

RAPID' Sakazakii/Gélose**356-4976****DOMAINE D'APPLICATION**

Milieu **chromogénique** sélectif pour la recherche de ***Cronobacter* spp.** (anciennement ***Enterobacter sakazakii***) dans les poudres de lait, les produits déshydratés pour alimentation infantile ainsi que dans leurs matières premières et leur environnements de production.

NF VALIDATION par AFNOR CERTIFICATION selon le protocole EN ISO 16140

La méthode RAPID' Sakazakii est certifiée NF VALIDATION comme méthode alternative à la norme ISO/TS 22964 (2006) pour la recherche des *Cronobacter* spp. dans les poudres de lait infantile selon le protocole ISO 16140.



BRD 07/22 – 05/12
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSES POUR
L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFNOR Certification
www.afnor-validation.com

REFERENCE(S) NORMATIVE(S)**• ISO/TS 22964 – IDF/RM 210 (Février 2006)**

Lait et produits laitiers – Détection de l'*Enterobacter sakazakii*.

PRINCIPE

Le principe du milieu repose sur la mise en évidence d'une activité enzymatique caractéristique de *Cronobacter* spp. : l' α -glucosidase. Sous son action, le substrat chromogénique 5-bromo-4-chloro-3-indolyl α -D-glucopyranoside est hydrolysé provoquant la coloration en bleu à bleu vert des colonies de *Cronobacter* spp.

La température d'incubation fixée à 44°C associée au désoxycholate de sodium et au cristal violet permet d'inhiber la croissance d'une partie de la microflore associée.

PRESENTATION**• Déshydraté**

500 g

code 356-4976**CONSERVATION/VALIDITE/LOT**

- Déshydraté : + 2 - 8 °C, flacon soigneusement fermé dans un endroit frais, sec et à l'obscurité.
- La date de péremption et le numéro du lot sont indiqués sur le conditionnement.
- Flacons préparés par l'utilisateur : 1 mois à + 2 - 8 °C et à l'obscurité.
- Boîtes préparées par l'utilisateur : 15 jours à + 2 - 8 °C et à l'obscurité.

FORMULE THEORIQUE

| | |
|---|----------|
| Peptone pancréatique de caséine | 10,0 g |
| Extrait de levure | 3,0g |
| Chlorure de sodium | 5,0 g |
| Désoxycholate de sodium | 0,6g |
| Cristal violet | 2,0 mg |
| 5-bromo-4-chloro-3-indolyl α -D-glucopyranoside | 150,0 mg |
| Agar | 18,0 g |
| Eau distillée | 1000 mL |

pH final = 7,0 \pm 0,2**MATERIEL NECESSAIRE (NON FOURNI)**

(liste non exhaustive)

- Balance
- Sacs de pesée stériles
- Broyeur
- Agitateur - homogénéisateur
- Pipettes stériles (0,1ml ; 1 ml,....)
- Boîtes de Pétri stériles (\varnothing = 90 mm)
- Pipette Pasteur stériles
- Bain-marie avec une précision de \pm 1 °C
- Etuves ou enceintes thermostatées avec une précision de \pm 1 °C
- Autoclave
- Tout matériel courant d'un laboratoire

PREPARATION DU MILIEU DESHYDRATE**Toujours agiter avant chaque utilisation**

Dissoudre 36,7 grammes de poudre dans un litre d'eau distillée. Attendre 5 minutes, puis mélanger jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. Chauffer lentement, en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à complète dissolution. Répartir, puis stériliser à l'autoclave à 121°C (\pm 1°C) pendant 15 minutes.

Couler environ 18 ml de milieu par boîte de Petri stérile (90 mm). Laisser solidifier sur une surface fraîche et horizontale.

Taux de reconstitution : 36,7 g/l**500 grammes de poudre permettent de reconstituer 13.6 litres de milieu.**

RAPID' Sakazakii/Gélose

PROTOCOLES

Méthode alternative RAPID' Sakazakii certifiée NF VALIDATION (protocole court)

• Préparation de l'échantillon/Enrichissement

- Diluer η g de l'échantillon dans 9 x η ml d'Eau Peptonée Tamponnée (ex. codes **355-4179, 355-5789, 356-4684 et 355-5790**).
- Incuber à 37°C (± 1°C) pendant 18 h (± 2 h).

Note :

- Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, les prises d'essai supérieures à 30g n'ont pas été testées.
- Après l'étape d'incubation, il est possible de conserver le bouillon 48h à 2-8°C avant l'ensemencement des boîtes.

• Isolement et Incubation

- Prélever le bouillon d'enrichissement en fin d'incubation avec une ôse bouclée stérile.
- Ensemencer à la surface de la gélose RAPID' Sakazakii selon les techniques traditionnelles d'isolement en stries.
- Incuber les boîtes à l'envers à 44°C (± 1°C) pendant 24 h (± 2 h).

• Lecture

- Réaliser une lecture après 24 heures d'incubation. Les colonies typiques de *Cronobacter* spp. présentent une coloration bleue à bleu-vert caractéristique. Les colonies non typiques sont souvent légèrement transparentes avec une coloration violette.

Protocole ISO/TS 22964

• Préparation de l'échantillon/Enrichissement primaire

- Diluer η g ou η ml de l'échantillon dans 9 x η ml d'Eau Peptonée Tamponnée (ex. codes **355-4179, 355-5789, 356-4684 et 355-5790**).
- Incuber à 37°C (± 1°C) pendant 18 h (± 2 h).

• Enrichissement sélectif secondaire

- Transférer 0,1 ml de la culture obtenue en Eau Peptonée Tamponnée dans 10 ml de bouillon mLST/vancomycine
- Incuber à 44 °C (± 0,5 °C) pendant 24 heures (± 2 h).

• Isolement et Incubation

- Prélever le bouillon d'enrichissement en fin d'incubation avec une ôse bouclée stérile.
- Ensemencer à la surface de la gélose RAPID' Sakazakii selon les techniques traditionnelles d'isolement en stries.
- Incuber les boîtes à l'envers à 44°C (± 1°C) pendant 24 h (± 2 h).

• Lecture

- Réaliser une lecture après 24 heures d'incubation. Les colonies typiques de

Cronobacter spp. présentent une coloration bleue à bleu-vert caractéristique. Les colonies non typiques sont souvent légèrement transparentes avec une coloration violette.

Confirmation des colonies caractéristiques Protocole ISO et protocole court.

Dans le cadre de la la marque NF VALIDATION, tous les résultats présomptifs positifs doivent être confirmés.

Pour la confirmation et l'identification des colonies présumées *Cronobacter* spp., sélectionner de 1 à 5 colonies caractéristiques bleues/bleue-vertes, (s'il y en a moins, les retenir toutes) et procéder aux tests d'identification selon la norme ISO/TS 22964, incluant l'étape d'isolement sur gélose TSA.

• Expression des résultats/Calculs

- Se reporter aux normes ISO/TS 22964 et ISO 7218.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Les précautions d'usage relatives à la manipulation de produits potentiellement contaminés, dans un laboratoire de microbiologie doivent être observées.
- Respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire (EN ISO 7218).

PERFORMANCES/CONTROLE QUALITE DU TEST

Les performances culturelles sont contrôlées à l'aide des souches suivantes :

| MICRO-ORGANISMES | Aspect des colonies après 24 heures d'incubation à 44 °C | |
|---|--|-------------|
| | CROISSANCE | COULEUR |
| <i>Cronobacter sakazakii</i> LMG 23826 | + | Bleue-verte |
| <i>Escherichia coli</i> WDCM 00013 | + | Violettes |
| <i>Bacillus cereus</i> WDCM 00001 | - | NA |

NA: non applicable

CONTROLE QUALITE DU FABRICANT

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.

RAPID' *Sakazakii*/Gélose

BIBLIOGRAPHIE

GUILLAUME-GENTIL, O., SONNARD, V., KANDHAI, M.C., MARUGG, J.D., and JOOSTEN, H. 2005. A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *Journal of Food Protection*, 68(1) : 64-69.

GURTLER, J.B., KORNACKI, J.L., and BEUCHAT, L.R. 2005. *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology*, 104 : 1-34.

IVERSEN, C., DRUGGAN, P., and FORSYTHE, S. 2004. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, 96 : 133-139.

LEHNER, A., and STEPHAN, R. 2004. Microbiological, epidemiological and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Food Protection*, 67(12) : 2850-2857.

SIMMONS, B.P., GELFAND, M.S., HASS, M., METTS, L. and FERGUSON, J. 1989. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 10 : 398-401.

MOTS CLES

RAPID' *Sakazakii* / *Cronobacter sakazakii* /
Detection / Infant Food / Chromogenic /
Medium.