GLBiocontrol
PROCEDURES

DENDRIDIAG® UPW

MODE OPERATOIRE POUR LA QUANTIFICATION DE LA FLORE TOTALE D'UNE EAU ULTRA-PURE PAR ATP-METRIE

- LUMINOMETRE KIKKOMAN PD30 -

INDICE DU DOCUMENT : V2018-07

GL BIOCONTROL – Société spécialisée en gestion des risques microbiologiques présents dans les eaux
9, avenue de l'Europe - CAP ALPHA - 34 830 CLAPIERS - FRANCE / Tél : +33.(0)9.67.39.35.20 - Fax : +33.(0)9.55.25.40.31
Email : contact@gl-biocontrol.com - Web : www.gl-biocontrol.com

SOMMAIRE

Présentation de la société GL BIOCONTROL 3

Qu'est-ce que l'ATP-métrie ? 4

Pourquoi adopter une surveillance microbiologique par ATP-métrie ? 5

Protocole de mesure d'une eau ultra-pure prélevée dans un flacon ou cuve 6

- **Matériel nécessaire** 6
- **Procédure** 8

Protocole de mesure d'une eau ultra-pure prélevée à partir d'une vanne PEMS 11

- **Matériel nécessaire** 11
- **Procédure** 13

Analyse des résultats 16

- **Mesure du blanc méthode (Rbm)** 16
- **Calcul de la valeur de flore totale** 17
- **Gestion des données avec le fichier Excel** 17
- **Interprétation des résultats** 19

Gestion des anomalies 20

Contrôles 22

F.A.Q. 23

Contact 30

GL BIOCONTROL – Société spécialisée en gestion des risques microbiologiques présents dans les eaux
9, avenue de l'Europe - CAP ALPHA - 34 830 CLAPIERS - FRANCE / Tél : +33.(0)9.67.39.35.20 - Fax : +33.(0)9.55.25.40.31
Email : contact@gl-biocontrol.com - Web : www.gl-biocontrol.com

Présentation de la société GL BIOCONTROL

La société GL BIOCONTROL est spécialisée dans la **maîtrise des risques environnementaux**, plus précisément, dans l'ingénierie sanitaire et la surveillance microbiologique des eaux et des surfaces.

Nos clients sont des professionnels de l'environnement : industriels, exploitants, sociétés de maintenance, traiteurs d'eau, laboratoires, bureaux d'études et collectivités publiques.

Nous sommes organisés autour de 5 activités : les études, la recherche & développement, les analyses, les produits et les formations. À travers ces domaines d'activité, GL BIOCONTROL :

- **Développe** des outils de surveillance du risque microbiologique (kits de quantification de la flore totale par ATP-métrie, kit d'extraction et de purification d'ADN, kit d'amplification PCR temps réel, membranes électropositives pour virus…).
- **Utilise** les méthodologies et les outils modernes de la biologie pour étudier le monde microbien (ATP-métrie, qPCR, NGS...).
- **Etudie** les écosystèmes de l'environnement pour anticiper et prévenir les risques sanitaires liés en particulier aux *Legionella* et *Pseudomonas* (analyse méthodique des risques, diagnostic microbiologique, cartographie ATP...).
- **Conseille** les acteurs de « la filière eau » dans la conduite de leurs installations pour réduire le risque sanitaire et l'empreinte environnementale (biosurveillance des circuits, pack de surveillance, évaluation de l'efficacité des procédés et des procédures de traitement...).
- **Forme** les professionnels de l'environnement sur la gestion des risques microbiologiques et sur les techniques de laboratoire.

GL BIOCONTROL propose le nécessaire permettant de quantifier la flore totale présente dans les eaux, sur les surfaces et dans l'air par **ATP-métrie** : les kits de mesures **DENDRIDIAG®**.

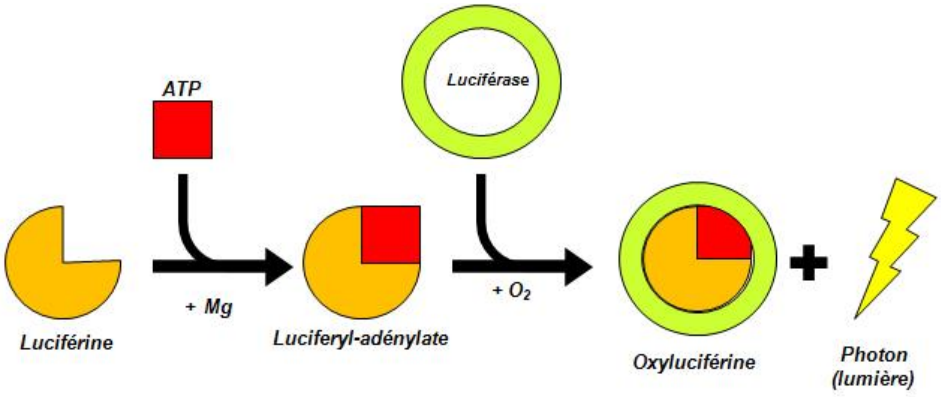
Qu'est-ce que l'ATP-métrie ?

« L'ATP-métrie est une technique de biologie moléculaire, basée sur le principe de la bioluminescence, qui permet de mesurer une quantité d'ATP présente dans un échantillon »

L'**adénosine triphosphate** (ATP) est l'intermédiaire énergétique majeur et obligatoire de très nombreuses réactions du métabolisme cellulaire. Toute cellule vivante produit et consomme de l'ATP. Ce coenzyme est **spécifique des milieux vivants**, on considérera que toute trace d'ATP est le témoin d'une trace de vie.

Dans l'eau, quantifier l'ATP présent à l'intérieur des cellules revient à **quantifier les microorganismes totaux** (flore totale ou biomasse totale).

L'**ATP-métrie** est une technique de mesure basée sur le principe de la **bioluminescence**. La lumière émise par une **réaction enzymatique** utilisant la luciférine et la luciférase de luciole est mesurée :



L'ATP, en présence d'un complexe Luciférine/Luciférase et d'un catalyseur, libère de l'énergie sous forme de **lumière**. En mesurant la quantité de lumière émise à l'aide d'un **luminomètre**, on en déduit la **quantité d'ATP en picogramme par litre**. La flore totale, exprimée en **équivalent bactéries par litre**, est calculée à partir de la relation suivante : 1 picogramme ≈ 1 000 bactéries.

La méthode de mesure de la flore totale par ATP-métrie est un **test de terrain** dont le résultat est obtenu en quelques minutes.

Pourquoi adopter une surveillance microbiologique par ATP-métrie ?

La contamination ou la dégradation de la qualité microbiologique de l'eau trouve ses origines dans la qualité de la ressource, dans la qualité des matériaux composant le réseau et/ou dans les procédures d'exploitation. Il n'existe pas de solution définitive d'éradication des problèmes de microbiologie. Seule une démarche commençant par l'**observation** de l'état du réseau et se poursuivant par le **suivi** de l'efficacité des actions correctives peut conduire à la maîtrise de la sécurité sanitaire.

La plupart des textes réglementaires relatifs à la gestion des risques microbiologiques dans les circuits d'eau demandent aux exploitants de mettre en place des **indicateurs de suivi**. Ils permettent d'anticiper une dérive de l'installation pouvant aboutir à un résultat positif en culture lors du contrôle réglementaire (*Legionella* ou *Pseudomonas* par exemple).

Le choix d'un indicateur de surveillance se porte en général vers une technologie dont la **fiabilité**, le **coût** et la **facilité** de mise en œuvre permettent de réaliser le test à fréquence suffisamment élevée pour prévenir cette dérive.

Parmi ces indicateurs microbiologiques, les plus répandus sur le marché sont le dénombrement des germes revivifiables à 22°C ou 36°C, la PCR quantitative, l'ATP-métrie qualitative (au format « stylo ») et l'**ATP-métrie quantitative**.

L'ATP-métrie quantitative se révèle être un des **meilleurs indicateurs** de surveillance biologique du marché par sa rapidité et simplicité de mise en œuvre. La mise en œuvre d'une biosurveillance par ATP-métrie quantitative vous permettra :

- **De gérer l'encrassement de vos membranes d'osmose :** anticiper l'encrassement biologique, gérer les risques pour la santé publique (dialyse), éviter les arrêts de production.
- **De surveiller votre réseau :** déclencher les traitements seulement quand nécessaire, réduire les défauts de production, réduire les coûts d'arrêt d'installation.
- **D'évaluer l'efficacité de vos procédures de traitement :** valider l'efficacité des différentes phases (nettoyage, désinfection, rinçage), réduire le temps de mobilisation des équipes.
- **D'identifier les zones propices au développement :** caractériser les points critiques du circuit d'eau en temps réel, détecter un élément de réseau produisant de la biomasse, identifier le dysfonctionnement d'un élément de réseau.

Protocole de mesure d'une eau ultra-pure prélevée dans un flacon ou cuve

Matériel nécessaire

Kit de réactifs pour 60 mesures

Produit	Quantité	
Flacon compte-gouttes **DENDRIDIAG® UPW**	6	
Flacon compte-gouttes **STANDARD 1000**	1	

*Les réactifs contenus dans le kit d'ATP-métrie (**DENDRIDIAG® UPW** et **STANDARD 1000**) doivent être stockés au congélateur (env. -18°C) et à l'abri de la lumière. Ils peuvent ainsi être conservés durant 12 mois à minima. Suite à leur première utilisation, ces réactifs seront préférentiellement recongelés, ou à défaut conservés au réfrigérateur (3 - 8°C) et à l'abri de la lumière jusqu'à 8 semaines.*

Kit de consommables pour 60 mesures

Produit	Quantité	
Seringue stérile de 10 ml	60	
Filtre de porosité 0,45 µm stérile	60	
Prolongateur luer-lock stérile	60	
Pipette d'aspiration stérile 1 ml	60	

Tube en polypropylène stérile	60	

Les consommables plastiques doivent être conservés dans un endroit sec à température ambiante. Leur date limite d'utilisation est affichée sur leur emballage unitaire (prolongateurs, filtres et seringues).

Equipements

Produit	Quantité	
Luminomètre KIKKOMAN C110 ou équivalent	1	
Pompe de filtration électronique	1	
Hotte à flux laminaire	1	
Réfrigérateur (env. 3 à 8°C) *	1	
Congélateur (env. -18°C) *	1	

* Pour une bonne conservation des réactifs, il est nécessaire de disposer ou d'avoir accès à congélateur ou a minima un réfrigérateur.

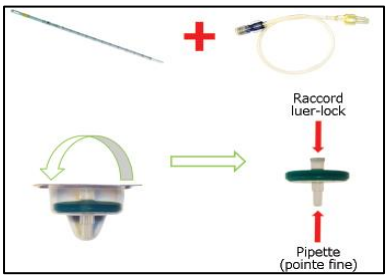
Procédure

Phase 1 : installation

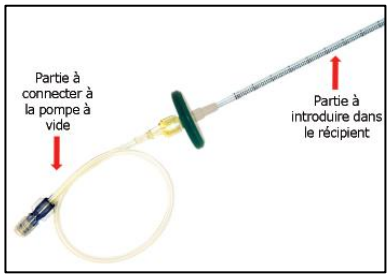
1. Sous la hotte à flux laminaire, décongeler un flacon de réactif DENDRIDIAG® UPW et un flacon de **STANDARD 1000**. Laisser les revenir à température ambiante (supérieure à 18°C),
2. Préparer les consommables plastiques nécessaires à la mesure (seringue, filtre, prolongateur, pipette et tube),
3. Allumer le luminomètre (chambre de mesure fermée) et attendre l'affichage du menu,
4. Sélectionner « *Standard Mode* » et s'assurer que l'affichage présente bien l'état « *Ready* »,
5. Mettre les gants stériles,

*Pour effectuer l'analyse, les réactifs DENDRIDIAG® UPW et **STANDARD 1000** doivent être à température ambiante (entre 18°C et 25°C environ) pour assurer une efficacité enzymatique optimale.*

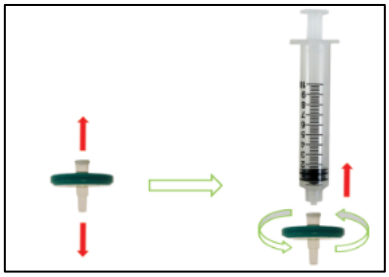
Phase 2 : prélèvement de l'échantillon d'eau



1. Ouvrir l'opercule plastique du filtre sans jeter l'emballage,
2. Ouvrir la pipette stérile du côté de la pointe,
3. Sortir le prolongateur luer-lock de son emballage en prenant garde de ne pas toucher (doigt ou surface) les extrémités qui entreront en contact avec l'échantillon,
4. Connecter la pipette sur le filtre du côté de la pointe fine,
5. Connecter le prolongateur luer-lock sur le filtre,



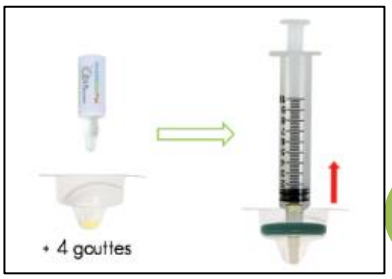
6. Connecter l'autre extrémité du prolongateur luer-lock sur la pompe à vide,
7. Ouvrir le flacon à analyser, y introduire la pipette stérile et aspirer le volume souhaité (environ 1000 ml) en veillant à ne pas sécher le filtre pendant l'aspiration,
8. Noter le volume d'eau filtré,



9. Sortir la seringue de son emballage en prenant garde de ne pas toucher (doigt ou surface) l'embout et aspirer 4 ml d'air dans la seringue,
10. Déconnecter le filtre du montage de filtration,
11. Visser le corps de la seringue sur le filtre en prenant garde de ne pas toucher (doigt ou surface) les extrémités du filtre.

Pousser légèrement sur le piston de la seringue afin d'éliminer le volume mort d'eau jusqu'à ce que les stries du filtre soient visibles. Arrêtez la pression sous peine de déchirer la membrane.

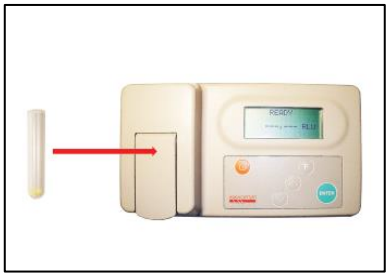
Phase 3 : quantification de la flore totale dans l'échantillon d'eau



12. S'assurer le réactif DENDRIDIAG® UPW ait atteint la température ambiante (entre 18°C et 25°C) et déposer 4 gouttes de réactif DENDRIDIAG® UPW au fond de la cupule (emballage plastique du filtre),
13. Placer la pointe du filtre dans le fond de la cupule où se trouve le réactif DENDRIDIAG® UPW,
14. Aspirer (à contre sens) à l'aide de la seringue et au travers du filtre, la totalité du volume de réactif DENDRIDIAG® UPW contenu dans la cupule en une seule fois. Maintenir la dépression à l'intérieur de la seringue,

A partir de ce point, les étapes qui suivent doivent être réalisées en un temps réduit pour obtenir un résultat optimal, aucun temps de pose n'est permis.

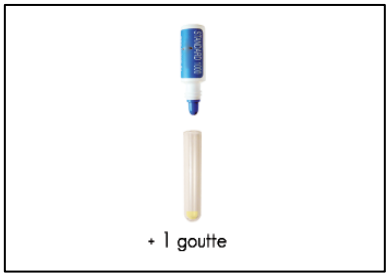
15. Par une pression constante sur le piston de la seringue, repousser la totalité du réactif dans le tube jusqu'à l'apparition d'une mousse blanche. L'extrémité du filtre doit entrer en contact avec la surface intérieure du tube afin que le liquide s'écoule sur la paroi et descende jusqu'au fond. Stopper la pression dès que la mousse apparaît pour ne pas créer un « bouchon » en haut du tube.
16. Placer le tube dans le luminomètre, refermer le capot et appuyer sur le bouton « Enter »,
17. Après 10 secondes de mesure, noter le résultat R1 en RLU (Relative Light Unit).



Si l'appareil affiche le résultat « OVERSCALE », la limite haute de quantification a été dépassée (1 000 000 RLU). Dans ce cas, stopper le protocole et recommencer l'étape 1 en filtrant un volume plus faible (soit le 1/10 environ du volume initial).

GL BIOCONTROL – Société spécialisée en gestion des risques microbiologiques présents dans les eaux
9, avenue de l'Europe - CAP ALPHA - 34 830 CLAPIERS - FRANCE / Tél : +33.(0)9.67.39.35.20 - Fax : +33.(0)9.55.25.40.31
Email : contact@gl-biocontrol.com - Web : www.gl-biocontrol.com

18. Immédiatement, ouvrir le capot et récupérer le tube,
19. Introduire au centre du tube une goutte de **STANDARD 1000** (ajout dosé). Dans le cas où la mousse formerait une barrière dans la partie supérieure du tube, tapoter le tube sur une surface plane pour faire descendre la mousse, puis ajouter la goutte de **STANDARD 1000**. Lors du dépôt de la goutte, le compte-goutte ne doit pas toucher le tube.



20. Homogénéiser le mélange en tapotant le tube sur une surface plane,
21. Replacer le tube dans le luminomètre, refermer le capot et appuyer sur le bouton « Enter »,
22. Après 10 secondes de mesure, noter le résultat R2 en RLU.

Si l'appareil affiche le résultat « OVERSCALE », la limite haute de quantification a été atteinte (1 000 000 RLU). Dans ce cas, stopper le protocole et recommencer l'étape 1 en filtrant un volume plus faible (de moitié).

Protocole de mesure d'une eau ultra-pure prélevée sur vanne PEMS

Matériel nécessaire

Kit de réactifs pour 60 mesures

Produit	Quantité	
Flacon compte-gouttes **DENDRIDIAG® UPW**	6	
Flacon compte-gouttes **STANDARD 1000**	1	

*Les réactifs contenus dans le kit d'ATP-métrie (**DENDRIDIAG® UPW** et **STANDARD 1000**) doivent être stockés au congélateur (env. -18°C) et à l'abri de la lumière. Ils peuvent ainsi être conservés durant 12 mois à minima. Suite à leur première utilisation, ces réactifs seront préférentiellement recongelés, ou à défaut conservés au réfrigérateur (3 - 8°C) et à l'abri de la lumière jusqu'à 8 semaines.*

Kit de consommables pour 60 mesures

Produit	Quantité	
Seringue stérile de 10 ml	60	
Filtre de porosité 0,45 µm stérile	60	
Adaptateur luer-lock / PEMS stérile	60	
Tube en polypropylène stérile	60	

Les consommables plastiques doivent être conservés dans un endroit sec à température ambiante. Leur date limite d'utilisation est affichée sur leur emballage unitaire (flacons, filtres et seringues).

Equipements

Produit	Quantité	
Luminomètre KIKKOMAN C110 ou équivalent	1	
Hotte à flux laminaire	1	
Réfrigérateur (env. 3 à 8°C) *	1	
Congélateur (env. -18°C) *	1	

* Pour une bonne conservation des réactifs, il est nécessaire de disposer ou d'avoir accès à congélateur ou a minima un réfrigérateur.

GL BIOCONTROL – Société spécialisée en gestion des risques microbiologiques présents dans les eaux
9, avenue de l'Europe - CAP ALPHA - 34 830 CLAPIERS - FRANCE / Tél : +33.(0)9.67.39.35.20 - Fax : +33.(0)9.55.25.40.31
Email : contact@gl-biocontrol.com - Web : www.gl-biocontrol.com

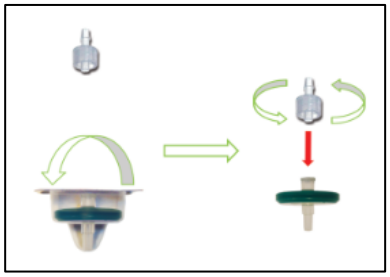
Procédure

Phase 1 : installation

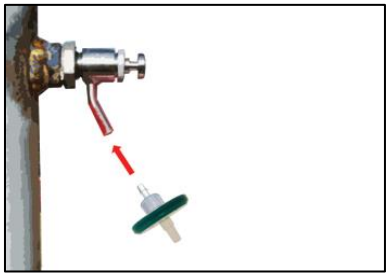
- Sous la hotte à flux laminaire, décongeler un flacon de réactif DENDRIDIAG® UPW et un flacon de **STANDARD 1000**. Laisser les revenir à température ambiante (supérieure à 18°C),
- Préparer les consommables plastiques nécessaires à la mesure (seringue, filtre, adaptateur luer-lock et tube),
- Allumer le luminomètre (chambre de mesure fermée) et attendre l'affichage du menu,
- Sélectionner « *Standard Mode* » et s'assurer que l'affichage présente bien l'état « *Ready* »,
- Mettre les gants stériles,

*Pour effectuer l'analyse, les réactifs DENDRIDIAG® UPW et **STANDARD 1000** doivent être à température ambiante (entre 18°C et 25°C environ) pour assurer une efficacité enzymatique optimale.*

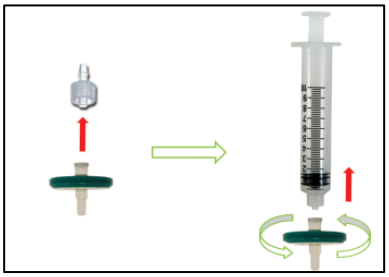
Phase 2 : prélèvement de l'échantillon d'eau



1. Ouvrir l'opercule plastique du filtre sans jeter l'emballage,
2. Connecter l'adaptateur luer-lock sur le filtre en prenant garde de ne pas toucher (doigt ou surface) les extrémités des éléments,
3. Purger le point de puisage pendant environ 20 secondes puis stopper l'écoulement,
4. Connecter le montage raccord-filtre sur la vanne,



5. Ouvrir la vanne de prélèvement et filtrer 1000ml. Placer un flacon poubelle sous le point de prélèvement afin de mesurer le volume d'échantillon filtré,
6. Noter le volume d'eau filtré,
7. Sortir la seringue de son emballage en prenant garde de ne pas toucher (doigt ou surface) l'embout et aspirer 4 ml d'air dans la seringue,

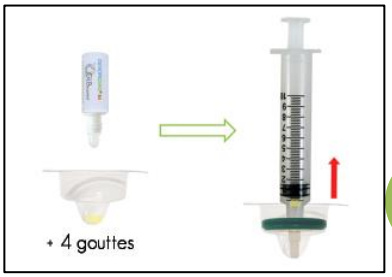


8. Retirer le montage de la vanne et déconnecter le filtre du montage de filtration,
9. Visser le corps de la seringue sur le filtre en prenant garde de ne pas toucher (doigt ou surface) les extrémités.

   Pousser légèrement sur le piston de la seringue afin d'éliminer le volume mort d'eau jusqu'à ce que les stries du filtre soient visibles. Arrêtez la pression sous peine de déchirer la membrane.

Phase 3 : quantification de la flore totale dans l'échantillon d'eau

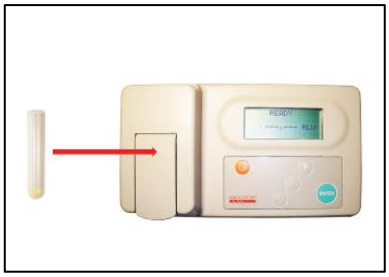
*Pour cette étape, les réactifs **DENDRIDIAG® UPW** et **STANDARD 1000** doivent être à température ambiante (entre 18°C et 25°C environ) pour assurer une efficacité enzymatique optimale.*



10. Déposer 4 gouttes de réactif **DENDRIDIAG® UPW** au fond de la cupule (emballage plastique du filtre),
11. Placer la pointe du filtre dans le fond de la cupule où se trouve le réactif **DENDRIDIAG® UPW**,
12. Aspirer (à contre sens) à l'aide de la seringue et au travers du filtre, la totalité du volume de réactif **DENDRIDIAG® UPW** contenu dans la cupule en une seule fois. Maintenir la dépression à l'intérieur de la seringue,

A partir de ce point, les étapes qui suivent doivent être réalisées en un temps réduit pour obtenir un résultat optimal, aucun temps de pose n'est permis.

13. Par une pression constante sur le piston de la seringue, repousser la totalité du réactif dans le tube jusqu'à l'apparition d'une mousse blanche. L'extrémité du filtre doit entrer en contact avec la surface intérieure du tube afin que le liquide s'écoule sur la paroi et descende jusqu'au fond. Stopper la pression dès que la mousse apparaît pour ne pas créer un « bouchon » en haut du tube.



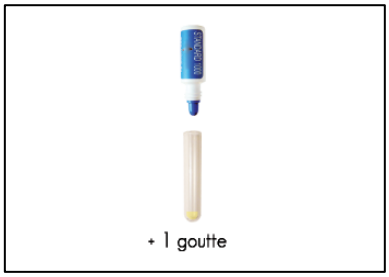
14. Placer le tube dans le luminomètre, refermer le capot et appuyer sur le bouton « Enter »,
15. Après 10 secondes de mesure, noter le résultat R1 en RLU (Relative Light Unit).

Si l'appareil affiche le résultat « OVERSCALE », la limite haute de quantification a été dépassée (1 000 000 RLU). Dans ce cas, stopper le protocole et recommencer l'étape 1 en filtrant un volume plus faible (soit le 1/10 environ du volume initial).

16. Immédiatement, ouvrir le capot et récupérer le tube,

GL BIOCONTROL – Société spécialisée en gestion des risques microbiologiques présents dans les eaux
9, avenue de l'Europe - CAP ALPHA - 34 830 CLAPIERS - FRANCE / Tél : +33.(0)9.67.39.35.20 - Fax : +33.(0)9.55.25.40.31
Email : contact@gl-biocontrol.com - Web : www.gl-biocontrol.com

17. Introduire au centre du tube une goutte de **STANDARD 1000** (ajout dosé). Dans le cas où la mousse formerait une barrière dans la partie supérieure du tube, tapoter le tube sur une surface plane pour faire descendre la mousse, puis ajouter la goutte de **STANDARD 1000**. Lors du dépôt de la goutte, le compte-goutte ne doit pas toucher le tube.



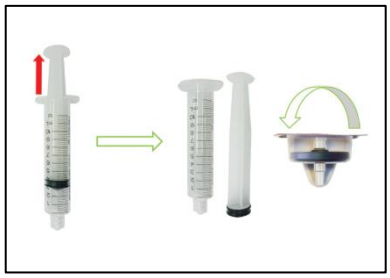
18. Homogénéiser le mélange en tapotant le tube sur une surface plane,
19. Replacer le tube dans le luminomètre, refermer le capot et appuyer sur le bouton « Enter »,
20. Après 10 secondes de mesure, noter le résultat R2 en RLU.

Si l'appareil affiche le résultat « OVERSCALE », la limite haute de quantification a été atteinte (1 000 000 RLU). Dans ce cas, stopper le protocole et recommencer l'étape 1 en filtrant un volume plus faible (de moitié).

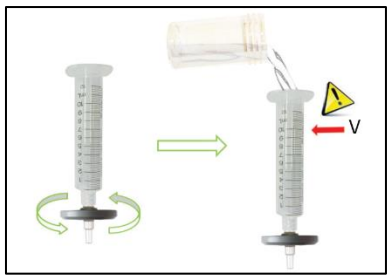
Analyse des résultats

Mesure du blanc méthode (Rbm)

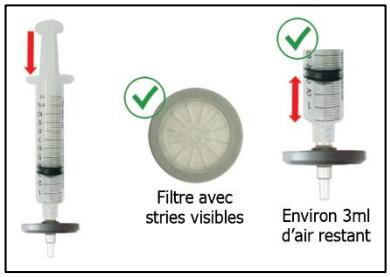
Afin d'avoir une analyse la plus sensible et juste possible, il est nécessaire de soustraire le bruit de fond de la méthode. Pour cela, il est conseillé d'effectuer une mesure d'ATP sur une eau stérile :



1. Sortir la seringue 10 ml de son emballage. Ne pas toucher l'extrémité qui entrera en contact avec l'échantillon,
2. Retirer le piston en prenant garde de ne pas toucher (doigt ou surface) l'extrémité noire qui entrera en contact avec l'échantillon,
3. Ouvrir l'opercule plastique du filtre sans jeter l'emballage,
4. Visser fermement la seringue sur le filtre pour assurer l'étanchéité,

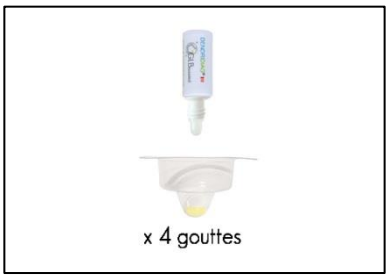


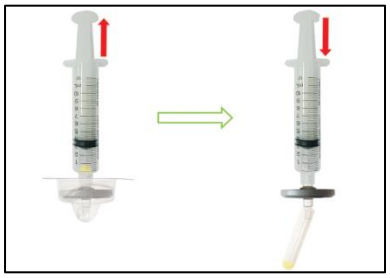
5. Verser le contenu du flacon d'eau stérile dans le corps de la seringue,
6. Replacer le piston de la seringue et filtrer la totalité de l'échantillon jusqu'à ce que les stries du filtre soient à nouveau visibles. Stopper alors la pression.
   Ne pas faire descendre le piston jusqu'au fond de la seringue pour ne pas sécher le filtre.



S'assurer que le réactif soit proche de la température ambiante (>18°C). Chauffer entre vos mains si nécessaire.

7. Déposer 4 gouttes de **DENDRIDIAG® UPW** au fond de la cupule (emballage plastique du filtre),
8. Placer la pointe du filtre dans le fond de la cupule où se trouve le réactif **DENDRIDIAG® UPW**,
9. Aspirer (à contre sens) à l'aide de la seringue et au travers du filtre, la totalité du volume de réactif **DENDRIDIAG® UPW** contenu dans la cupule en une seule fois. Maintenir la dépression à l'intérieur de la seringue,
10. Par une pression constante sur le piston de la seringue, repousser la totalité du réactif dans le tube jusqu'à l'apparition d'une mousse blanche.





11. Introduire le tube dans le luminomètre, fermer le capot et presser le bouton « Enter »,
12. Après 10 secondes de mesure, noter le résultat Rbm obtenu en RLU (Relative Light Unit),

Calcul de la valeur de flore totale

La concentration en ATP intracellulaire est exprimée en picogramme d'ATP par litre. Pour obtenir le résultat, réaliser les opérations suivantes :

Calcul de l'ETALON (en RLU/pgATP) :

$$\text{ETALON} = \frac{R2 - R1}{1\,000}$$

Calcul de la valeur de biomasse (en pgATP/l) :

$$[ATP] = \frac{R1 - Rbm}{ETALON \times V}$$

Avec :

R1 = résultat sur l'échantillon en RLU

R2 = résultat sur échantillon + standard (ajout dosé) en RLU

ETALON = valeur de l'étalon en RLU/pg ATP

Rbm = résultat du « Blanc méthode » en RLU

V = volume filtré en litre

Il est possible de convertir la concentration en ATP (en pgATP/l) en équivalent bactérie par litre (eq. bact./l) en appliquant la convention suivante : 1 picogramme d'ATP ≈ 1 000 bactéries.
Par exemple, 5 pg/l ≈ 5 000 eq.bact./l.

Si le résultat obtenu est inférieur ou égal à 0, le signal se situe dans le bruit de fond de l'analyse. Le résultat à rendre est le suivant : < 100 bactéries/l, inférieur au seuil de quantification de la méthode.

Gestion des données avec le fichier Excel

Afin de réaliser le calcul présenté ci-dessus, un fichier Excel prêt à remplir est fourni sur la clé USB. Il permet de suivre et d'interpréter les valeurs obtenues via les procédures de nos kits d'ATP-métrie.

Après chaque analyse, la date de la mesure ou le point de prélèvement, le volume filtré ainsi que les valeurs R1 et R2 mesurées par le luminomètre, doivent être rentrés dans le fichier Excel fourni. Seules les cases grisées doivent être complétées.

Les calculs se font automatiquement et sont donnés en :

- **Picogramme** par litre (pg ATP/l),
- Flore totale en **équivalent bactérie** par litre (eq.bact./l),
- Flore totale en **logarithme** (LOG eq.bact./l).

Par défaut, nous utilisons le résultat en logarithme équivalent bactéries. Cependant, vous pouvez travailler sur une des deux autres unités.

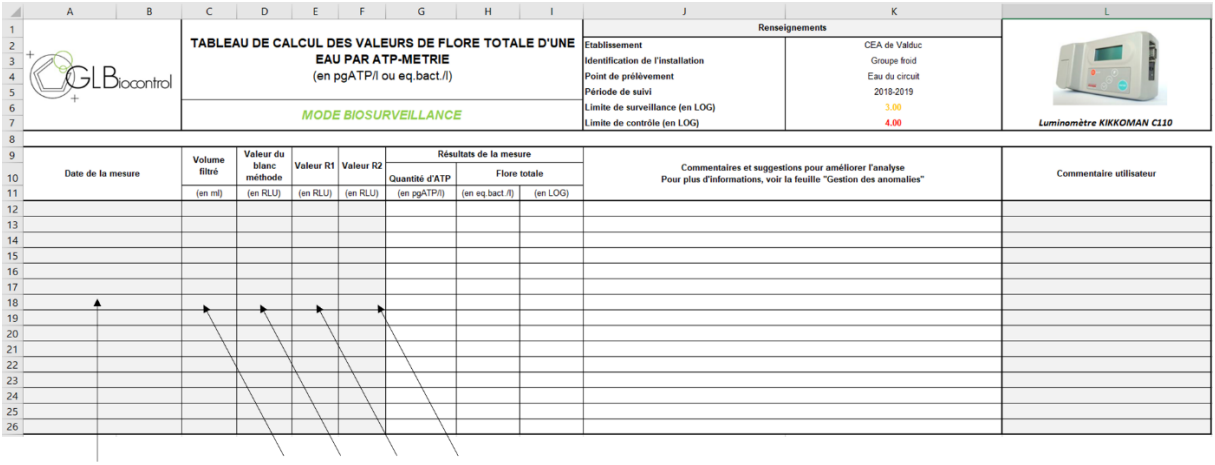


TABLEAU DE CALCUL DES VALEURS DE FLORE TOTALE D'UNE EAU PAR ATP-METRIE (en pgATP/l ou eq.bact./l)

MODE BIOSURVEILLANCE

Renseignements	
Etablissement	CEA de Valduc
Identification de l'installation	Groupe froid
Point de prélèvement	Eau du circuit
Période de suivi	2018-2019
Limite de surveillance (en LOG)	3.00
Limite de contrôle (en LOG)	4.00

Luminomètre KIKKOMAN C110

Date de la mesure	Volume filtré	Valeur du blanc méthode	Valeur R1	Valeur R2	Résultats de la mesure			Commentaires et suggestions pour améliorer l'analyse Pour plus d'informations, voir la feuille "Gestion des anomalies"	Commentaire utilisateur
					Quantité d'ATP	Flore totale			
	(en ml)	(en RLU)	(en RLU)	(en RLU)	(en pgATP/l)	(en eq.bact./l)	(en LOG)		

Date ou point de prélèvement — Volume filtré — Rbm — R1 — R2

Dans le cas où vous effectuez **un suivi de votre réseau dans le temps**, remplissez la feuille « BIOSURVEILLANCE ». Chaque ligne correspond à un jour de mesure. Un graphique se trace automatiquement dans l'onglet « GRAPH BIOSURVEILLANCE ».

⇨ *Il est conseillé de réaliser a minima un **suivi hebdomadaire** de la qualité de l'eau.*

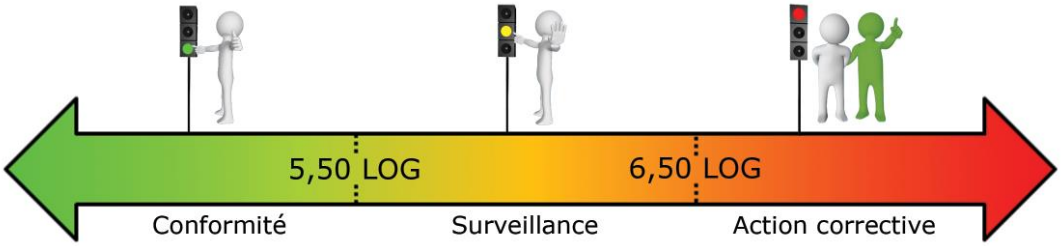
Dans le cas où vous effectuez une **cartographie de votre réseau**, remplissez la feuille « CARTOGRAPHIE ». Chaque ligne correspond à un élément du réseau à contrôler sur un même jour. Un graphique se trace automatiquement dans l'onglet « GRAPH CARTOGRAPHIE ». Si vous souhaitez réaliser plusieurs cartographies, vous pouvez dupliquer les onglets.

⇨ *Il est conseillé de réaliser **une mesure en amont et en aval** de chaque élément important du réseau.*

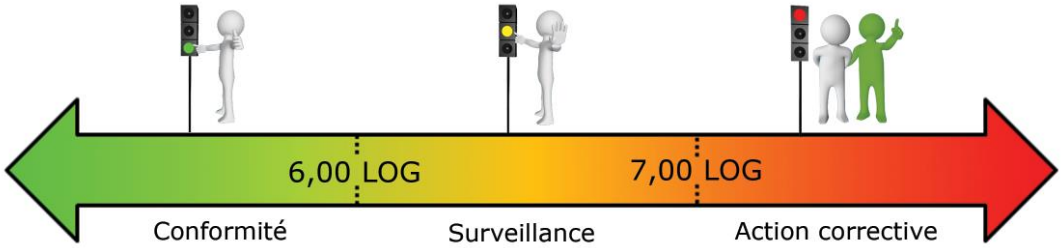
Interprétation des résultats

Des limites de surveillance et de contrôle ont été établies à partir de notre expérience des réseaux d'eau. Ces seuils sont à affiner en fonction des premiers résultats obtenus sur vos circuits. Les flèches suivantes vous aideront à **interpréter vos résultats** :

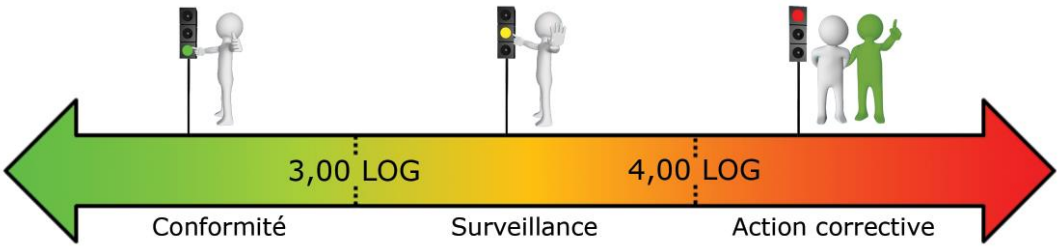
Eau de ville (en LOG eq.bact./l) :



Eau adoucie (en LOG eq.bact./l) :



Eau ultra-pure (en LOG eq.bact./l) :



On considère que lorsqu'une mesure est :

- **Sous le seuil de surveillance**, l'installation est sous contrôle microbiologique,
- **Entre le seuil de surveillance et le seuil de contrôle**, l'installation ne présente pas de danger immédiat. Une action corrective est recommandée si 3 mesures consécutives se situent dans cette zone,
- **Supérieure au seuil de contrôle**, l'installation n'est pas sous contrôle microbiologique. Une action corrective rapide est recommandée.

Dans le fichier Excel, le résultat est affiché en vert, orange ou rouge selon s'il se trouve sous le seuil de surveillance, entre le seuil de surveillance et de contrôle ou au-dessus du seuil de contrôle.

Afin de comprendre les résultats obtenus, nous vous invitons à noter en commentaire sur le tableur Excel tout élément vous semblant important correspondant à l'entretien ou la maintenance.

Gestion des anomalies

Le fichier Excel détecte automatiquement 2 types d'erreur et affiche un message en fonction du problème identifié. Lorsqu'une erreur est signalée, référez-vous au tableau de gestion des anomalies ci-dessous.

Si une mesure est à refaire suite à une erreur, nous vous conseillons de remplacer les valeurs sur la même ligne afin d'éviter que le graphique ne soit erroné.

Problème rencontré	Commentaires et suggestions
Affichage « Faible sensibilité des réactifs. Contrôler le mélange du Standard, la température et l'état des réactifs. » dans le tableur Excel.	Le réactif **DENDRIDIAG® UPW** n'est pas suffisamment actif (périmé, dégradé ou trop froid) pour obtenir une bonne sensibilité. Réchauffer le réactif à une température supérieure à 18°C et recommencer l'analyse. Si le problème persiste, effectuer un ***Contrôle de l'efficacité des réactifs.*** Cf. page 22.
Affichage « Valeur du blanc trop élevée. Vérifier la qualité microbiologique de l'eau stérile et des consommables. » dans le tableur Excel.	L'eau pour préparation injectable, les consommables ou le réactif **DENDRIDIAG® UPW** sont contaminés. Effectuer un ***Contrôle de la contamination du luminomètre*** et/ou un ***Contrôle de la contamination des réactifs*** (cf. page 22). Si le problème persiste, utiliser un flacon d'eau neuf.
Trop de mousse dans le tube.	Incliner le tube pour faire couler le réactif le long de la paroi et stopper la pression dès l'apparition de la mousse. Bien homogénéiser le tube après l'ajout du **STANDARD 1000** en tapotant la base sur une surface plane.
Peu de réactif ressort de la seringue.	Vous avez certainement séché le filtre. Recommencer la manipulation en veillant à ne pas sécher le filtre lors de l'étape de filtration. Pour cela, stopper la pompe dès que le flacon d'eau ou le bac est vide.

Je ne parviens pas à filtrer la totalité de mon flacon.

Lors du prélèvement, la pipette est certainement sortie de l'eau, et de l'air a été aspiré. Dans ce cas, le filtre n'est plus perméable à l'eau.

Si vous avez filtré suffisamment d'eau, notez le volume filtré et continuez la manipulation.

Si vous n'avez pas filtré suffisamment d'eau, changez le montage de prélèvement (filtre, pipette et prolongateur luer-lock) et recommencez l'analyse.

Si vous rencontrez des difficultés, n'hésitez pas nous contacter par mail ou par téléphone :

Yannick FOURNIER
Ingénieur Commercial
9, avenue de l'Europe - Cap Alpha
34 830 CLAPIERS (FRANCE)
GSM : +33 (0)6 33 64 42 29
Tél. : +33 (0)9 67 39 35 20
Email : y.fournier@gl-biocontrol.com

Nicolas FABRE
Dirigeant technique
9, avenue de l'Europe - Cap Alpha
34 830 CLAPIERS (FRANCE)
GSM : +33 (0)6 81 71 31 83
Tél. : +33 (0)9 67 39 35 20
Email : n.fabre@gl-biocontrol.com

Contrôles

Contrôle de la contamination de l'appareil

a) Test :

- Introduire un tube de mesure vide dans le luminomètre,
- Refermer le capot et appuyer sur le bouton « Enter ». Lire le résultat,
- Le résultat doit être inférieur ou égal à 5 RLU.

b) Protocole à suivre en cas de contamination de l'appareil :

A l'aide d'un écouvillon en coton, nettoyer les surfaces internes de la chambre de mesure.

Contrôle de la contamination du réactif

a) Test :

- Dans un tube de mesure, déposer 2 gouttes de **DENDRIDIAG® UPW**,
- Introduire le tube dans la chambre de mesure,
- Refermer le capot et appuyer sur le bouton « Enter ». Lire le résultat,
- Le résultat doit être inférieur à 50 RLU.

b) Protocole à suivre en cas de contamination du réactif :

Eliminer le réactif contaminé et choisir un nouveau flacon de **DENDRIDIAG® UPW.**

Contrôle de l'efficacité des réactifs

a) Test :

- Dans un tube, déposer 2 gouttes de **DENDRIDIAG® UPW** et 1 goutte de **STANDARD 1000** (la température des réactifs doit être supérieure à 18°C),
- Homogénéiser en tapotant le fond du tube sur une surface,
- Introduire le tube dans le luminomètre,
- Refermer le capot et appuyer sur le bouton « Enter ». Lire le résultat,
- Pour une bonne efficacité des réactifs, le résultat affiché doit être supérieur à 50 000 RLU.

b) Protocole à suivre en cas de dérive des réactifs :

Eliminer le réactif qui ne présente pas une efficacité optimale et choisir un nouveau flacon de **DENDRIDIAG® UPW**.

Contrôle de l'état de la batterie

Au démarrage de l'appareil, l'affichage présente une ligne « BATTERY ». L'état de charge de la batterie est défini entre 1 et 5. Si le test affiche un résultat proche de 1 « BATTERY 1 », veuillez brancher le luminomètre sur le secteur et poursuivre les mesures.

F.A.Q.

GENERALITES SUR L'ATP ET LES KITS DENDRIDIAG®

Qu'est-ce que l'ATP ?

L'adénosine triphosphate (ATP) est une molécule **présente chez tous les organismes vivants** pour fournir de l'énergie aux réactions chimiques. L'ATP est spécifique des milieux vivants. On considère que toute trace d'ATP est le témoin d'une trace de vie.

Qu'est-ce que je mesure avec l'ATP-métrie ?

Mesurer une quantité d'ATP revient à mesurer la quantité totale de microorganismes présents dans l'échantillon. L'ATP-métrie est une technique de biologie moléculaire, basée sur le principe de la bioluminescence. La mesure s'effectue à l'aide d'un luminomètre.

Qu'est-ce que je mesure avec le kit d'ATP-métrie DENDRIDIAG® ?

Grâce au kit DENDRIDIAG® et à la filtration, seul **l'ATP intracellulaire** est mesuré. Il s'agit de l'ATP présent à l'intérieur des cellules vivantes représentant les bactéries en bon état.

Il existe aussi l'ATP extracellulaire qui est présent à l'état libre dans l'échantillon. Il est issu des microorganismes « morts » ou en phase de lyse. La filtration permet d'éliminer cet ATP. Sans étape de filtration, c'est l'ATP total qui est mesuré : ATP intracellulaire + extracellulaire.

Quels microorganismes sont lysés par le réactif DENDRIDIAG® ?

Les kits DENDRIDIAG® lysent préférentiellement les bactéries, les cyanobactéries ainsi que les amibes non-enkystées. Pour une lyse totale de tous les microorganismes (moisissures, levures, amibes enkystées et algues) consulter GL BIOCONTROL.

A quelle température dois-je utiliser les réactifs ?

Pour assurer une efficacité enzymatique optimale, le réactif DENDRIDIAG® et le **STANDARD 1000** doivent être à température ambiante (18°C - 25°C).

Comment et combien de temps conserver les réactifs ?

Les réactifs d'ATP-métrie (flacons blancs de DENDRIDIAG®IW, DENDRIDIAG®SW, DENDRIDIAG®UPW et DENDRIDIAG®BF, flacon bleu de **STANDARD 1000** et flacon rouge d'**EXTRACTANT**) doivent être stockés au congélateur (-18°C) et à l'abri de la lumière. Ils peuvent ainsi être conservés 12 mois a minima. Suite à leur première utilisation, ces réactifs seront préférentiellement recongelés, ou à défaut

conservés au réfrigérateur (3 - 8°C) et à l'abri de la lumière jusqu'à 8 semaines. Attention, conservés à température ambiante, les réactifs seront stables moins d'une semaine.

Comment et combien de temps conserver les consommables plastiques ?

Les consommables plastiques doivent être conservés dans un endroit sec à température ambiante. Leur date limite d'utilisation est affichée sur leur emballage individuel.

J'ai oublié le kit DENDRIDIAG® à température ambiante. Que faire ?

Pour une meilleure longévité du kit, l'ensemble des réactifs doit être stocké au congélateur (-18°C). Si vous avez oublié les réactifs à température ambiante et que vous souhaitez vérifier leur efficacité, vous pouvez effectuer un contrôle de ces réactifs. Pour ce faire, reportez-vous au paragraphe '***Contrôle de l'efficacité des réactifs***' page 22.

Dans quels domaines d'application puis-je utiliser les kits DENDRIDIAG® ?

Eau industrielle : installations de refroidissement, circuits de process, unités de production d'eau à usage industriel…

Eau sanitaire : réseaux d'eau à usage sanitaire et réseaux d'eau thermale des établissements de soins et de remise en forme…

Eau ultrapure : boucles à usage médical, pharmaceutique, micro-électronique, réseaux d'eau bactériologiquement maitrisée…

Surface : piscines, process alimentaires, circuits de refroidissement, unités de production d'eau sanitaire…

Air : circuit aérauliques, hôpitaux, bureaux, industries à risques comme les usines de compostage, méthanisation, élevage...

PROTOCOLE DE MESURE

Quel volume d'échantillon dois-je filtrer ?

Par défaut, nous vous conseillons de filtrer un volume de :

- **10 ml** pour le kit IW
- **50 ml** pour le kit SW
- **1000 ml** pour le kit UPW

La filtration d'un volume représentatif offre une meilleure fiabilité des résultats en concentrant les microorganismes sur une membrane de porosité 0,45 µm. Aussi, grâce à la filtration, seul l'ATP intracellulaire est mesuré.

Veillez à toujours noter le volume que vous filtrez pour chaque échantillon.

Peu de réactif ressort de la seringue.

Vous avez certainement séché le filtre. Recommencer la manipulation en veillant à ne pas sécher le filtre lors de l'étape de filtration. Pour cela, stopper la pompe dès que le flacon d'eau ou le bac est vide.

Je ne parviens pas à filtrer la totalité de mon flacon.

Lors du prélèvement, la pipette est certainement sortie de l'eau, et de l'air a été aspiré. Dans ce cas, le filtre n'est plus perméable à l'eau.

Si vous avez filtré suffisamment d'eau, notez le volume filtré et continuer la manipulation.

Si vous n'avez pas filtré suffisamment d'eau, changez le montage de prélèvement (filtre, pipette et prolongateur luer-lock) et recommencez l'analyse.

LUMINOMETRE

J'ai oublié de noter les mesures R1 et R2.

Il est possible de récupérer les résultats RLU dans le luminomètre. Pour cela, une fois le luminomètre correctement allumé, appuyez sur la flèche du haut pour remonter aux dernières valeurs obtenues.

Le luminomètre C110 affiche « OVERSCALE ».

Le luminomètre C110 étant très sensible, il peut arriver qu'il affiche le message « OVERSCALE » sur certains échantillons. Cela signifie que la limite supérieure de linéarité de l'appareil a été dépassée. En d'autres termes, l'échantillon est fortement contaminé. Si vous effectuez vos analyses sur une matrice liquide, recommencez la manipulation en filtrant 1/10ème du volume.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Quelle unité utiliser pour exprimer mes résultats ?

Le picogramme d'ATP par litre (pgATP/l) est l'unité vraie.

Pour une meilleure compréhension du résultat, il est possible d'utiliser l'équivalent bactérie par litre (eq.bact./l) en se basant sur la convention : 1 pgATP ≈ 1 000 bactéries. Ce résultat n'est pas strictement vrai, il s'agit d'une moyenne car la quantité d'ATP varie d'un microorganisme à l'autre et selon la phase de croissance (métabolisme actif ou dormance).

Pourquoi exprimer mes résultats en LOG ?

Exprimer un résultat en LOG permet de savoir si deux valeurs sont significativement différentes. On considère deux résultats différents lorsqu'on mesure 1 LOG d'écart entre les deux valeurs.

L'écriture LOG du résultat en équivalent bactérie par litre permet de simplifier le résultat afin de mieux l'interpréter. La correspondance mathématique de l'unité eq.bact./l au LOG est la suivante :

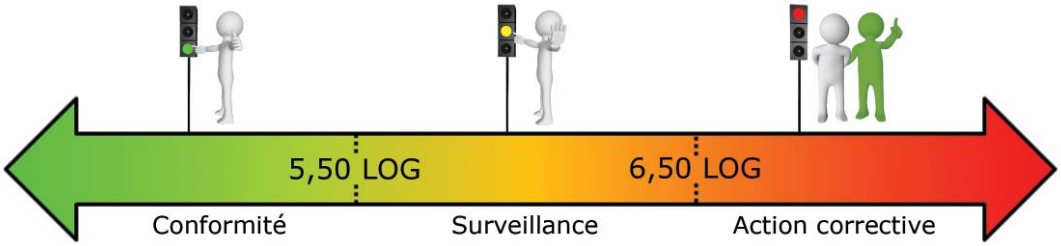
eq.bact./l	LOG(eq.bact./l)
10	1
100	2
1 000	3
10 000	4
100 000	5

Le tableur Excel vous donne automatiquement cette valeur en LOG.

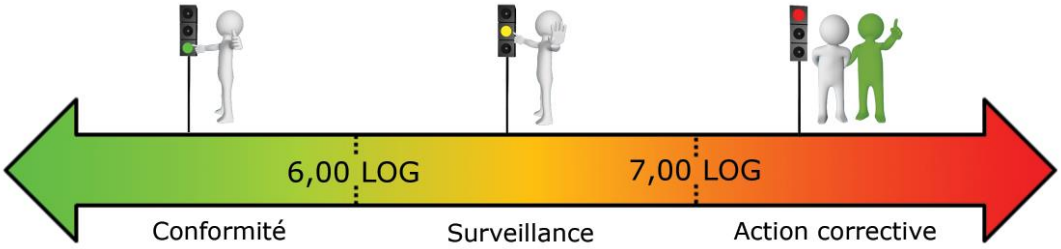
Quelles limites de référence dois-je prendre en compte pour mes analyses sur l'eau ?

A partir de notre retour d'expérience, nous avons établi les limites de surveillance et de contrôle suivantes :

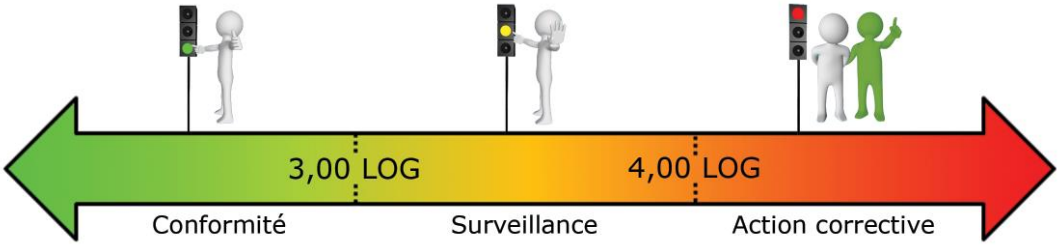
Eau de ville (en LOG eq.bact./l) :



Eau adoucie (en LOG eq.bact./l) :



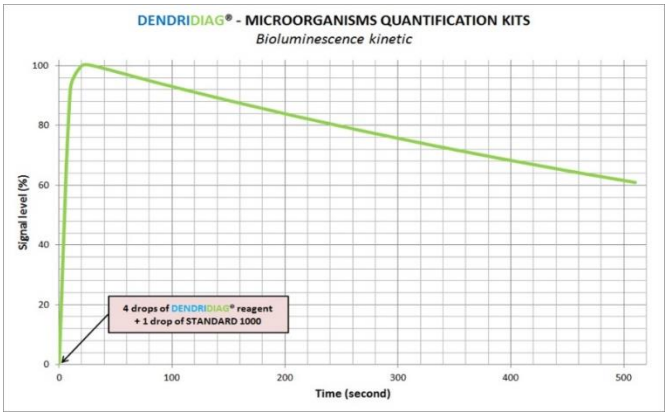
Eau ultra-pure (en LOG eq.bact./l) :



Ces seuils doivent être **ajustés** pour chaque installation car chaque écosystème rencontré est différent.

Pourquoi mon résultat R2 est inférieur au résultat R1 ?

La perte du signal est de 6 à 8% par minute. Si le temps de manipulation est trop important entre l'extraction et l'obtention du résultat R2, l'ajout dosé se fera sur la **phase de décroissance** du signal. Ce phénomène peut être observé sur des quantités d'ATP très importante. Nous vous conseillons de recommencer l'analyse en filtrant un volume d'eau plus faible (de moitié a minima).



Pourquoi le message « Faible sensibilité des réactifs. Contrôler le mélange du Standard, la température et l'état des réactifs. » s'affiche dans le tableau Excel ?

Le réactif **DENDRIDIAG UPW®** n'est pas suffisamment actif (périmé, dégradé ou trop froid) pour obtenir une bonne sensibilité.

Réchauffer le réactif à une température supérieure à 18°C et recommencer l'analyse. Si le problème persiste, effectuer un ***Contrôle de l'efficacité des réactifs.*** Cf. page 22.

Pourquoi le message « Valeur du blanc trop élevée. Vérifier la qualité microbiologique de l'eau stérile et des consommables. » s'affiche dans le tableau Excel ?

L'eau pour préparation injectable, les consommables ou le réactif **DENDRIDIAG® UPW** sont contaminés.

Effectuer un ***Contrôle de la contamination du luminomètre*** et/ou un ***Contrôle de la contamination des réactifs*** (cf. page 22). Si le problème persiste, utiliser un flacon d'eau neuf.

Contact

Pour toute aide ou informations complémentaires sur l'interprétation des résultats, le protocole de mesure ou pour des informations commerciales, contacter par mail ou téléphone :

Yannick FOURNIER
Ingénieur Commercial
9, avenue de l'Europe - Cap Alpha
34 830 CLAPIERS (FRANCE)
GSM : +33 (0)6 33 64 42 29
Tél. : +33 (0)9 67 39 35 20
Email : y.fournier@gl-biocontrol.com

Nicolas FABRE
Dirigeant technique
9, avenue de l'Europe - Cap Alpha
34 830 CLAPIERS (FRANCE)
GSM : +33 (0)6 81 71 31 83
Tél. : +33 (0)9 67 39 35 20
Email : n.fabre@gl-biocontrol.com

Un tutoriel vidéo du protocole de test est disponible dans la clé USB livrée avec l'appareil de mesure ou sur notre site internet dans l'onglet Produits – Kit d'ATP-métrie pour eau industrielle :

www.gl-biocontrol.com

4 façons de commander facilement
par email à contact@gl-biocontrol.com,
par fax au + 33 (0)9 55 25 40 31,
par téléphone au + 33 (0)9 67 39 35 20,
par courrier à GL BIOCONTROL - 9, avenue de l'Europe, Cap Alpha - 34 830 CLAPIERS (FRANCE).
>>> www.gl-biocontrol.com