the Application Section can be expanded to include these new foods if the data comply with MMC requirements (refer to Development of Methods in Volume 1 of the *Compendium of Analytical Methods*).

2. Description

The iQ-Check™ system is a real-time PCR based assay that involves simultaneous amplification and detection of the target organism after a single overnight enrichment. The *Listeria* spp. test detects all species of *Listeria*, including *L. grayi*. PCR is run after a single 24 hr enrichment in *Listeria* Special Broth (LSB). This broth was developed by Bio-Rad and specially formulated to meet the growth requirements of *Listeria*. The nutritive nature of LSB combined with the sensitivity and specificity of the iQ-Check assay eliminate the need for a secondary enrichment. The assay should only be used by trained laboratory personnel who follow standard Good Laboratory Practices.

### 3. Principle

The iQ-Check *Listeria* spp. kit is a test based on gene amplification and detection by real-time PCR. Ready-to-use PCR reagents contain DNA primers and a fluorescent DNA hybridization probe specific for *Listeria* spp., as well as DNA polymerase and nucleotides. All reagents necessary for the test are contained in the kit. PCR is a technique used to generate many copies of target DNA. During the PCR reaction, several cycles of heating and cooling allow DNA denaturation, by heat, followed by primers binding to the target region. The DNA polymerase then uses these primers and deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) to extend the DNA, creating copies of the target DNA. These copies are called amplicons. In real-time PCR, specific oligonucleotide probes are used to detect the DNA during the amplification, by hybridizing to the amplicons. These probes are linked to a fluorophore which fluoresces only when hybridized to the target sequence. In the iQ-Check *Listeria* spp. kits, carboxyfluorescein (FAM) is the fluorophore linked to the probe hybridizing to the *Listeria* spp. specific DNA sequence. In the absence of target DNA, no fluorescence will be detected, and the sample is determined to be negative by the iQ-Check software. As the amount of amplicons increases with each round of amplification, fluorescence intensity also increases. During each PCR cycle, at the annealing step, the real-time PCR system measures this fluorescence and the associated software plots the fluorescence intensity versus number of cycles. This method allows a simple determination of the presence of *Listeria* spp. in a sample. To monitor for a successful DNA amplification in each reaction well, a synthetic DNA "internal control" is included in the reaction mix. This control is amplified with a specific probe at the same time as the *Listeria* spp. target DNA sequence, and detected by a second fluorophore.

### 4. Definition of Terms

See [Appendix A of Volume 3](#).

### 5. Collection of Samples

See [Appendix B of Volume 3](#).

### 6. Materials and Special Equipment

**Note:** The Laboratory Supervisor must ensure that the analysis described in this method is carried out in accordance with the International Standard referred to as "ISO/IEC 17025:2005 (or latest version): General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories".

**Note:** It is the responsibility of the laboratory to ensure equivalency if any variations of the media formulations listed here are used (either product that is commercially available or made from scratch). Please forward equivalency data to the Editor of *Compendium of Analytical Methods* for consideration of modification of this method.

#### 6.1 iQ-Check *Listeria* spp. kit (Bio-Rad catalog # 357-8113)

- 6.1.1 Reagent A - Lysis reagent, 1 bottle (20 mL), contains magnetic stirbar
- 6.1.2 Reagent B - Fluorescent probes, 1 tube (0.55 mL)
- 6.1.3 Reagent C - Amplification mix, 2 tubes (2.2 mL each)
- 6.1.4 Reagent D - PCR negative control, 1 tube (0.5 mL)
- 6.1.5 Reagent E - PCR positive control, 1 tube (0.25 mL)
- 6.1.6 Reagent F - Lysis beads, 1 bottle (17.6g)

## 6.2 Supplies and reagents

- 6.2.1 Combitips pipette or equivalent repeat pipette
- 6.2.2 Combitips tips
- 6.2.3 Conical screw cap sterile tubes, 1.5 mL (for tube extraction only)
- 6.2.4 Dey-Engley (D/E) neutralizing broth for sponges and swabs
- 6.2.5 Deepwell microplates (for deepwell extraction only)
- 6.2.6 Enrichment medium - LSB (Bio-Rad catalog # 355-5703 [225mlx6], 356-4706 [500g])
- 6.2.7 Environmental sponges
- 6.2.8 Environmental swabs
- 6.2.9 Low-profile 0.2 mL PCR 8-tube strips without caps, thin-walled, white (Bio-Rad, catalog # TLS-0851XTU)
- 6.2.10 Low-profile unskirted PCR plates, 48 or 96 well, white (Bio-Rad catalog# MLL-4851XTU, MLL-9651XTU)
- 6.2.11 Micropipettes - 20 µL, 200 µL and 1000 µL
- 6.2.12 Optical Flat 8-cap strips, ultraclear (Bio-Rad catalog # TCS-0803XTU)
- 6.2.13 Pre-pierced sealing film (Bio-Rad catalog # 360-0040) (for deepwell extraction only)
- 6.2.14 Powder-free gloves
- 6.2.15 Sterile filter tips - adaptable to 20 µL, 200 µL and 1000 µL micropipettes
- 6.2.16 Stomacher bag with incorporated filter

## 6.3 Equipment

- 6.3.1 Bench top centrifuge - maximum 10,000 – 12,000 × g, for 1.5 mL tubes (for tube extraction only)
- 6.3.2 Cell disruptor (Bio-Rad catalog # 359-1456) (for tube extraction only)
- 6.3.3 Dry heat block, for 1.5 mL tubes - capable of maintaining 95 – 100°C (for tube extraction only)
- 6.3.4 Incubator - capable of maintaining temperatures of 30 ± 1°C for sample incubation
- 6.3.5 Magnetic stir plate
- 6.3.6 Real-time PCR system – CFX96™ real-time PCR detection system (Bio-Rad cat. # 360-0037) or MiniOpticon™ real-time PCR detection system (Bio-Rad catalog # 359-1592)
- 6.3.7 Stomacher, blender or equivalent
- 6.3.8 Thermomixer (for deepwell extraction only)
- 6.3.9 Vortex apparatus

**Note:** It is the responsibility of each laboratory to ensure that the temperatures of the incubators or water baths are maintained at the recommended temperatures. Where 35°C is recommended in text of the method the incubator may be at 35 ± 1.0°C. Similarly, lower temperatures of 30 or 25 may be ± 1.0°C. However, where higher temperatures are recommended, such as 43 or 45.5°C, it is imperative that the incubators or water baths be maintained within 0.5°C due to potential lethality of the higher temperatures on the microorganism(s) being isolated.

## 7. Procedure

The test shall be carried out in accordance with the following instructions:

### 7.1 Handling of sample units

**Note:** It is important that the D/E neutralizing broth listed in 6.2 is used to moisten sponges. The use of other neutralizing buffers can cause PCR inhibition.

- 7.1.1 During storage and transport, with the exception of shelf-stable products, keep the sample units refrigerated. Keep sample units of frozen products frozen. Thaw frozen samples in a refrigerator, or under time and temperature conditions which prevent microbial growth or death.
- 7.1.2 Add D/E neutralizing broth to sterile sponges and swabs to moisten.
- 7.1.3 The protocol of MFLP-41 should be followed for obtaining and transporting swabs.
- 7.1.4 Analyze the sample units as soon as possible after receipt at the laboratory.

### 7.2 Preparation for analysis

- 7.2.1 Turn on heating block or thermomixer in advance to reach 95 – 100°C.
- 7.2.2 Turn on the thermal cycler and computer.
- 7.2.3 Carefully pour all the contents from Reagent F (lysis beads) into Reagent A (lysis reagent).

### 7.3 Preparation of sample

- 7.3.1 Temper LSB to  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  before use.
- 7.3.2 To ensure a representative analytical unit, agitate liquids or free flowing materials until the contents are homogeneous. If the sample unit is a solid, obtain the analytical unit by taking a portion from several locations within the sample unit.
- 7.3.3 Add 25 g or mL of the food (analytical unit) to 225 ml of LSB. For composite samples, analytical units may be combined up to 125g or mL (e.g., 125 g or mL in 1125 mL of LSB). If alternate analytical units are required, maintain a ratio of 1 part sample material to 9 parts LSB.
- 7.3.4 Add the environmental sponge or large swabs to 100 mL of LSB or composite up to 10 sponges with 100 mL of LSB **per sponge**. Place smaller environmental swabs (e.g., cotton tip) in 10 mL of LSB or composite up to 10 swabs with 10 mL LSB **per swab**.
- 7.3.5 Blend, stomach or vortex as required for thorough mixing.
- 7.3.6 Incubate food sample or environmental sponges/swabs in LSB at  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  for  $25 \pm 1$  h.

### 7.4 DNA extraction – tube format

- 7.4.1 Collect 100  $\mu\text{L}$  of enriched sample into a 1.5 mL conical tube with screw cap. Avoid transferring food particles. Store the remaining enrichment broth at  $2 - 8^\circ\text{C}$  for later use in the confirmation of any iQ Check™ *Listeria* spp. positive assay results.
- 7.4.2 Place final lysis reagent (reagent + beads) on a magnetic stir plate and stir on medium speed for a minimum of 1 min.

- 7.4.3 Add 100 µL of the final lysis reagent to the sample tube. Mix the solution by pipetting up and down in the tube a minimum of 3 times.
- 7.4.4 Place tube in the cell disruptor for 3 ± 1 min.
- 7.4.5 Place tube in the heat block at 100°C for 15 min.
- 7.4.6 Vortex at high speed.
- 7.4.7 Centrifuge at 10,000 – 12,000 × g for 2 min.

## 7.5 DNA extraction – deepwell format

- 7.5.1 Add 100 µl of the lysis reagent to each well of a deepwell microplate.
- 7.5.2 After sample enrichment, collect a 100 µl aliquot of each sample and add into the deepwell microplate. Avoid transferring food particles..
- 7.5.3 Seal with pre-pierced sealing film.
- 7.5.4 Place in the thermomixer instrument set at 95 – 99°C at 1,300 rpm for 15 – 20 min.
- 7.5.5 Remove plate from thermomixer and allow to cool in the refrigerator for 10 minutes.

## 7.6 PCR

- 7.6.1 Prepare PCR mix combining the amplification solution (Reagent C) and the fluorescent probes (Reagent B) according to the chart in the package insert.
- 7.6.2 Add 45 µL of PCR mix to each well of a 48 or 96 well PCR plate, pipetting carefully to avoid bubbles.
- 7.6.3 Add 5 µL of each sample, or control, to the appropriate well.
- 7.6.4 One positive control (Reagent E) and one negative control (Reagent D) are run with each assay. Controls are provided as ready-to-use solutions in the kit.
- 7.6.5 Seal the plate with the optical caps.
- 7.6.6 Place the plate into the reaction module of the thermal cycler and close the lid.
- 7.6.7 Verify the plate setup and protocol selection are correct.
- 7.6.8 Click on the “run” button in the software program.
- 7.6.9 A window will appear allowing you to save your data in a specific location. Once “save” is selected, the PCR protocol is started.
- 7.6.10 A report will be generated at the end of the run assigning each sample a positive or negative result.

## 7.7 Confirmation of Presumptive Positive Results

Using the refrigerated enrichment broth, proceed with plating and confirmation steps of a cultural method (*i.e.*, MFHPB-07 or MFHPB-30), as appropriate. Use at least one chromogenic agar listed in the cultural method in addition to Oxford agar.

**Note:** For the heat processed food type of the ready-to-eat meat and poultry food category, if the results indicate that *Listeria* spp. have not been detected, it is understood that the presence of *L. monocytogenes* has also not been detected, since no species belonging to the *Listeria* genus were detected. However, if *Listeria* spp. are detected in heat processed ready-to-eat meat and poultry, regardless of the amount of colony screening or additional confirmation steps done, these results cannot be used to state that *L. monocytogenes* is absent. For heat processed ready-to-eat meat and poultry, report all species of *Listeria* that are identified.

## 8. References

- 8.1 Bio-Rad. iQ-Check™ *Listeria* spp. Kit User Guide 357-8113. Test for the real-time PCR detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples.
- 8.2 Microbiological Methods Committee. 2010. [MFLP-41: Environmental sampling for the detection of microorganisms.](#) Volume 3. *The Compendium of Analytical Methods*.
- 8.3 Pagotto, F., Hébert, K., J. Farber. 2011. [MFHPB-30: Isolation of \*Listeria monocytogenes\* and other \*Listeria\* spp. from foods and environmental samples.](#) Volume 2. *The Compendium of Analytical Methods*.
- 8.4 Warburton, D., Boville, A., Pagotto, F., Daley, E. and Chow, C. 2011. [MFHPB-07: The Isolation of \*Listeria monocytogenes\* and other \*Listeria\* spp. from foods and environmental samples using palcam broth.](#) Volume 2. *The Compendium of Analytical Methods*.

**End of Document**



Direction Générale des Produits de Santé et des Aliments

Ottawa

Détection de *Listeria* spp. dans les échantillons de surfaces environnementales, la viande et la volaille prêtes-à-manger traitées thermiquement, au moyen de la trousse iQ-Check™ *Listeria* spp., une méthode PCR en temps réel

Comité des méthodes microbiologiques  
Division de l'évaluation microbiologique  
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments,  
Direction générale des produits de santé et des aliments, Santé Canada  
Repère postal : 2204E  
Ottawa (Ontario) K1A 0K9

Contactez le comité des méthodes microbiologiques: [mmc-cmm@hc-sc.gc.ca](mailto:mmc-cmm@hc-sc.gc.ca)

## 1. Application

Cette méthode s'applique à la détection rapide de *Listeria* spp. afin de déterminer s'il y a conformité aux articles 4 et 7 de la *Loi sur les aliments et drogues*. Cette méthode a été validée pour l'utilisation avec les échantillons environnementaux et le type d'aliment thermiquement traitées des catégories de viande et de volaille prêtes-à-manger. Cette version révisée remplace la méthode MFLP-39 datée d'avril 2011.

**Note:** Cette méthode est approuvée pour les échantillons environnementaux, la viande et la volaille prêtes-à-manger traitées thermiquement, mais il peut être assumé que cette méthode pourrait être utilisée avec des autres produits alimentaires. Il faut s'assurer que la méthode convient pour l'utilisation visée avec d'autres produits alimentaires. Il est impératif que la méthode soit correctement validée avec ces autres produits selon les lignes directrices dans le *Compendium de méthodes*. Le cas échéant, nous demandons de transmettre ces données de validation au Comité des Méthodes de Microbiologie afin que nous puissions réviser la portée d'application de la méthode si ces nouvelles données sont conformes aux critères d'acceptabilité du CMM (voir *Élaboration de méthodes* dans le volume 1 du *Compendium de méthodes*).

## 2. Description

Le système iQ-Check™ est une trousse d'analyse fondée sur le PCR en temps réel qui incorpore simultanément l'amplification et la détection d'un organisme ciblé à la suite d'un seul enrichissement de 24 heures. L'analyse de *Listeria* spp. détecte toutes les espèces de *Listeria*, y compris *L. grayi*. L'épreuve du PCR est effectuée après un seul enrichissement de 24 heures dans le LSB (*Listeria* Special Broth), développé et préparé spécialement par Bio-Rad pour satisfaire aux conditions de croissance de *Listeria*. La valeur nutritive du LSB, combinée à la sensibilité et la spécificité de l'analyse iQ-Check™, élimine la nécessité d'un deuxième enrichissement. L'analyse devrait être effectuée uniquement par du personnel de laboratoire compétent qui observe les bonnes pratiques de laboratoire.

### 3. Principe

La trousse iQ-Check™ *Listeria* spp. est une analyse fondée sur une technique d'amplification et de détection au moyen du PCR en temps réel. Les réactifs de PCR prêts à l'utilisation contiennent des amorces et une sonde d'hybridation de l'ADN fluorescente qui est spécifique pour *Listeria* spp., en plus d'ADN polymérase et de nucléotides. La trousse contient tous les réactifs nécessaires pour l'analyse. Le PCR est une technique servant à générer de nombreuses copies de l'ADN ciblé. Pendant le PCR, plusieurs cycles de chauffage et de refroidissement permettent de dénaturer thermiquement l'ADN, suivis par des cycles de fixation des amorces à la région ciblée par appariement. L'ADN polymérase utilise ensuite ces amorces et les désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) pour répliquer l'ADN, créant ainsi des copies de l'ADN ciblé. Ces copies sont appelées amplicons. Dans le PCR en temps réel, les sondes d'oligonucléotides spécifiques sont utilisées pour détecter l'ADN pendant l'amplification, par hybridation des amplicons. Ces sondes sont liées à un fluorophore qui fluoresce seulement pendant l'hybridation à la séquence ciblée. Dans les trousse iQ-Check™ *Listeria* spp., la carboxyfluoresceïne (FAM) est le fluorophore lié à la sonde d'hybridation de la séquence d'ADN spécifique pour *Listeria* spp. En absence d'ADN ciblé, aucune fluorescence n'est détectée et l'échantillon est déterminé comme étant négatif par le logiciel iQ-Check™. L'intensité de la fluorescence augmente proportionnellement avec l'augmentation du nombre d'amplicons à chaque cycle d'amplification. Durant chaque cycle de PCR, à l'étape d'appariement, le système de PCR en temps réel mesure cette fluorescence et le logiciel associé reproduit sur graphique l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles. Cette méthode permet une détermination de la présence de *Listeria* spp. dans un échantillon. Le mélange réactionnel contient un « témoin interne synthétique » d'ADN pour confirmer la réussite de l'amplification de l'ADN dans chaque puits de réaction. Ce témoin est amplifié avec une sonde spécifique simultanément à l'amplification de la séquence d'ADN ciblé pour *Listeria* spp., puis détecté par une deuxième sonde marquée d'un fluorophore différent.

### 4. Définitions

Voir [l'annexe A du Volume 3](#).

### 5. Prélèvement des échantillons

Voir [l'annexe B du Volume 3](#).

### 6. Matériel et produits spéciaux

**Note:** Il est de la responsabilité du superviseur du laboratoire de voir à ce que l'analyse décrite dans cette méthode soit réalisée en accord avec la Norme Internationale intitulée « ISO/IEC 17025:2005 (ou la version plus récente): Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais ».

**Note:** Il est de la responsabilité du laboratoire de s'assurer de l'équivalence de toutes variations de formulation des milieux énumérés ici si elles sont utilisées (qu'il s'agisse d'un produit disponible sur le marché ou fabriqué à partir d'ingrédients). Il serait apprécié que les résultats d'équivalence soient transmis à l'éditeur du Compendium des méthodes analytiques en vue d'une modification de la méthode.

## 6.1 Trousse iQ-Check™ *Listeria* spp. (n° de catalogue Bio-Rad 357-8113)

- 6.1.1 Réactif A – réactif de lyse, 1 bouteille (20 mL) contenant une tige agitatrice magnétique
- 6.1.2 Réactif B – sondes fluorescentes, 1 tube (0,55 mL)
- 6.1.3 Réactif C – mélange d'amplification, 2 tubes (2,2 mL chacun)
- 6.1.4 Réactif D – témoin négatif de PCR, 1 tube (0,5 mL)
- 6.1.5 Réactif E - témoin positif de PCR, 1 tube (0,25 mL)
- 6.1.6 Réactif F – billes de lyse, 1 bouteille (17,6 g)

## 6.2 Fournitures et réactifs

- 6.2.1 Pipette Combitips ou multi-distributeur
- 6.2.2 Embouts Combitips
- 6.2.3 Microtubes coniques stériles à bouchon vissé, 1,5 mL (pour extraction en tube seulement)
- 6.2.4 Bouillon neutralisant Dey-Engley (D/E) pour humidifier les éponges et les écouvillons
- 6.2.5 Microplaques à puits profonds (pour extraction en puits profond seulement)
- 6.2.6 Milieu d'enrichissement - LSB (no. de catalogue Bio-Rad 355-5703 [225 mL x 6], 356-4706 [500 g])
- 6.2.7 Éponges pour le prélèvement d'échantillons de surfaces environnementales
- 6.2.8 Écouvillons pour le prélèvement d'échantillons de surfaces environnementales
- 6.2.9 Bandes de 8 tubes pour PCR, 0,2 mL, sans bouchons, à paroi mince, de couleur blanche (no. de catalogue Bio-Rad TLS-0851XTU)
- 6.2.10 Plaques sans rebords pour PCR, 48 ou 96 puits, de couleur blanche (no. de catalogue Bio-Rad MII-4851XTU, MLL-9651XTU)
- 6.2.11 Micropipettes - 20 µL, 200 µL et 1000 µL
- 6.2.12 Bandes optiques plates de 8 bouchons, ultra-transparentes (no. de catalogue Bio-Rad TCS-0803XTU)
- 6.2.13 Film scellant pré-percé (no. de catalogue Bio-Rad 360-0040) (pour extraction en puits profond seulement)
- 6.2.14 Gants non poudrés
- 6.2.15 Embouts à filtre stériles – utilisables sur les micropipettes de 20 µL, 200 µL et 1000 µL
- 6.2.16 Sac pour Stomacher avec filtre incorporé

## 6.3 Équipement

- 6.3.1 Centrifugeuse de table – vitesse maximale de 10 000 à 12 000 x g, pour tubes de 1,5 mL (pour extraction en tube seulement)
- 6.3.2 Désintégrateur de cellules (no de catalogue Bio-Rad 359-1456) (pour extraction en tube seulement)
- 6.3.3 Bloc de chauffage à sec, pour tubes de 1,5 mL - capable de maintenir une température de 95 à 100°C (pour extraction en tube seulement)
- 6.3.4 Incubateur - capable de maintenir une température de 30 ± 1°C pour incuber les échantillons
- 6.3.5 Plaque d'agitation magnétique
- 6.3.6 Système de PCR en temps réel – système CFX96™ pour la détection PCR en temps réel (no de catalogue Bio-Rad 360-0037) ou système MiniOpticon™ pour la détection PCR en temps réel (no de catalogue Bio-Rad 359-1592)
- 6.3.7 Stomacher, mélanger ou l'équivalent
- 6.3.8 Thermomixeur (pour extraction en puits profond seulement)
- 6.3.9 Vortex

**Note:** Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs ou les bains-marie sont maintenus à la température recommandée. Lorsqu'on recommande 35°C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être réglé à 35 ± 1,0°C. De même, les températures plus basses de 30 ou 25°C peuvent être réglées à ± 1,0°C près. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 ou 45,5°C, il est impératif de maintenir les incubateurs ou les bains-marie à ± 0,5°C parce que des températures plus élevées peuvent être létales pour le micro-organisme qu'on cherche à isoler.

## 7. Marche à suivre

L'épreuve doit être effectuée conformément aux instructions suivantes :

### 7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

**Note:** Il est important que le bouillon neutralisant D/E décrit au point 6.2 soit utilisé pour humecter les éponges. L'utilisation d'autres tampons de neutralisation peut provoquer l'inhibition de la réaction PCR.

- 7.1.1 Les unités d'échantillonnage doivent être conservées au réfrigérateur ou au congélateur, selon la nature du produit, jusqu'au moment de l'analyse sauf dans le cas des aliments pouvant être conservés à la température de la pièce pour une longue période de temps. Faire décongeler les échantillons congelés au réfrigérateur ou pendant une période et à une température qui empêchent la croissance ou la mort des microorganismes.
- 7.1.2 Humidifier les éponges et les écouvillons à l'aide du bouillon neutralisant D/E.
- 7.1.3 Le protocole de la méthode MFLP-41 doit être suivi pour le prélèvement et le transport des écouvillons.
- 7.1.4 Les échantillons doivent être analysés le plus tôt possible après leur réception au laboratoire.

### 7.2 Préparation pour l'analyse

- 7.2.1 Mettre en fonction le bloc de chauffage ou le thermomixeur pour lui permettre d'atteindre une température de 95 à 100°C.
- 7.2.2 Mettre en fonction le thermocycleur et l'ordinateur.
- 7.2.3 Verser prudemment tout le contenu du réactif F (billes de lyse) dans le réactif A (réactif de lyse).

### 7.3 Préparation de l'échantillon

- 7.3.1 Tempérer le LSB à 30°C avant de l'utiliser.
- 7.3.2 Pour veiller à ce que l'unité d'analyse soit vraiment représentative, agiter les liquides ou les matières libres jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Si l'unité est un solide, prélever des parties à différents endroits de l'unité d'échantillonnage.
- 7.3.3 Ajouter 25 g ou ml de l'aliment (l'unité d'analyse) à 225 ml LSB. Dans le cas des échantillons composés, les unités analytiques peuvent être combinées jusqu'à concurrence de 125g ou ml (par exemple, 125g ou ml d'aliment à 1125 ml de LSB). Si des unités d'analyses différentes sont requises, maintenir un ratio de 1 portion d'échantillon pour 9 portions de LSB.

- 7.3.4 Ajouter 100 mL de LSB à chaque éponge ou amalgamer jusqu'à 10 éponges et ajouter 100 ml de LSB **par éponge**. Ajouter 10 ml de LSB à chaque écouvillon ou amalgamer jusqu'à 10 écouvillons et ajouter 10 ml de LSB **par écouvillon**.
- 7.3.5 Mélanger au broyeur, au stomacher ou au vortex selon les besoins pour obtenir un mélange bien homogène.
- 7.3.6 Incuber les éponges/écouvillons ou les échantillons d'aliments dans le LSB à 30 ±1°C pendant 25 ± 1 heure.

#### 7.4 Extraction de l'ADN – méthode avec tube

- 7.4.1 Transférer 100 µL d'échantillon enrichi dans un microtube conique de 1,5 mL à bouchon vissé. Éviter d'y transférer des particules d'aliments. Entreposer le bouillon d'enrichissement restant à 2 – 8°C pour utilisation ultérieure lors de la confirmation des résultats présumés positifs au iQ-check™ *Listeria* spp.
- 7.4.2 Placer le réactif de lyse finale (réactif + billes) sur une plaque d'agitation magnétique et mélanger à vitesse moyenne pendant au moins 1 minute.
- 7.4.3 Ajouter 100 µL du réactif de lyse finale dans le tube contenant l'échantillon. Mélanger la solution à l'aide d'une pipette (montée/descente) dans le tube au moins 3 fois.
- 7.4.4 Placer le tube dans le désintégrateur de cellules pendant 3 minutes (± 1 minute).
- 7.4.5 Placer le tube dans le bloc de chauffage à 100°C pendant 15 minutes.
- 7.4.6 Mélanger à grande vitesse à l'aide de l'agitateur Vortex.
- 7.4.7 Centrifuger à 10 000 à 12 000 x g pendant 2 minutes.

#### 7.5 Extraction de l'ADN – méthode de puits profonds

- 7.5.1 Ajouter 100 µL du réactif tempéré de lyse finale dans chaque puits d'une microplaque à puits profonds.
- 7.5.2 Transférer un aliquot de 100 µL de chaque échantillon enrichi dans le puits approprié de la microplaque à puits profonds. Éviter d'y transférer des particules d'aliments.
- 7.5.3 Sceller à l'aide du film scellant pré-percé.
- 7.5.4 Placer dans le thermomixeur réglé à 95 – 99°C, à 1 300 rpm pendant 15 à 20 minutes.
- 7.5.5 Retirer la plaque du thermomixeur et laisser refroidir au réfrigérateur pendant 10 minutes.

#### 7.6 PCR

- 7.6.1 Préparer le mélange de PCR en combinant la solution d'amplification (réactif C) et les sondes fluorescentes (réactif B), selon le tableau de la notice d'accompagnement du produit.
- 7.6.2 Ajouter 45 µL de mélange de PCR dans chaque puits d'une microplaque à 48 ou 96 puits Il est important de pipetter soigneusement pour éviter toute formation de bulles dans les puits ou les tubes à PCR.
- 7.6.3 Ajouter un aliquot de 5 µL de chaque échantillon ou témoin dans le puits approprié.
- 7.6.4 Un témoin positif (réactif E) et un témoin négatif (réactif D) devraient être analysés avec chaque épreuve. La trousse contient les témoins prêts à l'utilisation.
- 7.6.5 Sceller la plaque à l'aide des bouchons optiques.
- 7.6.6 Placer la plaque dans le thermo cycleur et refermer le couvercle.
- 7.6.7 Confirmer la sélection appropriée de la préparation de la plaque et du protocole.
- 7.6.8 Cliquer sur le bouton « run » du logiciel.

- 7.6.9 Une fenêtre apparaîtra pour vous permettre de sauvegarder vos données à un emplacement spécifique. Appuyer sur « save » pour démarrer le protocole de PCR.
- 7.6.10 À la fin de l'analyse, un rapport sera généré attribuant un résultat positif ou négatif à chaque échantillon.

### 7.7 Épreuves de confirmation pour les résultats présumés positifs

En utilisant les bouillons enrichis réfrigérés, procéder à l'ensemencement et à la confirmation selon les étapes décrites dans une méthode de culture tel que MFHPB-07 ou MFHPB-30, selon le cas. Au moins un milieu chromogénique présenté dans la méthode de culture doit être utilisé en plus de la gélose Oxford.

**Note :** Pour le type d'aliment thermiquement traité de viande et de volaille prêtes-à-manger, si les résultats indiquent qu'aucune espèce de *Listeria* n'a été détectée, il est convenu que la présence de *Listeria monocytogenes* n'ait également pas été révélée puisqu'aucune espèce appartenant au genre *Listeria* ne fut détectée. Toutefois, si un résultat positif pour *Listeria* spp. est obtenu dans la viande et la volaille prêtes-à-manger ayant subi un traitement thermique, ces résultats ne peuvent pas être utilisés pour affirmer que *Listeria monocytogenes* est absente, et ce sans égard au nombre de colonies présumées testées ou au nombre d'essais de confirmation supplémentaires réalisés. Pour la viande et la volaille prêtes-à-manger ayant subi un traitement thermique, rapporter toutes les espèces de *Listeria* identifiées.

## 8. Références

- 8.1 iQ-Check™ *Listeria* spp. Kit Réf.: 357-8113 Notice d'utilisation Test pour la détection par PCR en temps réel des *Listeria* spp. dans les aliments et les échantillons d'environnement.
- 8.2 Comité des méthodes de Microbiologie. 2010. [MFLP-41: Échantillonnage environnemental pour la détection des microorganismes](#). Volume 2. *Compendium des Méthodes*.
- 8.3 Pagotto, F., Hébert, K., J. Farber. 2011. [MFHPB-30: Isolement de \*Listeria monocytogenes\* et autres \*Listeria\* spp. dans les aliments et les échantillons environnementaux](#). Volume 2. *Compendium des Méthodes*.
- 8.4 Warburton, D., Boville, A., Pagotto, F., Daley, E. et Chow, C. 2011. [MFHPB-07: Isolement de \*Listeria monocytogenes\* et des autres \*Listeria\* spp. dans les aliments et les échantillons environnementaux à l'aide du bouillon palcam](#). Volume 2. *Compendium des Méthodes*.

**Fin du document**