



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

**DÉNOMBREMENT DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DANS
LES ALIMENTS ET LES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX AU MOYEN
DES PLAQUES PETRIFILM^{MC} 3M^{MC} NUMÉRATION STAPH EXPRESS (STX)**

**Division de l'évaluation
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments
Localisateur postal : 2204A1
Ottawa (Ontario) K1A 0L2**

Courriel : Don_Warburton@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode s'applique au dénombrement des *Staphylococcus aureus* dans les aliments et les échantillons environnementaux. Les directives sur les tolérances sont spécifiques au produit analysé.

2. PRINCIPE

Les plaques Petrifilm sont des produits prêts à utiliser mis au point par la Compagnie 3M, St. Paul, MN 55144-1000 (USA). Les pellicules sont recouvertes de milieux de culture; il n'est donc pas nécessaire de préparer les milieux, ce qui permet de réaliser des économies au niveau du temps et de la main-d'œuvre. Les *S. aureus* peuvent être dénombrés au moyen des plaques Petrifilm de numération Staph Express (STX). On utilise des plaques de culture bactérienne contenant un milieu sec et un agent gélifiant soluble dans l'eau froide. Les échantillons dilués ou non dilués sont ajoutés directement sur les plaques, à raison de 1,0 ml par plaque. Une pression exercée sur le diffuseur en plastique placé sur le dessus de la pellicule étale l'échantillon sur une zone de croissance de 30 cm². Après avoir laissé l'agent gélifiant se solidifier, les plaques sont incubées et dénombrées. Les colonies rouge violacé sont un indice de la présence de *S. aureus*. Lorsque seulement des colonies rouge violacé apparaissent, dénombrer les colonies; le test est complété. Si une flore de fond est présente, le disque Petrifilm STX peut être utilisé pour identifier les *S. aureus* de toutes les colonies suspectes. Selon les études collaboratives et les études de validation, la méthode Petrifilm STX est comparable aux méthodes traditionnelles (7.4, 7.7-7.9).

3. DÉFINITION DES TERMES

3.1 Voir l'annexe A du volume 3.

3.2 Les plaques Petrifilm STX contiennent un agent gélifiant soluble à l'eau froide. Le milieu chromogène Baird-Parker modifié dans la plaque est un milieu sélectif et différentiel pour les *S. aureus*.

Note: Ne pas utiliser de solution tampon au citrate ni de solution contenant du bisulfate ou du thiosulfate avec la méthode Petrifilm STX.

- 3.3 Les colonies rouge violacé sur la plaque Petrifilm STX sont des *S. aureus*. Si une flore de fond est présente, le disque Petrifilm STX peut être utilisé pour identifier les *S. aureus* de toutes les colonies suspectes. Le disque Petrifilm STX contient un colorant et un acide désoxyribonucléique (ADN). Les *S. aureus* produisent de la désoxyribonucléase (DNase) qui, au contact du colorant, forme des zones roses.
- 3.4 Le diffuseur en plastique fourni avec les plaques Petrifilm est conçu pour étaler l'échantillon ou un inoculum d'échantillon dans la zone de croissance de la plaque. La zone de croissance circulaire des plaques inoculées est de 30 cm² tracée sur la base de la pellicule.

4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 3.

5. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT SPÉCIAL

Les items 5.1 à 5.4 sont disponibles chez 3M Canada Inc., C.P. 5757, London (Ontario) N6A 4T1. Les milieux énumérés ci-après (5.5) sont disponibles dans le commerce et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir aussi l'annexe G du volume 3; la référence 7.2 ou autre source appropriée pour la formulation des milieux individuels.

Note: Si l'analyste utilise toute variation des milieux énumérés ci-après (produit disponible commercialement ou préparé à partir d'ingrédients), il incombe à l'analyste ou au surveillant du laboratoire d'en assurer l'équivalence.

- 5.1 Plaques Petrifilm STX 6490/6491 (Entreposer à une température de 8 °C ou moins)
- 5.2 Disques Petrifilm STX 6492/6493 (Entreposer à une température de 8 °C ou moins)
- 5.3 Diffuseur en plastique, numéro de catalogue 6425.
- 5.4 Feuillet d'instruction, incluant le mode d'emploi. Un « Guide d'interprétation » est disponible sur demande.
- 5.5 Diluants stériles appropriés : eau de dilution tamponnée au phosphate Butterfield, diluant salin peptoné, eau peptonée à 0,1 %, eau peptonée tamponnée, solution saline (0,85 à 0,90 %) et solutions de Ringer à 0,25 %. Si l'on indique du citrate dans la norme, remplacer par une solution tampon tempérée (40 à 45 °C) au phosphate Butterfield.
- 5.6 Stomacher, mélangeur ou l'équivalent.
- 5.7 Incubateur pouvant maintenir une température de 35 ° ou 37 °C.

Note: Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que l'on maintient les incubateurs ou les bains-marie à la température recommandée. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, les incubateurs peuvent être réglés à 35 +/-1,0 °C. De même, une température moindre, soit de 30 ou 25 °C, peut s'établir à +/-1,0 °C. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 ou 45,5 °C, il est crucial de maintenir les incubateurs ou les bains-marie à +/-0,5 °C de la température recommandée car des températures plus élevées peuvent être létales pour le micro-organisme que l'on cherche à isoler.

- 5.8 pH-mètre ou papier pouvant distinguer entre 0,3 et 0,5 unités de pH à l'intérieur d'une gamme de 6,0 à 8,0.
- 5.9 NaOH 1N ou HCl 1N, si un ajustement du pH est nécessaire.
- 5.10 Pipettes ou pipettes automatiques ayant une capacité nominale de 1,0 ml.
- 5.11 Compteur de colonies ou loupe lumineuse.

6. PROCÉDURE

Chaque unité d'échantillonnage peut être analysée individuellement ou les unités d'échantillonnage peuvent être regroupées lorsque les exigences du plan d'échantillonnage peuvent être rencontrées.

6.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 6.1.1 Au laboratoire, avant l'analyse, garder les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (2-8°C) ou au congélateur, selon la nature du produit, à l'exception des aliments stables à la température de la pièce. Décongeler les échantillons congelés au réfrigérateur ou dans des conditions de temps et de température empêchant la croissance ou la destruction microbienne.
- 6.1.2 Procéder à l'analyse des échantillons aussitôt que possible après leur réception au laboratoire.

6.2 Préparation pour l'analyse

- 6.2.1 Avoir en main le diluant stérile. Désinfecter la surface de travail.
- 6.2.2 Placer la plaque Petrifilm sur une surface plane. Inscire l'information relative à l'identification de l'échantillon sur la pellicule.

6.3 Préparation de l'échantillon

- 6.3.1 Afin d'assurer une unité analytique représentative, mélanger les liquides jusqu'à ce que le contenu soit homogène.
- 6.3.2 Échantillons de lait: Appliquer 1,0 ml directement et/ou faire des dilutions décimales dans le diluant approprié. Mélanger vigoureusement la préparation de dilution.
- 6.3.3 Autres produits laitiers (lait au chocolat, lait concentré, lait évaporé, crème épaisse ou légère, crème glacée, mélanges glacés, beurre, lait de beurre, fromage, fromage cottage, trempette, crème sure, yogourt et yogourt glacé): Un minimum de 1:10 (11g / 99 ml d'eau de dilution) et/ou une dilution décimale dans le diluant approprié. Mélanger vigoureusement la préparation de dilution.
- 6.3.4 Échantillons d'aliments solides: Prélever des portions représentatives dans différentes parties de l'échantillon. Préparer au minimum une dilution 1:10 dans un diluant approprié. Mélanger vigoureusement.
- 6.3.5 Pour les produits acides, ajuster le pH de l'échantillon dilué entre 6 et 8 avec du NaOH 1N. Mélanger vigoureusement.
- 6.3.6 Pour les produits alcalins, ajuster le pH de l'échantillon dilué entre 6 et 8 avec du HCl 1N. Mélanger vigoureusement.

6.4 Inoculation et incubation

- 6.4.1 Relever la pellicule du dessus et inoculer avec précaution 1,0 ml d'échantillon dilué ou non dilué au centre de la pellicule inférieure.
- 6.4.2 Remettre la pellicule du dessus en place. Dérouler avec précaution la pellicule du dessus de la plaque Petrifilm STX vers le bas afin d'éviter d'emprisonner des bulles d'air.
- 6.4.3 Distribuer l'échantillon de façon égale en exerçant une pression vers le bas sur le centre du diffuseur en plastique. Ne pas faire glisser le diffuseur sur la pellicule. Laisser reposer la plaque pendant au moins une minute afin que le gel puisse se solidifier.
- 6.4.4 Incuber les plaques à l'horizontale, le côté clair sur le dessus, en piles d'au plus 20 plaques pendant 24 heures \pm 2 heures. Suivre les normes en vigueur relativement à la température d'incubation, par exemple : 35 °C ou 37 °C.
- 6.4.5 Replacer les plaques inutilisées dans le sachet métallique. Replier l'extrémité ouverte du sachet et sceller avec du ruban adhésif. Entreposer le sachet refermé dans un endroit sec et frais. Une fois le sachet ouvert, le délai d'utilisation des plaques est d'un mois. L'exposition des plaques Petrifilm à des températures supérieures à 25 °C et/ou à des conditions d'humidité relative de plus de 50 % peut réduire l'efficacité des plaques. Ne pas utiliser les plaques qui présentent une décoloration orange ou brune. Chaque paquet de plaques Petrifilm porte la date de péremption et le numéro de lot. Le numéro de lot figure aussi sur chaque pellicule.
- 6.4.6 Observer les couleurs des colonies. S'il n'y a aucune colonie ou si les seules colonies présentes sont rouge violacé après 24 heures \pm 2 heures, dénombrer les colonies rouge violacé comme des *S. aureus*; le test est complété.
- 6.4.7 Si des colonies de couleurs différentes apparaissent, utiliser un disque Petrifilm STX. Relever la pellicule du dessus et mettre le disque dans le puits de la plaque de façon que la languette reste à l'extérieur du puits. Remettre la pellicule en place.

<p>Note: Le gel peut parfois se séparer lorsque la pellicule du dessus est relevée. Cela ne réduit pas l'efficacité de la plaque Petrifilm STX parce que le disque est recouvert des deux côtés.</p>

- 6.4.8 Exerger une pression en faisant glisser fermement un doigt ganté sur toute la surface du disque (y compris sur les bords) afin d'assurer un contact uniforme du disque avec le gel et d'éliminer les bulles d'air.
- 6.4.9 Placer les plaques Petrifilm Staph Express avec disques en piles d'au plus 20 plaques et incuber à 35 °C ou à 37 °C pendant au moins 60 minutes et pas plus de 3 heures.
- 6.4.10 Replacer les disques inutilisés dans le sachet métallique. Replier l'extrémité ouverte et sceller avec du ruban adhésif. Entreposer le sachet refermé dans un endroit sec et frais ou au congélateur. Une fois le sachet ouvert, le délai d'utilisation des disques est de six mois. L'exposition des disques Petrifilm STX à des températures supérieures à 25 °C et/ou à des conditions d'humidité relative de plus de 50 % peut réduire l'efficacité des disques. Chaque paquet de disques Petrifilm STX porte la date de péremption et le numéro de lot.

6.5 Lecture des résultats

- 6.5.1 Effectuer le dénombrement rapidement après la période d'incubation. Si le dénombrement ne peut pas être fait immédiatement, entreposer les plaques dans le congélateur. Il faut toutefois éviter d'en prendre l'habitude.
- 6.5.2 Utiliser un compteur de colonies standard pour le dénombrement. Une loupe lumineuse peut également être utilisée pour faciliter le dénombrement.

- 6.5.3 La zone de croissance circulaire est d'environ 30 cm². Il est possible d'établir des estimations des plaques qui contiennent plus de 150 colonies en déterminant le nombre moyen de colonies de quelques carrés représentatifs et en multipliant le résultat par 30 pour obtenir le total de chaque plaque.
- 6.5.4 Calculer le nombre de colonies par ml ou par g d'échantillon à partir du nombre de colonies (dénombrées à une dilution spécifique) obtenues sur les plaques choisies à un niveau de dilution qui donne un résultat significatif sur le plan statistique.
- 6.5.5 Pour compter les colonies sur des plaques en double de dilutions successives, calculer le nombre moyen de colonies de chaque dilution avant de déterminer le nombre moyen de bactéries.
- 6.5.6 Afin d'isoler des colonies pour identification plus poussée, relever la pellicule du dessus et prélever la colonie sur le gel.

6.6 Interprétation et résultats

- 6.6.1 Les colonies de *S. aureus* sont rouge violacé après 24 heures.
- 6.6.2 Si des colonies de couleurs différentes du rouge violacé sont présentes, utiliser un disque Petrifilm STX (voir 6.4.7).
- 6.6.3 Lorsqu'un disque Petrifilm STX est utilisé, dénombrer toutes les zones roses, et ce, qu'il y ait ou non des colonies présentes. Les zones roses sont habituellement associées à *S. aureus*, mais peuvent indiquer des bactéries *S. hyicus* ou *S. intermedius*. Les colonies non associées à une zone rose ne sont pas des *S. aureus* et ne doivent pas être dénombrées. Si toute la zone circulaire est uniformément rose sans zones distinctes, un grand nombre de *S. aureus* est présent. Rapporter le résultat comme « trop nombreux pour être dénombrés » et procéder à une autre dilution de l'échantillon afin d'obtenir un dénombrement plus précis.

7. RÉFÉRENCES

- 7.1 Association Française de Normalisation (AFNOR): Certificate No.: 3M 01/9 – 04/03. 3M Petrifilm Staph Express Count System. 95029, Cergy-Pontoise Cedex.
- 7.2 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Second edition. L.C. Parks (editor). CRC Press Inc.
- 7.3 Bacteriological Analytical Manual (8th ed.), Rev. A. International, Appendix 3.64 (R11). 1998. Gaithersburg, Md.
- 7.4 Ingham, S.C., K.L. Becker and M.A. Fanslau. 2003. Comparison of the Baird-Parker Agar and 3M Petrifilm Staph Express count plate methods for enumeration of *Staphylococcus aureus* in naturally and artificially contaminated foods. *J. Food Prot.* 66: 2151-2155.
- 7.5 International Standards Organization, ISO 6887-1:1999, Microbiology – General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination.
- 7.6 International Standards Organization, ISO 8261:2001, Milk and Milk Products – Preparation of test samples and dilutions for microbiological examination.
- 7.7 McMahon, W.A., V.A. Aleo, A. M. Schultz, B.L. Horter, and K.G. Lindberg. 2003. 3M™ Petrifilm™ Staph Express count plate method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected types of meat, seafood, and poultry: collaborative study. *J. AOAC Int.* 86:947-953.

- 7.8 Silbernagel, K.M., R.P. Jechorek, C.N. Carver, B.L. Horter and K.G. Lindberg. 2003. 3M™ Petrifilm™ Staph Express count plate method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected types of processed and prepared foods: collaborative study. J. AOAC Int. 86:954-962.
- 7.9 Silbernagel, K.M., R.P. Jechorek, C.N. Carver, B.L. Horter and K.G. Lindberg. 2003. 3M™ Petrifilm™ Staph Express count plate method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected dairy foods: collaborative study. J. AOAC Int. 86:963-970.