
BOUILLON TRYPTO-CASEINE SOJA MODIFIE (MTSB)

DETECTION DES *ESCHERICHIA COLI* O157

1 DOMAINE D'UTILISATION

Le bouillon Trypto-caséine soja modifié (mTSB) est un milieu d'enrichissement utilisé pour la recherche des sérotypes pathogènes d'*Escherichia coli*, notamment le sérotype O157 dans les produits alimentaires et tous les prélèvements d'origine animale susceptibles d'en contenir.

La formule-type du bouillon répond à la composition définie dans la norme ISO 16654.

2 HISTORIQUE

Le sérotype O157 d'*Escherichia coli* est un sérotype pathogène, identifié pour la première fois en 1982, comme agent responsable de colites hémorragiques. L'alimentation d'origine animale est la source principale de contamination humaine. La viande de bœuf, de porc, les volailles et certains produits laitiers non pasteurisés ont été incriminés dans les toxi-infections à *Escherichia coli* O157. Ce microorganisme a également été isolé à partir de pommes de terre, de cidre et d'eau du robinet.

De nombreux auteurs ont utilisé avec succès le bouillon Trypto-caséine soja modifié pour l'enrichissement sélectif d'*Escherichia coli* O157. La formule de base du milieu est celle du bouillon Trypto-caséine soja, modifiée par l'adjonction de 1,5 g/L de phosphate dipotassique et de 1,5 g/L de sels biliaries. En 1987, Doyle *et al.* ont préconisé l'addition de 20 mg/L de Novobiocine pour renforcer la sélectivité du milieu et augmenter le taux de détection d'*Escherichia coli* O157.

3 PRINCIPES

La base nutritive du bouillon Trypto-caséine soja, constituée par l'association entre la Tryptone, la peptone papaïnique de soja et le glucose, permet d'obtenir une croissance optimale d'*Escherichia coli* O157.

La présence simultanée de sels biliaries et de novobiocine assure l'inhibition des microorganismes à Gram positif ainsi que de certains à Gram négatif, notamment les *Proteus*.

Le phosphate dipotassique agit comme substance tampon. En maintenant le pH, il permet d'augmenter la capacité de récupération du bouillon.

4 FORMULE-TYPE

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Pour 1 litre de milieu complet :

- Tryptone	17,0 g
- Peptone papaïnique de soja	3,0 g
- Glucose	2,5 g
- Sels biliaries n°3.....	1,5 g
- Chlorure de sodium.....	5,0 g
- Phosphate dipotassique.....	4,0 g
- Novobiocine	20,0 mg

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,4 ± 0,2.

Pour 33 g de base déshydratée BK150

- Tryptone	17,0 g
- Peptone papainique de soja.....	3,0 g
- Glucose	2,5 g
- Sels biliaires n°3.....	1,5 g
- Chlorure de sodium	5,0 g
- Phosphate dipotassique	4,0 g

Pour un flacon de supplément BS056

- Novobiocine.....	40 mg
--------------------	-------

Pour un flacon de supplément BS033

- Novobiocine.....	10 mg
--------------------	-------

5 PREPARATION

- Mettre en solution 33,0 g de milieu déshydraté (BK150) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement jusqu'à dissolution complète.
- Répartir à raison de 90 mL ou 225 mL par flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir à température ambiante.

- Reconstituer le supplément Novobiocine 40 mg (BS056) avec 20 mL d'eau stérile ou le supplément Novobiocine 10 mg (BS033) avec 5 mL.
- Agiter ou vortexer de façon à assurer une dissolution complète, tout en évitant la formation de mousse.

- Ajouter stérilement 2,25 mL de supplément sélectif reconstitué par flacon de 225 mL ou 0,9 mL par flacon de 90 mL.
- Homogénéiser parfaitement

✓ **Reconstitution :**
33,0 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

✓ **Réhydratation supplém.**
20 mL eau stérile BS056
5 mL eau stérile BS033

✓ **Ajout base :**
2,25 mL / 225 mL

6 MODE D'EMPLOI

- Introduire aseptiquement x g de produit par flacon de 9x mL de bouillon.
- Homogénéiser parfaitement.
- Incuber à 41,5 ± 1 °C pendant 6 h puis de nouveau pendant 12 à 18 h.

✓ **Ensemencement :**
Au 1/10^{ème}

✓ **Incubation :**
6 à 24 h à 41.5°C

7 LECTURE

- Après 6 heures d'incubation, prélever stérilement un aliquot de la culture et réaliser une séparation immunomagnétique, suivie d'un isolement sur gélose CT-SMAC (BK150).
- Prolonger l'incubation de 12 à 18 heures supplémentaires. Réaliser une nouvelle séparation immunomagnétique, suivie d'un isolement sur gélose CT-SMAC

8 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté : poudre crème, fluide et homogène.

Suppléments Novobiocine : lyophilisat blanc, donnant après reconstitution une solution incolore, limpide.

Milieu préparé (complet) : solution ambrée, limpide.

Réponse culturale après 24 heures d'incubation à 41,5 °C, puis subculture sur gélose CT-SMAC:

Microorganismes		Croissance
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	WDCM 00014	> 10 colonies caractéristiques
+ <i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	
+ <i>Proteus mirabilis</i>	WDCM 00023	
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	NCTC 13126	> 10 colonies caractéristiques
+ <i>Enterobacter aerogenes</i>	WDCM 00175	
+ <i>Staphylococcus aureus</i>	WDCM 00034	
<i>Staphylococcus aureus</i>	WDCM 00034	Inhibée
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	Inhibée

9 CONSERVATION

Milieu de base déshydraté : 2-30 °C.

Suppléments sélectifs Novobiocine : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Supplément Novobiocine réhydraté (*) : 30 jours à 2-8 °C

Milieu de base préparé en flacons (*) : 180 jours à 2-8 °C

Milieu complet préparé en flacons (*) : 30 jours à 2-8 °C.

(*) Valeur indicative déterminée dans les conditions standards de préparation, suivant les instructions du fabricant.

10 PRESENTATION

Milieu de base déshydraté (sans Novobiocine) :

Flacon de 500 g BK150HA

Supplément sélectif Novobiocine :

Coffret de 8 flacons de 40 mg..... BS05608

Coffret de 10 flacons de 10 mg..... BS03308

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Doyle, M.P., and J.L. Schoeni. 1987. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. Appl. Environ. Microbiol. 53: 2394-2396.

Feldsine, P.T., M.T. Falbo-Nelson, S.L. Brunelle, and R.L. Forgey. 1997. Assurance Enzyme Immunoassay for the Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Selected Foods: Collaborative Study. Journal of AOAC International. 80: 530-543.

NF EN ISO 16654. Juillet 2001. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche des *Escherichia coli* O157.

12 AUTRES INFORMATIONS

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document et sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

Code document : BOUILLON TSB MODIFIE_FR_V6.

Date création : 09-2001

Date de révision : 09-2018

Motif de révision : Mise à jour reconstitution du supplément.