

RAPID' *E. coli* O157:H7/Gélose**356-4748****DOMAINE D'APPLICATION**

Milieu **chromogénique** sélectif pour la recherche, l'isolement et l'identification présomptive des *Escherichia coli* O157:H7 dans les produits destinés à l'alimentation humaine et les échantillons d'environnement.

PRINCIPES

Le milieu RAPID' *E. coli* O157 : H7 est un milieu sélectif combinant à la fois des substrats chromogéniques et des indicateurs biochimiques. Cette association permet l'identification présomptive directe des *E. coli* O157 : H7, incluant les souches atypiques, parmi la flore interférente sur la base de profils enzymatiques et métaboliques spécifiques observés.

La sélectivité du milieu est augmentée par l'ajout d'agents sélectifs : novobiocine (10 mg/l) et tellurite de potassium (0.8 mg/l).

NF VALIDATION par AFNOR CERTIFICATION selon le protocole EN ISO 16140

La méthode RAPID' *E. coli* O157 :H7 est certifiée NF VALIDATION comme méthode alternative à la norme de référence NF EN ISO 16654, selon le protocole ISO 16140, pour la **recherche des *Escherichia coli* O157 :H7 pour tous produits d'alimentation humaine** et pour les échantillons d'environnement.



BRD 07/14-09/07
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSES POUR
L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFNOR Certification
www.afnor-validation.com

Pour toute information concernant la fin de validité de la certification NF VALIDATION, consulter l'attestation BRD 07/14-09/07 disponible auprès du service client de Bio-Rad ou d'AFNOR Certification.

VALIDATION AOAC-RI

RAPID' *E. coli* O157 :H7 est validé AOAC Research Institute selon le protocole « Performance Methods Tested », sous le n° d'attestation : 060701.

REFERENCES NORMATIVES**NF EN ISO 16654 (juillet 2001)**

Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche des *Escherichia coli* O157

PRESENTATION**Déshydraté**

- 100g **code 356-4748**
- Novobiocine (1 flacon de 1 g) **code 356-4610**

CONSERVATION/VALIDITE/LOT

- Déshydraté : 2 - 8°C, flacon soigneusement fermé.
- La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

FORMULE THEORIQUE

Mélange d'enrichissement	58 g
Agents sélectifs	6,25 g
Mélange chromogénique	0,75 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 mL

pH (25°C) final = 6,9 ± 0,2

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

- Bouillon mTSB :
Prêt à l'emploi (avec novobiocine):
6 flacons de 225 ml **(ex. code 355-5426)**
Déshydraté (base) :
500 g **(ex. code 356-4426)**
- Novobiocine (ex. 1 flacon /1 g **code 356-4610**)
- Tellurite de potassium

Voir Fiche(s) Technique(s) correspondante(s)

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI (liste non exhaustive)

- Balance
- Sacs stomacher avec filtre fin
- Broyeur
- Agitateur-homogénéisateur
- Boîtes de Pétri stériles (Ø = 90 mm)
- Pipettes stériles (1 mL.....)

RAPID' *E. coli* O157:H7/Gélose et méthode

- Cônes à filtre pour micro-pipettes (100(0)µL)
- Oses bouclées
- Pipettes Pasteur stériles
- Bain-marie à ± 1 °C
- Etuve ou enceinte thermostatée à ± 1 °C
- Billes d'immunoconcentration *E. coli* O157 et portoir magnétique
- Tests latex de confirmation *E. coli* O157 : H7
- Tout matériel courant d'un laboratoire

PREPARATION DU MILIEU DESHYDRATE

« Toujours agiter avant chaque utilisation »

Dissoudre 80 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée. Mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Ajuster le pH à 6,9 +/- 0,2 à 25°C en utilisant soit NaOH ou HCl 1N. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Eviter la surchauffe. NE PAS AUTOCLAVER. Refroidir à 45-50°C au bain-marie. Ajouter stérilement la novobiocine (code 356-4610) (qsp 10 mg/L dans le milieu complet) et le tellurite de potassium (qsp 0,8 mg/L dans le milieu complet).

Mélanger et répartir dans des boîtes de Pétri stériles. Laisser sécher à température ambiante une nuit. pH final 6,9 +/- 0,2 à 25°C

Supplément novobiocine : Dissoudre 100 mg de novobiocine (code 356-4610) dans 1 ml d'eau distillée stérile. Stériliser par filtration à l'aide d'un filtre absolu de 0,2 µm et d'une seringue à usage unique. Vous pouvez conserver cette solution de novobiocine plusieurs mois à 4°C dans une bouteille opaque.

**Taux de reconstitution : 80 g /L
100 g de poudre permettent de réaliser 1,25 litres de milieu**

PROTOCOLES

Recherche des *Escherichia coli* O157:H7 dans ηg ou ηml d'échantillon:

METHODE NORMALISEE :

• Préparation des échantillons/ Enrichissement

A effectuer conformément à la norme du produit concerné.

• Immunoséparation

Suivre **strictement** les recommandations du fournisseur pour le protocole d'immunoséparation.

• Isolement et incubation

Prélever 50 µl de billes lavées et remises en suspension après immunoséparation avec une

micropipette stérile et réaliser un isolement selon les techniques traditionnelles, sur la gélose RAPID' *E.coli* O157 :H7 en parallèle d'une boîte de CT-SMAC. Incuber à 37°C \pm 1°C.

METHODE ALTERNATIVE :

• Préparation de l'échantillon/ Enrichissement sélectif

- Ensemencer η g ou η ml de l'échantillon dans 9 x η ml de bouillon mTSB+ novobiocine (20 mg/l).
- Incuber à 41.5 °C pendant 16-24 heures.

• Immunoséparation

- Utiliser un dispositif de billes paramagnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques pour la capture des *E. coli* O157. Suivre précisément les recommandations du fournisseur pour le protocole d'immunoséparation.

Note : Les échantillons visqueux ou gras peuvent provoquer des interférences pour la capture de billes magnétiques (récupération faible, spécificité d'action des anticorps diminuée).

Se reporter aux solutions techniques des fournisseurs pour le traitement de ces échantillons.

• Isolement et Incubation

- Prélever 50 µl de billes lavées et remises en suspension après immunoséparation avec une micropipette avec cônes stériles et réaliser un isolement en stries selon les techniques traditionnelles, sur la gélose RAPID' *E.coli* O157:H7. Incuber 24h \pm 2h à 37°C \pm 1°C.

Note : Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, les prises d'essais supérieures à 25g n'ont pas été testées.

LECTURE ET CONFIRMATION

• Lecture

Réaliser une lecture après incubation de 24h \pm 2h. Les *Escherichia coli* O157:H7 typiques (sorbitol - et β-glucuronidase -) présentent des colonies caractéristiques bombées brillantes de 1 à 2 mm, de couleur bleu-foncé à noire avec un léger précipité noir en périphérie de la colonie. Les *Escherichia coli* O157:H7 atypiques β-glucuronidase + forment des colonies de même type.

Les souches d'*Escherichia coli* O157:H7 atypiques sorbitol + sont également détectées. Ces colonies présenteront une couleur bleue à bleue turquoise avec un faible précipité noir en périphérie de la colonie.

Note : On notera un virage complet au rouge de

RAPID' *E. coli* O157:H7/Gélose et méthode

la gélose, en présence de souches pures d'*E. coli* O157:H7.

Sur une gélose avec un mélange de souches, les *Escherichia coli* O157:H7 typiques présenteront des colonies bleu-foncé à noires avec un léger précipité noir en périphérie de la colonie, pouvant parfois être associé à un halo rouge.

• Confirmation des colonies caractéristiques

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, la confirmation doit être effectuée selon une des manières suivantes :

1-Par l'utilisation des **tests classiques** décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification) ou par l'utilisation de **sondes nucléiques** ayant fait l'objet d'une validation comme par exemple la PCR **iQ-Check™ *E.coli* O157:H7**. (code **357 8114**) à partir des colonies isolées (avec ou sans l'étape de purification).

2- L'utilisation de **tests latex** O157 et H7, à partir de 1 à 3 colonies isolées. Il est nécessaire d'effectuer une étape d'isolement en cas de confirmation avec 2 latex.

Note :

- Pour l'utilisation des tests latex, se référer précisément à la notice et aux recommandations de mise en oeuvre du fabricant.

- Dans le cas de colonies caractéristiques donnant un test latex O157 positif et H7 négatif, le laboratoire devra mettre en oeuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

3- L'utilisation de toute **autre méthode certifiée NF VALIDATION de principe différent** du RAPID'*E.coli* O157:H7. Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble, c'est à dire que toutes les étapes antérieures à l'étape intermédiaire de laquelle on repart pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes.

En cas de résultats discordants (positifs par la méthode alternative, négatifs par l'une des options décrites ci-dessus, et en particulier pour les tests Latex) le laboratoire devra mettre en oeuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- La réalisation de l'étape d'immunoséparation nécessite une formation adéquate et une pratique régulière de la technique.
- La lecture des tests latex peut nécessiter une formation préalable.
- Les précautions d'usage relatives à la manipulation de produits potentiellement contaminés, dans un laboratoire de microbiologie doivent être observées.
- Avant d'utiliser les boîtes de RAPID'*E. coli* O157:H7, laisser sécher, selon la norme EN ISO 11133-1, à 25°C-50°C jusqu'à disparition des gouttelettes à la surface du milieu. Toutefois, éviter un séchage prolongé qui pourrait altérer les performances du milieu.
- Respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire (EN ISO 7218).

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.

QUALITE ET PERFORMANCES DU TEST

MICRO-ORGANISMES	Aspect des colonies après 24 heures à 37 °C	
	CROISSANCE	COULEUR
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 700728	+	Colonie bleue à noire avec précipité noir en périphérie
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43888	+	Colonie bleue à noire avec précipité noir en périphérie
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	partielle à inhibition	Colonie verte avec précipité vert en périphérie
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	NA

MOTS CLES

RAPID'*E. coli* O157:H7 / *Escherichia coli* / *Escherichia coli* O157 / *Escherichia coli* O157:H7 / Détection / Produits alimentaires/ Environnement / Chromogénique / Milieu.