



Health Products and Food Branch

Ottawa

Detection of *Listeria monocytogenes* from selected foods using iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* 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

1. Application

This method is applicable to the rapid detection of *Listeria monocytogenes* to determine compliance with the requirements of Sections 4 and 7 of the *Food and Drugs Act* and/or other relevant federal regulations. This method has been validated for use in ready-to-eat meat and poultry, fruit and vegetable based products (except raw processed vegetables), fish and seafood products (except smoked fish), and frozen and fermented dairy products.

2. Description

The iQ-Check™ system is a real-time PCR based assay that involves simultaneous amplification and detection of target organism after a 25 ± 1 hr enrichment in *Listeria* Special Broth. Results are automatically determined by the iQ-Check™ software.

Note: While this method is only approved for certain food products, as listed above, 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](#) (MMC) 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](#)).

3. Principle

The iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* kit is based on gene amplification and detection by real-time PCR. Ready-to-use PCR reagents contain DNA polymerase, nucleotides, DNA primers and a fluorescent DNA hybridization probe specific to a highly conserved region on the genome of *Listeria monocytogenes*. All reagents necessary for the test are contained in the kit. In real-time PCR, probes are linked to a fluorophore which fluoresces only when hybridized to the target sequence. In the iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* kit, carboxyfluorescein (FAM) is the

fluorophore linked to the probe hybridizing to the *Listeria monocytogenes* 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 amplicon 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 monocytogenes* in a sample. To monitor for successful DNA amplification in each reaction well, a synthetic DNA "internal control" is included in the reaction mix to monitor for potential inhibition. This control is amplified with a specific probe at the same time as the target DNA sequence, and detected by a second fluorophore.

4. Definition of Terms

See [Appendix A of Volume 1](#).

5. Collection of Samples

See [Appendix B of Volume 1](#).

6. Materials and Special Equipment

Note: The laboratory supervisor must ensure that completion of the analysis described in this method is done in accordance with the International Standards reference "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.

1) iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* kit (Bio-Rad catalog # 3578124)

Reagent A - Lysis reagent, 1 bottle (20 mL), contains magnetic stirbar
Reagent B - Fluorescent probes, 1 tube (0.55 mL)
Reagent C - Amplification mix, 1 tube (4.4 mL)
Reagent D - PCR negative control, 1 tube (0.5 mL)
Reagent E - PCR positive control, 1 tube (0.25 mL)
Reagent F - Lysis beads, 1 tube (17.6g)

2) Supplies and reagents

Listeria Special Broth (LSB, Bio-Rad catalog # 3555703 for 225mlx6, # 3564703 for 500g or # 3564753 for 5kg)
Conical screw cap sterile tubes, 1.5 mL (for tube extraction only)
Deepwell microplates (for deepwell extraction only)
Low-profile unskirted PCR plates, 48 or 96 well, white (Bio-Rad catalog# MLL4851XTU, MLL9651XTU, HSP9955XTU)
Optical Flat 8-cap strips, ultraclear (Bio-Rad catalog # TCS0803XTU)
Pre-pierced sealing film (Bio-Rad catalog # 3600040) or equivalent (for deepwell extraction only)
Powder-free gloves

Sterile filter tips - adaptable to 20 μ L, 200 μ L and 1000 μ L micropipettes
Stomacher bag or stomacher bag with incorporated filter (recommended for meat and highly particulate samples)
Micropipettes 20 μ L, 200 μ L and 1000 μ L
PCR mix tube for iQ-Check™ Prep system (Bio-Rad catalog # 3594901)
Pipette tips for iQ-Check™ Prep system (Bio-Rad catalog # 3594902 and 3594903)
Plating and confirmation media and supplies (i.e., from MFHPB-30)
Positive and negative control cultures (e.g., ATCC strains)

3) Equipment

Bench top centrifuge - maximum 10,000-12,000 \times g, for 1.5 mL tubes (for tube extraction only)
CFX Manager Software Industrial Diagnostic Edition (Bio-Rad catalog # 3600042)
Dry heat block, for 1.5 mL tubes - capable of maintaining 95 - 100°C (for tube extraction only)
Incubator - capable of maintaining temperatures of 30 °C for sample incubation
iQ-Check Prep automation system (optional) – for automated DNA extraction and PCR plate setup (Bio-Rad catalog # 3594911)
Magnetic stir plate
Plate sealer – for sealing hard shell PCR plates (Bio-Rad catalog # 1814000)
Real-time PCR system – CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad catalog # 3600037) or MiniOpticon real-time PCR detection system (Bio-Rad catalog # 3591592)
Stomacher, blender or equivalent
Thermomixer® – capable of maintaining 95-100°C (Bio-Rad catalog # 3600038 [base] and 3600039 [deepwell block] or catalog # 3594999) (for deepwell extraction only)
Vortex mixer

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. The following applies to steps of the method which apply to growth only. Where a temperature of $\leq 37^\circ\text{C}$ is recommended in the text of the method the incubator may be at $35 \pm 1.0^\circ\text{C}$. However, where higher temperatures are recommended, 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

7.1.1 In the laboratory prior to analysis, except for shelf-stable foods, keep sample units refrigerated or frozen, depending on the nature of the product. Thaw frozen samples in a refrigerator, or under time and temperature conditions which prevent microbial growth or death.

7.1.2 Analyze sample units as soon as possible after their receipt in the laboratory.

7.2 Preparation of sample

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.

- 7.2.1 Temper LSB to 30°C before use.
- 7.2.2 Prepare a 1 in 10 dilution of the food by aseptically adding 25 g or ml into 225 ml of LSB.
- 7.2.3 Other analytical unit sizes, such as 65 g or ml may be used while maintaining the 1 in 10 dilution. Do not exceed the maximum composited sample size of 125 g or ml.
- 7.2.4 Blend, stomach or vortex as required for thorough mixing.
- 7.2.5 Incubate all samples 30°C for 25 ± 1 hr.

7.3 Preparation for Analysis

- 7.3.1 Turn on heating block (for tube extraction) or Thermomixer[®] (for deepwell extraction) in advance to reach 95 - 100°C.
- 7.3.2 Turn on the thermal cycler and computer.
- 7.3.3 Turn on iQ-Check[™] Prep automation system (for automated sample processing)
- 7.3.4 Carefully pour all the contents from Reagent F (lysis beads) into Reagent A (lysis reagent).
- 7.3.5 Proceed to either step 7.4 for DNA extraction with the tube format or step 7.5 for the DNA extraction with a deepwell microplate.

7.4 DNA Extraction – tube format

- 7.4.1 Place lysis reagent (A+F) on a magnetic stir plate and stir on medium speed.

Note: A medium speed setting is used to ensure the lysis beads remain in suspension while dispensing. Using non-homogenous reagent could impact final results
--

- 7.4.2 Add 100 µl of the lysis reagent to each 1.5 ml screw cap conical tube.
- 7.4.3 Collect 100 µl of enriched sample and add to a tube containing lysis reagent. Mix the solution by pipetting up and down in the tube a minimum of 3 times.
- 7.4.4 Place tube in the heat block at 95-100°C for 15 min.
- 7.4.5 Vortex at high speed.
- 7.4.6 Centrifuge at 10,000-12,000 × g for 2 min.
- 7.4.7 Bring samples forward to 7.6.3.

7.5 DNA Extraction – deepwell format

- 7.5.1 Add 100 µl of the lysis reagent (A+F) 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.

- 7.5.3 For running iQ-Check™ Prep automation system, place unsealed deepwell plate, reagents and consumables into the instrument for automated sample processing.
- 7.5.4 For manual deepwell extraction, seal plate with pre-pierced sealing film.
- 7.5.5 Place in the Thermomixer® instrument at 95-100°C at 1,300 rpm for 15-20 min.
- 7.5.6 Remove plate from Thermomixer® and allow to cool in the refrigerator for a minimum of 10 minutes.
- 7.5.7 Bring samples forward to 7.6.3

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. If the DNA extract was obtained using the tube format (7.4.6), carefully pipette the supernatant, being careful not to disturb the pellet.
- 7.6.4 In addition to the laboratory's standard broth/enrichment controls, one positive control (Reagent E) and one negative control (Reagent D) should be run with each assay. Controls are provided as ready-to-use solutions in the kit.

Note: Steps 7.6.1 – 7.6.4 are completed automatically by the iQ-Check™ Prep automation system.

- 7.6.5 Seal the plate with the optical caps or use the PX1 plate sealer (for hard shell plates only).
- 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 is 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 Interpretation of Results

- 7.7.1 CFX Manager IDE software will make the determination if a sample is positive, negative, inhibited or invalid.
- 7.7.2 A positive *Listeria monocytogenes* sample must have a Cq value ≥ 10 for the FAM fluorophore.

- 7.7.3 If there is no Cq value (Cq=N/A) for FAM, the internal control for that sample must then be analyzed. This sample is considered as a negative *Listeria monocytogenes* sample if the internal control has a Cq \geq 28.
- 7.7.4 If the internal control does not have a Cq value (Cq= N/A), then it is not possible to interpret the result. Such a result indicates an inhibition of the PCR reaction.
- 7.7.5 If a sample is scored as invalid, PCR should be repeated. If the sample is invalid a second time, contact Bio-Rad technical support and proceed with the confirmation steps for this sample.

7.8 Confirmation of Presumptive Positive Results

Using the 24 hour LSB enrichment broth aliquot, proceed with the plating and confirmation steps as described in the “isolation procedure” section of the cultural method MFHPB-30. Use at least one chromogenic agar listed in the cultural method in addition to Oxford agar. Additionally, transfer 0.1 mL of the presumptive positive broth to modified Fraser Broth and proceed with incubation and plating from Fraser Broth as indicated in MFHPB-30. Place the remainder of the 24 h LSB enriched sample back in the incubator and continue incubation for up to 48 h as required, for use as required in the confirmation of presumptive positive results, as described in MFHPB-30.

Once the presumptive positive has been confirmed, other confirmation streams can be discontinued. However, all plating and confirmation steps must be performed as described above, before reporting a presumptive positive result as a negative.

8. References

- 8.1 Bio-Rad Laboratories – iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* II kit user guide. Available at <http://www.bio-rad.com/en-us/product/iq-check-listeria-monocytogenes-ii-kit>
- 8.2 Pagotto, F., Hébert, K., J. Farber. 2011. Isolation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. from foods and environmental samples (MFHPB-30). Volume 2. The *Compendium of Analytical Methods*.
- 8.3 Warburton, D., Boville, A., Pagotto, F., Daley, E. and Chow, C. 2012. The isolation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. from foods and environmental samples using Palcam broth (MFHPB-07). Volume 2. The *Compendium of Analytical Methods*

End of Document



Direction générale des produits de santé et des aliments

Ottawa

Détection de *Listeria monocytogenes* dans certains aliments au moyen de la trousse d'analyse par PCR en temps réel iQ-Check™ *Listeria monocytogenes*

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
Indice de l'adresse : 2204E
Ottawa (Ontario) K1A 0K9

Contactez le Comité des méthodes microbiologiques : mmc-cmm@hc-sc.gc.ca

1. Application

Cette méthode est applicable à la détection rapide de *Listeria monocytogenes* afin de déterminer la conformité aux exigences des articles 4 et 7 de la *Loi sur les aliments et drogues* et/ou d'autres règlements fédéraux pertinents. Cette méthode a été validée pour la viande et la volaille prêtes-à-manger, les produits à base de fruits et de légumes (sauf les légumes crus transformés), les produits de poisson et de fruits de mer (sauf le poisson fumé) ainsi que les produits laitiers congelés et fermentés.

2. Description

Le système iQ-Check™ est une analyse fondée sur la PCR en temps réel qui repose sur l'amplification simultanée et la détection de l'organisme cible à la suite d'un enrichissement de 25 ± 1 h dans le bouillon spécial *Listeria* (LSB). Le logiciel iQ-Check™ détermine les résultats automatiquement.

Note: Bien que cette méthode ne soit approuvée que pour certains types de produits alimentaires, listés ci-dessus, il est présumé que cette méthode puisse être utilisée pour d'autres types de produits. Afin de s'assurer de la validité de cette méthode sur des produits différents de ceux spécifiés ici, il est impératif de valider la méthode selon les critères du Compendium de Méthodes. Il est requis que ces résultats de validation soient envoyés au [Comité des Méthodes Microbiologiques](#) (CMM) pour que la section Application puisse être modifiée afin d'inclure ce(s) nouveau(x) type(s) de produit(s), si les résultats obtenus rencontrent les normes du CMM (se référer à la section 'Élaboration de méthodes' du [Volume 1 du Compendium de Méthodes](#)).

3. Principe

La trousse iQ-Check^{MC} *Listeria monocytogenes* est fondée sur l'amplification génique et la détection au moyen de la PCR en temps réel. Les réactifs de PCR prêts à être utilisés contiennent de l'ADN polymérase, des nucléotides, des amorces d'ADN et une sonde

d'hybridation d'ADN fluorescente ciblant une zone du génome hautement conservée de *Listeria monocytogenes*. La trousse contient tous les réactifs nécessaires à l'analyse. En PCR en temps réel, les sondes sont liées à un fluorophore, lequel fluoresce exclusivement pendant l'hybridation à la séquence cible. Dans les trousse*s* iQ-Check™ *Listeria monocytogenes*, la carboxyfluorescéine (FAM) est le fluorophore lié à la sonde d'hybridation à la séquence d'ADN spécifique de *Listeria monocytogenes*. En l'absence d'ADN cible, aucune fluorescence n'est détectée, et le logiciel iQ-Check™ détermine que l'échantillon est négatif. L'intensité de la fluorescence augmente proportionnellement à l'augmentation du nombre d'amplicons à chaque cycle d'amplification. Durant chaque cycle de PCR, à l'étape d'hybridation, le système de PCR en temps réel mesure cette fluorescence et le logiciel de la trousse reproduit sur graphique l'intensité de la fluorescence par rapport au nombre de cycles. Cette méthode permet une détermination simple de la présence de *Listeria monocytogenes* dans un échantillon donné. Dans le but de surveiller la réussite de l'amplification de l'ADN dans chaque puits de réaction, le mélange réactionnel contient un « contrôle interne » d'ADN synthétique destiné à surveiller une éventuelle inhibition. Ce contrôle est amplifié au moyen d'une sonde spécifique simultanément avec la séquence d'ADN cible, puis la détection par un second fluorophore a lieu.

4. Définition des termes

Voir [l'annexe A du volume 1](#).

5. Prélèvement des échantillons

Voir [l'annexe B du volume 1](#).

6. Matériel et équipements spéciaux

Note : Le superviseur du laboratoire est responsable de s'assurer 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: Le laboratoire est responsable 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 de méthodes](#) en vue d'une modification de la méthode.

1) Trousse iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* (n° 3578124 du catalogue Bio-Rad)

Réactif A – réactif de lyse, 1 flacon (20 ml) contenant une tige agitatrice magnétique

Réactif B – sondes fluorescentes, 1 tube (0,55 ml)

Réactif C – mélange d'amplification, 1 tube (4,4 ml)

Réactif D – témoin négatif de PCR, 1 tube (0,5 ml)

Réactif E – témoin positif de PCR, 1 tube (0,25 ml)

Réactif F – billes de lyse, 1 tube (17,6 g)

2) Fournitures et réactifs

Bouillon spécial *Listeria* (LSB) (n°s du catalogue Bio-Rad 3555703 pour 6 x 225 ml, 3564703 pour 500 g ou 3564753 pour 5 kg)

Tubes coniques à bouchon vissable de 1,5 ml, stériles (exclusivement pour l'extraction en

tube)
 Plaques de puits profonds (exclusivement pour l'extraction en plaque de puits profonds)
 Plaques à profil abaissé sans rebords pour PCR, de 48 ou 96 puits, blanches (n° MLL4851XTU, MLL9651XTU, HSP9955XTU du catalogue Bio-Rad)
 Barrettes de 8 bouchons optiques plats, ultra-transparents (n° TCS0803XTU du catalogue Bio-Rad)
 Film scellant percé au préalable (n° 3600040 du catalogue Bio-Rad) ou l'équivalent (pour extraction en plaque de puits profonds seulement)
 Gants non poudrés
 Embouts à filtre stériles adaptables aux micropipettes de 20 µL, de 200 µL et de 1 000 µL
 Sac à stomacher ou sac à stomacher avec filtre incorporé (recommandé pour la viande et les échantillons très denses en particules)
 Micropipettes de 20 µl, de 200 µl et de 1 000 µl
 Tube pour mélanger de PCR pour le système iQ-Check™ Prep (n° 3594901 du catalogue Bio-Rad)
 Embouts de pipette pour le système iQ-Check™ Prep (n° 3594902 et 3594903 du catalogue Bio-Rad)
 Fournitures et milieu de culture pour ensemencement et confirmation (c.-à-d. MFHPB-30)
 Cultures de contrôle positives et négatives (p. ex. souches ATCC)

3) Équipement

Centrifugeuse de table – vitesse maximale de 10 000 à 12 000 x g, pour tubes de 1,5 ml (pour extraction en tube seulement)
 CFX Manager Software – Industrial Diagnostic Edition (n° 3600042 du catalogue Bio-Rad)
 Bloc de chauffage à sec, pour tubes de 1,5 ml – maintenant une température de 95 à 100 °C (pour extraction en tube seulement)
 Incubateur – Maintenant une température de 30 °C pour incuber les échantillons
 Système d'automatisation iQ-Check Prep (facultatif) – pour l'extraction d'ADN et la préparation de plaque PCR (n° 3594911 du catalogue Bio-Rad)
 Plaque d'agitation magnétique
 Film scellant – pour sceller les plaques PCR Hard-Shell (n° 1814000 du catalogue Bio-Rad)
 Système de PCR en temps réel – système de détection PCR en temps réel CFX96 (n° 3600037 du catalogue Bio-Rad) ou système de détection PCR en temps réel MiniOpticon (n° 3591592 du catalogue Bio-Rad)
 Stomacher, mélangeur ou l'équivalent
 ThermoMixer® – maintenant une température de 95 à 100 °C (n° 3600038 [base] et 3600039 [bloc de puits profonds] ou n° 3594999 du catalogue Bio-Rad) (pour l'extraction en plaque de puits profonds seulement)
 Mélangeur vortex

Note : Chaque laboratoire a la responsabilité de s'assurer que les incubateurs et les bains-marie soient maintenus aux températures recommandées. Les dispositions suivantes s'appliquent aux étapes de la méthode reliées à la croissance seulement. Lorsqu'une température ≤ 37 °C est recommandée dans le texte de la méthode, l'incubateur peut-être à 35 ± 1.0 °C. Toutefois, lorsque des températures plus élevées sont recommandées, il est impératif que la température des incubateurs ou des bains-marie ne varie pas plus de 0.5 °C, parce qu'une température plus élevée peut être létale pour les micro-organismes qu'on cherche à isoler.

7. Marche à suivre

L'analyse doit être effectuée en suivant les instructions ci-dessous :

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 7.1.1 Au laboratoire, avant l'analyse, à l'exception des aliments de longue conservation, réfrigérer ou congeler les aliments comme leur conservation l'exige. Laisser dégeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur ou pendant une période et à une température empêchant la croissance ou la destruction microbiennes.
- 7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire.

7.2 Préparation de l'échantillon

Pour veiller à ce que l'unité d'analyse soit représentative, agiter les liquides ou les substances fluides jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Si l'unité d'échantillon est un solide, constituer l'unité d'analyse à partir de morceaux prélevés à différents endroits de l'échantillon.

- 7.2.1 Avant d'utiliser le LSB, veiller à ce que sa température atteigne 30 °C.
- 7.2.2 Préparer une dilution 1 dans 10 de l'aliment en mélangeant de manière aseptique 25 g ou ml dans 225 ml de LSB.
- 7.2.3 D'autres tailles d'unité d'analyse peuvent être utilisées, par exemple 65 g ou ml, en maintenant le rapport de dilution 1 dans 10. Ne pas dépasser le poids maximal de 125 g ou ml pour les échantillons analysés en composite.
- 7.2.4 Passer au mélangeur, au stomacher ou au vortex selon le cas de façon à obtenir un mélange bien homogène.
- 7.2.5 Incuber tous les échantillons à 30 °C pendant 25 ± 1 h.

7.3 Préparation à l'analyse

- 7.3.1 Mettre en marche le bloc chauffant (pour l'extraction en tube) ou le ThermoMixer® (pour l'extraction en plaques de puits profonds) à l'avance afin qu'il atteigne une température de 95 à 100 °C.
- 7.3.2 Mettre en marche le cycleur thermique et l'ordinateur.
- 7.3.3 Mettre en marche le système d'automatisation iQ-Check™ Prep (pour le traitement automatisé des échantillons).
- 7.3.4 Avec soin, verser tout le contenu du réactif F (billes de lyse) dans le réactif A (réactif de lyse).
- 7.3.5 Procéder à l'étape 7.4 pour l'extraction de l'ADN avec tube ou à l'étape 7.5 pour l'extraction de l'ADN avec puits d'une microplaque.

7.4 Extraction de l'ADN – avec tube

- 7.4.1 Placer le réactif de lyse (A + F) sur la plaque d'agitation magnétique et agiter à vitesse moyenne.

Note : Un ajustement à la vitesse moyenne est utilisé pour s'assurer que les billes de lyse demeurent en

suspension pendant la distribution. L'utilisation de réactif non homogène pourrait avoir un impact sur les résultats finaux.

- 7.4.2 Ajouter 100 µl du réactif de lyse à chaque tube conique à bouchon vissable de 1,5 ml.
- 7.4.3 Prélever 100 µl du bouillon enrichi de l'échantillon et les ajouter au tube contenant le réactif de lyse. Mélanger la solution en pipetant en mouvements ascendants et descendants au moins 3 fois.
- 7.4.4 Placer le tube dans le bloc de chauffage à une température de 95 à 100 °C pendant 15 min.
- 7.4.5 Mélanger à haute vitesse au moyen de mélangeur Vortex.
- 7.4.6 Centrifuger à une vitesse de 10 000 à 12 000 x g pendant 2 min.
- 7.4.7 Utiliser ces échantillons à l'étape 7.6.3.

7.5 Extraction de l'ADN – avec plaque de puits profonds

- 7.5.1 Ajouter 100 µL du réactif de lyse (A + F) à chaque puits d'une microplaque de puits profondément de l'échantillon.
- 7.5.2 Transférer une aliquote de 100 µL de chaque échantillon dans la microplaque de puits profonds.
- 7.5.3 Pour l'utilisation du système d'automatisation iQ-Check™ Prep, placer la plaque de puits profonds non scellée, les réactifs et les articles consommables dans l'instrument aux fins du traitement automatisé des échantillons.
- 7.5.4 Pour l'extraction manuelle en plaque de puits profonds, sceller cette dernière avec un film scellant préalablement percé.
- 7.5.5 Placer dans le ThermoMixer® réglé à une température de 95 à 100 °C, à 1 300 rpm pendant 15 à 20 min.
- 7.5.6 Retirer la plaque du ThermoMixer® et laisser refroidir au réfrigérateur pendant au moins 10 minutes.
- 7.5.7 Utiliser ces échantillons à l'étape 7.6.3

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 à 96 puits en pipetant soigneusement pour éviter la formation de bulles.
- 7.6.3 Ajouter une aliquote de 5 µl de chaque échantillon ou contrôle dans le puits approprié. Si l'extrait d'ADN a été obtenu à partir du tube (7.4.6), pipeter soigneusement le surnageant en prenant soin de ne pas déranger le culot.
- 7.6.4 En plus du bouillon normalisé/des contrôles d'enrichissement du laboratoire, un

contrôle positif (réactif E) et un contrôle négatif (réactif D) devraient être analysés avec chaque épreuve. Les contrôles prêts à utiliser sont compris dans la trousse.

Note : Étapes 7.6.1 à 7.6.4 sont effectuées automatiquement par le système d'automatisation iQ check™ Prep.

- 7.6.5 Sceller la plaque au moyen des bouchons optiques ou du scellant à plaque PX1 (exclusivement pour les plaques à coquille dure).
- 7.6.6 Placer la plaque dans le module de réaction du cycleur thermique et fermer le couvercle.
- 7.6.7 S'assurer que la configuration de la plaque et que le protocole sélectionné sont appropriés.
- 7.6.8 Cliquer sur le bouton « run » du programme du logiciel.
- 7.6.9 Une fenêtre vous permettant de sauvegarder vos données à l'endroit de votre choix s'affichera. La sélection de « save » démarrera le protocole de PCR.
- 7.6.10 À la fin de l'analyse, un rapport sera produit attribuant un résultat positif ou négatif à chaque échantillon.

7.7 Interprétation des résultats

- 7.7.1 Le logiciel CFX Manager IDE déterminera si un échantillon est positif, négatif, inhibé ou non valide.
- 7.7.2 La valeur Cq d'un échantillon positif contaminé par *Listeria monocytogenes* doit être ≥ 10 pour le fluorophore FAM.
- 7.7.3 S'il n'y a pas de valeur Cq (Cq=N/A) pour le fluorophore FAM, le contrôle interne pour cet échantillon doit être analysé. Cet échantillon est considéré comme négatif, soit non contaminé par *Listeria monocytogenes* si sa valeur Cq est ≥ 28 .
- 7.7.4 Si le contrôle interne n'a pas de valeur Cq (Cq= N/A), il est impossible d'interpréter le résultat. Un tel résultat révèle l'inhibition de la réaction de PCR.
- 7.7.5 Dans le cas d'un échantillon désigné comme non valide, la PCR devrait être reprise. Si la situation se répète, communiquer avec l'assistance technique de Bio-Rad et procéder aux étapes de confirmation pour cet échantillon.

7.8 Confirmation des résultats présumés positifs

Utiliser l'aliquote de l'échantillon enrichi dans le LSB 24 h, procéder à l'ensemencement et aux étapes de confirmation décrites dans la section *Méthode d'isolement* de la méthode de culture MFHPB-30. Utiliser au moins l'une des géloses chromogènes qui y figurent en plus de la gélose Oxford. De plus, transférer 0,1 ml du bouillon présumé positif dans le bouillon Fraser modifié et suivre les étapes d'incubation et de confirmation de la méthode de culture MFHPB-30 à partir du bouillon Fraser modifié. Retourner le reste du bouillon LSB 24h enrichi de l'échantillon dans l'incubateur et continuer l'incubation jusqu'à 48 h comme demandé, pour utiliser tel que requis dans la confirmation des résultats présumés positifs tels que décrits dans la méthode MFHPB-30.

Une fois que les résultats présumés positifs ont été confirmés, les autres étapes de confirmation peuvent être abandonnées. Cependant, toutes les étapes d'ensemencement doivent être effectuées telles que décrites ci-dessus avant de déclarer négatif un résultat présumé positif.

8. Références

- 8.1 Bio-Rad Laboratories – IQ-Check™. « *Listeria monocytogenes* II kit user guide », disponible au : <http://www.bio-rad.com/en-us/product/iq-check-listeria-monocytogenes-ii-kit>
- 8.2 Pagotto, F., K. Hébert et J. Farber. « Isolation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. from foods and environmental samples (MFHPB-30) », 2011, volume 2 du *Compendium de méthodes*.
- 8.3 Warburton, D., A. Boville, F. Pagotto, E. Daley et C. Chow. 2012. « The isolation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. from foods and environmental samples using Palcam broth (MFHPB-07) », 2012, volume 2 du *Compendium de méthodes*.

Fin du document