



DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ

OTTAWA

**DÉNOMBREMENT DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DANS LA
GLACE ET L'EAU CONSERVÉES DANS DES CONTENANTS
HERMÉTIQUES PAR LA MÉTHODE DE LA MEMBRANE
FILTRANTE QUADRILLÉE HYDROPHOBE (MFQH)**

Don Warburton

Bureau des dangers microbiens, direction des aliments

Repère Postal: 2204A1

Santé Canada, Ottawa ON K1A 0L2

Courrier électronique: Don_Warburton@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

La présente méthode peut être utilisée pour le dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans la glace ou l'eau conservées dans des contenants hermétiques dans le cadre des activités de vérification de la conformité à l'égard des articles 4 et 7 de la loi des aliments et drogues.

2. PRINCIPE

La présente méthode MFQH utilise une étape de rescuscitation sur un gélose non-sélectif suivie par de l'incubation additionnel (7.3) sur des géloses sélectif. Une seule dilution est satisfaisante pour plusieurs degrés de contamination. La précision du dénombrement peut être meilleure avec la MFQH qu'avec les géloses ou les membrane filtrantes classiques (7.3). Un gélose recommandé utilise C-390 comme agent sélectif et est basée sur la méthode de Havelaar et During (7.2), tel que modifiée par Warburton *et coll.* (7.4). Un autre gélose recommandée à été développé par Brodsky et Ciebin (7.1). Des identifications additionnelles peuvent être fait en utilisant des trousse d'identification disponible dans le commerce ou des réactions biochimique classiques.

3. DÉFINITION DES TERMES

Voir l'Annexe A du Volume 3.

4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

4.1 Voir l'Annexe B du Volume 3.

4.2 Chaque unité d'échantillonnage doit contenir au moins 500 mL de produit.

4.3 Pendant le transport, il faut conserver les unités d'échantillonnage réfrigérées à une température comprise entre 0 °C et 4 °C.

5. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT SPÉCIAL

- 1) MFQH (1 600 mailles, pores de 0,45 µm) (ISO-GRID®; vendues par Oxoid Inc., Ottawa, ON) ou l'équivalent
- 2) Pincés à membrane filtrante (Millipore Corp.)
- 3) Gélose trypticase soya (TSA) (en vente dans le commerce)
- 4) Géloses Sélectif:
Boîtes de Gélose sélectif pour *Pseudomonas aeruginosa* (PAS), mPAC ((Brodsky and Ciebin 1978) en vente dans le commerce par BBL ou Que-Lab), Cetrimide (Merck), Gélose du Roi (Merck), *Pseudomonas* CN (Oxoid), ou *Pseudomonas* CFC (Oxoid), ou l'équivalent.
- 5) Pour gélose PAS: la teinture acridan C-390 [9-chloro-9-(4-diethylaminophenyl)-10-phenylacridan] (Biosynth International (USA)).

NOTE: Avertissement: Manipuler C-390 avec soin appropriée (peut-être carcinogène ou neoplastinogène; peut irriter l'oeil ou la peau, etc.)

- 6) Boîtes de gélose de lait
- 7) Appareil de filtration et entonnoir (modèle MF-10, vendu par Richard Brancker Research Ltd., Ottawa, ON) ou appareil de filtration ISO-GRID® (vendu par Oxoid Inc., Ottawa, ON) ou l'équivalent.
- 8) Incubateur pouvant maintenir une température de 35 °C et 42° C.

NOTE: Il incombe à chaque laboratoire de veiller à ce que la température des incubateurs ou des bains-marie soit maintenue au degré recommandé. Lorsque l'on recommande 35° C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut-être à 36± 1,0° C. De même, une température moindre, soit de 30 ou 25, peut s'établir à ± 1,0° C. Lorsqu'on recommande des températures plus élevées, toutefois, comme 43 ou 45.5° C il est crucial de maintenir les incubateurs ou les bains-maries à ±0,5° C de la température recommandée parce que des températures plus élevées peuvent être mortelles pour le microorganisme que l'on cherche à isoler.

6. MODE OPÉRATOIRE

Analyser les unités d'échantillonnage individuellement ou après les avoir mélangées. Effectuer l'épreuve conformément aux instructions suivantes :

6.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

6.1.1 Au laboratoire, avant l'analyse, garder toutes les unités d'échantillonnage réfrigérées à une température comprise entre 0 °C et 4 °C.

6.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus rapidement possible après leur arrivée au laboratoire.

6.2 Préparatifs

6.2.1 Avoir à sa disposition des géloses stériles de Trypticase Soja (TSA), des géloses stériles de mA-tréhalose (MAT) et des milieux de culture stériles pour *Aeromonas* (AM).

6.2.2 Nettoyer l'aire de travail avec un désinfectant approprié.

- 6.2.3 Marquer clairement les boîtes de Pétri en y indiquant l'information d'identification appropriée.
- 6.2.4 La méthode MFQH permet d'effectuer des dénombrements dans des suspensions renfermant jusqu'à 5 000 organismes par mL. Il ne devrait pas être nécessaire de préparer des dilutions supplémentaires.

6.3 Filtration

- 6.3.1 Agiter tous les échantillons pour remettre en suspension les matières qui pourraient s'être déposées.
- 6.3.2 Manipuler la MFQH avec des pinces à membrane filtrante stériles.
- 6.3.3 Suivre les instructions du fabricant pour l'utilisation de l'appareil de filtration et y verser 100 mL de l'unité d'analyse. Ouvrir le robinet du filtre, laisser tout le liquide s'écouler et retirer aseptiquement la MFQH. Réaliser cette étape en double.
- 6.3.4 Suivre les instructions du fabricant pour le nettoyage de l'appareil.

6.4 Ensemencement et incubation

- 6.4.1 Déposer la MFQH sur la surface d'une gélose TSA en la roulant de manière à ne pas emprisonner de bulles d'air. Incuber les géloses à l'endroit (en prenant soin de ne pas empiler plus de trois boîtes) à 35 °C pendant 4 heures. Après 4 heures, transférer une MFQH sur deux différents géloses sélectifs. Incuber à 42 °C pendant 24 à 48 heures.
- 6.4.2 Les colonies typiques sur le gélose PAS démontrent une croissance luisante et noire. Suivre les instructions du fabricant pour la sélection de *P. aeruginosa* présomptifs sur d'autres géloses sélectifs.
- 6.4.3 Il est recommandé de toujours employer une culture de *Pseudomonas aeruginosa* comme témoin positif et une culture d'organismes d'un autre genre (par ex., *Escherichia coli*) comme témoin négatif.

6.5 Ensemencement et dénombrement sur les MFQH

- 6.5.1 Les colonies typiques à l'intérieur des mailles de la MFQH sont causées par la présence de *P. aeruginosa*.
- 6.5.2 S'il n'y a aucune croissance dans les MFQH, noter que le résultat du test est <1/100mL.

6.6 Confirmation

- 6.6.1 Ensemencer un minimum de cinq colonies de *P. aeruginosa* présomptif de chaque filtre sur du gélose de Lait. Faire un seul rayure d'environ 4 cm de longueur avec l'inoculum et incubé à 35° C pour 24 h. *P. aeruginosa* hydrolyse la caseïne et produit un pigment diffusible jaune ou vert.

6.7 Nouvelle confirmation

- 6.7.1 On peut pratiquer d'autres tests biochimiques classiques, ou faire appel à des trousse d'identification (comme le VITEK).

6.8 Calcul du nombre le plus probable de *P. aeruginosa*

- 6.8.1 Déterminer le nombre le plus probable des colonies (NPPC). Suivre les instructions du fabricant. Voir l'Annexe C du Volume 3 qui donne des exemples de calcul.

6.9 Présentation des résultats

Voir l'Annexe C du Volume 3

7. RÉFÉRENCES

- 7.1 Brodsky, M., and Ciebin, B. 1978. Improved medium for recovery and enumeration of *Pseudomonas*

- aeruginosa* from waters using membrane filters. Appl. Environ. Microbiol. **36**(1):36-42.
- 7.2 Havelaar, A.H. and M. During. 1986. C-390 as sole selective agent for the isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from hospital waste water. Can. J. Microbiol. **32**:513-515.
- 7.3 Sharpe, A.N. and P.I. Peterkin. 1988. Membrane filter food microbiology. Research Studies Press, Taunton, Somerset, U.K.
- 7.4 Warburton, D.W., B. Bowen and A. Konkle. 1994. The survival and recovery of *Pseudomonas aeruginosa* and its effect upon salmonellae in water: methodology to test bottled water in Canada. Can. J. Microbiol. **40**:987-992.

8. PRÉPARATION DES MILIEUX

Lorsqu'on utilise la stérilisation par la vapeur, il est essentiel d'allouer une période suffisante pour que la charge atteigne la température requise avant que la stérilisation proprement dite commence. Cette période varie selon la nature et la taille de la charge. On doit donc respecter les temps d'exposition pour s'assurer de la stérilité des solutions en flacons et des milieux de culture qui sont stables à la chaleur. Se référer au mode d'emploi du stérilisateur.

8.1 Gélose de Lait

Mélange A

Lait sans matières gras	100 g
Eau distillé	500 mL

Mélange B

Bouillon nutritif	12,5 g
Chlorure de sodium	2,5 g
Gélose	15,0 g
Eau distillé	500 mL

Stérilisé les mélanges séparément à l'autoclave, et tempérer à 50° C. Combiner aseptiquement et verser 20 mL dans chaque boîte.