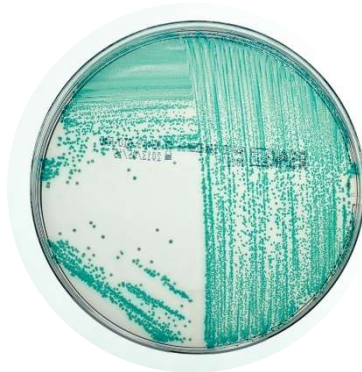

RAPID'*Sakazakii* Agar

User Guide

Selective chromogenic medium used for the detection of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) in milk powders, dried products for infant feeding, and also in their raw materials and their production environment

Catalog #3563971, Prepared plates, 90 mm x 20 dishes
Catalog #3564976, Dehydrated, 500 g



BIO-RAD

Table of Contents

Section 1	Introduction	1
Section 2	RAPID' <i>Sakazakii</i> Principle	1
Section 3	Theoretical Formula	1
Section 4	Shelf Life and Storage	1
Section 5	Materials Required but Not Supplied	1
	Equipment.....	2
	Supplies	2
Section 6	Precautions, Limitations of Use and Quality Control	2
Section 7	Protocol.....	3
	Preparation of Dehydrated Medium.....	3
	Preparation of Selective Supplement	3
	Sample Enrichment	4
	Inoculation and Plate Reading.....	4
Section 8	Confirmation of Positive Results.....	4
Section 9	Confirmation of Other Methods.....	5
Section 10	Test Performance and Validation	6
Section 11	References.....	6
Section 12	Revision History.....	7

Section 1 Introduction

Cronobacter spp., formerly named *Enterobacter sakazakii*, is a ubiquitous pathogen that has been isolated from food, environmental, and clinical sources. It is associated with rare but fatal (case fatality rate may reach 80%) infant infections linked to the consumption of reconstituted powdered infant formula. Newborns less than 4 weeks old (neonates) and those who have a low birth weight or are immunocompromised are particularly at risk because of the high mortality rate. But the largest number of cases occurs in the older population. The resistance of the organism to desiccation, the low cell numbers that have been reported to cause disease, and the high numbers of baby milk product sales have led many authorities to monitor for the pathogen. For example, an EU regulation (EC 2073/2005) requires the absence of the bacterium in 10 g of sample. To comply with regulations and to fulfill the HACCP approaches, industries have even stricter targets and need to select highly sensitive and specific methods.

Section 2 RAPID'Sakazakii Principle

The principle of the medium is based on the detection of the α -glucuronidase enzymatic activity characteristic of *Cronobacter* spp. Under its action, the chromogenic substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl α -D-glucopyranoside is hydrolyzed, producing *Cronobacter* spp. colonies with a blue to blue-green color. The incubation temperature is set at 44°C, sodium deoxycholate and crystal violet inhibit the growth of some of the associated microflora.

Section 3 Theoretical Formula

Pancreatic peptone of casein	10.0 g
Yeast extract	3.0g
Sodium chloride	5.0 g
Sodium deoxycholate	0.6 g
Crystal violet	2.0 mg
5-bromo-4-chloro-3-indolyl α -D-glucopyranoside	150.0 mg
Agar	18.0 g
Distilled water	qsp 1,000 ml

Final pH at 25°C = 7.2 \pm 0.2

Section 4 Shelf Life and Storage

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

Section 5 Materials Required but Not Supplied

Equipment

- All usual laboratory equipment
- Hot plate
- 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 Buffered Peptone Water (BPW), (for example, catalog #3554179, 225 ml x 6 bottles; 3564684, 500 g; 3564686, 5 kg; 3555790, 5 L x 2 bags; 3555795, 3 L x 4 bags)
- Inoculating loops
- PIF Supplement for *Cronobacter* and *Salmonella* co-enrichment (catalog #12013322)
- Sterile petri dishes (\varnothing 90 mm)
- Sterile pipets
- Sterile spreaders
- Sterile weigh bags

Section 6 Precautions 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
- 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
- Product development and validation of the PIF Supplement have been performed with Bio-Rad Buffered Peptone Water for optimal performance of the method

Limitations of Use

Not applicable

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 36.7 g of powder in 1 L of distilled water and mix until a homogenous suspension is obtained.
3. Wait 5 min and mix again until a homogenous suspension is obtained.
4. Heat gently, agitating frequently, then boil until completely dissolved.
5. Dispense, then autoclave at $121 \pm 1^\circ\text{C}$ for 15 min.
6. Cool the medium to 50°C . Dispense in petri dishes and leave on the bench to dry.
7. One 500 g bottle of powder makes 13.6 L of medium.

Preparation of Selective Supplement

1. Open the bottle of PIF Supplement and fill with 40 ml of 1:1 ethanol/sterile distilled water. Homogenize by agitating vigorously in order to obtain a blue concentrated solution. Diluted solution can be stored for 1 week at ambient temperature or at $2-8^\circ\text{C}$.
2. When using the concentrated solution, the volume can easily be adapted to the size and dilution ratio of the sample tested in order to obtain the right final concentration. For example, for 375 g sample diluted in 1.125 L of BPW, add 150 μl of reconstituted supplement.

Section 8 Confirmation of Positive Results

Sample size, g	BPW volume 1:4 dilution, ml	Volume of PIF supplement, µl
50	150	20
100	300	40
300	900	120
375	1125	150

Sample Enrichment

1. Dilute n g or n ml of sample in BPW following the appropriate protocol.

Scope (matrices)	Sample size	Enrichment	Certification
Infant formula and infant cereals with and without probiotics and ingredients, 30 g	30 g	n g of sample in $9 \times n$ ml BPW $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 16–20 hr	NF VALIDATION
Infant formula and infant cereals with and without probiotics and ingredients, up to 375 g	50–375 g	n g of sample in $3 \times n$ ml pre-warmed (37°C) BPW Add $0.4 \times n$ µl of reconstituted PIF supplement $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 18–24 hr	NF VALIDATION

2. Homogenize with stirrer/homogenizer.
3. If required, add the appropriate volume of selective supplement (see above).
4. Incubate according to table above.
5. After the enrichment step, the broth can be stored at $2\text{--}8^\circ\text{C}$ for 48 hr (30 g sample size) or 72 hr (50–375 g sample size).

Inoculation and Plate Reading

1. Using a sterile loop, streak 10 µl of enrichment broth on RAPID'*Sakazakii* Agar.
2. Incubate plate at $44 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 ± 2 hr.
3. *Cronobacter* spp. form blue to blue-green colonies on RAPID'*Sakazakii* Agar.
4. After the incubation step, plates can be stored at $2\text{--}8^\circ\text{C}$ for 72 hr.

Section 8 Confirmation of Positive Results

1. In the context of NF VALIDATION, 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 (with or without the purification step).
 - b. Using nucleic probes as described in the ISO 7218 standard (for example, iQ-Check

Confirmation of Positive Results


- Cronobacter* spp. Real-Time PCR Kit, catalog #3578137) using isolated colonies (with or without purification step).
2. Outside the NF Validation Mark, use the MALDI Biotyper System (MALDI-Time-Of-Flight Mass Spectrometer and MBT Compass Software version 4, Bruker) test directly from an isolated colony or after a purification step to confirm a sample as positive.
 3. In the event of discordant results (presumptive positive with RAPID'*Sakazakii* Agar, negative with confirmation method), 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 *Cronobacter* spp. Kit, NF VALIDATION–Certified Protocol

1. For environmental samples only, take 100 µl of the enriched BPW and add to one tube of 10 ml mLST.
2. Incubate at $44 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 ± 2 hr.
3. Using a sterile loop, streak 10 µl of enrichment broth in supplemented BPW or subculture broth in mLST for environmental samples on RAPID'*Sakazakii* Agar.
4. Incubate plate at $44 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 ± 2 hr.
5. *Cronobacter* spp. form blue to blue-green colonies on RAPID'*Sakazakii* Agar.
6. Perform a confirmation of 1 to 5 blue to blue-green colonies using the conventional tests described in the CEN or ISO standard methods.

Section 10 Test Performance and Validations

Certification	Scope	Validation Protocol	Reference Protocol	Certificate Reference
NF VALIDATION	<p>Infant formula and infant cereals with and without probiotics and ingredients, 30 g samples and</p> <p>Infant formula and infant cereals with and without probiotics and ingredients, 50 to 375 g samples with 1/4 dilution</p>	EN ISO 16140-2 (2016)	ISO 22964 (2017)	 <p>BRD 07/22 – 05/12 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Certified by AFNOR Certification http://nf-validation.afnor.org/en</p>

Section 11 References

Guillaume-Gentil O et al. (2005). A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *J Food Prot* 68, 64–69.

Gurtler JB et al. (2005). *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *Int J Food Microbiol* 104, 1–34.

ISO 22964:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the *Cronobacter* spp.

Iversen C et al. (2004). A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int J Food Microbiol* 96, 133–139.

Lehner A and Stephan R (2004). Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *J Food Prot* 67, 2850–2857.

Simmons BP et al. (1989). *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infec Control Hosp Epidemiol* 10, 398–401.

Section 12 Revision History

Release Date	Document Number	Change
March 2020	10000127307 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Extension of validation for large sample size for PIF Supplement with 1:4 dilution. - Validation renewal according to ISO 16140-2:2016 and reference protocol ISO 22964:2017 - New document design - Document number change – previous version RAPID'Sakazakii_V3_19 May 2016

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



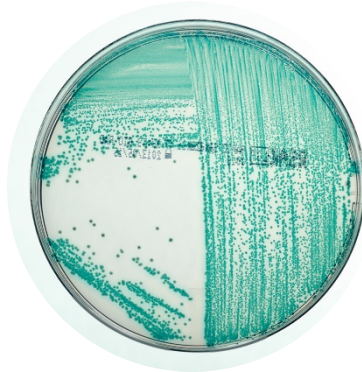
RAPID'*Sakazakii* Agar

Guide d'utilisation

Milieu chromogène sélectif utilisé pour la détection de *Cronobacter* spp. (anciennement *Enterobacter sakazakii*) dans les laits et produits en poudre destinés à l'alimentation des nourrissons, ainsi que dans leurs matières premières et leur environnement de production

N° de référence 3563971, boîte préparée, 90 mm x 20 boîtes

N° de référence 3564976, base déshydratée, 500 g



BIO-RAD

Sommaire

Section 1	Introduction	1
Section 2	RAPID'Sakazakii - Principe	1
Section 3	Formule théorique	1
Section 4	Durée de conservation et stockage	1
Section 5	Matériel requis non fourni	2
	Matériel	2
	Produits.....	2
Section 6	Précautions et contrôle qualité	2
Section 7	Protocole	3
	Préparation du milieu de culture déshydraté	3
	Préparation du supplément sélectif.....	3
	Enrichissement de l'échantillon.....	4
	Inoculation et lecture	4
Section 8	Confirmation des résultats positifs	4
Section 9	Confirmation d'autres méthodes	5
Section 10	Performance du test et validations	6
Section 11	Références	6
Section 12	Historique des révisions	7

Section 1 Introduction

Cronobacter spp., initialement appelé *Enterobacter sakazakii*, est un agent pathogène ubiquitaire qui a été isolé à partir de sources alimentaires, environnementales et cliniques. Il est associé à de rares cas d'infection mortelle du nourrisson (le taux de létalité peut atteindre 80 %), en lien avec la consommation de substituts de lait maternel en poudre reconstitués. Les nouveau-nés (moins de quatre semaines), les nourrissons avec un faible poids à la naissance ou immunodéprimés sont particulièrement exposés, compte tenu du taux de mortalité élevé. Toutefois, les cas apparaissent le plus souvent chez les adultes. La résistance du micro-organisme à la dessiccation, le faible nombre de cellules à l'origine de la maladie et le volume élevé de ventes de substituts de lait maternel ont amené de nombreuses autorités à surveiller l'agent pathogène. Par exemple, une réglementation européenne (EC 2073/2005) exige l'absence de la bactérie dans 10 g d'échantillon. De façon à respecter les réglementations ainsi que les programmes HACCP (système d'analyse des risques aux points critiques), les sociétés industrielles sont soumises à des cibles plus strictes et doivent sélectionner des méthodes spécifiques, à haute sensibilité.

Section 2 RAPID'Sakazakii - Principe

Le principe du milieu repose sur la détection de l'activité enzymatique α -glucuronidase spécifique de *Cronobacter* spp. Sous son action, le substrat chromogène 5-bromo-4-chloro-3-indolyl α -D-gluco-pyranoside est hydrolysé et donne aux colonies de *Cronobacter* spp. une couleur bleue à bleu-vert. Avec une température d'incubation à 44 °C, le désoxycholate de sodium et le violet cristallisé inhibent la croissance d'une partie de la microflore associée.

Section 3 Formule théorique

Peptone pancréatique de caséine	10,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Désoxycholate de sodium	0,6 g
Violet cristallisé	2,0 mg
5-bromo-4-chloro-3-indolyl α -D-gluco-pyranoside	150,0 mg
Agar	18,0 g
Eau distillée	q.s.p. 1 000 ml

pH final à 25 °C = 7,2 \pm 0,2

Section 4 Durée de conservation et stockage

- Gélose base déshydratée : 2–8 °C en emballage soigneusement scellé, dans un endroit sec et à l'abri de la lumière
- Boîtes de gélose précoulée : 2–8 °C à l'abri de la lumière
- Boîte pré-coulée 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
- Balance, sensibilité 0,1 g
- Agitateur/homogénéisateur
- Étuve ou enceinte thermostatée, précision ± 1 °C
- Bain-marie

Produits

- Milieu d'enrichissement Buffered Peptone Water (BPW), (par exemple, n° de référence 3554179, 225 ml x 6 flacons ; n° de référence 3564684, 500 g ; n° de référence 3564686, 5 kg ; n° de référence 3555790, 5 L x 2 sachets ; n° de référence 3555795, 3 L x 4 sachets)
- Öse d'inoculation
- PIF Supplement pour co-enrichissement *Cronobacter* et *Salmonella* (n° de référence 12013322)
- Boîtes de Petri stériles (Ø 90 mm)
- Pipettes stériles
- Étaleurs stériles
- Sacs de pesée stériles

Section 6

Précautions 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.
- 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.
- En vue d'obtenir des performances optimales de la méthode, le développement et la validation du PIF Supplement ont été réalisés avec l'eau peptonée tamponnée Bio-Rad.

Limites d'utilisation

Sans objet

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 36,7 g de poudre dans 1 L d'eau distillée et mélanger jusqu'à obtenir une suspension homogène.
3. Attendre 5 minutes et mélanger de nouveau jusqu'à obtenir une suspension homogène.
4. Chauffer doucement en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
5. Répartir, puis soumettre à l'autoclave à 121 ± 1 °C pendant 15 min.
6. Faire refroidir le milieu de culture à 50 °C. Répartir dans les boîtes de Petri et laisser sécher.
7. 500 g de poudre permettent de reconstituer 13,6 L de milieu.

Préparation du supplément sélectif

1. Ouvrir le flacon de PIF Supplement et remplir avec 40 ml de 1:1 d'éthanol /d'eau distillée stérile. Homogénéiser en agitant vigoureusement afin d'obtenir une solution concentrée bleue. La solution diluée peut être stockée pendant 1 semaine à température ambiante ou à 2–8 °C.
2. Avec la solution concentrée, le volume peut être adapté facilement à la taille et au rapport de dilution de l'échantillon testé afin d'obtenir la concentration finale correcte. Par exemple, pour un échantillon de 375 g dilué dans 1,125 L de BPW, ajouter 150 µl de supplément reconstitué.

Section 8 Confirmation des résultats positifs

Taille de l'échantillon, g	Volume BPW Dilution 1:4, ml	Volume PIF Supplement, µl
50	150	20
100	300	40
300	900	120
375	1 125	150

Enrichissement de l'échantillon

1. Diluer n g ou n ml d'échantillon dans la BPW conformément au protocole approprié.

Domaine (matrices)	Taille de l'échantillon	Enrichissement	Certification
Substituts du lait maternel et céréales infantiles (avec et sans probiotiques) et leurs ingrédients, 30 g	30 g	n g d'échantillon dans 9 x n ml de BPW 37 ± 1 °C pendant 16–20 hr	NF VALIDATION
Substituts du lait maternel et céréales infantiles (avec et sans probiotiques) et leurs ingrédients, jusqu'à 375 g	50–375 g	n g d'échantillon dans 3 x n ml de BPW préchauffée (37 °C) Ajouter 0,4 x n µl de PIF Supplement reconstitué 37 ± 1 °C pendant 18–24 hr	NF VALIDATION

2. Homogénéiser avec un agitateur/homogénéisateur.
3. Si nécessaire, ajouter le volume approprié de supplément sélectif (voir ci-dessus).
4. Incuber selon le tableau ci-dessus.
5. Après l'étape d'enrichissement, le bouillon peut être stocké à 2-8 °C pendant 48 hr (taille d'échantillon 30 g) ou 72 hr (taille d'échantillon 50-375 g).

Inoculation et lecture

1. À l'aide d'une öse stérile, strier 10 µl de bouillon d'enrichissement sur la gélose RAPID'Sakazakii.
2. Incuber la boîte à 44 ± 1 °C pendant 24 ± 2 hr.
3. Les *Cronobacter* spp. forment des colonies de couleur bleue à bleu-vert sur la gélose RAPID'Sakazakii.
4. Après l'étape d'incubation, les boîtes peuvent être stockées à 2–8 °C pendant 72 hr.

Section 8 Confirmation des résultats positifs

1. 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 (avec ou sans étape de purification).

Confirmation des résultats positifs

- b. À l'aide de sondes nucléiques comme décrit dans la norme ISO 7218 (par exemple, kit de détection par PCR en temps réel iQ-Check *Cronobacter* spp., n° de référence 3578137) avec des colonies isolées (avec ou sans étape de purification).
2. En dehors de la marque NF Validation, utilisation du test MALDI Biotyper (le système Biotyper de Bruker inclut un spectromètre de masse à temps de vol MALDI et MBT Compass version logicielle 4) directement à partir d'une colonie isolée ou après une étape de purification, pour confirmer qu'un échantillon est positif.
3. En cas de résultats discordants (présupposé positif avec la gélose RAPID'*Sakazakii*, négatif avec la méthode de confirmation), 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 le kit iQ-Check *Cronobacter* spp., NF VALIDATION – Protocole certifié

1. Pour les échantillons environnementaux uniquement, prélever 100 µl du bouillon BPW enrichi et ajouter à un tube de bouillon mLST 10 ml.
2. Incuber à 44 ± 1 °C pendant 24 ± 2 hr.
3. À l'aide d'une öse stérile, strier 10 µl de bouillon d'enrichissement en BPW supplémentée, ou de bouillon de sous-culture en mLST pour les échantillons environnementaux, sur la gélose RAPID'*Sakazakii*.
4. Incuber la boîte à 44 ± 1 °C pendant 24 ± 2 hr.
5. Les *Cronobacter* spp. forment des colonies de couleur bleue à bleu-vert sur la gélose RAPID'*Sakazakii*.
6. Procéder à une confirmation de 1 à 5 colonies de couleur bleue à bleu-vert à l'aide des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées CEN ou ISO.

Section 10 Performance du test et validations

Certification	Domaine	Protocole de validation	Protocole de référence	Référence de certificat
NF VALIDATION	<p>Substituts du lait maternel et céréales infantiles (avec et sans probiotiques) et leurs ingrédients, échantillons 30 g</p> <p>et</p> <p>Substituts du lait maternel et céréales infantiles (avec et sans probiotiques) et leurs ingrédients, échantillons 50 à 375 g avec dilution 1/4</p>	EN ISO 16140-2 (2016)	ISO 22964 (2017)	 <p>BRD 07/22– 05/12 MÉTHODES ANALYTIQUES ALTERNATIVES POUR LE SECTEUR AGRO- ALIMENTAIRE Certifié par AFNOR Certification http://nf-validation.afnor.org/en</p>

Section 11 Références

Guillaume-Gentil O et al. (2005). A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *J Food Prot* 68, 64–69.

Gurtler JB et al. (2005). *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *Int J Food Microbiol* 104, 1–34.

ISO 22964:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the *Cronobacter* spp.

Iversen C et al. (2004). A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int J Food Microbiol* 96, 133–139.

Lehner A and Stephan R (2004). Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *J Food Prot* 67, 2850–2857.

Simmons BP et al. (1989). *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infec Control Hosp Epidemiol* 10, 398–401.

Section 12 Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Mars 2020	10000127307 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Extension de la validation pour les échantillons de grande taille, avec PIF Supplement et dilution 1:4. - Renouvellement de la validation conformément à ISO 16140-2:2016 et au protocole de référence ISO 22964:2017 - Nouvelle conception de document - Modification du numéro de document – version précédente RAPID'Sakazakii_V3_19 mai 2016

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



10000127307 Ver A US/EG

RAPID'*Sakazakii* Agar

Anwenderhandbuch

Selektives chromogenes Medium zum Nachweis von *Cronobacter* spp. (ehemals *Enterobacter sakazakii*) in Milchpulver und gepulverter Säuglingsnahrung sowie in deren Rohmaterial und Produktionsumgebung

Katalog-Nr. 3563971, gebrauchsfertige Agarplatten, 20 Agarplatten x 90 mm
Katalog-Nr. 3564976, dehydriert, 500 g



BIO-RAD

Inhaltsverzeichnis

Abschnitt 1	Einleitung	1
Abschnitt 2	RAPID´ <i>Sakazakii</i> Testprinzip	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.....	2
Abschnitt 7	Protokoll	3
	Vorbereitung des dehydrierten Mediums.....	3
	Vorbereitung des selektiven Supplements.....	3
	Probenanreicherung.....	4
	Beimpfung und Auswertung der Platten	4
Abschnitt 8	Bestätigung positiver Ergebnisse.....	4
Abschnitt 9	Bestätigung anderer Methoden	5
Abschnitt 10	Testleistung und Testvalidierung.....	6
Abschnitt 11	Literatur	6
Abschnitt 12	Revisionshistorie.....	7

Abschnitt 1 Einleitung

Cronobacter spp., ehemals *Enterobacter sakazakii*, ist ein ubiquitärer Keim, der aus Lebensmitteln, in der Umgebung und im klinischen Umfeld isoliert wurde. Er ist mit seltenen, aber tödlichen Infektionen bei Säuglingen (Sterberate bis zu 80 %) im Zusammenhang mit der Aufnahme von rekonstituierter gepulverter Säuglingsnahrung verbunden. Neugeborene unter 4 Wochen und solche mit niedrigem Geburtsgewicht oder geschwächtem Immunsystem sind aufgrund der hohen Sterberate besonders gefährdet. Die meisten Fälle treten jedoch bei älteren Säuglingen auf. Die Resistenz des Organismus gegen Trockenheit, die Tatsache, dass bereits eine geringe Keimzahl eine Erkrankung verursachen kann, sowie der hohe Absatz an Babymilchprodukten haben viele Behörden zur Einführung von Maßnahmen zur Keimüberwachung veranlasst. Eine EU-Verordnung (EG 2073/2005) verlangt beispielsweise, dass das Bakterium in 10 g einer Probe nicht nachweisbar sein darf. Zur Einhaltung der Verordnungen und der HACCP-Konzepte gelten in der Industrie noch strengere Sollwerte, sodass hochempfindliche und spezifische Testmethoden erforderlich sind.

Abschnitt 2 RAPID'Sakazakii Testprinzip

Das Testprinzip bei Verwendung des Mediums basiert auf dem Nachweis der für *Cronobacter* spp typischen α -Glucuronidase-Aktivität. Dieses Enzym hydrolysiert das chromogene Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- α -D-Glucopyranosid, was zu blau bis blaugrünen *Cronobacter* spp.-Kolonien führt. Die Inkubationstemperatur beträgt 44°C. Natriumdesoxycholat und Kristallviolett hemmen das Wachstum bestimmter anderer, gleichzeitig vorhandener Mikroorganismen.

Abschnitt 3 Theoretische Zusammensetzung

Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	10,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Natriumdesoxycholat	0,6 g
Kristallviolett	2,0 mg
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- α -D-Glucopyranosid	150,0 mg
Agar	18,0 g
Destilliertes Wasser	qsp 1.000 ml

Finaler pH-Wert bei 25°C = 7,2 \pm 0,2

Abschnitt 4 Haltbarkeit und Lagerung

- Dehydrierter Agar: Trocken und lichtgeschützt in der sorgfältig verschlossenen Packung bei 2–8°C.
- Gebrauchsfertige Agarplatten: Lichtgeschützt bei 2–8°C
- Aus dehydriertem Medium hergestellte Agarplatte: 15 Tage bei trockener und lichtgeschützter Lagerung in der sorgfältig verschlossenen Packung bei 2–8°C

Abschnitt 5

Zusätzlich benötigte Materialien

Geräte

- Alle üblichen Laborgeräte
- Heizplatte
- 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 gepuffertes Peptonwasser (BPW) (z. B. Katalog-Nr 3554179, 6 Flaschen x 225 ml; 3564684, 500 g; 3564686, 5 kg; 3555790, 2 Beutel x 5 L; 3555795, 4 Beutel x 3 L)
- Impfösen
- PIF Supplement zur gemeinsamen Anreicherung von *Cronobacter* und *Salmonella* (Katalog-Nr. 12013322)
- Sterile Petrischalen (\varnothing 90 mm)
- Sterile Pipetten
- Sterile Spatel
- Sterile Wägebeutel

Abschnitt 6

Vorsichtsmaßnahmen und Qualitätskontrolle

Vorsichtsmaßnahmen

- Es sind die Richtlinien der guten Laborpraxis einzuhalten (EN ISO 7218). Bei der Arbeit mit potenziell infektiösen, lebenden Bakterien 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 Produktentwicklung und Validierung des PIF Supplements wurde mit gepuffertem Peptonwasser von Bio-Rad durchgeführt, um eine optimale Methodenleistung zu erzielen.

Anwendungsbeschränkungen

Nicht zutreffend.

Qualitätskontrolle

- Jedes von der Firma Bio-Rad hergestellte und verkaufte Produkt unterliegt einer umfassenden Qualitätssicherung, d. h. vom Rohstoffeingang bis zur Vermarktung der Fertigprodukte. 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. 36,7 g Pulver werden in 1 L destilliertem Wasser gelöst und zu einer homogenen Suspension gemischt.
3. 5 min warten und mischen, bis eine homogene Suspension entstanden ist.
4. Unter ständigem Rühren vorsichtig erhitzen und zum Kochen bringen, bis sich das Medium vollständig gelöst hat.
5. Abfüllen und dann in einem Autoklaven 15 min bei $121 \pm 1^\circ\text{C}$ sterilisieren.
6. Das Medium auf 50°C abkühlen lassen. In Petrischalen geben und auf dem Tisch trocknen lassen.
7. 500 g Pulver ergeben 13,6 L Medium.

Vorbereitung des selektiven Supplements

1. Den Behälter mit PIF Supplement öffnen und 40 ml 1:1 Ethanol/Steriles destilliertes Wasser zugeben. Durch kräftiges Rühren homogenisieren, um eine blaue konzentrierte Lösung zu erhalten. Die verdünnte Lösung kann 1 Woche bei Raumtemperatur oder bei $2-8^\circ\text{C}$ gelagert werden.
2. Bei Verwendung der konzentrierten Lösung kann das Volumen leicht an die Menge und das Verdünnungsverhältnis der getesteten Probe angepasst werden, um die richtige Endkonzentration zu erhalten. Beispiel: Für 375 g Probe, die in 1, 125 L BPW verdünnt wurde, werden 150 μl rekonstituiertes Supplement zugegeben.

Abschnitt 8 Bestätigung positiver Ergebnisse

Probenmenge, g	BPW Volumen 1:4-Verdünnung, ml	Volumen des PIF Supplement, µl
50	150	20
100	300	40
300	900	120
375	1125	150

Probenanreicherung

1. n g oder n ml Probe nach dem jeweiligen Protokoll in BPW verdünnen.

Umfang (Matrizes)	Probenmenge	Anreicherung	Zertifizierungsstelle
Säuglingsnahrung und Säuglingszerealien mit und ohne Probiotika und Zutaten, 30 g	30 g	n g Probe in $9 \times n$ ml BPW $37 \pm 1^\circ\text{C}$ für 16–20 hr	NF VALIDATION
Säuglingsnahrung und Säuglingszerealien mit und ohne Probiotika und Zutaten, bis zu 375 g	50–375 g	n g Probe in $3 \times n$ ml vorgewärmtem (37°C) BPW $0,4 \times n$ µl rekonstituiertes PIF Supplement zugeben $37 \pm 1^\circ\text{C}$ für 18–24 hr	NF VALIDATION

2. Mit dem Rührer / Homogenisator homogenisieren.
3. Falls erforderlich, das geeignete Volumen des selektiven Supplements zugeben (siehe oben).
4. Unter Beachtung der vorstehenden Tabelle inkubieren.
5. Nach dem Anreicherungsschritt kann die Bouillon bei $2-8^\circ\text{C}$ für 48 hr (Probenmenge 30 g) oder für 72 hr (Probenmenge 50–375 g) gelagert werden.

Beimpfung und Auswertung der Platten

1. Mit einer sterilen Impföse 10 µl Anreicherungsbouillon auf RAPID'*Sakazakii* Agar ausstreichen.
2. Die Platte bei $44 \pm 1^\circ\text{C}$ für 24 ± 2 hr inkubieren.
3. *Cronobacter* spp. bildet auf RAPID'*Sakazakii* Agar blaue bis blau-grüne Kolonien.
4. Nach der Inkubation können die Platten für 72 hr bei $2-8^\circ\text{C}$ gelagert werden.

Abschnitt 8

Bestätigung positiver Ergebnisse

1. Im Rahmen einer 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 (mit oder ohne den Reinigungsschritt).
 - b. Durch Verwendung von Nukleinsonden wie in der Norm ISO 7218 beschrieben (z. B. iQ-Check *Cronobacter* spp. Real-Time PCR Kit, Katalog-Nr. 3578137) unter Verwendung von Einzelkolonien (mit oder ohne Reinigungsschritt).

Bestätigung positiver Ergebnisse


2. Außerhalb der Validierung zum Erhalt der NF VALIDATION-Zertifizierung: Anwendung des MALDI Biotyper Systems (MALDI-TOF-Massenspektrometer und MBT Compass-Software, Version 4, von Bruker) direkt mit einer isolierten Kolonie oder nach einem Reinigungsschritt zur Bestätigung der Positivität einer Probe.
3. Bei nicht übereinstimmenden Ergebnissen (vermutlich positiv auf RAPID'*Sakazakii* Agar, negativ mit der Bestätigungsmethode) muss das Labor die erforderlichen Schritte ausführen, um die Validität des erhaltenen Ergebnisses sicherzustellen.

Abschnitt 9 Bestätigung anderer Methoden

Bestätigung positiver Ergebnisse mit dem iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit, von NF VALIDATION zertifiziertes Protokoll

1. Nur bei Umgebungsproben: 100 µl des angereicherten BPW in ein Röhrchen mit 10 ml mLST geben.
2. Bei $44 \pm 1^\circ\text{C}$ für 24 ± 2 hr inkubieren.
3. Mit einer sterilen Impföse 10 µl der Anreicherungsbouillon in BPW mit Supplement geben oder (bei Umgebungsproben) Bouillon in mLST auf RAPID'*Sakazakii* Agar subkultivieren.
4. Die Platte bei $44 \pm 1^\circ\text{C}$ für 24 ± 2 hr inkubieren.
5. *Cronobacter* spp. bildet auf RAPID'*Sakazakii* Agar blaue bis blau-grüne Kolonien.
6. Mit den herkömmlichen Tests, die in den Methoden der CEN- oder ISO-Normen beschrieben sind, eine Bestätigung von 1 bis 5 blauen bis blau-grünen Kolonien durchführen.

Abschnitt 10 Testleistung und Testvalidierung

Zertifizierungsstelle	Umfang	Validierungsprotokoll	Referenzprotokoll	Zertifikat-Referenz
NF VALIDATION	Säuglingsnahrung und Säuglingszerealien mit und ohne Probiotika und Zutaten, 30 g Proben und Säuglingsnahrung und Säuglingszerealien mit und ohne Probiotika und Zutaten, 50 bis 375 g Proben mit 1:4-Verdünnung	EN ISO 16140-2 (2016)	ISO 22964 (2017)	 <p>BRD 07/22 – 05/12 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Zertifiziert durch die AFNOR- Zertifizierungsstelle http://nf-validation.afnor.org/en</p>

Abschnitt 11 Literatur

Guillaume-Gentil O et al. (2005). A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *J Food Prot* 68, 64–69.

Gurtler JB et al. (2005). *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *Int J Food Microbiol* 104, 1–34.

ISO 22964:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the *Cronobacter* spp.

Iversen C et al. (2004). A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int J Food Microbiol* 96, 133–139.

Lehner A and Stephan R (2004). Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *J Food Prot* 67, 2850–2857.

Simmons BP et al. (1989). *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infec Control Hosp Epidemiol* 10, 398–401.

Abschnitt 12 Revisionshistorie

Versionsdatum	Dokumentnummer	Änderung
März 2020	10000127307 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Erweiterung der Validierung für große Probenmengen in Bezug auf PIF Supplement mit einer 1:4-Verdünnung. - Erneuerung der Validierung gemäß ISO 16140-2:2016 und Referenzprotokoll ISO 22964:2017 - Neues Dokumentdesign - Änderung der Dokumentnummer – vorhergehende Version RAPID'Sakazakii_V3_19. Mai 2016

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 G220

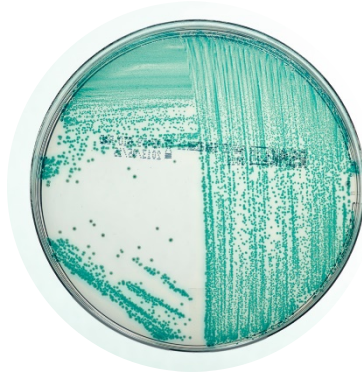


RAPID'*Sakazakii* Agar

Manuale utente

Terreno cromogenico selettivo utilizzato per la rilevazione di *Cronobacter* spp. (in precedenza *Enterobacter sakazakii*) in latte in polvere, prodotti disidratati per l'alimentazione dei neonati ed inoltre nelle materie prime e negli ambienti di produzione associati

Catalogo # 3563971, piastre pronte, 90 mm x 20 piastre
Catalogo # 3564976, disidratato, 500 g



BIO-RAD

Indice

Sezione 1	Introduzione	1
Sezione 2	Principio di RAPID' <i>Sakazakii</i>	1
Sezione 3	Formula teorica	1
Sezione 4	Durata e conservazione	1
Sezione 5	Materiali necessari ma non forniti	2
	Apparecchiatura	2
	Materiali	2
Sezione 6	Precauzioni e controllo qualità	2
Sezione 7	Protocollo	3
	Preparazione del terreno disidratato	3
	Preparazione del supplemento selettivo.....	3
	Arricchimento del campione	4
	Inoculazione e lettura delle piastre	4
Sezione 8	Conferma dei risultati positivi	4
Sezione 9	Conferma di altri metodi	5
Sezione 10	Performance del test e validazioni	6
Sezione 11	Riferimenti	6
Sezione 12	Cronologia delle revisioni	7

Sezione 1 Introduzione

Cronobacter spp., precedentemente denominato *Enterobacter sakazakii*, è un patogeno ubiquitario che è stato isolato da fonti alimentari, ambientali e cliniche. È associato a infezioni neonatali rare ma fatali (il tasso di mortalità può raggiungere l'80%) legate al consumo di formulazioni in polvere per neonati. I neonati di età inferiore a 4 settimane e quelli che presentano un peso ridotto alla nascita o sono immunocompromessi sono particolarmente a rischio a causa dell'elevato tasso di mortalità. Il maggior numero di casi, tuttavia, si registra nella popolazione anziana. La resistenza dell'organismo all'essiccamento, il ridotto numero di cellule riportato come causa di malattie e l'elevato volume di vendite di prodotti a base di latte per neonati hanno portato al monitoraggio di questo organismo patogeno da parte di numerose autorità. Ad esempio, il regolamento dell'UE (CE 2073/2005) richiede l'assenza del batterio in campioni di 10 g. Per ottemperare alla normativa e soddisfare gli approcci HACCP, le industrie si sono poste obiettivi ancora più rigidi e devono selezionare metodi altamente sensibili e specifici.

Sezione 2 Principio di RAPID'*Sakazakii*

Il principio del terreno si basa sulla rilevazione dell'attività enzimatica della α -glucuronidasi caratteristica di *Cronobacter* spp. Per opera della sua azione, il substrato cromogenico 5-bromo-4-cloro-3-indolil α -D-glucopiranoside viene idrolizzato, determinando una colorazione da blu a blu-verde delle colonie di *Cronobacter* spp. La temperatura di incubazione è fissata a 44°C, il sodio desossicolato e il cristalvioletto inibiscono la crescita di parte della microflora associata.

Sezione 3 Formula teorica

Peptone pancreatico di caseina	10,0 g
Estratto di lievito	3,0g
Cloruro di sodio	5,0 g
Sodio desossicolato	0,6 g
Cristalvioletto	2,0 mg
5-bromo-4-cloro-3-indolil α -D-glucopiranoside	150,0 mg
Terreno di coltura agar	18,0 g
Acqua distillata	QSP 1.000 ml

pH finale a 25°C = 7,2 \pm 0,2

Sezione 4 Durata e conservazione

- Terreno di coltura agar disidratato: 2-8°C in una confezione sigillata con cura, in un luogo asciutto e buio
- Piastre di agar pronte: 2-8°C in un luogo buio
- Piastra preparata con il terreno di coltura disidratato: 15 giorni a 2-8°C in una confezione sigillata con cura, in un luogo asciutto e buio

Sezione 5

Materiali necessari ma non forniti

Apparecchiatura

- Tutta la normale apparecchiatura di laboratorio
- Piastra riscaldante
- 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: Acqua peptonata tamponata (APT), (ad esempio, catalogo #3554179, 225 ml x 6 flaconi; 3564684, 500 g; 3564686, 5 kg; 3555790, 5 L x 2 sacche; 3555795, 3 L x 4 sacche)
- Anse per inoculazione
- PIF Supplement per l'arricchimento simultaneo di *Cronobacter* e *Salmonella* (catalogo #12013322)
- Piastre Petri sterili (\varnothing 90 mm)
- Pipette sterili
- Spatole sterili
- Sacche di pesatura sterili

Sezione 6

Precauzioni e controllo qualità

Precauzioni

- Rispettare le buone pratiche di laboratorio (EN ISO 7218). Indossare protezioni adeguate, come guanti e camici da laboratorio, quando si manipolano batteri vivi potenzialmente infettivi
- I terreni entrati in contatto con campioni di alimenti devono essere considerati come contaminati e quindi smaltiti in conformità alle normative e direttive locali
- Lo sviluppo del prodotto e la validazione del Supplemento PIF sono stati eseguiti con Acqua peptonata tamponata Bio-Rad per garantire prestazioni ottimali del metodo

Limitazioni d'uso

Non applicabile

Controllo qualità

- Tutti i prodotti fabbricati e commercializzati dalla società Bio-Rad sono sottoposti a un sistema di assicurazione qualità dal momento del ricevimento delle materie prime fino alla commercializzazione dei prodotti finiti. Ciascun lotto di prodotto finito è soggetto a un controllo di qualità conformemente alla norma EN ISO 11133 e viene messo in commercio soltanto se risulta conforme ai criteri di accettazione. Tutta la documentazione relativa alla produzione e al controllo qualità di ciascun lotto è conservata a cura del fabbricante
- 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 36,7 g di polvere in 1 L di acqua distillata e miscelare fino ad ottenere una sospensione omogenea.
3. Attendere 5 minuti e miscelare nuovamente fino ad ottenere una sospensione omogenea.
4. Riscaldare lentamente, agitando frequentemente, quindi portare a ebollizione fino al completo scioglimento.
5. Dispensare, quindi autoclavare a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ per 15 minuti.
6. Raffreddare il terreno a 50°C . Dispensare in piastre Petri e lasciare asciugare sul piano di lavoro.
7. Un flacone di polvere da 500 g produce 13,6 L di terreno.

Preparazione del supplemento selettivo

1. Aprire il flacone di PIF Supplement e riempire con 40 ml di 1:1 di etanolo/ acqua distillata sterile. Omogeneizzare agitando vigorosamente fino ad ottenere una soluzione concentrata blu. La soluzione diluita può essere conservata per 1 settimana a temperatura ambiente o a $2-8^\circ\text{C}$.
2. Durante l'uso della soluzione concentrata, il volume può essere facilmente adattato alle dimensioni e al rapporto di diluizione del campione testato in modo da ottenere la concentrazione finale corretta. Ad esempio, per 375 g di campione diluito in 1,125 L di BPW, aggiungere 150 μl di supplemento ricostituito.

Sezione 8 Conferma dei risultati positivi

Dimensioni del campione, g	Volume di BPW Diluizione di 1:4, ml	Volume del PIF Supplement, µl
50	150	20
100	300	40
300	900	120
375	1125	150

Arricchimento del campione

1. Diluire n g o n ml di campione in BPW seguendo il protocollo appropriato.

Oggetto (matrici)	Dimensioni del campione	Arricchimento	Certificazione
Formula per neonati e cereali per neonati con e senza probiotici e ingredienti associati, 30 g	30 g	n g di campione in 9 x n ml di APT $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 16–20 hr	NF VALIDATION
Formula per neonati e cereali per neonati con e senza probiotici e ingredienti associati, fino a 375 g	50–375 g	n g di campione in 3x n ml di APT preriscaldata (37°C) Aggiungere 0,4x n µl di PIF Supplement ricostituito $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore	NF VALIDATION

2. Omogeneizzare con un agitatore/omogeneizzatore.
3. Se necessario, aggiungere il volume appropriato di supplemento selettivo (vedere sopra).
4. Incubare secondo la tabella sopra riportata.
5. Al termine della fase di arricchimento, il brodo può essere conservato a $2-8^\circ\text{C}$ per 48 hr (campione di 30 g) o 72 hr (campione di 50–375 g).

Inoculazione e lettura delle piastre

1. Utilizzando un'ansa sterile, strisciare 10 µl di brodo di arricchimento su agar RAPID'Sakazakii.
2. Incubare la piastra a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 hr.
3. *Cronobacter* spp. forma colonie da blu a verde-blu su agar RAPID'Sakazakii.
4. Al termine della fase di incubazione, le piastre possono essere conservate a $2-8^\circ\text{C}$ per 72 hr.

Sezione 8

Conferma dei risultati positivi

1. 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 (con o senza fase di purificazione).

Conferma dei risultati positivi

- b. Mediante sonde nucleiche come descritto nella norma ISO 7218 (ad esempio, Kit iQ-Check *Cronobacter* spp. Real-Time PCR, catalogo #3578137) utilizzando colonie isolate (con o senza fase di purificazione).
2. Al di fuori del marchio NF Validation, utilizzare il test MALDI Biotyper System (spettrometro di massa a tempo di volo MALDI e software MBT Compass versione 4 di Bruker) direttamente da una colonia isolata o dopo una fase di purificazione per confermare un campione come positivo.
3. In caso di risultati discordanti (presunto positivo con agar RAPID'*Sakazakii*, negativo con metodo di conferma), 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 il Kit iQ-Check *Cronobacter* spp. protocollo certificato da NF VALIDATION

1. Solo per i campioni ambientali, prendere 100 µl di APT arricchita e aggiungerla ad una provetta di 10 ml di mLST.
2. Incubare a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 hr.
3. Utilizzando un'ansa sterile, strisciare 10 µl di brodo di arricchimento in APT supplementata o brodo di sottocoltura in mLST per i campioni ambientali su agar RAPID'*Sakazakii*.
4. Incubare la piastra a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 hr.
5. *Cronobacter* spp. forma colonie da blu a verde-blu su agar RAPID'*Sakazakii*.
6. Eseguire una conferma di 1-5 colonie da blu a blu-verde utilizzando i test convenzionali descritti nei metodi standard CEN o ISO.

Sezione 10 Performance del test e validazioni

Certificazione	Ambito di applicazione	Protocollo di validazione	Protocollo di riferimento	Riferimento al certificato
NF VALIDATION	Formula per neonati e cereali per neonati con e senza probiotici e ingredienti associati, campioni da 30 g e Formula per neonati e cereali per neonati con e senza probiotici e ingredienti associati, campioni da 50 a 375 g con diluizione di 1/4	EN ISO 16140-2 (2016)	ISO 22964 (2017)	 <p>BRD 07/22 – 05/12 METODI ANALITICI ALTERNATIVI PER IL SETTORE AGROALIMENTARE Certificato mediante certificazione AFNOR http://nf-validation.afnor.org/en</p>

Sezione 11 Riferimenti

Guillaume-Gentil O et al. (2005). A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *J Food Prot* 68, 64–69.

Gurtler JB et al. (2005). *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *Int J Food Microbiol* 104, 1–34.

ISO 22964:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the *Cronobacter* spp.

Iversen C et al. (2004). A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int J Food Microbiol* 96, 133–139.

Lehner A and Stephan R (2004). Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *J Food Prot* 67, 2850–2857.

Simmons BP et al. (1989). *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infec Control Hosp Epidemiol* 10, 398–401.

Sezione 12 Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero di documento	Modifica
Marzo 2020	10000127307 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Estensione della validazione per i campioni di grandi dimensioni per il Supplemento PIF con diluizione di 1:4. - Rinnovo della validazione in base alla norma ISO 16140-2:2016 e al protocollo di riferimento ISO 22964:2017 - Nuovo design del documento - Modifica al numero di documento – versione precedente RAPID'Sakazakii_V3_19 maggio 2016

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



10000127307 Ver A US/EG

RAPID'*Sakazakii* Agar

Guia do usuário

Meio cromogênico seletivo utilizado para a detecção de *Cronobacter* spp. (anteriormente *Enterobacter sakazakii*) em leite em pó, produtos secos para alimentação infantil, e também em suas matérias-primas e seu ambiente de produção

Nº do catálogo 3563971, Meios de cultura preparados, 90 mm x 20 placas

Nº do catálogo 3564976, Desidratado, 500 g



BIO-RAD

Índice

Seção 1	Introdução	1
Seção 2	RAPID'Sakazakii Princípio	1
Seção 3	Fórmula Teórica	1
Seção 4	Prazo de validade e armazenamento	1
Seção 5	Materiais necessários, mas não fornecidos	2
	Equipamento	2
	Suprimentos.....	2
Seção 6	Precauções e Controle de qualidade	2
Seção 7	Protocolo	3
	Preparação do Meio Desidratado.....	3
	Preparação do suplemento seletivo.....	3
	Enriquecimento da amostra	4
	Inoculação e Leitura de Meios de Cultura	4
Seção 8	Confirmação de Resultados Positivos	4
Seção 9	Confirmação de outros métodos	5
Seção 10	Desempenho e validação do teste	6
Seção 11	Referências	6
Seção 12	Histórico de Revisão	7

Seção 1 Introdução

O *Cronobacter* spp., anteriormente denominado *Enterobacter sakazakii*, é um patógeno onipresente que foi isolado a partir de fontes alimentares, ambientais e clínicas. Ele está associado a infecções infantis raras, mas fatais (a taxa de fatalidade pode chegar a 80%), ligadas ao consumo de fórmula infantil em pó reconstituída. Recém-nascidos com menos de 4 semanas (neonatos) e aqueles que têm um baixo peso ao nascer ou são imunocomprometidos estão particularmente em risco por causa da alta taxa de mortalidade. Mas o maior número de casos ocorre na população idosa. A resistência do organismo à dessecação, os baixos números de células que causam doenças e o alto número de vendas de leite industrializado para bebês levaram muitas autoridades a monitorar o patógeno. Por exemplo, um regulamento da UE (CE 2073/2005) exige ausência de bactéria em 10 g de amostra. Para cumprir os regulamentos e as abordagens da APPCC, as indústrias têm metas mais rígidas e precisam selecionar métodos altamente sensíveis e específicos.

Seção 2 RAPID'Sakazakii Princípio

O princípio do meio se baseia na detecção da atividade enzimática α -glucuronidase característica da *Cronobacter* spp. Sob sua ação, o substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indolil α -D-glucopiranosídeo é hidrolisado, produzindo colônias de *Cronobacter* spp. de cor azul a azul-esverdeada. A temperatura de incubação é fixada em 44°C, o deoxicolato de sódio e a violeta cristalina inibem o crescimento de alguma da microflora associada.

Seção 3 Fórmula Teórica

Peptona pancreática de caseína	10,0 g
Extrato de levedura	3,0g
Cloreto de sódio	5,0 g
Deoxicolato de sódio	0,6 g
Cristal violeta	2,0 mg
5-bromo-4-cloro-3-indolil α -D-glucopiranosídeo	150,0 mg
Ágar	18,0 g
Água destilada	qsp 1.000 ml

pH final a 25°C = 7,2 \pm 0,2

Seção 4 Prazo de validade e armazenamento

- Ágar desidratado: 2–8°C em embalagem cuidadosamente vedada, em um ambiente seco e arejado
- Placas de ágar pré-distribuídas: 2–8°C em local escuro
- Meio de cultura preparado a partir do ágar desidratado: 15 dias a 2–8°C em embalagem cuidadosamente vedada, em um ambiente seco e arejado

Seção 5

Materiais necessários, mas não fornecidos

Equipamento

- Todo o equipamento comum de laboratório
- Placa de aquecimento
- 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, água peptonada tamponada (BPW), (por exemplo, nº do catálogo 3554179, 225 ml x 6 garrafas; 3564684, 500 g; 3564686, 5 kg; 3555790, 5 L x 2 sacos; 3555795, 3 L x 4 sacos)
- Inoculação de loops
- PIF Supplement para coenriquecimento *Cronobacter* e *Salmonella* (nº do catálogo 12013322)
- Placas de Petri estéreis (\varnothing 90 mm)
- Pipetas estéreis
- Espalhadores estéreis
- Sacos de pesagem estéreis

Seção 6

Precauções e Controle de qualidade

Precauções

- Respeite as boas práticas de laboratório (EN ISO 7218). Proteção adequada, como luvas e jalecos, deve ser usada ao trabalhar com bactérias vivas potencialmente infecciosas
- O meio que entrou em contato com amostras de alimentos deve ser considerado contaminado e descartado de acordo com as regras e regulamentos locais
- O desenvolvimento de produto e a validação do PIF Supplement foram realizados com água peptonada tamponada Bio-Rad para o melhor desempenho do método

Limitações de uso

Não aplicável

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 36,7 g de pó em 1 L de água destilada e misture até obter uma suspensão homogênea.
3. Aguarde 5 min e misture novamente até obter uma suspensão homogênea.
4. Aqueça delicadamente, agitando com frequência, e ferva até dissolver completamente.
5. Dispense e então autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min.
6. Resfriar o meio a 50°C . Dispense em placas de Petri e deixe na bancada para secar.
7. Um frasco de 500 g de pó produz 13,6 L de meio.

Preparação do suplemento seletivo

1. Abra o frasco do PIF Supplement e encha com 40 ml de 1:1 etanol / água destilada estéril. Homogeneíze agitando vigorosamente a fim de obter uma solução concentrada azul. A solução diluída pode ser armazenada por 1 semana à temperatura ambiente ou a $2-8^\circ\text{C}$.
2. Ao utilizar a solução concentrada, o volume pode ser facilmente adaptado ao tamanho e à razão de diluição da amostra testada, a fim de obter a concentração final correta. Por exemplo, para 375 g de amostra diluída em 1,125 L de BPW, adicione 150 μl de suplemento reconstituído.

Seção 8 Confirmação de Resultados Positivos

Tamanho da amostra, g	Volume BPW Diluição 1:4, ml	Volume do PIF Supplement, µl
50	150	20
100	300	40
300	900	120
375	1125	150

Enriquecimento da amostra

1. Dilua n g ou n ml de amostra em BPW, seguindo o protocolo apropriado.

Escopo (matrizes)	Tamanho da amostra	Enriquecimento	Certificação
Fórmula e cereais infantis com e sem probióticos e ingredientes, 30 g	30 g	n g de amostra em 9 x n ml BPW $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16–20 hr	NF VALIDATION
Fórmula e cereais infantis com e sem probióticos e ingredientes, até 375 g	50–375 g	n g de amostra em 3x n ml pré-aquecido (37°C) BPW Adicione 0,4x n µl do PIF Supplement reconstituído $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18–24 hr	NF VALIDATION

2. Uniformize com o misturador/homogeneizador.
3. Se necessário, adicione o volume apropriado de suplemento seletivo (ver acima).
4. Incube de acordo com a tabela acima.
5. Após o passo de enriquecimento, o caldo pode ser armazenado com uma temperatura entre 2–8°C por 48 hr (tamanho da amostra 30 g) ou 72 hr (tamanho da amostra 50–375 g).

Inoculação e Leitura de Meios de Cultura

1. Usando um loop estéril, estriar 10 µl de caldo de enriquecimento em RAPID'Sakazakii Agar.
2. Deixe incubar o meio de cultura a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 hr.
3. *Cronobacter* spp. forma colônias azuis a azul-esverdeadas no RAPID'Sakazakii Agar.
4. Após o passo de incubação, as placas podem ser armazenadas a 2–8°C por 72 hr.

Seção 8 Confirmação de Resultados Positivos

1. No contexto do 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 (com ou sem a etapa de purificação).

Confirmação de Resultados Positivos

- b. Usar sondas nucléicas, conforme descrito na norma ISO 7218 (por exemplo, kit iQ-Check *Cronobacter* spp. PCR em tempo real, nº do catálogo 3578137) usar colônias isoladas (com ou sem etapas de purificação).
2. Além da marcação NF Validation, use o sistema MALDI Biotyper (espectrômetro de massa MALDI-TOF e o software MBT Compass versão 4, Bruker) para testar diretamente a partir de uma colônia isolada ou após uma etapa de purificação, a fim de confirmar uma amostra como positiva.
3. No caso de resultados discordantes (presumivelmente positivos com RAPID'*Sakazakii* Agar, negativos com método de confirmação), 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 kit iQ-Check *Cronobacter* spp., protocolo certificado NF VALIDATION

1. Apenas para amostras ambientais, recolha 100 µl do BPW enriquecido e adicione a um tubo de 10 ml de mLST.
2. Incubar a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 hr.
3. Usando um loop estéril, estriar 10 µl de caldo de enriquecimento em BPW suplementado ou caldo de subcultura em mLST para amostras ambientais em RAPID'*Sakazakii* Agar.
4. Deixe incubar o meio de cultura a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 hr.
5. *Cronobacter* spp. forma colônias azuis a azul-esverdeadas no RAPID'*Sakazakii* Agar.
6. Execute uma confirmação de 1 a 5 colônias azuis a azuis-esverdeadas usando os testes convencionais descritos nos métodos das normas CEN ou ISO.

Seção 10 Desempenho e validação do teste

Certificação	Escopo	Protocolo de Validação	Protocolo de Referência	Referência de Certificado
NF VALIDATION	Fórmula e cereais infantis com e sem probióticos e ingredientes, amostras de 30 g e Fórmula e cereais infantis com e sem probióticos e ingredientes, amostras de 50 a 375 g com 1/4 de diluição	EN ISO 16140-2 (2016)	ISO 22964 (2017)	 <p>BRD 07/22 – 05/12 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA O AGRONEGÓCIO Certificado pela certificação AFNOR http://nf-validation.afnor.org/en</p>

Seção 11 Referências

Guillaume-Gentil O et al. (2005). A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *J Food Prot* 68, 64–69.

Gurtler JB et al. (2005). *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *Int J Food Microbiol* 104, 1–34.

ISO 22964:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the *Cronobacter* spp.

Iversen C et al. (2004). A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int J Food Microbiol* 96, 133–139.

Lehner A and Stephan R (2004). Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *J Food Prot* 67, 2850–2857.


Simmons BP et al. (1989). *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infec Control Hosp Epidemiol* 10, 398–401.

Seção 12 Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Março de 2020	10000127307 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Extensão da validação para amostras de tamanho grande para PIF Supplement com diluição 1:4. - Renovação da validação de acordo com a ISO 16140-2:2016 e protocolo de referência ISO 22964:2017 - Novo design de documento - Alteração do número do documento – versão anterior RAPID'Sakazakii_V3_19 maio 2016

Visite www.bio-rad.com/rapidmedia para obter 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** 85 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



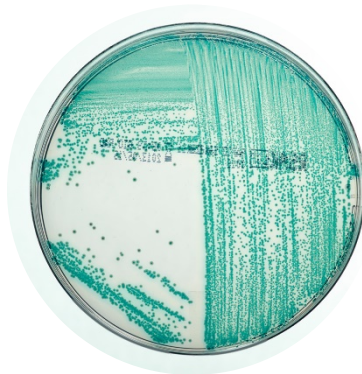
10000127307 Ver A US/EG

RAPID'*Sakazakii* Agar

Manual del usuario

Medio cromogénico selectivo usado para la detección de *Cronobacter* spp. (antes *Enterobacter sakazakii*) en leches en polvo, productos secos para la alimentación de lactantes, y también en sus materias primas y su entorno de producción

Referencia #3563971, placas preparadas, placas de 90 mm x 20
Referencia #3564976, deshidratado, 500 g



BIO-RAD

Tabla de Contenidos

Apartado 1	Introducción	1
Apartado 2	Principio de RAPID'Sakazakii	1
Apartado 3	Fórmula teórica	1
Apartado 4	Vida útil y conservación	1
Apartado 5	Materiales necesarios, no suministrados	2
	Equipamiento	2
	Consumibles	2
Apartado 6	Precauciones y control de calidad	2
Apartado 7	Protocolo	3
	Preparación del medio deshidratado	3
	Preparación del suplemento selectivo	3
	Enriquecimiento de la muestra	4
	Inoculación y lectura de la placa	4
Apartado 8	Confirmación de los resultados positivos	4
Apartado 9	Confirmación de otros métodos	5
Apartado 10	Aplicaciones del ensayo y validaciones	6
Apartado 11	Referencias	6
Apartado 12	Historial de revisiones	7

Apartado 1 Introducción

Cronobacter spp., antes denominado *Enterobacter sakazakii*, es un patógeno ubicuo que ha sido aislado de fuentes alimentarias, ambientales y clínicas. Se asocia a infecciones infantiles poco frecuentes pero mortales (la tasa de mortalidad puede alcanzar el 80%) relacionadas con el consumo de reconstituido a base de fórmula infantil en polvo. Los neonatos de menos de 4 semanas de edad (recién nacidos) y los que presentan un bajo peso al nacer o están inmunocomprometidos corren mayor riesgo debido a la elevada tasa de mortalidad. No obstante, el mayor número de casos se da en la población de edad avanzada. La resistencia del organismo a la desecación, el escaso número de células que, según se ha comprobado, causan la enfermedad y las elevadas cifras de venta de productos lácteos para bebés han obligado a las autoridades a vigilar la presencia del patógeno. Por ejemplo, un reglamento de la Unión Europea (CE 2073/2005) exige la ausencia de la bacteria en 10 g de muestra. Para cumplir con las normativas y ajustarse a los planteamientos del sistema APPCC, las industrias tienen objetivos aún más estrictos y se ven obligadas a seleccionar métodos de ensayo altamente sensibles y específicos.

Apartado 2 Principio de RAPID'Sakazakii

El principio del medio se fundamenta en la detección de la actividad enzimática de la α -glucuronidasa característica de las *Cronobacter* spp. Bajo su acción, el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolilo α -D-glucopiranosido se hidroliza, produciendo colonias de *Cronobacter* spp. de color azul a verde azulado. La temperatura de incubación está establecida en 44°C, el desoxicolato de sodio y el cloruro de metilrosanilina inhiben el crecimiento de parte de la microflora asociada.

Apartado 3 Fórmula teórica

Peptona pancreática de caseína	10,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Desoxicolato sódico	0,6 g
Cloruro de metilrosanilina	2,0 mg
5-bromo-4-cloro-3-indolilo α -D-glucopiranosido	150,0 mg
Agar	18,0 g
Agua destilada	c.s.p. 1.000 ml

pH final a 25 °C = 7,2 \pm 0,2

Apartado 4 Vida útil y conservación

- Agar deshidratado: 2–8°C en un paquete cuidadosamente sellado, en un lugar seco y oscuro
- Placas de agar preparadas: 2–8°C en un lugar oscuro
- Placa preparada desde agar deshidratado: 15 días a 2–8°C en un paquete cuidadosamente sellado, en un lugar seco y oscuro

Apartado 5

Materiales necesarios, no suministrados

Equipamiento

- Todo el instrumental de laboratorio habitual
- Placa calefactada
- Balanza, sensibilidad de 0,1 g
- Agitador/homogeneizador
- Incubadora o sala de incubación controlada termostáticamente, con una precisión de ± 1 °C
- Baño termostático

Fungibles

- Medio de enriquecimiento: agua de peptona tamponada (APT), (por ejemplo, referencia #3554179, 225 ml x 6 frascos; 3564684, 500 g; 3564686, 5 kg; 3555790, 5 L x 2 bolsas; 3555795, 3 L x 4 bolsas)
- Asas de siembra
- PIF Supplement para co-enriquecimiento de *Cronobacter* y *Salmonella* (referencia #12013322)
- Placas de Petri estériles (\varnothing 90 mm)
- Pipetas estériles
- Esparcidores estériles
- Bolsas estériles para pesada

Apartado 6

Precauciones y control de calidad

Precauciones

- Deben respetarse las buenas prácticas de laboratorio (EN ISO 7218). Usar protección adecuada, como guantes y batas de laboratorio, cuando se trabaja con bacterias vivas potencialmente infecciosas
- 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
- El desarrollo del producto y la validación del PIF Supplement se han realizado con el agua de peptona tamponada de Bio-Rad para un rendimiento óptimo del método

Limitaciones de uso

No aplicable

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. Asimismo, se mantiene un registro de toda la documentación relativa a la producción y el control de calidad de cada lote
- Para información de seguridad del 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 36,7 g de polvo en 1 L de agua destilada y mezclar hasta obtener una suspensión homogénea.
3. Esperar 5 minutos y mezclar de nuevo hasta obtener una suspensión homogénea.
4. Calentar suavemente, agitando frecuentemente, y hervir hasta que se disuelva completamente.
5. Dispensar y esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min.
6. Enfriar el medio a 50°C . Dispensar en placas de Petri y dejar en una superficie nivelada para que se seque.
7. Un frasco de 500 g de polvo permite obtener 13,6 L de medio.

Preparación del suplemento selectivo

1. Abra el frasco de PIF supplement y llene con 40 ml de solución 1:1 de etanol/agua destilada estéril. Homogeneice agitando enérgicamente para obtener una solución concentrada azul. La solución diluida puede conservarse durante 1 semana a temperatura ambiente o a $2-8^\circ\text{C}$.
2. Cuando se utiliza la solución concentrada, el volumen puede adaptarse fácilmente al tamaño y al ratio de dilución de la muestra analizada y así obtener la concentración final adecuada. Por ejemplo, para 375 g de muestra diluida en 1,125 L de APT, añada 150 μl de suplemento reconstituido.

Apartado 8 Confirmación de los resultados positivos

Tamaño de muestra, g	Volumen de APT dilución 1:4, ml	Volumen de PIF supplement, µl
50	150	20
100	300	40
300	900	120
375	1125	150

Enriquecimiento de la muestra

1. Diluya n g o n ml de muestra en APT siguiendo el protocolo correspondiente.

Alcance (matrices)	Tamaño de la muestra	Enriquecimiento	Certificación
Fórmula infantil y cereales infantiles con y sin probióticos e ingredientes, 30 g	30 g	n g de muestra en $9 \times n$ ml de APT $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 16–20 hr	NF VALIDATION
Fórmula infantil y cereales infantiles con y sin probióticos e ingredientes, hasta 375 g	50–375 g	n g de muestra en $3 \times n$ ml de APT precalentada (37°C) Añada $0,4 \times n$ µl de PIF supplement reconstituido $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18–24 hr	NF VALIDATION

2. Homogeneizar con agitador/homogeneizador.
3. En caso necesario, añadir el volumen apropiado de suplemento selectivo (ver arriba).
4. Incubar conforme a la tabla anterior.
5. Tras la fase de enriquecimiento, el caldo se puede conservar a $2-8^\circ\text{C}$ durante 48 hr (30 g de tamaño de muestra) o 72 hr (50–375 g de tamaño de muestra).

Inoculación y lectura de la placa

1. Usando un asa estéril, aísle 10 µl de caldo de enriquecimiento en RAPID'Sakazakii Agar.
2. Incube la placa a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 hr.
3. *Cronobacter* spp. forman colonias de color azul a azul-verde en RAPID'Sakazakii Agar.
4. Tras la etapa de incubación, las placas pueden almacenarse a $2-8^\circ\text{C}$ durante 72 hr.

Apartado 8

Confirmación de los resultados positivos

1. En el contexto de 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 (con o sin fase de purificación).

Confirmación de los resultados positivos

- b. Utilizando sondas nucleicas como se describe en la norma ISO 7218 (por ejemplo, iQ-Check *Cronobacter* spp. Real-Time PCR Kit, referencia #3578137) sobre colonias aisladas (con o sin fase de purificación).
2. Fuera del alcance NF Validation, utilice el ensayo MALDI Biotyper (Byotiper system de Bruker incluye un espectrómetro de masas MALDI time-of-flight y el software MBT Compass version 4 directamente de una colonia aislada o tras una fase de purificación para confirmar que una muestra es positiva.
3. En caso de producirse resultados discordantes (supuestos positivos con RAPID'*Sakazakii* Agar, negativos con el método de confirmación), 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 el iQ-Check *Cronobacter* spp. Kit (protocolo certificado NF VALIDATION)

1. Solo para muestras ambientales, tome 100 µl de APT enriquecida y añada a un tubo de 10 ml mLST.
2. Incube la placa a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 hr.

Usando un asa estéril, siembre por aislamiento en RAPID'*Sakazakii* Agar 10 µl de caldo de enriquecimiento de APT suplementada o de subcultivo de caldo en mLST para muestras ambientales.
3. Incube la placa a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 hr.
4. *Cronobacter* spp. forman colonias de color azul a azul-verdoso en RAPID'*Sakazakii* Agar.
5. Lleve a cabo una confirmación de 1 a 5 colonias de color azul a azul-verdoso empleando las pruebas convencionales descritas en los métodos normalizados CEN o ISO.

Apartado 10 Aplicaciones del ensayo y validaciones

Certificación	Alcance	Protocolo de validación	Protocolo de referencia	Referencia de certificado
NF VALIDATION	Fórmula infantil y cereales infantiles con y sin probióticos e ingredientes, muestras de 30 g y Fórmula infantil y cereales infantiles con y sin probióticos e ingredientes, muestras de 50 a 375 g con dilución 1/4	EN ISO 16140-2 (2016)	ISO 22964 (2017)	 <p>BRD 07/22 – 05/12 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA LA AGROINDUSTRIA Certificado mediante certificación AFNOR http://nf-validation.afnor.org/en</p>

Apartado 11 Referencias

Guillaume-Gentil O et al. (2005). A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *J Food Prot* 68, 64–69.

Gurtler JB et al. (2005). *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *Int J Food Microbiol* 104, 1–34.

ISO 22964:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the *Cronobacter* spp.

Iversen C et al. (2004). A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int J Food Microbiol* 96, 133–139.

Lehner A and Stephan R (2004). Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *J Food Prot* 67, 2850–2857.

Simmons BP et al. (1989). *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infec Control Hosp Epidemiol* 10, 398–401.

Apartado 12 Historial de revisiones

Fecha de publicación	N.º de documento	Cambio
Marzo de 2020	10000127307 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> - Ampliación de la validación para el tamaño de muestra elevado para el PIF Supplement con dilución 1:4. - Renovación de la validación según la norma ISO 16140-2:2016 y el protocolo de referencia ISO 22964:2017 - Nuevo diseño del documento - Cambio en el número de documento - versión anterior RAPID'Sakazakii_V3_19 mayo 2016

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



10000127307 Ver A US/EG