

E-IV-5V1 – RECHERCHE ET DÉNOMBREMENT DES STAPHYLOCOQUES PATHOGÈNES *et/ ou Staphylococcus aureus*. FILTRATION SUR MEMBRANE

1. Objet

Cette procédure décrit la méthode de recherche et de dénombrement des staphylocoques pathogènes et / ou de *Staphylococcus aureus* dans un échantillon d'eau par filtration sur membrane.

2. Domaine d'application

Cette procédure s'applique aux eaux de boisson et de distribution, aux eaux souterraines, aux eaux de piscines, excepté lorsque d'autres organismes en trop grand nombre interfèrent avec la croissance des staphylocoques.

3. Définitions et abréviations

Staphylocoques pathogènes : bactéries capables de former des colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques à la surface d'un milieu de culture sélectif et donnant une réaction positive à la coagulase.

Staphylococcus aureus: bactéries capables de former des colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques à la surface d'un milieu de culture sélectif contenant du tellurite de potassium et du chlorure de lithium, donnant une réaction fortement positive à la coagulase, possédant une désoxyribonucléase et agglutinant en présence d'un anticorps spécifique.

4. Principe

Le dénombrement des staphylocoques est basé sur la filtration de volumes donnés de l'échantillon sur une membrane filtrante de porosité 0.45 µm.

Les membranes sont alors placées sur un milieu sélectif contenant du tellurite de potassium et du chlorure de lithium et sont mises à incuber.

Les types de colonies caractéristiques sont confirmés par le test de la coagulase. Les colonies suspectées d'être *Staphylococcus aureus* subissent un test de séro-agglutination.

5. Conditionnement et conservation de l'échantillon

Les échantillons d'eau doivent être prélevés dans des bouteilles ou des flacons stériles à usage unique (avec inhibiteur de désinfectant si nécessaire)

Les flacons contenant les échantillons destinés aux analyses microbiologiques ne sont pas remplis entièrement.



Les échantillons sont conservés jusqu'au moment de l'analyse entre 2 et 5 °C.
L'échantillon doit être analysé de préférence dans les 8 heures qui suivent le prélèvement, sinon impérativement dans les 24 h.

6. Appareillages et matériels utilisés

6.1 Appareillage

- Rampe de filtration
- Autoclave
- Incubateur à 37 ± 1 °C
- Colony counter

6.2 Petit matériel

- Bouteille en verre : préparation du milieu de culture.
- Petit matériel stérile à usage unique : pipettes individuelles stériles en plastique de 2 et 10 ml, boîtes de pétri de 50 mm de diamètre, pots de 50 ml ou tubes de 20 ml en plastique pour les éventuelles dilutions.
- Des membranes filtrantes stériles de 0.45 µm de porosité, d'environ 47 mm de diamètre

7. Réactifs utilisés

7.1 Milieu de culture Baird-Parker

Le milieu contient du chlorure de lithium, du tellurite et une forte concentration de glycine pour inhiber la flore secondaire. Par contre, le pyruvate et la glycine agissent comme accélérateurs sélectifs de la croissance pour les staphylocoques.

Sur ce milieu, les colonies des staphylocoques donnent naissance par lipolyse et protéolyse à des halos clairs. La réduction du tellurite en tellure développe une colonie noire.

7.2 Bouillon cœur-cervelle :

Ce bouillon est utilisé pour la culture des staphylocoques pour le test coagulase.

7.3 Diluant

Pour des dilutions éventuelles, la solution de Ringer ¼ stérile est utilisée.

7.4 Plasma de lapin :

Le plasma de lapin permet de tester l'activité de la coagulase des colonies suspectes apparues sur le milieu sélectif



7.5 Slidex Staph-Kit :

Slidex Staph kit est un test d'agglutination de particules de latex et d'hématies pour l'identification des souches de *Staphylococcus aureus* qui possèdent le facteur d'affinité pour le fibrinogène et /ou d'autres antigènes caractéristiques. Le kit permet l'identification rapide des souches de *Staphylococcus aureus*.

8. Mode opératoire

8.1 Préparation de l'échantillon

Le nombre de dilutions réalisées et le choix des volumes à filtrer varient en fonction du type d'échantillon analysé.

A titre indicatif, pour les eaux de distribution, les eaux de piscines, la filtration est effectuée pour 10 et 100 ml d'échantillons. Lorsqu'une pollution est suspectée un aliquote de 1 ml est également filtré.

8.2 Filtration

Les prises d'essai sont filtrées sur membranes de 0.45 µm de porosité.

8.3 Incubation.

Les membranes placées sur milieu Baird-Parker. Les boîtesensemencées sont retournées et disposées en piles (max 6 boîtes) sont mises à incuber dans un incubateur réglé à 37 ± 1 °C pendant 48 ± 4 h.

8.4 Lecture.

Sur Baird-Parker, les colonies caractéristiques présentent un halo brillant sur la membrane et un halo dans la gélose, (généralement une zone plus opaque sous la colonie puis un cercle clair entouré par une tranche opaque, visible lorsque la membrane est légèrement soulevée).

Différents types de colonies peuvent être observés selon que la couleur, l'aspect et la forme varient (halo + ou - marqué, colonie grise ou noire, mate ou brillante, ronde ou polygonale...). Ces différents types sont dénombrés séparément.

Pour chaque type de colonie, deux colonies isolées sont retenues pour le test de la coagulase, et la séro-agglutination.

8.5 Confirmation

Des témoins positif et négatif sont réalisés pour chaque test de confirmation.



8.5.1 Préparation d'une culture pure.

Avant la mise en œuvre des tests de confirmation, il est parfois nécessaire de ré-isoler une colonie afin d'obtenir une culture pure.

Ces isolements sont effectués sur une gélose de Baird-Parker coulée en boîtes de 90 mm de diamètre. Après ensemencement, ces boîtes sont incubées à 37 ± 1 °C pendant 24 ± 4 h.

8.5.2 Test de la coagulase.

A partir des colonies isolées ou des isolements, la colonie est prélevée et ensemencée dans un bouillon Cœur-cervelle à l'aide d'une pipette stérile de 2 ml ou d'une anse stérile. Une fois ensemencés les bouillons sont incubés à 37 ± 1 °C durant 24 ± 2 h.

Après incubation, une aliquote de bouillon est transférée dans un tube contenant du plasma de lapin stérile pour la mise en évidence de l'activité coagulase. (Selon les prescriptions du fabricant). Le mélange "bouillon cœur-cervelle + plasma" est incubé à 37 ± 1 °C pendant maximum 24 h.

Après 4h à 6 h, les tubes sont examinés une première fois afin de vérifier une éventuelle coagulation du plasma. Si la réaction est négative l'incubation est poursuivie et les tubes sont à nouveau examinés au bout des 24 ± 4 h.

La réaction est positive lorsque le coagulum occupe plus de la moitié du volume initialement occupé par le liquide.

A titre de contrôle, un même aliquote du bouillon cœur-cervelle stérile est ajouté à la quantité recommandée de plasma de lapin et est incubé sans ensemencement. Pour que la réaction soit valable, le plasma du tube témoin ne devra montrer aucun signe de coagulation.

8.5.3 Test sérologique.

Lorsque *Staphylococcus aureus* est spécifiquement recherché, un test d'agglutination est effectué pour les cultures pures qui se sont révélées positives au test coagulase. Ce test est effectué suivant les indications du fabricant.

9. Paramètres qualité

Le contrôle de qualité des essais sera réalisé par :

- Le contrôle des conditions d'essais : délais entre le prélèvement et l'analyse, condition de conservation des échantillons, qualité des milieux de culture, surveillance des températures d'incubation,...
- La vérification de l'asepsie de l'environnement : témoin (filtration de 100 ml de solution de Ringer et incubation parallèlement aux échantillons)
- Utilisation de Matériaux de référence quantifiés et établissement d'une carte de contrôle
- Le contrôle externe par la participation à des exercices interlaboratoires

10. Calcul et expression de résultats

Additionner le nombre de chaque type de colonies observées pour lesquels les tests de confirmation sont positifs.

Les résultats sont normalement exprimés en nombre de staphylocoques pathogènes ou *Staphylococcus aureus* par 100 ml.

11. Sécurité

Sans objet dans cette procédure.

12. Rapport d'essai

Le rapport doit contenir au minimum :

- une référence à la présente méthode de la Région wallonne et éventuellement à la méthode normalisée
- l'identification complète de l'échantillon
- la date de prélèvement ; ceci qu'il ait été réalisé par le laboratoire ou par le client
- la date d'analyse
- les résultats du dénombrement conformément au point 10
- les détails opératoires non prévus dans la présente méthode, ainsi que tout facteur ayant pu affecter les résultats.

13. Références

AFNOR XP T90-412 : 2006

ISO 8199 :2005 – Water quality -- General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture