

---

# RAPID'*E.coli* 2 Agar (for Water Testing)

## User Guide

**Selective chromogenic medium used for direct enumeration (without confirmation) of colonies of *Escherichia coli* and other coliform bacteria in water for human consumption and nontreated water**

Catalog #3563982, Prepared plates, 55 mm x 20 dishes

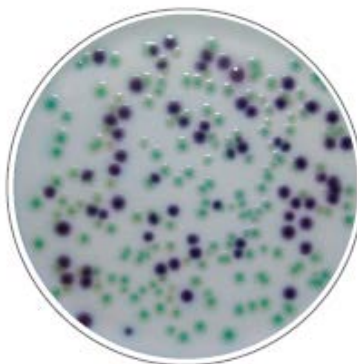
Catalog #3555297, Ready-to-use, 200 ml x 6 bottles

Catalog #3555299, Ready-to-use, 100 ml x 6 bottles

Catalog #3564024, Dehydrated, 500 g

Catalog #12008041, Supplement, 6 vials (for 200 ml bottles)

Catalog #17005373, Ready-to-use kit (for 200 ml), includes bottled agar and supplements



**BIO-RAD**

# Table of Contents

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

## Section 1 Introduction

Coliform is a nontaxonomic group of bacteria that are exclusively gram-negative, non-spore forming, facultative anaerobic, rod-shaped and that ferment lactose to produce acid and gas. The group is composed of enteric bacteria such as *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, and *Enterobacter*. Enumeration of coliform bacteria may be useful to confirm sanitation of water for human consumption or nontreated water. *Escherichia coli* is found in the intestine of animals and is abundant in human and animal feces. The bacteria can also be isolated from environmental samples. Fecal coliforms are often used as indicators of contamination and the possible presence of pathogenic organisms. While these bacteria are generally nonpathogenic, they can cause infection in immunocompromised hosts. Most probable number methods for enumeration of coliform bacteria can be laborious and costly. The use of chromogenic substrates in media has led to development of faster and easier methods for detection, differentiation, and enumeration of target bacteria.

## Section 2 RAPID'*E.coli* 2 Principle

The principle of the complete medium (supplemented RAPID'*E.coli* 2) relies on the simultaneous detection of two enzymatic activities,  $\beta$ -D-glucuronidase (GLUC) and  $\beta$ -D-galactosidase (GAL), by two chromogenic substrates. Cleavage of the GAL-specific substrate forms a precipitate, giving a green color to the colonies positive for this enzyme (coliforms). Cleavage of the GLUC-specific substrate forms a precipitate, giving a pink color to the colonies positive for this enzyme (*E. coli*). Coliforms (GAL+/GLUC-) produce green colonies. *E. coli* (GAL+/GLUC+) produce blue to violet colonies due to the superposition of both colors. The selective mixture in the supplement inhibits the main interfering flora in water.

## Section 3 Theoretical Formula

Peptones	10 g
Sodium chloride	5 g
Yeast extract	3 g
Selective chromogenic mixture	6 g
Agar	13 g
Distilled water	qsp 1,000 ml
Selective mixture	

---

Final pH at 25°C = 7.2 ± 0.2

## Section 4 Shelf Life and Storage

- Dehydrated agar and supplement: Store at 2–8°C in a carefully sealed package in a dry and dark place
- Rehydrated supplement: Store for 7 days at 2–8°C in a dark place; for 3 months at –20°C with one thaw
- Plate prepared from the dehydrated agar: Store for 15 days at 2–8°C in a carefully sealed package in a dry and dark place

## Section 5 Materials Required but Not Supplied

### Equipment

- All usual laboratory equipment
- Filtration device
- Scale, sensitivity of 0.1 g
- Stirrer/homogenizer
- Thermostatically controlled incubator or incubation room, precise to  $\pm 1^{\circ}\text{C}$
- Water bath, precise to  $\pm 1^{\circ}\text{C}$

### Supplies

- Forceps for handling membranes
- Sterile distilled water
- Sterile filtration membranes (47 mm, 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore HAWG 047 Type HA)
- Sterile petri dishes (55 mm)
- Sterile pipets

## Section 6 Precautions, Limitations of Use, and Quality Control

### Precautions

- Respect Good Laboratory Practice (EN ISO 8199). Appropriate protection, such as gloves and lab coats, should be worn when working with potentially infectious live bacteria such as *E. coli* or coliforms.
- Media that have come in contact with water samples should be considered contaminated and should be disposed of in accordance with local rules and regulations
- Avoid trapping air bubbles underneath the membrane during its placement on the agar. Poor membrane-agar contact may lead to an erroneous result. If necessary, gently and carefully flatten the membrane with the forceps

### Limitations of Use

- Certified quantitative microbiological reference materials (capsules, lenticules, and pastilles) are commonly used in internal laboratory quality controls or interlaboratory tests to check and validate the

## Section 7 Protocol

performance of the culture media. Depending on the production method, some collection strains may present difficulties in growth due to physiological stress on the cells, however, this does not call into question the fertility performance of the culture medium used. Some BioReference pastilles containing *E. coli* and other coliform reference strains could present weaker relative yields (RY < 66%) on supplemented RAPID'*E.coli* 2 medium. Therefore, to ensure the physiological integrity of cells, preparation of a fresh calibrated suspension from a strain cultured on a nutritive medium is recommended. The use of other commercial reference materials remains possible

## 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](http://www.bio-rad.com)

## Section 7 Protocol

### Preparation of Supplement

1. Aseptically rehydrate the lyophilized pellet by adding 2.2 ml of distilled water to the vial.
2. Shake until the pellet is completely dissolved.

### Preparation of Dehydrated Medium

1. Always shake bottle before use.
2. Dissolve 37 g of powder in 1 L of distilled water. Wait 5 min and mix until a homogenous suspension is obtained.
3. Heat gently, agitating frequently, then bring to a boil until completely dissolved.
4. Dispense, then sterilize in an autoclave at  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  for 15 min.
5. Cool medium to  $47 \pm 2^\circ\text{C}$  before adding supplement.
6. One 500 g bottle of powder makes 13.5 L of medium.

### Preparation of Complete Medium

1. Aseptically add 2 ml of rehydrated supplement to 200 ml of medium cooled to  $47 \pm 2^\circ\text{C}$  or 1–100 ml of medium cooled to  $47 \pm 2^\circ\text{C}$ . There will be residual supplement in the vials after use (0.2 ml in supplement for a 200 ml bottle (catalog #12008041).
2. Shake thoroughly to homogenize.

## Section 8 Confirmation of Positive Results

3. Dispense in Petri dishes and leave on the bench to dry.

### Sample Preparation

1. To be carried out in accordance with the standard of the product concerned.

### Inoculation and Plate Reading

1. Bring medium to room temperature.
2. Under sterile conditions, filter the volume of water to be analyzed (for example, 250 ml for a sample of bottled water) through a membrane according to the origin of the sample.
3. Place the membrane, cross-hatched surface up, on the surface of the medium, taking care that the membrane-agar contact is complete.
4. Incubate plate at  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  for  $21 \pm 3$  hr (EPA validated method:  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  for  $24 \pm 2$  hr).
5. Coliforms (other than *E. coli*) form green colonies on RAPID'*E.coli* 2 Agar. *E. coli* can have a variable appearance, blue to violet (GLUC+) or gray-blue (weak GLUC+) with a possible violet halo surrounding the colony.
6. Enumerate total coliforms by adding the number of blue to violet, gray-blue and green colonies.
7. Retain only dishes that contain maximum 110 colonies.
8. Record the total number of *E. coli* and/or coliforms per unit volume of filtered sample.


## Section 8 Confirmation of Positive Results

Not applicable.

## Section 9 Confirmation of Other Methods

Not applicable.

## Section 10 Test Performance and Validations

Certification	Scope	Validation Protocol	Reference Protocol	Certificate Reference
NF VALIDATION	Water for human consumption	NF 148	EN ISO 9308-1	 BRD: 07/20–03/11 Water analysis methods <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>
EPA VALIDATION	Treated and untreated drinking water	Alternative Test Protocol EPA-821-B-10-001	EPA 9221 B EPA 9221 F	<a href="http://www.epa.gov">www.epa.gov</a>

## Section 11 References

American Public Health Association. 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition. American Public Health Association, Washington D.C.

Federal Register / Vol. 86, No. 100 / May 26, 2021 / Rules and Regulations.

NF EN ISO 9308-1 (09/2000). Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora.

United States Environmental Protection Agency. January 2005. Manual for the Certification for Laboratories Analyzing Drinking Water, Fifth Edition, EPA 815-R-004, Office of Ground Water and Drinking Water, Technical Support Division, U.S. EPA, Cincinnati, OH.

United States Environmental Protection Agency. September 2010. EPA Microbiological Alternate Test procedure (ATP) Protocol for Drinking Water, Ambient Water, Wastewater, and Sewage Sludge Monitoring Methods, EPA-821-B-10-001, Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C.

## Section 12

### Revision History

Release date	Document number	Change
July 2020	10000134990 Ver A	- New document design - Document number change – previous version REC2_Rev 6
June 2021	10000134990 Ver B	- Added EPA Validation and references - Corrected AFNOR logo and number
March 2023	10000134990 Ver C	- Updated GLP reference - Updated preparation instructions to align with standard

BIO-RAD is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc. All trademarks used herein are the property of their respective owner.



**Bio-Rad**  
Laboratories, Inc.

Life Science  
Group

Website [bio-rad.com](http://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 82 080 007 7373 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

10000134990 Ver C US/EG

Sig 0123



---

# RAPID'*E. coli* 2 Agar (for water testing)

## Guide d'utilisation

Milieu chromogène sélectif utilisé pour le dénombrement direct (sans confirmation) de colonies d'*Escherichia coli* et autres bactéries coliformes dans l'eau destinée à la consommation humaine et l'eau non traitée

N° de référence 3563982, boîte pré-coulée, 55 mm x 20 boîtes

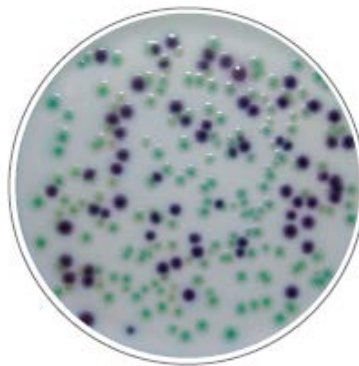
N° de référence 3555297, prêt à l'emploi, 200 ml x 6 flacons

N° de référence 3555299, prêt à l'emploi, 100 ml x 6 flacons

N° de référence 3564024, base déshydratée, 500 g

N° de référence 12008041, supplément, 6 flacons (pour flacons 200 ml)

N° de référence 17005373, kit prêt à l'emploi (pour 200 ml), avec flacons de gélose et flacons de supplément



**BIO-RAD**

# Sommaire

Section 1	Introduction .....	1
Section 2	RAPID' <i>E.coli</i> 2 - 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, limites d'utilisation et contrôle qualité .....	2
	Précautions .....	2
	Limites d'utilisation.....	3
	Contrôle qualité.....	3
Section 7	Protocole.....	3
	Préparation du supplément.....	3
	Préparation du milieu déshydraté .....	3
	Préparation du milieu complet .....	4
	Préparation des échantillons .....	4
	Inoculation et lecture.....	4
Section 8	Confirmation des résultats positifs.....	4
Section 9	Confirmation d'autres méthodes.....	4
Section 10	Performance du test et validations .....	5
Section 11	Références.....	5
Section 12	Historique des révisions.....	6

## Section 1 Introduction

Les coliformes décrivent un groupe non taxonomique de bacilles à Gram négatif, anaérobies facultatifs, non sporulants, fermentant le lactose avec production de gaz et d'acide. Le groupe est composé de bactéries entériques telles que *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* et *Enterobacter*. Le dénombrement de bactéries coliformes est utile pour confirmer la salubrité de l'eau destinée à la consommation humaine ou de l'eau non traitée. *Escherichia coli* est présente dans les intestins d'animaux et est abondante dans les matières fécales humaines et animales. Il est également possible d'isoler la bactérie dans les échantillons environnementaux. Les coliformes fécaux sont souvent utilisés comme indicateurs de contamination et de présence éventuelle d'organismes pathogènes. Même si ces bactéries sont généralement non pathogènes, elles peuvent causer une infection chez des hôtes immunovulnérables. Les techniques du nombre le plus probable pour le dénombrement de coliformes peuvent s'avérer contraignantes et coûteuses. L'utilisation de substrats chromogènes dans les milieux a permis le développement de méthodes plus rapides et plus aisées pour la recherche, la différenciation et le dénombrement de bactéries cibles.

## Section 2 RAPID'*E.coli* 2 - Principe

Le principe du milieu complet (RAPID'*E.coli* 2 avec supplément) repose sur la détection simultanée de deux activités enzymatiques,  $\beta$ -D-glucuronidase (GLUC) et  $\beta$ -D-galactosidase (GAL), par deux substrats chromogènes. Le clivage du substrat spécifique de la GAL forme un précipité présentant une coloration verte des colonies positives pour cette enzyme (coliformes). Le clivage du substrat spécifique de la GLUC forme un précipité présentant une coloration rose des colonies positives pour cette enzyme (*E. coli*). Les coliformes (GAL+/GLUC-) produisent des colonies vertes. Les *E. coli* (GAL+/GLUC+) produisent des colonies bleues à violettes en raison de la superposition des deux couleurs. Le mélange sélectif du supplément permet d'inhiber l'importante flore interférente dans les eaux.

## Section 3 Formule théorique

Peptones	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Extrait de levure	3 g
Mélange chromogène sélectif	6 g
Gélose	13 g
Eau distillée	q.s.p. 1 000 ml
Mélange sélectif	

---

pH final à 25 °C = 7,2 ± 0,2

## Section 4 Durée de conservation et stockage

- Gélose base déshydratée et supplément : 2–8 °C en emballage soigneusement scellé dans un endroit sec et à l'abri de la lumière.

## Section 5 Matériel requis non fourni

- Supplément réhydraté : 2–8 °C à l'abri de la lumière pendant 7 jours ; -20 °C pendant 3 mois avec une décongélation.
- Boîte préparée à partir de la gélose 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
- Dispositif de filtration
- Balance, sensibilité 0,1 g
- Agitateur/homogénéisateur
- Étuve ou enceinte thermostatée, précision  $\pm 1$  °C
- Bain-marie, précision  $\pm 1$  °C

### Produits

- Pince pour membranes
- Eau distillée stérile
- Membranes filtrantes stériles (47 mm, 0,45  $\mu$ m Millipore HAWG 047 Type HA)
- Boîtes de Petri stériles ( $\varnothing$  55 mm)
- Pipettes stériles

## Section 6 Précautions, limites d'utilisation et contrôle qualité

### Précautions

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (EN ISO 8199). Porter un équipement de protection approprié, par exemple des gants et une blouse de laboratoire, pour travailler avec des bactéries vivantes potentiellement infectieuses telles qu'*E. coli* ou les coliformes.
- Les milieux qui sont entrés en contact avec des échantillons d'eau doivent être considérés comme contaminés et doivent être éliminés conformément aux règles et réglementations locales.

## Section 7 Protocole

- Éviter d'emprisonner des bulles d'air sous la membrane durant son placement sur la gélose. Un contact membrane-gélose inadéquat est susceptible d'entraîner des résultats erronés. Si nécessaire, aplanir doucement et soigneusement la membrane avec la pince.

### 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 essais interlaboratoires afin de vérifier et valider les performances des milieux de culture. Selon la méthode de production, 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 pastilles BioRéférence contenant *E. coli* et d'autres souches de référence de coliformes peuvent présenter des rendements relatifs 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.

### 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](http://www.bio-rad.com)

## Section 7 Protocole

### Préparation du supplément

1. Réhydrater aseptiquement le lyophilisat en ajoutant 2,2 ml d'eau distillée dans le flacon.
2. Agiter jusqu'à dissolution complète du lyophilisat.

### Préparation du milieu déshydraté

1. Toujours agiter le flacon avant utilisation.
2. Dissoudre 37 g de poudre dans 1 L d'eau distillée. Attendre 5 min et mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène.
3. Chauffer doucement en mélangeant fréquemment, puis amener à ébullition jusqu'à dissolution complète.
4. Répartir, puis stériliser à l'autoclave à  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  pendant 15 min.
5. Refroidir le milieu à  $47 \pm 2^\circ\text{C}$  avant l'ajout du supplément.

## Section 8 Confirmation des résultats positifs

6. 500 grammes de poudre permettent de reconstituer 13,5 L de milieu.

### Préparation du milieu complet

1. Ajouter aseptiquement 2 ml de supplément réhydraté à 200 ml de milieu refroidi à  $47 \pm 2$  °C ou 1 ml pour 100 ml de milieu refroidi à  $47 \pm 2$  °C. Il reste du supplément dans l'ampoule après utilisation (0,2 ml de supplément pour un flacon de 200 ml (n° de référence 12008041).
2. Agiter de façon à bien homogénéiser l'ensemble.
3. Répartir dans les boîtes de Petri et laisser sécher.

### Préparation des échantillons

1. À effectuer conformément à la norme du produit concerné.

### Inoculation et lecture

1. Laisser le milieu de culture atteindre une température ambiante.
2. En conditions stériles, filtrer le volume d'eau à analyser (par exemple, 250 ml pour un échantillon d'eau embouteillée) à travers une membrane, en fonction de l'origine de l'échantillon.
3. Placer la membrane sur le milieu de culture, surface quadrillée vers le haut, en prenant soin de garantir un contact membrane-gélose optimal.
4. Incuber la boîte à  $36 \pm 2$  °C pendant  $21 \pm 3$  hr. (Méthode validée EPA:  $36 \pm 1$ °C for  $24 \pm 2$  hr).
5. Les coliformes (autres que *E. coli*) forment des colonies vertes sur la gélose RAPID'*E.coli* 2. Les *E. coli* peuvent présenter une apparence variable, bleu foncé à violet (GLUC +) ou gris-bleu (GLUC + faible), avec un éventuel halo violet autour des colonies.
6. Le dénombrement des coliformes totaux s'obtient en faisant la somme des colonies bleu foncé à violet, des colonies gris-bleu et des colonies vertes.
7. Retenir uniquement les boîtes contenant au maximum 110 colonies.
8. Enregistrer le nombre total de *E. coli* et/ou coliformes par unité de volume d'échantillon filtré.


## Section 8 Confirmation des résultats positifs

Sans objet

## Section 9 Confirmation d'autres méthodes

Sans objet

## Section 10 Performance du test et validations

Certification	Portée	Protocole de validation	Protocole de référence	Référence de certificat
NF VALIDATION	Eaux de consommation humaine	NF 148	EN ISO 9308-1	 BRD : 07/20–03/11 Méthodes d'analyse de l'eau <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>
EPA VALIDATION	Eaux de consommation humaines traitées et non-traitées	Alternative Test Protocol EPA-821-B-10-001	EPA 9221 B EPA 9221 F	www.epa.gov

## Section 11 Références

American Public Health Association. 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition. American Public Health Association, Washington D.C.

Federal Register / Vol. 86, No. 100 / May 26, 2021 / Rules and Regulations.

NF EN ISO 9308 (09/2000) : Qualité de l'eau — Dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes : Méthode par filtration sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries.

United States Environmental Protection Agency. January 2005. Manual for the Certification for Laboratories Analyzing Drinking Water, Fifth Edition, EPA 815-R-004, Office of Ground Water and Drinking Water, Technical Support Division, U.S. EPA, Cincinnati, OH.

United States Environmental Protection Agency. September 2010. EPA Microbiological Alternate Test procedure (ATP) Protocol for Drinking Water, Ambient Water, Wastewater, and Sewage Sludge Monitoring Methods, EPA-821-B-10-001, Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C.

## Section 12

### Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Juillet 2020	10000134990 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nouvelle conception de document</li> <li>- Modification du numéro de document – Version précédente REC2_ Rév 6</li> </ul>
Juin 2021	10000134990 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ajout références validation EPA</li> <li>- Correction logo et référence validation AFNOR</li> </ul>
Mars 2023	10000134990 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mise à jour des BPL</li> <li>- Mise à jour des intructions de préparation pour s'aligner sur la norme</li> </ul>

BIO-RAD est une marque déposée de Bio-Rad Laboratories, Inc. Toutes les marques déposées utilisées dans ce document appartiennent à leur propriétaire respectif.



**Bio-Rad**  
Laboratories, Inc.

Life Science  
Group

Website [bio-rad.com](http://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 82 080 007 7373 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

10000134990 Ver C US/EG

Sig 0123



---

# RAPID'*E. coli* 2 Agar (Wasseranalytik)

## Anwenderhandbuch

**Selektives chromogenes Medium zur direkten Zählung (ohne Bestätigung) von Kolonien von *Escherichia coli* und anderen coliformen Bakterien in Wasser für den menschlichen Verzehr und in unbehandeltem Wasser**

Katalog-Nr. 3563982, Gebrauchsfertige Agarplatten, 20 Platten x 55 mm

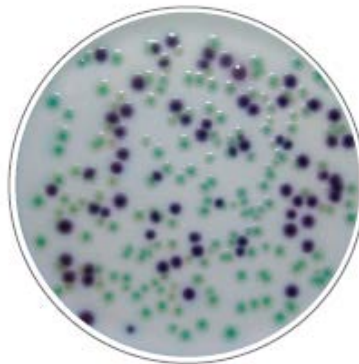
Katalog-Nr. 3555297, Gebrauchsfertig, 6 Flaschen x 200 ml

Katalog-Nr. 3555299, Gebrauchsfertig, 6 Flaschen x 100 ml

Katalog-Nr. 3564024, Dehydriert, 500 g

Katalog-Nr. 12008041, Supplement, 6 Fläschchen (für 200 ml Flaschen)

Katalog-Nr. 17005373, Gebrauchsfertiges Kit (für 200 ml), inkl. Agar in Flaschen und Supplement



**BIO-RAD**

# Inhaltsverzeichnis

Abschnitt 1	Einleitung .....	1
Abschnitt 2	Das Prinzip von RAPID' <i>E.coli</i> 2 .....	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
	Vorsichtsmaßnahmen .....	2
	Anwendungsbeschränkungen .....	3
	Qualitätskontrolle .....	3
Abschnitt 7	Protokoll .....	3
	Vorbereitung des Supplements .....	3
	Vorbereitung des dehydrierten Mediums .....	3
	Zubereitung des Komplettmediums .....	4
	Probenvorbereitung .....	4
	Beimpfung und Ablesen der Platten .....	4
Abschnitt 8	Bestätigung positiver Ergebnisse .....	4
Abschnitt 9	Bestätigung anderer Methoden .....	5
Abschnitt 10	Testleistung und Validierungen .....	5
Abschnitt 11	Literatur .....	5
Abschnitt 12	Revisionshistorie .....	6

## Abschnitt 1

### Einleitung

Coliforme Bakterien sind eine nicht-taxonomische Gruppe von ausschließlich gramnegativen, nicht sporenbildenden, fakultativ anaeroben, stäbchenförmigen Bakterien, die Laktose fermentieren, um Säure und Gas zu produzieren. Die Gruppe besteht aus enterischen Bakterien wie *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* und *Enterobacter*. Die Zählung coliformer Bakterien kann hilfreich sein, um die Sauberkeit von Trinkwasser oder von unbehandeltem Wasser zu bestätigen. *Escherichia coli* kommt im Darm von Tieren vor und ist in Tierkot und menschlichem Stuhl in großer Zahl enthalten. Die Bakterien können auch aus Umweltproben isoliert werden. Coliforme Keime im Kot/Stuhl werden häufig als Indikatoren für Kontaminationen und das mögliche Vorhandensein krankheitserregender Organismen verwendet. Zwar sind diese Bakterien im Allgemeinen nicht pathogen, bei einem immungeschwächten Wirt können sie aber eine Infektion verursachen. Die meisten verlässlichen Methoden zur Zählung coliformer Bakterien sind zeit- und kostenaufwändig. Durch die Verwendung chromogener Substrate in Nährmedien konnten schnellere und einfachere Methoden zum Nachweis, zur Differenzierung und zur Zählung von Zielbakterien entwickelt werden.

## Abschnitt 2

### Das Prinzip von RAPID'*E.coli* 2

Das Prinzip des Komplettmediums (RAPID'*E.coli* 2 mit Supplement) beruht auf dem gleichzeitigen Nachweis von zwei enzymatischen Aktivitäten, der  $\beta$ -D-Glucuronidase (GLUC) und der  $\beta$ -D-Galactosidase (GAL), durch zwei chromogene Substrate. Durch Spaltung des GAL-spezifischen Substrats bildet sich ein Präzipitat, durch das die für dieses Enzym positiven Kolonien (Coliforme) eine grüne Farbe annehmen. Durch Spaltung des GLUC-spezifischen Substrats bildet sich ein Präzipitat, durch das die für dieses Enzym positiven Kolonien (*E. coli*) eine rosa Farbe annehmen. Coliforme Keime (GAL+/GLUC-) bilden grüne Kolonien, *E. coli* (GAL+/GLUC+) bildet aufgrund der Überlagerung beider Farben blaue bis violette Kolonien. Die selektive Mischung im Supplement hemmt das Wachstum der wichtigsten, störenden Begleitflora im Wasser.

## Abschnitt 3

### Theoretische Zusammensetzung

Pepton	10 g
Natriumchlorid	5 g
Hefeextrakt	3 g
Selektive chromogene Mischung	6 g
Agar	13 g
Destilliertes Wasser	qsp 1.000 ml
Selektive Mischung	

---

Finaler pH-Wert bei 25 °C = 7,2 ± 0,2

## Abschnitt 4

### Haltbarkeit und Lagerung

- Dehydrierter Agar und Supplement: Bei 2–8 °C in einer sorgfältig verschlossenen Verpackung an einem trockenen und dunklen Ort lagern.

- Rehydriertes Supplement: 7 Tage bei 2–8 °C an einem dunklen Ort lagern; 3 Monate bei -20 °C mit einmaligem Auftauen lagern.
- Aus dem dehydrierten Agar hergestellte Agarplatten: 15 Tage bei 2–8 °C in einer sorgfältig verschlossenen Verpackung an einem trockenen und dunklen Ort lagern.

## Abschnitt 5

### Zusätzlich benötigtes Material

#### Geräte

- Die üblichen Laborgeräte
- Filtrationsvorrichtung
- Waage, Genauigkeit bis 0,1 g
- Rührer/Homogenisator
- Thermostatisch gesteuerter Inkubator oder Inkubationsraum, Genauigkeit bis  $\pm 1$  °C
- Wasserbad, Genauigkeit bis  $\pm 1$  °C

#### Zubehör

- Pinzette zur Handhabung der Membranen
- Steriles destilliertes Wasser
- Membranen zur Sterilfiltration (47 mm, 0,45  $\mu$ m Millipore HAWG 047 Typ HA)
- Sterile Petrischalen (55 mm)
- Sterile Pipetten

## Abschnitt 6

### Vorsichtsmaßnahmen, Anwendungsbeschränkungen und Qualitätskontrolle

#### Vorsichtsmaßnahmen

- Es sind die Richtlinien der guten Laborpraxis zu beachten (EN ISO 8199). Bei der Arbeit mit potenziell infektiösen lebenden Bakterien wie *E. coli* oder Coliformen sollten angemessene Schutzvorkehrungen getroffen werden (zum Beispiel Handschuhe und Laborkittel tragen)
- Medien, die mit Wasserproben in Kontakt gekommen sind, sind als kontaminiert zu betrachten und den vor Ort geltenden Vorschriften und Bestimmungen entsprechend zu entsorgen

- Die Membranen möglichst ohne Luftblasen darunter auf den Agar legen. Ungenügender Kontakt zwischen Membran und Agar kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Die Membran erforderlichenfalls behutsam und vorsichtig mit der Pinzette glätten

## Anwendungsbeschränkungen

- Zur Überprüfung und Validierung der Leistung der Kulturmedien werden bei internen Laborqualitätskontrollen oder bei Tests innerhalb des Labors üblicherweise zertifizierte quantitative mikrobiologische Referenzmaterialien (Kapseln, Linsen und Pastillen) verwendet. Abhängig von der Herstellungsmethode weisen manche Stämme in Entnahmeprobe aufgrund von physiologischem Stress der Zellen Wachstumsschwierigkeiten auf, dies ist jedoch nicht auf eine schwächere Fertilitätsleistung des verwendeten Kulturmediums zurückzuführen. Einige BioReference-Pastillen, die *E. coli* und andere coliforme Referenzstämme enthalten, könnten daher niedrigere relative Ausbeuten (RY < 66 %) auf RAPID'*E.coli* 2 Medium plus Supplement ergeben. Zur Sicherstellung der physiologischen Integrität der Zellen wird daher die Herstellung einer frisch kalibrierten Suspension aus einem Stamm empfohlen, der auf einem Nährmedium kultiviert wurde. Es können auch andere handelsübliche Referenzmaterialien verwendet werden

## Qualitätskontrolle

- Jedes von der Firma Bio-Rad hergestellte und verkaufte Produkt unterliegt vom Rohstoffeingang bis zur Vermarktung der Fertigprodukte einem umfassenden Qualitätssicherungsverfahren. 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](http://www.bio-rad.com) erhältlich

## Abschnitt 7 Protokoll

### Vorbereitung des Supplements

1. Unter sterilen Bedingungen das lyophilisierte Pellet durch Zugabe von 2,2 ml destilliertem Wasser in das Fläschchen rehydratisieren.
2. Schütteln, bis sich das Pellet vollständig aufgelöst hat.

### Vorbereitung des dehydrierten Mediums

1. Die Flasche vor jedem Gebrauch schütteln.
2. 37 g Pulver in 1 l destilliertem Wasser lösen. Fünf Minuten warten und mischen, bis eine homogene Suspension entstanden ist.
3. Vorsichtig erhitzen, häufig umrühren und dann bis zum vollständigen Auflösen kochen lassen.
4. Abfüllen und anschließend in einem Autoklaven 15 Minuten bei  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  sterilisieren.

5. Das Medium vor der Zugabe des Supplements auf  $47 \pm 2$  °C abkühlen lassen.
6. Eine 500 g Flasche dehydriertes Pulver ergibt 13,5 l Medium.

## Zubereitung des Komplettmediums

1. Unter sterilen Bedingungen 2 ml rehydratisiertes Supplement zu 200 ml bzw. 1 ml zu 100 ml des auf  $47 \pm 2$  °C abgekühlten Mediums geben. In den Fläschchen ist danach noch eine Restmenge des Supplements vorhanden (0,2 ml in dem Zusatz für eine 200-ml-Flasche (Katalog-Nr. 12008041)).
2. Zum Homogenisieren kräftig schütteln.
3. In Petrischalen gießen und auf dem Tisch fest werden lassen.

## Probenvorbereitung

1. Dem für das jeweilige Produkt üblichen Standardverfahren entsprechend durchführen.

## Beimpfung und Ablesen der Platten

1. Das Medium auf Raumtemperatur bringen.
2. Die der Herkunft der Probe entsprechende, zu analysierende Wassermenge unter sterilen Bedingungen durch eine Membran filtrieren (z. B. 250 ml bei einer Probe aus in Flaschen abgefülltem Wasser).
3. Die Membran mit der schraffierten Oberfläche nach oben auf das Medium legen und darauf achten, dass Membran und Agar vollständig miteinander in Kontakt sind.
4. Die Platte bei  $36 \pm 2$  °C für  $21 \pm 3$  Stunden inkubieren. (EPA validierte Methode  $36 \pm 1$ °C for  $24 \pm 2$  hr).
5. Coliforme Keime (außer *E. coli*) bilden auf RAPID'*E.coli* 2 Agar grüne Kolonien. *E. coli* Kolonien können eine unterschiedliche Farbe annehmen, dunkelblau bis violett (GLUC+) oder grau-blau (schwach GLUC+), eventuell mit einem violetten Hof um die Kolonie.
6. Zur Bestimmung der Gesamtzahl der coliformen Keime die Anzahl der dunkelblau bis violetten, graublauen und grünen Kolonien addieren.
7. Nur Platten behalten, die maximal 110 Kolonien aufweisen.
8. Die Gesamtzahl an *E. coli* und/oder coliformen Keimen pro Volumeneinheit der gefilterten Probe protokollieren.

## Abschnitt 8


### Bestätigung positiver Ergebnisse

Nicht zutreffend

## Abschnitt 9 Bestätigung anderer Methoden

Nicht zutreffend

## Abschnitt 10 Testleistung und Validierungen

Zertifizierungsstelle	Umfang	Validierungsprotokoll	Referenzprotokoll	Zertifikat-Referenz
NF VALIDATION	Wasser für den menschlichen Verzehr	NF 148	EN ISO 9308-1	 BRD: 07/20-03/11 Wasseranalysemethoden <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>
EPA VALIDATION	Behandeltes und unbehandeltes Trinkwasser	Alternative Test Protocol EPA-821-B-10-001	EPA 9221 B EPA 9221 F	www.epa.gov

## Abschnitt 11 Literatur

American Public Health Association. 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition. American Public Health Association, Washington D.C.

Federal Register / Vol. 86, No. 100 / May 26, 2021 / Rules and Regulations.

NF EN ISO 9308 (09/2000): Wasserbeschaffenheit - Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien: Membranfiltrationsverfahren für Wässer mit niedriger Begleitflora.

United States Environmental Protection Agency. January 2005. Manual for the Certification for Laboratories Analyzing Drinking Water, Fifth Edition, EPA 815-R-004, Office of Ground Water and Drinking Water, Technical Support Division, U.S. EPA, Cincinnati, OH.

United States Environmental Protection Agency. September 2010. EPA Microbiological Alternate Test procedure (ATP) Protocol for Drinking Water, Ambient Water, Wastewater, and Sewage Sludge Monitoring Methods, EPA-821-B-10-001, Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C.

## Abschnitt 12

### Revisionshistorie

Freigabedatum	Dokumentnummer	Änderung
Juli 2020	10000134990 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Neues Dokumentdesign</li> <li>- Änderung der Dokumentennummer – vorhergehende Version REC2_Rev 6</li> </ul>
June 2021	10000134990 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> <li>- EPA Validierung und Referenzen hinzugefügt</li> <li>- Korrigiertes AFNOR Logo und Nummer</li> </ul>
März 2023	10000134990 Ver C	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aktualisierung der GLP Referenz</li> <li>- Aktualisierung der Instruktionen für die Herstellung zur Angleichung an den Standard</li> </ul>

BIO-RAD ist eine Marke von Bio-Rad Laboratories, Inc. 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** 82 080 007 7373 **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

10000134990 Ver C US/EG

Sig 0123



---

# RAPID'*E. coli* 2 Agar (per il test delle acque)

## Manuale utente

**Terreno cromogenico selettivo utilizzato per l'enumerazione diretta (senza conferma) di colonie di *Escherichia coli* e altri batteri coliformi in acqua per il consumo umano e acqua non trattata**

N. catalogo 3563982, Piastre pronte all'uso, 55 mm x 20 piastre

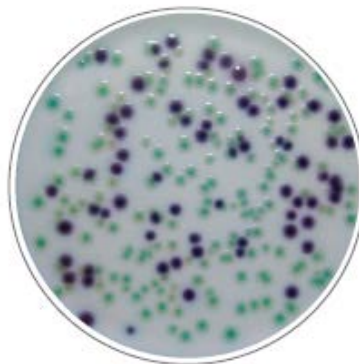
N. catalogo 3555297, Pronto per l'uso, 200 ml x 6 flaconi

N. catalogo 3555299, Pronto per l'uso, 100 ml x 6 flaconi

N. catalogo 3564024, Disidratato, 500 g

N. catalogo 12008041, Supplemento, 6 fiale (per flaconi da 200 ml)

N. catalogo 17005373, Kit pronto per l'uso (per 200 ml), include flacone di terreno di coltura agar e supplementi



**BIO-RAD**

# Indice

Sezione 1	Introduzione .....	1
Sezione 2	RAPID' <i>E.coli</i> 2 - Principio .....	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, limitazioni d'uso e controllo qualità .....	2
	Precauzioni .....	2
	Limitazioni d'uso .....	3
	Controllo qualità .....	3
Sezione 7	Protocollo .....	3
	Preparazione del supplemento .....	3
	Preparazione del terreno disidratato .....	3
	Preparazione del terreno completo .....	4
	Preparazione dei campioni .....	4
	Inoculazione e lettura delle piastre .....	4
Sezione 8	Conferma dei risultati positivi .....	4
Sezione 9	Conferma di altri metodi .....	5
Sezione 10	Prestazioni del test e validazioni .....	5
Sezione 11	Riferimenti .....	5
Sezione 12	Cronologia delle revisioni .....	6

## Sezione 1 Introduzione

I coliformi sono un gruppo non tassonomico di batteri facoltativi anaerobi, gram negativi, non sporigeni, a forma di bastoncino che fermentano il lattosio producendo acido e gas. Il gruppo è costituito da batteri enterici come *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*. L'enumerazione dei batteri coliformi può essere utile per confermare l'igienizzazione dell'acqua per il consumo umano o dell'acqua non trattata. L'*Escherichia coli* è presente nell'intestino degli animali ed è abbondante nelle feci umane e animali. I batteri possono anche essere isolati dai campioni ambientali. I coliformi fecali sono spesso utilizzati come indicatori di contaminazione e della possibile presenza di organismi patogeni. Sebbene questi batteri siano generalmente non patogeni, possono causare infezioni negli ospiti immunocompromessi. La maggior parte dei metodi di enumerazione dei batteri coliformi può risultare dispendiosa in termini di tempo e costi. L'uso dei substrati cromogenici contenuti nei terreni ha consentito lo sviluppo di metodi più rapidi e semplici di rilevamento, differenziazione ed enumerazione dei batteri target.

## Sezione 2 RAPID'*E.coli* 2 - Principio

Il principio del terreno completo (RAPID'*E.coli* 2 supplementato) si basa sul rilevamento contemporaneo di due attività enzimatiche:  $\beta$ -D-glucuronidasi (GLUC) e  $\beta$ -D-galattosidasi (GAL), mediante due substrati cromogenici. La scissione del substrato specifico per GAL forma un precipitato che conferisce una colorazione verde alle colonie positive per questo enzima (coliformi). La scissione del substrato specifico per GLUC forma un precipitato che conferisce una colorazione rosa alle colonie positive per questo enzima (*E. coli*). I coliformi (GAL+/GLUC-) producono colonie di colore verde. L'*E. coli* (GAL+/GLUC+) produce colonie di colore da blu a viola a causa della sovrapposizione di entrambi i colori. La miscela selettiva contenuta nel supplemento consente di inibire la maggior parte della flora interferente presente nell'acqua.

## Sezione 3 Formula teorica

Peptoni	10 g
Cloruro di sodio	5 g
Estratto di lievito	3 g
Miscela cromogenica selettiva	6 g
Terreno di coltura agar	13 g
Acqua distillata	QSP 1.000 ml
Miscela selettiva	

---

pH finale a 25°C = 7,2 ± 0,2

## Sezione 4 Durata e conservazione

- Terreno di coltura agar disidratato e supplemento: Conservare a 2–8°C in una confezione accuratamente sigillata e in un luogo asciutto e buio

## Sezione 5 Materiali necessari ma non forniti

- Supplemento reidratato: Conservare per 7 giorni a 2–8°C in un luogo buio; per 3 mesi a -20°C con uno scongelamento
- Piastra preparata con il terreno di coltura disidratato: Conservare per 15 giorni a 2–8°C in una confezione accuratamente sigillata e in un luogo asciutto e buio

## Sezione 5 Materiali necessari ma non forniti

### Apparecchiatura

- Tutta la normale apparecchiatura di laboratorio
- Dispositivo di filtrazione
- 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, con precisione di  $\pm 1^\circ\text{C}$

### Materiali

- Pinze per manipolazione delle membrane
- Acqua distillata sterile
- Membrane di filtrazione sterili (Millipore HAWG 047 Tipo HA, 47 mm, 0,45  $\mu\text{m}$  )
- Piastre di Petri sterili (55 mm)
- Pipette sterili

## Sezione 6 Precauzioni, limitazioni d'uso e controllo qualità

### Precauzioni

- Rispettare le buone pratiche di laboratorio (EN ISO 8199). Indossare protezioni adeguate, come guanti e camici da laboratorio, quando si manipolano batteri vivi potenzialmente infettivi quali *E. coli* o coliformi.
- I terreni che sono entrati in contatto con campioni d'acqua devono essere considerati contaminati e smaltiti conformemente alle norme e ai regolamenti locali

- Evitare di intrappolare bolle d'aria sotto la membrana durante il suo posizionamento sul terreno di coltura agar. Uno scarso contatto tra membrana e terreno di coltura agar può produrre un risultato errato. Se necessario, appiattare delicatamente e con cautela la membrana utilizzando le pinze

## Limitazioni d'uso

- Per verificare e convalidare le prestazioni dei terreni di coltura, nei controlli qualità interni dei laboratori o nei test inter-laboratorio vengono comunemente utilizzati materiali di riferimento microbiologici quantitativi certificati (capsule, lenticole e pastiglie). A seconda del metodo di produzione, alcuni ceppi di raccolta possono presentare difficoltà di crescita a causa delle sollecitazioni fisiologiche sulle cellule; ciò, tuttavia, non compromette le prestazioni di fertilità del terreno di coltura utilizzato. Alcune pastiglie BioReference contenenti *E. coli* e altri ceppi di riferimento di coliformi potrebbero presentare rendimenti relativi inferiori (RY < 66%) sul terreno RAPID'*E.coli* 2 supplementato. Pertanto, per garantire l'integrità fisiologica delle cellule, si raccomanda la preparazione di una nuova sospensione calibrata da un ceppo coltivato su un terreno nutritivo. L'uso di altri materiali di riferimento commercializzati rimane possibile.

## 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](http://www.bio-rad.com)

## Sezione 7 Protocollo

### Preparazione del supplemento

1. Reidratare in condizioni asettiche il pellet liofilizzato aggiungendo 2,2 ml di acqua distillata nella fiala.
2. Agitare fino a sciogliere completamente il pellet.

### Preparazione del terreno disidratato

1. Agitare sempre il flacone prima dell'uso.
2. Sciogliere 37 g di polvere in 1 L di acqua distillata. Attendere 5 minuti e miscelare fino ad ottenere una sospensione omogenea.
3. Riscaldare lentamente, agitando frequentemente, quindi portare a ebollizione fino al completo scioglimento.
4. Dispensare, quindi sterilizzare in autoclave a  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  per 15 minuti.

## Sezione 8 Conferma dei risultati positivi

5. Raffreddare il terreno a  $47 \pm 2^\circ\text{C}$  prima di aggiungere il supplemento.
6. Un flacone di polvere da 500 g produce 13,5 L di terreno.

### Preparazione del terreno completo

1. In condizioni asettiche, aggiungere 2 ml di supplemento reidratato a 200 ml di terreno raffreddato a  $47 \pm 2^\circ\text{C}$  o 1-100 ml di terreno raffreddato a  $47 \pm 2^\circ\text{C}$ . Nelle fiale, dopo l'uso, rimarrà una quantità residua di supplemento (0,2 ml di supplemento per flacone da 200 ml (n. catalogo 12008041)).
2. Agitare accuratamente per omogeneizzare.
3. Dispensare su piastre di Petri e lasciare asciugare sul bancone.

### Preparazione dei campioni

1. La preparazione deve essere eseguita conformemente allo standard del prodotto in questione.

### Inoculazione e lettura delle piastre

1. Portare il terreno a temperatura ambiente.
2. In condizioni sterili, filtrare il volume di acqua da analizzare (ad esempio, 250 ml per un campione di acqua minerale) attraverso una membrana in base all'origine del campione.
3. Posizionare la membrana, con la superficie reticolata verso l'alto, sulla superficie del terreno, accertandosi che il contatto tra membrana e terreno di coltura agar sia completo.
4. Incubare la piastra a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  per  $21 \pm 3$  hr. (Metodo validato EPA:  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  for  $24 \pm 2$  hr).
5. I coliformi (diversi da *E. coli*) formano colonie di colore verde sul terreno di coltura agar RAPID'*E.coli* 2. *E. coli* può avere un aspetto variabile, dal blu scuro al viola (GLUC +) o grigio-blu (GLUC + debole) con un possibile alone viola intorno alla colonia.
6. Eseguire l'enumerazione dei coliformi totali sommando il numero di colonie blu scuro-viola, grigio-blu e verde.
7. Considerare solo le piastre che contengono massimo 110 colonie.
8. Registrare il numero totale di *E. coli* e/o coliformi per unità di volume di campione filtrato.


## Sezione 8 Conferma dei risultati positivi

Non applicabile

## Sezione 9 Conferma di altri metodi

Non applicabile

## Sezione 10 Prestazioni del test e validazioni

Certificazione	Ambito di applicazione	Protocollo di validazione	Protocollo di riferimento	Riferimento al certificato
NF VALIDATION	Acqua per il consumo umano	NF 148	EN ISO 9308-1	 BRD: 07/20-03/11 Metodi di analisi dell'acqua <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>
EPA VALIDATION	Acqua potabile trattata e non trattata	Alternative Test Protocol EPA-821-B-10-001	EPA 9221 B EPA 9221 F	<a href="http://www.epa.gov">www.epa.gov</a>

## Sezione 11 Riferimenti

American Public Health Association. 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition. American Public Health Association, Washington D.C.

Federal Register / Vol. 86, No. 100 / May 26, 2021 / Rules and Regulations.

NF EN ISO 9308 (09/2000): Qualità dell'acqua – Enumerazione di *Escherichia coli* e batteri coliformi: Metodo per filtrazione su membrana per acque contraddistinte da una ridotta flora batterica di fondo.

United States Environmental Protection Agency. January 2005. Manual for the Certification for Laboratories Analyzing Drinking Water, Fifth Edition, EPA 815-R-004, Office of Ground Water and Drinking Water, Technical Support Division, U.S. EPA, Cincinnati, OH.

United States Environmental Protection Agency. September 2010. EPA Microbiological Alternate Test procedure (ATP) Protocol for Drinking Water, Ambient Water, Wastewater, and Sewage Sludge Monitoring Methods, EPA-821-B-10-001, Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C.

## Sezione 12

### Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero di documento	Modifica
Luglio 2020	10000134990 Ver A	- Nuova struttura del documento - Modifica al numero di documento – versione precedente REC2_Rev 6
Giugno 2021	10000134990 Ver B	- Aggiunta validazione EPA e riferimenti - Corretto numero e logo AFNOR
Marzo 2023	10000134990 Ver C	- Aggiornamento GLP - Aggiornamento delle indicazioni di preparazione per allinearsi alla Norma

BIO-RAD è un marchio registrato di Bio-Rad Laboratories, Inc. 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** 82 080 007 7373 **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

10000134990 Ver C US/EG

Sig 0123



---

# RAPID'*E. coli* 2 Agar (Para teste em água)

## Guia do usuário

**Meio cromogênico seletivo usado para enumeração direta (sem confirmação) de colônias de *Escherichia coli* e outras bactérias coliformes em água para consumo humano e água não tratada**

Nº do catálogo 3563982, Meios de cultura preparados, 55 mm x 20 placas

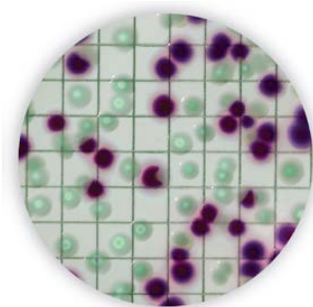
Nº do catálogo 3555297, pronto para uso, 200 ml x 6 frascos

Nº do catálogo 3555299, pronto para uso, 100 ml x 6 frascos

Nº do catálogo 3564024, Desidratado, 500 g

Nº do catálogo 12008041, Suplemento, 6 ampolas (para frascos de 200 ml)

Nº do catálogo 17005373, kit pronto para uso (para 200 ml), inclui ágar engarrafado e suplementos



**BIO-RAD**

# Índice

Seção 1	Introdução .....	1
Seção 2	Princípio RAPID' <i>E.coli</i> 2 .....	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, limitações de uso e controle de qualidade .....	2
	Precauções .....	2
	Limitações de uso.....	3
	Controle de qualidade.....	3
Seção 7	Protocolo.....	3
	Preparação do Suplemento.....	3
	Preparação do Meio Desidratado.....	3
	Preparação do Meio Completo .....	4
	Preparação da amostra .....	4
	Inoculação e Leitura de Meios de Cultura .....	4
Seção 8	Confirmação de Resultados Positivos .....	4
Seção 9	Confirmação de outros métodos.....	4
Seção 10	Desempenho e validação do teste .....	5
Seção 11	Referências.....	5
Seção 12	Histórico de Revisão .....	6

## Seção 1 Introdução

Os Coliformes são um grupo não taxonômico de bactérias exclusivamente gram-negativas, não formadoras de esporos, bactérias anaeróbias facultativas em forma de bastonete que fermentam lactose para produzir ácido e gás. O grupo é composto por bactérias entéricas como *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, e *Enterobacter*. A enumeração de bactérias coliformes pode ser útil para confirmar o saneamento da água para consumo humano ou água não tratada. A *Escherichia coli* é encontrada no intestino dos animais e é abundante nas fezes humanas e animais. A bactéria também pode ser isolada de amostras ambientais. Os coliformes fecais são frequentemente usados como indicadores de contaminação e possível presença de organismos patogênicos. Embora essas bactérias sejam geralmente não patogênicas, elas podem causar infecção em hospedeiros imunocomprometidos. Os métodos numéricos mais prováveis para enumeração de bactérias coliformes podem ser trabalhosos e caros. O uso de substratos cromogênicos em meios levou ao desenvolvimento de métodos mais rápidos e fáceis para detecção, diferenciação e enumeração de bactérias alvo.

## Seção 2 Princípio RAPID'*E.coli* 2

O princípio do meio completo (RAPID'*E.coli* 2 suplementado) se baseia na detecção simultânea de duas atividades enzimáticas:  $\beta$ -D-glucuronidase (GLUC) e  $\beta$ -D-galactosidase (GAL), por dois substratos cromogênicos. A clivagem do substrato específico de GAL forma um precipitado dando uma cor verde das colônias positivas para esta enzima (coliformes). A clivagem do substrato específico de GLUC forma um precipitado dando uma cor rosa das colônias positivas para esta enzima (*E. coli*). Os coliformes (GAL+/GLUC-) produzem colônias verdes. *E. coli* (GAL+/GLUC+) produz colônias de azul a violeta devido à sobreposição de ambas as cores. A mistura seletiva no suplemento inibe a principal flora interferente na água.

## Seção 3 Fórmula Teórica

Peptonas	10 g
Cloreto de sódio	5 g
Extrato de levedura	3 g
Mistura cromogênica seletiva	6 g
Agar	13 g
Água destilada	qsp 1,000 ml
Mistura seletiva	

---

pH final a 25°C = 7,2 ± 0,2

## Seção 4 Prazo de validade e armazenamento

- Ágar desidratado e suplemento: Armazenar 2–8°C em uma embalagem cuidadosamente vedada e em um ambiente seco e escuro
- Suplemento reidratado: Armazenar por 7 dias a 2–8°C em um local escuro; por 3 meses a -20°C com um degelo

## Seção 5 Materiais necessários, mas não fornecidos

- Meio de cultura preparado a partir do ágar desidratado: Armazene por 15 dias a 2–8°C em uma embalagem cuidadosamente selada em um local seco e escuro

## Seção 5

### Materiais necessários, mas não fornecidos

#### Equipamento

- Todo o equipamento comum de laboratório
- Dispositivo de filtragem
- Balança, sensibilidade de 0,1 g
- Agitador/homogeneizador
- Incubadora ou sala de incubação controlada termostaticamente, com precisão de  $\pm 1^\circ\text{C}$
- Banho-maria, preciso a  $\pm 1^\circ\text{C}$

#### Suprimentos

- Pinça para deposição de membranas
- Água destilada estéril
- Membranas de filtragem estéreis (47 mm, 0,45  $\mu\text{m}$  Millipore HAWG 047 Tipo HA)
- Placas de Petri estéreis (55 mm)
- Pipetas estéreis

## Seção 6

### Precauções, limitações de uso e controle de qualidade

#### Precauções

- Respeite as Boas Práticas de Laboratório (EN ISO 8199). É necessário o uso de proteção adequada, como luvas e jalecos, ao trabalhar com bactérias vivas potencialmente infecciosas, como *E. Coli* ou *coliformes*
- O meio que tiver entrado em contato com amostras de água deve ser considerado contaminado e descartado de acordo com as regras e regulamentos locais
- Evite a formação de bolhas de ar sob a membrana durante a sua colocação no ágar. Um mau contato membrana-ágar pode levar a um resultado incorreto. Se necessário, alise delicadamente e com cuidado a membrana com a pinça

## Limitações de uso

- Materiais de referência microbiológicos quantitativos certificados (cápsulas, lenticulas e pastilhas) são comumente usados em controles de qualidade laboratoriais internos ou testes interlaboratoriais para verificar e validar o desempenho dos meios de cultura. Dependendo do método de produção, algumas cepas de coleta podem apresentar dificuldades de crescimento devido ao estresse fisiológico das células que, no entanto, não põe em causa o desempenho da fertilidade do meio de cultura utilizado. Algumas pastilhas BioReference contendo *E. coli* e outras cepas de referência de coliformes podem apresentar rendimentos relativos mais fracos (RY <66%) em meio RAPID'*E.coli* 2 suplementado. Portanto, para garantir a integridade fisiológica das células, recomenda-se a preparação de uma suspensão calibrada fresca de uma cepa cultivada em meio nutritivo. O uso de outros materiais de referência comercializados continua sendo possível

## 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](http://www.bio-rad.com)

## Seção 7 Protocolo

### Preparação do Suplemento

1. Reidrate assepticamente o pellet liofilizado adicionando 2,2 ml de água destilada à ampola.
2. Agite até que o pellet esteja completamente dissolvido.

### Preparação do Meio Desidratado

1. Agite sempre a garrafa antes de usar.
2. Dissolva 37 g de pó em 1 L de água destilada. Aguarde 5 min e misture até obter uma suspensão homogênea.
3. Aqueça delicadamente, agitando com frequência, e deixe ferver até dissolver completamente.
4. Dispense e esterilize em autoclave a  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  por 15 min.
5. Resfrie o meio a  $47 \pm 2^\circ\text{C}$  antes de adicionar o suplemento.
6. Um frasco de 500 g de pó produz 13,5 L de meio.

## Preparação do Meio Completo

1. Adicione assepticamente 2 ml de suplemento reidratado a 200 ml de meio resfriado a  $47 \pm 2^\circ\text{C}$  ou 1 - 100 ml de meio resfriado a  $47 \pm 2^\circ\text{C}$ . Haverá suplemento residual nas ampolas após o uso (0,2 ml em suplemento para frasco de 200 ml (N° no catálogo 12008041).
2. Agite bem para homogeneizar.
3. Dispense em placas de Petri e deixe na bancada para secar.

## Preparação da amostra

1. A realizar de acordo com a norma do produto em causa.

## Inoculação e Leitura de Meios de Cultura

1. Leve o meio à temperatura ambiente.
2. Sob condições estéreis, filtre o volume de água a ser analisado (p.ex., 250 ml para uma amostra de água engarrafada) através de uma membrana de acordo com a origem da amostra.
3. Coloque a membrana, superfície hachurada, na superfície do meio, cuidando para que o contato membrana-ágar esteja completo.
4. Deixe incubar o meio de cultura a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  por  $21 \pm 3$  hr. (Método validado EPA:  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  for  $24 \pm 2$  hr).
5. Os coliformes (exceto *E. coli*) formam colônias verdes em ágar RAPID'*E.coli* 2 . O *E. coli* pode ter uma aparência variável, azul escuro a violeta (GLUC +) ou azul-acinzentado (GLUC + fraco) com um possível halo violeta ao redor da colônia.
6. Enumere o total de coliformes adicionando o número de colônias de azul escuro a violeta, azul acinzentado e verde.
7. Retenha apenas placas que contenham no máximo 110 colônias.
8. Registre o número total de *E. coli* e/ou coliformes por unidade de volume de amostra filtrada.

## Seção 8 Confirmação de Resultados Positivos


Não aplicável

## Seção 9 Confirmação de outros métodos

Não aplicável

## Seção 10

### Desempenho e validação do teste

Certificação	Escopo	Protocolo de Validação	Protocolo de Referência	Referência de Certificado
NF VALIDATION	Água para consumo humano	NF 148	EN ISO 9308-1	 BRD: 07/20-03/11 Water analysis methods <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>
EPA VALIDATION	Água potável tratada e não tratada	Alternative Test Protocol EPA-821-B-10-001	EPA 9221 B EPA 9221 F	<a href="http://www.epa.gov">www.epa.gov</a>

## Seção 11

### Referências

American Public Health Association. 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition. American Public Health Association, Washington D.C.

Federal Register / Vol. 86, No. 100 / May 26, 2021 / Rules and Regulations.

NF EN ISO 9308 (09/2000): Qualidade da água - Enumeração de *Escherichia coli* e bactérias coliformes: Método de filtração por membrana para águas com baixa flora bacteriana de fundo.

United States Environmental Protection Agency. January 2005. Manual for the Certification for Laboratories Analyzing Drinking Water, Fifth Edition, EPA 815-R-004, Office of Ground Water and Drinking Water, Technical Support Division, U.S. EPA, Cincinnati, OH.

United States Environmental Protection Agency. September 2010. EPA Microbiological Alternate Test procedure (ATP) Protocol for Drinking Water, Ambient Water, Wastewater, and Sewage Sludge Monitoring Methods, EPA-821-B-10-001, Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C.

## Seção 12 Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Julho de 2020	10000134990 Ver A	- Novo design de documento - Alteração do número do documento – versão anterior REC2 Ver 6
Junho de 2021	10000134990 Ver B	- Adicionada validação EPA e referências - Correção do logotipo e número AFNOR
Março de 2023	10000134990 Ver C	- Referência BPL atualizada - Instruções de preparo atualizadas para alinhar com o padrão.

BIO-RAD é uma marca comercial da Bio-Rad Laboratories, Inc. 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** 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** 82 080 007 7373 **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

10000134990 Ver C US/EG

Sig 0123



---

# RAPID'*E. coli* 2 Agar (para análisis de aguas)

## Guía del usuario

**Medio cromogénico selectivo utilizado para el recuento directo (sin confirmación) de las colonias de *Escherichia coli* y otras bacterias coliformes en agua de consumo humano y en agua no tratada**

Referencia 3563982, placas preparadas, 55 mm x 20 placas

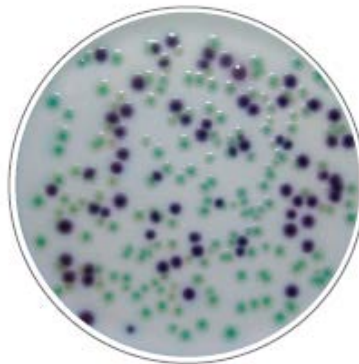
Referencia 3555297, listo para usar, 200 ml x 6 frascos

Referencia 3555299, listo para usar, 100 ml x 6 frascos

Referencia 3564024, deshidratado, 500 g

Referencia 12008041, suplemento, 6 viales (para frascos de 200 ml)

Referencia 17005373, kit listo para usar (para 200 ml), incluye suplementos y agar en frascos



**BIO-RAD**

# Tabla de Contenidos

Apartado 1	Introducción .....	1
Apartado 2	RAPID' <i>E.coli</i> 2 Principio.....	1
Apartado 3	Fórmula teórica .....	1
Apartado 4	Vida útil y conservación .....	1
Apartado 5	Materiales necesarios, pero no suministrados .....	2
	Equipo .....	2
	Fungibles .....	2
Apartado 6	Precauciones, limitaciones de uso y control de calidad .....	2
	Precauciones .....	2
	Limitaciones de uso .....	3
	Control de calidad.....	3
Apartado 7	Protocolo.....	3
	Preparación del suplemento .....	3
	Preparación del medio deshidratado .....	3
	Preparación del medio completo .....	4
	Preparación de las muestras .....	4
	Inoculación y lectura de la placa.....	4
Apartado 8	Confirmación de resultados positivos .....	4
Apartado 9	Confirmación de otros métodos.....	4
Apartado 10	Aplicaciones del ensayo y validaciones .....	5
Apartado 11	Referencias.....	5
Apartado 12	Historial de revisiones.....	6

## Apartado 1 Introducción

Los Coliformes son un grupo no taxonómico de bacterias que son exclusivamente gram-negativas, no forman esporas, son anaerobias facultativas, en forma de bacilo y fermentan la lactosa para producir ácido y gas. El grupo está compuesto por bacterias entéricas como *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. El recuento de bacterias coliformes puede ser útil a fin de verificar el estado de saneamiento del agua para consumo humano o del agua no tratada. *Escherichia coli* se encuentra en el intestino de los animales y abunda en las heces humanas y animales. Esta bacteria también se puede aislar de muestras ambientales. Los coliformes fecales suelen usarse como indicadores de contaminación y de la posible presencia de organismos patógenos. Aunque estas bacterias son generalmente no patógenas, pueden causar infección en huéspedes inmunodeprimidos. Los métodos basados en la estrategia del número más probable para el recuento de bacterias coliformes pueden resultar laboriosos y costosos. La utilización de sustratos cromógenos en los medios ha permitido desarrollar métodos más rápidos y sencillos para la detección, diferenciación y recuento de las bacterias de interés.

## Apartado 2 RAPID'*E.coli* 2 Principio

El principio del medio completo (RAPID'*E.coli* 2 suplementado) se basa en la detección simultánea de dos actividades enzimáticas:  $\beta$ -D-glucuronidasa (GLUC) y  $\beta$ -D-galactosidasa (GAL), por dos sustratos cromogénicos. La escisión del sustrato específico de GAL forma un precipitado que confiere un color verde a las colonias positivas para esta enzima (coliformes). La escisión del sustrato específico de GLUC forma un precipitado que confiere un color rosa a las colonias positivas para esta enzima (*E. coli*). Las coliformes (GAL+/GLUC-) producen colonias verdes. Las *E. coli* (GAL+/GLUC+) producen colonias que van del azul al violeta debido a la superposición de ambos colores. La mezcla selectiva del suplemento inhibe la principal flora interferente presente en el agua.

## Apartado 3 Fórmula teórica

Peptonas	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Extracto de levadura	3 g
Mezcla cromogénica selectiva	6 g
Agar	13 g
Agua destilada	c.s.p. 1.000 ml
Mezcla selectiva	

---

pH final a 25°C = 7,2 ± 0,2

## Apartado 4 Vida útil y conservación

- Agar y suplemento deshidratados: Almacenar a 2-8°C en un paquete debidamente cerrado en un lugar seco y oscuro.

## Apartado 5 Materiales necesarios, pero no suministrados

- Suplemento rehidratado: conservar durante 7 días a 2-8°C en un lugar oscuro; durante 3 meses a -20°C con una descongelación
- Placa con preparado de agar deshidratado: Almacenar durante 15 días a 2-8°C en un paquete debidamente cerrado en un lugar seco y oscuro.

## Apartado 5 Materiales necesarios, pero no suministrados

### Equipo

- Todo el instrumental de laboratorio habitual
- Dispositivo de filtrado
- Balanza, sensibilidad de 0,1 g
- Agitador / homogeneizador
- Incubadora o sala de incubación controlada por termostato, grado de precisión  $\pm 1^\circ\text{C}$
- Baño de agua termostático, grado de precisión  $\pm 1^\circ\text{C}$

### Fungibles

- Pinzas para manipular las membranas defiltración
- Agua destilada estéril
- Membranas de filtración estériles (47 mm, 0,45  $\mu\text{m}$  Millipore HAWG 047 tipo HA)
- Placas de Petri estériles (55 mm)
- Pipetas estériles

## Apartado 6 Precauciones, limitaciones de uso y control de calidad

### Precauciones

- Respetar las buenas prácticas de laboratorio (EN ISO 8199). Se deben utilizar protecciones adecuadas, como guantes y batas de laboratorio, cuando se trabaje con bacterias vivas potencialmente infecciosas como las *E. coli* o coliformes
- Los medios que hayan estado en contacto con muestras de agua deben considerarse contaminados y deben desecharse de conformidad con las normas y reglamentos locales

## Apartado 7 Protocolo

- Debe evitarse que queden atrapadas burbujas de aire debajo de la membrana durante su colocación en el agar. Un contacto deficiente entre la membrana y el agar puede llevar a un resultado erróneo. Si es necesario, aplanar la membrana con las pinzas suave y cuidadosamente

## Limitaciones de uso

- A fin de comprobar y validar el rendimiento de los medios de cultivo, se suelen utilizar materiales de referencia microbiológicos cuantitativos certificados (cápsulas, lentículas y pastillas) en los controles de calidad internos de los laboratorios o en las pruebas entre laboratorios. Dependiendo del método de producción, algunas cepas de colección pueden presentar dificultades de crecimiento debido al estrés fisiológico sobre las células, aunque esto no pone en duda el rendimiento del medio de cultivo utilizado en términos de fertilidad. Algunas pastillas BioReference que contienen *E. coli* y otras cepas de referencia de coliformes podrían presentar rendimientos relativos más débiles (RR < 66%) en el medio RAPID'*E.coli* 2 suplementado. Por tanto, con objeto de garantizar la integridad fisiológica de las células, se recomienda la preparación de una suspensión calibrada fresca de una cepa cultivada en un medio nutritivo. Queda la opción de utilizar otros materiales de referencia disponibles en el mercado.

## 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 más información sobre la seguridad de los productos en las fichas de datos de seguridad y el certificado de análisis, visite [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)

## Apartado 7 Protocolo

### Preparación del suplemento

1. Rehidratar asépticamente el liofilizado añadiendo para ello 2,2 ml de agua destilada en el frasco.
2. Agitar hasta que el líofilo se disuelva por completo.

### Preparación del medio deshidratado

1. Agitar siempre el frasco antes de usar.
2. Disolver 37 g de polvo en 1 l de agua destilada. Esperar 5 minutos y mezclar hasta obtener una suspensión homogénea.
3. Calentar suavemente, agitando con frecuencia, y a continuación llevar a ebullición hasta que se disuelva por completo.
4. Dispensar y luego esterilizar en un autoclave  $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

## Apartado 8 Confirmación de resultados positivos

5. Enfriar el medio a  $47 \pm 2^\circ\text{C}$  antes de añadir el suplemento.
6. Una botella de 500 g de polvo deshidratado permite obtener 13,5 l de medio.

### Preparación del medio completo

1. Añadir asépticamente 2 ml de suplemento rehidratado a 200 ml de medio refrigerado a  $47 \pm 2^\circ\text{C}$  o 1 ml-100 ml de medio refrigerado a  $47 \pm 2^\circ\text{C}$ . Quedará suplemento residual en los frascos después de su uso (0,2 ml en suplemento por frasco de 200 ml (Referencia 12008041)).
2. Agitar exhaustivamente para homogeneizar.
3. Dispensar en placas de Petri y dejar en el mesado para secar.

### Preparación de las muestras

1. Debe realizarse de acuerdo con la norma del producto en cuestión.

### Inoculación y lectura de la placa

1. Llevar el medio a temperatura ambiente.
2. En condiciones de esterilidad, filtrar el volumen de agua a analizar (por ejemplo, 250 ml para una muestra de agua embotellada) a través de una membrana en función del origen de la muestra.
3. Colocar la membrana, con el lado de la cuadrícula hacia arriba, en la superficie del medio, procurando que el contacto membrana-agar sea completo.
4. Incubar la placa a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  durante  $21 \pm 3$  hr. (Método validado por EPA:  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  for  $24 \pm 2$  hr).
5. Las coliformes (salvo la *E. coli*) forman colonias verdes en el agar del RAPID'*E.coli* 2. La *E. coli* puede tener una apariencia variable, de azul oscuro a violeta (GLUC +) o azul grisáceo (GLUC + débil) con un posible halo violeta rodeando la colonia.
6. Realizar el recuento total de coliformes sumando el número de colonias de azul oscuro a violeta, azul grisáceo y verde.
7. Conservar solo las placas que contengan un máximo de 110 colonias.
8. Registrar el número total de *E. coli* y / o coliformes por unidad de volumen de muestra filtrada.

## Apartado 8 Confirmación de resultados positivos


No aplicable

## Apartado 9 Confirmación de otros métodos

No aplicable

## Apartado 10

### Aplicaciones del ensayo y validaciones

Certificación	Alcance	Protocolo de validación	Protocolo de referencia	Referencia de certificado
NF VALIDATION	Agua para consumo humano	NF 148	EN ISO 9308-1	 BRD: 07/20–03/11 Métodos de análisis del agua <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>
EPA VALIDATION	Agua potable con y sin tratamiento	Alternative Test Protocol EPA-821-B-10-001	EPA 9221 B EPA 9221 F	<a href="http://www.epa.gov">www.epa.gov</a>

## Apartado 11

### Referencias

American Public Health Association. 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition. American Public Health Association, Washington D.C.

Federal Register / Vol. 86, No. 100 / May 26, 2021 / Rules and Regulations.

NF EN ISO 9308 (09/2000): Calidad del agua. Recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes: Método de filtración por membrana para aguas con bajo contenido de microbiota.

United States Environmental Protection Agency. January 2005. Manual for the Certification for Laboratories Analyzing Drinking Water, Fifth Edition, EPA 815-R-004, Office of Ground Water and Drinking Water, Technical Support Division, U.S. EPA, Cincinnati, OH.

United States Environmental Protection Agency. September 2010. EPA Microbiological Alternate Test procedure (ATP) Protocol for Drinking Water, Ambient Water, Wastewater, and Sewage Sludge Monitoring Methods, EPA-821-B-10-001, Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C.

## Apartado 12

### Historial de revisiones

Fecha de publicación	Número de documento	Cambio
Julio 2020	10000134990 Ver A	- Nuevo diseño de documento - Cambio en el número de documento - versión anterior REC2_Rev 6
Junio 2021	10000134990 Ver B	- Adición de validación EPA y referencias - Corrección de logotipo y número AFNOR
Marzo 2023	10000134990 Ver C	- Referencia GLP actualizada - Instrucciones para preparación actualizadas para alinearlas con el estándar

BIO-RAD es una marca registrada de Bio-Rad Laboratories, Inc. Todas las marcas comerciales aquí indicadas son propiedad de sus respectivos propietarios.



**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** 82 080 007 7373 **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

10000134990 Ver C US/EG

Sig 0123