

SOLUS *E. COLI* O157 ELISA

Systeme de test immunologique pour
la detection de *E. coli* O157
dans les aliments et les echantillons
environnementaux

Numéro du supplément : 38
Numéro de publication : 2,0
Date de publication : Avril 2020
Code(s) de produit : EC-048S
Organisme de certification : AFNOR





SOL 37/03-10/15
AUTRES MÉTHODES ANALYTIQUES POUR L'AGRO-INDUSTRIE
<http://nf-validation.afnor.org/en>

Cette méthode est certifiée par la certification AFNOR pour la détection des *E. coli* O157, y compris H7, dans les produits bovins crus (assaisonnés ou non), le lait cru et les produits laitiers, les légumes et les échantillons environnementaux (réf. de validation **SOL 37/03-10/15**).

1. INTRODUCTION

Le test ELISA Solus *E. coli* O157 fournit un résultat négatif ou présumé positif à partir 'un seul enrichissement en 18 à 22 heures, durée du test comprise.

2. UTILISATION PRÉVUE

Le test ELISA Solus *E. coli* O157 est destiné à la détection des *E. coli* O157 dans des aliments sélectionnés et des échantillons d'environnements de production. La méthode de test est facile à réaliser mais elle nécessite des installations de laboratoire ainsi qu'un personnel qualifié et formé. Une formation de base est recommandée aux utilisateurs débutants. Elle est fournie par Solus Scientific Solutions Ltd.

L'utilisation de cette méthode inclut la conformité aux bonnes pratiques de laboratoire (voir ISO 7218).

3. RÉACTIFS FOURNIS

La plupart des composants du kit sont fournis stabilisés et prêts à l'emploi à une concentration de travail, seul le concentré de tampon de lavage nécessitant une dilution. Chaque kit contient suffisamment de matériel pour 1 x 93 déterminations, plus les contrôles. La date de péremption du kit est indiquée sur l'étiquette de chaque produit.

Composant	Apparence	Volume	Commentaires
Plaque de test	Microplaque à 96 puits au format barrette amovible/cassable	1	Puits revêtus d'anticorps contre <i>E. coli</i> O157
Contrôle négatif	Liquide incolore/transparent. Étiquette verte.	3 ml	Concentration de travail. Contient du diluant avec conservateur.
Contrôle positif	Liquide noir. Étiquette rouge.	3 ml	Concentration de travail. Contient de la <i>E. coli</i> O157 tué par la chaleur dans le diluant avec conservateur.
Conjugué	Liquide incolore/très pâle de couleur paille paille. Étiquette orange.	11ml	Concentration de travail. Contient un anticorps conjugué contre la peroxydase de raifort dans un diluant avec conservateur.
Substrat	Liquide incolore/bleu très pâle. Étiquette bleue.	11ml	Concentration de travail. Contient du 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), du peroxyde d'hydrogène et des stabilisateurs.
Solution d'arrêt	Liquide incolore. Étiquette jaune.	11ml	Concentration de travail. Contient de l'acide sulfurique 0,2M.
Concentré de tampon de lavage	Liquide incolore/jaune/orange. Étiquette blanche.	10ml x 6	Concentré. À diluer avant utilisation.
Filtres en verre fritté	Disques plats en plastique blanc ~12 mm de diamètre	100	Des filtres en verre fritté doivent être appliqués sur chaque tube d'échantillon après le traitement thermique après refroidissement de l'échantillon à température ambiante (18-25°C). Voir la section 7 pour plus de détails.

4. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRE QUI NE SONT PAS FOURNIS

Réfrigérateur entre 2 et 8 °C.	Minuteur
Eau déionisée ou distillée (DI)	Incubateur à 37±1°C.
Bouillon tryptone soja modifié + novobiocine (20 mg/l)	Incubateur à 41,5±1°C.
Éprouvettes graduées pour différents volumes (par ex. 250ml, 1 l)	Appareil de chauffage (par exemple, bloc de chauffage) capable de chauffer à 85-100°C.
Tubes à essai stériles de 10ml adaptés à l'enrichissement sélectif	
Homogénéiseur (ou appareil similaire) et sachets filtrants	Pipettes et pointes (1ml ; 0,1ml)
Pipettes de transfert de 3ml (stériles)	Laveur et lecteur de microplaques DyneX DS2 ou Microplate avec filtre 450 nm
Mélangeur de type vortex	
Tubes pour l'ébullition des échantillons (par ex. tubes sans col en polypropylène de 5ml - 12x75 mm)	Autoclave pour la décontamination des échantillons

5. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Tampon de lavage :

Ajouter le contenu d'un flacon de tampon de lavage (10ml) à 240ml d'eau déionisée pour préparer le tampon de lavage à la concentration requise pour le test. Répartir et étiqueter selon les besoins. La solution préparée peut être conservée pendant un maximum de 4 semaines si elle est conservée entre 2 et 8°C.

Bouillon de culture (milieu de croissance) :

Préparer le bouillon tryptone soja modifié en suivant les consignes du fabricant. Laisser refroidir à température ambiante (18-30°C) avant d'ajouter le supplément de novobiocine à 20mg/L (mTSMn).

6. PRÉPARATION ET ENRICHISSEMENT DES ÉCHANTILLONS - méthode standard

Homogénéiser 25g de l'échantillon à tester, si nécessaire par homogénéisateur, dans 225ml de bouillon tryptone soja modifié (BTSM) + novobiocine (20mg/L) et incubé pendant 16-20 heures à 41.5±1°C. Dans le contexte de la VALIDATION NF, les portions d'essai pesant plus de 25 g n'ont pas été testées.

7. INACTIVATION THERMIQUE APRÈS ENRICHISSEMENT

Lorsque la période d'incubation de l'échantillon est terminée, transférer une aliquote de 1-2ml (en évitant les particules) dans un tube à essai pour l'ébullition (par ex. un tube de 5ml en polypropylène).

Chauffer l'aliquote à 85-100°C pendant 15-20 minutes dans le tube. Après le chauffage, laisser refroidir l'échantillon à température ambiante (18-30°C). Cette opération peut être accélérée en plaçant les tubes dans de l'eau du robinet froide pendant environ 5 minutes.

Pour éviter les problèmes de pipetage, en particulier sur l'appareil Dynex DS2, ajouter un filtre en verre fritté directement dans chaque tube d'échantillon et appuyer doucement pour permettre le pipetage d'un échantillon relativement clair au-dessus du niveau du verre fritté.

REMARQUE - le verre fritté ne doit être inséré qu'après la phase de chauffage et une fois que le tube a refroidi à température ambiante (18-30°C).

Les échantillons qui n'ont pas été inactivés par la chaleur doivent être conservés à des fins de vérification jusqu'à ce que les résultats des tests ELISA aient été obtenus. Ces échantillons doivent être conservés à $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ si le test ELISA doit être effectué dans les 2 heures. Si cela n'est pas possible, conserver les bouillons pendant 72 heures maximum à $2-8^\circ\text{C}$ avant le test ELISA.

8. PROCÉDURE DE TEST ELISA

Sortir le kit de test de son lieu de conservation au moins une heure avant utilisation pour permettre aux composants d'atteindre la température ambiante ($18-30^\circ\text{C}$). Déterminer le nombre de puits requis pour le test. Retirer le nombre de barrettes requis de la pochette et les fixer au cadre fourni. Les barrettes inutilisées doivent être remises dans la pochette et conservées entre 2 et 8°C .

Préparer le tampon de lavage comme indiqué à la section 5.1.

Laisser le premier puits de la barrette vide pour servir de « blanc » afin de mesurer l'absorbance du substrat.

Pipeter $0,1\text{ml}$ de contrôle négatif (étiquette verte) dans le deuxième puits.

Pipeter $0,1\text{ml}$ de contrôle positif (étiquette rouge) dans le troisième puits.

Pipeter $0,1\text{ml}$ de chaque échantillon inactivé par la chaleur séparément dans des puits consécutifs de la barrette. S'il reste des puits

à la fin d'une barrette de test, les contrôles positifs ou négatifs peuvent être répétés. †

Incuber la plaque (contenant les barrettes) à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 30-35 minutes.

Après incubation, aspirer le contenu des puits, en éliminant autant de liquide que possible. Laver les puits 5 fois avec le tampon de lavage en veillant à remplir et à vider complètement les puits à chaque cycle de lavage. La technique de lavage est essentielle pour les performances de dosage. Il est donc recommandé d'utiliser un laveur de microplaques.

Pipeter $0,1\text{ml}$ de conjugué (étiquette orange) dans tous les puits, à l'exception du puits « vide ».

Incuber la plaque à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 30-35 minutes.

Répéter les cycles de lavage comme indiqué à la section 8.8

Pipeter $0,1\text{ml}$ de conjugué (étiquette bleue) dans tous les puits, à l'exception du puits « vide ».

Incuber la plaque à température ambiante ($18-30^\circ\text{C}$) pendant 10 minutes, dans l'obscurité.

Après incubation, arrêter la réaction en ajoutant $0,1\text{ml}$ de solution d'arrêt (étiquette jaune) à tous les puits, y compris le puits « vide ». Les puits contenant du bleu deviendront jaunes après l'ajout de la solution d'arrêt.

Lire les densités optiques des puits dans les 10 minutes dans un lecteur de plaques à l'aide d'un filtre 450 nm . Avant la lecture, vérifier qu'il n'y ait pas de bulles d'air dans les puits et, le cas échéant, les faire éclater avec une aiguille. Le lecteur doit être remis à zéro par rapport au puits « vide » bien avant la lecture des autres puits. Ne pas utiliser de filtre de référence. L'utilisation d'un équipement ELISA automatique est préférable. Il doit être configuré et validé selon ce protocole.

† En cas d'utilisation de l'instrumentation Dynex, veiller à éviter la formation de bulles dans les tubes contenant les échantillons et le réactif ou la formation de films dans les tubes, au-dessus du niveau du liquide. Il est essentiel de vérifier que le système ait bien pipeté les échantillons dans la plaque de dosage avant de procéder plus avant.

9. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats sont exprimés sous forme de mesures de densité optique (DO₄₅₀) à l'aide d'un lecteur de microplaques.

Critères d'acceptation :

DO du contrôle négatif ₄₅₀	< 0,100
DO du contrôle positif ₄₅₀	> 0,500

La valeur du puits vide (généralement A1 lors d'un traitement manuel) doit toujours être soustraite. Si la valeur des contrôles négatifs ou positifs ne répond pas à ces critères, le test n'est pas considéré comme valide et doit être effectué à nouveau.

Les échantillons dont les relevés de DO₄₅₀ sont < 0,200 sont considérés comme négatifs. Dans ce cas, l'analyse est terminée, les résultats peuvent être rapportés et les échantillons correspondants qui n'ont pas été inactivés par la chaleur peuvent être éliminés conformément aux réglementations/directives locales.

Les puits d'échantillonnage dont la DO_{est de 450} ≥ 0,200 sont présumés positifs pour *E. coli* O157. Les résultats présumés positifs doivent être vérifiés à l'aide d'une méthode de culture reconnue.

10. CONFIRMATION DES RÉSULTATS POSITIFS DE TESTS *E. COLI* O 157 ELISA

Dans le contexte de LA VALIDATION NF, tous les échantillons identifiés comme positifs par la méthode alternative doivent être confirmés par l'un des tests suivants :

- En utilisant les tests conventionnels décrits dans les méthodes standardisées du CEN ou de l'ISO. L'étape de confirmation doit commencer à partir du BTSm+n non-inactivé par la chaleur conservé à 41,5 °C ou 2-8 °C. (Voir la méthode horizontale ISO 16654:2001 pour la détection des *Escherichia coli* O157).
- Isoler le BTSm+n (10 µl) sur de la gélose MacConkey Sorbitol (CT-SMAC) et une plaque de gélose chromogène (p. ex. CHROMagar O157) et incuber les plaques à 37 °C ± 1° pendant 18-24 heures. Effectuer une identification sérologique de colonies caractéristiques, avec ou sans étape de purification, à l'aide d'un test au latex O157 (Microgen *E. coli* O157 M44) et après une étape de purification à l'aide d'un test au latex H7 (Wellcolex *E. coli* O157:H7 R30959601).

En cas de résultats discordants (résultats ELISA présumés positifs et résultats de culture négatifs), une étape de SIM doit être utilisée comme étape de confirmation en prenant 1ml de BTSm+n (non-chauffé) et en suivant la méthode décrite dans la norme ISO 16654:2001 avant d'isoler les particules magnétiques sur les deux plaques de gélose. Cette méthode est plus sensible que l'isolement direct et peut aider à confirmer les échantillons qui contiennent des niveaux inférieurs d'organisme cible.

En cas de résultats discordants (résultat ELISA présumé positif non-confirmé par l'un des moyens décrits ci-dessus et en particulier en ce qui concerne les tests au latex), le laboratoire doit suivre les étapes nécessaires pour assurer la validité du résultat obtenu.

11. CONSERVATION ET EXPIRATION DU KIT

Le kit et tous les composants inutilisés doivent être conservés entre 2 et 8 °C. NE PAS CONGELER. La date d'expiration du kit est indiquée sur la boîte, ainsi que sur tous les composants du kit contenus dans celle-ci. Tout tampon de lavage dilué inutilisé peut être conservé pendant 4 semaines maximum entre 2 et 8 °C. Toutes les barrettes de microplaques inutilisées doivent être remises dans la pochette en aluminium avec le sachet de dessiccant en veillant à bien la refermée et en la conservant entre 2 et 8 °C.

12. SÉCURITÉ

Bien que les procédures détaillées soient simples et faciles à réaliser, elles nécessitent des installations de laboratoire dotées d'un personnel qualifié dûment formé à la manipulation d'organismes potentiellement pathogènes. Une formation de base est recommandée aux utilisateurs débutants. Elle est fournie par Solus Scientific Solutions Ltd.

- La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique corrosif. La peau ou les muqueuses qui entrent en contact avec la solution doivent être lavée(s) immédiatement avec de grandes quantités d'eau.

À titre indicatif, les précautions minimum suivantes doivent être prises :

- Des vêtements de protection doivent être portés, notamment une blouse de laboratoire, des lunettes de sécurité, un masque et des gants, le cas échéant.
- Ne pas pipeter en utilisant la bouche.
- Éviter tout contact avec la peau.
- Ne pas manger, boire ou appliquer de cosmétiques dans le laboratoire.
- Respecter toutes les réglementations locales, provinciales et/ou nationales applicables en matière d'élimination des déchets biologiques.

13. PRÉCAUTIONS

- Les réactifs sont fournis à une concentration de travail fixe. La sensibilité et la spécificité optimales seront réduites si les réactifs sont modifiés ou ne sont pas conservés dans les conditions recommandées.
- Ne pas mélanger différents lots de réactifs.
- Éviter la contamination microbienne des flacons de réactif ouverts.
- S'assurer qu'aucune contamination croisée ne se produise entre les puits.
- Il est essentiel au bon déroulement du test que l'anticorps conjugué aux enzymes ne puisse pas contaminer les autres réactifs et équipements.
- S'assurer que les composants du kit ne soient pas exposés à des températures supérieures à 40 °C.
- Les solutions contenant de l'azoture de sodium ne doivent pas être utilisées pour nettoyer les équipements, en particulier les dispositifs de lavage (l'enzyme peroxydase utilisée dans le kit est inactivée par l'azoture de sodium).
- Ne pas utiliser à des fins de diagnostic d'échantillons médicaux.

14. INFORMATIONS DES FDS

Des fiches de données de sécurité (FDS) relatives à ce test sont disponibles sur demande.

15. GARANTIE

La précision des résultats dépend de l'utilisation correcte du kit en suivant attentivement les consignes d'utilisation. Si le kit ne fonctionne pas conformément aux spécifications, veuillez contacter :

Solus Scientific Solutions Ltd

9 Mansfield Networkcentre
Millennium Business Park
Concorde Way
Mansfield
Nottinghamshire
NG19 7JZ

Tél. - +44 (0)1623 429701

Fax - +44 (0)1623 620977

E-mail : info@solusscientific.com

Informations sur les droits d'auteur

Le présent document, y compris toutes ses photographies et illustrations, contient des informations propriétaires protégées par le droit d'auteur. Aucune partie de cette publication ne peut être reproduite sous quelque forme que ce soit niu traduite dans une langue quelconque sans l'autorisation écrite préalable de PerkinElmer. ©2020 PerkinElmer, Inc. Tous droits réservés.

Marques commerciales

PerkinElmer est une marque déposée de PerkinElmer, Inc. Toutes les autres marques commerciales appartiennent à leurs propriétaires respectifs.

Résumé des modifications

Date de la modification	Numéro de publication :	Résumé des modifications
Jan2020	1	Nouvelle marque de test Solus E.coli O157 ELISA – QCF49 – Numéro 1.3 – 07/16.
Avr2020	2	Ajout de colorant noir au contrôle positif et inclusion de filtres en verre fritté dans le kit de dosage.

NOTE : Les modifications mineures (par exemple, formatage, grammaire, correction d'erreurs typographiques) ne sont pas incluses dans le résumé des modifications.

Pour plus d'informations, veuillez cons le site www.solusscientific.com

Fabriqué à :

Solus Scientific Solutions Ltd

9 Mansfield Networkcentre,
Millennium Business Park, Concorde Way,
Mansfield, Nottinghamshire
NG19 7JZ
Royaume-Uni
Tél. - +44 (0)1623 429701

PerkinElmer, Inc

940 Winter Street,
Waltham, MAa 02451
États-Unis T : (800) 762-
4000 ou
(+1) 203-925-4602
www.perkinelmer.com



Pour voir lae liste complète de nos bureaux mondiaux, veuillez consulter nous consulter la pagewww.perkinelmer.com/ContactUs