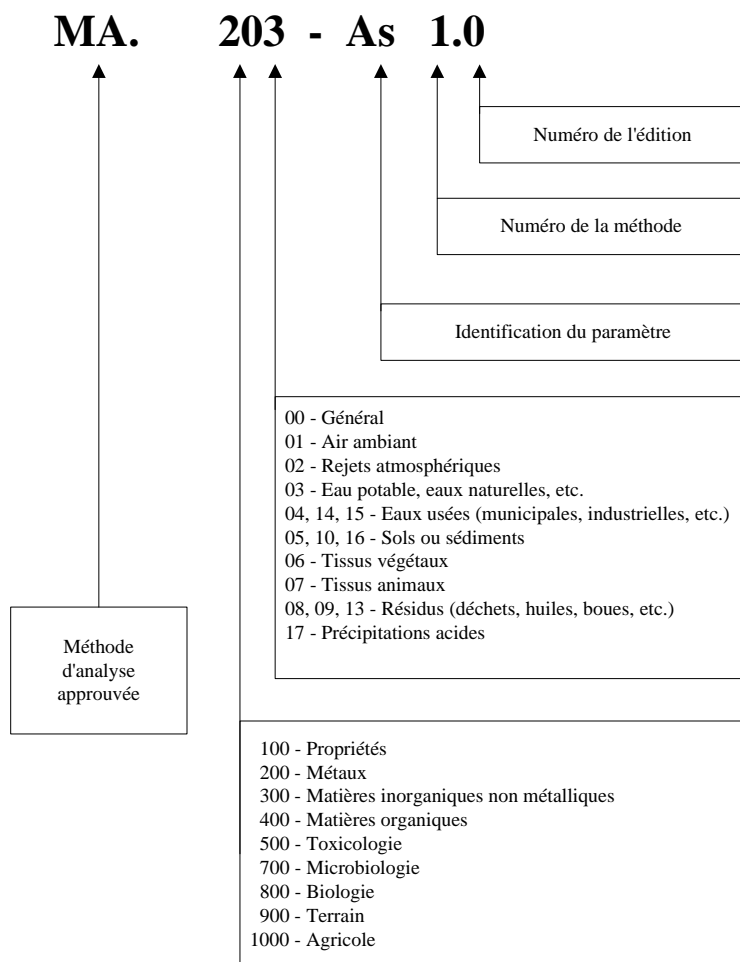


MA. 700 – STA 1.0
Édition : 2000-04-06
Révision : 2005-05-11 (2)

Méthode d'analyse

Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus* :
méthode par filtration sur membrane

Exemple de numérotation :



La première édition d'une méthode est identifiée par l'indice « 0 ». De façon usuelle, après quatre révisions successives, l'indice est augmenté de 1. L'indice peut également être augmenté si une révision entraîne des modifications en profondeur. La date de révision d'une méthode est suivie d'un chiffre indiquant la révision en cours.

Ce document doit être cité de la façon suivante :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC,
Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus* : Méthode par filtration sur membrane. MA. 700 – STA 1.0, Rév. 2, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2005, 20 p.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
1. DOMAINE D'APPLICATION	6
2. PRINCIPE ET THÉORIE	6
3. FIABILITÉ	6
3.1. Interférence	6
3.2. Limite de détection	7
3.3. Limite de quantification	7
3.4. Fidélité	7
3.5. Sélectivité	7
3.6. Taux de faux positifs et de faux négatifs	7
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	8
5. APPAREILLAGE	8
6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS	9
7. PROTOCOLE D'ANALYSE	12
7.1. Préparation des échantillons	13
7.2. Analyse de l'échantillon	13
7.3. Observation des résultats	14
7.4. Confirmation	14
8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	16
8.1. Dénombrement à l'intérieur des limites de quantification	16
8.2. Dénombrement à l'extérieur des limites de quantification	17
9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ	18
10. BIBLIOGRAPHIE	18
Figure 1 - Schéma du protocole de confirmation des colonies de <i>Staphylococcus aureus</i>	20

INTRODUCTION

Le microorganisme *Staphylococcus aureus* est une bactérie de la famille des *Micrococcaceae* de forme sphérique (coque), de 0,8 µm à 1,0 µm de diamètre. Ces coques à Gram positif se présentent généralement en grappes, par paires ou en cellules individuelles compte tenu de l'âge de la culture. C'est une bactérie non mobile, asporulée et aérobie facultatif possédant une catalase.

S. aureus est un microorganisme pathogène dont on connaît au moins deux types de manifestations cliniques chez l'homme. Les staphylocoques sont d'abord souvent mis en cause dans les cas de toxi-infections alimentaires où il y a production d'une entérotoxine thermorésistante responsable de gastro-entérites. Ils sont également responsables d'infections rhinopharyngées et cutanées qui sont de loin prédominantes par rapport aux infections gastro-intestinales.

Les staphylocoques trouvés dans l'eau proviennent principalement de la peau, de la bouche, du nez et de la gorge des baigneurs et occasionnellement d'une pollution fécale. Les staphylocoques pathogènes (*S. aureus*) produisent plusieurs types d'enzymes qui participent à l'envahissement d'un hôte. Ces enzymes sont :

- la coagulase, qui protège la bactérie contre les mécanismes de défense de l'hôte;
- la leucocidine, qui attire et inhibe les leucocytes au site de l'infection (formation de pus);
- les hémolysines, exotoxines qui détruisent les globules rouges;
- la phosphatase et la désoxyribonucléase (Dnase) dont les rôles demeurent ambigus dans le processus d'agression.

De plus, les staphylocoques sont parmi les organismes asporulés les plus difficiles à éliminer. En effet, ils résistent à une température de 60 °C pendant 30 minutes ou à 1 % de phénol pendant 15 minutes. Ils démontrent également une résistance au chlore et aux autres agents de désinfection utilisés dans l'entretien des piscines publiques.

L'influence du milieu et l'état physique d'un individu jouent un rôle primordial dans les infections staphylococciques. Soulignons d'abord que les substances chimiques introduites pour désinfecter l'eau des piscines sont des agents irritants pour la peau et les muqueuses et favorisent ainsi l'agression microbienne. De plus, les germes apportés par les baigneurs forment, avec les huiles de bains, un film microbien dangereux et fortement contaminant à la surface de l'eau des piscines. Finalement, la fatigue musculaire, l'effort prolongé et même le froid peuvent être préjudiciables au baigneur en favorisant l'agression microbienne.

L'origine de *S. aureus*, sa pathogénicité, son pouvoir d'agression, sa résistance et les facteurs environnementaux sont autant de facteurs qui démontrent l'importance de confirmer son absence dans les eaux de piscines. L'ensemble de ces considérations en font le microorganisme indicateur de choix pour les eaux à vocation récréative, les piscines, les bains à remous et les bains flottants.

Cette méthode correspond à la méthode 9213B, section 6, du manuel *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA et WEF, 1998). L'étape facultative de confirmation des colonies emploie des galeries biochimiques d'identification bactérienne.

1. DOMAINE D'APPLICATION

Ce document décrit une méthode de recherche et de dénombrement de *S. aureus* par filtration sur membrane. La technique de la membrane filtrante doit être utilisée dans les eaux limpides et dépourvues de matières en suspension (argiles, substances ferrugineuses, terre, algues, etc.). La présente méthode convient généralement pour les eaux de piscines.

Pour les eaux contenant trop de matières en suspension, il est recommandé d'utiliser la technique de fermentation en tubes multiples (TFTM).

2. PRINCIPE ET THÉORIE

La méthode de la membrane filtrante consiste à recueillir, à identifier et à énumérer à la surface d'une membrane filtrante stérile les bactéries recherchées dans un échantillon d'eau. Pour les *S. aureus*, il s'agit de filtrer à travers la membrane d'une porosité de 0,45 µm un volume déterminé de l'échantillon et d'incuber ensuite cette membrane pendant 48 heures ± 3 heures à 35 °C ± 0,5 °C sur la gélose Baird-Parker. Dans ces conditions, les *S. aureus* forment des colonies de 1,0 mm à 1,5 mm, convexes, noires (par réduction du tellurite) et brillantes avec une zone claire dans la gélose sous la colonie. Il peut arriver qu'une zone opaque se forme à l'intérieur de la zone claire. *S. aureus* produit normalement une zone claire par lipolyse (lécithinase ou lipase) ou protéolyse et une zone opaque à cause de son système enzymatique. De plus, *S. aureus* produit une réaction positive à l'épreuve de la coagulase.

3. FIABILITÉ

3.1. INTERFÉRENCE

Les bouteilles d'échantillonnage de 250 ml remplies à pleine capacité ne permettent pas d'agiter l'échantillon et de disperser uniformément les bactéries présentes dans tout le volume initial. Le rejet d'une portion de l'échantillon au laboratoire risquerait de modifier la concentration initiale des bactéries par unité de volume de l'échantillon et de fausser le résultat. L'analyse de tels échantillons doit faire l'objet d'une remarque à cet effet dans le rapport d'analyse.

La présence de matières en suspension (alumine, argile, substances ferrugineuses, etc.) peut nuire à la filtration en colmatant la membrane. Les matières en suspension accumulées sur la membrane peuvent également entraver l'observation des colonies en masquant ou en inhibant la croissance des *S. aureus*. L'utilisation de plusieurs membranes est alors indiquée afin de filtrer le volume d'échantillon recommandé. La technique de fermentation en tubes multiples (TFTM) doit être utilisée si l'emploi de plusieurs membranes ne constitue pas une solution valable pour remédier à ces interférences.

La gélose sélective Baird-Parker sans enrichissement au jaune d'œuf et au tellurite doit être conservée à 4 °C dans des bouteilles de verre fermées à l'abri de la lumière pendant une période d'entreposage maximale de quatre semaines. Le milieu contenant l'enrichissement au jaune d'œuf et au tellurite est coulé dans des boîtes de Pétri et entreposé à environ 4 °C. Il peut être conservé ainsi environ une semaine. Une période d'entreposage prolongée peut conduire à une baisse appréciable de la sélectivité et du rendement de ce milieu.

Les bactéries ne doivent pas être en suspension dans l'eau de dilution pendant plus de 30 minutes à la température ambiante, car il peut en résulter une variation de la population initiale.

3.2. LIMITE DE DÉTECTION

La limite de détection pour cette méthode est de 1 UFC (unités formant des colonies) par volume ou dilution filtré.

3.3. LIMITE DE QUANTIFICATION

Les limites de quantification, inférieure et supérieure, pour cette méthode sont respectivement de 20 et 100 UFC de *S. aureus*. Le nombre total de colonies de toutes sortes doit être inférieur à 200 par membrane. De plus, lorsqu'il y a une croissance abondante d'organismes, spécifique ou non, le résultat peut être non quantifiable. Le résultat est alors rapporté de la façon suivante :

TNI : colonies trop nombreuses pour être identifiées.

3.4. FIDÉLITÉ

3.4.1. Répétabilité

Trois tests de répétabilité ont été réalisés dans le laboratoire du CEAEQ. Dix replica de trois échantillons différents fabriqués avec une culture pure de *Staphylococcus aureus* ont été analysés par une seule technicienne. Les coefficients de variation ont été de 8, 9 et 10 % pour des concentrations moyennes respectives de 30, 58 et 43 UFC/100 ml.

3.5. SÉLECTIVITÉ

La sélectivité du milieu Baird-Parker a été de plus de 98 % à la suite de l'observation de 3 colonies atypiques et de plus de 200 colonies typiques à partir de 129 échantillons positifs.

3.6. TAUX DE FAUX POSITIFS ET DE FAUX NÉGATIFS

Les taux de faux positifs et de faux négatifs du milieu Baird-Parker ont été calculés selon deux références. Dans un premier temps, une colonie était classée « vraie » lorsqu'elle était identifiée à l'espèce *Staphylococcus aureus*. Dans un deuxième temps, une colonie classée « vraie » lorsqu'elle était identifiée au genre *Staphylococcus* sp.

Plus de 203 colonies ont été identifiées à partir de 129 échantillons positifs. Le taux de colonies classées faussement positives en employant comme référence *Staphylococcus aureus* a été de 98 %, le taux de colonies classées faussement négatives a été de 0 % (aucune colonie atypique sur 3 colonies vérifiées n'appartenait à l'espèce *S. aureus*) et l'efficacité du milieu a été de 4 %.

Le taux de colonies classées faussement positives en utilisant comme référence *Staphylococcus* sp. a été de 6 %, le taux de colonies classées faussement négatives a été de 33 % (une colonie atypique sur 3 colonies vérifiées appartenait au genre *Staphylococcus* sp.) et l'efficacité du milieu a été de 94 %.

Ces résultats signifient que le milieu Baird-Parker est très bon pour mettre en évidence les staphylocoques, mais qu'il ne permet pas la mise en évidence spécifique de l'espèce *Staphylococcus aureus*. Pour en arriver à mettre en évidence *Staphylococcus aureus* avec cette méthode, il faut absolument faire des confirmations des colonies.

4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION

Les échantillons doivent toujours être prélevés avec toutes les conditions d'asepsie nécessaires dans des contenants stériles de verre ou de polypropylène à large ouverture, de capacité d'environ 250 ml, en laissant un espace d'air d'au moins 2,5 cm.

De plus, les contenants utilisés pour le prélèvement des échantillons d'eau probablement chlorée doivent contenir une solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) dont la concentration finale est d'au moins 100 mg/l dans l'échantillon. Pour obtenir ce résultat, introduire 2,5 ml d'une solution de thiosulfate de sodium à 1 % (1 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ par 100 ml d'eau) dans un contenant de 250 ml avant de le stériliser. Le thiosulfate de sodium agit comme agent neutralisant du chlore résiduel qui pourrait être présent dans l'eau. Il empêche ainsi le chlore d'agir entre le moment du prélèvement et celui de l'analyse et permet donc d'obtenir le nombre réel de microorganismes présents dans l'eau au moment du prélèvement.

Une étude réalisée dans nos laboratoires sur les eaux de consommation a permis d'établir que le délai maximal admissible pour l'analyse est de 48 heures après le prélèvement et que l'échantillon devrait être protégé contre les effets de la température à l'aide d'un isolant thermique ou être réfrigéré pendant le transport.

À leur réception au laboratoire, les échantillons qui ne peuvent être analysés dans les 4 heures qui suivent leur arrivée doivent être placés au réfrigérateur jusqu'au moment de leur analyse.

Les échantillons reçus congelés, dans des contenants non conformes ou selon des délais de prélèvement inacceptables (> 48 heures) ne doivent pas être analysés.

5. APPAREILLAGE

5.1. Stérilisateur à rayons ultraviolets

5.2. Boîtes de Pétri d'environ 49 mm x 9 mm

- 5.3. Membranes filtrantes stériles quadrillées de porosité de 0,45 µm et de 47 mm de diamètre
- 5.4. Pincettes en acier inoxydable à bouts plats
- 5.5. Pipettes stériles de 10,0 ml et 1,0 ml de type TD
- 5.6. Thermomètres permettant une lecture à 0,1 °C
- 5.7. Fil à boucle
- 5.8. Stéréoscope à lampe de type « Daylight » fluorescente
- 5.9. Autoclave
- 5.10. Incubateur à 35 °C ± 0,5 °C
- 5.11. Incubateur à 37 °C ± 0,5 °C
- 5.12. Bain-marie dont la température est ajustée à 45 °C ± 1 °C
- 5.13. Balance analytique avec une précision de 0,01 g
- 5.14. Rampe de filtration avec entonnoirs et supports de filtres
- 5.15. pH-mètre
- 5.16. Plaque chauffante agitatrice avec barre magnétique
- 5.17. Réfrigérateur maintenant une température entre 2 et 6 °C
- 5.18. Pompe à vide
- 5.19. Flacons laveurs pour l'eau de rinçage
- 5.20. Bouteilles de 150 ml avec bouchons
- 5.21. Tubes à essais de 16 mm x 125 mm avec bouchons
- 5.22. Bain d'eau bouillante
- 5.23. Tubes stériles de 10 mm x 75 mm

6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS

Tous les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité A.C.S., à moins d'indication contraire. L'eau utilisée pour la préparation des milieux de culture et des réactifs est de l'eau distillée, déminéralisée ou ultra-pure. Les marques de commerce apparaissant ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement.

6.1. Enrichissement au jaune d'œuf et au tellurite

Produit commercial.

6.2. Hydroxyde de sodium, NaOH (CAS n° 1310-73-2)

Solution commerciale 10 N.

6.3. Acide chlorhydrique, HCl (CAS n° 7647-01-0)

Solution commerciale 1 N.

6.4. Phosphate de potassium, KH_2PO_4 (CAS n° 7778-77-0)

6.5. Peroxyde d'hydrogène 30 %, H_2O_2 (CAS n° 7722-84-1)

6.6. Plasma de lapin et d'éthylène tétraacétate déshydraté

Produit commercial.

6.7. Solution d'hydroxyde de sodium 1 N

Ajouter 100 ml de la solution commerciale de NaOH 10 N (*cf.* 6.2) dans environ 700 ml d'eau et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à la température ambiante.

6.8. Gélose Baird-Parker

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 63,0 g/l et sa formulation tel que présentée par le fabricant est la suivante :

Formule en grammes par litre d'eau

Tryptone	10,0 g
Extrait de bœuf	5,0 g
Extrait de levure	1,0 g
Glycine	12,0 g
Pyruvate de sodium	10,0 g
Chlorure de lithium	5,0 g
Agar	20,0 g

Dans un erlenmeyer de 2 000 ml, peser 63,0 g de milieu déshydraté et ajouter 950 ml d'eau. Porter le milieu à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Répartir le milieu de base dans des bouteilles de verre en volume suffisant pour avoir 95 ml après stérilisation à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Avant d'utiliser, faire fondre le milieu de base dans un bain d'eau bouillante et ensuite le refroidir entre 44 °C et 46 °C dans un bain-marie. Réchauffer l'enrichissement au jaune

d'œuf et au tellurite (cf. 6.1) entre 44 °C et 46 °C dans un bain-marie. Agiter l'enrichissement pour mettre de nouveau le précipité en suspension. Dans les conditions d'asepsie nécessaires, ajouter 5 ml de l'enrichissement au 95 ml du milieu de base, mélanger uniformément et distribuer en volumes de 4,0 ml dans des boîtes de Pétri de 49,0 mm x 9,0 mm. Le pH final du milieu doit être de $7,0 \pm 0,2$ à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.3) ou de NaOH 1 N (cf. 6.7).

Le milieu de base sans enrichissement au jaune d'œuf et au tellurite doit être conservé à 4 °C dans des bouteilles de verre fermées à l'abri de la lumière pendant une période d'entreposage maximale de quatre semaines. Le milieu contenant l'enrichissement au jaune d'œuf et au tellurite coulé dans des boîtes de Pétri et entreposé à environ 4 °C peut être conservé environ une semaine. Une période d'entreposage prolongée peut conduire à une baisse appréciable de la sélectivité et du rendement de ce milieu.

6.9. Gélose infusion cœur-cervelle

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 52,0 g/l et sa formulation tel que présentée par le fabricant est la suivante :

Formule en grammes par litre d'eau

Infusion de cervelle de veau	200,0 g
Infusion de cœur de bœuf	250,0 g
Protéose peptone	10,0 g
Bacto dextrose	2,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate disodique	2,5 g
Agar	15,0 g

NOTE - La gélose nutritive ou la gélose trypticase de soya peut aussi être utilisée comme milieux non sélectifs de propagation.

Dans un erlenmeyer de 2 000 ml, peser 52,0 g de milieu déshydraté et dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Porter le milieu à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète, à feu moyen, en remuant avec un agitateur magnétique. Le pH doit être de $7,4 \pm 0,2$ à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.3) ou de NaOH 1 N (cf. 6.7). Répartir environ 8 ml dans des tubes de 16 mm x 125 mm pour former des géloses inclinées. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Le milieu doit être conservé à environ 4 °C à l'obscurité pendant quatre semaines au maximum.

6.10. Solution tampon phosphate

Dissoudre 34,0 g de KH_2PO_4 anhydre (cf. 6.4) dans environ 500 ml d'eau, ajuster le pH à 7,2 avec une solution de NaOH 1 N (cf. 6.7) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à 4 °C.

6.11. Eau tamponnée de rinçage

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate (cf. 6.10) par litre d'eau. Répartir dans des bouteilles de polypropylène ou des flacons laveurs et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 20 minutes. L'eau tamponnée de rinçage se conserve deux mois à 4 °C.

6.12. Eau tamponnée de dilution

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate (cf. 6.10) par litre d'eau. Répartir dans des bouteilles de 150 ml en volumes suffisants pour obtenir un volume final de 90 ml ± 2 ml après autoclavage à 121 °C pendant 15 minutes. L'eau tamponnée de dilution se conserve deux mois à 4 °C.

6.13. Solutions de la coloration Gram

Solutions commerciales.

6.14. Solution de peroxyde d'hydrogène à 3 %

Ajouter 900 ml d'eau à 100 ml d'une solution de peroxyde d'hydrogène 30 % (cf. 6.5). Cette solution se conserve à 4 °C pendant une semaine.

6.15. Solution de plasma de lapin et d'éthylène diamine tétraacétate (EDTA)

Ajouter 3 ml d'eau purifiée dans un vial de plasma de lapin et d'éthylène tétraacétate déshydraté (cf. 6.6). Mélanger doucement jusqu'à dissolution complète. Toujours utiliser une solution fraîchement préparée.

7. PROTOCOLE D'ANALYSE

Pour toute série d'échantillon, les recommandations des « Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en microbiologie », DR-12-SCA-02, sont suivies et tous les éléments de contrôle et d'assurance de la qualité nécessaires sont réalisés en conformité à ces lignes directrices.

Il est recommandé que tous les entonnoirs et les supports de filtre soient lavés et stérilisés aux rayons ultraviolets après toute interruption de travail supérieure à 15 minutes. La stérilisation aux rayons ultraviolets est obligatoire avant l'analyse de chaque échantillon d'eau.

Le lavage et la stérilisation à l'autoclave de l'équipement de filtration sont indispensables après l'analyse d'échantillons fortement contaminés (eaux de plages, lacs, eaux usées, eaux de lixiviation, etc.) et avant de poursuivre l'analyse sur des échantillons peu contaminés (eau de consommation).

L'absence de *S. aureus* dans chaque entonnoir et support de filtre doit être vérifiée avant chaque série d'analyses d'eau. Procéder en rinçant la paroi intérieure de l'entonnoir avec environ 20 ml à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage (cf. 6.11), filtrer sur une membrane stérile et incubé pendant 48 heures ± 3 heures à 35 °C ± 0,5 °C sur le milieu Baird-Parker (cf. 6.8). La fréquence de ce

contrôle peut être augmentée lors de l'analyse d'eau fortement contaminée. En tout temps, les exigences prescrites par le DR-12-SCA-02 doivent être respectées.

7.1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Tous les échantillons doivent être homogénéisés en agitant vigoureusement les bouteilles d'un mouvement vertical.

Les échantillons soupçonnés d'être fortement contaminés (eaux usées, etc.) doivent être traités de façon à obtenir, pour un volume donné d'échantillon, entre 20 et 100 colonies sur la membrane et ainsi permettre une lecture juste et rapide du nombre de colonies.

Pour cela, des dilutions sériées sont effectuées de la façon suivante :

- en conditions aseptiques, pipetter 10 ml d'échantillon d'eau dans 90 ml d'eau tamponnée de dilution (*cf.* 6.12) (1 : 10);
- bien agiter la bouteille d'eau tamponnée de dilution afin de disperser l'échantillon;
- répéter cette même opération jusqu'à l'obtention de la dilution désirée (1 : 100, 1 : 1 000, 1 : 10 000, etc.);
- changer de pipette entre chaque dilution.

7.2. ANALYSE DE L'ÉCHANTILLON

- Placer les entonnoirs et les supports dans le stérilisateur à rayons ultraviolets pendant 2 minutes.
- Mettre les supports et les entonnoirs sur la rampe de filtration.
- Mettre en fonction l'appareil à vide.
- Prendre une membrane filtrante stérile près du bord à l'aide d'une pincette stérilisée par flambage à l'alcool et la déposer ensuite sur le support de filtre.
- Placer l'entonnoir sur le support et le fixer fermement.
- Verser dans l'entonnoir les volumes requis, selon la nature de l'échantillon analysé (voir le tableau ci-dessous). Pour les volumes de 10 ml ou moins, introduire de 20 ml à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage (*cf.* 6.11) dans l'entonnoir de filtration. Ensuite, prélever à l'aide d'une pipette stérile le volume désiré. Laisser couler l'échantillon en appuyant le bout de la pipette sur l'épaulement interne de l'entonnoir. Enlever la dernière goutte de la pipette à l'aide de la poire.

Provenance de l'eau	Volumes en ml*
Eau embouteillée et eau de consommation	100 ou 50 ml
Rivière, ruisseau et lac	50, 10 et 1,0 ml
Piscine	100 ou 50 ml

* : des volumes supérieurs ou inférieurs pourraient être filtrés, selon la turbidité de l'échantillon analysé.

- Faire le vide pour filtrer l'échantillon.
- Rincer au moins deux fois la paroi intérieure de l'entonnoir avec une quantité de 20 ml à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage stérile (utiliser un flacon laveur). Rincer davantage s'il y a possibilité de forte contamination.
- Retirer l'entonnoir et déposer la membrane filtrante à l'aide d'une pince stérile sur une gélose Baird-Parker (cf. 6.8).

NOTE - Déposer la membrane en la déroulant pour obtenir un contact étroit avec la gélose. La présence de bulles d'air est signalée par des taches blanches.

- Inscrire sur la boîte de Pétri le numéro de l'échantillon et le volume filtré.
- Placer les boîtes de Pétri en position inversée (l'inversion des boîtes de Pétri empêche la condensation de se déposer sur les membranes) dans un incubateur à $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ pendant 48 heures \pm 3 heures.

7.3. OBSERVATION DES RÉSULTATS

Après la période d'incubation, sortir et ranger les boîtes de Pétri par ordre de numéro d'échantillon.

Effectuer l'observation des membranes le plus tôt possible après la période d'incubation à l'aide d'un stéréoscope réglé à un grossissement de 10 X à 15 X. Choisir les membranes sur lesquelles il y a entre 20 et 100 colonies typiques et au maximum 200 colonies de toutes sortes. Compter toutes les colonies noires, luisantes et convexes de 1,0 à 1,5 mm de diamètre avec une étroite zone d'éclaircissement concentrique autour de la colonie sous la membrane.

Inscrire sur la feuille de travail le nombre de colonies typiques correspondant au volume d'eau filtrée et reporter le résultat par 100 ml, comme présenté dans la section 8.

7.4. CONFIRMATION

La méthode décrite précédemment est une méthode de dénombrement et d'identification présumée de *S. aureus*. Cette désignation signifie que les bactéries isolées sont reconnues comme la bactérie recherchée à l'aide d'une seule réaction biochimique caractéristique. Dans certain cas, cette réaction unique peut produire des faux positifs ou des faux négatifs qu'on doit éliminer à l'aide d'un dépistage biochimique plus complet. Cette étape de la méthode est celle de la confirmation.

La confirmation établit la validité de la différenciation des colonies sur le milieu Baird-Parker par la coloration noire et supporte l'interprétation de cette coloration.

Le degré de certitude avec lequel l'analyste doit préciser l'identification d'une colonie isolée détermine l'ampleur que prend cette confirmation. La confirmation peut être sommaire (étapes 7.4.1 à 7.4.4), ou aller à une identification plus complète de l'espèce à l'aide de systèmes d'identification biochimique que l'on peut se procurer dans le commerce (système API 20GP[®], système MicroScan[®], etc.).

Par souci de commodité, d'efficacité, de rapidité et de coût, nous privilégions la méthode de confirmation décrite ci-dessous et schématisée à la figure 1. Cette confirmation devrait être effectuée sur au moins 5 colonies suspectes ou selon un nombre de colonies évaluées à 10 % des colonies présentes sur la membrane filtrante.

7.4.1. Propagation des souches suspectes

Prélever une colonie bien isolée sur la gélose Baird-Parker et effectuer une propagation de la souche par étalement sur gélose inclinée cœur-cervelle (cf. 6.9). Placer dans l'incubateur à 35 °C ± 0,5 °C pendant 18 à 24 heures.

7.4.2. Épreuve de la catalase

À partir de la croissance présente sur la gélose de propagation, effectuer une suspension dense de la souche bactérienne sur une lame de microscope et y ajouter 1 ou 2 gouttes de la solution de peroxyde d'hydrogène à 3 % (cf. 6.14). L'effervescence qui en résulte indique la présence de catalase (réaction positive). *Staphylococcus sp.* et *Micrococcus sp.* sont catalase positif et les *Streptococcus sp.* sont catalase négatif.

7.4.3. Épreuve de la coagulase

Ajouter, à l'aide d'une pipette sérologique stérile, 0,5 ml de solution de plasma de lapin et d'EDTA (cf. 6.15) reconstitué dans un tube stérile de 10 mm x 75 mm.

À partir de la croissance présente sur la gélose de propagation, inoculer le plasma de lapin et mélanger doucement.

Placer le tube dans un incubateur à 37 °C ± 0,5 °C pendant 4 heures. S'il n'y a pas de coagulation après 4 heures d'incubation, poursuivre l'incubation et examiner après 24 heures. *S. aureus* présente une réaction positive au test de la coagulase.

7.4.4. Coloration de Gram

NOTE - Suivre les instructions du fabricant pour effectuer la coloration de Gram. Ce test n'est pas utilisé de façon routinière au laboratoire.

Effectuer l'observation microscopique à un grossissement de 1 000 X à l'aide d'huile à immersion. Les bactéries dont la coloration est bleue ou violette sont dites Gram positif; celles dont la coloration est rose sont dites Gram négatif. *S. aureus* est Gram positif.

7.4.5. Pourcentage de confirmation

Inscrire sur la feuille de travail le nombre et le pourcentage de colonies qui, selon la confirmation précédente, sont reconnues *S. aureus*. Établir le pourcentage de confirmation comme suit.

$$\text{Pourcentage de confirmation} = \frac{\text{Nombre de colonies confirmées de } S. aureus}{\text{Nombre de colonies soumises à la confirmation}} \times 100$$

Exemple :

Si 20 colonies suspectes sur le milieu Baird-Parker ont été soumises aux étapes de confirmation et si 18 de ces colonies se sont révélées être des *S. aureus*, selon les critères du test le pourcentage de confirmation est le suivant :

$$\text{Pourcentage de confirmation} = \frac{18}{20} \times 100 = 90 \%$$

8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

De façon générale, choisir la ou les membranes avec le nombre de colonies acceptables, de préférence à l'intérieur des limites de quantification, et exprimer le résultat en unités formant des colonies (UFC) par 100 ml d'échantillon, selon l'équation générale suivante :

$$\text{UFC}/100 \text{ ml} = \frac{\text{Nombre de colonies de } S. aureus}{\text{Volume d'échantillon analysé en ml}} \times 100$$

Dans le cas où une confirmation est effectuée, il faut appliquer le pourcentage de confirmation (cf. 7.4.5) au résultat précédent :

$$\text{UFC}/100 \text{ ml confirmées} = \text{UFC}/100 \text{ ml présumées} \times \% \text{ de configuration}$$

8.1. DÉNOMBREMENT À L'INTÉRIEUR DES LIMITES DE QUANTIFICATION

Calculer le résultat en ne retenant que les membranes sur lesquelles il y a de 20 à 100 colonies.

Exemples :

- 1) Si des volumes filtrés de 100 ml, 50 ml, 10 ml, 1 ml et 0,1 ml d'un échantillon produisent respectivement des dénombrements de 200, 110, 25, 4 et 1 colonies, choisir la membrane

sur laquelle il y a 25 colonies (volume de 10 ml) et calculer le résultat à l'aide de l'équation suivante :

$$\frac{25}{10} \times 100 = 250 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

- 2) Si des volumes filtrés de 10,0 ml, 1,0 ml, 0,1 ml et 0,01 ml d'un échantillon produisent respectivement les résultats TNI, 55, 30 et 8 colonies, choisir les membranes sur lesquelles il y a 55 et 30 colonies (1,0 ml et 0,1 ml) :

$$\frac{55 + 30}{1,0 + 0,1} \times 100 = 7\,727 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

8.2. DÉNOMBREMENT À L'EXTÉRIEUR DES LIMITES DE QUANTIFICATION

8.2.1. Dénombrement lorsque le nombre de colonies isolées sur les membranes est inférieur à la limite de quantification

Additionner toutes les colonies sur l'ensemble des membranes, tout en tenant compte des volumes de l'échantillon ensemencés et exprimer le résultat par 100 ml.

Exemples :

- 1) Si deux volumes filtrés de 50 ml d'un échantillon produisent respectivement 5 et 3 colonies :

$$\frac{5 + 3}{50 + 50} \times 100 = 8 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

- 2) Si des volumes filtrés de 50 ml, 10 ml et 1 ml d'un échantillon produisent respectivement 15, 4 et 0 colonies :

$$\frac{15 + 4 + 0}{50 + 10 + 1} \times 100 = 31 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

8.2.2. Dénombrement lorsque aucune colonie n'a été isolée sur les membranes correspondant à plusieurs volumes filtrés d'un échantillon

Calculer le résultat à l'aide du volume d'échantillon filtré le plus grand.

Exemple :

Si des volumes filtrés de 10 ml, 1 ml et 0,1 ml d'un échantillon produisent tous des dénombrements de 0 colonie, calculer le nombre de colonies par 100 ml qui aurait été rapporté s'il y avait eu 1 colonie sur la membrane du plus grand volume d'échantillon filtré :

$$\frac{1}{10} \times 100 = 10 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

Transmettre ce résultat comme étant :

< 10 UFC/100 ml

8.2.3. Dénombrement lorsque tous les résultats de plusieurs volumes filtrés d'un échantillon sont au-delà de la limite supérieure de quantification

Calculer le résultat à l'aide de la limite de quantification et du plus faible volume d'échantillon utilisé.

Exemple :

Si des volumes de 1 ml, 0,1 ml et 0,01 ml produisent respectivement les résultats TNI, 150 et 110 colonies, ces dénombrements sont tous au-delà de la limite supérieure de quantification. Estimer le résultat à l'aide de la limite de quantification (100 pour les *S. aureus*) et du plus faible volume d'échantillon filtré (0,01 ml) :

$$\frac{100}{0,01} \times 100 = 1\,000\,000 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

Transmettre ce résultat comme étant :

> 1 000 000 UFC/100 ml

9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ

Les blancs d'entonnoir effectués au moment de l'analyse doivent démontrer l'absence de colonies de *S. aureus* ou de tout autre microorganisme.

La température de l'incubateur doit être maintenue à 35 °C ± 0,5 °C pendant toute la durée de l'incubation.

Toutes les exigences précisées dans le document DR-12-SCA-02, intitulé « Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en microbiologie », doivent être respectées.

10. BIBLIOGRAPHIE

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION AND WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition, 1998.

BUREAU DE NORMALISATION DU QUÉBEC, Eaux - Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*, Méthode par filtration sur membrane, Première édition, 09-09, Dépôt légal - 3^e trimestre, Bibliothèque nationale du Québec, 1992.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en microbiologie, DR-12-SCA-02, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.

DIRECTION DES LABORATOIRES, MENVIQ, Les délais dans l'analyse bactériologique et leurs impacts sur le niveau d'intervention dans le domaine de l'eau potable, Document interne, 1982.

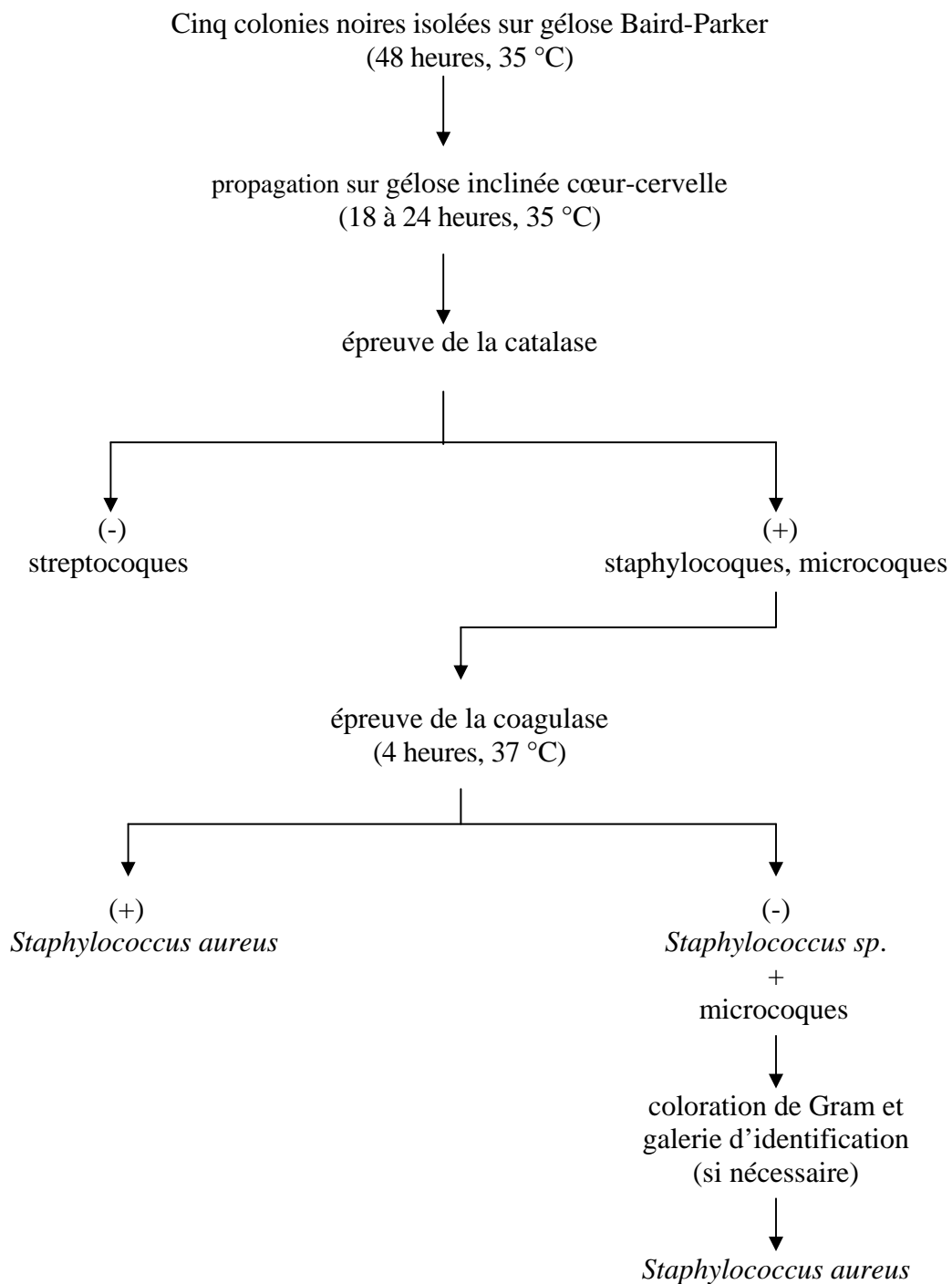


Figure 1 - Schéma du protocole de confirmation des colonies de *Staphylococcus aureus*