

RAPID' *Campylobacter* / Gélose

356-4295
356-4296

DOMAINE D'APPLICATION

La gélose RAPID' *Campylobacter* est un milieu sélectif chromogénique utilisé pour la recherche et le dénombrement des principales espèces de *Campylobacter* thermotolérants (*C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*) dans les produits d'alimentation et les échantillons de l'environnement.

NF VALIDATION par AFNOR CERTIFICATION selon le protocole EN ISO 16140

La méthode RAPID' *Campylobacter* est certifiée NF VALIDATION comme méthode alternative à la norme ISO/TS 10272-2 (Janvier 2006) pour le dénombrement des *Campylobacter* spp, selon le protocole ISO 16140, dans les volailles et produits à base de volaille, les viandes et produits à base de viande, ainsi que dans les échantillons de l'environnement.



BRD-07/25-01/14
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSES POUR
L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFNOR Certification
www.afnor-validation.org

REFERENCE(S) NORMATIVE(S)

- **ISO 10272-1:2006 (2006-01-15)**
Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des *Campylobacter* spp. - Partie 1 : méthode de recherche
- **ISO/TS 10272-2:2006 (2006-01-15)**
Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des *Campylobacter* spp. - Partie 2 : technique par comptage des colonies

PRINCIPE

La gélose RAPID' *Campylobacter* permet le développement des principales espèces de *Campylobacter* thermotolérants (*C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*) en 24 à 48 heures. Une association d'éléments nutritifs et de composés réducteurs favorise la croissance des *Campylobacter* qui produisent des colonies

rouge brique sur le milieu. Les autres espèces bactériennes, ainsi que les levures et moisissures sont inhibées grâce au mélange sélectif.

PRESENTATION

• **Déshydraté**
500g code 356-4295

• **Supplément Lyophilisé**
10 flacons QSP 400 ml code 356-4296

CONSERVATION/VALIDITE/LOT

- Déshydraté : + 15 - 25 °C, flacon soigneusement fermé dans un endroit frais et sec.
- Supplément lyophilisé : 2-8°C à l'abri de la lumière.
- Milieu préparé par l'utilisateur :
 - Base non supplémenté : 6 semaines à 2-8°C et à l'obscurité.
 - Boîtes de Petri reconstituées : 2 semaines à 2-8°C et à l'obscurité emballées dans sac plastique ou équivalent.
- La date de péremption et le numéro du lot sont indiqués sur le conditionnement.

FORMULE THEORIQUE

Mélange nutritif	28.5 g
Mélange réducteur	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Tampon	1.25 g
Mélange sélectif	0.082 g
Substrat chromogène	0.05 g
Agar	14 g

Eau q.s.p. 1 L
pH (25°C) final = 7.2 à 7.5



H315 Provoque une irritation cutanée.
H319 Provoque une sévère irritation des yeux.
H335 Peut irriter les voies respiratoires.

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

(liste non exhaustive)

- Balance
- Sacs de pesée stériles
- Broyeur
- Agitateur-homogénéisateur
- Boîtes de Petri stériles
- Pipettes stériles (0,1 ml ; 1 ml.....)

RAPID' *Campylobacter* / Gélose

- Ôse bouclée
- Pipettes Pasteur stériles
- Bains-marie
- Etuve ou enceinte thermostatée
- Tout matériel courant d'un laboratoire

AUTRE(S) PRODUIT(S) NECESSAIRE(S) NON FOURNI(S)

Méthode de recherche :

- Bouillon Bolton
- Bouillon Preston
- Gélose mCCD
- Dispositif approprié à la culture en atmosphère microaéroophile

Méthode de dénombrement :

- Tryptone-Sel :
 - 9 ml x 25 tubes (ex. code 355-5754)
 - 90 ml x 6 flacons (ex. code 355-5756)
 - 500 g (ex. code 356-4544)
 - 5 poches de 3 l (ex. code 355-5796)
- Eau Peptonée Tamponnée :
 - 6 flacons de 225 ml (ex. code 355-4179)
 - 500 g (ex. code 356-4684)
 - 5 poches de 3 l (ex. code 355-5795)
 - 2 poches de 5 l (ex. code 355-5790)
- Dispositif approprié à la culture en atmosphère microaéroophile

Confirmation

- Gélose Columbia (ex. code 356-3784)
- Eau physiologique (ex. code 355-4164)
- Disque oxydase (ex. code 355-3834)
- Eau distillée stérile (ex. code 355-4154)
- *Campylobacter* Confirm Latex (code 356-4297)
- iQ-Check *Campylobacter* (code 357-8135)

PREPARATION DU MILIEU DESHYDRATE MODE D'EMPLOI

« Toujours agiter avant chaque utilisation »

Reconstitution du Supplément Lyophilisé (code 356-4296)

- Réhydrater aseptiquement par 30 ml d'eau distillée stérile (ex. code 355-4154) le lyophilisat.
- Homogénéiser jusqu'à dissolution complète.

Milieu complet

- Dissoudre **20g** de poudre (code 356-4295) dans **370 ml** d'eau distillée.
- Mélanger jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.
- Chauffer lentement, en agitant fréquemment, puis porter à ébullition.
- Stériliser en autoclavant pendant 15 minutes à 121°C.
- Refroidir à 47/50°C.

- Ajouter aseptiquement 1 flacon reconstitué de supplément RAPID' *Campylobacter* (code 356-4296).
- Bien mélanger et répartir en boîtes de Petri.
- Avant utilisation, les boîtes de Petri doivent être soigneusement séchées (cf. § Précautions).

PROTOCOLES

Recherche : Méthode normalisée ISO 10272-1:2006 (2006-01-15)

Préparation et enrichissement des échantillons

- A effectuer conformément à la norme ISO 10272-1:2006 (2006-01-15)

Ensemencement et incubation

- A effectuer conformément à la norme ISO 10272-1:2006 (2006-01-15).
- Incuber les boîtes de RAPID' *Campylobacter*, couvercle vers le bas, pendant 24 heures à 48 heures à 41.5°C ± 1°C en atmosphère microaéroophile.

Lecture

- Les *Campylobacter* produisent des colonies rouges brique.

Confirmation

- A effectuer conformément à la norme ISO 10272-1:2006 (2006-01-15)

Dénombrement : Méthode alternative RAPID' *Campylobacter* validée ISO 16140

Préparation des échantillons, ensemencement et incubation

- Préparer l'échantillon à analyser conformément à la norme ISO 10272-2:2006 (2006-01-15).

Etalage et Incubation

- Etaler 0.1 mL en surface d'une gélose RAPID' *Campylobacter*, ou 1 mL sur 3 boîtes de gélose RAPID' *Campylobacter*.
- Effectuer si nécessaire, une dilution au 1/10 (ou plus) dans les diluants Tryptone-Sel ou Eau peptonée tamponnée selon la norme ISO 6887-1, et étaler 0,1 ml de chaque dilution sur 1 boîte de RAPID' *Campylobacter*.
- Incuber les boîtes, couvercle vers le bas, pendant 24 heures à 48 heures à 41.5°C ± 1°C en atmosphère microaéroophile.
- Après incubation, les géluses RAPID' *Campylobacter* peuvent être conservées au froid (2-8°C) pendant 72 heures en atmosphère microaéroophile avant lecture et/ou confirmation.

Lecture

- Les *Campylobacter* produisent des colonies

2/4

RAPID' *Campylobacter* / Gélose

rouge brique bien visibles.

Confirmation

Après 24 heures d'incubation :

- Réaliser un test PCR iQ-Check *Campylobacter* (code 357-8135) directement à partir d'une colonie caractéristique de *Campylobacter*.

Après 44 ± 4 heures d'incubation :

- Par l'utilisation des tests classiques décrits dans la norme ISO 10272-1:2006 (2006-01-15)
- A l'aide d'un test PCR iQ-Check *Campylobacter* (code 357-8135) réalisé directement à partir d'une colonie caractéristique de *Campylobacter*.
- Par l'utilisation d'un test *Campylobacter* Confirm Latex (code 356-4297) sur colonie isolée.

NB : Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, les temps d'incubation inférieurs à 44 h +/- 4h n'ont pas été validés.

Expression des résultats

- A effectuer conformément à la norme ISO 10272-2 :2006 (2006-01-15).

NB : Le fait de ne pas confirmer 5 colonies en dénombrement implique un risque de rendre un résultat surestimé du fait de la présence éventuelle de colonies caractéristiques qui ne seraient pas des *Campylobacter* spp..

Recherche : Méthode alternative RAPID' *Campylobacter*

Préparation des échantillons

Diluer h g ou h mL de l'échantillon dans 9 x h mL de bouillon Preston ou Bolton.
Exemple : Diluer 25 g d'échantillon dans 225 mL de bouillon Preston ou Bolton.

Enrichissement

Preston : Incuber à 41,5°C ± 1°C pendant 24h ± 2 heures en atmosphère microaéroophile.
Bolton : Incuber à 37°C +/- 1°C pendant 4 à 6 heures puis à 41.5°C +/- 1°C pendant 44h ± 4 heures en atmosphère microaéroophile.

Ensemencement et incubation

- Prélever 10µl de bouillon d'enrichissement en fin d'incubation, à l'aide d'une öse stérile.
- Ensemencer une gélose de RAPID' *Campylobacter* selon les techniques traditionnelles d'isolement en stries.
- Incuber les boîtes de RAPID' *Campylobacter*, couvercle vers le bas, pendant 24 heures à 44 ± 4 heures à 41.5°C ± 1°C en atmosphère microaéroophile.

- Après incubation, les géloses RAPID' *Campylobacter* peuvent être conservées au froid (2-8°C) pendant 72 heures en atmosphère microaéroophile avant lecture et/ou confirmation.

Lecture

- Les *Campylobacter* produisent des colonies rouge brique.

Confirmation

Après 24 heures d'incubation :

- Réaliser un test PCR iQ-Check *Campylobacter* (code 357-8135) directement à partir d'une colonie caractéristique de *Campylobacter*.

Après 44 ± 4 heures d'incubation :

- Par l'utilisation des tests classiques décrits dans la norme ISO 10272-1:2006 (2006-01-15)
- A l'aide d'un test PCR iQ-Check *Campylobacter* (code 357-8135) réalisé directement à partir d'une colonie caractéristique de *Campylobacter*.
- Par l'utilisation d'un test Latex *Campylobacter* (code 356-4297) sur colonie isolée.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire (EN ISO 7218).
- Ne pas exposer les boîtes de Petri aux rayons du soleil.
- Après répartition, laisser le milieu se stabiliser en stockant les boîtes de Petri une nuit à température ambiante et à l'obscurité. Avant ensemencement, les géloses doivent être suffisamment sèches, sans humidité visible en surface, pour éviter la propagation des colonies (par exemple en les séchant 15 min à 56 °C en incubateur)
- Les boîtes de Petri peuvent être stockées 2 semaines à 2-8°C. Avant ensemencement, laisser les boîtes revenir à température ambiante. Les géloses doivent être suffisamment sèches, sans humidité visible en surface, pour éviter la propagation des colonies (par exemple en les séchant 15 min à 56 °C en incubateur)
- Lors de la validation NF VALIDATION, la souche *Ralstonia mannitolytica* a révélé des colonies typiques après 48 h d'incubation. Cette souche, très rare en matrice alimentaire, est négative en confirmation. Elle présente une réaction d'agglutination atypique avec le test de confirmation *Campylobacter* Confirm Latex (code 356-4297) :
 - agglutination faible d'apparence mucoïde, et filamenteuse très différente d'une

RAPID' *Campylobacter* / Gélose

agglutination typique, granuleuse, homogène et dense.

- Après 24h d'incubation des géloses, si les colonies sont de trop petite taille pour être aisément dénombrable, une prolongation jusqu'à 48h de l'incubation est possible.
- En cas de résultats discordants (positif sur la gélose RAPID' *Campylobacter*, négatif par la méthode de confirmation), le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

PERFORMANCES / CONTROLE QUALITE DU TEST

Les performances culturales sont contrôlées à l'aide des souches référencées.

MICRO-ORGANISMES	Aspect après 24 à 48h à 41.5 °C en atmosphère microaérophile
<i>Campylobacter coli</i> ATCC 43478 (WDCM 00004)	Bonne croissance Colonies rouge brique
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 29428 (WDCM 00156)	Bonne croissance Colonies rouge brique
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (WDCM 00012)	Inhibition totale
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (WDCM 00034)	Inhibition totale

CONTROLE QUALITE

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis.

Chaque lot du produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et il n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation.

La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée.

La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée.

MOTS CLES

RAPID' *Campylobacter* / *Campylobacter* / Produits à base de viande / Produits à base de volaille / Dénombrement