



# PROCEDURE D'UTILISATION ET DE QUALIFICATION DU KIT DE MESURE DE LA FLORE TOTALE

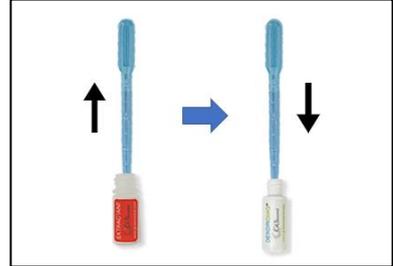
**DENDRIDIAG® UPW**

Rédigé par : Clément FAYE  
Célia MARTINEZ

**Version : Janvier 2021**

## REHYDRATATION DU REACTIF DE MESURE DENDRIDIAG®

1. Décongeler un flacon de reconstitution **EXTRACTANT** et un flacon compte-goutte de réactif **DENDRIDIAG®**.
2. Enlever l'opercule du flacon compte-goutte **DENDRIDIAG®**.
3. A l'aide d'une pipette plastique stérile fournie, aspirer délicatement l'intégralité de la solution d'**EXTRACTANT** en une seule fois. Eviter de faire mousser le produit.
4. Repousser délicatement la totalité de la solution dans le flacon compte-goutte **DENDRIDIAG®**.
5. Enlever l'opercule du bouchon blanc en maintenant l'ouverture vert le haut (capuchon retourné).
6. Visser le bouchon blanc sur le flacon compte-goutte **DENDRIDIAG®** jusqu'à entendre « clic ».
7. Laisser reposer 30 min avant utilisation. Pour limiter au maximum le bruit de fond, laisser reposer 60 min.



Après reconstitution, les réactifs doivent être conservés au congélateur (< -20°C). Ils peuvent subir jusqu'à 5 cycles de congélation-décongélation.

## MESURE D'UN ECHANTILLON

### Phase 1 : installation

1. Sous la hotte à flux laminaire, décongeler un flacon de réactif **DENDRIDIAG® UPW** et un flacon de **STANDARD**. 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,

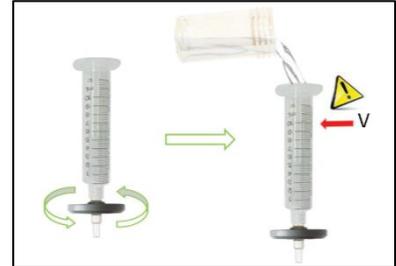


Pour effectuer l'analyse, les réactifs **DENDRIDIAG® UPW** et **STANDARD 1000** doivent être à température ambiante (entre 18°C et 25°C environ) pour assurer une efficacité enzymatique optimale.

### Phase 2 : mesure du blanc méthode (Rbm)

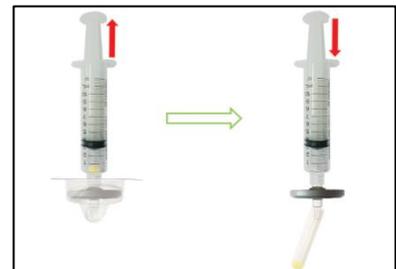
Afin d'avoir une analyse la plus sensible possible, il est nécessaire de soustraire le bruit de fond de la méthode. Pour cela, effectuer une mesure d'ATP sur une eau stérile :

1. Sortir la seringue de son emballage. Retirer le piston et le déposer en prenant garde de ne pas mettre en contact l'extrémité noire et le plan de travail.
2. Ouvrir l'opercule plastique du filtre sans jeter l'emballage.
3. Visser fermement la seringue sur le filtre pour assurer l'étanchéité.
4. Verser le contenu du flacon d'eau stérile dans le corps de seringue.
5. Replacer le piston dans la seringue. Filtrer la totalité de l'échantillon jusqu'à ce que les stries du filtre soient à nouveau visibles. Stopper alors la pression.



 **S'assurer que le réactif soit proche de la température ambiante (>18°C).**

6. Déposer 4 gouttes de réactif **DENDRIDIAG® UPW** au fond de la cupule.
7. Placer la pointe du filtre dans le fond de la cupule, aspirer en une seule fois la totalité du **DENDRIDIAG® UPW** et maintenir la dépression.



8. Par une pression constante sur le piston de la seringue, repousser le réactif dans le tube jusqu'à l'apparition d'une mousse blanche.
9. Placer le tube dans le luminomètre et appuyer sur « Entrer » pour lancer la mesure.
10. Noter le résultat Rbm (en RLU).

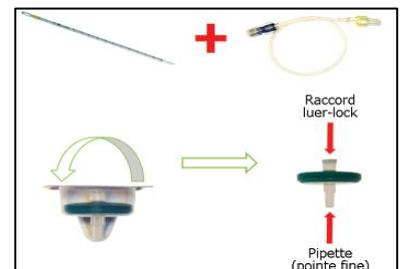
### Phase 3 : prélèvement de l'échantillon d'eau



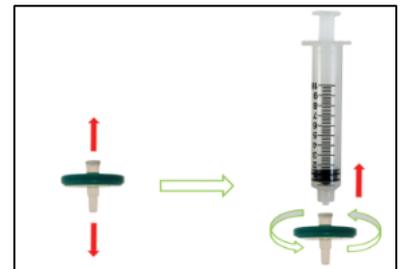
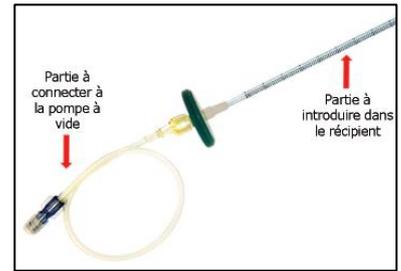
*Afin de faciliter le prélèvement, placer une vanne luer-lock 2 ou 3 voies à la sortie de la pompe à vide.*



1. Ouvrir l'opercule plastique du filtre sans jeter l'emballage,
2. 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,
3. Connecter le raccord luer-lock femelle du prolongateur sur la pompe à vide,
4. Connecter l'autre extrémité du prolongateur luer-lock sur le filtre,
5. Ouvrir la pipette stérile du côté de la pointe,



6. Connecter la pipette sur le filtre du côté de la pointe fine,
7. Ouvrir le flacon à analyser, y introduire la pipette stérile,
8. Mettre en route la pompe à vide et ouvrir la vanne 2 ou 3 voies,
9. Aspirer le volume souhaité en veillant à ne pas sécher le filtre pendant l'aspiration,
10. Stopper la filtration en fermant la vanne,
11. Noter le volume d'eau filtré,
12. 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,
13. Retirer la pipette puis récupérer le filtre,
14. Visser le corps de la seringue sur le filtre en prenant garde de ne pas toucher (doigt ou surface) les extrémités du filtre. Ne pas évacuer le volume d'eau restant dans le filtre.



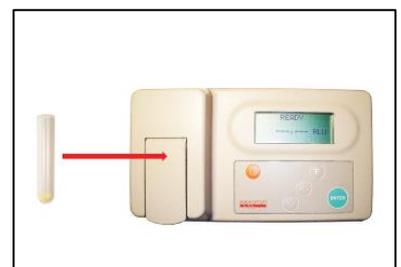
#### Phase 4 : quantification de la flore totale dans l'échantillon d'eau

1. S'assurer que 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),
2. Placer la pointe du filtre dans le fond de la cupule où se trouve le réactif **DENDRIDIAG® UPW**,
3. 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.*

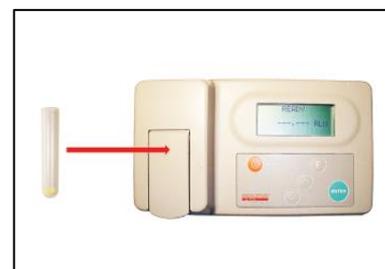
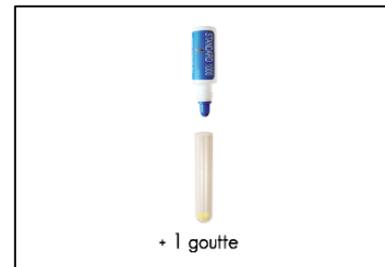
4. Par une pression constante sur le piston de la seringue, repousser la totalité du réactif dans le tube jusqu'à l'apparition d'une mousse blanche. L'extrémité du filtre doit entrer en contact avec la surface intérieure du tube afin que le liquide s'écoule sur la paroi et descende jusqu'au fond. Stopper la pression dès que la mousse apparaît pour ne pas créer un « bouchon » en haut du tube.
5. Placer le tube dans le luminomètre, refermer le capot et appuyer sur le bouton « Enter »,
6. 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).*

7. Immédiatement, ouvrir le capot et récupérer le tube,
8. Introduire au centre du tube une goutte de **STANDARD** (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**. Lors du dépôt de la goutte, le compte-goutte ne doit pas toucher le tube.
9. Homogénéiser le mélange en tapotant le tube sur une surface plane,
10. Replacer le tube dans le luminomètre, refermer le capot et appuyer sur le bouton « Enter »,
11. 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).*

## CALCUL DE LA VALEUR DE FLORE TOTALE

### Calcul manuel

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

Calcul de l'ÉTALON (en RLU/pgATP) :

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

Avec :

**R1** = résultat sur l'échantillon en RLU

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

**ÉTALON** = valeur de l'étalon en RLU/pg ATP

**Rbm** = résultat du « Blanc méthode » en RLU

**V** = volume filtré en litre

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

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



### **Préparation de la gamme d'ATP**

- Déposer 10 gouttes de **STANDARD** dans un tube stérile (noté QS4).
- Prélever 100 µl de **QS4** et les déposer dans un tube contenant 900µl d'eau stérile (noté QS3).
- Prélever 100 µl de **QS3** et les déposer dans un tube contenant 900µl d'eau stérile (noté QS2).
- Prélever 100 µl de **QS2** et les déposer dans un tube contenant 900µl d'eau stérile (noté QS1).

### **Mesure**

- Introduire 40 µl de solution d'ATP dans un tube de mesure.
- Ajouter 2 gouttes de **DENDRIDIAG®**.
- 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 ».
- Pour chaque point de gamme, réaliser la mesure en triplicat.

### **Droite de calibration**

Tracer la droite de calibration donnant la quantité de RLU obtenu (ordonnée) par rapport à la quantité d'ATP théorique (abscisse) :

$$y = ax + b$$

Avec  $y = \text{RLU}$   
 $x = \text{pgATP}/40\mu\text{l théorique}$   
 $a = \text{pente}$   
 $b = \text{ordonnée à l'origine}$

Le coefficient de corrélation  $R^2$  de la droite de calibration doit être supérieur ou égal à 0,98.

## **CONTROLES**

### **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 »,
- 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 »,

- Le résultat doit être inférieur à 50 RLU.

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

Éliminer 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** (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 »,
- 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 :*

Éliminer 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.