



BD BBL CHROMagar O157

U.S. Patent No. 6,165,743



*See footnote below

APPLICATION

BBL CHROMagar O157 est un milieu sélectif servant à l'isolement, la différenciation et l'identification présumée d'*Escherichia coli* O157:H7 à partir d'échantillons cliniques et d'échantillons d'origine alimentaire, vétérinaire et environnementale.

BBL CHROMagar O157 a été validé par l'AOAC Research Institute dans le cadre du programme Performance Tested Methods pour l'analyse du boeuf haché cru et du cidre non pasteurisé avec les méthodes FDA BAM, USDA FSIS et ISO.¹⁻³

PRINCIPES ET EXPLICATION DE LA METHODE

Méthode microbiologique.

E. coli O157:H7 est le pathogène le plus fréquemment isolé à partir de selles saignantes.⁴⁻⁶

L'absence de diarrhées hémorragiques n'exclut toutefois pas la présence d'*E. coli* O157:H7.⁷

Ce sérotype est à l'origine d'un large éventail de maladies allant de la diarrhée légère sans hémorragie à la diarrhée hémorragique aiguë (colite hémolytique), au syndrome hémolytique et urémique et jusqu'à la mort.⁴⁻⁶ L'isolement d'*E. coli* O157:H7 dépasse celui d'autres pathogènes entériques courants, notamment les *Shigella*, dans de nombreuses régions et de nombreux groupes d'âge. La transmission a lieu le plus souvent par l'ingestion de boeuf cru ou mal cuit, mais d'autres produits alimentaires ont également été impliqués.⁴⁻⁶ En outre, une transmission de personne à personne peut également s'effectuer ainsi qu'une transmission par l'eau des activités de loisirs.⁴⁻⁶

CHROMagar O157 sert à l'isolement, la différenciation et l'identification présumée d'*E. coli* O157:H7. En raison de la présence de substrats chromogènes dans le milieu, les colonies d'*E. coli* O157:H7 produisent un colorant de couleur mauve, ce qui permet leur identification présumée à partir de la boîte de Pétri d'isolement primaire et de les différencier des autres organismes. Dans les échantillons avec de faibles concentrations en *E. coli* O157:H7, des méthodes d'enrichissement peuvent être utiles avant d'ensemencer le milieu.

CHROMagar O157 a été initialement mis au point par A. Rambach, CHROMagar, Paris, France. BD, sous un contrat de licence, en a optimisé la préparation en utilisant les droits de propriété intellectuelle spécifiques servant à la fabrication du milieu préparé **BBL CHROMagar O157** en boîtes de Pétri.

Des peptones **Difco** spécialement sélectionnées fournissent les éléments nutritifs. L'addition de tellurite de potassium, de céfixime et de cefsulodine réduit le nombre de bactéries autres que *E. coli* O157:H7 se développant sur ce milieu. Le mélange chromogène se compose de substrats artificiels (chromogènes) qui libèrent un composé coloré insoluble lorsqu'ils sont hydrolysés par une enzyme spécifique. *E. coli* O157:H7 hydrolyse l'un de ces substrats chromogènes, produisant ainsi des colonies mauves. Le développement de colonies mauves est considéré comme une identification par présomption d'*E. coli* O157:H7 sur **BBL CHROMagar O157**. Les bactéries autres que *E. coli* O157:H7 peuvent utiliser les autres substrats

*DES ECHANTILLONS FOURNIS PAR LE FABRICANT DE CE MODELE DE TROUSSE DIAGNOSTIQUE ONT ETE EVALUES INDEPENDAMMENT PAR L'AOAC RESEARCH INSTITUTE ET ONT DONNE DES PERFORMANCES CONFORMES AUX SPECIFICATIONS DU FABRICANT STIPULEES DANS LA NOTICE DESCRIPTIVE DE LA TROUSSE DIAGNOSTIQUE. LE FABRICANT CERTIFIE QUE CETTE TROUSSE EST CONFORME EN TOUS POINTS AUX SPECIFICATIONS INITIALEMENT EVALUEES PAR L'AOAC RESEARCH INSTITUTE TELLES QUE DECRITES DANS LE CERTIFICAT NUMERO 090501 DE *Performance Tested Methods*sm.

chromogènes et produire des colonies de couleur bleu à bleu-vert ou, si aucun des substrats chromogènes n'est utilisé, les colonies peuvent garder leur couleur naturelle. Ceci facilite la détection et la différenciation d'*E. coli* O157:H7 des autres organismes.

REACTIFS

BD CHROMagar O157 Medium

Formule approximative* par litre d'eau purifiée

Chromopeptone	16,0 g
Chlorure de sodium	7,0 g
Mélange chromogène	0,65 g
Tellurite de potassium	2,5 mg
Céfixime	0,05 mg
Cefsulodine	4,0 mg
Gélose	14,0 g

pH : 7,1 ± 0,2

*Ajustée et/ou complétée en fonction des critères de performance imposés.

PRECAUTIONS

IVD . A usage professionnel uniquement.

En présence d'une condensation excessive, inverser le fond de la boîte sur le couvercle excentré pour sécher la condensation afin d'empêcher la formation d'un joint entre la partie supérieure et la partie inférieure de la boîte pendant l'incubation. Conserver à l'abri de la lumière pendant le séchage. Voir **STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION**.

Ne pas utiliser de boîte de Pétri présentant des signes de contamination microbienne, de décoloration, de dessiccation ou de fissure ou d'autres signes de détérioration.

Des microorganismes pathogènes, notamment les virus de l'hépatite et de l'immunodéficience humaine, sont susceptibles d'être présents dans les échantillons cliniques. Respecter les Précautions standard⁸⁻¹¹ et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques.

Des microorganismes pathogènes, y compris *E. coli* O157, peuvent être présents dans les échantillons alimentaires. Respecter les techniques d'asepsie et prendre les précautions en vigueur contre les dangers microbiologiques.

Après utilisation, stériliser à l'autoclave les boîtes préparées, les récipients ayant contenu des échantillons et tout autre matériel contaminé avant de les éliminer.

Consulter le document **MODE D'EMPLOI GENERAL** pour plus d'informations concernant les procédures de manipulation aseptique, les risques biologiques et l'élimination des produits usagés.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Dès réception, conserver les boîtes de Pétri dans l'obscurité entre 2 et 8 °C, dans leur emballage d'origine, jusqu'au moment de leur utilisation. Ne pas les congeler ni les surchauffer. Ne pas ouvrir prématurément. Les boîtes peuvent êtreensemencées jusqu'à la date de péremption indiquée (voir l'étiquette de l'emballage) et incubées pendant les durées recommandées. Laisser le milieu s'équilibrer jusqu'à la température ambiante avant de l'ensemencer.

Les boîtes provenant de piles de 10 ouvertes peuvent être utilisées pendant une semaine, dans la mesure où elles sont conservées dans un lieu propre et obscur entre 2 et 8 °C. **Maintenir à l'abri de la lumière avant et pendant l'incubation puisque la lumière peut détruire les chromogènes.**

CONTROLE DE QUALITE PAR L'UTILISATEUR

Contrôler les performances en ensemençant un échantillon représentatif de boîtes avec des cultures pures de souches de contrôle stables, produisant une réaction connue (pour de plus amples informations, consulter le **MODE D'EMPLOI GENERAL**). Les souches citées dans le tableau ci-dessous sont recommandées pour ces contrôles. Incuber en conditions aérobies pendant 18 à 24 h, à 35 ± 2 °C à l'obscurité.

Souches	Croissance
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 700728 (=NCTC 12900)	Croissance moyenne à importante. Colonies gris-violet à rose-violet (= mauve)

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibition partielle à complète; colonies bleu-vert ; pouvant être entourées d'un halo bleu-vert
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	Croissance : Colonies bleu-vert à bleu
Sans ensemencement	Incolore à légèrement beige, transparent

Effectuer les contrôles de qualité conformément aux réglementations locales, nationales et/ou internationales en vigueur, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé au clinicien de consulter les directives appropriées du Clinical and Laboratory Standards Institute (anciennement NCCLS) pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

METHODE

Matériaux fournis

BD CHROMagar O157 Medium (boîtes de Pétri **Stacker** de 90 mm). Produits contrôlés microbiologiquement.

Matériaux requis mais non fournis : Milieux de culture auxiliaires, réactifs, souches de contrôle de qualité et autre matériel de laboratoire nécessaire.

Types d'échantillons

Pour une utilisation clinique, consulter les protocoles de laboratoire pour de plus amples informations sur les méthodes de prélèvement et de manipulation des échantillons. Ce milieu sert à l'isolement d'*Escherichia coli* O157:H7 à partir d'échantillons de selles ou d'écouvillonnages rectaux de patients suspectés d'être infectés par ce pathogène.

Pour les tests d'échantillons agroalimentaires, utiliser les méthodes standard appropriées pour obtenir de plus amples informations concernant la préparation et le traitement des échantillons en fonction du type et de l'échantillon et de la situation géographique.

Voir également la rubrique **CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE**.

Mode opératoire du test

Respecter les techniques d'asepsie. La surface de la gélose doit être lisse et humide, mais sans excès d'humidité.

Pour les échantillons cliniques, dès que possible après la réception au laboratoire, ensemercer une boîte de **BBL CHROMagar O157** avec l'échantillon et strier afin de réaliser l'isolement. Si l'échantillon est cultivé à partir d'un écouvillon, rouler ce dernier sur une petite zone de la surface près du bord, puis strier à partir de cette zone à l'aide d'un ensemencement à anse. Les boîtes peuvent également être ensemencées à partir de préenrichissements. Incuber les boîtes de Pétri en position retournée (gélose en haut) en aérobiose à 35 ± 2 °C pendant 18 h à 24 h. D'autres milieux tels que **BD MacConkey II Agar** peuvent aussi être ensemencés afin de détecter d'autres pathogènes entériques.

Pour les échantillons alimentaires, consulter les références et appliquer les méthodes standard appropriées. Ensemercer le bouillon d'enrichissement incubé ou une particule d'échantillon alimentaire tamisé sur **BBL CHROMagar O157** et strier pour réaliser l'isolement. Incuber les boîtes de Pétri en position retournée (gélose en haut) en aérobiose à 35 ± 2 °C pendant 18 h à 24 h.

Résultats

Au terme d'une durée d'incubation appropriée, examiner les boîtes sur un fond blanc. *E. coli* O157:H7 produit des colonies de couleur mauve sur le milieu **BBL CHROMagar O157**. Toutes les colonies mauves doivent être confirmées biochimiquement et/ou sérologiquement comme étant *E. coli* O157:H7 avant d'être rendues comme tel.^{1,2,3,6} Les organismes à Gram positif doivent être complètement inhibés. Les organismes à Gram négatif autres que *E. coli* O157:H7 seront ou inhibés ou ils produiront des colonies incolores, bleues, vertes, bleu-vert (aigue-marine) ou de leur couleur naturelle.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE

BD CHROMagar O157 est un milieu chromogène servant à l'isolement sélectif et l'identification présumée d'*E. coli* O157:H7 à partir d'échantillons cliniques et d'échantillons d'origine alimentaire, vétérinaire et environnementale.

Résultats de performances¹²

Tests cliniques : Un total de 110 isolats de matières fécales congelés et de 16 cultures d'échantillons de selles (10 fraîches et 6 en archives) ont été évalués dans un hôpital métropolitain en utilisant **BBL CHROMagar O157**, Sorbitol MacConkey (SMAC) et Sorbitol MacConkey additionné de céfixime et tellurite (SMAC-CT). Les isolats de matières fécales congelés se composaient de 50 *E. coli* O157:H7, 15 *E. coli* non-O157, 8 *E. coli* non-O157 positifs pour les toxines de type Shigella et 37 autres *Enterobacteriaceae* et bacilles non fermentatifs à Gram négatif. Sept des 16 cultures de selles testées se sont avérées positives pour *E. coli* O157:H7. On a obtenu les sensibilités et spécificités suivantes :

	Sensibilité (Nbre)	Spécificité (Nbre)
BBL CHROMagar O157	98 % (56/57)	100 % (69/69)
SMAC	96 % (55/57)	80% (55/69)
SMAC-CT	100 % (57/57)	93% (64/69)

Tests des échantillons agroalimentaires

BBL CHROMagar O157 a été validé par l'AOAC Research Institute dans le cadre du programme Performance Tested Methods^{SM 12}. **BBL CHROMagar O157** a été évalué pour la détection d'*E. coli* O157:H7 dans le boeuf haché cru et le cidre non pasteurisé à l'aide d'échantillonsensemencés. La mise en évidence d'*E. coli* O157:H7 sur le milieu **BBL CHROMagar O157** a été comparée à celle sur les milieux de référence en boîtes de Pétri des méthodes FDA BAM, USDA FSIS et ISO. Les procédures d'enrichissement et de dépistage recommandées par les méthodes de référence ont été appliquées pour les milieux de référence comme pour le milieu **BBL CHROMagar O157**. Une séparation immunomagnétique (IMS) a été exécutée conformément aux méthodes USDA et ISO. Sur les 180 échantillons alimentaires testés, 45 l'ont été en utilisant les méthodes FDA BAM et USDA FSIS et 90 à l'aide des méthodes ISO. **BBL CHROMagar O157** a donné une sensibilité et une spécificité de 100 % chacune par comparaison aux méthodes de référence pour les deux types d'échantillons agroalimentaires. Les tests de ces échantillons agroalimentaires n'ont donné aucun faux négatif. Un test de Chi-Deux n'a révélé aucune différence statistique entre le milieu **BBL CHROMagar O157** et les milieux de référence en boîtes de Pétri en ce qui concerne la mise en évidence. Des isolats connus, à savoir 54 souches d'*E. coli* O157:H7 (dont 3 étaient des souches non motiles) et 32 souches non-*E. coli* O157:H7 ont été évalués sur le milieu **BBL CHROMagar O157** et ont donné une sensibilité et une spécificité égales à 100 %. Les résultats de ces études indiquent que **BBL CHROMagar O157** est un milieu efficace pour la mise en évidence d'*E. coli* O157:H7 dans le bœuf haché cru et le cidre non pasteurisé à l'aide des méthodes FDA BAM, USDA FSIS et ISO. Voir le tableau 1 pour un récapitulatif des résultats de l'étude comparative des méthodes à des fins de validation.

Tableau 1 : Récapitulatif des résultats de la comparaison des méthodes pour la validation

Matrice alimentaire	Méthode	Taux d'inoculum	Nbre d'échantillons	Nbre de positifs	Positifs pour la référence	Positifs sur CHROMagar O157	Concordance entre méthodes ¹	Chi-Deux ³
Bœuf haché cru	Boeuf USDA	Elevé	20	15	12	15	85 % ²	1,33
		Faible	20	13	10	13	85 % ²	1,33
		Contrôle	5	0	0	0	-	-
Bœuf haché cru	Bœuf ISO	Elevé	20	17	16	17	95 % ²	0,00
		Faible	20	10	9	10	95 % ²	0,00
		Contrôle	5	0	0	0	-	-
Cidre non pasteurisé	Cidre ISO	Elevé	20	19	19	19	100 %	0,00
		Faible	20	14	14	14	100 %	0,00
		Contrôle	5	0	0	0	-	-
Cidre non pasteurisé	Cidre FDA	Elevé	20	13	13	13	100 %	0,00
		Faible	20	10	10	10	100 %	0,00
		Contrôle	5	0	0	0	-	-

¹ Représente le pourcentage combiné d'échantillons positifs et négatifs confirmés qui concordait entre les méthodes de référence et la méthode **BBL CHROMagar O157**.

² Echantillons positifs supplémentaires détectés par la méthode **BBL CHROMagar O157** : 3 positifs supplémentaires pour le boeuf haché cru par rapport à la méthode USDA/FSIS et 1 positif supplémentaire pour le boeuf haché cru par rapport à la méthode ISO.

³ Les valeurs de Chi-Deux < 3,84 indiquent l'absence de différence significative à $p < 0,05$.

Limites de la méthode

BBL CHROMagar O157 ne détecte pas les sérotypes entérohémorragiques ou entéropathogènes d'*E. coli* autres que O157:H7, puisqu'ils peuvent en être biochimiquement distincts. Les souches positives pour la β -glucuronidase d'*E. coli* O157:H7 ne seront pas mises en évidence sur le milieu **BBL CHROMagar O157** ; ces souches sont toutefois rares.

Le milieu **BBL CHROMagar O157** ne distingue pas les souches d'*E. coli* O157:H7 productrices de toxines des souches non productrices.

Les organismes autres que *E. coli* O157:H7, tels que *Proteus* spp., peuvent se développer sur ce milieu ; mais en général ils produisent une coloration différente. Si de colonies mauves non isolées sont observées, il suffit de repiquer sur une autre boîte de Pétri contenant **BBL CHROMagar O157** pour parvenir à l'isolement. De rares souches d'*E. coli* (biochimiquement similaires aux *Shigella*) ont donné des faux positifs sur le milieu **BBL CHROMagar O157**. Une incubation à des températures inférieures à celles qui sont recommandées peut retarder la détection des réactions positives. Si la température d'incubation est inférieure à 35 ± 2 °C, il faut incuber les boîtes de Pétri pendant 24 heures entières avant de rendre un résultat négatif.¹²

Des tests de confirmation sont nécessaires pour une identification définitive.^{1-3,6}

Ce milieu ne doit pas être utilisé pour l'isolement de pathogènes entériques autres que *E. coli* O157:H7.

REFERENCES

1. U.S. Food and Drug Administration. 2002. Bacteriological analytical manual (online), Chapter 4A: Diarrheagenic Escherichia coli. AOAC International, Gaithersburg, MD. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>
2. U. S. Department of Agriculture. 2002. Detection, isolation and identification of Escherichia coli O157:H7 and O157:NM (Nonmotile) from meat products. In Microbiology laboratory guidebook MLG 5.03.
3. International Organization for Standards (ISO) Microbiological Methods, ISO 16654: Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection of Escherichia coli O157, First Edition, 2001-05-01.
4. Moe, C. 2002. Waterborne transmission of infectious agents. In C. Hurst, R. Crawford, G. Knudsen, M. McInerney, and L. Stetzenbach (eds.), Manual of environmental microbiology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
5. Doyle, M., T. Zhao, J. Meng, and S. Zhao. 1997. Escherichia O157:H7. In M. Doyle, L. Beuchat, and T. Montville (eds.), Food microbiology fundamentals and frontiers. American Society for Microbiology, Washington, DC.
6. Bopp, C.A., F.W. Brenner, P.I. Fields, J.G. Wells, and N.A. Strockbine. 2003. Escherichia, Shigella and Salmonella. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, J.H. Jorgensen and R.H. Tenover (eds.), Manual of clinical microbiology. 8th ed. American Society for Microbiology, Washington DC.
7. CDC MMWR Jan 26, 2001/50 (RR02): 1-69. Diagnosis and management of foodborne illness.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. 2nd ed., NCCLS, Wayne, Pa.
9. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. Infect. Control Hospital Epidemiol. 17:53-80.
10. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
11. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work

(seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC).
Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021-0045.
12. Data on file, BD Diagnostic Systems.

CONDITIONNEMENT

BD CHROMagar O157 Medium

N° réf. 254105 Milieux en boîtes de Pétri prêts à l'emploi, 20 unités par carton

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

Pour plus d'informations, contacter le représentant local de BD.



Becton Dickinson GmbH
BD Diagnostic Systems
Tullastrasse 8 – 12
D-69126 Heidelberg/Germany
Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16
Reception_Germany@europe.bd.com

BD Diagnostic Systems Europe
Becton Dickinson France SA
11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix/France
Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 <http://www.bd.com>

AOAC is a trademark and Performance Tested Methods is a service mark of AOAC International.
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
CHROMagar is a trademark of Dr. A. Rambach.
Difco is a trademark of Difco Laboratories, subsidiary of Becton, Dickinson and Company.
BD, BD Logo and BBL are trademarks of Becton, Dickinson and Company.
© 2006 BD.