

RAPID' *E. coli* 2/Gélose

355-5299
355-5297
356-4024

DOMAINE D'APPLICATION

Milieu **chromogénique** sélectif pour dénombrer directement (sans confirmation des colonies) les *Escherichia coli* et les autres *coliformes* dans les produits destinés à l'alimentation humaine et animale (*Technique en profondeur*), et dans les eaux (*Technique de filtration sur membrane, voir Fiche Technique correspondante*)

Remarque : Dans le cadre de la marque NF Validation seuls les produits destinés à l'alimentation humaine sont concernés.

NF VALIDATION par AFNOR CERTIFICATION selon le protocole EN ISO 16140

La méthode RAPID' *E. coli* 2 (Dénombrement des *E. coli* à 44°C) est certifiée NF VALIDATION comme méthode alternative à la norme NF ISO 16649-2 pour le dénombrement des *Escherichia coli* β-Glucuronidase positives à 44°C pour **tous produits d'alimentation humaine**, selon le protocole ISO 16140.



BRD 07/1 - 07/93
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSES POUR
L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFNOR Certification
www.afnor-validation.com

La méthode Rapid' *E. coli* 2 (Dénombrement des *E. coli* à 37°C) est certifiée NF VALIDATION comme méthode alternative à la norme NF ISO 16649-2 pour le dénombrement des *Escherichia coli* β-Glucuronidase positives à 37°C pour **tous produits d'alimentation humaine**, selon le protocole ISO 16140.



BRD 07/7 - 12/04
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSES POUR
L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFNOR Certification
www.afnor-validation.com

La méthode Rapid' *E. coli* 2 (Dénombrement des *coliformes* à 37°C) est certifiée NF VALIDATION comme méthode alternative à la norme NF ISO 4832 pour le dénombrement des *coliformes* pour **tous produits d'alimentation humaine**, selon le protocole ISO 16140.



BRD 07/8 - 12/04
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSES POUR
L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFNOR Certification
www.afnor-validation.com

- Pour toute information concernant la fin de validité de la certification NF VALIDATION, consulter les attestations BRD 07/1 - 07/93, BRD 07/7 - 12/04 et BRD 07/8 - 12/04 disponibles auprès de votre représentant Bio-Rad ou d'AFNOR Certification.

VALIDATION NordVal

La méthode Rapid' *E. coli* 2 (Dénombrement des *E. coli* à 44°C) est validée **NordVal** comme méthode alternative à la norme NF ISO 16649-2 pour le dénombrement des *Escherichia coli* β-Glucuronidase positives à 44°C pour **tous produits d'alimentation humaine et animale**, selon le protocole ISO 16140.

La méthode Rapid' *E. coli* 2 (Dénombrement des *E. coli* à 37°C) est validée **NordVal** comme méthode alternative à la norme NF ISO 16649-2 pour le dénombrement des *Escherichia coli* β-Glucuronidase positives à 37°C pour **tous produits d'alimentation humaine et animale**, selon le protocole ISO 16140.

La méthode Rapid' *E. coli* 2 (Dénombrement des *coliformes* à 37°C) est validée **NordVal** comme méthode alternative à la norme NF ISO 4832 pour le dénombrement des *coliformes* pour **tous produits d'alimentation humaine et animale**, selon le protocole ISO 16140

RAPID' *E. coli* 2/Gélose

VALIDATION AOAC-RI

RAPID' *E.coli* 2 est validé AOAC Research Institute selon le protocole « Performance Methods Tested », sous le n° d'attestation : 050601.

REFERENCE(S) NORMATIVE(S)

• MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS

• NF ISO 16649-2 (juillet 2001) :

Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β-glucuronidase positive.

Partie 2 : Technique de comptage des colonies à 44°C au moyen d'acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronate (IC : V08-031-2).

• **NF ISO 4832 (juillet 1991)**: Microbiologie - directives générales pour le dénombrement des coliformes - Méthode par comptage des colonies (IC : V08-015)

PRINCIPE

Le principe du milieu repose sur la mise en évidence simultanée de deux activités enzymatiques : la Bêta-D-Glucuronidase (GLUC) et la Bêta-D-Galactosidase (GAL). Le milieu contient deux substrats chromogéniques :

• un substrat spécifique de la GAL qui entraîne la coloration bleue des colonies positives pour cette enzyme.

• un substrat spécifique de la GLUC qui entraîne la coloration rose des colonies positives pour cette enzyme.

Les *E.coli* (GAL+/GLUC+) forment des **colonies violettes à roses**, les **coliformes** autres que *E.coli* (GAL+/GLUC-) forment des **colonies bleues**.

La détection de la GLUC confère une haute spécificité au milieu de culture. En effet, *Escherichia coli* est une des seules espèces d'entérobactéries à posséder cette enzyme.

Rq:

- Il existe quelques souches d'*E.coli* β-D glucuronidase négatives, par exemple *E.coli* O157.

- Quelques sérovars de *Salmonella* et quelques espèces de *Shigella* possèdent l'enzyme β-D-glucuronidase (< 1,5%).

PRESENTATION

• Prêt à l'emploi

100 ml x 6 flacons

200 ml x 6 flacons

code 355-5299

code 355-5297

• Déshydraté

500 g

code 356-4024

CONSERVATION/VALIDITE/LOT

- Prêt à l'emploi : + 2 - 8 °C et à l'obscurité.
- Déshydraté : + 15 - 25 °C, flacon soigneusement fermé dans un endroit frais, sec et à l'obscurité.
- La date de péremption et le numéro du lot sont indiqués sur le conditionnement.
- Milieu préparé par l'utilisateur à partir du milieu sec: 1 mois à + 2 - 8 °C et à l'obscurité.

FORMULE THEORIQUE

Peptones	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Extrait de levure	3 g
Mélange sélectif chromogénique	6 g
Agar	13 g
Eau distillée	1000 ml
pH (25°C) final = 7,2 ± 0,2	

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

- Supplément REC 2 (lyophilisé) en coffret de 6 ampoules : 1 ampoule en quantité suffisante pour 100 ml de milieu REC 2 (pour utilisation **uniquement dans les eaux** - code 355-5298)
 - Diluant(s)
 - Eau distillée
- Voir Fiche(s) Technique(s) correspondante(s)*

MATERIEL NECESSAIRE (NON FOURNI) (liste non exhaustive)

- Balance
- Sacs de pesée stériles
- Broyeur
- Agitateur - homogénéisateur
- Flacons de 125 ml avec bouchons autoclavables
- Pipettes stériles (1 ml,...)
- Boîtes de Pétri stériles (Ø = 55 mm et 90 mm)
- Bain-marie avec une précision de ± 1 °C
- Etuves ou enceintes thermostatées avec une précision de ± 1 °C
- Autoclave
- Tout matériel courant d'un laboratoire

PREPARATION DU MILIEU DESHYDRATE

Toujours agiter avant chaque utilisation

Dissoudre 37 grammes de poudre dans un litre d'eau distillée. Attendre 5 minutes, puis mélanger jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. Chauffer lentement, en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à complète dissolution. Répartir, puis stériliser à l'autoclave à 121°C (± 1°C) pendant 15 minutes.

Taux de reconstitution : 37 g/l
500 grammes de poudre permettent de reconstituer 13,5 litres de milieu.

RAPID'E. coli 2/Gélose

PROTOCOLLE

• Préparation des échantillons

A effectuer conformément à la norme du produit concerné.

• Ensemencement

Produits alimentaires

- Transférer, à l'aide de pipettes stériles, 1 ml de l'échantillon à analyser (produit liquide) ou 1 ml de la suspension mère (autres produits) et/ou 1 ml de ses dilutions décimales dans les boîtes de Pétri stériles ($\varnothing = 90$ mm).
- Couler rapidement une quantité d'environ 15 ml du milieu préalablement fondu et refroidi à 44 - 47°C.
- Homogénéiser.
- Laisser solidifier sur une surface fraîche et horizontale.

Eaux

Voir Fiche Technique correspondante.

• Incubation

- Retourner les boîtes et incuber à :
 - 37 °C \pm 1 °C pendant 21 heures (\pm 3 h) pour le dénombrement simultané d'*E. coli* et des coliformes (= coliformes totaux).
 - 44 °C \pm 1 °C pendant 21 heures (\pm 3 h) pour le dénombrement d'*E. coli* *.

* Température d'incubation pour laquelle la méthode RAPID'E.coli 2 a été validée dans le cadre de la marque NF VALIDATION.

LECTURE ET INTERPRETATION

(produits alimentaires)

Pour les Eaux, se référer à la Fiche Technique correspondante.

• Comptage des colonies (UFC)

- Après la période d'incubation, procéder au comptage des colonies caractéristiques:
- Coliformes (autres qu'*E. coli*) = bleues
- *E. coli* = violettes à roses.

Escherichia coli étant une espèce appartenant au groupe des coliformes, le dénombrement des coliformes totaux s'obtient en faisant la somme des colonies bleues et des colonies violettes à roses.

N.B.

- Ne Retenir que les boîtes contenant moins de 150 colonies caractéristiques et moins de 300 colonies au total.
- Selon les différentes méthodes de calcul, les boîtes ne contenant aucune colonie peuvent être retenues.

• Expression des résultats/Calculs

Pour le mode de calcul, se reporter à la norme NF EN ISO 7218.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Pour les milieux prêt à l'emploi et préparé à l'avance, il faut éviter toute surchauffe prolongée pendant leur fusion (en général, 20 minutes suffisent pour obtenir une gélose liquide homogène) et leur surfusion (6h maximum).
- Pour conserver une qualité optimale, le milieu ne peut subir que deux régénérations (ne pas dépasser un total de 6h de surfusion).
- Le milieu peut présenter un aspect floconneux après gélification en flacon. Il conserve cependant toutes ses qualités dès lors que cet aspect disparaît après fusion et agitation.
- Le développement des colonies sur le fond de la boîte de Petri pouvant nuire à la lecture, il est recommandé de limiter le temps entre le dépôt de l'inoculum au fond de la boîte et la répartition du milieu de culture.
- A 37 °C pour le dénombrement d'*E. coli* et des coliformes dans les matrices contenant une flore mésophile abondante, il est préférable d'utiliser le milieu en double couche.
- La deuxième couche a pour but de limiter l'envahissement de surface pouvant nuire à la lecture (produits laitiers crus, viandes crues).
- Respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire (EN ISO 7218).

PERFORMANCES/CONTROLE QUALITE DU TEST

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

MICRO-ORGANISMES	Aspect des colonies après 18-24 heures d'incubation à 44 °C	
	CROISSANCE	COULEUR
<i>Escherichia coli</i> WDCM 00090	+	Violettes

MICRO-ORGANISMES	Aspect des colonies après 18-24 heures d'incubation à 37 °C	
	CROISSANCE	COULEUR
<i>Klebsiella oxytoca</i> SDP 12.1.1	+	Bleues
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	+	Non typique
<i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00034	-	NA

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

3/4

RAPID'*E. coli* 2/Gélose

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 / *Escherichia coli* / Coliformes / Produits alimentaires / Eaux / Recherche / Dénombrement / Bêta-D-Glucuronidase / Bêta-D-Galactosidase / Chromogène / Milieu.

BIBLIOGRAPHIE

- **Majchrazak V., Facon JP. and Vermeulen M. (April 27 - 29 1998):** AFNOR validation of the new RAPID'*E. COLI* 2 medium for rapid detection and enumeration of *Escherichia coli* in food. 5th Congress of the Société Française de Microbiologie, Lille, France.
- **GRAND M. and BAUMGARTNER A. (1996) :** Enumeration of *Escherichia coli* by means of selective chromogenic agars – Comparison with the official method. *Trav. Chim. Alim. Hyg.* 87: 623-630.
- **MOINI R., GRIMALDI M., ZORZI P., MANI A. and BORDIN P. (1996):** Comparison between selective media « RAPID'*E. coli* » and « VRBA with sodium malonate » for *E. coli* investigation. *Industrie alimentari.* 35: 793 - 796.
- **OCHIN D., SIMON F. and CATTEAU M. (12-15 September 1993) :** A new medium for rapid detection and enumeration of *Escherichia coli* in food. 7th international congress on Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology. London UK
- **OCHIN D., SIMON F. and CATTEAU M. (28-29 avril 1993) :** New method for rapid detection and enumeration of *Escherichia coli* in food products. Paris - Colloque Société Française de Microbiologie.