

RAPID' *E.coli* 2 Supplément (pour le contrôle des eaux)

355-5298

DOMAINE D'APPLICATION

Le RAPID' *E.coli* 2 supplément pour le contrôle des eaux s'utilise avec le milieu chromogénique RAPID' *E.coli* 2. Le milieu complet permet le dénombrement direct (sans confirmation) et simultané, des *Escherichia coli* et des coliformes totaux, par méthode de filtration sur membrane. Il s'avère particulièrement adapté pour le contrôle des eaux de consommation humaine, notamment les eaux non traitées (telles que les eaux de puits, lacs et rivières), qui présentent une flore hydrique interférante abondante, pour lesquelles les milieux normalisés sont mal adaptés.

CERTIFICATION AFNOR selon le protocole AFNOR Rev 1

La méthode RAPID' *E.coli* 2 complet pour le contrôle des eaux est certifiée AFNOR Validation comme méthode alternative à la norme EN ISO 9308-1, pour le dénombrement des *Escherichia coli* et des Coliformes totaux à 36°C **dans les eaux à faible teneur en MES, dont les eaux de réseau et les eaux embouteillées**, selon le Référentiel de validation « Protocole de Validation d'une méthode alternative commerciale par rapport à une méthode de référence (révision 1) » (adopté par AFNOR Certification le 10/05/2010), sous le n° d'attestation : **BRD 07/20 - 03/11**.

La date de fin de validité de l'attestation est :
03/2015



BRD 07/20 - 03/11
Méthodes d'analyse de l'eau
Performances analytiques certifiées
www.afnor-validation.org

PRINCIPE

Le principe du milieu complet (RAPID' *E.coli* 2 supplémenté) repose sur la détection simultanée de deux activités enzymatiques: la β -D-glucuronidase (GLUC) et la β -D-galactosidase (GAL), par deux substrats chromogéniques :

- le clivage du substrat spécifique de la GAL conduit à la formation d'un précipité donnant une coloration verte aux colonies positives pour cette enzyme (Coliformes),

- le clivage du substrat spécifique de la GLUC conduit à la formation d'un précipité donnant une coloration rose aux colonies positives pour cette enzyme (*E. coli*).

Les coliformes (GAL+/GLUC-) forment des colonies vertes, les *E. coli* (GAL+/GLUC+) forment des colonies bleu-foncé à violette en raison de la superposition des deux couleurs.

Le milieu complet est rendu inhibiteur vis-à-vis de la flore interférante très importante dans l'eau, par le mélange sélectif contenu dans le supplément.

PRESENTATION

- **Supplément RAPID' *E.coli* 2 (lyophilisé)**
Coffret de 6 ampoules **code 355-5298**
(1 ampoule contient une quantité de lyophilisat suffisante pour 1 flacon de 100 ml de milieu RAPID' *E.coli* 2)

- **RAPID' *E.coli* 2 Kit (pour le Contrôle des eaux)** **code 355-5296**

Pack incluant :

- 6 flacons x 100 ml de milieu RAPID' *E.coli* 2
- 1 coffret de 6 ampoules
(1 ampoule q.s.p. 1 flacon de 100 ml de milieu RAPID' *E.coli* 2)

- **RAPID' *E.coli* 2 Agar**
55 mm x 20 boîtes **code 356-3982**

CONSERVATION/VALIDITE/LOT

- Lyophilisé : +2-8°C et à l'abri de la lumière
- Ampoule réhydratée : 7 jours à +2-8°C et à l'abri de la lumière
- La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

FORMULE THEORIQUE
RAPID' *E.coli* 2 Supplément
Mélange sélectif lyophilisé

AUTRE(S) PRODUIT(S) NECESSAIRE(S) NON FOURNI(S)

- Eau distillée stérile
- RAPID'E.coli 2/Gélose
6 flacons de 100 ml (code 355-5299)
Voir Fiche Technique correspondante.

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI (liste non exhaustive)

- Agitateur-homogénéisateur
- Pipettes stériles (1 ml, 5 ml...)

REHYDRATATION DU SUPPLÉMENT RAPID'E.coli 2

Reprendre le lyophilisat en ajoutant aseptiquement **1,1 ml d'eau distillée stérile** dans l'ampoule. Agiter jusqu'à dissolution complète du lyophilisat.

PREPARATION DU MILIEU COMPLET (Milieu RAPID'E.coli 2 + Supplément)

A l'aide d'une pipette ou d'une seringue, ajouter stérilement 1,0 ml de supplément réhydraté (ou décongelé) à 100 ml de gélose stérile RAPID'E.coli 2 refroidie et maintenue à $47 \pm 2^\circ\text{C}$ (= milieu complet).

NB : Il reste volontairement 0,1 ml de supplément réhydraté dans le fond de l'ampoule.

Agiter de façon à bien homogénéiser l'ensemble. Couler 8 à 10 ml de milieu complet par boîte de Petri stérile (55 mm). Laisser solidifier sur une surface fraîche et horizontale.

1 ampoule de supplément RAPID'E.coli 2 réhydraté permet de compléter 100 ml de milieu RAPID'E.coli 2.

PROTOCOLE

• Préparation des échantillons

A effectuer conformément à la norme du produit.

• Ensemencement et incubation

Après filtration de 100 ml d'échantillon d'eau à analyser (ou plus selon l'origine), la membrane est déposée à la surface de la gélose, face quadrillée vers le haut.

Retourner les boîtes et incuber à **la seule température de $36 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 21 ± 3 h** (pour le dénombrement d'E.coli et des Coliformes totaux).

LECTURE ET INTERPRETATION

• Comptage des colonies (UFC)

Après incubation, effectuer la lecture des boîtes par le dessus de la membrane et procéder au comptage des colonies caractéristiques :

- Coliformes (autres qu'E.coli) = GAL(+) colonies vertes,

- E.coli = variabilité d'apparence :

- bleues foncées à violettes = GLUC(+)
- gris-bleues = GLUC(+ faible)
- possible halo violet autour des colonies.

Escherichia coli étant une espèce appartenant au groupe des coliformes, le dénombrement des coliformes totaux s'obtient en faisant la somme des colonies bleu et bleu foncé à violet, et des colonies vertes.

NB : Ne retenir que les boîtes contenant moins de 50 colonies caractéristiques et moins de 100 colonies au total.

• Expression des résultats/Calculs

Reporter le nombre d'E.coli et/ou de coliformes totaux par unité de volume d'échantillon filtré.

LIMITES D'UTILISATION

Les matériaux de référence microbiologiques quantitatifs certifiés (capsules, lenticules et pastilles) sont fréquemment utilisés dans le cadre des contrôles qualité internes ou contrôles inter-laboratoires, afin de contrôler et valider les performances culturelles des milieux de culture.

Selon le mode de fabrication, certaines souches de collection peuvent présenter des difficultés de croissance liées au stress physiologique des cellules, qui ne remettent cependant pas en cause les performances de fertilité du milieu de culture utilisé. Certaines souches de collection E.coli et autres coliformes présentées en Pastilles Bio-Référence (Institut Pasteur, France) peuvent ainsi présenter des rendements plus faibles (RR < 66%) sur le milieu RAPID'E.coli 2 supplémenté.

Aussi, pour garantir l'intégrité physiologique des cellules, il est recommandé de préparer une suspension fraîche calibrée à partir d'une souche relancée en milieu nutritif. L'utilisation de tout autre matériel de référence commercialisé demeure cependant possible.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Éviter d'enfermer des bulles d'air en dessous de la membrane lors de son dépôt sur la gélose. Si nécessaire, aplatir doucement et avec précaution la membrane avec la pince.

- Respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

PERFORMANCES/CONTROLE QUALITE DU TEST

Les performances culturales sont contrôlées à l'aide des souches suivantes :

| SOUCHES | Résultats après 18-24 hrs d'incubation à 36°C | |
|---|---|-------------------------|
| | CROISSANCE | COULEUR |
| <i>Escherichia coli</i> * RIVM WR1** | + | Violet avec halo violet |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | Inhibition | NA |

* Rendement de fertilité : R = [66% - 150%]

** RIVM WR1 est équivalente à NCTC 13167

NA :Non Applicable

CONTROLE QUALITE DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot du produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et il n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation.

La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée.

MOTS CLES

RAPID' *E.coli* 2 / Supplément / *Escherichia coli* / Coliformes / Eaux / Dénombrement / Chromogène / Bêta-D-glucuronidase / Bêta-D-galactosidase / Filtration / Milieu.