

ÉTUDES DE VALIDATION DE L'EASYSPIRAL® / EASYSPIRAL PRO®

Appareils : *easySpiral*® / *easySpiral Pro*®

1. Validation de l'ensemencement *easySpiral*® / *easySpiral Pro*® en mode exponentiel décroissant

Objectif :

Étudier la fiabilité de l'ensemencement de l'*easySpiral*® / *easySpiral Pro*® en mode exponentiel décroissant (dite **technique d'ensemencement Spiral**®) en procédant à une étude comparative avec la technique de référence « ensemencement manuel en surface » (dite technique classique).

Matériels et techniques :

Cinq souches bactériennes (trois de gram + et deux de gram -) sont testées : *Lactobacillus casei* var. *rhannosus*, *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 8739) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027).

Les cultures bactériennes sont diluées dans l'eau peptonée tamponnée, puis ensemencées sur des boîtes de Petri gélosées (90 mm) en utilisant la technique classique et **Spiral**® (50 µL en mode exponentiel). Après 48 h d'incubation à 37 °C (±1) sur MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) pour *Lactobacillus casei* et 18 h (±2) à 37 °C (±1) sur PCA (Plate Count Agar) pour *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et sur Macconkey pour *Escherichia coli*, le dénombrement est effectué par un compteur automatique de colonies (**Scan**® 1200).

Analyse des résultats :

Les dénombrements sont exprimés en Log UFC/mL (Unité Formant Colonie) et une analyse de régression est réalisée afin d'évaluer la corrélation entre la technique d'ensemencement **Spiral**® avec l'*easySpiral Pro*® et la technique classique d'ensemencement.

Résultats :

- *Bacillus Cereus* :

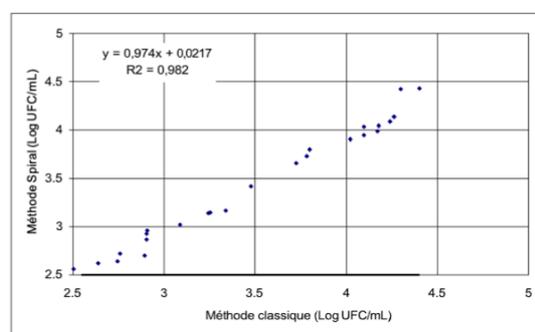


Figure 1 : Droite de corrélation entre le dénombrement de *Bacillus cereus* (en Log UFC/mL) obtenu par ensemencement avec la technique **Spiral**® et classique.

- *Bacillus subtilis* :

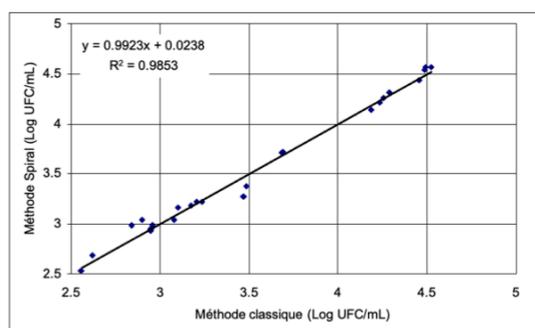


Figure 2 : Droite de corrélation entre le dénombrement de *Bacillus subtilis* (en Log UFC/mL) obtenu par ensemencement avec la technique **Spiral**® et classique.

- *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* :

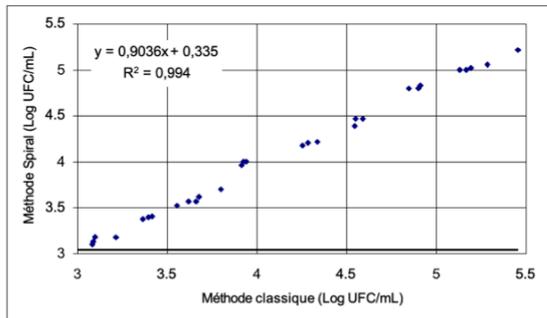


Figure 3 : Droite de corrélation entre le dénombrement de *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* (en Log UFC/mL) obtenu par ensemencement avec la technique d'ensemencement Spiral® et classique.

- *Escherichia coli* :

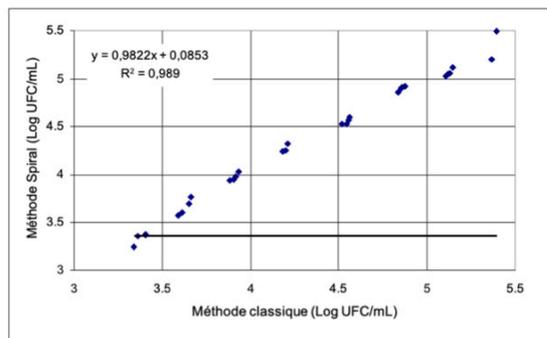


Figure 4 : Droite de corrélation entre le dénombrement d'*Escherichia coli* (en Log UFC/mL) obtenu par ensemencement avec la technique Spiral® et classique.

- *Pseudomonas aeruginosa* :

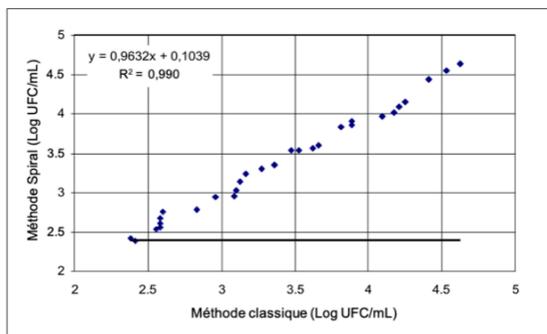


Figure 5 : Droite de corrélation entre le dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* (en Log UFC/mL) obtenu par ensemencement avec la technique Spiral® et classique.

Conclusion :

Nos résultats montrent une forte corrélation ($R^2 \geq 0,982$) entre l'ensemencement en mode **Spiral** par l'**easySpiral**® et la méthode classique. Aussi la moyenne de la différence des logs UFC/mL entre les deux méthodes est 12 fois inférieure à l'écart maximal (0,5 log) autorisé par la norme AFNOR NF V 08/100, donc non significative.

2. Efficacité du nettoyage de l'**easySpiral**® / **easySpiral Pro**®

Objectif :

Assurer un nettoyage du stilet de l'**easySpiral**® / **easySpiral Pro**® entre chaque série d'échantillon. Vérifier l'efficacité de la désinfection du stilet par ensemencement de diluant stérile.

Principe de l'étude :

- Contamination du stilet de l'**easySpiral**® / **easySpiral Pro**® par un échantillon bactérien de concentration élevée ($C = 10^5 - 10^7$ UFC/mL).
- Nettoyage du stilet avec un produit désinfectant en utilisant le mode de nettoyage "normal" ou le mode "long" (disponible uniquement sur l'**easySpiral Pro**®) de l'ensemencement.
- Vérification de l'efficacité du nettoyage avec l'ensemencement de diluant stérile (ex : un tampon phosphate salin, PBS) sur une gélose non sélective (ex : TSA, Tryptone Soya Agar) et incubation à 37 °C (± 1 °C) pendant 48h (± 2 h).

Souches bactériennes :

Escherichia coli ATCC 25922,
Staphylococcus aureus ATCC 9144,
Listeria monocytogenes ATCC 13932,
Salmonella typhimurium ATCC 14028,
Pseudomonas aeruginosa WDCM 00027,
Bacillus subtilis ATCC 6633.

Désinfectants :

Éthanol 70 %

Javel 1 %

H₂O₂ 3 % + APA 0,08 % (solution de peroxyde d'hydrogène 3 % + acide peracétique 0,08 %).

Résultats :

Les concentrations des suspensions bactériennes utilisées pour "contaminer" le stilet varient de 10⁵ à 6,6 x10⁷ UFC/mL.

L'ensemencement de diluant stérile après un cycle "prélèvement de suspension bactérienne/nettoyage" montre qu'aucune colonie n'est observée sur les boîtes de Petri (cf. tableau ci-dessous) et ceci quel que soit le mode de nettoyage utilisé.

Souche bactérienne	[bactéries] dans la suspension (UFC/mL)	Désinfectant	Nombre d'UFC après nettoyage	
			Mode normal	Mode long*
<i>Escherichia coli</i>	5,5 x10 ⁷	Ethanol 70 %	0	0
		Javel 1 %	0	0
		H ₂ O ₂ 3 % + APA 0,08 %	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	3,3 x10 ⁶	Ethanol 70 %	0	0
		Javel 1 %	0	0
		H ₂ O ₂ 3 % + APA 0,08 %	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	5,0 x10 ⁶	Ethanol 70 %	0	0
		Javel 1 %	0	0
		H ₂ O ₂ 3 % + APA 0,08 %	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,6 x10 ⁷	Ethanol 70 %	0	0
		Javel 1 %	0	0
		H ₂ O ₂ 3 % + APA 0,08 %	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,3 x10 ⁶	Ethanol 70 %	0	0
		Javel 1 %	0	0
		H ₂ O ₂ 3 % + APA 0,08 %	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	1,0 x10 ⁵	Ethanol 70 %	0	0
		Javel 1 %	0	0
		H ₂ O ₂ 3 % + APA 0,08 %	0	0

* Disponible uniquement sur l'easySpiral Pro®

Efficacité de désinfection du stilet en fonction du mode de nettoyage sélectionné "normal" ou "long" et du désinfectant utilisé (3 répétitions pour chaque test).

Conclusions :

L'étude montre que pour les six souches bactériennes, le nettoyage en mode long ou en mode court permet une désinfection du stilet et évite les contaminations entre les échantillons.

Trois produits désinfectants ont été testés : l'éthanol 70 %, la javel 1 % et une formulation à base de peroxyde d'hydrogène (3 %) + acide peracétique (0,08 %).

D'autres formulations avec des concentrations légèrement différentes en H₂O₂ et APA peuvent être également efficaces. Dans ce cas, il revient au client d'effectuer les tests pour vérifier l'efficacité de nettoyage du stilet avec le produit et l'absence de contamination.

Il est recommandé d'ensemencer une boîte de Petri avec du diluant stérile avant et après chaque série d'échantillons pour vérifier la stérilité du stilet.