

Assurance® GDS MPX pour STEC du Top 7

Certification NF VALIDATION TRA 02/13-04/22

Réf. : 71015-100 (100 tests)

Description générale

Assurance® GDS MPX pour STEC du Top 7 est un système automatisé d'amplification des acides nucléiques permettant de détecter *E. coli* O157:H7 ainsi que le "Top six" des *E. coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) non O157 dans la viande crue, les produits carnés prêts à cuisiner (RTC), la volaille crue, les produits à base de volaille prêts à cuisiner (RTC), les produits à base de volaille prêts à manger (RTE), les produits à base de volaille prêts à réchauffer (RTRH), le lait cru et les produits laitiers ainsi que les échantillons environnementaux. Le Top Six 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 au moins l'un des gènes codant pour la shigatoxine *stx1* ou *stx2*. Assurance® GDS MPX pour STEC du Top 7 utilise une procédure exclusive de préparation d'échantillons par séparation immunomagnétique (IMS) pour capturer les micro-organismes appartenant aux 7 sérogroupes O spécifiques des principaux STEC (O103, O111, O121, O145, O26, O45 et O157) avant analyse génétique à la recherche des gènes de pathogénicité associés. L'ISO/TS 13136 (2012) cible uniquement les STEC du Top 5 (O157, O103, O111, O145 et O26). Cette méthode NF est validée uniquement pour la détection et la confirmation des sérotypes de STEC du Top 5.

Cette méthode de détection des STEC est basée sur le processus décrit dans la norme ISO/TS 13136:2012 et comprend deux étapes de criblage à partir d'échantillons enrichis :

1. Détection des gènes *eae* et *stx* des organismes appartenant aux STEC principaux à l'aide de l'Assurance® GDS MPX pour STEC du Top 7 (réf. 20764278)
2. Détection des groupes O à l'aide de l'Assurance® GDS MPX ID pour STEC principaux (réf. 20764279) et/ou l'Assurance® GDS EHEC ID pour *E. coli* O157:H7 Tq (réf. 20764281)

Les résultats de criblage positifs doivent être confirmés par un ensemencement sur gélose sélective et un test des colonies caractéristiques (réf. 20764279 et 20764281).

Composants du kit

Chaque kit Assurance® GDS MPX pour STEC du Top 7 contient les éléments suivants :

- Tubes d'amplification MPX pour les principaux STEC
- Réactif de concentration pour STEC du Top 7
- 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 :

- Milieu mEHEC®
- 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)
- Bandelettes de film adhésif
- Puits d'échantillon et base pour puits d'échantillon

Plaque de remise en suspension
Homogénéiseur à palettes Stomacher® ou équivalent
Sachets du type Stomacher® avec filtre ou équivalent
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 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

Préparation du milieu d'enrichissement

- A. Pour un échantillon de 25 g, pré-chauffer 225 ml d'eau désionisée stérile toute une nuit à $41,5 \pm 1$ °C. Le jour de l'utilisation, transférer en conditions aseptiques 7,1 g de milieu mEHEC® dans l'eau stérile préchauffée. Mélanger doucement pour réhydrater le milieu. Utiliser le bouillon ainsi préparé dans les 6 h qui suivent.
- B. Pour un échantillon de 375 g, pré-chauffer 1500 ml d'eau désionisée stérile toute une nuit à $41,5 \pm 1$ °C. Le jour de l'utilisation, transférer en conditions aseptiques 47,3 g de milieu mEHEC® dans l'eau stérile préchauffée. Mélanger doucement pour réhydrater le milieu. Utiliser le bouillon ainsi préparé dans les 6 h qui suivent.
- C. Il est également possible de préparer à l'avance le milieu mEHEC® et de l'autoclaver. Ajouter 31,6 g de milieu par litre d'eau désionisée. Agiter pour réhydrater le milieu, prélever le volume souhaité et autoclaver à 121 °C pendant 15 min. Le bouillon doit être préchauffé toute une nuit à $41,5 \pm 1$ °C avant ajout à l'échantillon.

Préparation des échantillons

Application dans la viande crue, la viande RTC, la volaille crue, la volaille RTC, la volaille RTRH, la volaille RTE, le lait cru et les produits laitiers (jusqu'à 25 g) ou la viande de bœuf crue (jusqu'à 375 g) ou échantillons environnementaux (25 g, ml ou dispositif d'échantillonnage).

A. Préparation et enrichissement des prises d'essai

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

Remarque : suivre les instructions des normes EN ISO 6887 (ajout de Tween-80 (10 g/l) pour les matrices > 20 % de graisse).

1. **Viande crue et viande RTC jusqu'à 25 g** – Pour une prise d'essai de 25 g, ajouter l'échantillon dans 225 ml de milieu mEHEC® préchauffé ($41,5 \pm 1$ °C). Homogénéiser ou mélanger l'échantillon, puis l'incuber pendant 6 à 24 h à $41,5 \pm 1$ °C.
2. **Viande de bœuf crue jusqu'à 375 g** – Pour une prise d'essai de 375 g, ajouter l'échantillon dans 1 500 ml de milieu mEHEC® préchauffé ($41,5 \pm 1$ °C) sans respecter les normes EN ISO 6887 (aucun ajout de Tween-80). Homogénéiser ou mélanger l'échantillon, puis l'incuber pendant 10 à 18 h à $41,5 \pm 1$ °C. En cas d'analyse d'autres tailles de prise d'essai, ajuster en proportion le volume des milieux de façon à maintenir un rapport de 1:5.

3. **Volaille crue, produits à base de volaille RTC, RTRH et RTE jusqu'à 25 g** – Pour une prise d'essai de 25 g, ajouter l'échantillon dans 225 ml de milieu mEHEC® préchauffé (37 °C ±1 °C). Homogénéiser ou mélanger l'échantillon, puis l'incuber pendant 8 à 24 h à 41,5 °C ±1 °C.
4. **Lait cru et produits laitiers jusqu'à 25 g** – Pour une prise d'essai de 25 g, ajouter l'échantillon dans 225 ml de milieu mEHEC® préchauffé (41,5 °C ±1 °C). Homogénéiser ou mélanger l'échantillon, puis l'incuber pendant 10 à 24 h à 41,5 °C ±1 °C **ou** pendant 18 à 24 h à 41,5 °C sans respecter les normes EN ISO 6887 (aucun ajout de Tween-80).
5. **Échantillons environnementaux jusqu'à 25 g, ml ou dispositif d'échantillonnage** – Peser en conditions aseptiques 25 g de balayures ou 25 ml d'eau de procédé et les introduire dans 225 ml de milieu mEHEC® préchauffé (à 41,5 ±1 °C). Pour le contrôle environnemental, pré-humidifier des éponges déshydratées stériles avec 10 ml de bouillon D/E (Dey/Engley) ou de bouillon Lethen. Humidifier un écouvillon stérile en le trempant dans du bouillon D/E ou Lethen. Après avoir recueilli l'échantillon, ajouter l'éponge ou l'écouvillon à respectivement 100 ml ou 10 ml de milieu mEHEC®. Incuber pendant 10 à 24 h à 41,5 ±1 °C.

Remarque : contacter votre service technique local pour connaître les procédures recommandées pour tester d'autres types ou tailles d'échantillon.

Remarque : les échantillons enrichis peuvent être conservés à 2–8 °C (réfrigération) jusqu'à 72 h avant analyse avec Assurance® GDS MPX pour STEC du Top 7 (non applicable aux protocoles à enrichissement court).

B. Protocole d'extraction des échantillons

Changer de gants avant de manipuler les réactifs.

Toutes les denrées alimentaires sauf le fromage au lait cru enrichi sans respecter les normes EN ISO 6887

1. Vortexer le **réactif de concentration pour STEC du Top 7**. Transférer immédiatement 20 µl dans chacun des puits d'échantillon 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 45 µl de **tampon de remise en suspension Tq** dans les puits d'échantillon de la plaque de remise en suspension 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 7. Mélanger les enrichissements d'échantillon incubés. 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 échantillon. Couvrir chaque barrette de puits d'échantillon avec un nouveau 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.**
5. Placer les puits d'échantillons scellés contenant le Réactif de concentration des STEC du Top 7 et les enrichissements sur l'agitateur vortex et le vortexer à environ 900 tours/minute pendant 10 à 20 minutes. 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 d'échantillon contenant la solution de lavage pour les principaux STEC et de la plaque de remise en suspension.

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 insérer les pointes 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 doucement les pointes PickPen™ contre la paroi des puits d'échantillon pour éliminer l'excédent de gouttelettes de milieu.
8. Transférer les pointes PickPen™ dans le premier jeu de puits d'échantillon correspondant 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 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.
11. Transférer les pointes PickPen™ vers un deuxième jeu de puits d'échantillon contenant de la solution de lavage pour les principaux STEC fraîche et agiter doucement pendant 10 s (ne pas libérer les particules dans la solution). Tapoter 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'enrichissements.

PASSER À LA SECTION PROCÉDURE DE TEST

Fromage au lait cru enrichi sans respecter les normes EN ISO 6887

1. Vortexer le **réactif de concentration pour STEC du Top 7**. Transférer immédiatement 20 µl dans chacun des puits d'échantillon 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 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. Distribuer 0,5 ml de bouillon cœur-cerveille (BHI) stérile dans les puits d'échantillon (1 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.
 4. Transférer 45 µl de **tampon de remise en suspension Tq** dans les puits d'échantillon de la plaque de remise en suspension 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.
 5. Retirer avec précaution le film adhésif d'une barrette de puits d'échantillon contenant du réactif de concentration pour STEC du Top 7. Mélanger les enrichissements incubés. Ajouter 1,0 ml d'enrichissement incubé à chaque puits d'échantillon. Éviter de transférer des particules alimentaires. Utiliser une nouvelle pointe de pipette pour chaque échantillon. Couvrir chaque barrette de puits d'échantillon avec un nouveau film adhésif avant d'ajouter des échantillons 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 fromages au lait cru, au bout de 18 h, peuvent être conservés à température ambiante pendant l'analyse de l'échantillon.
6. Placer les puits d'échantillons scellés contenant le Réactif de concentration des STEC du Top 7 et les enrichissements sur l'agitateur vortex et agiter à environ 900 tours/minute pendant 10 à 20 minutes. Si nécessaire, ajuster le régime pour veiller à ce que le liquide n'entre pas en contact avec le film adhésif.

7. Retirer avec précaution le film adhésif d'une barrette d'enrichissements et le jeter. Retirer le film adhésif correspondant de 1 barrette de puits d'échantillon contenant la solution de lavage pour les principaux STEC. Retirer également le film adhésif correspondant à la barrette de puits contenant le BHI.
8. Charger des pointes sur le PickPen™ en veillant à ce qu'elles soient bien fixées sur l'outil PickPen™. Déployer les aimants PickPen™ et insérer les pointes 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 doucement les pointes PickPen® contre la paroi des puits d'échantillon pour éliminer l'excédent de gouttelettes de milieu.
9. Transférer les pointes PickPen™ vers le jeu de puits d'échantillon contenant de la solution de lavage pour les principaux STEC fraîche et agiter doucement pendant 10 s (ne pas libérer les particules dans la solution). Tapoter les pointes PickPen™ contre la paroi des puits d'échantillon pour éliminer l'excédent de gouttelettes de solution de lavage pour les principaux STEC.
10. Transférer les pointes PickPen™ dans les puits d'échantillon correspondants contenant le BHI et rétracter les aimants PickPen™ pour libérer les particules dans le BHI.
11. Couvrir chaque barrette de puits d'échantillon contenant le BHI avec un film adhésif avant d'ajouter d'autres échantillons à une nouvelle barrette de puits. Incuber les puits d'échantillon avec BHI contenant des particules pendant 2 à 4 h à 37 ± 1 °C. Répéter les étapes (7) à (11) pour tous les échantillons.
12. Après incubation, retirer le film adhésif correspondant de la barrette de puits d'échantillon restante contenant la solution de lavage pour les principaux STEC. Retirer avec précaution le film adhésif de la barrette d'échantillons avec BHI et le jeter. Déployer les aimants PickPen™ et insérer des pointes dans la barrette de puits contenant le BHI et les particules.

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 BHI.
13. Transférer les pointes PickPen™ vers le second jeu de puits d'échantillon contenant de la solution de lavage pour les principaux STEC fraîche et agiter doucement pendant 10 s (ne pas libérer les particules dans la solution). Tapoter les pointes PickPen™ contre la paroi des puits d'échantillon pour éliminer l'excédent de gouttelettes de solution de lavage pour les principaux STEC.
14. 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.
15. Répéter les étapes (12) à (14) pour tous les échantillons en utilisant de nouvelles pointes PickPen™ pour chaque barrette d'enrichissements.

Procédure de test (amplification et détection)

Changer de gants avant de manipuler les réactifs.

A. Préparation du bloc 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 à -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 dans les **tubes d'amplification**.
2. Retirer les tubes d'amplification MPX pour les principaux STEC du sachet en aluminium et les placer dans le bloc de refroidissement avec gel congelé. Refermer le sachet. Vérifier soigneusement que le culot blanc se trouve au fond des tubes d'amplification.

- 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 tube d'amplification. Appuyer fermement sur le bouchon de chaque tube d'amplification pour le fermer. Inspecter visuellement chaque tube pour s'assurer que le bouchon est bien scellé.
- Placer les tubes d'amplification dans le Rotor-Gene® Assurance® GDS dans l'ordre séquentiel, en commençant par la position 1. Démarrer 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 principaux STEC, et comme **positif** ou **négatif** pour *E. coli* O157:H7, ou comme **Pas d'amp.** Les résultats pour les différents gènes (*eae*, *stx1*, *stx2*) sont également présentés.

Résultats pour les principaux STEC (*eae/stx*) :

Positif : les échantillons sont présumés positifs pour les principaux STEC, ce qui signifie qu'il s'agit de *E. coli* appartenant aux sérogroupes O103, O111, O121, O145, O26, O45 et O157, et possédant le gène *eae* et au moins l'un des gènes codant pour la shigatoxine *stx1* ou *stx2*.

Négatif : les échantillons sont négatifs pour les principaux STEC.

Pas d'amp. (No Amp.) : aucune amplification ne s'est produite. Répéter le test en commençant à l'étape **B. Protocole d'extraction des échantillons**. Si le résultat "Pas d'amp." se répète, contacter votre service technique local.

No.	Name	Top STEC Result	eae Result	stx1 result	stx2 result	Assay	Kit lot
1	Sample 1	Positive	+	+	+	Top STEC MPX	abc123
2	Sample 2	Positive	+	+	-	Top STEC MPX	abc123
3	Sample 3	Positive	+	-	+	Top STEC MPX	abc123
4	Sample 4	Negative	+	-	-	Top STEC MPX	abc123
5	Sample 5	Negative	-	+	+	Top STEC MPX	abc123
6	Sample 6	Negative	-	+	-	Top STEC MPX	abc123
7	Sample 7	Negative	-	-	+	Top STEC MPX	abc123
8	Sample 8	Negative	-	-	-	Top STEC MPX	abc123
9	Sample 9	No Amp	-	-	-	Top STEC MPX	abc123

Résultats pour *E. coli* O157:H7 :

Positif : les échantillons sont présumés positifs pour *E. coli* O157:H7. Certaines souches de STEC appartenant au séro groupe O145 peuvent également apparaître comme positives pour *E. coli* O157:H7.

Négatif : les échantillons sont négatifs pour *E. coli* O157:H7.

Pas d'amp. (No Amp.) : aucune amplification ne s'est produite. Répéter le test en commençant à l'étape **B. Protocole d'extraction des échantillons**. Si le résultat "Pas d'amp." se répète, contacter votre service technique local.

No.	Name	E. coli O157:H7 Result	Assay	Kit lot
1	Sample 1	Positive	Top STEC MPX	abc123
2	Sample 2	Positive	Top STEC MPX	abc123
3	Sample 3	Positive	Top STEC MPX	abc123
4	Sample 4	Negative	Top STEC MPX	abc123
5	Sample 5	Negative	Top STEC MPX	abc123
6	Sample 6	Negative	Top STEC MPX	abc123
7	Sample 7	Negative	Top STEC MPX	abc123
8	Sample 8	Negative	Top STEC MPX	abc123
9	Sample 9	No Amp	Top STEC MPX	abc123

Remarque : Assurance® GDS MPX pour STEC du Top 7 est destiné à la détection des sérotypes des STEC du Top 7 ; cependant, tout isolat d'*E. coli* positif pour eae et contenant également *stx1* et/ou *stx2* est considéré comme une souche potentiellement pathogène.

Confirmation

Dans le cadre de la certification NF VALIDATION, tous les échantillons identifiés comme positifs par Assurance® GDS MPX pour STEC du Top 7 doivent être confirmés par l'un des tests suivants :

- A. STEC du Top 6 non O157. Les STEC du Top 6 non O157 sont identifiés par la combinaison d'un résultat positif issu du canal TOP STEC et un résultat négatif issu du canal O157. Une aliquote de l'enrichissement au mEHEC® issu des échantillons positifs avec GDS MPX pour STEC du Top 7 peut être confirmée pour les STEC du Top 6 via une analyse secondaire par l'essai MPX ID.

Remarque : la méthode NF sera validée uniquement pour la confirmation des STEC non O157 du Top 4 (sérotypes O111, O26, O103 et O145) répertoriés dans la norme ISO/TS 13136 (2012).

- B. *E. coli* O157:H7. Une aliquote de l'enrichissement au mEHEC® issu des échantillons positifs avec GDS MPX pour les STEC du Top 7 peut être confirmée pour *E. coli* O157:H7 via une analyse secondaire par les essais GDS EHEC ID et MPX ID, pour faire la distinction entre O157 et O145, si nécessaire. Certaines souches de STEC appartenant au séro groupe O145 peuvent également apparaître comme positives pour *E. coli* O157:H7.

Remarque : dans l'éventualité de résultats discordants (présumés positifs avec la méthode alternative, non confirmés par l'un des moyens ci-dessus), le laboratoire doit prendre les mesures nécessaires pour s'assurer de la validité des résultats obtenus.

Stockage

Stocker les composants du kit Assurance® GDS MPX pour STEC du Top 7 à 5 ±3 °C. La date de péremption du kit est indiquée sur l'étiquette de la boîte du produit.

Précautions

Respecter les Bonnes pratiques de laboratoire (voir la norme EN ISO 7218).

Le kit Assurance® GDS MPX pour STEC du Top 7 doit être utilisé comme décrit dans le présent document. Le contenu du test peut être nocif en cas d'ingestion.

Ne pas utiliser les réactifs du test Assurance® GDS MPX pour STEC du Top 7 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 pour STEC du Top 7.—Ce produit n'est pas destiné à un usage humain ou vétérinaire. Assurance® GDS MPX pour STEC du Top 7 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 pour STEC du Top 7. 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. En cas de suspicion d'une contamination, humidifier une serviette en papier avec une solution d'eau de Javel à 10 % et essuyer toutes les paillasse de laboratoire et les surfaces de l'équipement. 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 MilliporeSigma.

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 du Top 7

Catégorie de denrées alimentaires	Milieu	Taille de l'échantillon	Rapport échantillon/ milieu (volume de milieu)	Durée d'enrichissement	Température d'enrichissement (préchauffage du milieu)
Sans repiquage dans du BHI					
Viande crue et viande RTC*	mEHEC®	Jusqu'à 25 g	1:10 (225 ml)	6 à 24 h	41,5 ±1 °C (41,5 ±1 °C)
Viande de bœuf crue		Jusqu'à 375 g	1:5 (1 500 ml)	10 à 18 h	41,5 ±1 °C (41,5 ±1 °C)
Volaille crue, produits à base de volaille RTC, RTRH et RTE*		Jusqu'à 25 g	1:10 (225 ml)	8 à 24 h	41,5 ±1 °C (37 ±1 °C)
Lait cru et produits laitiers*		Jusqu'à 25 g	1:10 (225 ml)	10 à 24 h	41,5 ±1 °C (41,5 ±1 °C)
Lait cru et produits laitiers (à l'exception des fromages au lait cru)		Jusqu'à 25 g	1:10 (225 ml)	18 à 24 h	41,5 ±1 °C (41,5 ±1 °C)
Échantillons environnementaux*		Jusqu'à 25 g ou ml ou dispositif d'échantillonnage	1:10	10 à 24 h	41,5 ±1 °C (41,5 ±1 °C)
Avec repiquage dans du BHI					
Fromages au lait cru	mEHEC®	Jusqu'à 25 g	1:10 (225 ml)	18 à 24 h + 2 à 4 h dans du BHI	41,5 ±1 °C (41,5 ±1 °C)

* Pour ces protocoles, respecter les normes EN ISO 6887 (ajout de Tween-80 (10 g/l) pour les matrices > 20 % de graisse).

Certificat NF Validation accordé par AFNOR Certification à Assurance® GDS MPX pour les STEC du Top 7 comme méthode alternative d'analyse pour la détection des STEC du Top 7 dans la viande crue, les produits carnés prêts à cuisiner (RTC), la volaille crue, les produits à base de volaille prêts à cuisiner (RTC), les produits à base de volaille prêts à manger (RTE), les produits à base de volaille prêts à réchauffer (RTRH), le lait cru et les produits laitiers ainsi que les échantillons environnementaux en relation avec la méthode de référence décrite dans la norme internationale ISO EN 13136 conformément à la norme EN ISO 16140-2 (2016). Pour de plus amples informations sur la date de fin de validité de la certification NF VALIDATION, veuillez consulter le certificat TRA 02/13-04/22 disponible sur le site Internet <http://nf-validation.afnor.org/en>.



TRA 02/13-04/22

MÉTHODES ANALYTIQUES ALTERNATIVES POUR L'AGRO-ALIMENTAIRE

<http://nf-validation.afnor.org/en>

Entité de fabrication

BioControl Systems, Inc., 12822 SE 32nd St, Bellevue, WA 98005, États-Unis.

Tél. : +1 425-586-3300 www.sigmaaldrich.com

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

