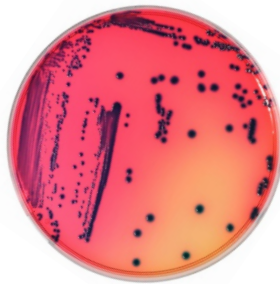

RAPID'*E. coli* O157:H7 Agar

User Guide

Selective chromogenic media for the detection, isolation, and presumptive identification of *Escherichia coli* O157:H7 in products for use in human food and environmental samples

Catalog #3564748, dehydrated, 100 g



BIO-RAD

Table of Contents

Section 1	Introduction	1
Section 2	RAPID' <i>E.coli</i> O157:H7 Principle	1
Section 3	Theoretical Formula	1
Section 4	Shelf Life and Storage	1
Section 5	Materials Required but Not Supplied	2
	Equipment.....	2
	Supplies	2
Section 6	Precautions, Limitations of Use, and Quality Control	3
	Precautions.....	3
	Limitations of Use	3
	Quality Control	3
Section 7	Protocol.....	4
	Preparation of Dehydrated Medium.....	4
	Sample Enrichment and Immunomagnetic Separation	4
	Inoculation and Plate Reading.....	5
Section 8	Confirmation of Positive Results.....	5
Section 9	Confirmation of Other Methods.....	6
	Confirmation of Positive Results with iQ-Check <i>E.coli</i> O157:H7 (NF VALIDATION Certified Protocol)	6
Section 10	Test Performance and Validations.....	6
Section 11	References.....	7
Section 12	Revision History	7

Section 1 Introduction

First associated with human illness in undercooked ground beef in 1982, *E. coli* O157:H7 became clearly recognized as an important pathogen of human concern in 1993 after a substantial outbreak of the bacteria developed from undercooked ground beef sold at a fast food restaurant chain. As a result of this outbreak, in 1994, the United States Department of Agriculture (USDA) Food Safety and Inspection Service (FSIS) began a microbiological testing program to detect *E. coli* O157:H7 in ground beef. Common symptoms of illness associated with *E. coli* O157:H7 infection include watery, bloody diarrhea, severe abdominal cramps, and vomiting. As many as 8–18% of patients, mostly the young and the elderly, develop hemolytic uremic syndrome (HUS), which causes hemolytic anemia, thrombocytopenia, and kidney failure. In recent years, there have been large outbreaks of the bacteria associated particularly with ground beef and leafy greens.

Section 2 RAPID'*E.coli* O157:H7 Principle

RAPID'*E.coli* O157:H7 medium is a selective medium combining chromogenic substrates and biochemical indicators. This combination provides direct presumptive identification of *E. coli* O157:H7, including atypical strains, among the interfering flora on the basis of the specific metabolic and enzymatic profiles observed. The selectivity of the medium is increased by adding selective agents novobiocin (10 mg/L) and potassium tellurite (0.8 mg/L).

Section 3 Theoretical Formula

Enrichment mixture	58 g
Selective agents	6.25 g
Chromogenic mix	0.75 g
Agar	15 g
Distilled water	qsp 1,000 ml

Final pH at 25°C = 6.9 ± 0.2

Section 4 Shelf Life and Storage

- Dehydrated agar and supplement: Store at 2–8°C in a carefully sealed package in a dry and dark place
- Plate prepared from the dehydrated agar: Store for 15 days at 2–8°C in a carefully sealed package in a dry and dark place

Section 5 Materials Required but Not Supplied

Equipment

- All usual laboratory equipment
- Hot plate
- Magnetic particle concentrator
- Scale, sensitivity of 0.1 g
- Stirrer/homogenizer
- Thermostatically controlled incubator or incubation room, precise to $\pm 1^{\circ}\text{C}$
- Water bath

Supplies

- Enrichment medium: Modified EC Broth, mEC+n
- Enrichment medium: Modified Tryptic Soy Broth + 20 mg/L novobiocin, mTSB+n (catalog #3555426, 225 ml x 6 bottles including novobiocin; 3564426, dehydrated, 500 g)
- Immunoconcentration beads for *E. coli* O157:H7
- Inoculating loops
- Novobiocin supplement
- Potassium tellurite supplement
- Sterile petri dishes (90 mm)
- Sterile pipets
- Sterile weigh bags

Section 6

Precautions, Limitations of Use, and Quality Control

Precautions

- Respect Good Laboratory Practice (EN ISO 7218). Appropriate protection, such as gloves and lab coats, should be worn when working with potentially infectious live bacteria such as *E. coli* O157:H7
- Media that have come in contact with food samples should be considered contaminated and should be disposed of in accordance with local rules and regulations
- Before using RAPID'*E.coli* O157:H7, let the petri dishes dry in compliance with the EN ISO 11133 standard at 25–50°C until droplets disappear from the surface of the medium. Avoid prolonged drying, however, as this could alter the performance of the medium
- Performing the immunomagnetic separation step requires sufficient training and regular practice of the technique. Following these precautions for use is a prerequisite for obtaining valid, reliable results
- When applying immunomagnetic separation, viscous or fatty samples may cause interference in the magnetic bead capture (low retrieval, reduced specificity of the antibody action). See the suppliers' technical solutions for handling such samples
- Reading the latex tests may require prior training, notably for interpreting the agglutination of the H7 flagellar antigen, which can be very fine. When using the latex tests, carefully follow the manufacturer's instructions and recommendations for use

Limitations of Use

- In the context of the NF VALIDATION mark, no samples over 25 g were tested
- The agar will turn completely red in the presence of pure strains of *E. coli* O157:H7
- On agar with a mixture of strains, typical *E. coli* O157:H7 produce dark blue to black colonies with a slight black precipitate around the edges of the colony, sometimes combined with a red halo
- For characteristic colonies giving a positive O157 latex test and a negative H7 latex test, the laboratory will have to apply the appropriate measures to ensure the validity of the results obtained

Quality Control

- Every product manufactured and marketed by Bio-Rad is subject to a quality assurance procedure at all stages, from reception of raw materials through to marketing of the finished products. Each batch of finished product undergoes quality control according to EN ISO 11133 and is marketed only if it satisfies the acceptability criteria. Documentation relative to the production and quality control of each batch is kept on file
- For SDS product safety information and certificate of analysis, visit www.bio-rad.com

Section 7 Protocol

Preparation of Dehydrated Medium

1. Always shake bottle before use.
2. Dissolve 80 g of powder in 1 L of distilled water and mix until a homogenous suspension is obtained.
3. Bring to a boil until completely dissolved. Avoid overheating.
4. **Do not autoclave.**
5. Cool the medium to 45–50°C in a water bath.
6. Aseptically add novobiocin supplement (10 mg/L) and potassium tellurite supplement (0.8 mg/L). Mix thoroughly.
7. Dispense in Petri dishes and leave to dry overnight at room temperature.
8. One 100 g bottle of powder makes 1.25 L of medium.

Sample Enrichment and Immunomagnetic Separation

Scope (matrices)	Enrichment	Certification
Ground beef	n g/ml of sample in 9 x n ml mEC+n 35 ± 2°C for 16 hr	AOAC
Fresh spinach	According to FDA BAM 37 ± 0.5°C for 24 hr	AOAC
Meat products, dairy products, fruits and vegetables, composite foods	n g/ml of sample in 9 x n ml prewarmed mTSB+n 41.5 ± 1°C for 16–24 hr	NF VALIDATION

1. Dilute samples in enrichment broth according to instructions in the table above.
2. Homogenize with stirrer/homogenizer.
3. Incubate according to instructions in the table above.
4. When performing the ISO 16649 standard method, follow sample enrichment protocol as written in the standard.
5. Use a system of paramagnetic beads coated with specific antibodies for capturing *E. coli* O157. Carefully follow the supplier's recommendations for the immunomagnetic separation protocol.

Inoculation and Plate Reading

1. Streak 50 µl of washed, resuspended magnetic beads on dried RAPID'*E.coli* O157:H7 agar.
2. Incubate plate at 37 ± 1°C for 24 ± 2 hr.
3. When following the ISO 16649 standard method, repeat inoculation on CT-SMAC agar.
4. Typical *E. coli* O157:H7 (sorbitol [–] and β-glucuronidase [–]) present characteristic bright, bulging colonies measuring 1 to 2 mm, dark blue to black in color, with a slight black precipitate around the edges of the colonies. Atypical β-glucuronidase (+) strains form colonies of the same type.
5. Strains of atypical sorbitol (+) *E. coli* O157:H7 are also detected. These colonies will have a blue to turquoise color with a weak black precipitate around the edges of the colonies.

Section 8 Confirmation of Positive Results



1. In the context of AOAC validation, confirm suspect isolated colonies according to the classic confirmation test procedure described in the standard reference methods.
2. In the context of NF VALIDATION mark, all samples identified as positive must be confirmed in one of the following ways:
 - a. Using the conventional tests described in the CEN or ISO standard methods (including the purification step).
 - b. Using nucleic probes as described in the ISO 7218 standard (for example, iQ-Check *E. coli* O157:H7 PCR Detection Kit, catalog #3578114) using isolated colonies (with or without purification step).
 - c. Using latex tests for O157 and H7 starting with 1 to 3 isolated colonies. An isolation step must be performed in case of confirmation with two latex tests.
 - d. Using any other NF VALIDATION certified method based on a different principle from that of RAPID'*E.coli* O157:H7. The validated protocol of the second method must be respected in its entirety. All steps preceding the detection step used as a starting point for confirmation must be common to both methods.
3. In the event of discordant results (presumptive positive with RAPID'*E.coli* O157:H7, negative with confirmation method and particularly with the latex test), the laboratory must follow the necessary steps to ensure validity of the result obtained.

Section 9 Confirmation of Other Methods

Confirmation of Positive Results with iQ-Check *E.coli* O157:H7 (NF VALIDATION Certified Protocol)

1. Starting from the buffered peptone water enrichment, use a system of paramagnetic beads coated with specific antibodies for capturing *E. coli* O157. Carefully follow the supplier's recommendations for the immunomagnetic separation protocol.
2. Using a sterile loop, streak on RAPID *E.coli* O157:H7 Agar.
3. Incubate plate at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 ± 2 hr.
4. Restreak obtained colonies on a nonselective agar plate to obtain isolated colonies.
5. Perform a confirmation of 1 to 3 isolated colonies using O157 and H7 latex agglutination tests as described in Section 8.2.c.

Section 10 Test Performance and Validations

Certification	Scope	Validation Protocol	Reference Protocol	Certificate Reference
AOAC-RI	Ground beef and fresh spinach	Performance Tested Methods	FDA BAM Chapter 4A USDA MLG 5C.00	 License# 060701
NF VALIDATION	Meat products, dairy products, fruits and vegetables, composite foods	EN ISO 16140-2	EN ISO 16654	 BRD 07/14–09/07 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Certified by AFNOR Certification Valid until: Refer to the certificate available on the AFNOR Certification website: http://nf-validation.afnor.org/en

Section 11 References

ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 16654:2001// ADM 1: 2017/ ADM 2:2023. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.

United States Department of Agriculture. Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 5C.00: Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7ffc02b5-3d33-4a79-b50c-81f208893204/mlg-5.pdf?MOD=AJPERES>, accessed May 14, 2020.

United States Food and Drug Administration (2017). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-diarrheagenic-escherichia-coli>, accessed May 14, 2020.

Section 12 Revision History

Release date	Document number	Change
November 2020	10000127898 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Major change - New document design - Document number change — previous version RAPID_E.coli 0157:H7_V3_04 March 2020
August 2023	10000127898 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Withdrawal of novobiocin supplement - Selective supplement preparation update - References update

Visit www.bio-rad.com/rapidmedia for more information on our complete range of RAPID chromogenic media

BIO-RAD is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK is a trademark of Bio-Rad Europe GMBH in certain jurisdictions.

All trademarks used herein are the property of their respective owner.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 00 800 00 24 67 23 Belgium 00 800 00 24 67 23 Brazil 4003 0399 Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 00 800 00 24 67 23 Denmark 00 800 00 24 67 23 Finland 00 800 00 24 67 23 France 00 800 00 24 67 23 Germany 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300 Hungary 00 800 00 24 67 23 India 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050 Italy 00 800 00 24 67 23 Japan 81 3 6361 7000 Korea 82 2 3473 4460 Luxembourg 00 800 00 24 67 23 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 00 800 00 24 67 23 New Zealand 64 9 415 2280 Norway 00 800 00 24 67 23 Poland 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23 Russian Federation 00 800 00 24 67 23 Singapore 65 6415 3188 South Africa 00 800 00 24 67 23 Spain 00 800 00 24 67 23 Sweden 00 800 00 24 67 23 Switzerland 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 651 8311 United Arab Emirates 36 1 459 6150 United Kingdom 00 800 00 24 67 23

Sig 0220



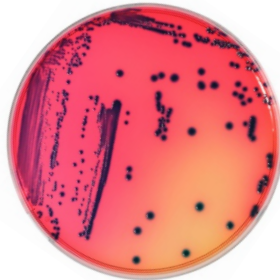
10000127898 Ver B

RAPID'*E. coli* O157:H7 Agar

Guide d'utilisation

Milieu chromogénique sélectif pour la détection, l'isolement et l'identification présumée des *Escherichia coli* O157:H7 dans les produits destinés à la consommation humaine et dans les échantillons environnementaux

N° de référence 3564748, base déshydratée, 100 g



BIO-RAD

Sommaire

Section 1	Introduction	3
Section 2	RAPID' <i>E.coli</i> O157:H7 - Principe.....	3
Section 3	Formule théorique.....	3
Section 4	Durée de conservation et stockage	3
Section 5	Matériel requis non fourni	4
	Matériel	4
	Produits.....	4
Section 6	Précautions, limites d'utilisation et contrôle qualité	5
	Précautions	5
	Limites d'utilisation.....	5
	Contrôle qualité.....	5
Section 7	Protocole.....	6
	Préparation du milieu de culture déshydraté	6
	Enrichissement de l'échantillon et séparation immunomagnétique.....	6
	Inoculation et lecture.....	7
Section 8	Confirmation des résultats positifs.....	7
Section 9	Confirmation d'autres méthodes.....	8
	Confirmation des résultats positifs avec iQ-Check <i>E.coli</i> O157:H7 (NF VALIDATION – Protocole certifié)	8
Section 10	Performance du test et validations	8
Section 11	Références.....	9
Section 12	Historique des révisions.....	9

Section 1 Introduction

Associée pour la première fois en 1982 à une maladie humaine causée par la viande de bœuf hachée insuffisamment cuite, la bactérie *E. coli* O157:H7 a été clairement identifiée comme important agent pathogène humain en 1993, après une flambée épidémique issue d'une mauvaise cuisson de bœuf haché dans une chaîne de restauration rapide. En conséquence, en 1994, le service FSIS (Food Safety and Inspection Service) de l'USDA (United States Department of Agriculture, Département de l'Agriculture des États-Unis) a lancé un programme de test microbiologique pour détecter *E. coli* O157:H7 dans le bœuf haché. Les symptômes courants associés à une infection par *E. coli* O157:H7 incluent une diarrhée aqueuse et sanguinolente, de fortes douleurs abdominales et des vomissements. Chez 8 à 18 % des patients, principalement des enfants et des personnes âgées, apparaît un syndrome hémolytique et urémique, qui entraîne une anémie hémolytique, une thrombocytopénie et une insuffisance rénale. Au cours des dernières années, d'importantes flambées d'infections bactériennes ont eu lieu, associées particulièrement à la consommation de bœuf haché et de légumes-feuilles.

Section 2 RAPID'*E.coli* O157:H7 - Principe

RAPID'*E.coli* O157:H7 est un milieu sélectif qui combine des substrats chromogènes et des indicateurs biochimiques. Cette combinaison permet d'obtenir une identification directe présumée des *E.coli* O157:H7, y compris les souches atypiques, parmi la flore interférente et sur la base des profils métaboliques et enzymatiques spécifiques observés. La sélectivité du milieu est accrue grâce à l'ajout d'agents sélectifs, la novobiocine (10 mg/L) et le tellurite de potassium (0,8 mg/L).

Section 3 Formule théorique

Mélange d'enrichissement	58 g
Agents sélectifs	6,25 g
Mélange chromogène	0,75 g
Agar	15 g
Eau distillée	q.s.p. 1 000 ml

pH final à 25 °C = 6,9 ± 0,2

Section 4 Durée de conservation et stockage

- Gélose base déshydratée et supplément : 2–8 °C en emballage soigneusement scellé dans un endroit sec et à l'abri de la lumière.
- Boîte préparée à partir de la gélose base déshydratée : 15 jours à 2–8 °C, en emballage soigneusement scellé, dans un endroit sec et à l'abri de la lumière.

Section 5

Matériel requis non fourni

Matériel

- Tout le matériel de laboratoire habituel
- Plaque chauffante
- Concentrateur de particules magnétiques
- Balance, sensibilité 0,1 g
- Agitateur/homogénéisateur
- Étuve ou enceinte thermostatique, précision ± 1 °C
- Bain-marie

Produits

- Milieu d'enrichissement : Bouillon EC modifié, mEC+n
- Milieu d'enrichissement : Bouillon de soja tryptique modifié + 20 mg/L novobiocine, mTSB+n (n° de référence 3555426, 225 ml x 6 flacons y compris la novobiocine ; 3564426, base déshydratée, 500 g)
- Billes d'immunoconcentration pour *E. coli* O157:H7
- Anses d'inoculation
- Supplément novobiocine
- Supplément tellurite de potassium
- Boîtes de Pétri stériles (\varnothing 90 mm)
- Pipettes stériles
- Sacs de pesée stériles

Section 6

Précautions, limites d'utilisation et contrôle qualité

Précautions

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (EN ISO 7218). Porter un équipement de protection approprié, par exemple des gants et une blouse de laboratoire, pour travailler avec des bactéries vivantes potentiellement infectieuses telles que les *E. coli* O157:H7.
- Les milieux qui sont entrés en contact avec des échantillons alimentaires doivent être considérés comme contaminés et doivent être éliminés conformément aux règles et réglementations locales.
- Avant d'utiliser les boîtes RAPID'*E.coli* O157:H7, laisser sécher à 25–50 °C conformément à la norme EN ISO 11133, jusqu'à ce que les gouttelettes disparaissent de la surface du milieu. Éviter cependant un séchage prolongé afin de ne pas altérer l'efficacité du milieu.
- L'étape de séparation immunomagnétique nécessite une formation adéquate et une pratique régulière de la technique. Le respect de ces précautions d'utilisation est un prérequis à l'obtention de résultats valides et fiables.
- Lors de la séparation immunomagnétique, des échantillons visqueux ou gras peuvent entraîner des interférences avec la capture de billes magnétiques (faible récupération, spécificité réduite de l'action des anticorps). Se reporter aux solutions techniques du fournisseur pour le traitement de ce type d'échantillon.
- La lecture des tests au latex peut nécessiter une formation préalable, notamment l'interprétation de l'agglutination de l'antigène flagellaire H7, qui peut être très subtile. Lors de l'utilisation des tests au latex, suivre attentivement les instructions et recommandations du fabricant.

Limites d'utilisation

- Dans le contexte de la marque NF VALIDATION, aucun échantillon de plus de 25 g n'a été analysé.
- La gélose devient totalement rouge en présence de souches pures d'*E. coli* O157:H7.
- Sur une gélose avec un mélange de souches, la bactérie *E. coli* O157:H7 typique produit des colonies bleu foncé à noir, avec un précipité légèrement noir sur les bords, parfois combiné à un halo rouge.
- En ce qui concerne les colonies caractéristiques qui entraînent un test au latex O157 positif et un test au latex H7 négatif, le laboratoire devra appliquer les mesures appropriées pour garantir la validité des résultats obtenus.

Contrôle qualité

- Chaque produit fabriqué et commercialisé par Bio-Rad est soumis à une procédure d'assurance qualité à toutes les étapes, de la réception des matières premières jusqu'à la mise sur le marché du produit fini. Chaque lot de produits finis subit un contrôle qualité conforme à EN ISO 11133 et est mis sur le marché uniquement s'il satisfait aux critères d'acceptabilité. La documentation relative à la production et au contrôle qualité de chaque lot est archivée.
- Pour consulter la fiche de données de sécurité (FDS) et le certificat d'analyse, visiter www.bio-rad.com

Section 7 Protocole

Préparation du milieu de culture déshydraté

1. Toujours agiter le flacon avant utilisation.
2. Dissoudre 80 g de poudre dans 1 L d'eau distillée et mélanger jusqu'à obtenir une suspension homogène.
3. Amener à ébullition jusqu'à dissolution complète. Éviter toute surchauffe.
4. **Ne pas soumettre à l'autoclave.**
5. Faire refroidir le milieu de culture à 45–50 °C en bain-marie.
6. Ajouter aseptiquement le supplément novobiocine (10 mg/L) et le supplément tellurite de potassium (0,8 mg/L). Mélanger soigneusement.
7. Répartir dans les boîtes de Pétri et laisser sécher une nuit à température ambiante.
8. 100 g de poudre permettent de reconstituer 1,25 L de milieu.

Enrichissement de l'échantillon et séparation immunomagnétique

Domaine (matrices)	Enrichissement	Certification
Bœuf haché	<i>n</i> g/ml d'échantillon dans 9 x <i>n</i> ml de mEC+n 35 ± 2 °C pendant 16 hr	AOAC
Épinards frais	Selon FDA BAM 37 ± 0,5 °C pendant 24 hr	AOAC
Produits carnés, produits laitiers, fruits et légumes, aliments composites	<i>n</i> g/ml d'échantillon dans 9 x <i>n</i> ml de mTSB+n préchauffé 41,5 ± 1 °C pendant 16–24 hr	NF VALIDATION

1. Diluer les échantillons dans un bouillon d'enrichissement conformément aux instructions du tableau ci-dessus.
2. Homogénéiser avec un agitateur/homogénéisateur.
3. Incuber conformément aux instructions du tableau ci-dessus.
4. Si la méthode de la norme ISO 16649 est mise en œuvre, suivre le protocole d'enrichissement d'échantillon tel qu'énoncé.
5. Utiliser un système de billes paramagnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques pour la capture des *E. coli* O157. Suivre attentivement les recommandations du fabricant pour le protocole de séparation immunomagnétique.

Inoculation et lecture

1. Strier 50 µl de billes magnétiques remises en suspension et nettoyées sur RAPID'*E.coli* O157:H7 Agar séchée.
2. Incuber la boîte à 37 ± 1 °C pendant 24 ± 2 hr.
3. Lors de la mise en œuvre de la méthode normalisée ISO 16649, répéter l'inoculation sur la gélose CT-SMAC.
4. Les colonies typiques d' *E. coli* O157:H7 (sorbitol [-] et β-glucuronidase [-]) produit des colonies caractéristiques bombées et brillantes, de 1 à 2 mm, de couleur bleu foncé à noir, avec un précipité légèrement noir autour des bords. Les souches β-glucuronidase (+) atypiques forment des colonies du même type.
5. Les souches *E. coli* O157:H7 sorbitol (+) atypiques sont également détectées. Ces colonies présentent une couleur bleue à turquoise, avec un précipité légèrement noir autour des bords.

Section 8 Confirmation des résultats positifs



1. Dans le contexte de la validation AOAC, confirmer les colonies isolées suspectes conformément à la procédure de test de confirmation classique décrite dans les méthodes de référence normalisées.
2. Dans le contexte de la marque NF VALIDATION, tous les échantillons identifiés comme positifs doivent être confirmés de l'une des façons suivantes :
 - a. À l'aide des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées CEN ou ISO (y compris l'étape de purification).
 - b. À l'aide de sondes nucléiques comme décrit dans la norme ISO 7218 (par exemple, iQ-Check *E. coli* O157:H7 PCR Detection Kit, n° de référence 3578114) avec des colonies isolées (avec ou sans étape de purification).
 - c. À l'aide de tests au latex pour O157 et H7 , en démarrant avec 1 à 3 colonies isolées. Il est nécessaire d'effectuer une étape d'isolement en cas de confirmation avec deux tests au latex.
 - d. À l'aide de toute autre méthode certifiée NF VALIDATION reposant sur un principe différent de celui de RAPID'*E.coli* O157:H7. Le protocole validé de cette seconde méthode doit être suivi dans sa totalité. Toutes les étapes précédant l'étape de détection utilisée comme point de départ pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes.
3. En cas de résultats discordants (préssumé positif avec RAPID'*E.coli* O157:H7, négatif avec la méthode de confirmation et particulièrement avec le test au latex), le laboratoire doit suivre les étapes nécessaires pour garantir la validité du résultat obtenu.

Section 9 Confirmation d'autres méthodes

Confirmation des résultats positifs avec iQ-Check *E.coli* O157:H7 (NF VALIDATION – Protocole certifié)

1. À partir de l'enrichissement Eau Peptonée Tamponée, utiliser un système de billes paramagnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques pour la capture des *E. coli* O157. Suivre attentivement les recommandations du fabricant pour le protocole de séparation immunomagnétique.
2. À l'aide d'une anse stérile, strier sur RAPID'*E.coli* O157:H7 Agar.
3. Incuber la boîte à 37 ± 1 °C pendant 24 ± 2 hr.
4. Strier de nouveau les colonies obtenues sur une boîte gélosée non sélective afin d'obtenir des colonies isolées.
5. Exécuter une confirmation de 1 à 3 colonies isolées à l'aide des tests d'agglutination au latex O157 et H7, comme décrit dans la section 8.2.c.

Section 10 Performance du test et validations

Certification	Domaine	Protocole de validation	Protocole de référence	Référence de certificat
AOAC-RI	Bœuf haché et épinards frais	Performance Tested Methods	FDA BAM Chapter 4A USDA MLG 5C.00	 PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 000701 License n° 060701
NF VALIDATION	Produits carnés, produits laitiers, fruits et légumes, aliments composites	EN ISO 16140-2	EN ISO 16654	 BRD : 07/14-09/07 MÉTHODES ANALYTIQUES ALTERNATIVES POUR LE SECTEUR AGRO-ALIMENTAIRE Certifié par AFNOR Certification Date de fin de validité : Se référer au certificat disponible sur le site internet AFNOR Certification : http://nf-validation.afnor.org/en

Section 11 Références

ISO 6887-1:2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire – Préparation d'échantillon, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologiques - Partie 1 : Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales

ISO 16654:2001// ADM 1: 2017/ ADM 2:2023. Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche des *Escherichia coli* O157.

United States Department of Agriculture. Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 5C.00: Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7ffc02b5-3d33-4a79-b50c-81f208893204/mlg-5.pdf?MOD=AJPERES>, accessed May 14, 2020.

United States Food and Drug Administration (2017). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-diarrheagenic-escherichia-coli>, accessed May 14, 2020.

Section 12 Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
15-05-2020	10000127898 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Modification importante - Nouvelle conception de document - Modification du numéro de document — version précédente RAPID_E.coli O157:H7_V3_04 mars 2020
Août 2023	10000127898 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Retrait du supplément novobiocine - Mise à jour de la préparation du supplément sélectif - Mise à jour des références

Visitez www.bio-rad.com/rapidmedia pour plus d'informations sur la gamme complète de milieux chromogènes RAPID.

BIO-RAD est une marque déposée de Bio-Rad Laboratories, Inc.,
IQ-CHECK est une marque déposée de Bio-Rad Europe, GmbH dans certaines circonscriptions.
Toutes les marques déposées utilisées dans ce document appartiennent à leur propriétaire respectif.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000
Korea 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0220



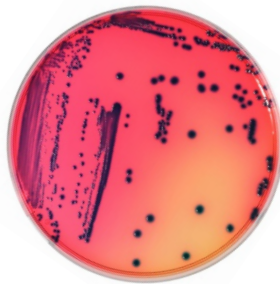
10000127898 Ver B

RAPID'*E. coli* O157:H7 Agar

Anwenderhandbuch

Selektives chromogenes Medium zum Nachweis, zur Isolierung und zur vorläufigen Identifizierung von *Escherichia coli* O157:H7 in Produkten zur Verwendung in Lebensmitteln für den menschlichen Verzehr und in Umgebungsproben

Katalog-Nr. 3564748, dehydriert, 100 g



BIO-RAD

Inhaltsverzeichnis

Abschnitt 1	Einleitung.....	1
Abschnitt 2	Prinzip von RAPID' <i>E.coli</i> O157:H7.....	1
Abschnitt 3	Theoretische Zusammensetzung.....	1
Abschnitt 4	Haltbarkeit und Lagerung.....	1
Abschnitt 5	Zusätzlich benötigtes Material.....	2
	Geräte.....	2
	Zubehör.....	2
Abschnitt 6	Vorsichtsmaßnahmen, Anwendungsbeschränkungen und Qualitätskontrolle.....	3
	Vorsichtsmaßnahmen.....	3
	Anwendungsbeschränkungen.....	3
	Qualitätskontrolle.....	4
Abschnitt 7	Protokoll.....	4
	Vorbereitung des dehydrierten Mediums.....	4
	Probenanreicherung und immunomagnetische Trennung.....	4
	Beimpfung und Ablesen der Platten.....	5
Abschnitt 8	Bestätigung positiver Ergebnisse.....	5
Abschnitt 9	Bestätigung anderer Methoden.....	6
	Bestätigung positiver Ergebnisse mit iQ-Check <i>E.coli</i> O157:H7 (von NF VALIDATION zertifiziertes Protokoll).....	6
Abschnitt 10	Testleistung und Testvalidierungen.....	7
Abschnitt 11	Literatur.....	7
Abschnitt 12	Revisionshistorie.....	8

Abschnitt 1 Einleitung

E. coli O157:H7 wurde erstmals 1982 mit Erkrankungen des Menschen durch Verzehr von zu wenig gegartem Rinderhackfleisch in Verbindung gebracht. Seitdem es 1993, ebenfalls aufgrund des Verzehrs von zu wenig gegartem Rinderhackfleisch in einer Fastfood-Restaurantkette, erneut zu einer erheblichen Erkrankungswelle kam, gilt das Bakterium als bedeutender, für den Menschen potenziell gefährlicher Erreger. Infolge dieses Ausbruchs startete der „Food Safety and Inspection Service“ (FSIS) des US-Landwirtschaftsministeriums (USDA) 1994 ein mikrobiologisches Testprogramm zum Nachweis von *E. coli* O157:H7 in Rinderhackfleisch. Häufige Erkrankungssymptome im Zusammenhang mit einer *E. coli* O157:H7-Infektion sind wässriger, blutiger Durchfall, starke Bauchkrämpfe und Erbrechen. Bis zu 8–18 % der Patienten, hauptsächlich junge und ältere Menschen, entwickeln ein hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS), das zu hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie und Nierenversagen führt. In den letzten Jahren gab es große Erkrankungswellen mit Infektionen durch das Bakterium, insbesondere im Zusammenhang mit dem Verzehr von Rinderhackfleisch und Blattgemüse.

Abschnitt 2 Prinzip von RAPID'*E.coli* O157:H7

Das RAPID'*E.coli* O157:H7 Medium ist ein selektives Medium, das sowohl chromogene Substrate als auch biochemische Indikatoren enthält. Diese Kombination ermöglicht die direkte vorläufige Identifizierung von *E.coli* O157:H7, einschließlich atypischer Stämme, in der Begleitflora auf der Grundlage der jeweiligen spezifischen Stoffwechsel- und Enzymprofile. Die Selektivität des Mediums ist aufgrund des Zusatzes der selektiven Agenzien Novobiocin (10 mg/l) und Kaliumtellurit (0,8 mg/l) besonders hoch.

Abschnitt 3 Theoretische Zusammensetzung

Anreicherungsmischung	58 g
Selektive Agenzien	6,25 g
Chromogenes Substrat	0,75 g
Agar	15 g
Destilliertes Wasser	qsp 1.000 ml

Finaler pH-Wert bei 25°C = 6,9 ± 0,2

Abschnitt 4 Haltbarkeit und Lagerung

- Dehydrierter Agar und Zusatz: Bei 2–8°C in einer sorgfältig verschlossenen Verpackung an einem trockenen und dunklen Ort lagern.
- Aus dehydriertem Agar hergestellte Agarplatten: 15 Tage bei Lagerung bei 2–8°C in einer sorgfältig verschlossenen Verpackung an einem trockenen und dunklen Ort.

Abschnitt 5

Zusätzlich benötigtes Material

Geräte

- Alle üblichen Laborgeräte
- Heizplatte
- Magnetpartikelkonzentrator
- Waage, bis auf 0,1 g genau
- Rührer / Homogenisator
- Thermostatisch kontrollierter Inkubator oder Inkubationskammer, bis auf $\pm 1^\circ\text{C}$ genau
- Wasserbad

Zubehör

- Anreicherungsmedium: Modifizierte EC-Nährbouillon, mEC+n
- Anreicherungsmedium: Modifiziertes Casein-Soja-Pepton-Medium (Tryptic Soy Broth) + 20 mg/L Novobiocin, mTSB+n (Katalog-Nr. 3555426, 6 Flaschen x 225 ml mit Novobiocin; 3564426, dehydriert, 500 g)
- Beads zur immunologischen Anreicherung von *E. coli* O157:H7
- Impfösen
- Novobiocin Supplement
- Kaliumtellurit-Supplement
- Sterile Petrischalen (90 mm)
- Sterile Pipetten
- Sterile Probenbeutel

Abschnitt 6

Vorsichtsmaßnahmen, Anwendungsbeschränkungen und Qualitätskontrolle

Vorsichtsmaßnahmen

- Es sind die Richtlinien der guten Laborpraxis zu beachten (EN ISO 7218). Bei der Arbeit mit potenziell infektiösen, lebenden Bakterien wie *E. coli* O157:H7 sollte angemessene Schutzkleidung wie Handschuhe und Laborkittel getragen werden.
- Medien, die mit Lebensmittelproben in Kontakt gekommen sind, sind als kontaminiert zu betrachten und gemäß den vor Ort geltenden Vorschriften und Bestimmungen zu entsorgen.
- Die Petrischalen vor der Verwendung von RAPID'*E.coli* O157:H7 gemäß der Norm EN ISO 11133 bei 25–50°C trocknen lassen, bis die Tröpfchen von der Mediumoberfläche verschwunden sind. Ein längeres Trocknen jedoch vermeiden, um die Effizienz des Mediums nicht zu verändern.
- Die immunomagnetische Trennung erfordert eine entsprechende Einweisung und regelmäßige Anwendung der Technik. Die Befolgung dieser Vorsichtsmaßnahmen für die Verwendung ist eine Voraussetzung, um valide und verlässliche Ergebnisse zu erhalten.
- Bei einer immunomagnetischen Trennung kann die Bindung an die Magnetbeads bei viskösen oder fetthaltigen Proben beeinträchtigt sein (geringe Wiederfindung, verringerte Spezifität der Antikörperbindung). Bezüglich des Umgangs mit solchen Proben sind die technischen Lösungen des Herstellers zu beachten.
- Das Ablesen der Latex-Tests erfordert möglicherweise eine vorhergehende Schulung, insbesondere zur Interpretation der Agglutination des H7-Flagellen-Antigens, die sehr subtil sein kann. Bei der Verwendung von Latex-Tests sind die Anweisungen und Empfehlungen des Herstellers sorgfältig zu befolgen.

Anwendungsbeschränkungen

- Im Rahmen der NF VALIDATION-Zertifizierung wurden keine Probenmengen über 25 g geprüft.
- Bei Vorhandensein reiner Stämme von *E. coli* O157:H7 nimmt der Agar durchgehend eine rote Farbe an.
- Auf Agar mit einer Mischung von Stämmen bilden typische *E. coli* O157:H7 dunkelblaue bis schwarze Kolonien mit einem schwachen schwarzen Niederschlag an den Rändern der Kolonie, mitunter begleitet von einem roten Hof.
- Bei charakteristischen Kolonien mit positivem Ergebnis im O157-Latex-Test und einem negativen Ergebnis im H7-Latex-Test muss das Labor geeignete Maßnahmen treffen, um die Validität der erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen.

Qualitätskontrolle

- Jedes von der Firma Bio-Rad hergestellte und verkaufte Produkt unterliegt vom Rohstoffeingang bis zur Vermarktung der Fertigprodukte einer umfassenden Qualitätssicherung. Jede Charge des fertigen Produkts wird einer Qualitätskontrolle gemäß EN ISO 11133 unterzogen und gelangt nur dann in den Vertrieb, wenn sie die Akzeptanzkriterien erfüllt. Die Dokumente im Zusammenhang mit der Herstellung und der Überprüfung jeder Charge werden archiviert.
- Das Sicherheitsdatenblatt und das Analysezertifikat für das Produkt sind im Internet auf www.bio-rad.com erhältlich.

Abschnitt 7 Protokoll

Vorbereitung des dehydrierten Mediums

1. Den Behälter vor jedem Gebrauch schütteln.
2. 80 g Pulver werden in 1 L destilliertem Wasser gelöst und zu einer homogenen Suspension gemischt.
3. So lange kochen lassen, bis das Medium vollständig aufgelöst ist. Zu langes und starkes Erhitzen vermeiden.
4. **Nicht autoklavieren.**
5. Das Medium in einem Wasserbad auf 45–50°C abkühlen lassen.
6. Unter sterilen Bedingungen (aseptisch) Novobiocin-Supplement (10 mg/L) und Kaliumtellurit-Supplement (0,8 mg/L) zugeben. Gründlich mischen.
7. In Petrischalen verteilen und über Nacht bei Raumtemperatur fest werden lassen.
8. 100 g Pulver ergeben 1,25 L Medium.

Probenanreicherung und immunomagnetische Trennung

Umfang (Matrizes)	Anreicherung	Zertifizierungsstelle
Rinderhackfleisch	n g/ml Probe in $9 \times n$ ml mEC+n 35 ± 2°C für 16 hr	AOAC
Roher Spinat	Gemäß FDA BAM 37 ± 0,5°C für 24 hr	AOAC
Fleischerzeugnisse, Milchprodukte, Obst und Gemüse, zusammengesetzte Lebensmittel	n g/ml Probe in $9 \times n$ ml vorgewärmtem mTSB+n 41,5 ± 1°C für 16–24 hr	NF VALIDATION

Abschnitt 8 Bestätigung positiver Ergebnisse

1. Die Proben nach den Anweisungen in der vorstehenden Tabelle in Anreicherungsbouillon verdünnen.
2. Mit dem Rührer/Homogenisator homogenisieren.
3. Nach den Anweisungen in der vorstehenden Tabelle inkubieren.
4. Bei der Durchführung der Standardmethode nach ISO 16649 ist das in der Norm beschriebene Protokoll zur Probenanreicherung zu befolgen.
5. Zur Erfassung von *E. coli* O157 ein System mit paramagnetischen Beads verwenden, die mit spezifischen Antikörpern beschichtet sind. Bei der immunomagnetischen Trennung sind die Empfehlungen des Herstellers sorgfältig zu befolgen.

Beimpfung und Ablesen der Platten

1. 50 µl der gewaschenen, resuspendierten Magnetbeads auf festem, trockenem RAPID'*E.coli* O157:H7 Agar ausstreichen.
2. Die Platte für 24 ± 2 hr bei 37 ± 1°C inkubieren.
3. Bei Anwendung der Standardmethode nach ISO 16649 die Beimpfung auf CT-SMAC-Agar wiederholen.
4. Typische *E. coli* O157:H7 (Sorbitol[–] und β-Glucuronidase[–]) bilden charakteristische glänzende, dunkelblaue bis schwarze, gewölbte Kolonien mit einem Durchmesser von 1 bis 2 mm und einem schwachen schwarzen Niederschlag an den Rändern der Kolonie. Atypische β-Glucuronidase(+)-Stämme bilden Kolonien derselben Art.
5. Es werden auch atypische Sorbitol(+) *E. coli* O157:H7-Stämme nachgewiesen. Diese Kolonien sind blau bis türkisfarben mit einem schwachen schwarzen Niederschlag an den Rändern der Kolonien.

Abschnitt 8 Bestätigung positiver Ergebnisse

1. Im Rahmen einer AOAC-Validierung vermutete Einzelkolonien nach dem klassischen Bestätigungstestverfahren, das in den Standardreferenzmethoden beschrieben ist, bestätigen.
2. Im Rahmen des Verfahrens zum Erhalt des Zeichens für die NF-Validierung müssen alle als positiv identifizierten Proben mit einer der folgenden Methoden bestätigt werden:
 - a. Mit den in CEN- oder ISO-Normen beschriebenen herkömmlichen Tests (einschließlich des Reinigungsschritts).
 - b. Durch Verwendung von Nukleinsonden wie in der Norm ISO 7218 beschrieben (z. B. iQ-Check *E. coli* O157:H7 PCR Detection Kit, Katalog-Nr. 3578114) unter Verwendung von Einzelkolonien (mit oder ohne Reinigungsschritt).

Abschnitt 9 Bestätigung anderer Methoden



- c. Durch Verwendung von Latex-Tests für O157 und H7 mit 1 bis 3 isolierten Kolonien. Wenn zur Bestätigung zwei Latex-Tests verwendet werden, muss ein Isolationsschritt stattfinden.
 - d. Durch Verwendung einer anderen NF VALIDATION-zertifizierten Methode, die auf einem anderen Testprinzip als dem von RAPID'*E.coli* O157:H7 beruht. Das validierte Protokoll dieser zweiten Methode muss ohne Abwandlungen durchgeführt werden. Alle Schritte vor dem Nachweisschritt als Ausgangspunkt für die Bestätigung müssen in beiden Methoden identisch sein.
3. Bei nicht übereinstimmenden Ergebnissen (vermutlich positiv auf RAPID'*E.coli* O157:H7, negativ mit der Bestätigungsmethode und insbesondere beim Latex-Test) muss das Labor die erforderlichen Schritte ausführen, um die Validität des erhaltenen Ergebnisses sicherzustellen.

Abschnitt 9 Bestätigung anderer Methoden

Bestätigung positiver Ergebnisse mit iQ-Check *E.coli* O157:H7 (von NF VALIDATION zertifiziertes Protokoll)

1. Zur Erfassung von *E. coli* O157 die in gepuffertem Peptonwasser angereicherte Lösung und ein System mit paramagnetischen Beads verwenden, die mit spezifischen Antikörpern beschichtet sind. Bei der immunomagnetischen Trennung sind die Empfehlungen des Herstellers sorgfältig zu befolgen.
2. Mit einer sterilen Impföse auf RAPID'*E.coli* O157:H7 Agar ausstreichen.
3. Die Platte für 24 ± 2 hr bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubieren.
4. Die erhaltenen Kolonien zur Vereinzelung noch einmal auf einem nichtselektiven Agar ausstreichen.
5. Mit 1 bis 3 isolierten Kolonien O157- und H7-Latexagglutinationstests zur Bestätigung durchführen (siehe Abschnitt 8.2.c).

Abschnitt 10 Testleistung und Testvalidierungen

Zertifizierungsstelle	Umfang	Validierungsprotokoll	Referenzprotokoll	Zertifikat-Referenz
AOAC-RI	Rinderhackfleisch und roher Spinat	Leistungsgeprüfte Methoden	FDA BAM Chapter 4A USDA MLG 5C.00	 PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 060701 Lizenznr. 060701
NF VALIDATION	Fleischerzeugnisse, Milchprodukte, Obst und Gemüse, zusammengesetzte Lebensmittel	EN ISO 16140-2	EN ISO 16654	 BRD: 07/14–09/07 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Zertifiziert durch die AFNOR-Zertifizierungsstelle Gültig bis: Siehe das auf der AFNOR-Zertifizierungswebsite verfügbare Zertifikat: http://nf-validation.afnor.org/en

Abschnitt 11 Literatur

ISO 6887-1:2017. Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 1: Allgemeine Regeln für die Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen

ISO 16654:2001// ADM 1: 2017/ ADM 2:2023. Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren für den Nachweis von *Escherichia coli* O157.

United States Department of Agriculture. Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 5C.00: Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7ffc02b5-3d33-4a79-b50c-81f208893204/mlg-5.pdf?MOD=AJPERES>, accessed May 14, 2020.

United States Food and Drug Administration (2017). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-diarrheagenic-escherichia-coli>, accessed May 14, 2020.

Abschnitt 12 Revisionshistorie

Freigabedatum	Dokumentnummer	Änderung
Mai 2020	10000127898 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Bedeutende Änderung - Neues Dokumentdesign - Änderung der Dokumentnummer - vorhergehende Version RAPID_E.coli 0157:H7_V3_04 März 2020
August 2023	10000127898 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Absetzen des Novobiocin Supplements - Aktualisierung zur Vorbereitung des selektiven Supplements - Aktualisierung der Referenzen

Weitere Informationen über unser vollständiges Angebot an chromogenen RAPID Medien finden Sie bei uns im Internet auf www.bio-rad.com/rapidmedia.

BIO-RAD ist eine Marke von Bio-Rad Laboratories, Inc.
iQ-Check ist in bestimmten Ländern eine Marke der Bio-Rad Europe GmbH.
Alle hier genannten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 00 800 00 24 67 23 Belgium 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 00 800 00 24 67 23 Denmark 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 France 00 800 00 24 67 23 Germany 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 India 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050 Italy 00 800 00 24 67 23 Japan 81 3 6361 7000
Korea 82 2 3473 4460 Luxembourg 00 800 00 24 67 23 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 Norway 00 800 00 24 67 23 Poland 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 Singapore 65 6415 3188 South Africa 00 800 00 24 67 23 Spain 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 Switzerland 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 United Kingdom 00 800 00 24 67 23

Sig 0220



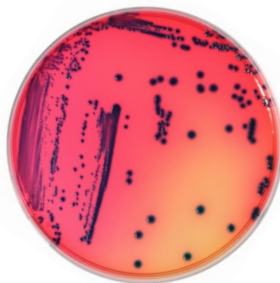
10000127898 Ver B

RAPID'*E. coli* O157:H7 Agar

Manuale utente

Terreno cromogenico selettivo per la ricerca, l'isolamento e l'identificazione presuntiva dell'*Escherichia coli* O157:H7 per l'uso in prodotti alimentari destinati al consumo umano e campioni ambientali

Catalogo #3564748, disidratato, 100 g



BIO-RAD

Indice

Sezione 1	Introduzione	3
Sezione 2	RAPID' <i>E.coli</i> O157:H7 - Principio	3
Sezione 3	Formula teorica	3
Sezione 4	Durata e conservazione	3
Sezione 5	Materiali necessari ma non forniti	4
	Apparecchiatura	4
	Materiali	4
Sezione 6	Precauzioni, limitazioni d'uso e controllo qualità	5
	Precauzioni	5
	Limitazioni d'uso	5
	Controllo qualità	5
Sezione 7	Protocollo	6
	Preparazione del terreno disidratato	6
	Arricchimento del campione e separazione immunomagnetica	6
	Inoculazione e lettura delle piastre	7
Sezione 8	Conferma dei risultati positivi	7
Sezione 9	Conferma di altri metodi	8
	Conferma dei risultati positivi con iQ-Check <i>E.coli</i> O157:H7 (protocollo certificato con VALIDAZIONE NF)	8
Sezione 10	Performance del test e validazioni	8
Sezione 11	Riferimenti	9
Sezione 12	Cronologia delle revisioni	9

Sezione 1 Introduzione

Individuata in carne di manzo macinata poco cotta e associata per la prima volta all'insorgenza della malattia nell'uomo nel 1982, l'*E. coli* O157:H7 è stata chiaramente riconosciuta come un importante agente patogeno pericoloso per l'uomo nel 1993, dopo un importante focolaio derivante dalla presenza del batterio in carne di manzo macinata poco cotta, venduta in una catena di ristoranti fast food. A seguito di questo focolaio, nel 1994 il Dipartimento dell'Agricoltura (USDA) e il Servizio di ispezione e sicurezza alimentare (FSIS) degli Stati Uniti hanno avviato un programma di test microbiologici al fine di rilevare la presenza di *E. coli* O157:H7 in carne di manzo macinata. I sintomi comuni della malattia associata all'infezione da *E. coli* O157:H7 includono diarrea acquosa ed emorragica, forti crampi addominali e vomito. Una percentuale compresa tra l'8 e il 18% dei pazienti, soprattutto bambini e anziani, sviluppa la sindrome emolitico-uremica (SEU), caratterizzata da anemia emolitica, trombocitopenia e insufficienza renale. Negli ultimi anni si sono riscontrati estesi focolai del batterio associati nello specifico a carne di manzo macinata e verdure a foglia verde.

Sezione 2 RAPID'*E.coli* O157:H7 - Principio

RAPID'*E.coli* O157:H7 è un terreno selettivo che unisce substrati cromogenici e indicatori biochimici. Questa combinazione fornisce l'identificazione presuntiva diretta dell'*E.coli* O157:H7, ceppi atipici inclusi, tra la flora interferente sulla base dei profili enzimatici e metabolici specifici osservati. La selettività del terreno è aumentata grazie all'aggiunta degli agenti selettivi novobiocina (10 mg/L) e tellurite di potassio (0,8 mg/L).

Sezione 3 Formula teorica

Miscela di arricchimento	58 g
Agenti selettivi	6,25 g
Miscela cromogenica	0,75 g
Agar	15 g
Acqua distillata	qs 1.000 ml

pH finale a 25°C = 6,9 ± 0,2

Sezione 4 Durata e conservazione

- Agar disidratato e supplemento: Conservare a 2-8°C in una confezione accuratamente sigillata, in un luogo asciutto e buio
- Piastra preparata da agar disidratato: Conservare per 15 giorni a 2-8°C in una confezione accuratamente sigillata, in un luogo asciutto e buio

Sezione 5 Materiali necessari ma non forniti

Apparecchiatura

- Tutta la normale apparecchiatura di laboratorio
- Piastra riscaldante
- Concentratore di particelle magnetiche
- Bilancia, sensibilità di 0,1 g
- Agitatore/omogeneizzatore
- Incubatore o camera di incubazione con controllo termostatico, con precisione di $\pm 1^{\circ}\text{C}$
- Bagnomaria

Materiali

- Terreno di arricchimento: Brodo EC modificato, mEC+n
- Terreno di arricchimento: Tryptic Soy Broth modificato + 20 mg/L novobiocina, mTSB+n (catalogo #3555426, 225 ml x 6 flaconi inclusa novobiocina; 3564426, disidratato, 500 g)
- Sfere immuno-concentrazione per *E. coli* O157:H7
- Anse per inoculazione
- Supplemento Novobiocina
- Supplemento di tellurite di potassio
- Piastre di Petri sterili (90 mm)
- Pipette sterili
- Sacche di pesatura sterili

Sezione 6

Precauzioni, limitazioni d'uso e controllo qualità

Precauzioni

- Rispettare le buone pratiche di laboratorio (EN ISO 7218). Indossare protezioni adeguate, quali guanti e camici da laboratorio, quando si manipolano batteri vivi potenzialmente infettivi come l'*E. Coli* O157:H7
- I terreni entrati in contatto con campioni di prodotti alimentari devono essere considerati contaminati e quindi smaltiti in conformità con normative e direttive locali
- Prima di utilizzare RAPID'*E.coli* O157:H7, lasciare asciugare le piastre di Petri conformemente alla norma EN ISO 11133 a 25–50°C fino alla scomparsa delle goccioline dalla superficie del terreno. Evitare, tuttavia, l'asciugatura prolungata che potrebbe alterare la prestazione del terreno
- L'esecuzione della fase di separazione immunomagnetica necessita di una formazione sufficiente e di una pratica regolare della tecnica. Il rispetto delle precauzioni d'uso è un prerequisito per ottenere risultati validi e affidabili
- Nell'applicazione della separazione immunomagnetica, campioni viscosi o grassi possono interferire con la cattura delle sfere magnetiche (basso recupero, ridotta specificità dell'azione degli anticorpi). Vedere le soluzioni tecniche dei fornitori per la manipolazione dei suddetti campioni
- La lettura dei test al lattice può richiedere una formazione precedente, in particolare per interpretare l'agglutinazione dell'antigene flagellare H7 che può essere molto fine. Nell'utilizzare i test al lattice seguire attentamente le istruzioni e le raccomandazioni per l'uso del produttore.

Limitazioni d'uso

- Nell'ambito del marchio NF VALIDATION, non sono stati testati campioni superiori a 25 g
- L'agar diventerà completamente rosso in presenza di ceppi puri di *E. coli* O157:H7
- Nell'agar con una miscela di ceppi, l'*E. coli* O157:H7 tipica genera colonie da blu a nero, con un leggero precipitato nero intorno ai bordi della colonia, a volte in combinazione con un alone rosso
- Per le colonie caratteristiche con esito positivo al test al lattice O157 e negative al test al lattice H7, il laboratorio dovrà applicare le misure appropriate al fine di garantire la validità dei risultati ottenuti

Controllo qualità

- Tutti i prodotti fabbricati e commercializzati dalla società Bio-Rad sono sottoposti a un sistema di assicurazione qualità in ogni fase, dal momento del ricevimento delle materie prime fino alla commercializzazione dei prodotti finiti. Ciascun lotto di prodotto finito è soggetto a un controllo qualità conformemente alla norma EN ISO 11133 e viene messo in commercio solo se risulta conforme ai criteri di accettazione. La documentazione relativa alla produzione e al controllo qualità di ogni lotto è conservata su file
- Per informazioni sulla sicurezza del prodotto (schede dati di sicurezza) e il certificato di analisi, visitare il sito www.bio-rad.com

Sezione 7 Protocollo

Preparazione del terreno disidratato

1. Agitare sempre il flacone prima dell'uso.
2. Dissolvere 80 g di polvere in 1 L di acqua distillata e miscelare fino a ottenere una sospensione omogenea.
3. Portare a ebollizione fino al completo dissolvimento. Evitare il surriscaldamento.
4. **Non autoclavare.**
5. Raffreddare il terreno a 45–50°C a bagnomaria.
6. Aggiungere in condizioni asettiche il supplemento di novobiocina (10 mg/L) e il supplemento di tellurite di potassio (0,8 mg/L). Miscelare accuratamente.
7. Dispensare nelle piastre di Petri e lasciare asciugare tutta la notte a temperatura ambiente.
8. Un flacone di polvere da 100 g produce 1,25 L di terreno.

Arricchimento del campione e separazione immunomagnetica

Oggetto (matrici)	Arricchimento	Certificazione
Carne di manzo macinata	n g/ml di campione in 9 x n ml mEC+n 35 ± 2°C per 16 hr	AOAC
Spinaci freschi	In conformità con FDA BAM 37 ± 0,5°C per 24 hr	AOAC
Prodotti a base di carne, prodotti lattiero-caseari, frutta e verdura, alimenti composti	n g/ml di campione in 9 x n ml preriscaldati mTSB+n 41,5 ± 1°C per 16–24 hr	VALIDAZIONE NF

1. Diluire i campioni in brodo di arricchimento secondo le istruzioni riportate nella tabella qui sopra.
2. Omogeneizzare con un agitatore/omogeneizzatore.
3. Incubare secondo le istruzioni riportate nella tabella qui sopra.
4. Quando si segue il metodo standard ISO 16649, attenersi al protocollo di arricchimento del campione come descritto dalla norma.
5. Utilizzare un sistema di sfere paramagnetiche rivestite di specifici anticorpi per catturare l'*E. Coli* O157. Seguire attentamente le raccomandazioni del fornitore riguardo al protocollo di separazione immunomagnetica.

Inoculazione e lettura delle piastre

1. Strisciare 50 µl di sfere magnetiche risospese e lavate sull'agar essiccato RAPID'*E.coli* O157:H7.
2. Incubare la piastra a 37 ± 1°C per 24 ± 2 hr.
3. Nel seguire il metodo standard ISO 16649, ripetere l'inoculazione su agar CT-SMAC.
4. L'*E. coli* O157:H7 tipico (sorbitolo [-] e β-glucuronidasi [-]) presenta caratteristiche colonie lucide, rigonfie, che misurano da 1 a 2 mm, di colore da blu a nero, con un leggero precipitato nero intorno ai bordi delle colonie. I ceppi atipici di β-glucuronidasi (+) generano colonie dello stesso tipo.
5. Sono stati rilevati ceppi di *E. coli* O157:H7 sorbitolo (+) atipica. Queste colonie sono di colore blu-turchese con un leggero precipitato nero intorno ai bordi delle colonie.

Sezione 8 Conferma dei risultati positivi



1. Nell'ambito della validazione AOAC, confermare le colonie isolate sospette secondo la tradizionale procedura del test di conferma descritta nei metodi di riferimento standard.
2. Nell'ambito del marchio NF VALIDATION, tutti i campioni identificati come positivi devono essere confermati in uno dei seguenti modi:
 - a. Utilizzando i test convenzionali descritti nei metodi standard CEN o ISO (inclusa la fase di purificazione).
 - b. Mediante sonde nucleiche, come descritto nella norma ISO 7218 (ad esempio, il kit di rilevamento iQ-Check *E. coli* O157:H7 PCR, catalogo #3578114) utilizzando colonie isolate (con o senza fase di purificazione).
 - c. Utilizzando test al lattice per O157 e H7 a partire da 1 a 3 colonie isolate. Deve essere eseguita una fase di isolamento in caso di conferma con due test al lattice.
 - d. Utilizzando qualsiasi altro metodo certificato di VALIDAZIONE NF basato su un principio diverso rispetto a quello di RAPID'*E.coli* O157:H7. Il protocollo validato del secondo metodo deve essere rispettato interamente. Tutte le fasi che precedono la fase di ricerca usata come punto di inizio per la conferma devono essere comuni a entrambi i metodi.
3. In caso di risultati discordanti (presunto positivo con RAPID' *E.coli* O157:H7, negativo con metodo di conferma, in particolare con il test al lattice), il laboratorio deve seguire le fasi necessarie per garantire la validità del risultato ottenuto.

Sezione 9 Conferma di altri metodi

Conferma dei risultati positivi con iQ-Check *E.coli* O157:H7 (protocollo certificato con VALIDAZIONE NF)

1. A partire dall'arricchimento di acqua peptonata tamponata, utilizzare un sistema di sfere paramagnetiche rivestite di specifici anticorpi per catturare l'*E. coli* O157. Seguire attentamente le raccomandazioni del fornitore riguardo al protocollo di separazione immunomagnetica.
2. Usare un'ansa sterile, strisciare sull'agar RAPID'*E.coli* O157:H7.
3. Incubare la piastra a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 hr.
4. Strisciare nuovamente le colonie ottenute su una piastra di agar non selettiva per ottenere colonie isolate.
5. Eseguire la conferma di 1-3 colonie isolate utilizzando i test di agglutinazione al lattice O157 e H7 come descritto nella Sezione 8.2.c.

Sezione 10 Performance del test e validazioni

Certificazione	Ambito di applicazione	Protocollo di validazione	Protocollo di riferimento	Riferimento al certificato
AOAC-RI	Carne di manzo macinata e spinaci freschi	Performance Tested Methods	FDA BAM Capitolo 4A USDA MLG 5C.00	 PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 060701 Licenza n. 060701
VALIDAZIONE NF	Prodotti a base di carne, prodotti lattiero-caseari, frutta e verdura, alimenti composti	EN ISO 16140-2	EN ISO 16654	 BRD: 07/14-09/07 METODI ANALITICI ALTERNATIVI PER IL SETTORE AGROALIMENTARE Certificato mediante certificazione AFNOR Valido fino a: fare riferimento al certificato disponibile sul sito internet AFNOR: http://nf-validation.afnor.org/en

Sezione 11 Riferimenti

ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 16654:2001// ADM 1: 2017/ ADM 2:2023. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.

United States Department of Agriculture. Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 5C.00: Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7ffc02b5-3d33-4a79-b50c-81f208893204/mlg-5.pdf?MOD=AJPERES>, accessed May 14, 2020.

United States Food and Drug Administration (2017). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-diarrheagenic-escherichia-coli>, accessed May 14, 2020.

Sezione 12 Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero documento	Modifica
15-05-2020	10000127898 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Modifica importante - Nuovo design del documento - Modifica numero documento — versione precedente RAPID_E.coli O157:H7_V3_04 marzo 2020
Agosto 2023	10000127898 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Ritiro del supplemento Novobiocina - Aggiornamento in merito alla preparazione del supplement - Aggiornamento dei riferimenti

Per ulteriori informazioni sulla nostra gamma completa di terreni cromogenici RAPID', visitare il sito www.bio-rad.com/rapidmedia.

BIO-RAD è un marchio registrato di Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK è un marchio registrato di Bio-Rad Europe GmbH in determinate giurisdizioni.

Tutti i marchi registrati qui utilizzati sono di proprietà dei rispettivi titolari.



Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science
Group

Website bio-rad.com USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 00 800 00 24 67 23 Belgium 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 00 800 00 24 67 23 Denmark 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 France 00 800 00 24 67 23 Germany 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 India 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050 Italy 00 800 00 24 67 23 Japan 81 3 6361 7000
Korea 82 2 3473 4460 Luxembourg 00 800 00 24 67 23 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 Norway 00 800 00 24 67 23 Poland 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 Singapore 65 6415 3188 South Africa 00 800 00 24 67 23 Spain 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 Switzerland 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 United Kingdom 00 800 00 24 67 23

Sig 0220



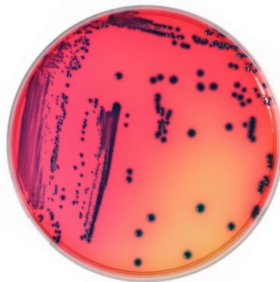
10000127898 Ver B

RAPID'*E. coli* O157:H7 Agar

Guia do usuário

Meios cromogênicos seletivos para a detecção, isolamento e identificação presuntiva de *Escherichia coli* O157:H7 em produtos para uso em alimentos humanos e amostras ambientais

Nº do catálogo 3564748, desidratado, 100 g



BIO-RAD

Índice

Seção 1	Introdução	3
Seção 2	Princípio RAPID' <i>E.coli</i> O157:H7	3
Seção 3	Fórmula Teórica.....	3
Seção 4	Prazo de validade e armazenamento	3
Seção 5	Materiais necessários, mas não fornecidos	4
	Equipamento.....	4
	Suprimentos.....	4
Seção 6	Precauções, limitações de uso e controle de qualidade	5
	Precauções.....	5
	Limitações de uso.....	5
	Controle de qualidade.....	5
Seção 7	Protocolo.....	6
	Preparação do Meio Desidratado.....	6
	Enriquecimento da amostra e Separação imunomagnética.....	6
	Inoculação e Leitura de Meios de Cultura	7
Seção 8	Confirmação de Resultados Positivos	7
Seção 9	Confirmação de outros métodos.....	8
	Confirmação de Resultados Positivos com iQ-Check <i>E.coli</i> O157:H7 (Protocolo certificado NF VALIDATION)	8
Seção 10	Desempenho e validação do teste	8
Seção 11	Referências.....	9
Seção 12	Histórico de Revisão.....	9

Seção 1 Introdução

Associado pela primeira vez a doenças humanas em carne moída mal cozida em 1982, *E. coli* O157:H7 tornou-se claramente reconhecido como um patógeno importante de preocupação humana em 1993, após um surto substancial da bactéria desenvolvida a partir de carne moída mal cozida vendida em uma cadeia de restaurantes de fast food. Como resultado deste surto, em 1994, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) Food Safety and Inspection Service (FSIS) iniciou um programa de testes microbiológicos para detectar *E. coli* O157:H7 em carne moída. Os sintomas comuns de doenças associadas à infecção por *E. coli* O157:H7 incluem diarreia aquosa, sangrenta, câibras abdominais graves e vômitos. Cerca de 8-18% dos pacientes, principalmente jovens e idosos, desenvolvem síndrome hemolítica uremica (HUS), que causa anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiência renal. Nos últimos anos, houve grandes surtos de bactérias associadas particularmente à carne moída e aos verdes folhosos.

Seção 2 Princípio RAPID'*E.coli* O157:H7

O meio RAPID'*E.coli* O157:H7 é um meio seletivo que combina substratos cromogênicos e indicadores bioquímicos. Esta combinação fornece uma identificação presuntiva direta de *E.coli* O157:H7, incluindo cepas atípicas, entre a flora interferente com base nos perfis metabólicos e enzimáticos específicos observados. A seletividade do meio é aumentada pela adição de agentes seletivos novobiocina (10 mg/L) e telúrio de potássio (0,8 mg/L).

Seção 3 Fórmula Teórica

Mistura de enriquecimento	58 g
Agentes seletivos	6,25 g
Mistura cromogênica	0,75 g
Ágar	15 g
Água destilada	qsp 1.000 ml

pH final em 25°C = 6,9 ± 0,2

Seção 4 Prazo de validade e armazenamento

- Ágar desidratado e suplemento: Armazenar 2–8°C em uma embalagem cuidadosamente vedada e em um ambiente seco e escuro
- Meio de cultura preparado a partir do ágar desidratado: Armazene por 15 dias a 2–8°C em uma embalagem cuidadosamente selada em um local seco e escuro

Seção 5

Materiais necessários, mas não fornecidos

Equipamento

- Todo o equipamento comum de laboratório
- Placa de aquecimento
- Concentrador de partículas magnéticas
- Escala, sensibilidade de 0,1 g
- Misturador/homogeneizador
- Incubadora ou sala de incubação controlada termostaticamente, com precisão de $\pm 1^\circ\text{C}$
- Lavagem em água

Suprimentos

- Meio de enriquecimento: Caldo EC modificado, mEC+n
- Meio de enriquecimento: Caldo de soja tríplico modificado + 20 mg/L de novobiocina, mTSB+n (nº do catálogo 3555426, 225 ml x 6 frascos incluindo novobiocina; 3564426, desidratada, 500 g)
- Microesferas de imunoconcentração para *E. coli* O157:H7
- Inoculação de loops
- Suplemento de Novobiocina
- Suplemento de telurito de potássio
- Placas de Petri estéreis (90 mm)
- Pipetas estéreis
- Sacos de pesagem estéreis

Seção 6

Precauções, limitações de uso e controle de qualidade

Precauções

- Respeite as boas práticas de laboratório (EN ISO 7218). É necessário o uso de proteção adequada, como luvas e jalecos, ao trabalhar com bactérias vivas potencialmente infecciosas, como a *E. Coli* O157:H7
- O meio que entrou em contato com amostras de alimentos deve ser considerado contaminado e descartado de acordo com as regras e regulamentos locais
- Antes de utilizar o RAPID'*E.coli* O157:H7, deixe secar as placas de Petri em conformidade com a norma EN ISO 11133 a 25-50°C, até que as gotículas desapareçam da superfície do meio. Evite a secagem prolongada, porém, pois isso poderia alterar o desempenho do meio
- A realização da etapa de separação imunomagnética requer treinamento suficiente e prática regular da técnica. Siga estas precauções de uso é um pré-requisito para a obtenção de resultados válidos e confiáveis
- Ao aplicar a separação imunomagnética, amostras viscosas ou gordurosas podem causar interferência na captura de microesferas magnéticas (baixa recuperação, menor especificidade da ação do anticorpo). Veja as soluções técnicas dos fornecedores para o manuseio de tais amostras
- A leitura dos testes de látex pode exigir treinamento prévio, notadamente para a interpretação da aglutinação do antígeno flagelar H7, o que pode ser muito bom. Ao utilizar os testes de látex, siga cuidadosamente as instruções e recomendações de uso do fabricante

Limitações de uso

- Não foram testadas amostras acima de 25 g no contexto da marca NF VALIDATION
- O ágar ficará completamente vermelho na presença de cepas puras de *E. coli* O157:H7
- Em ágar com uma mistura de estirpes, as *E. coli* O157:H7 típicas produzem colônias de azul escuro a preto com um leve precipitado preto ao redor das bordas da colônia, às vezes combinado com uma auréola vermelha
- Para colônias características que dão um teste de látex O157 positivo e um teste de látex H7 negativo, o laboratório terá que aplicar as medidas apropriadas para garantir a validade dos resultados obtidos

Controle de qualidade

- Todos os produtos fabricados e comercializados pela Bio-Rad estão sujeitos aos procedimentos de garantia de qualidade em todas as etapas, desde a recepção da matéria-prima até a comercialização do produto final. Cada lote de produto acabado passa por um controle de qualidade de acordo com a EN ISO 11133 e é comercializado apenas quando satisfaz os critérios de aceitabilidade. A documentação relativa à produção e ao controle de qualidade de cada lote é mantida arquivada
- Para informações de segurança do produto SDS e certificado de análise, visite www.bio-rad.com

Seção 7 Protocolo

Preparação do Meio Desidratado

1. Agite sempre a garrafa antes de usar.
2. Dissolva 80 g de pó em 1 L de água destilada e misture até obter uma suspensão homogênea.
3. Deixe ferver até a completa dissolução. Evite o sobreaquecimento.
4. **Não autoclave.**
5. Resfrie o meio até 45-50°C em um banho-maria.
6. Adicione asepticamente suplemento de novobiocina (10 mg/L) e suplemento de telúrio de potássio (0,8 mg/L). Misture cuidadosamente.
7. Distribua em placas de Petri e deixe secar durante a noite à temperatura ambiente.
8. Um frasco de 100 g de pó produz 1,25 L de meio.

Enriquecimento da amostra e Separação imunomagnética

Escopo (matrizes)	Enriquecimento	Certificação
Carne moída	n g/ml de amostra em 9 x n ml mEC+n 35 ± 2°C por 16 h	AOAC
Espinafre fresco	De acordo com FDA BAM 37 ± 0,5°C por 24 h	AOAC
Produtos de carne, produtos lácteos, frutas e vegetais, alimentos compostos	n g/ml de amostra em 9 x n ml mTSB+n pré-aquecido 41,5 ± 1°C por 16–24 h	NF VALIDATION

1. Dilua as amostras em caldo de enriquecimento de acordo com as instruções da tabela acima.
2. Uniformize com o misturador/homogeneizador.
3. Incube de acordo com as instruções da tabela acima.
4. Ao executar o método da norma ISO 16649, siga o protocolo de enriquecimento de amostras, conforme escrito na norma.
5. Use um sistema de microesferas paramagnéticas revestidas com anticorpos específicos para a captura *E. coli* O157. Siga cuidadosamente as recomendações do fornecedor para o protocolo de separação imunomagnética.

Inoculação e Leitura de Meios de Cultura

1. Estrie 50 µl de microesferas magnéticas, lavadas, resuspendidas, em RAPID'*E.coli* O157:H7 ágar seco.
2. Deixe incubar o meio de cultura a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 hr.
3. Ao seguir o método da norma ISO 16649, repetir a inoculação no ágar CT-SMAC.
4. As *E. coli* O157:H7 típicas (sorbitol [-] e β -glucuronidase [-]) apresentam colônias brilhantes e salientes, medindo de 1 a 2 mm, de cor azul escuro a preto, com um leve precipitado preto ao redor das bordas das colônias. As cepas atípicas β -glucuronidase (+) formam colônias do mesmo tipo.
5. Cepas de sorbitol atípico (+) *E. coli* O157:H7 também são detectadas. Estas colônias terão uma cor azul a turquesa com um fraco precipitado preto ao redor das bordas das colônias.

Seção 8 Confirmação de Resultados Positivos



1. No contexto da validação AOAC, verifique as colônias isoladas suspeitas de acordo com o procedimento clássico de teste de confirmação descrito nos métodos de referência padrão.
2. No contexto da marcação NF VALIDATION, todas as amostras identificadas como positivas devem ser confirmadas de uma das seguintes formas:
 - a. Usando os testes convencionais descritos nos métodos padrão CEN ou ISO (incluindo a etapa de purificação).
 - b. Usar sondas nucleicas, conforme descrito na norma ISO 7218 (por exemplo, kit de detecção iQ-Check *E. coli* O157:H7 PCR., nº do catálogo 3578114) usar colônias isoladas (com ou sem etapas de purificação).
 - c. Usar testes de látex para O157 e H7, começando com 1 a 3 colônias isoladas. Uma etapa de isolamento deve ser realizada em caso de confirmação com dois testes de látex.
 - d. Usar qualquer outro método certificado NF VALIDATION baseado em um princípio diferente do da RAPID'*E.coli* O157:H7. O segundo protocolo de método validado deve ser completamente respeitado. Todas as etapas anteriores à etapa de detecção utilizada como ponto de partida para a confirmação devem ser comuns a ambos os métodos.
3. No caso de resultados discordantes (presumivelmente positivos com RAPID'*E.coli* O157:H7, negativos com método de confirmação, e particularmente com o teste do látex), o laboratório deve seguir as etapas necessárias para garantir a validade do resultado obtido.

Seção 9 Confirmação de outros métodos

Confirmação de Resultados Positivos com iQ-Check *E.coli* O157:H7 (Protocolo certificado NF VALIDATION)

1. Começando a partir de um enriquecimento de água peptonada tamponada, use um sistema de microesferas paramagnéticas revestidas com anticorpos específicos para a captura *E. coli* O157. Siga cuidadosamente as recomendações do fornecedor para o protocolo de separação imunomagnética.
2. Usando um loop estéril, estriar em RAPID'*E.coli* O157:H7 Ágar.
3. Deixe incubar o meio de cultura a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 hr.
4. O reestriamento obteve colônias em uma placa de ágar não-seletiva para obter colônias isoladas.
5. Execute uma confirmação de 1 a 3 colônias isoladas usando O157 e testes de aglutinação de látex H7, como descrito na seção 8.2.c.

Seção 10 Desempenho e validação do teste

Certificação	Escopo	Protocolo de Validação	Protocolo de Referência	Referência de Certificado
AOAC-RI	Carne moída e espinafres frescos	Métodos de desempenho testados	FDA BAM Capítulo 4A USDA MLG 5C.00	 Nº da licença 060701
NF VALIDATION	Produtos de carne, produtos lácteos, frutas e vegetais, alimentos compostos	EN ISO 16140-2	EN ISO 16654	 BRD: 07/14-09/07 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA O AGRONEGÓCIO Certificado pela certificação AFNOR Validade: Consulte o certificado disponível no site da Certificação AFNOR: http://nf-validation.afnor.org/en

Seção 11 Referências

ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 16654:2001// ADM 1: 2017/ ADM 2:2023. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.

United States Department of Agriculture. Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 5C.00: Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.
<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7ffc02b5-3d33-4a79-b50c-81f208893204/mlg-5.pdf?MOD=AJPERES>, accessed May 14, 2020.

United States Food and Drug Administration (2017). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-diarrheagenic-escherichia-coli>, accessed May 14, 2020.

Seção 12 Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
05-15-2020	10000127898 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Alteração importante - Novo design de documento - Alteração do número do documento — versão anterior RAPID_E.coli 0157:H7_V3_04 Março de 2020
Agosto de 2023	10000127898 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - Retirada do suplemento de novobiocina - Atualização do preparo de suplemento seletivo - Atualização de referências

Visite www.bio-rad.com/rapidmedia para mais informações sobre a nossa completa linha de meios cromogênicos RAPID.

BIO-RAD é uma marca comercial da Bio-Rad Laboratories, Inc.

iQ-CHECK é uma marca comercial da Bio-Rad Europe GmbH em certas jurisdições.

Todas as marcas comerciais usadas neste documento são de propriedade de seus respectivos proprietários.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 00 800 00 24 67 23 Belgium 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 00 800 00 24 67 23 Denmark 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 France 00 800 00 24 67 23 Germany 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 India 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050 Italy 00 800 00 24 67 23 Japan 81 3 6361 7000
Korea 82 2 3473 4460 Luxembourg 00 800 00 24 67 23 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 Norway 00 800 00 24 67 23 Poland 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 Singapore 65 6415 3188 South Africa 00 800 00 24 67 23 Spain 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 Switzerland 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 United Kingdom 00 800 00 24 67 23

Sig 0220



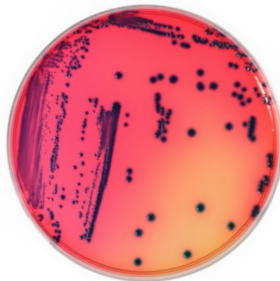
10000127898 Ver B

RAPID'*E. coli* O157:H7 Agar

Manual del usuario

Medio cromogénico selectivo para la detección, aislamiento e identificación presuntiva de *Escherichia coli* O157:H7 en productos destinados a alimentación humana y en muestras ambientales

Referencia #3564748, deshidratado, 100 g



BIO-RAD

Tabla de Contenidos

Apartado 1	Introducción	1
Apartado 2	Principio del RAPID' <i>E.coli</i> O157:H7	1
Apartado 3	Fórmula teórica	1
Apartado 4	Vida útil y conservación.....	1
Apartado 5	Materiales necesarios, pero no suministrados.....	2
	Equipamiento	2
	Fungibles	2
Apartado 6	Precauciones, limitaciones de uso y control de calidad.....	3
	Precauciones.....	3
	Limitaciones de uso.....	3
	Control de calidad	3
Apartado 7	Protocolo	4
	Preparación del medio deshidratado	4
	Enriquecimiento de la muestra y separación inmunomagnética.....	4
	Inoculación y lectura de la placa	5
Apartado 8	Confirmación de los resultados positivos.....	5
Apartado 9	Confirmación de otros métodos	6
	Confirmación de los resultados positivos obtenidos con iQ-Check <i>E.coli</i> O157:H7 (protocolo certificado NF VALIDATION).	6
Apartado 10	Aplicaciones del ensayo y validaciones	6
Apartado 11	Referencias	7
Apartado 12	Historial de revisiones	7

Apartado 1 Introducción

Asociado por primera vez con enfermedades humanas en la carne picada poco cocinada en 1982, *E. coli* O157:H7 se identificó claramente como un importante patógeno de interés humano en 1993, después de un brote importante de la bacteria desarrollada a partir de la carne picada poco cocinada que se vendía en una cadena de restaurantes de comida rápida. Como resultado de este brote, en 1994, el Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) inició un programa de pruebas microbiológicas para detectar *E. coli* O157:H7 en la carne picada. Los síntomas más comunes de la enfermedad asociada con la infección por *E. coli* O157:H7 incluyen diarrea acuosa y sanguinolenta, calambres abdominales severos y vómitos. Entre el 8 y el 18% de los pacientes, la mayoría jóvenes y ancianos, desarrollan síndrome urémico hemolítico (SUH), que causa anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal. En los últimos años, se han producido grandes brotes de la bacteria asociados en particular con la carne picada y las verduras de hoja.

Apartado 2 Principio del RAPID'*E.coli* O157:H7

El medio RAPID'*E.coli* O157:H7 es un medio selectivo que combina sustratos cromogénicos e indicadores bioquímicos. Esta combinación permite la identificación presuntiva directa de *E.coli* O157:H7, incluidas las cepas atípicas, entre la flora interferente en base a los perfiles metabólicos y enzimáticos específicos observados. La selectividad del medio se optimiza añadiendo agentes selectivos como la novobiocina (10 mg/L) y el telurito de potasio (0,8 mg/L).

Apartado 3 Fórmula teórica

Mezcla de enriquecimiento	58 mg
Agentes selectivos	6,25 g
Mezcla cromogénica	0,75 g
Agar	15 g
Agua destilada	c.s.p. 1.000 ml

pH final a 25° C = 6,9 ± 0,2

Apartado 4 Vida útil y conservación

- Agar y suplemento deshidratados: Almacenar a 2-8° C en un envase debidamente sellado en un lugar seco y oscuro.
- Placa preparada desde agar deshidratado: Almacenar durante 15 días a 2-8° C en un envase debidamente precintado en un lugar seco y oscuro.

Apartado 5

Materiales necesarios, pero no suministrados

Equipamiento

- Todo el instrumental habitual en laboratorio
- Placa calefactada
- Concentrador de partículas magnéticas
- Balanza, sensibilidad de 0,1 g
- Agitador/homogeneizador
- Incubador o sala de incubación temostatizada, con una precisión de $\pm 1^\circ \text{C}$
- Baño termostático

Fungibles

- Caldo de enriquecimiento: Caldo EC modificado, mEC+n
- Caldo de enriquecimiento: Caldo de Soja Trípico Modificado + 20 mg/L novobiocina, mTSB+n (referencia #3555426, 225 ml x 6 frascos incluyendo novobiocina; 3564426, deshidratado, 500 g)
- Beads o perlas para inmunocentración de *E. coli* O157:H7
- Asas de siembra
- Suplemento de Novobiocina
- Suplemento de telurito de potasio
- Placas de Petri estériles (90 mm)
- Pipetas estériles
- Bolsas estériles para pesada

Apartado 6

Precauciones, limitaciones de uso y control de calidad

Precauciones

- Deben respetarse las buenas prácticas de laboratorio (EN ISO 7218). Se debe usar una protección adecuada, como guantes y batas de laboratorio, cuando se trabaja con bacterias vivas potencialmente infecciosas como *E. coli* O157:H7
- Los medios que han estado en contacto con muestras de alimentos deben considerarse potencialmente contaminados y deben eliminarse de conformidad con las normas y reglamentos locales.
- Antes de usar RAPID'*E.coli* O157:H7, deje secar las placas de Petri de acuerdo con la norma EN ISO 11133 a 25–50° C hasta que desaparezcan las microgotas de la superficie del medio. No obstante, hay que evitar un secado prolongado, ya que esto podría alterar el rendimiento del medio.
- La realización de la etapa de separación inmunomagnética requiere contar con la suficiente preparación y unos conocimientos prácticos habituales de la técnica. Seguir estas precauciones de uso es un requisito indispensable para obtener resultados válidos y fiables.
- Cuando se aplica la técnica de separación inmunomagnética, las muestras viscosas o grasas pueden causar interferencias en la captación de las perlas magnéticas (baja recuperación, menor especificidad de la acción de los anticuerpos). Vea las soluciones técnicas de los proveedores para la manipulación de esas muestras.
- La lectura de las pruebas de látex puede requerir contar con una formación previa, en particular para interpretar la aglutinación del antígeno flagelar H7, que puede ser muy sutil. Cuando utilice las pruebas de látex, siga detalladamente las instrucciones y recomendaciones de uso del fabricante.

Limitaciones de uso

- En el contexto de validación NF VALIDATION, no se analizaron muestras de más de 25 g.
- El agar vira completamente a color rojo en presencia de cepas puras de *E. coli* O157:H7
- En el agar, en presencia de una mezcla de cepas, las *E. coli* O157:H7 típicas forman colonias de color azul oscuro a negro con un ligero precipitado negro alrededor de los bordes de la colonia, a veces combinado con un halo rojo.
- En el caso de colonias características que respondan a una prueba de látex O157 como positivas y una prueba de látex H7 como negativas, el laboratorio deberá aplicar las medidas adecuadas para garantizar la validez de los resultados obtenidos.

Control de calidad

- Todos los productos fabricados y comercializados por Bio-Rad están sujetos a un protocolo de garantía de calidad en todas las etapas, desde la recepción de las materias primas hasta la comercialización de los productos acabados. Cada lote de producto acabado se somete a un control de calidad según la norma EN ISO 11133 y su comercialización está condicionada a que cumpla los criterios de aceptabilidad. La documentación relativa a la producción y el control de calidad de cada lote se mantiene archivada.
- Para información relativa a la seguridad sobre el producto (SDS) y del certificado de análisis, visite www.bio-rad.com

Apartado 7 Protocolo

Preparación del medio deshidratado

1. Agitar siempre el frasco antes de usar.
2. Disolver 80 g de polvo en 1 L de agua destilada y mezclar hasta obtener una suspensión homogénea.
3. Llevar a ebullición hasta completa disolución. Evitar el sobrecalentamiento.
4. **No utilizar el autoclave.**
5. Enfriar el medio a 45–50° C.
6. Asépticamente, agregar el suplemento de novobiocina (10 mg/L) y el suplemento de telutito de potasio (0,8 mg/L). Mezclar completamente.
7. Dispensar en placas de Petri y dejar durante la noche a temperatura ambiente para su secado.
8. Un frasco de 100 g de medio deshidratado permite obtener 1,25 L de medio.

Enriquecimiento de la muestra y separación inmunomagnética

Alcance (matrices)	Enriquecimiento	Certificación
Carne picada	n g/ml de muestra en $9 \times n$ ml mEC+n 35 ± 2° C durante 16 hr	AOAC
Espinaca fresca	De conformidad con el Manual del Análisis Bacteriológicos (BAM) de la FDA 37 ± 0,5° C durante 24 hr	AOAC
Productos cárnicos, productos lácteos, frutas y verduras, alimentos compuestos	n g/ml de muestra en $9 \times n$ ml de mTSB+n precalentado 41,5 ± 1° C durante 16–24 hr	NF VALIDATION

1. Diluir las muestras en caldo de enriquecimiento según las instrucciones de la tabla anterior.
2. Homogeneizar con agitador/homogeneizador.
3. Incubar según las instrucciones de la tabla anterior.
4. Cuando se aplique el método normalizado ISO 16649, debe seguirse el protocolo de enriquecimiento de la muestra tal como se establece en la norma.
5. Utilizar un sistema de perlas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos específicos para capturar *E. coli* O157. Seguir cuidadosamente las recomendaciones del proveedor para el protocolo de separación inmunomagnética.

Inoculación y lectura de la placa

1. Aislar 50 µl de perlas magnéticas lavadas y resuspendidas en RAPID'*E.coli* O157:H7.
2. Incubar la placa a 37 ± 1° C durante 24 ± 2 hr.
3. Cuando se siga el método de la norma ISO 16649, se deberá repetir la inoculación en el agar CT-SMAC.
4. Las *E. coli* O157:H7 típicas(sorbitol [-] y β-glucuronidasa [-]) presentan colonias características brillantes y abultadas que miden de 1 a 2 mm, de color azul oscuro a negro, con un ligero precipitado negro alrededor de los bordes de las colonias. Las cepas atípicas β-glucuronidasa (+) forman colonias del mismo tipo.
5. También se detectan cepas atípicas de *E. coli* O157:H7 sorbitol (+). Estas colonias presentarán un color entre azul y turquesa con un débil precipitado negro alrededor de los bordes de las colonias.

Apartado 8

Confirmación de los resultados positivos



1. En el contexto de validación AOAC, confirme las colonias aisladas sospechosas siguiendo el procedimiento clásico de prueba de confirmación indicado en los métodos de referencia normalizados.
2. Con respecto a la validación NF VALIDATION, todas las muestras identificadas como positivas deben confirmarse de una de las siguientes formas:
 - a. Empleando las pruebas convencionales descritas en los métodos normalizados CEN o ISO (incluida la fase de purificación).
 - b. Utilizando sondas nucleicas como se describe en la norma ISO 7218 (por ejemplo, iQ-Check *E. coli* O157:H7 PCR Detection Kit, referencia #3578114) sobre colonias aisladas (con o sin fase de purificación).
 - c. Usando pruebas de látex para O157 y H7 comenzando con 1 a 3 colonias aisladas. En caso de confirmación con dos pruebas de látex, se debe realizar una etapa de aislamiento.
 - d. Usando cualquier otro método certificado NF VALIDATION basado en un principio diferente al de RAPID'*E.coli* O157:H7. El protocolo validado de este segundo método debe ser seguido en su totalidad. Todos los pasos que preceden al paso de detección utilizado como punto de partida para la confirmación deben ser comunes para ambos métodos.
3. En caso de producirse resultados discordantes (supuestos positivos con RAPID'*E.coli* O157:H7, negativos con el método de confirmación, y en particular con la prueba de látex), el laboratorio debe seguir los pasos necesarios para garantizar la validez del resultado obtenido.

Apartado 9 Confirmación de otros métodos

Confirmación de los resultados positivos obtenidos con iQ-Check *E.coli* O157:H7 (protocolo certificado NF VALIDATION).

1. A partir del enriquecimiento del Agua de Peptona Tamponada, utilice un sistema de perlas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos específicos para capturar *E. coli* O157. Siga cuidadosamente las recomendaciones del proveedor para el protocolo de separación inmunomagnética.
2. Usando un asa estéril, siembre en RAPID'*E.coli* O157:H7 Agar.
3. Incube la placa a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 24 ± 2 hr.
4. Re-siembra las colonias en una placa de agar no selectiva para obtener colonias aisladas.
5. Realice una confirmación de 1 a 3 colonias aisladas utilizando pruebas de aglutinación de látex O157 y H7 como se describe en el apartado 8.2.c.

Apartado 10 Aplicaciones del ensayo y validaciones

Certificación	Alcance	Protocolo de validación	Protocolo de referencia	Referencia de certificado
AOAC-RI	Carne picada y espinacas frescas	Performance Tested Methods	FDA BAM Capítulo 4A USDA MLG 5C.00	 Licencia# 060701
NF VALIDATION	Productos cárnicos, productos lácteos, frutas y verduras, alimentos compuestos	EN ISO 16140-2	EN ISO 16654	 BRD: 07/14-09/07 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA LA AGROINDUSTRIA Certificado mediante certificación AFNOR Válido hasta: Consulte el certificado disponible en la página web de Certificación AFNOR: http://nf-validation.afnor.org/en

Apartado 11 Referencias

ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 16654:2001// ADM 1: 2017/ ADM 2:2023. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.

United States Department of Agriculture. Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 5C.00: Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7ffc02b5-3d33-4a79-b50c-81f208893204/mlg-5.pdf?MOD=AJPERES>, accessed May 14, 2020.

United States Food and Drug Administration (2017). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-diarrheagenic-escherichia-coli>, accessed May 14, 2020.

Apartado 12 Historial de revisiones

Fecha de publicación	N.º de documento	Cambio
05/15/2020	10000127898 Ver A	- Cambio significativo - Nuevo diseño del documento - Cambio en el número de documento — versión anterior RAPID_E.coli 0157:H7_V3_04 marzo 2020
Agosto de 2023	10000127898 Ver B	- Retirada del suplemento de Novobiocina - Actualización de la preparación del suplemento selectivo - Actualización de referencias

Visite www.bio-rad.com/rapidmedia para más información sobre nuestra gama completa de medios cromogénicos RAPID.

BIO-RAD es una marca registrada de Bio-Rad Laboratories, Inc.

IQ-CHECK es una marca registrada de Bio-Rad Europe GmbH en diversos países.

Todas las marcas comerciales utilizadas en el presente documento son propiedad de sus respectivos dueños.



Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science
Group

Website bio-rad.com USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 00 800 00 24 67 23 Belgium 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 00 800 00 24 67 23 Denmark 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 France 00 800 00 24 67 23 Germany 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 India 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050 Italy 00 800 00 24 67 23 Japan 81 3 6361 7000
Korea 82 2 3473 4460 Luxembourg 00 800 00 24 67 23 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 Norway 00 800 00 24 67 23 Poland 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 Singapore 65 6415 3188 South Africa 00 800 00 24 67 23 Spain 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 Switzerland 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 United Kingdom 00 800 00 24 67 23

Sig 0220



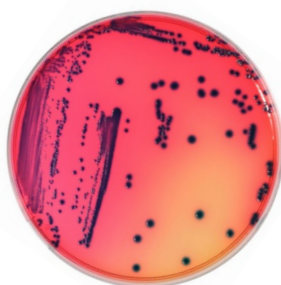
10000127898 Ver B

RAPID'*E. coli* O157:H7 Agar

用户指南

用于人类食品和环境样品中大肠杆菌O157:H7 检测、分离和推定鉴定的选择性显色培养基

目录 #3564748, 干粉, 100 g



BIO-RAD

目录

第 1 部分	简介	1
第 2 部分	RAPID' <i>E.coli</i> O157:H7 原理	1
第 3 部分	理论配方	1
第 4 部分	保质期及储存条件	1
第 5 部分	其他仪器、试剂与耗材	2
	仪器	2
	试剂和耗材	2
第 6 部分	预防措施、使用限制和质量控制	2
	预防措施	2
	使用限制	3
	质量控制	3
第 7 部分	操作流程	3
	干粉培养基的制备	3
	样品增菌和免疫磁性分离	4
	接种和平板读数	4
第 8 部分	阳性结果的确认	5
第 9 部分	其他方法的确认	5
	用 iQ-Check <i>E.coli</i> O157:H7 确认阳性结果 (NF 验证认证方案)	5
第 10 部分	测试性能和验证	6
第 11 部分	参考资料	6
第 12 部分	修订记录	7

第 1 部分

简介

1982 年，*大肠杆菌* O157:H7 首次与未煮熟的碎牛肉中发现的人类疾病有关，1993 年，在一家连锁快餐店出售的未煮熟碎牛肉中爆发了大量这种细菌后，该细菌被明确认定为是一种引起人类关注的重要病原体。由于此次爆发，1994 年，美国农业部 (USDA) 食品安全与检验局 (FSIS) 开始了一项微生物检测计划，以检测碎牛肉中的 *大肠杆菌* O157:H7。与 *大肠杆菌* O157:H7 感染相关的常见疾病症状包括水样腹泻、血样腹泻、严重的腹部痉挛和呕吐。多达 8-18% 的患者，主要是年轻人和老年人，会出现溶血性尿毒症综合征 (HUS)，引起溶血性贫血、血小板减少和肾衰竭。近年来，特别是与碎牛肉和绿叶菜有关的细菌大规模爆发。

第 2 部分

RAPID'*E.coli* O157:H7 原理

RAPID'*E.coli* O157:H7 培养基是一种结合了显色底物和生化指示剂的选择性培养基。这种组合可根据观察到的特定代谢和酶学特征，直接推定鉴定干扰菌群中的 *大肠杆菌* O157:H7，包括非典型菌株。通过添加选择剂新生霉素 (10 mg/L) 和亚碲酸钾 (0.8 mg/L) 来提高培养基的选择性。

第 3 部分

理论配方

增菌混合物	58 g
选择性制剂	6.25 g
显色混合物	0.75 g
琼脂	15 g
蒸馏水	qsp 1,000 ml

25°C 时的最终 pH 值 = 6.9 ± 0.2

第 4 部分

保质期及储存条件

- 干粉培养基和添加剂：在 2-8°C 下妥善密封包装，置于干燥、避光处
- 干粉平板的制备：在 2-8°C 下妥善密封包装，干燥、避光处储存 15 天

第 5 部分

其他仪器、试剂与耗材

仪器

- 所有常用的实验室仪器
- 热平板
- 磁粉集中器
- 天平，灵敏度为 0.1 g
- 搅拌器/均质器
- 恒温控制的孵化器或孵化室，精确到 $\pm 1^{\circ}\text{C}$
- 水浴

试剂和耗材

- 培养基：改良 EC 肉汤，mEC+n
- 培养基：改良胰蛋白酶大豆肉汤 + 20 mg/L 新生霉素，mTSB+n (目录 #3555426，225 ml x 6 瓶，包括新生霉素；3564426，干粉，500 g)
- *大肠杆菌* O157:H7 免疫浓缩珠
- 接种环
- Novobiocin supplement
- 亚碲酸钾添加剂
- 无菌培养皿 (90 mm)
- 无菌移液管
- 无菌称重袋

第 6 部分

预防措施、使用限制和质量控制

预防措施

- 遵守良好实验室规范 (EN ISO 7218)。在处理 *大肠杆菌* O157:H7 等具有潜在传染性的活细菌时，应穿戴适当的防护装置，如手套和实验室外套
- 与食品样品接触过的培养基应被视为潜在传染性材料处理，并根据当地法规和规定进行废弃物处理
- 在使用 RAPID'*E.coli* O157:H7 之前，按照 EN ISO 11133 标准，在 25-50°C 下让培养皿干燥，直到培养基表面的液滴消失。避免长时间的干燥，因为这可能改变培养基的性能

第 7 部分 操作流程

- 执行免疫磁性分离步骤需要充分的培训和定期的技术实践。遵循这些使用注意事项是获得有效、可靠结果的先决条件
- 在应用免疫磁性分离时，粘性或脂肪类样品可能会对磁珠捕获造成干扰（检索率低，抗体作用的特异性降低）。有关处理此类样品的信息，请参阅供应商的技术解决方案
- 读取乳胶试验可能需要事先培训，特别是解释 H7 鞭毛抗原的凝集，它可能非常精细。使用乳胶试验时，请仔细遵守制造商的使用说明和建议

使用限制

- 在 NF 验证标志的背景下，超过 25 g 的样品未经过测试
- 在 *大肠杆菌* O157:H7 纯菌株存在的情况下，培养基将完全变成红色
- 在有混合菌株的琼脂上，典型的 *大肠杆菌* O157:H7 产生深蓝色至黑色的菌落，在菌落边缘有轻微的黑色沉淀物，有时伴有红色光晕
- 对于 O157 乳胶试验呈阳性而 H7 乳胶试验呈阴性的特征菌落，实验室必须采取适当的措施以确保所获结果的有效性

质量控制

- Bio-Rad 公司生产和销售的每一种产品，从接收原材料到销售成品的各个阶段都要受到质量保证程序的约束。每批成品都根据 EN ISO 11133 进行质量控制，只有满足验收标准才能上市。与每批次生产和质量控制有关的文件均进行存档
- 有关 SDS 产品安全信息和分析证书，请访问 www.bio-rad.com。

第 7 部分

操作流程

干粉培养基的制备

1. 使用前请摇晃瓶子。
2. 将 80 g 粉末溶解在 1 L 蒸馏水中，并进行搅拌，直到得到均匀的悬浮液。
3. 煮沸直到完全溶解。避免过热。
4. 请勿进行高压灭菌。
5. 在水浴中将培养基冷却到 45-50°C。
6. 以无菌方式加入新生霉素添加剂 (10 mg/L) 和亚碲酸钾添加剂 (0.8 mg/L)。充分搅拌。
7. 分装在培养皿中，在室温下放置过夜，使之晾干。
8. 一瓶 100 g 粉末可制成 1.25 L 培养基。

样品增菌和免疫磁性分离

范围 (食品基质)	增菌条件	证书
碎牛肉	n g/ml 样品在 $9 \times n$ ml mEC+n 中 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 培养 16 小时	AOAC
新鲜菠菜	根据 FDA BAM $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 培养 24 小时	AOAC
肉制品、乳制品、水果和蔬菜、 复合食品	n g/ml 样品在 $9 \times n$ ml 预热的 mTSB+n 中 $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ 下培养 16–24 小时	NF 验证

1. 根据上表中的说明，将样品在增菌液中稀释。
2. 用搅拌器/均质器进行均质处理。
3. 按照上表中的说明进行培养。
4. 当执行 ISO 16649 标准方法时，请遵循标准中写明的样品增菌方案。
5. 使用涂有特异性抗体的顺磁珠系统来捕捉 *大肠杆菌* O157。仔细遵循供应商对免疫磁性分离方案的建议。

接种和平板读数

1. 在干燥的 RAPID'*E.coli* O157:H7 琼脂上，连续加入 50 μ l 洗净的重悬磁珠。
2. 在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 下培养平板 24 ± 2 小时。
3. 当遵循 ISO 16649 标准方法时，在 CT-SMAC 琼脂上重复接种。
4. 典型的 *大肠杆菌* O157:H7 (山梨糖醇 [-] 和 β -葡萄糖醛酸酶 [-]) 呈现出特征性的明亮、隆起的菌落，大小为 1 至 2 mm，颜色为深蓝色至黑色，在菌落边缘有轻微黑色沉淀物。非典型的 β -葡萄糖醛酸酶 (+) 菌株形成相同类型的菌落。
5. 还检测到非典型的山梨糖醇 (+) *大肠杆菌* O157:H7 的菌株。这些菌落将呈现蓝色至绿松石色，在菌落边缘有轻微黑色沉淀物。

第 8 部分

阳性结果的确认

1. 在 AOAC 验证的背景下，根据标准参考方法中描述的经典确认测试程序确认可疑的分离菌落。
2. 在 NF 验证标志的背景下，所有被确定为阳性的样品必须以下列方式之一加以确认：
 - a. 使用 CEN 或 ISO 标准方法中描述的常规测试（包括纯化步骤）。
 - b. 使用 ISO 7218 标准中描述的核探针（例如，iQ-Check *E. coli* O157:H7 PCR Detection Kit，目录 #3578114）、使用分离的菌落（有或无纯化步骤）。
 - c. 从 1 到 3 个分离的菌落开始对 O157 和 H7 采用乳胶试验。如果通过两次乳胶试验进行确认，则必须执行隔离步骤。
 - d. 使用任何其他与 RAPID'*E. coli* O157:H7 不同原理的 NF 验证认证的方法。必须完全遵循第二种方法的验证方案。用作确认起点的检测步骤之前的所有步骤必须对两种方法通用。
3. 如果出现不一致的结果（RAPID'*E. coli* O157:H7 推定为阳性，而确认法特别是乳胶试验则为阴性），实验室必须遵循必要的步骤，以确保所获结果的有效性。

第 9 部分

其他方法的确认

用 iQ-Check *E. coli* O157:H7 确认阳性结果 (NF 验证认证方案)

1. 从缓冲蛋白胨水增菌开始，使用涂有特异性抗体的顺磁珠系统来捕捉 *大肠杆菌* O157。仔细遵循供应商对免疫磁性分离方案的建议。
2. 使用无菌环，在 RAPID'*E. coli* O157:H7 平板上划线。
3. 在 37±1°C 下培养平板 24±2 小时。
4. 在非选择性培养基平板上对获得的菌落重新划线，以获得分离的菌落。
5. 如第 8.2.c 部分所述，使用 O157 和 H7 乳胶凝集试验对 1 至 3 个分离的菌落进行确认。

第 10 部分

测试性能和验证

证书	范围	验证方案	参考方案	证书参考
AOAC-RI	碎牛肉和新鲜菠菜	性能测试方法	FDA BAM 第 4A 章 USDA MLG 5C.00	 许可 # 060701
NF 验证	肉制品、乳制品、 水果和蔬菜、 复合食品	EN ISO 16140-2	EN ISO 16654	 BRD : 07/14-09/07 农业企业的替代分析方法 通过 AFNOR 认证 Valid until: Refer to the certificate available on the AFNOR Certification website: http://nf-validation.afnor.org/en

第 11 部分

参考资料

ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 16654:2001// ADM 1: 2017/ ADM 2:2023. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.

United States Department of Agriculture. Microbiology Laboratory Guidebook. Chapter 5C.00: Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental

Sponges. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7ffc02b5-3d33-4a79-b50c-81f208893204/mlg-5.pdf?MOD=AJPERES>, accessed May 14, 2020.

United States Food and Drug Administration (2017). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-diarrheagenic-escherichia-coli>, accessed May 14, 2020.

第 12 部分 修订记录

发布日期	文件编号	变更
2020 年 5 月	10000127898 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - 主要变更 - 新的文档设计 - 文件编号变更 — 先前版本 RAPID_E.coli O157:H7_V3_04 2020 年 3 月
2023 年 8 月	10000127898 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> - 撤回新生霉素补充剂 - 选择性补充剂制备更新 - 更新参考资料

请访问 www.bio-rad.com/rapidmedia，了解有关我们全系列 RAPID 显色培养基的更多信息。

BIO-RAD 是 Bio-Rad Laboratories, Inc. 的商标。

IQ-CHECK 是 Bio-Rad Europe GmbH 在某些司法管辖区的商标。

此处使用的所有商标均为其各自所有者的财产。



Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science
Group

Website bio-rad.com USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 00 800 00 24 67 23 Belgium 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 00 800 00 24 67 23 Denmark 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 France 00 800 00 24 67 23 Germany 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300
Hungary 00 800 00 24 67 23 India 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050 Italy 00 800 00 24 67 23 Japan 81 3 6361 7000
Korea 82 2 3473 4460 Luxembourg 00 800 00 24 67 23 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 00 800 00 24 67 23
New Zealand 64 9 415 2280 Norway 00 800 00 24 67 23 Poland 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 Singapore 65 6415 3188 South Africa 00 800 00 24 67 23 Spain 00 800 00 24 67 23
Sweden 00 800 00 24 67 23 Switzerland 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 651 8311
United Arab Emirates 36 1 459 6150 United Kingdom 00 800 00 24 67 23

Sig 0220



10000127898 Ver B