

---

# RAPID' *E.coli* 2 Agar

## User Guide

**Selective chromogenic medium used for direct enumeration (without confirmation) of colonies of *Escherichia coli* and other coliform bacteria in all products for human consumption, animal feed and environmental samples**

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



**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 .....	1
	Equipment.....	2
	Supplies .....	2
Section 6	Precautions, Limitations of Use, and Quality Control .....	2
Section 7	Protocol.....	3
	Preparation of Dehydrated Medium.....	3
	Sample Preparation .....	3
	Inoculation and Plate Reading.....	4
Section 8	Confirmation of Positive Results .....	4
Section 9	Confirmation of Other Methods.....	4
Section 10	Test Performance and Validation .....	4
Section 11	References.....	6
Section 12	Revision History.....	7

## Section 1

### Introduction

Coliform is a non-taxonomic group of bacteria that are exclusively gram-negative, non-spore forming, facultative anaerobic, rod-shaped bacteria 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 or food processing environments. *Escherichia coli* is found in animals' intestine 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. The fecal coliform group consists primarily of *E. coli* and some thermotolerant *Klebsiella*. While these bacteria are generally nonpathogenic, they can cause infection in immunocompromised hosts. Traditional 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 medium relies on the simultaneous detection of two enzymatic activities,  $\beta$ -D-glucuronidase (GLUC) and  $\beta$ -D-galactosidase (GAL). These enzymes react with the chromogenic substrates present in the medium to produce specific colors. Substrate specific to GLUC leads to pink coloration of colonies positive for this enzyme. Substrate specific to GAL leads to blue coloration of colonies positive for this enzyme. The detection of GLUC makes the culture medium highly specific; *E. coli* is, in fact, one of the only species of coliforms to possess this enzyme. *E. coli* (GAL+/GLUC+) form violet to pink colonies. Other coliforms (GAL+/GLUC-) form blue colonies. Other bacteria are inhibited by the selective mixture.

## 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

---

Final pH at 25°C = 7.2 ± 0.2

## Section 4

### Shelf Life and Storage

- Dehydrated: 15–25°C in carefully sealed package in a dry and dark place
- Ready-to-use bottles: 2–8°C in a dark place
- Plate prepared from the dehydrated: 1 month at 2–8°C in a dark place

## Section 5 Materials Required but Not Supplied

### Equipment

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

### Supplies

- Sterile petri dishes (90 mm)
- Sterile pipets
- Sterile weigh bags

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

### Precautions

- Respect Good Laboratory Practice (EN ISO 7218). Appropriate protection, such as gloves and lab coats, should be worn when working with potentially infectious live bacteria
- Media that have come in contact with food samples should be considered contaminated and should be disposed of in accordance with local rules and regulations
- For ready-to-use medium prepared in advance, avoid prolonged overheating (in general, 20 min is enough to obtain a homogenous liquid agar)
- The agar must not undergo more than 2 regeneration cycles
- In order to conserve optimal quality, do not store molten agar ( $44 - 47^{\circ}\text{C}$ ) for more than 6 hr
- The medium may look frothy after it solidifies in bottles. It nevertheless conserves all its qualities when the froth disappears after melting and shaking
- As development of colonies at the bottom of the petri dish may interfere with reading, limit the period between deposition of the inoculum at the bottom of the dish and dispensing of the culture medium

## Section 7

- It is preferable to use a double-layered medium at 37°C for the enumeration of *E. coli* and coliforms in matrices containing abundant mesophilic flora (such as raw untreated milk, raw meat). The aim of the second layer is to limit invasion of the surface, which can interfere with reading

### Limitations of Use

- A few  $\beta$ -D-glucuronidase–negative strains of *E. coli* exist; for example, *E. coli* O157
- Some serovars of *Salmonella* and a few species of *Shigella* possess the enzyme  $\beta$ -D-lucuronidase (<1.5%)

### 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 Dehydrated Medium

1. Always shake bottle before use.
2. Dissolve 37 g of powder in 1 L of distilled water and mix until a homogenous suspension is obtained.
3. Wait 5 min and mix until a homogeneous solution is obtained.
4. Heat gently, agitating frequently, bringing to a boil until completely dissolved.
5. Dispense and then autoclave at 121°C for 15 min.
6. Cool medium to 44–47°C before use.
7. One 500 g bottle of powder makes 13.5 L of medium.

### Sample Preparation

Dilute sample according to the standard method applicable to the product concerned.

### Inoculation and Plate Reading

1. Using a sterile pipet, transfer 1 ml of sample to be tested (liquid product) or 1 ml of stock suspension (other products) and/or 1 ml of its decimal dilutions to a sterile petri dish.

## Section 8

2. Pour approximately 15 ml of melted medium, cooled to 44–47°C onto the sample. Homogenize by swirling.
3. Leave to solidify on a cool flat surface.
4. Turn the dishes over and incubate at:
  - a. 37 ± 1°C for 21 ± 3 hr for simultaneous enumeration of *E. coli* and other coliforms
  - b. 44 ± 1°C for 21 ± 3 hr for enumeration of *E. coli*
5. In the context of AOAC Validation, both 37°C and 44°C are validated for the simultaneous enumeration of *E. coli* and other coliforms.
6. Typical colonies of *E. coli* are violet to pink. Typical colonies of coliforms other than *E. coli* are blue.
7. For enumeration, select only dishes containing fewer than 150 characteristic colonies and fewer than 300 colonies in all.
8. As *E. coli* is a member of the coliform group, total coliforms are enumerated by added together blue and violet colonies.
9. Refer to EN ISO 7218 standard for inoculation, colony counting, calculation, and expression of results.
10. After the incubation step, plates can be stored at 2–8°C for 72 hr.


## 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
AOAC-RI	Raw ground beef, raw boneless pork, fermented sausage, processed ham, processed turkey, frozen turkey breast, raw ground chicken, cottage cheese,	Performance Tested Methods	AOAC Official Method 966.24	 License# 050601

Section 10

	processed ricotta cheese, raw milk, and dry infant formula			
NF VALIDATION	All human food products, animal feed and environmental samples ( <i>E. coli</i> at 37°C)	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2	 <p>BRD: 07/07 – 12/04 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Certified by AFNOR Certification <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a></p>
NF VALIDATION	All human food products ( <i>E. coli</i> at 44°C)	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2	 <p>BRD: 07/01–07/93 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Certified by AFNOR Certification <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a></p>
NF VALIDATION	All human food products, animal feed and environmental samples (coliforms at 37°C)	EN ISO 16140-2	ISO 4832	 <p>BRD: 07/08 – 12/04 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Certified by AFNOR Certification <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a></p>
NordVal	All food products intended for human consumption	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2 ISO 4832	 <p>NordVal# 020</p>

## Section 11 References

AOAC Official Method 966.24: Coliform Group and *Escherichia coli*.

Grand M and Baumgartner A (1996). Chim Alim Hyg 623–630.

ISO 16649-2 (July 2001): Food microbiology – Horizontal method for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide.

ISO 4832 (July 2006): Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique.

ISO 7218:2007/AMD1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations

ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 18593: 2018. Microbiology of the food chain - Horizontal methods for surface sampling

Majchrzak V et al. (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. April 27–29, Lille, France.

Moini R et al. (1996). Indust Aliment 793–796.

Ochin D et al. (1993). New method for rapid detection and enumeration of *Escherichia coli* in food products. Colloque Société Française de Microbiologie. April 28–29, Paris, France.

Ochin D et al. (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. September 12–15, London, UK.



## Section 12

### Revision History

Release date	Document number	Change
November 2020	10000127899 Ver A	- Major change - New document design - Document number change – previous version RAPID'E.coli 2_V05_05-10-15
December 2022	10000127899 Ver B	- Extension of NF Validation for environmental samples - Plate storage after incubation
March 2023	10000127899 Ver C	- Extension of NF Validation scope for animal feed

Visit [www.bio-rad.com/rapidmedia](http://www.bio-rad.com/rapidmedia) for more information on our complete range of RAPID chromogenic media.

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

---

# RAPID'*E.coli* 2 Agar

## Guide d'utilisation

Milieu chromogénique sélectif pour le dénombrement direct (sans confirmation) de colonies d'*Escherichia coli* et d'autres bactéries coliformes dans les produits alimentaires destinés à la consommation humaine et animale et les échantillons de l'environnement

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



**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
Section 7	Protocole .....	3
	Préparation du milieu de culture déshydraté .....	3
	Préparation de l'échantillon .....	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 .....	7
Section 12	Historique des révisions .....	8

## 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 ou des environnements de transformation alimentaire. *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. Le groupe des coliformes fécaux se compose principalement d'*E. coli* et de certaines *Klebsiella* thermotolérantes. Même si ces bactéries sont généralement non pathogènes, elles peuvent causer une infection chez des hôtes immunovulnérables. Les méthodes classiques de dénombrement des coliformes peuvent s'avérer contraignantes et coûteuses. L'utilisation de substrats chromogènes dans les milieux a permis l'élaboration 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 repose sur la détection simultanée de deux activités enzymatiques,  $\beta$ -D-glucuronidase (GLUC) et  $\beta$ -D-galactosidase (GAL). Ces enzymes réagissent avec les substrats chromogènes présents dans le milieu pour produire des couleurs spécifiques. Le substrat spécifique de la GAL entraîne la coloration en rose des colonies positives pour cette enzyme. Le substrat spécifique de la GLUC entraîne la coloration en bleu des colonies positives pour cette enzyme. La détection de la GLUC confère une spécificité élevée au milieu de culture ; *E. coli* est en fait l'une des seules espèces de coliformes à posséder cette enzyme. Les *E. coli* (GAL+/GLUC+) forment des colonies violettes à roses. Les autres coliformes (GAL+/GLUC-) forment des colonies bleues. Les autres bactéries sont inhibées par le mélange sélectif.

## Section 3

### Formule théorique

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

---

pH final à 25 °C = 7,2 ± 0,2

## Section 4

### Durée de conservation et stockage

- Base déshydratée : 15–25 °C en emballage soigneusement scellé, dans un endroit sec et à l'abri de la lumière
- Flacons prêts à l'emploi : 2–8 °C à l'abri de la lumière
- Boîte préparée à partir de la base déshydratée : 1 mois à 2–8 °C à l'abri de la lumière

## Section 5

### Matériel requis non fourni

#### Matériel

- Tout le matériel de laboratoire habituel
- Plaque chauffante
- Balance, sensibilité 0,1 g
- Agitateur/homogénéisateur
- Étuve ou enceinte thermostatique, précision  $\pm 1$  °C
- Bain-marie

#### Produits

- Boîtes de Pétri stériles ( $\varnothing$  90 mm)
- Pipettes stériles
- Sacs de pesée stériles

## Section 6

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

#### Précautions

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (EN ISO 7218). Porter un équipement de protection approprié, par exemple des gants et une blouse de laboratoire, pour travailler avec des bactéries vivantes potentiellement infectieuses.
- Les milieux qui sont entrés en contact avec des échantillons alimentaires doivent être considérés comme contaminés et doivent être éliminés conformément aux règles et réglementations locales.
- Pour un milieu prêt à l'emploi préparé à l'avance, éviter toute surchauffe prolongée (en général, 20 min suffisent pour obtenir une gélose liquide homogène).
- La gélose ne doit pas subir plus de 2 cycles de régénération.
- Afin de conserver une qualité optimale, la gélose fondue (44-47 °C) ne doit pas être conservée plus de 6 hr.
- Le milieu peut avoir un aspect mousseux après solidification en flacons. Il conserve cependant toutes ses qualités lorsque la mousse disparaît après fonte et agitation.

## Section 7

- Étant donné que le développement de colonies au fond de la boîte de Pétri est susceptible de perturber la lecture, limiter le délai entre le dépôt de l'inoculum au fond de la boîte et la distribution du milieu de culture.
- Il est préférable d'utiliser un milieu à deux couches à 37 °C pour le dénombrement d'*E.coli* et de coliformes dans les matrices qui contiennent une abondante flore mésophile (par exemple le lait cru non traité, la viande crue). La seconde couche permet de limiter l'invasion de la surface, laquelle peut perturber la lecture.

### Limites d'utilisation

- Il existe quelques souches d'*E. coli*  $\beta$ -D-glucuronidase négative, par exemple, *E. coli* O157.
- Certains sérovars de *Salmonella* et quelques espèces de *Shigella* possèdent l'enzyme  $\beta$ -D-glucuronidase (< 1,5 %).

### 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 milieu de culture déshydraté

1. Toujours agiter le flacon avant utilisation.
2. Dissoudre 37 g de poudre dans 1 L d'eau distillée et mélanger jusqu'à obtenir une suspension homogène.
3. Attendre 5 min et mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène.
4. Chauffer doucement en mélangeant fréquemment, puis amener à ébullition jusqu'à dissolution complète.
5. Distribuer puis soumettre à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min.
6. Faire refroidir le milieu de culture à 44–47 °C avant utilisation.
7. 500 g de poudre permettent de reconstituer 13,5 L de milieu.

## Préparation de l'échantillon

Diluer l'échantillon conformément à la méthode normalisée applicable au produit concerné.

## Inoculation et lecture

1. À l'aide d'une pipette stérile, transférer 1 ml d'échantillon à analyser (produit liquide) ou 1 ml de suspension mère (autres produits) et/ou 1 ml de ses dilutions décimales dans une boîte de Pétri stérile.
2. Verser environ 15 ml de milieu fondu, refroidi à 44–47 °C, sur l'échantillon. Homogénéiser en mélangeant.
3. Laisser solidifier sur une surface plane et froide.
4. Retourner les boîtes et incuber à :
  - a. 37 ± 1 °C pendant 21 ± 3 hr pour le dénombrement simultané d'*E.coli* et d'autres coliformes
  - b. 44 ± 1 °C pendant 21 ± 3 hr pour le dénombrement d'*E.coli*
5. Dans le contexte de la validation AOAC, les deux températures 37 °C et 44 °C sont validées pour le dénombrement simultané d'*E. coli* et d'autres coliformes.
6. Les colonies typiques d'*E. coli* sont de couleur violette à rose. Les colonies typiques de coliformes autres qu'*E. coli* sont de couleur bleue.
7. Pour le dénombrement, retenir uniquement les boîtes contenant moins de 150 colonies caractéristiques et moins de 300 colonies au total.
8. *E. coli* étant un membre du groupe des coliformes, le dénombrement des coliformes totaux s'obtient en faisant la somme des colonies bleues et violettes.
9. Consulter la norme EN ISO 7218 pour obtenir des informations sur l'inoculation, le comptage des colonies, les calculs et l'expression des résultats.
10. Après l'étape d'incubation, les boîtes peuvent être stockées à 2–8 °C pendant 72 hr

## Section 8

### Confirmation des résultats positifs

Sans objet.




## Section 9

### Confirmation d'autres méthodes



Sans objet.

## Section 10

### Performance du test et validations

Certification	Domaine	Protocole de validation	Protocole de référence	Référence de certificat
AOAC-RI	Bœuf haché cru, porc désossé cru, saucisse fermentée, jambon traité, viande de dinde transformée, poitrine de dinde congelée, poulet haché cru, fromage cottage, fromage ricotta transformé, lait cru et substitut de lait maternel sous forme sèche.	Performance Tested Methods	AOAC Official Method 966.24	 License n° 050601
NF VALIDATION	Tous les produits alimentaires destinés à la consommation humaine, l'alimentation animale et les échantillons de l'environnement ( <i>E. coli</i> à 37°C)	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2	 BRD : 07/07 – 12/04 MÉTHODES ANALYTIQUES ALTERNATIVES POUR LE SECTEUR AGRO-ALIMENTAIRE Certifié par AFNOR Certification <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>
NF VALIDATION	Tous les produits alimentaires destinés à la consommation humaine ( <i>E. coli</i> à 44°C)	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2	 BRD : 07/01 – 07/93 MÉTHODES ANALYTIQUES ALTERNATIVES POUR LE SECTEUR AGRO-ALIMENTAIRE Certifié par AFNOR Certification <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>



<p>NF VALIDATION</p>	<p>Tous les produits alimentaires destinés à la consommation humaine, l'alimentation animale et les échantillons de l'environnement (coliformes à 37°C)</p>	<p>EN ISO 16140-2</p>	<p>ISO 4832</p>	 <p>BRD : 07/08 – 12/04</p> <p>MÉTHODES ANALYTIQUES ALTERNATIVES POUR LE SECTEUR AGRO-ALIMENTAIRE Certifié par AFNOR Certification <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a></p>
<p>NordVal</p>	<p>Tous les produits alimentaires destinés à la consommation humaine</p>	<p>EN ISO 16140-2</p>	<p>ISO 16649-2 ISO 4832</p>	 <p>NordVal n° 020</p>

## Section 11

### Références

AOAC Official Method 966.24: Coliform Group and *Escherichia coli*.

Grand M and Baumgartner A (1996). Chim Alim Hyg 623–630.

ISO 16649-2 (juillet 2001) : Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* bêta-glucuronidase positive — Partie 2 : Technique de comptage des colonies à 44 degrés C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl bêta-D-glucuronate.

ISO 4832 (juillet 2006) : Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes — Méthode par comptage des colonies.

ISO 7218:2007/AMD1:2013 – Microbiologie des aliments—Exigences générales et recommandations.

ISO 6887-1:2017 – Microbiologie de la chaîne alimentaire – Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique – Partie 1 : Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.

ISO 18593:2018 - Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthodes horizontales pour les prélèvements de surface

Majchrzak V et al. (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. April 27–29, Lille, France.

Moini R et al. (1996). Indust Aliment 793–796.

Ochin D et al. (1993). New method for rapid detection and enumeration of *Escherichia coli* in food products. Colloque Société Française de Microbiologie. April 28–29, Paris, France.

Ochin D et al. (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. September 12–15, London, UK.

## Section 12

# Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Novembre 2020	10000127899 Ver A	- Modification importante - Nouvelle conception de document - Modification du numéro de document – version précédente RAPID' <i>E.coli</i> 2_V05_05-10-15
Décembre 2022	10000127899 Ver B	- Extension NF Validation pour les échantillons de l'environnement - Stockage des boîtes après incubation
Mars 2023	10000127899 Ver C	- Extension NF validation pour l'alimentation animale

Visitez [www.bio-rad.com/rapidmedia](http://www.bio-rad.com/rapidmedia) pour obtenir plus d'informations sur la gamme complète de milieux chromogènes RAPID.

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

10000127899 Ver C US/EG

Sig 0123

---

# RAPID'*E.coli* 2 Agar

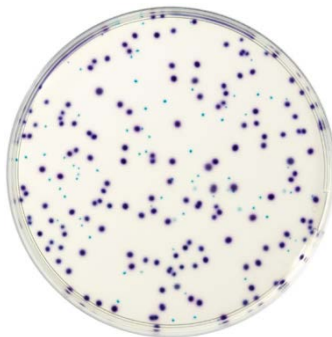
## Anwenderhandbuch

**Selektives chromogenes Medium für die direkte Zählung (ohne Bestätigung) von Kolonien von *Escherichia coli* und anderen Coliformen in allen Produkten für den menschlichen Verzehr, in Futtermitteln und Umweltproben**

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

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

Katalog-Nr. 3564024, dehydriert, 500 g



**BIO-RAD**

# Inhaltsverzeichnis

Abschnitt 1	Einleitung .....	1
Abschnitt 2	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
Abschnitt 7	Protokoll .....	3
	Vorbereitung des dehydrierten Mediums.....	3
	Probenvorbereitung .....	4
	Beimpfung und Ablesen der Platten.....	4
Abschnitt 8	Bestätigung positiver Ergebnisse .....	4
Abschnitt 9	Bestätigung anderer Methoden .....	4
Abschnitt 10	Testleistung und Testvalidierungen .....	5
Abschnitt 11	Literatur .....	7
Abschnitt 12	Revisionshistorie .....	8

## Abschnitt 1

### Einleitung

Coliforme 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 Wasser oder des Umfelds der Lebensmittelverarbeitung 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 im Kot/Stuhl werden häufig als Indikatoren für eine Kontamination und das mögliche Vorhandensein krankheitserregender Organismen verwendet. Die Gruppe der Coliformen im Kot/Stuhl besteht hauptsächlich aus *E. coli* und einigen thermotoleranten *Klebsiella*. Zwar sind diese Bakterien im Allgemeinen nicht pathogen, bei einem immungeschwächten Wirt können sie aber eine Infektion verursachen. Herkömmliche Methoden zur Zählung coliformer Bakterien sind zeit- und kostenaufwändig. Durch die Verwendung chromogener Substrate im Medium konnten schnellere und einfachere Methoden zum Nachweis, zur Differenzierung und zur Zählung der Zielbakterien entwickelt werden.

## Abschnitt 2

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

Das Prinzip des Mediums beruht auf dem gleichzeitigen Nachweis von zwei enzymatischen Aktivitäten, der  $\beta$ -D-Glucuronidase (GLUC) und der  $\beta$ -D-Galactosidase (GAL). Diese Enzyme gehen mit den im Medium vorhandenen chromogenen Substraten eine bestimmte Farbreaktion ein. GLUC-Substrate führen zu einer Rosafärbung der Kolonien, die für dieses Enzym positiv sind. GAL-Substrate führen zu einer Blaufärbung der Kolonien, die für dieses Enzym positiv sind. Durch den Nachweis von GLUC ist das Kulturmedium hochspezifisch. Tatsächlich zählt *E. coli* zu den einzigen Arten von Coliformen, die dieses Enzym aufweisen. *E. coli* (GAL+/GLUC+) bilden violette bis rosafarbene Kolonien. Andere Coliforme (GAL+/GLUC-) bilden blaue Kolonien. Das Wachstum anderer Bakterien wird durch die selektive Mischung gehemmt.

## Abschnitt 3

### Theoretische Zusammensetzung

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

---

Finaler pH-Wert bei 25°C = 7,2 ± 0,2

## Abschnitt 4

### Haltbarkeit und Lagerung

- Dehydriert: Trocken und lichtgeschützt in der sorgfältig verschlossenen Packung bei 15–25°C.
- Flaschen mit gebrauchsfertigem Agar: Lichtgeschützt bei 2–8°C
- Aus dehydriertem Basisagar hergestellte Platten: 1 Monat lichtgeschützt bei 2–8°C

## Abschnitt 5

### Zusätzlich benötigtes Material

#### Geräte

- Alle üblichen Laborgeräte
- Heizplatte
- Waage, bis auf 0,1 g genau
- Rührer / Homogenisator
- Thermostatisch kontrollierter Inkubator oder Inkubationskammer, bis auf  $\pm 1^\circ\text{C}$  genau
- Wasserbad

#### Zubehör

- Sterile Petrischalen (90 mm)
- Sterile Pipetten
- Sterile Probenbeutel

## Abschnitt 6

### Vorsichtsmaßnahmen, Anwendungsbeschränkungen und Qualitätskontrolle

#### Vorsichtsmaßnahmen

- Es sind die Richtlinien der guten Laborpraxis zu beachten (EN ISO 7218). Bei der Arbeit mit potenziell infektiösen, lebenden Bakterien sollte angemessene Schutzkleidung wie Handschuhe und Laborkittel getragen werden.
- Medien, die mit Lebensmittelproben in Kontakt gekommen sind, sind als kontaminiert zu betrachten und gemäß den vor Ort geltenden Vorschriften und Bestimmungen zu entsorgen.
- Bei einem vorab hergestellten, gebrauchsfertigen Medium ist längeres, zu starkes Erhitzen zu vermeiden (im Allgemeinen reichen 20 Minuten aus, um einen homogenen flüssigen Agar zu erhalten).
- Der Agar darf nicht mehr als 2-mal regeneriert werden.
- Geschmolzenen Agar (44–47°C) nicht länger als 6 Stunden lagern, um eine optimale Qualität zu erhalten.

- Das Medium kann nach dem Festwerden in der Flasche Schaumbildung aufweisen. Die Qualität des Mediums bleibt jedoch erhalten, da der Schaum nach dem Schmelzen und Schütteln verschwindet.
- Da die Entwicklung von Kolonien am Boden der Petrischale das Ablesen beeinträchtigen kann, ist der Zeitraum zwischen der Einbringung des Inokulums am Boden der Schale und der Abgabe des Kulturmediums zu begrenzen.
- In Matrices, die eine hohe Anzahl mesophiler Keime enthalten (z. B. unbehandelte Rohmilch, rohes Fleisch), sollte vorzugsweise ein zweischichtiges Medium bei 37°C zur Zählung von *E. coli* und Coliformen verwendet werden. Die zweite Schicht dient dazu, das Eindringen in die Oberfläche zu begrenzen, was das Ablesen stören könnte.

## Anwendungsbeschränkungen

- Es existieren einige  $\beta$ -D-Glucuronidase-negative Stämme von *E. coli*, zum Beispiel *E. coli* O157.
- Einige Serovare von *Salmonella* und einige Arten von *Shigella* weisen das Enzym  $\beta$ -D-Glucuronidase auf (< 1,5 %).

## Qualitätskontrolle

- Jedes von der Firma Bio-Rad hergestellte und verkaufte Produkt unterliegt vom Rohstoffeingang bis zur Vermarktung der Fertigprodukte einer umfassenden Qualitätssicherung. 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 dehydrierten Mediums

1. Den Behälter vor jedem Gebrauch schütteln.
2. 37 g Pulver werden in 1 L destilliertem Wasser gelöst und zu einer homogenen Suspension gemischt.
3. Fünf Minuten warten und mischen, bis eine homogene Lösung entstanden ist.
4. Unter ständigem Rühren vorsichtig erhitzen und zum Kochen bringen, bis sich das Medium vollständig gelöst hat.
5. Abfüllen und anschließend in einem Autoklaven 15 min bei 121°C sterilisieren.
6. Das Medium vor der Verwendung auf 44–47°C abkühlen lassen.
7. 500 g Pulver ergeben 13,5 L Medium.



## Probenvorbereitung

Die Probe nach der für das jeweilige Produkt geltenden Standardmethode verdünnen.

## Beimpfung und Ablesen der Platten

1. Mit einer sterilen Pipette 1 ml zu testende Probe (flüssiges Produkt) oder 1 ml Stammsuspension (andere Produkte) und/oder 1 ml ihrer Dezimalverdünnungen in eine sterile Petrischale geben.
2. Ungefähr 15 ml geschmolzenes, auf 44–47°C abgekühltes Medium auf die Probe gießen. Durch Schwenken homogenisieren.
3. Auf einer kühlen, ebenen Fläche fest werden lassen.
4. Die Schalen umdrehen und:
  - a.  $21 \pm 3$  hr bei  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  inkubieren (zur gleichzeitigen Zählung von *E. coli* und anderen Coliformen)
  - b.  $21 \pm 3$  hr bei  $44 \pm 1^\circ\text{C}$  inkubieren (zur Zählung von *E. coli*)
5. Im Rahmen der AOAC-Validierung wurden sowohl 37°C als auch 44°C für die simultane Zählung von *E. coli* und anderen Coliformen validiert.
6. Typische *E. coli*-Kolonien sind violett bis rosa. Typische Kolonien von anderen Coliformen als *E. coli* sind blau.
7. Zum Zählen nur solche Platten wählen, die weniger als 150 charakteristische Kolonien und insgesamt weniger als 300 Kolonien enthalten.
8. Da *E. coli* zur Gruppe der Coliformen gehört, wird die Gesamtanzahl der Coliformen durch Addition der blauen und der violetten Kolonien bestimmt.
9. Die Norm EN ISO 7218 enthält Informationen zum Beimpfen, Zählen von Kolonien sowie zum Berechnen und Angeben der Ergebnisse.
10. Nach dem Inkubationsschritt können die Platten bei 2-8°C für 72 hr gelagert werden.

## Abschnitt 8

### Bestätigung positiver Ergebnisse

Nicht zutreffend





## Abschnitt 9


### Bestätigung anderer Methoden

Nicht zutreffend

## Abschnitt 10

### Testleistung und Testvalidierungen

Zertifizierungsstelle	Umfang	Validierungsprotokoll	Referenzprotokoll	Zertifikat-Referenz
AOAC-RI	Rohes Rinderhackfleisch, rohes Schweinefleisch ohne Knochen, fermentierte Wurst, verarbeiteter Schinken, verarbeitetes Putenfleisch, gefrorene Putenbrust, rohes Hühnerhackfleisch, Hüttenkäse, verarbeiteter Ricotta-Käse, Rohmilch und trockene Säuglingsnahrung	Leistungsgeprüfte Methoden	AOAC Official Method 966.24	 PERFORMANCE TESTED <b>AOAC</b> RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 050601 Lizenznr. 050601
NF VALIDATION	Alle Produkten für den menschlichen Verzehr, Futtermitteln und Umweltproben ( <i>E. coli</i> bei 37°C)	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2	 BRD: 07/07 – 12/04 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Zertifiziert durch die AFNOR-Zertifizierungsstelle <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>
NF VALIDATION	Alle Produkten für den menschlichen Verzehr ( <i>E. coli</i> bei 44°C)	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2	 BRD: 07/01–07/93 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Zertifiziert durch die AFNOR-Zertifizierungsstelle <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>
NF VALIDATION	Alle Produkten für den menschlichen Verzehr, Futtermitteln und Umweltproben (coliformen bei 37°C)	EN ISO 16140-2	ISO 4832	 BRD: 07/08 – 12/04 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Zertifiziert durch die AFNOR-Zertifizierungsstelle <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>

NordVal	Alle Nahrungsmittelerzeugnisse für den menschlichen Verzehr	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2 ISO 4832	 NordVal# 020
---------	--	----------------	-------------------------	---

## Abschnitt 11

### Literatur

AOAC Official Method 966.24: Coliform Group and *Escherichia coli*.

Grand M and Baumgartner A (1996). Chim Alim Hyg 623–630.

ISO 16649-2 (Juli 2001): Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Horizontales Verfahren für die Zählung von  $\beta$ -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* - Teil 2: Koloniezählverfahren bei 44°C mit 5-Brom-4-chlor-3-indol- $\beta$ -D-glucuronid

ISO 4832 (Juli 2006): Mikrobiologie — Horizontales Verfahren zur Zählung von coliformen Keimen — Koloniezählverfahren.

ISO 7218:2007/AMD1:2013 – Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln—Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen.

ISO 6887-1:2017 – Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen - Teil 1: Allgemeine Regeln für die Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen

ISO 18593:2018 – Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren für Probenahmetechniken von Oberflächen

Majchrzak V et al. (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. April 27–29, Lille, France.

Moini R et al. (1996). Indust Aliment 793–796.

Ochin D et al. (1993). New method for rapid detection and enumeration of *Escherichia coli* in food products. Colloque Société Française de Microbiologie. April 28–29, Paris, France.

Ochin D et al. (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. September 12–15, London, UK.

## Abschnitt 12

### Revisionshistorie

Freigabedatum	Dokumentnummer	Änderung
November 2020	10000127899 Ver A	- Bedeutende Änderung - Neues Dokumentdesign - Änderung der Dokumentnummer – vorhergehende Version RAPID'E.coli 2_V05_05-10-15
Dezember 2022	10000127899 Ver B	- Erweiterung der NF Validierung für Umweltproben - Lagerung der Platten nach Inkubation
März 2023	10000127899 Ver C	- Erweiterung der NF Validierung auf Futtermittel

Weitere Informationen über unser vollständiges Angebot an chromogenen RAPID Medien finden Sie bei uns im Internet auf [www.bio-rad.com/rapidmedia](http://www.bio-rad.com/rapidmedia).

BIO-RAD ist eine Marke von Bio-Rad Laboratories, Inc. Alle hierin verwendeten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.



**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

10000127899 Ver C US/EG

Sig 0123

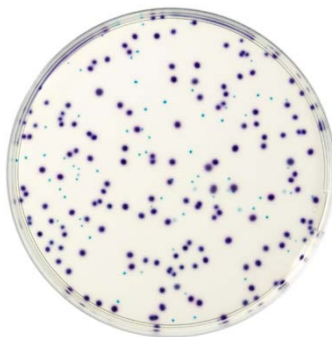
---

# RAPID'*E.coli* 2 Agar

## Manuale utente

**Terreno cromogenico selettivo per la conta diretta (senza conferma) di colonie di *Escherichia coli* e di altri batteri coliformi nei prodotti alimentari destinati alla consumazione umana, animale e nei prodotti ambientali**

Catalogo #3555297, pronto per l'uso, 200 ml x 6 flaconi  
Catalogo #3555299, pronto per l'uso, 100 ml x 6 flaconi  
Catalogo #3564024, disidratato, 500 g



**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
Sezione 7	Protocollo .....	3
	Preparazione del terreno disidratato .....	3
	Preparazione dei campioni.....	3
	Inoculazione e lettura delle piastre .....	4
Sezione 8	Conferma dei risultati positivi .....	4
Sezione 9	Conferma di altri metodi .....	4
Sezione 10	Performance del test e validazioni .....	5
Sezione 11	Riferimenti .....	6
Sezione 12	Cronologia delle revisioni .....	7

## Sezione 1

### Introduzione

I coliformi sono un gruppo non tassonomico di batteri esclusivamente Gram negativi, non sporigeni, anaerobi facoltativi, 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*. La conta dei batteri coliformi può essere utile per confermare l'igienizzazione di ambienti destinati al trattamento di acqua o alimenti. L'*Escherichia coli* è presente nell'intestino degli animali ed è abbondante nelle feci umane e animali. I batteri possono essere isolati anche da campioni ambientali. I coliformi fecali sono spesso utilizzati come indicatori di contaminazione e della possibile presenza di organismi patogeni. Il gruppo dei coliformi fecali è costituito principalmente da *E. coli* e in parte da *Klebsiella* termoresistente. Sebbene questi batteri siano generalmente non patogeni, possono causare infezioni in ospiti immunocompromessi. I metodi tradizionali di conta dei batteri coliformi possono risultare dispendiosi in termini di tempo e costi. L'uso dei substrati cromogenici contenuti nei terreni ha consentito lo sviluppo di metodi più rapidi e più semplici di ricerca, differenziazione e conta dei batteri target.

## Sezione 2

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

Il principio del terreno si basa sulla ricerca simultanea di due attività enzimatiche:  $\beta$ -D-glucuronidasi (GLUC) e  $\beta$ -D-galattosidasi (GAL). Questi enzimi reagiscono con i substrati cromogenici presenti nel terreno producendo colori specifici. Il substrato proprio del GLUC porta alla colorazione rosa delle colonie positive per questo enzima. Il substrato proprio del GAL porta alla colorazione blu delle colonie positive per questo enzima. La ricerca del GLUC rende il terreno di coltura altamente specifico: l'*E. coli* è una delle poche specie di coliformi a possedere questo enzima. L'*E. coli* (GAL+/GLUC+) genera colonie di colore da violetto a rosa. Altri coliformi (GAL+/GLUC-) generano colonie di colore blu. Altri batteri sono inibiti dalla miscela selettiva.

## Sezione 3

### Formula teorica

Peptoni	10 g
Cloruro di sodio	5 g
Estratto di lievito	3 g
Miscela cromogenica selettiva	6 g
Agar	13 g
Acqua distillata	qs 1.000 ml

---

pH finale a 25°C = 7,2 ± 0,2

## Sezione 4

### Durata e conservazione

- Disidratato: 15-25°C in una confezione accuratamente sigillata, in un luogo asciutto e buio
- Flaconi pronti all'uso: 2-8°C in un luogo buio
- Piastra preparata da disidratato: 1 mese a 2-8°C in un luogo buio



## Sezione 5

### Materiali necessari ma non forniti

#### Apparecchiatura

- Tutta la normale apparecchiatura di laboratorio
- Piastra riscaldante
- 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

#### Materiali

- Piastre di Petri sterili (90 mm)
- Pipette sterili
- Sacche di pesatura sterili

## Sezione 6

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

#### Precauzioni

- Rispettare le buone pratiche di laboratorio (EN ISO 7218). Indossare protezioni adeguate, quali guanti e camici da laboratorio, quando si manipolano batteri vivi potenzialmente infettivi
- I terreni entrati in contatto con campioni di prodotti alimentari devono essere considerati contaminati e quindi smaltiti in conformità con normative e direttive locali
- Per terreno pronto all'uso preparato in anticipo, evitare il surriscaldamento prolungato (generalmente 20 minuti sono sufficienti per ottenere un agar liquido omogeneo)
- L'agar non deve essere sottoposto a più di 2 cicli di rigenerazione
- Al fine di mantenere la qualità ottimale, non conservare l'agar liquefatto ( $44 - 47^{\circ}\text{C}$ ) per oltre 6 hr
- Il terreno può avere un aspetto schiumoso dopo la solidificazione nei flaconi. Tuttavia, esso conserva tutte le sue qualità quando la schiuma scompare dopo la liquefazione e lo scuotimento
- Poiché lo sviluppo di colonie sul fondo della piastra di Petri può interferire con la lettura, limitare il periodo tra la deposizione dell'inoculo sul fondo della piastra e la dispensazione del terreno di coltura

## Sezione 7

- È preferibile utilizzare un terreno a doppio strato a 37°C per la conta dell'*E. coli* e di coliformi in matrici contenenti abbondante flora mesofila (quali latte crudo non trattato, carne cruda). Lo scopo del secondo strato è limitare l'invasione della superficie, che può interferire con la lettura

### Limitazioni d'uso

- Esistono pochi ceppi  $\beta$ -D-glucuronidasi negativi di *E. coli*, ad esempio, *E. coli* O157
- Alcuni sierotipi di *Salmonella* e alcune specie di *Shigella* possiedono l'enzima  $\beta$ -D-glucuronidasi (<1,5%)

### Controllo qualità

- Tutti i prodotti fabbricati e commercializzati dalla società Bio-Rad sono sottoposti a un sistema di assicurazione qualità in ogni fase, dal momento del ricevimento delle materie prime fino alla commercializzazione dei prodotti finiti. Ciascun lotto di prodotto finito è soggetto a un controllo qualità conformemente alla norma EN ISO 11133 e viene messo in commercio solo se risulta conforme ai criteri di accettazione. La documentazione relativa alla produzione e al controllo qualità di ogni lotto è conservata su file
- 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 terreno disidratato

1. Agitare sempre il flacone prima dell'uso.
2. Dissolvere 37 g di polvere in 1 L di acqua distillata e miscelare fino a ottenere una sospensione omogenea.
3. Attendere 5 minuti e miscelare fino a ottenere una soluzione omogenea.
4. Riscaldare lentamente, agitando spesso, quindi portare a ebollizione fino al completo scioglimento.
5. Dispensare, quindi autoclavare a 121°C per 15 minuti.
6. Raffreddare il terreno a 44-47°C prima dell'uso.
7. Un flacone di polvere da 500 g produce 13,5 L di terreno.

### Preparazione dei campioni

Diluire il campione secondo il metodo standard applicabile al prodotto in questione.

## Inoculazione e lettura delle piastre

1. Con una pipetta sterile, trasferire 1 ml del campione da testare (prodotto liquido) o 1 ml di sospensione concentrata (altri prodotti) e/o 1 ml delle sue diluizioni decimali su una piastra di Petri.
2. Per circa 15 ml di terreno fuso, raffreddato a 44-47°C nel campione. Omogenizzare agitando.
3. Lasciare solidificare su una superficie piana e fredda.
4. Capovolgere le piastre e incubare a:
  - a.  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  per  $21 \pm 3$  hr per conta simultanea di *E. coli* e altri coliformi
  - b.  $44 \pm 1^\circ\text{C}$  per  $21 \pm 3$  hr per conta di *E. coli*
5. Nell'ambito della Validazione AOAC, sono validati sia  $37^\circ\text{C}$  sia  $44^\circ\text{C}$  per la conta simultanea di *E. coli* e altri coliformi.
6. Le colonie tipiche di *E. coli* sono di colore da violetto a rosa. Le colonie tipiche di coliformi diversi dall'*E. coli* sono di colore blu.
7. Per la conta, selezionare solo le piastre contenenti meno di 150 colonie caratteristiche e meno di 300 colonie complessivamente.
8. Poiché l'*E. coli* fa parte del gruppo dei coliformi, i coliformi totali sono contati sommando le colonie di colore blu e quelle di colore violetto.
9. Fare riferimento alla norma EN ISO 7218 per l'inoculazione, la conta delle colonie, il calcolo e l'espressione dei risultati.
10. Dopo la fase di incubazione, le piastre possono essere conservate a  $2-8^\circ\text{C}$  per 72 hr.

## Sezione 8

### Conferma dei risultati positivi

Non applicabile.




## Sezione 9



### Conferma di altri metodi

Non applicabile.

## Sezione 10

### Performance del test e validazioni

Certificazione	Ambito di applicazione	Protocollo di validazione	Protocollo di riferimento	Riferimento al certificato
AOAC-RI	Carne di manzo macinata cruda, carne di maiale disossata cruda, salsiccia fermentata, prosciutto lavorato, carne di tacchino lavorata, petto di tacchino congelato, carne di pollo macinata cruda, fiocchi di latte, ricotta lavorata, latte crudo e formula per neonati in polvere	Performance Tested Methods	Metodo ufficiale AOAC 966.24	 Licenza n. 050601
VALIDAZIONE NF	Tutti i prodotti alimentari destinati al consumo umano, l'alimentazione animale e campioni ambientali (E. coli a 37°C)	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2	 BRD: 07/07 – 12/04 METODI ANALITICI ALTERNATIVI PER IL SETTORE AGROALIMENTARE Certificato mediante certificazione AFNOR <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>
VALIDAZIONE NF	Tutti i prodotti alimentari destinati al consumo umano (E. coli a 44°C)	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2	 BRD: 07/01–07/93 METODI ANALITICI ALTERNATIVI PER IL SETTORE AGROALIMENTARE Certificato mediante certificazione AFNOR <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>

VALIDAZIONE NF	Tutti i prodotti alimentari destinati al consumo umano, l'alimentazione animale e campioni ambientali (coliformi a 37°C)	EN ISO 16140-2	ISO 4832	 <p>BRD: 07/08 – 12/04 METODI ANALITICI ALTERNATIVI PER IL SETTORE AGROALIMENTARE Certificato mediante certificazione AFNOR <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a></p>
NordVal	Tutti i prodotti alimentari destinati al consumo umano	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2 ISO 4832	 <p>NORDVAL n. 020</p>

## Sezione 11

### Riferimenti

AOAC Official Method 966.24: Coliform Group and *Escherichia coli*.

Grand M and Baumgartner A (1996). Chim Alim Hyg 623–630.

ISO 16649-2 (luglio 2001): Microbiologia di alimenti – Metodo orizzontale per la conta di *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidasi positiva - Parte 2: Tecnica della conta delle colonie a 44°C che utilizza 5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-glucuronide.

ISO 4832 (luglio 2006): Microbiologia di alimenti e mangimi per animali — Metodo orizzontale per la conta di coliformi - Tecnica della conta delle colonie.

ISO 7218:2007/AMD1:2013 – Microbiologia di alimenti e mangimi per animali–Requisiti generali e guida per le analisi microbiologiche.

ISO 6887-1:2017 – Microbiologia della catena alimentare – Preparazione dei campioni di prova, della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali per l'analisi microbiologica – Parte 1: Regole generali per la preparazione della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali.

ISO 18593: 2018. Microbiology of the food chain - Horizontal methods for surface sampling.

Majchrazak V et al. (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. April 27–29, Lille, France.

## Sezione 12

Moini R et al. (1996). Indust Aliment 793–796.

Ochin D et al. (1993). New method for rapid detection and enumeration of Escherichia coli in food products. Colloque Société Française de Microbiologie. April 28–29, Paris, France.

Ochin D et al. (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. September 12–15, London, UK.

## Sezione 12 Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero documento	Modifica
Novembre 2020	10000127899 Ver A	- Modifica importante - Nuovo design del documento - Modifica numero documento – versione precedente RAPID'E.coli 2_V05_10-05-15
Dicembre 2022	10000127899 Ver B	- Estensione della validazione NF per i campioni ambientali - Conservazione delle piastre dopo incubazione
Marzo 2023	10000127899 Ver C	- Estensione della validazione NF per l'alimentazione animale

Per ulteriori informazioni sulla nostra gamma completa di terreni cromogenici RAPID', visitare il sito [www.bio-rad.com/rapidmedia](http://www.bio-rad.com/rapidmedia).

BIO-RAD è un marchio registrato di Bio-Rad Laboratories, Inc. Tutti i marchi registrati qui utilizzati sono di proprietà del rispettivo proprietario.



**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

10000127899 Ver C US/EG

Sig 0123

---

# RAPID'*E.coli* 2 Agar

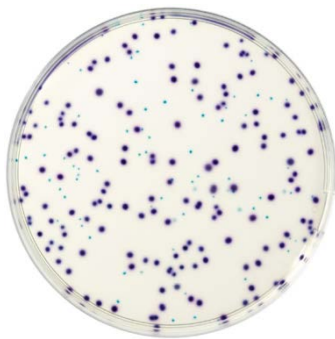
## Guia do usuário

**Meio cromogênico seletivo utilizado para enumeração direta (sem confirmação) de colônias de Escherichia coli e outros coliformes em todos os produtos para consumo humano, ração animal e amostras ambientais**

N° do catálogo 3555297, pronto para uso, 200 ml x 6 frascos

N° do catálogo 3555299, pronto para uso, 100 ml x 6 frascos

N° do catálogo 3564024, Desidratado, 500 g



**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
Seção 7	Protocolo .....	3
	Preparação do Meio Desidratado.....	3
	Preparação da amostra .....	3
	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 .....	6
Seção 12	Histórico de Revisão .....	7



## 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 ambientes de processamento de alimentos. A *Escherichia coli* é encontrada no intestino de 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. O grupo de coliformes fecais consiste principalmente de *E. coli* e alguns *Klebsiella* termotolerantes. Embora essas bactérias sejam geralmente não patogênicas, elas podem causar infecção em hospedeiros imunocomprometidos. Métodos tradicionais 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 se baseia na detecção simultânea de duas atividades enzimáticas,  $\beta$ -D-glucuronidase (GLUC) e  $\beta$ -D-galactosidase (GAL). Estas enzimas reagem com os substratos cromogênicos presentes no meio para produzir cores específicas. O substrato específico para GLUC leva à coloração rosa das colônias positivas para esta enzima. O substrato específico para GAL leva à coloração azul das colônias positivas para esta enzima. A detecção do GLUC torna o meio de cultura altamente específico; a *E. coli* é, de fato, uma das únicas espécies de coliformes a possuir esta enzima. *E. coli* (GAL+/GLUC+) formam colônias violeta a rosa. Outros coliformes (GAL+/GLUC-) formam colônias azuis. Outras bactérias são inibidas pela mistura seletiva.

## Seção 3

### Fórmula Teórica

Peptonas	10 g
Cloreto de sódio	5 g
Extrato de levedura	3 g
Mistura cromogênica seletiva	6 g
Ágar	13 g
Água destilada	qsp 1.000 ml

---

pH final a 25°C = 7,2 ± 0,2

## Seção 4

### Prazo de validade e armazenamento

- Desidratado: 15–25°C em embalagem cuidadosamente vedada, em um ambiente seco e arejado
- Frascos prontos para usar: 2–8°C em local escuro
- Meio de cultura preparado a partir do desidratado: 1 mês a 2-8°C em um lugar escuro

## Seção 5

### **Materiais necessários, mas não fornecidos**

#### **Equipamento**

- Todo o equipamento comum de laboratório
- Placa de aquecimento
- Escala, sensibilidade de 0,1 g
- Misturador/homogeneizador
- Incubadora ou sala de incubação controlada termostaticamente, com precisão de  $\pm 1^{\circ}\text{C}$
- Lavagem em água

#### **Suprimentos**

- Placas de Petri estéreis (90 mm)
- Pipetas estéreis
- Sacos de pesagem estéreis

## Seção 6

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

#### **Precauções**

- Respeite as boas práticas de laboratório (EN ISO 7218). Proteção adequada, como luvas e jalecos, deve ser usada ao trabalhar com bactérias vivas potencialmente infecciosas
- O meio que entrou em contato com amostras de alimentos deve ser considerado contaminado e descartado de acordo com as regras e regulamentos locais
- Para meios prontos para uso preparados com antecedência, evite o superaquecimento prolongado (em geral, 20 minutos é suficiente para obter um ágar líquido homogêneo)
- O ágar não deve ser submetido a mais de 2 ciclos de regeneração
- Para conservar a qualidade ideal, não armazenar ágar fundido ( $44 - 47^{\circ}\text{C}$ ) por mais de 6 hr
- O meio pode parecer espumoso depois de solidificar em frascos. No entanto, ela conserva todas as suas qualidades quando a espuma desaparece após derreter e agitar
- Como o desenvolvimento de colônias no fundo de placas de Petri pode interferir na leitura, limite o período entre a deposição do inóculo no fundo do prato e a distribuição do meio de cultura

## Seção 7

- É preferível utilizar um meio de dupla camada a 37°C para a contagem de *E. coli* e coliformes em matrizes contendo abundante flora mesófila (como leite cru não tratado, carne crua). O objetivo da segunda camada é limitar a invasão da superfície, o que pode interferir na leitura

### Limitações de uso

- Algumas cepas β-D-glucuronidase-negativas de *E. coli* existem; por exemplo, *E. coli* O157
- Alguns serotipos de *Salmonella* e algumas espécies de *Shigella* possuem a enzima β-D-lucuronidase (<1,5%)

### 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 Meio Desidratado

1. Agite sempre a garrafa antes de usar.
2. Dissolva 37 g de pó em 1 L de água destilada e misture até obter uma suspensão homogênea.
3. Aguarde 5 min e misture até obter uma solução homogênea.
4. Aqueça delicadamente, agitando com frequência, deixe ferver até dissolver completamente.
5. Distribua e depois autoclave a 121°C por 15 minutos.
6. Antes de usar, resfrie o meio até 44–47°C.
7. Um frasco de 500 g de pó produz 13,5 L de meio.

### Preparação da amostra

Dilua a amostra de acordo com o método padrão aplicável ao respectivo produto.

## Inoculação e Leitura de Meios de Cultura

1. Usando uma pipeta estéril, transferir 1 ml de amostra a ser testada (produto líquido) ou 1 ml de suspensão de estoque (outros produtos) e/ou 1 ml de suas diluições decimais para uma placa de Petri estéril.
2. Coloque aproximadamente 15 ml de meio derretido, resfriado a 44-47°C sobre a amostra. Homogenize usando vortex.
3. Deixe solidificar em uma superfície plana e fria.
4. Vire as placas e incube-as:
  - a.  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $21 \pm 3$  h para contagem simultânea de *E. coli* e outros coliformes
  - b.  $44 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $21 \pm 3$  h para contagem de *E. coli*
5. No contexto da AOAC Validation, ambas temperaturas de 37°C e 44°C são validadas para a contagem simultânea de *E. coli* e outros coliformes.
6. As colônias típicas de *E. coli* são violeta a rosa. As colônias típicas de coliformes diferentes de *E. coli* são azuis.
7. Para enumeração, selecione apenas placas contendo menos de 150 colônias características e menos de 300 colônias no total.
8. Como *E. coli* é um membro do grupo coliforme, os coliformes totais são numerados por colônias azul e violeta somadas.
9. Consulte o padrão EN ISO 7218 para inoculação, contagem de colônias, cálculo e expressão dos resultados.
10. Após a etapa de incubação, as placas podem ser armazenadas a 2–8°C por 72 hr

## Seção 8 Confirmação de Resultados Positivos




Não se aplica.



## Seção 9 Confirmação de outros métodos

Não se aplica.

## Seção 10

### Desempenho e validação do teste

Certificação	Escopo	Protocolo de Validação	Protocolo de Referência	Referência de Certificado
AOAC-RI	Carne bovina crua moída, carne suína crua desossada, salsicha fermentada, presunto processado, peru processado, peito de peru congelado, frango cru moído, queijo cottage, queijo ricota processado, leite cru e fórmula para lactentes secos	Métodos de desempenho testados	AOAC Official Method 966.24	 Nº da licença 050601
NF VALIDATION	Todos os produtos alimentares para consumo humano, ração animal e campioni ambientali ( <i>E. coli</i> a 37°C)	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2	 BRD: 07/07 – 12/04 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA O AGRONEGÓCIO Certificado pela certificação AFNOR <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>
NF VALIDATION	Todos os produtos alimentares para consumo humano ( <i>E. coli</i> a 44°C)	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2	 BRD: 07/01–07/93 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA O AGRONEGÓCIO Certificado pela certificação AFNOR <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>

NF VALIDATION	Todos os produtos alimentares para consumo humano, ração animal e campioni ambientali (coliformes a 37°C)	EN ISO 16140-2	ISO 4832	 <p>BRD: 07/08 – 12/04 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA O AGRONEGÓCIO Certificado pela certificação AFNOR <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a></p>
NordVal	Todos os produtos alimentares para consumo humano	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2 ISO 4832	 <p>NordVal# 020</p>

## Seção 11

### Referências

AOAC Official Method 966.24: Coliform Group and *Escherichia coli*.

Grand M and Baumgartner A (1996). Chim Alim Hyg 623–630.

ISO 16649-2 (Julho de 2001): Food microbiology – Horizontal method for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-  $\beta$ -D-glucuronide.

ISO 4832 (Julho de 2006): Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique.

ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 18593: 2018. Microbiology of the food chain - Horizontal methods for surface sampling

Majchrazak V et al. (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. April 27–29, Lille, France.

Moini R et al. (1996). Indust Aliment 793–796.

Ochin D et al. (1993). New method for rapid detection and enumeration of *Escherichia coli* in food products. Colloque Société Française de Microbiologie. April 28–29, Paris, France.

Ochin D et al. (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. September 12–15, London, UK.

## Seção 12

### Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Novembro de 2020	10000127899 Ver A	- Alteração importante - Novo design de documento - Alteração do número do documento – versão anterior RAPID' <i>E.coli</i> 2_V05_05-10-15
Dezembro 2022	10000127899 Ver B	- Extensão da validação NF para amostras ambientais - Armazenamento da placa pós incubação
Março 2023	10000127899 Ver C	- Extensão do escopo de validação NF para ração animal

Visite [www.bio-rad.com/rapidmedia](http://www.bio-rad.com/rapidmedia) para obter mais informações sobre a nossa completa linha de meios cromogênicos RAPID.

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](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

---

# RAPID'*E.coli* 2 Agar

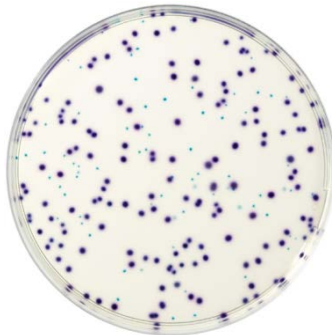
## Manual del usuario

**Medio cromogénico selectivo empleado para enumeración directa (sin confirmación) de colonias de *Escherichia coli* y otras bacterias coliformes en todos los productos para consumo humano, alimentación animal y muestras ambientales**

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



**BIO-RAD**



# Tabla de contenidos

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

## Apartado 1

### Apartado 1 Introducción

Las bacterias coliformes son un grupo no taxonómico de bacterias que son exclusivamente Gram-negativas, no forman esporas y son bacterias anaerobias facultativas en forma de bacilo que fermentan la lactosa para producir ácido y gas. El grupo está compuesto por bacterias entéricas como *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. El recuento de las bacterias coliformes puede ser útil a fin de verificar el estado de saneamiento del agua o de los entornos de procesamiento de alimentos. Las *Escherichia coli* se encuentran 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. El grupo de coliformes fecales comprende principalmente a *E. coli* y algunas *Klebsiella* termotolerantes. Aunque estas bacterias generalmente no son patógenas, pueden causar infección en huéspedes inmunodeprimidos. Los métodos tradicionales utilizados para el recuento de las bacterias coliformes pueden resultar laboriosos y costosos. La utilización de sustratos cromogénicos en los medios ha permitido desarrollar métodos más rápidos y sencillos para la detección, diferenciación y recuento de las bacterias de interés.

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

El principio del medio se basa en la detección simultánea de 2 actividades enzimáticas,  $\beta$ -D-glucuronidasa (GLUC) y  $\beta$ -D-galactosidasa (GAL). Estas enzimas reaccionan con los sustratos cromogénicos presentes en el medio para producir colores específicos. El sustrato específico del GLUC conduce a la coloración rosa de las colonias positivas para esta enzima. El sustrato específico del GAL conduce a la coloración azul de las colonias positivas para esta enzima. La detección de GLUC hace que el medio de cultivo sea altamente específico; *E. coli* es, de hecho, una de las únicas especies de coliformes que posee esta enzima. *E. coli* (GAL+/GLUC+) forma colonias que van de color violeta a rosa. Otros coliformes (GAL+/GLUC-) forman colonias azules. Otras bacterias son inhibidas por la mezcla selectiva.

### 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

---

pH final a 25° C = 7,2 ± 0,2

### Apartado 4 Vida útil y conservación

- Deshidratado: 15–25° C en un envase cuidadosamente sellado, en un lugar seco y oscuro
- Frascos listos para usar: 2–8° C en un lugar oscuro

## Apartado 5

- Placa preparada a partir de medio deshidratado: 1 mes a 2–8° C en un lugar oscuro

## Apartado 5

### **Materiales necesarios, pero no suministrados**

#### **Equipamiento**

- Todo el instrumental habitual en laboratorio
- Placa calefactada
- Balanza, sensibilidad de 0,1 g
- Agitador/homogeneizador
- Incubador o sala de incubación controlada termostáticamente, con una precisión de  $\pm 1^\circ$  C
- Baño termostático

#### **Fungibles**

- Placas de Petri estériles (90 mm)
- Pipetas estériles
- Bolsas estériles para pesada

## Apartado 6

### **Precauciones, limitaciones de uso y control de calidad**

#### **Precauciones**

- Deben respetarse las buenas prácticas de laboratorio (EN ISO 7218). Usar protección adecuada, como guantes y batas de laboratorio, cuando se trabaja con bacterias vivas potencialmente infecciosas.
- Los medios que han estado en contacto con muestras de alimentos deben considerarse potencialmente contaminados y deben eliminarse de conformidad con las normas y reglamentos locales.
- En el caso de un medio listo para el uso preparado de antemano, de evitarse el sobrecalentamiento prolongado (en general, 20 minutos son suficientes para obtener un agar líquido homogéneo).
- El agar no debe someterse a más de 2 ciclos de regeneración.
- Para conservar una calidad óptima, no debe almacenarse el agar fundido (44 - 47° C) durante más de 6 hr.
- El medio puede parecer espumoso tras su solidificación en los frascos. Sin embargo, conserva todas sus cualidades cuando la espuma desaparece después de fundirse y agitarse.

## Apartado 7

- Como el desarrollo de colonias en el fondo de la placa de Petri puede interferir con la lectura, es necesario limitar el período entre la adición del inóculo en el fondo de la placa y la dispensación del medio de cultivo.
- Es preferible utilizar un medio de doble capa a 37°C para el recuento de *E. coli* y coliformes en matrices que contengan abundante flora mesofílica (como leche cruda sin tratar, carne cruda). El objetivo de la segunda capa es limitar la invasión de la superficie, que puede interferir con la lectura.

### Limitaciones de uso

- Existen unas pocas cepas de *E. coli* β-D-glucuronidasa negativas; por ejemplo, *E. coli* O157.
- Algunos serovares de *Salmonella* y algunas especies de *Shigella* poseen la enzima β-D-glucuronidasa (<1,5%).

### 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. La documentación relativa a la producción y el control de calidad de cada lote se mantiene archivada.
- Para información relativa a la seguridad sobre el producto (SDS) y del certificado de análisis, visite [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)

## Apartado 7 Protocolo

### Preparación del medio deshidratado

1. Agitar siempre el frasco antes de usar.
2. Disolver 37 g de polvo en 1 L de agua destilada y mezclar hasta obtener una suspensión homogénea.
3. Esperar 5 minutos y mezclar hasta obtener una solución homogénea.
4. Calentar suavemente, agitando frecuentemente, y luego llevar a ebullición hasta su completa disolución.
5. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 min.
6. Enfriar el medio a 44-47° C antes de usar.
7. Un frasco de 500 g de medio deshidratado permite obtener 13,5 L de medio.

## Apartado 8

### Preparación de las muestras

Diluir la muestra según el método normalizado aplicable al producto en cuestión.

### Inoculación y lectura de la placa

1. Utilizando una pipeta estéril, transferir 1 ml de la muestra que se va a analizar (producto líquido) o 1 ml de la suspensión inicial (otros productos) y/o 1 ml de sus diluciones decimales a una placa de Petri estéril.
2. Verter aproximadamente 15 ml de medio fundido, enfriado a 44-47° C sobre la muestra. Homogeneizar realizando movimientos circulares con la placa.
3. Dejar solidificar en una superficie fría y nivelada.
4. Invertir las placas e incubar a:
  - a.  $37 \pm 1^\circ \text{C}$  durante  $21 \pm 3$  hr para el recuento simultáneo de *E. coli* y otros coliformes
  - b.  $44 \pm 1^\circ \text{C}$  durante  $21 \pm 3$  hr para el recuento de *E. coli*
5. En el contexto de AOAC Validation, están validadas las temperaturas de 37° C y 44° C para el recuento simultáneo de *E. coli* y otros coliformes.
6. Las colonias típicas de *E. coli* son de color violeta a rosa. Las colonias típicas de coliformes, distintas a la *E. coli*, son azules.
7. Para el recuento, seleccione sólo placas que contengan menos de 150 colonias características y menos de 300 colonias en total.
8. Como *E. coli* es un miembro del grupo de los coliformes, los coliformes totales se contabilizan sumando las colonias azules y violetas.
9. Consulte en la norma EN ISO 7218 la inoculación, el recuento de colonias, el cálculo y la expresión de los resultados.
10. Tras la etapa de incubación las placas pueden ser conservadas a 2-8°C durante 72 hr

## Apartado 8

### Confirmación de los 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
AOAC-RI	Carne picada cruda, cerdo deshuesado crudo, salchichas fermentadas, jamón procesado, fiambre de pavo, pechuga de pavo congelada, pollo picado crudo, requesón, queso ricotta procesado, leche cruda y fórmula infantil en seco.	Performance Tested Methods	AOAC Official Method 966.24	 Licencia# 050601
NF VALIDATION	Todos los productos alimentarios para consumo humano, alimentación animal y muestras ambientales ( <i>E. coli</i> a 37°C)	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2	 BRD: 07/07 – 12/04 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA LA AGROINDUSTRIA Certificado mediante certificación AFNOR <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>
NF VALIDATION	Todos los productos alimentarios para consumo humano ( <i>E. coli</i> a 44°C)	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2	 BRD: 07/01–07/93 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA LA AGROINDUSTRIA Certificado mediante certificación AFNOR <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>

## Apartado 11

NF VALIDATION	Todos los productos alimentarios para consumo humano, alimentación animal y muestras ambientales (coliformes a 37°C)	EN ISO 16140-2	ISO 4832	 <p>BRD: 07/08 – 12/04 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA LA AGROINDUSTRIA Certificado mediante certificación AFNOR <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a></p>
NordVal	Todos los productos alimentarios para consumo humano	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2 ISO 4832	 <p>NordVal# 020</p>

## Apartado 11 Referencias

AOAC Official Method 966.24: Coliform Group and *Escherichia coli*.

Grand M and Baumgartner A (1996). Chim Alim Hyg 623–630.

ISO 16649-2 (julio 2001): Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal – Método horizontal para la enumeración de *Escherichia coli* beta-glucuronidasa positivo - Parte 2: Técnica de recuento de colonias a 44°C utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indol beta-D-glucuronato.

ISO 4832 (julio 2006): Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal — Método horizontal para la detección y numeración de Coliformes — Técnica de recuento de colonias

ISO 7218:2007/AMD1:2013 – Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico.

ISO 6887-1:2017 – Microbiología de la cadena alimentaria – Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico – Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.

ISO 18593: 2018. Microbiology of the food chain - Horizontal methods for surface sampling

Majchrzak V et al. (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. April 27–29, Lille, France.

## Apartado 12

Moini R et al. (1996). Indust Aliment 793–796.

Ochin D et al. (1993). New method for rapid detection and enumeration of Escherichia coli in food products. Colloque Société Française de Microbiologie. April 28–29, Paris, France.

Ochin D et al. (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. September 12–15, London, UK.

## Apartado 12 Historial de revisiones

Fecha de publicación	N.º de documento	Cambio
Noviembre 2020	10000127899 Ver A	- Cambio significativo - Nuevo diseño del documento - Cambio en el número de documento - versión anterior RAPID'E.coli 2_V05_05-10-15
Diciembre 2022	10000127899 Ver B	- Extensión de Validación NF para muestras ambientales - Conservación de la placa tras incubación
Marzo 2023	10000127899 Ver C	- Extensión de alcance de validación NF para alimentación animal

Visite [www.bio-rad.com/rapidmedia](http://www.bio-rad.com/rapidmedia) para más información sobre nuestra gama completa de medios cromogénicos RAPID.

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](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

10000127899 Ver C US/EG

Sig 0123



---

# RAPID' *E.coli* 2 Agar

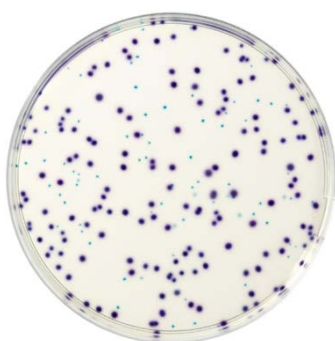
## 用户指南

选择性显色培养基可用于对所有人类食用，动物饲料和环境样品中的大肠杆菌和其他大肠菌群进行直接计数，且无需确认。

目录 # 3555297, 即用型, 200 ml x 6 瓶

目录 #3555299, 即用型, 100 ml x 6 瓶

目录 # 3564024, 干粉, 500 g



**BIO-RAD**

# 目录

第 1 部分 简介 .....	1
第 2 部分 RAPID' <i>E.coli</i> 2 原理 .....	1
第 3 部分 理论配方 .....	1
第 4 部分 保质期及储存条件 .....	2
第 5 部分 其他仪器、试剂与耗材 .....	2
仪器 .....	2
试剂和耗材 .....	2
第 6 部分 预防措施、使用限制和质量控制 .....	2
第 7 部分 操作流程 .....	3
干粉培养基的制备 .....	3
样品准备 .....	4
接种和平板读数 .....	4
第 8 部分 阳性结果的确认 .....	4
第 9 部分 其他方法的确认 .....	4
第 10 部分 测试性能和验证 .....	5
第 11 部分 参考资料 .....	6
第 12 部分 修订记录 .....	7

## 第 1 部分

### 简介

## 第 1 部分

### 简介

大肠菌群是一组非分类细菌，需氧及兼性厌氧、可分解乳糖产酸产气的革兰氏阴性无芽胚杆菌。大肠杆菌是一种细菌，可包括大肠埃希氏菌、柠檬酸杆菌、产气克雷伯氏菌和阴沟肠杆菌等多种细菌。大肠菌群的计数有助于确认水或食品加工环境的卫生状况。大肠杆菌主要存在于动物的肠道中，多见于人类和动物的粪便中。这种细菌也可以从环境样本中分离出来。粪便中大肠菌群数量通常被用作污染和可能存在病原生物体的指标。粪便大肠菌群主要由大肠杆菌和一些耐热克雷伯菌组成。虽然这些细菌通常是非致病性的，但它们可以引起免疫力低下的宿主感染。传统的大肠菌群计数方法可能费力又费钱。在培养基中使用显色底物以促进开发出更快、更简单的方法来检测、区分和计数目标细菌。

## 第 2 部分

### RAPID' *E.coli* 2 原理

该培养基的原理依赖于同时检测两种酶的活性，即  $\beta$ -D-葡萄糖醛酸酶 (GLUC) 和  $\beta$ -D-半乳糖苷酶 (GAL)。这些酶与存在于培养基中的显色底物发生反应，产生特定的颜色。GLUC 特异性底物导致该酶阳性菌落呈现粉红色。GAL 特异性底物导致该酶阳性菌落呈现蓝色。GLUC 的检测使培养基具有高度的特异性；事实上，大肠杆菌是唯一拥有这种酶的大肠菌群之一。大肠杆菌 (GAL+/GLUC+) 形成紫色至粉红色菌落。其他大肠菌群 (GAL+/GLUC-) 形成蓝色菌落。其他细菌受到选择性混合物的抑制。

## 第 3 部分

### 理论配方

蛋白胨	10 g
氯化钠	5 g
酵母抽提物	3 g
选择性显色混合物	6 g
琼脂	13 g
蒸馏水	qsp 1,000 ml

---

25°C 时的最终 pH 值 = 7.2 ± 0.2

## 第 4 部分

### 保质期及储存条件

## 第 4 部分

### 保质期及储存条件

- 干粉：在 15–25° C 下妥善密封包装置于干燥避光处
- 即用型瓶：2–8° C 避光处
- 干粉培养基平板：2–8° C 下避光处储存 1 个月

## 第 5 部分

### 其他仪器、试剂与耗材

#### 仪器

- 所有常用的实验室仪器
- 热平板
- 天平，灵敏度为 0.1 g
- 搅拌器/均质器
- 恒温控制的孵化器或孵化室，精确到  $\pm 1^{\circ}$  C
- 水浴

#### 试剂和耗材

- 无菌培养皿 (90 mm)
- 无菌移液管
- 无菌称重袋

## 第 6 部分

### 预防措施、使用限制和质量控制

#### 预防措施

- 遵守良好实验室规范 (EN ISO 7218)。在处理具有潜在传染性的活细菌时，应穿戴适当的防护装置，例如手套和实验室外套
- 与食品样品接触过的培养基应被视为潜在传染性材料处理，并根据当地法规和规定进行废弃物处理

## 第 7 部分

### 操作流程

- 对于提前准备好的即用型培养基，要避免长时间的过热（一般来说，20 分钟足以获得均匀的液体培养基）
- 培养基的再生周期不得超过 2 次
- 为了保持最佳质量，请勿将融化的培养基（44 - 47° C）储存超过 6 小时。
- 培养基在瓶中凝固后可能看起来有泡沫。然而，在融化和摇匀之后，当泡沫消失时，它仍然保持了所有的品质
- 由于培养皿底部的菌落发育可能会干扰读数，因此应限制培养皿底部接种物沉积与培养基分装之间的时间
- 在含有大量嗜中温菌群的基质（如未经处理的生牛奶、生肉）中，最好使用 37°C 的双层培养基进行大肠杆菌和大肠菌群的计数。第二层的目的是限制对表面的侵入，这可能会干扰读数

### 使用限制

- 存在少数  $\beta$ -D-葡萄糖醛酸酶阴性的 *大肠杆菌* 菌株；例如 *大肠杆菌* O157
- *沙门氏菌* 的一些血清型和少数 *志贺氏菌* 拥有  $\beta$ -D-葡萄糖醛酸酶 (<1.5%)

### 质量控制

- Bio-Rad 公司生产和销售的每一种产品，从接收原材料到销售成品的各个阶段都要受到质量保证程序的约束。每批成品都根据 EN ISO 11133 进行质量控制，只有满足验收标准才能上市。与每批次的质量和um控制有关的文件均进行存档
- 有关 SDS 产品安全信息和分析证书，请访问 [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)。

## 第 7 部分

### 操作流程

#### 干粉培养基的制备

1. 使用前请摇晃瓶子。
2. 将 37 g 粉末溶解在 1 L 蒸馏水中，并进行搅拌，直到得到均匀的悬浮液。
3. 等待 5 分钟并混合，直到获得均匀的溶液。
4. 缓慢加热，不断搅拌，然后煮沸直至完全溶解。
5. 分装，然后在 121° C 下高压灭菌 15 分钟。
6. 使用前将培养基冷却到 44-47°C。
7. 一瓶 500 g 粉末可制成 13.5 L 培养基。

## 第 8 部分

### 阳性结果的确认

#### 样品准备

按照适用于相关产品的标准方法稀释样品。

#### 接种和平板读数

1. 使用无菌移液管，将 1 ml 待测样品（液体产品）或 1 ml 储备悬浮液（其他产品）和/或其 1 ml 十分之一稀释液转移到无菌培养皿中。
2. 将大约 15 ml 已冷却至 44–47° C 的融化培养基倒入样品中。通过搅拌使之均匀。
3. 在阴凉的平面上静置凝固。
4. 将培养皿翻转过来，并在下列环境下培养：
  - a. 在  $37 \pm 1^\circ \text{C}$  下培养  $21 \pm 3$  小时，用于同时进行*大肠杆菌*和其他大肠菌群的计数
  - b. 在  $44 \pm 1^\circ \text{C}$  下培养  $21 \pm 3$  小时，用于*大肠杆菌*的计数
5. 在 AOAC 验证的背景下，37° C 和 44° C 都是经验证可用于*大肠杆菌*和其他大肠菌群的同步计数。
6. *大肠杆菌*的典型菌落为紫色至粉红色。*大肠杆菌*以外的*大肠菌群*的典型菌落是蓝色的。
7. 为了便于计数，只选择含有少于 150 个特征菌落和少于 300 个菌落的培养皿。
8. 由于*大肠杆菌*是大肠菌群的成员，因此将蓝色和紫色菌落加在一起计算出总大肠菌群。
9. 关于接种、菌落计数、计算和结果表达，请参考 EN ISO 7218 标准。
10. 孵育步骤后，平板可在 2–8° C 下储存 72 小时。

## 第 8 部分

### 阳性结果的确认

不适用。

## 第 9 部分

### 其他方法的确认

不适用。

第 10 部分  
测试性能和验证  
第 10 部分

测试性能和验证

证书	范围	验证方案	参考方案	证书参考
AOAC-RI	生碎牛肉、生去骨猪肉、发酵香肠、 加工火腿、加工火鸡、冷冻火鸡胸肉、 生碎鸡肉、白软干酪、 加工乳清干酪、生牛奶和婴儿配方奶粉	性能测试方法	AOAC 官方方法 966.24	 许可 # 050601
NF 验证	所有人类食品动物饲料和环境样品 (大肠杆菌 37° C)	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2	 BRD : 07/07 – 12/04 农业企业的替代分析方法 通过 AFNOR 认证 <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf- validation.afnor.org/en</a>
NF 验证	所有供人类食用的食品 (大肠杆菌 44° C)	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2	 BRD : 07/01-07/93 农业企业的替代分析方法 通过 AFNOR 认证 <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf- validation.afnor.org/en</a>
NF 验证	所有人类食品动物饲料和环境样品 (大肠菌群 37° C)	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2 ISO 4832	 BRD : 07/08 – 12/04 农业企业的替代分析方法 通过 AFNOR 认证 <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf- validation.afnor.org/en</a>

## 第 11 部分

### 参考资料

NordVal	所有供人类食用的食品	EN ISO 16140-2	ISO 16649-2 ISO 4832	 NordVal# 020
---------	------------	-------------------	-------------------------	---

## 第 11 部分

### 参考资料

AOAC Official Method 966.24: Coliform Group and Escherichia coli.

Grand M and Baumgartner A (1996). Chim Alim Hyg 623–630.

ISO 16649-2 (July 2001): Food microbiology – Horizontal method for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive Escherichia coli - Part 2: Colony count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-  $\beta$ -D-glucuronide.

ISO 4832 (July 2006): Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique.

ISO 7218:2007/AMD1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations

ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 18593: 2018. Microbiology of the food chain - Horizontal methods for surface sampling

Majchrazak V et al. (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. April 27–29, Lille, France.

Moini R et al. (1996). Indust Aliment 793–796.

Ochin D et al. (1993). New method for rapid detection and enumeration of Escherichia coli in food products. Colloque Société Française de Microbiologie. April 28–29, Paris, France.

Ochin D et al.(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. September 12–15, London, UK.



第 12 部分  
 修订记录  
 第 12 部分  
 修订记录

发布日期	文件编号	变更
2020 年 11 月	10000127899 Ver A	- 主要变更 - 新的文档设计 - 文件编号变更 – 先前版本 RAPID' <i>E.coli</i> 2_V05_05-10-15
2022 年 12 月	10000127899 Ver B	- 环境样本 AFNOR 验证的扩展 - 孵育后平板的储存
2023 年 3 月	10000127899 Ver C	- 对于动物饲料的 NF 验证范围扩展

请访问 [www.bio-rad.com/rapidmedia](http://www.bio-rad.com/rapidmedia), 了解有关我们全系列 RAPID 显色培养基的更多信息。

BIO-RAD 是 Bio-Rad Laboratories, Inc. 的商标。此处使用的所有商标均为其各自所有者的财产。



**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

10000127899 Ver C US/EG

Sig 0123