

Assurance® GDS MPX ID pour les principaux STEC

Certificat NF Validation N° TRA 02/13-04/22

Réf. : 71019-52 (52 tests)

Description générale

Assurance® GDS MPX ID pour les principaux STEC (MPX ID) est un système automatisé d'amplification des acides nucléiques permettant de confirmer génétiquement et d'identifier le "Top six" des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) non-O157 dans la viande crue, les produits carnés prêts à cuire, le lait cru et les produits laitiers. Le Top 6 des STEC non-O157 est défini comme les *E. coli* appartenant aux sérogroupes O103, O111, O121, O145, O26, ou O45 qui possèdent le gène *eae* et l'un des gènes codant pour la shigatoxine *stx1* ou *stx2*, ou les deux. L'ISO/TS 13136 (2012) cible uniquement les STEC du Top 4 non-O157 (O103, O111, O145 et O26). Cette méthode NF est validée uniquement pour la détection et la confirmation des sérotypes de STEC non O157 du Top 4.

Le test MPX ID utilise une procédure exclusive de préparation d'échantillons par séparation immunomagnétique (IMS) pour capturer les micro-organismes appartenant aux 6 sérogroupes O spécifiques des principaux STEC (O103, O111, O121, O145, O26 et O45) avant analyse génétique à la recherche des gènes de pathogénicité et des gènes du groupe antigène-O associés. Chacune des 3 séquences uniques du gène *eae* ciblées par MPX ID en combinaison avec un (ou plusieurs) des 6 sérogroupes antigène-O est hautement corrélée à la présence des STEC non-O157 du Top 6. Du fait des 3 cibles différentes pour le gène *eae* et des 6 cibles différentes pour les sérogroupes antigène-O, les réactions de PCR ont été séparées en 2 tubes d'amplification. Chaque tube contient un contrôle interne et tous les réactifs nécessaires à la PCR. Les résultats des 2 tubes sont automatiquement combinés par le logiciel du Rotor-Gene® Assurance® GDS. Les tests Assurance® GDS sont conçus pour être utilisés par du personnel de laboratoire qualifié conformément aux pratiques de laboratoire de microbiologie en vigueur.

Le test MPX ID est conçu pour suivre le test Assurance® GDS MPX pour STEC du Top 7 (Réf. 71015-100, GDS MPX) pour détecter et confirmer la présence de STEC non O157 du Top 6. Cependant, le test MPX ID ne permet pas de détecter ou de confirmer la présence de *E. coli* O157:H7. Les échantillons non O157 positifs à l'issue du test GDS MPX peuvent être confirmés, ce qui comprend l'identification du/des séro groupe(s) O spécifique(s) avec MPX ID. Suivre la procédure PROTOCOLE DE DÉPISTAGE SECONDAIRE.

En outre, MPX ID peut également servir à confirmer les colonies isolées à partir des échantillons présumés positifs pour les STEC non O157 du Top 6. Suivre la procédure CONFIRMATION DES COLONIES ISOLÉES.

Composants du kit

Chaque kit Assurance® GDS MPX ID pour les principaux STEC contient les éléments suivants :

- Tubes d'amplification MPX pour STEC du groupe 1
- Tubes d'amplification MPX pour STEC du groupe 2
- Réactif de concentration pour STEC du Top 6
- Tampon de remise en suspension Tq
- Solution de lavage pour les principaux STEC

Équipement/matériel requis

Le matériel suivant est également nécessaire, mais non inclus :

- Thermocycleur Rotor-Gene® Assurance® GDS
- Rotor GDS et anneau de verrouillage
- Ordinateur portable et logiciel v2.3.103
- Dispositif PickPen® et pointes PickPen®
- Agitateur vortex (IKA® MS3 ou équivalent)

The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the US and Canada.



Bandelettes de film adhésif
Puits d'échantillon et base pour puits d'échantillon
Plaque de remise en suspension
Micropipette à 8 canaux capable de distribuer précisément 30 µl
Micropipette réglable capable de distribuer précisément 1,0 ml
Pipette à répétition
Pointes pour pipette à répétition (0,5 ml et 10 ml)
Pointes de micropipette à filtre barrière (50 µl et 1,0 ml)
Bloc(s) de refroidissement avec gel
Incubateur capable de maintenir une température de $41,5 \pm 1$ °C
Incubateur capable de maintenir une température de 37 ± 1 °C
Congélateur capable de maintenir une température de -20 ± 5 °C
Réfrigérateur capable de maintenir une température de 5 ± 3 °C

PROTOCOLE DE DÉPISTAGE SECONDAIRE

Préparation des échantillons

Veuillez vous reporter au tableau de l'ANNEXE A - Méthodes d'enrichissement

Remarque : Pour cette méthode, lorsqu'une température de 41,5 °C est spécifiée, la plage de température acceptable est de $41,5 \pm 1$ °C.

Remarque : Assurance® GDS MPX ID est conçu pour servir de test secondaire, afin de confirmer les résultats positifs obtenus avec Assurance® GDS MPX pour les STEC du Top 7. Cependant, l'essai MPX ID ne permet pas de détecter ou de confirmer *E. coli* O157:H7.

A. Préparation des prises d'essai

1. **Viandes de bœuf crues** - retirer de l'incubateur à 41,5 °C les échantillons (enrichis selon les Instructions d'utilisation de Assurance® GDS MPX pour les STEC du Top 7) à l'issue d'une durée d'incubation totale de 10 à 22 h. Pour le bœuf à l'état congelé, incuber pendant un minimum de 12 à 24 h.
2. **Lait cru et produits laitiers** - retirer de l'incubateur à 41,5 °C les échantillons (enrichis selon les Instructions d'utilisation de Assurance® GDS MPX pour les STEC du Top 7) à l'issue d'une durée d'incubation totale de 20 à 30 h.

Remarque : La durée totale de l'enrichissement sera basée sur l'achèvement de l'analyse primaire Assurance® GDS MPX pour les STEC du Top 7.

B. Protocole d'extraction des échantillons

Changer de gants avant de manipuler les réactifs.

1. Vortexer le **réactif de concentration pour STEC du Top 6**. Transférer immédiatement 40 µl dans chacun des puits d'échantillon Assurance® GDS requis (1 puits/échantillon) à l'aide d'une pipette à répétition et de pointes de pipette de 0,5 ml. Couvrir les puits d'échantillon avec des bandelettes de film adhésif.
2. Transférer 1,0 ml de **solution de lavage pour les principaux STEC** dans 2 puits GDS supplémentaires (2 puits/échantillon) à l'aide d'une pipette à répétition et de pointes de pipette de 10 ml. Couvrir les puits d'échantillon avec des bandelettes de film adhésif.
3. Transférer 80 µl de **tampon de remise en suspension Tq** dans les puits de la plaque de remise en suspension (1 puits/échantillon) à l'aide d'une pipette à répétition et d'une pointe de pipette de 0,5 ml. Couvrir la plaque de remise en suspension avec des bandelettes de film adhésif.
4. Retirer avec précaution le film adhésif d'une barrette de puits d'échantillon contenant du réactif de concentration pour STEC du Top 6. Ajouter 1,0 ml d'enrichissement présumé positif à chaque puits d'échantillon. Éviter de transférer des particules alimentaires. Utiliser une nouvelle pointe de pipette pour chaque enrichissement. Couvrir chaque barrette de puits d'échantillon avec une nouvelle bandelette de film adhésif avant d'ajouter des enrichissements à une nouvelle barrette de puits. **Remplacer immédiatement les échantillons dans l'incubateur en vue d'une confirmation, si nécessaire.**

Remarque : Les enrichissements pour les produits à base de lait cru et les produits laitiers, au bout de 18 h, peuvent être conservés à température ambiante pendant l'analyse des échantillons.

5. Placer des puits d'échantillon scellés contenant le réactif de concentration pour STEC du Top 6 et les enrichissements sur l'agitateur vortex et vortexer à environ 900 tr/min pendant 10 à 20 min. Si nécessaire, ajuster le régime pour veiller à ce que le liquide n'entre pas en contact avec le film adhésif.
6. Retirer avec précaution le film adhésif d'une barrette d'enrichissements et le jeter. Retirer le film adhésif correspondant de 2 barrettes de puits contenant la solution de lavage pour les principaux STEC.
7. Charger des pointes sur le PickPen® en veillant à ce qu'elles soient bien fixées sur l'outil PickPen®. Déployer les aimants PickPen® et les insérer dans la première barrette de puits d'enrichissements. Agiter doucement pendant 30 s en effectuant un mouvement continu de haut en bas (de la surface vers le fond des puits). Tapoter les pointes PickPen® contre la paroi des puits d'échantillon pour éliminer l'excédent de gouttelettes de milieu.
8. Transférer les pointes PickPen® dans les puits d'échantillon correspondants contenant la solution de lavage pour les principaux STEC et rétracter les aimants PickPen® pour libérer les particules dans la solution de lavage pour les principaux STEC.
9. Jeter les pointes PickPen® et charger un nouveau jeu de pointes sur le PickPen®.
10. Déployer les aimants PickPen® et insérer des pointes dans la première barrette de puits contenant les particules et la solution de lavage pour les principaux STEC. Agiter doucement pendant 30 s en effectuant un mouvement continu de haut en bas (de la surface vers le fond des puits). Tapoter doucement les pointes PickPen® contre la paroi des puits d'échantillon pour éliminer l'excédent de gouttelettes de solution de lavage pour les principaux STEC.
11. Transférer les pointes PickPen® vers le second jeu de puits d'échantillon contenant la solution de lavage pour les principaux STEC fraîche et agiter doucement pendant 10 s (ne pas libérer les particules dans la solution). Tapoter doucement les pointes PickPen® contre la paroi des puits d'échantillon pour éliminer l'excédent de gouttelettes de solution de lavage pour les principaux STEC.
12. Transférer les particules dans la rangée correspondante de la plaque de remise en suspension préparée. Avec les pointes immergées, rétracter les aimants PickPen® et tapoter doucement pour libérer les particules dans le tampon de remise en suspension Tq. Couvrir la plaque de remise en suspension avec du film adhésif.
13. Répéter les étapes (6) à (12) pour tous les échantillons en utilisant de nouvelles pointes pour chaque barrette d'échantillons.

Procédure de test (amplification et détection)

Changer de gants avant de manipuler les réactifs.

A. Préparation des blocs de refroidissement avec gel

1. Avant la première utilisation, le bloc de refroidissement avec gel doit être stocké au congélateur (à -20 ± 5 °C) pendant au moins 6 h. Lorsqu'il est congelé, le bloc de refroidissement avec gel change de couleur et passe du rose au violet. Lorsqu'il n'est pas utilisé, le bloc de refroidissement avec gel doit continuer à être stocké -20 ± 5 °C.
2. Entre deux utilisations, replacer le bloc de refroidissement avec gel au congélateur jusqu'à ce qu'il soit complètement violet, ce qui indique qu'il est prêt à être utilisé. Cela peut prendre jusqu'à 2 h.

B. Préparation des tubes d'amplification

1. La configuration du Rotor-Gene® Assurance® GDS et la saisie des données doivent être terminées avant de transférer les échantillons de la plaque de remise en suspension vers les tubes d'amplification. Les tubes d'amplification pour STEC des groupes 1 et 2 doivent être nommés de la même façon que lors de leur saisie dans le logiciel. Si tous les échantillons portent le même nom, différencier les tubes en apposant un nombre ou des lettres après le nom. Pour indiquer quel tube d'amplification correspond aux STEC du groupe 1 ou du groupe 2, choisir le test correspondant dans le menu déroulant pour chaque échantillon.

Samples :										
C	ID	Name	Description	Kit Lot Number	Assay					
1	1			022420-05	Group 1 STEC					
2	2			022420-05	Group 1 STEC					
3	3			022420-05	Group 1 STEC					
4	4			022420-05	Group 1 STEC					
5	1			022420-05	Group 2 STEC					
6	2			022420-05	Group 2 STEC					
7	3			022420-05	Group 2 STEC					
8	4			022420-05	Group 2 STEC					

- Retirer les **tubes d'amplification pour STEC du groupe 1** (bouchons arrondis transparents) et les **tubes d'amplification pour STEC du groupe 2** (bouchons plats bleus) du sachet en aluminium et les placer dans 2 colonnes distinctes dans un bloc de refroidissement avec gel congelé. Refermer le sachet.
- Ouvrir les tubes d'amplification. À l'aide d'une pipette multicanaux et de pointes à filtre barrière, pipeter brièvement le tampon de remise en suspension Tq vers le haut puis vers le bas pour mélanger les billes dans les puits de la plaque de remise en suspension. Transférer 30 µl d'échantillon des puits de la plaque de remise en suspension vers chaque groupe de tubes d'amplification (STEC du groupe 1 et STEC du groupe 2). Appuyer fermement sur le bouchon de chaque tube d'amplification pour le fermer. Inspecter visuellement chaque tube d'amplification pour s'assurer que le bouchon est bien scellé.
- Placer les deux jeux de tubes d'amplification dans le Rotor-Gene® Assurance® GDS dans l'ordre séquentiel, en commençant par la position 1. Lancer le cycle du Rotor-Gene®. Se reporter au Manuel d'utilisation Assurance® GDS pour des instructions détaillées sur l'utilisation du thermocycleur Rotor-Gene®.

Remarque : Le Rotor-Gene® Assurance® GDS doit être démarré dans les 20 min suivant l'ajout des échantillons aux tubes d'amplification.

Résultats

Une fois l'analyse terminée, le logiciel du Rotor-Gene® Assurance® GDS fournit un tableau de résultats. Chaque échantillon est identifié comme **positif** ou **négatif** pour les STEC non O157 du Top 6, ou comme **No Amp** dans l'onglet des résultats combinés.

Positif : Les échantillons sont positifs pour un ou plusieurs STEC non O157 du Top 6, ce qui signifie qu'il s'agit de *E. coli* appartenant aux sérogroupes O (O103, O111, O121, O145, O26 et O45), et possédant le gène *eae* et au moins l'un des gènes codant pour la shigatoxine *stx1* ou *stx2*. Le(s) sérotype(s) spécifique(s) des STEC non O157 du Top 6 contenus dans l'échantillon sont identifiés par MPX ID. Les résultats des *stx* ont été fournis à partir de l'analyse primaire Assurance® GDS pour les STEC du Top 7.

Négatif : L'échantillon est négatif pour les STEC non O157 du Top 6.

Pas d'amp. (No Amp.) : Aucune amplification ne s'est produite. Répéter le test en commençant à l'étape **B**.

Protocole de préparation des échantillons. Si le résultat "Pas d'amp." se reproduit, contacter le Service technique (BioMTS@milliporesigma.com).

STEC CT Table Combined Results										
No.	C	Name	eae1 CT	eae2 CT	eae3 CT	O26 CT	O45 CT	O103 CT	O111/145 CT	O121 CT
5	1		21.65				22.60	21.82		22.09
6	2			21.14	20.97	20.96			21.86	
7	3									
8	4									

STEC CT Table											
Combined Results											
No.	C	Name	Top 6 STEC	O26	O45	O103	O111	O121	O145	Assay	Kit Lot Number
5	1		Positive		+	+		+		Assurance GDS MPX ID for Top STEC	022420-05
6	2		Positive	+			+		+	Assurance GDS MPX ID for Top STEC	022420-05
7	3		Negative							Assurance GDS MPX ID for Top STEC	022420-05
8	4		No Amp							Assurance GDS MPX ID for Top STEC	022420-05

Remarque : Assurance® GDS MPX ID pour les principaux STEC est destiné à la détection et à la confirmation des sérotypes des STEC non O157 du Top 6 ; cependant, tout isolat d'*E. coli* positif pour *eae* et contenant également *stx1* et/ou *stx2* devrait être considéré comme une souche potentiellement pathogène.

Remarque : Les échantillons enrichis peuvent être conservés à 5 ± 3 °C jusqu'à 72 h avant d'être testés avec MPX ID.

Confirmation par culture

Après 10 à 30 heures d'enrichissement (en fonction du type d'aliment analysé) dans mEHEC® à 41,5 °C, les échantillons peuvent être confirmés à partir de l'enrichissement mEHEC® retenu par les moyens suivants. Confirmer les échantillons par la méthode ISO ou par une autre méthode de confirmation.

Remarque : Pour toutes les méthodes d'isolement, les échantillons enrichis peuvent être conservés à 5 ± 3 °C (au réfrigérateur) jusqu'à 72 h avant confirmation.

- A. Une aliquote de l'enrichissement mEHEC® issu de Assurance® GDS MPX ID pour les échantillons positifs aux principaux STEC peut être confirmée par culture pour les STEC non O157 du Top 4 selon la méthode ISO/TS 13136:2012 Microbiologie des aliments — *Méthode basée sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments — Méthode horizontale pour la détection des Escherichia coli producteurs de Shigatoxines (STEC) et la détermination des sérogroupes O157, O111, O26, O103 et O145.*
- B. Les STEC non O157 du Top 6 peuvent être isolés à partir des échantillons positifs au test MPX ID en ensemençant le réactif de concentration pour STEC du Top 6 qui reste dans la plaque de remise en suspension (étape C, Procédure de test). Ensemencer les billes d'IMS sur des plaques de gélose chromogène. Ensemencer les plaques en stries en vue d'un isolement. Incuber les plaques pendant 20 à 24 h à 37 ± 1 °C.

Isolement des STEC du Top 6 à l'aide du réactif de concentration restant dans la plaque de remise en suspension

Équipement / Matériel requis

Matériel nécessaire en plus de celui demandé pour le PROTOCOLE DE DÉPISTAGE SECONDAIRE :

Solution de lavage pour les principaux STEC

Anses d'inoculation stériles jetables de 10 µl

1. Ajouter 30 µl de solution de lavage pour les principaux STEC, en utilisant une pipette à répétition et une pointe de pipette de 0,5 ml, dans le nombre requis de puits inutilisés d'une nouvelle plaque de remise en suspension (1 puits/échantillon). Couvrir les puits de la plaque de remise en suspension contenant la solution de lavage avec des bandelettes de film adhésif.
2. À partir de la plaque de remise en suspension de l'échantillon précédemment utilisée pour l'analyse MPX ID (étape B, Procédure de test), pipeter brièvement de haut en bas le liquide restant contenu dans le puits à ensemencher. Cela remettra en suspension les billes d'IMS contenues dans le tampon de remise en suspension Tq (il reste un volume d'environ 20 µl).
3. Retirer une bandelette de film adhésif de la plaque de remise en suspension contenant la solution de lavage pour les principaux STEC de l'étape 1. Transférer 15 µl de billes d'IMS en suspension dans un puits de la plaque de remise en suspension contenant 30 µl de solution de lavage pour les principaux STEC.
4. Pipeter brièvement la solution de lavage vers le haut puis vers le bas pour mélanger les billes dans le puits. Transférer 20 µl depuis la plaque de remise en suspension vers le premier quadrant de la plaque CHROMagar™ STEC. Transférer 20 µl supplémentaires depuis la plaque de remise en suspension vers le premier quadrant d'une plaque de gélose Rainbow® avec céfixime et novobiocine (gélose RANC), ChromID® EHEC, ou Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX). Ensemencer les billes en stries en vue d'un isolement sur plaques chromogènes. Incuber les boîtes pendant 20 à 24 h à 37 ± 1 °C.

Remarque : Les plaques de gélose CHROMagar™ STEC et Rainbow® avec novobiocine et céfixime sont sélectives pour les STEC. Les plaques de gélose ChromID® EHEC et Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX) sont sélectives pour tous les *E. coli* (y compris les STEC). Ces deux derniers types de plaques nécessiteront l'inoculation ponctuelle de colonies typiques d'*E. coli* et le criblage de pools de colonies initialement pour trouver les STEC présumés, puisqu'ils sélectionnent tous les *E. coli*. Pour plus de détails sur l'inoculation ponctuelle, consulter la norme ISO 13136.

5. Confirmer les colonies typiques en analysant les colonies isolées par Assurance® GDS MPX pour les STEC du Top 7 et Assurance® GDS MPX ID pour les principaux STEC, à l'aide du protocole de CONFIRMATION DES COLONIES ISOLÉES POUR LES PRINCIPAUX STEC PAR MPX ID, ci-dessous.

Remarque : La plaque de tampon de remise en suspension MPX ID originale peut être conservée à 5 ± 3 °C (réfrigération) jusqu'à 48 h avant la confirmation.

- C. Les STEC non O157 Top 6 peuvent être isolés par culture à partir d'échantillons positifs pour MPX ID en utilisant le Réactif de concentration des STEC du Top 6 (inclus dans le kit Assurance® GDS MPX ID pour les principaux STEC), qui contient un mélange de particules d'IMS contenant tous les sérogroupes O des STEC non O157 du Top 6. Cette méthode utilise le dispositif PickPen® Assurance® GDS pour l'isolement à l'aide du Réactif de concentration des STEC du Top 6. Ensemencer les billes d'IMS sur des plaques de gélose chromogène. Ensemencer les plaques en stries en vue d'un isolement. Incuber les plaques pendant 20 à 24 h à 37 ± 1 °C.

Isolement des STEC du Top 6 à l'aide du Réactif de concentration et du dispositif PickPen® / Matériel requis

Matériel nécessaire en plus de celui demandé pour le PROTOCOLE DE DÉPISTAGE SECONDAIRE :

Réactif de concentration pour STEC du Top 6

Solution de lavage pour les principaux STEC

Anses d'inoculation stériles jetables de 10 µl

1. À l'aide d'une pipette à répétition et d'une pointe de pipette de 0,5 ml, distribuer une aliquote de 40 µl de Réactif de concentration pour STEC du Top 6 homogénéisé dans les puits d'échantillon GDS (1 puits/échantillon). Couvrir les puits d'échantillon avec des bandelettes de film adhésif.
2. À l'aide d'une pipette à répétition et d'une pointe de pipette de 10 ml, ajouter 1 ml de solution de lavage pour les principaux STEC dans 2 jeux de puits d'échantillon GDS (2 puits/échantillon). Couvrir les puits d'échantillon avec des bandelettes de film adhésif.
3. Ajouter 50 µl de solution de lavage pour les principaux STEC, en utilisant une pipette à répétition et une pointe de pipette de 0,5 ml, dans le nombre requis de puits d'une nouvelle plaque de remise en suspension (1 puits/échantillon). Couvrir les puits de la plaque de remise en suspension contenant la solution de lavage avec des bandelettes de film adhésif.
4. Retirer avec précaution le film adhésif d'une barrette de puits d'échantillon GDS contenant le réactif de concentration. Après incubation, mélanger doucement à la main les enrichissements présumés positifs pour garantir leur homogénéité. Ajouter 1,0 ml d'enrichissement à chaque puits d'échantillon. Éviter de transférer des particules alimentaires. Utiliser une nouvelle pointe de pipette pour chaque enrichissement. Sceller chaque rangée de puits d'échantillon avec une nouvelle bandelette de film adhésif.
5. Placer les puits d'échantillons scellés contenant le Réactif de concentration des STEC du Top 6 et les enrichissements sur l'agitateur vortex pour plaques à environ 900 tours/minute pendant 10 à 20 minutes.

Remarque : Si nécessaire, ajuster le régime de l'agitateur vortex pour veiller à ce que le liquide n'entre pas en contact avec le film adhésif.

6. Retirer avec précaution le film adhésif d'une barrette d'enrichissements et le jeter. Retirer le film adhésif correspondant de 2 barrettes de puits contenant la solution de lavage pour les principaux STEC.
7. Charger des pointes sur le PickPen® en veillant à ce qu'elles soient bien fixées sur l'outil PickPen®. Déployer les aimants PickPen® et les insérer dans la première barrette de puits d'enrichissements. Agiter doucement pendant 30 s en effectuant un mouvement continu de haut en bas (de la surface vers le fond des puits). Tapoter les pointes PickPen® contre la paroi des puits d'échantillon pour éliminer l'excédent de gouttelettes de milieu.
8. Transférer les pointes PickPen® dans la première barrette de puits d'échantillon correspondants contenant la solution de lavage pour les principaux STEC et rétracter les aimants PickPen® pour libérer les particules dans la solution de lavage pour les principaux STEC.
9. Jeter les pointes PickPen® et charger un nouveau jeu de pointes sur le PickPen®.

10. Déployer les aimants PickPen® et insérer les pointes dans la barrette de puits contenant les particules et la solution de lavage pour les principaux STEC. Agiter doucement les pointes pendant 30 s en effectuant un mouvement continu de haut en bas (de la surface vers le fond des puits). Tapoter doucement les pointes PickPen® contre la paroi des puits d'échantillon pour éliminer l'excédent de gouttelettes de solution de lavage pour les principaux STEC.
11. Transférer les pointes PickPen® vers le second jeu de puits d'échantillon contenant la solution de lavage pour les principaux STEC fraîche et agiter doucement pendant 10 s (ne pas libérer les particules dans la solution). Tapoter doucement les pointes PickPen® contre la paroi des puits d'échantillon pour éliminer l'excédent de gouttelettes de solution de lavage pour les principaux STEC.
12. Retirer une bandelette de film adhésif de la plaque de remise en suspension contenant la solution de lavage pour les principaux STEC de l'étape 3. Transférer les pointes PickPen® sur la rangée correspondante de la plaque de remise en suspension préparée. Avec les pointes immergées, rétracter les aimants PickPen® et tapoter doucement les pointes pour libérer les particules dans la solution de lavage pour les principaux STEC se trouvant dans la plaque remise en suspension.
13. Pipeter brièvement la solution de lavage vers le haut puis vers le bas pour mélanger les billes. Transférer 20 µl depuis la plaque de remise en suspension vers le premier quadrant des plaques CHROMagar™ STEC. Transférer 20 µl supplémentaires depuis la plaque de remise en suspension vers le premier quadrant d'une plaque de gélose Rainbow® avec céfixime et novobiocine (gélose RANC), ChromID® EHEC ou Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX). Ensemencer les billes en stries en vue d'un isolement sur plaques chromogènes. Incuber les plaques pendant 20 à 24 h à 37 ± 1 °C.

Remarque : Les géloses CHROMagar STEC et Rainbow® avec novobiocine et céfixime sont sélectives pour les STEC. Les plaques de gélose ChromID® EHEC et Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX) sont sélectives pour tous les *E. coli* (y compris les STEC). Ces deux derniers types de plaques nécessiteront l'inoculation ponctuelle de colonies typiques d'*E. coli* et le criblage de pools de colonies initialement pour trouver les STEC présumés, puisqu'ils sélectionnent tous les *E. coli*. Pour plus de détails sur l'inoculation ponctuelle, consulter la norme ISO 13136.

14. Confirmer les colonies typiques en analysant les colonies isolées par les tests Assurance® GDS MPX pour les STEC du Top 7 et Assurance® GDS MPX ID pour les principaux STEC, à l'aide du protocole de CONFIRMATION DES COLONIES ISOLÉES POUR LES PRINCIPAUX STEC PAR MPX ID, ci-dessous.

Confirmation des colonies isolées pour les principaux STEC par l'équipement MPX ID / Matériel requis

Matériel nécessaire en plus de celui demandé pour le PROTOCOLE DE DÉPISTAGE SECONDAIRE :

Solution de lavage pour les principaux STEC

Tampon de remise en suspension Tq

Anses d'inoculation stériles jetables de 1 µl

A. Préparation des colonies

1. Transférer 500 µl de solution de lavage pour les principaux STEC, en utilisant une pipette à répétition et une pointe de pipette de 10 ml, dans le nombre requis de puits d'échantillon Assurance® GDS (1 puits pour chaque colonie suspecte).

Remarque : La colonie testée doit être bien isolée. Si ce n'est pas le cas, ensemencer de nouveau en stries pour garantir la pureté avant de poursuivre la confirmation de la colonie.

2. Pipeter 120 µl de tampon de remise en suspension Tq, en utilisant une pipette à répétition et une pointe de pipette de 0,5 ml, dans le nombre requis de puits de la plaque de remise en suspension (1 puits/test).
3. À l'aide d'une anse stérile de 1 µl, transférer une petite quantité de la colonie suspecte dans le puits d'échantillon contenant la solution de lavage pour les principaux STEC.

Remarque : Éviter de générer une trop forte turbidité pour la remise en suspension de la colonie. Il n'est pas nécessaire de créer une turbidité évidente dans l'échantillon. Mélanger avec l'anse pendant environ 5 s puis jeter l'anse.

4. À l'aide d'une nouvelle anse stérile de 1 µl, transférer 1 µl de la colonie en suspension dans le puits de la plaque de remise en suspension préparée. Agiter doucement avec l'anse.
5. Répéter les étapes (3) à (4) pour toutes les colonies suspectes à analyser.
6. Procéder aux tests Assurance® GDS MPX pour STEC du Top 7 et Assurance® MPX ID pour les principaux STEC comme indiqué dans les instructions d'utilisation [en commençant à l'étape **A. PROCÉDURE DE TEST (AMPLIFICATION ET DÉTECTION)**].

B. Interprétation et résultats de confirmation des colonies

Une fois l'analyse terminée, le logiciel du Rotor-Gene® Assurance® GDS fournit un tableau de résultats des tests GDS MPX et MPX ID. Chaque échantillon est identifié comme **positif**, **négatif** ou **pas d'amp.**

Positif : Un isolat sera considéré comme positif pour les STEC non O157 du Top 4 si les deux critères suivants sont remplis :

1. Résultat positif pour MPX ID : Le test MPX ID identifie la présence des sérogroupes O du Top 4 de l'ISO : O103, O111, O145 ou O26.
2. Résultat positif pour GDS MPX : Le test GDS MPX fournit un résultat pour le gène *eae* ainsi que les gènes *stx1* et/ou *stx2*.

Négatif : L'isolat est confirmé négatif s'il ne remplit pas les critères énoncés ci-dessus.

Pas d'amp. (No Amp.) : Aucune amplification ne s'est produite. Répéter le test en commençant à l'étape **A. Préparation des colonies**. Si le résultat "Pas d'amp." se reproduit, contacter le Service technique (BioMTS@milliporesigma.com).

Remarque : Le test Assurance® GDS MPX ID pour les principaux STEC confirmera également les STEC des sérotypes O45 et O121. Ces sérotypes de STEC ne sont pas ciblés par la norme ISO 13136 (2012). En outre, certaines souches de STEC O145 peuvent être positives pour le gène *eae* seulement par Assurance® GDS MPX pour les STEC du Top 7 (et pas le test Assurance® GDS MPX ID pour les principaux STEC).

Stockage

Stocker les composants du kit Assurance® GDS MPX ID à 5 ± 3 °C. La date de péremption du kit est indiquée sur l'étiquette de la boîte du produit.

Précautions

Assurance® GDS MPX ID pour les principaux STEC doit être utilisé comme décrit dans le présent document.

Ne pas utiliser les réactifs du test Assurance® GDS MPX ID pour les principaux STEC après expiration. Ne pas utiliser le kit de test au-delà de la date de péremption figurant sur l'étiquette de la boîte du produit.

Sécurité

Kit Assurance® GDS MPX ID pour les principaux STEC. — Ce produit n'est pas destiné à un usage humain ou vétérinaire. Assurance® GDS MPX ID pour les principaux STEC doit être utilisé comme décrit dans la notice. Le contenu du test peut être nocif en cas d'ingestion. L'utilisateur doit lire, comprendre et suivre toutes les informations relatives à la sécurité figurant dans les instructions du kit Assurance® GDS MPX ID pour les principaux STEC. Conserver les consignes de sécurité pour pouvoir les consulter ultérieurement.

Ne pas ouvrir ou autoclaver les tubes d'amplification usagés. Une fois l'analyse terminée, placer les tubes d'amplification usagés dans un récipient scellé contenant suffisamment de solution d'eau de Javel à 10 % pour recouvrir les tubes pendant au moins 15 min, ou dans un double sachet et les éliminer à l'extérieur du laboratoire. Suivre toutes les réglementations locales, des États/des provinces et/ou nationales en vigueur relatives à l'élimination des tubes d'amplification usagés. En cas de suspicion d'une contamination, humidifier une serviette en papier avec une solution d'eau de Javel et essuyer toutes les paillasse de laboratoire et les surfaces de l'équipement avec une solution d'eau de Javel à 10 %. Éviter de vaporiser la solution d'eau de Javel directement sur les surfaces. Laisser la solution d'eau de Javel agir sur les surfaces pendant au moins 15 min avant de l'essuyer avec une solution d'alcool isopropylique à 70 %.

Pour préparer une solution d'eau de Javel à 10 %, ajouter 10 ml d'eau de Javel du commerce contenant au moins 5 % d'hypochlorite de sodium à 90 ml d'eau désionisée. La concentration finale d'hypochlorite de sodium dans la solution d'eau de Javel doit être de 0,5 % minimum. La solution d'eau de Javel est stable pendant 7 jours à compter de la préparation. Pour préparer une solution d'alcool isopropylique à 70 %, ajouter 70 ml d'alcool isopropylique pur à 30 ml d'eau désionisée ou acheter de l'alcool isopropylique à 70 % du commerce.

Rotor-Gene® Assurance® GDS. — Une utilisation incorrecte du Rotor-Gene® Assurance® GDS peut provoquer des blessures ou endommager l'appareil. S'ils ne sont pas manipulés correctement, certains composants peuvent présenter un risque de blessure du fait de leur forte chaleur. Pour un usage en toute sécurité, l'appareil ne doit être utilisé que par du personnel de laboratoire qualifié dûment formé. L'entretien de l'appareil ne doit être réalisé que par des techniciens de maintenance de Merck KGaA.

Enrichissement des échantillons. — Pour réduire les risques liés à une exposition aux produits chimiques et aux produits biologiques à risque infectieux, effectuer les analyses de pathogènes dans un laboratoire correctement équipé sous la supervision d'un personnel formé. Toujours suivre les consignes de sécurité standards de laboratoire, notamment le port d'un équipement de protection individuelle (EPI) et d'une protection des yeux adaptés, lors de la manipulation des réactifs et des échantillons contaminés. Éviter tout contact avec les constituants des milieux d'enrichissement et les tubes de réactifs après l'amplification. Éliminer les échantillons enrichis conformément aux normes actuellement en vigueur dans le secteur. Décontaminer et éliminer les produits conformément aux bonnes pratiques de laboratoire et aux réglementations locales, nationales et fédérales.

Précautions concernant les *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC). — Les STEC sont des micro-organismes de niveau de biosécurité 3. Les échantillons biologiques, tels que les enrichissements, ont la capacité de transmettre des maladies infectieuses. Suivre toutes les réglementations locales, des États/des provinces, et/ou nationales en vigueur relatives à l'élimination des déchets biologiques. Porter un équipement de protection approprié comprenant, sans toutefois s'y limiter, des lunettes de protection, un masque facial, une blouse de laboratoire/des vêtements de protection et des gants. Toutes les tâches doivent être réalisées dans des installations correctement équipées, contenant du matériel de sécurité adapté (systèmes de confinement physique, etc.). Le personnel doit être formé conformément aux exigences de la réglementation et de l'entreprise/institution applicables avant de travailler avec des produits potentiellement infectieux. Tous les bouillons d'enrichissement doivent être stérilisés après toute étape de confirmation basée sur une culture. Nettoyer les postes de travail et le matériel de laboratoire avec le désinfectant de son choix avant et après chaque activité de laboratoire (solution d'hypochlorite de sodium, solution de phénol, solution d'ammonium quaternaire, etc.).

ANNEXE A – Méthodes d'enrichissement

Tableau 1. Types d'échantillon et méthodes d'enrichissement pour les STEC non O157 du Top 6

Veuillez noter que l'échantillon doit être prélevé dans l'enrichissement retenu, conformément aux instructions d'utilisation de Assurance® GDS MPX pour STEC du Top 7.

Catégorie de denrées alimentaires	Milieu	Taille d'échantillon	Rapport échantillon/milieu (volume de milieu)	Durée d'enrichissement	Température d'incubation
Sans repiquage dans du BHI					
Viandes de bœuf crues et produits à base de viande de bœuf prêts à cuire	mEHEC®	25 g	1/10 (225 ml)	10-18 h	41,5 ± 1 °C
		375 g	1/5 (1500 ml)	12-20 h	
Bœuf assaisonné	mEHEC®	25 g	1/10 (225 ml)	10-18 h	
Lait cru et produits laitiers (à l'exception des fromages au lait cru)	mEHEC®	25 g	1/10 (225 ml)	20-26 h	
Fromages au lait cru	mEHEC®	25 g	1/10 (225 ml)	22-30 h	41,5 ± 1 °C

ANNEXE B

Gélose Rainbow® avec novobiocine et céfixime (RANC)

Ingrédient	Qté/litre	Source
Gélose Rainbow® base O157	60 g	Réf. Biolog 80102
Novobiocine	5 mg	Sigma N1628
Céfixime	5 µg	Réf. Dynal 740.01

Préparation des plaques RANC :

1. Ajouter 60 g de base de gélose Rainbow® à 1000 ml d'eau désionisée. Chauffer en agitant fréquemment ou faire bouillir pendant 1 min pour dissoudre la poudre complètement.
2. Autoclaver à 121 °C pendant 10 min.
3. Laisser refroidir le milieu à 45–50 °C.
4. Ajouter les solutions d'antibiotiques suivantes et bien mélanger :
 - a. 2,5 ml de solution de novobiocine/litre de milieu.
 - b. 375 µl de solution de céfixime/litre de milieu.
5. Couler la gélose dans les boîtes (env. 20 ml par boîte).

Préparation des solutions antibiotiques :

Solution de novobiocine : ajouter 0,1 g de novobiocine à 50 ml d'eau stérile (2 mg/ml). Solution de

céfixime : ajouter 7,5 ml d'eau stérile water à 1 mg de céfixime (0,133 µg/µl).

**Certificat NF VALIDATION accordé par AFNOR
Certification à Assurance® GDS MPX ID for
Top comme méthode alternative d'analyse
pour tous les produits alimentaires et
échantillons environnementaux de production
industrielle en relation avec la méthode de
référence décrite dans la norme internationale
ISO EN 11290-1 conformément à la norme
EN ISO 16140-2 (2016). Pour de plus
amples informations sur la certification NF
VALIDATION, veuillez vous reporter au
certificat disponible à l'adresse
www.afnor-validation.com**



TRA 02/13-04/22

MÉTHODES ANALYTIQUES ALTERNATIVES POUR L'AGRO-ALIMENTAIRE

www.afnor-validation.org

Fabricant

BioControl Systems, Inc., 12822 SE 32nd St, Bellevue, WA 98005, États-
Unis. Tél. : 425-586-3300 www.sigmaaldrich.com

BioControl Systems, Inc. est une filiale de Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne.

Merck KGaA
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, Allemagne

