



DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ

OTTAWA

DÉNOMBREMENT DU *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DANS LES ALIMENTS

Comité des méthodes microbiologiques  
Division de l'évaluation microbiologique  
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments  
Direction générale des produit de santé et des aliments, Santé Canada  
Repère postal : 2204A1  
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

[Don\\_Warburton@hc-sc.gc.ca](mailto:Don_Warburton@hc-sc.gc.ca)

Rick A. Szabo  
Division de l'évaluation microbiologique  
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments  
Direction générale des produit de santé et des aliments, Santé Canada  
Repère postal : 2204A1  
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

[Rick\\_Szabo@hc-sc.gc.ca](mailto:Rick_Szabo@hc-sc.gc.ca)

**1. APPLICATION**

La présente méthode peut servir à dénombrer les *Staphylococcus aureus* dans les aliments afin de déterminer s'il y a conformité aux exigences des articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues. Lorsqu'une méthode officielle est prescrite pour certains produits, il faut la suivre. Cette méthode révisée remplace la méthode MFHPB-21 de novembre 2000, et ses suppléments de février 2002, août 2002, et décembre 2003.

**2. DESCRIPTION**

Les études de l'AOAC et de la DGPS (8.1-8.10) ont démontré que cette méthode peut donner des résultats satisfaisants avec les produits suivants : viandes, poisson, volaille, légumes, céréales et produits laitiers contaminés naturellement et aliments contaminés artificiellement. Cette méthode peut servir à détecter la présence de *Staphylococcus aureus* dans d'autres aliments, ingrédients alimentaires et spécimens environnementaux.

### 3. PRINCIPE

Certains staphylocoques produisent des entérotoxines qui provoquent des intoxications alimentaires. À quelques exceptions près, seules les souches à coagulase positive ou qui produisent une nucléase thermostable (TNase) produisent des entérotoxines. Cette méthode permet de détecter la présence de *S. aureus* par l'ensemencement de quantités (dilutions) connues d'un aliment à analyser sur une gélose sélective. Après l'incubation, on choisit des colonies présumées de staphylocoques pour les soumettre à des épreuves de confirmation. On calcule le nombre de *S. aureus* par g ou mL d'aliment à partir des résultats de ces épreuves. Le nombre de staphylocoques présents peut indiquer la présence possible d'entérotoxines, ou aussi qu'on ne se conforme pas aux bonnes pratiques d'hygiène.

### 4. DÉFINITIONS

Voir l'annexe A du volume 2.

### 5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 2.

### 6. MATÉRIEL ET PRODUITS SPÉCIAUX

**NOTE :** Le surveillant du laboratoire doit veiller à ce que l'analyse décrite dans la présente méthode est effectuée conformément à la norme internationale " ISO/IEC 17025 :2005 (ou dernière révision): Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais ".

Les milieux suivants sont commercialement disponibles et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir aussi l'annexe G du volume 1 pour la formulation des milieux individuels.

- 6.1 Gélose Baird-Parker (BP).
- 6.2 BD CHROMagar Staph aureus (BD).
- 6.3 Gélose mannitol-sel (BD).
- 6.4 Gélose BP-RPF (plasma de lapin + fibrinogène bovin) (BIO-RAD).
- 6.5 Rapid Staph (BIO-RAD).
- 6.6 Bouillon d'infusion de cerveau et de cœur (BHI).
- 6.7 Gélose non sélective, soit gélose au sang (BA), gélose nutritive (NA) ou gélose de trypticase de soya (TSA).
- 6.8 Pentes de TSA.
- 6.9 Diluant à l'eau peptonée.
- 6.10 Bouillon Staphylocoques

**NOTE:** Utiliser le bouillon Staphylocoques lors d'investigation sur des épisodes d'intoxications alimentaires et/ou lorsque l'échantillon est très petit. Passer au stomacher ou faire macérer l'échantillon dans une proportion 1:10 v/v de bouillon et incubé à 35°C pendant 18-24 h. Étaler sur les géloses sélectives et procéder tel que décrit à la section 7.4.

- 6.11 Citrate de sodium 2%
- 6.12 Stomacher, mélangeur ou l'équivalent.
- 6.13 Mélangeur vortex ou l'équivalent.
- 6.14 Souches contrôles; utiliser les souches suivantes ou l'équivalent :
  - Témoins positifs : *S. aureus* à coagulase positive, p. ex., ATCC 27 154, 25923  
*S. aureus* à coagulase négative, p. ex., ATCC 14000, 33501
  - Témoins négatifs : *Escherichia coli*, p. ex., ATCC 23509  
*Pseudomonas aeruginosa*, p. ex., ATCC 7700
- 6.15 Colorant violet de cristal.
- 6.16 Plasma de coagulase (Lapin)  
Suivre les instructions du fabricant pour la reconstitution.
- 6.17 Incubateur capable de maintenir une température de 35 °C.
- 6.18 Bain-marie capable de maintenir une température de 50-55 °C.

<b>NOTE :</b>	Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que l'on maintient la température des incubateurs ou des bains-marie au niveau recommandé. Lorsque l'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être réglé à 35 +/-1,0 °C. De même, les températures plus basses de 30 à 25 peuvent être réglées à +/-1,0 °C. Lorsque l'on recommande des températures plus élevées, comme 43 ou 45,5 °C, il est toutefois impératif de maintenir la température des incubateurs ou des bains-marie à +/-0,5 °C parce que les températures plus élevées peuvent être mortelles pour les micro-organismes que l'on cherche à isoler.
---------------	--

- 6.19 Fournitures nécessaires pour la confirmation :  
(Les fournitures suivantes peuvent être nécessaires pour la confirmation; voir 7.5)
  - 6.19.1 Accuprobe (voir MFLP-79)
  - 6.19.2 Dosage des entérotoxines (voir MFLP-47, 67, 68 ou 69)
  - 6.19.3 Trousses d'agglutination au latex, tel que le Pastorex Staph-plus (BIO-RAD)
  - 6.19.4 Trousses d'identification Rapid
  - 6.19.5 Utilisation du glucose en anaérobiose (bouillon de phénol rouge et de glucides contenant 0,5 % de glucose, huile de paraffine stérile)
  - 6.19.6 Utilisation du mannitol en anaérobiose (bouillon de phénol rouge et de glucides contenant 0,5 % de mannitol, huile de paraffine stérile)
  - 6.19.7 Sensibilité à la lysostaphine (solution tampon physiologique au phosphate, solution de lysostaphine)
  - 6.19.8 TNase (voir MFHPB-28).

## 7. MARCHÉ À SUIVRE

Il faut analyser chaque unité d'échantillonnage individuellement. Effectuer l'analyse en suivant les instructions ci-dessous :

## 7.1 **Manipulation des unités d'échantillonnage**

- 7.1.1 Au cours de l'entreposage et du transport, les règles suivantes s'appliquent : sauf dans le cas des aliments de longue conservation, garder les unités d'échantillonnage au réfrigérateur. Il faut garder au congélateur les unités d'échantillonnage de produits congelés. Faire décongeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur, ou pendant une période et à une température qui empêchent la croissance ou la mort des micro-organismes.
- 7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire.

## 7.2 **Préparation pour l'analyse**

- 7.2.1 Avoir en main du diluant stérile.
- 7.2.2 Nettoyer la surface de travail au moyen d'un désinfectant approprié.

## 7.3 **Préparation de l'échantillon**

- 7.3.1 Pour que l'unité d'analyse soit vraiment représentative, prélever des portions à différents endroits de chaque unité d'échantillonnage de solides,
- ou
- 7.3.2 Si l'unité d'échantillonnage est un liquide ou un solide à écoulement libre (poudre), mélanger soigneusement chaque unité d'échantillonnage en agitant le contenant.
- 7.3.3 Préparer une dilution 1:10 de l'aliment en ajoutant de façon aseptique 11(10) g ou mL (l'unité d'analyse) à 99(90) mL de diluant (voir tableau I). Agiter, passer au stomacher ou mélanger selon le type d'aliment.

<b>NOTE:</b> Le poids ou le volume entre parenthèses indique une autre façon de préparer les dilutions.
---

- 7.3.4 Utiliser le mélangeur ou le stomacher pendant le temps minimum nécessaire pour produire une suspension homogène. Pour éviter de surchauffer, ne pas mélanger pendant plus de 2,5 minutes. Dans le cas des aliments qui ont tendance à mousser, régler le mélangeur à basse vitesse et prélever ensuite une portion aliquote sous l'interface liquide-mousse.
- 7.3.5 S'il faut mélanger la dilution 1:10 en agitant, agiter la bouteille de dilution 25 fois en suivant un arc de 30 cm pendant 7 secondes environ.
- 7.3.6 Laisser l'homogénat (dilution 1:10) d'aliments secs reposer à la température de la pièce pendant 15 minutes. Dans tous les autres cas, poursuivre l'analyse sans tarder.
- 7.3.7 Préparer des dilutions décimales successives dans l'eau peptonée de la façon requise en utilisant une pipette stérile distincte pour effectuer chaque transfert.
- 7.3.8 Agiter toutes les dilutions immédiatement avant d'effectuer les transferts afin d'assurer l'uniformité de la distribution des micro-organismes présents.

## 7.4 **Dénombrement des colonies présumées de *S. aureus***

### 7.4.1 **Ensemencement**

- 7.4.1.1 Agiter chaque dilution afin de suspendre de nouveau la matière qui aurait pu se déposer au fond de la bouteille au cours de la préparation. Il faut effectuer l'ensemencement dans les 15 minutes qui suivent la préparation des dilutions.
- 7.4.1.2 Le volume ensemencé sur les géloses BP est déterminé par les limites de tolérance spécifiées dans les normes ou lignes directrices gouvernementales, ou dans les spécifications internes du laboratoire.

Lorsqu'un compte de <25/g constitue un résultat acceptable à rapporter pour un produit, étaler 0,2 ml de chaque dilution à utiliser sur chacune des boîtes de gélose BP préparées en double. Lorsque <5/g constitue un résultat acceptable à rapporter pour un produit, étaler alors 0,4 ml de la dilution 1:10 sur la surface de chacune de cinq boîtes de géloses BP.

- 7.4.1.3 Il ne faut pas étaler le liquide jusqu'au bord des boîtes, ce qui provoque une croissance confluyente entre la gélose et la boîte, croissance qui est difficile à compter.
- 7.4.1.4 Garder les boîtes en position non-inversée jusqu'à ce que le milieu ait absorbé l'inoculum (environ 10 minutes sur des boîtes bien asséchées). Si le milieu n'absorbe pas facilement l'inoculum, on peut placer les boîtes en position non-inversée dans l'incubateur pendant au plus une heure.

<b>NOTE:</b>	Il est recommandé, mais optionnel, que les analyses incluent l'ensemencement sur deux différents types de géloses sélectives (ex. Baird Parker (BP) et une autre gélose), tel que suggéré dans les méthodes pour la détection d'autres pathogènes décrites dans ce compendium. Si un seul type de milieu est utilisé pour l'ensemencement, un milieu équivalent au BP peut-être utilisé SEULEMENT si des données de validation ont été produites et démontrent une équivalence des deux milieux.
--------------	--

#### 7.4.2 Incubation

- 7.4.2.1 Incuber les boîtes de gélose en position inversée à 35 °C.
- 7.4.2.1.1 **BP** - Vérifier les boîtes après 24-30 heures pour déterminer s'il y a eu croissance envahissante; on peut alors compter les colonies présumées, mais il faut vérifier le dénombrement une fois la période de 48 ± 4 h écoulée.
- 7.4.2.1.2 **BD CHROMagar** - Les boîtes sont incubées pendant 24 ± 2 h.
- 7.4.2.1.3 **BP-RPF** - Les boîtes sont incubées pendant 24-48 h. Vérifier les boîtes après 24-30 heures pour déterminer s'il y a eu croissance; on peut alors compter les colonies présumées, mais il faut vérifier le dénombrement une fois la période de 48 ± 4 h écoulée.
- 7.4.2.1.4 **MSA** - Les boîtes sont incubées pendant 18-24 h (jusqu'à 48 h). Vérifier les boîtes après 24-30 heures pour déterminer s'il y a eu croissance; on peut alors compter les colonies présumées, mais il faut vérifier le dénombrement une fois la période de 48 ± 4 h écoulée.
- 7.4.2.1.5 **Rapid Staph** - Les boîtes sont incubées pendant 24-48 h. Vérifier les boîtes après 24-30 heures pour déterminer s'il y a eu croissance; on peut alors compter les colonies présumées, mais il faut vérifier le dénombrement une fois la période de 48 ± 4 h écoulée.
- 7.4.2.2 Éviter d'empiler ou d'entasser trop de boîtes de gélose afin de les laisser atteindre rapidement et uniformément la température de l'incubateur.

### 7.4.3 Dénombrement des colonies et inscription des résultats

7.4.3.1 **BP** - Observer les quatre types suivants de colonies présumées de staphylocoques :

Type 1. Colonies noires brillantes, entières, convexes, entourées de zones claires s'étendant dans le milieu opaque.

Type 2. Colonies noires brillantes, entières, convexes, sans zone claire bien définie.

Type 3. Colonies grises foncées semblables à celle du type 1.

Type 4. Colonies grises foncées semblables à celle du type 2.

Si des morphologies ou des dimensions différentes sont observées à l'intérieur d'un type de colonie, compter les sous-types de colonies et les confirmer séparément.

Seules les colonies grises foncées devraient être comptées pour les type 3 et 4. Les colonies grises pâles ne devraient pas être considérées comme des colonies présomptive de *S.aureus*.

Ne pas inclure les colonies de la grosseur d'une tête d'épingle dans le compte des colonies de *S.aureus* dans les quatre types de colonies.

Chaque type de colonie peut être entouré d'une bordure gris-blanc ou de zones opaques (halos doubles). Il ne faut pas compter les colonies noires mucoïdes ayant plus de 2 mm de diamètre, ni les colonies groupées. Ces colonies appartiennent habituellement au genre *Bacillus*.

7.4.3.1.1 Incrire le nombre de colonies de chaque type séparément, mais les additionner pour obtenir le nombre total de colonies présumées.

7.4.3.2 **BD CHROMagar** - Les colonies présomptives de *S.aureus* ont une coloration variant de mauve à mauve pâle (ou rose).

7.4.3.3 **MSA** - Les colonies de staphylocoques coagulase-positives présomptives apparaissent comme des colonies jaunes entourées de zones jaunes claires, alors que les colonies coagulase-négatives produisent de petites colonies rouges, qui ne provoquent pas de changement dans la couleur du milieu gélosé.

7.4.3.4 **BP-RPF agar** - L'apparence des colonies est silimaire à ce qui est observé sur BP, à l'exception que le halo entourant des colonies de *S.aureus* est plus blanc. Ce phénomène est le résultat de l'activité de la coagulase qui converti le fibrinogène en fibrine.

7.4.3.5 **Rapid Staph** - L'apparence des colonies est silimaire à ce qui est observé sur BP, à l'exception qu'elles sont d'un noir lustré et entièrement convexes, entourées de zones claires se prolongeant dans le milieu opaque.

### 7.4.4 Dénombrement de cinq boîtes de la dilution 1:10 (aliments solides seulement)

7.4.4.1 Si le nombre de toutes les colonies présumées de staphylocoques est inférieur à 20 par boîte, additionner séparément le total de chaque type des cinq boîtes et les inscrire comme dénombrement présumé respectif. Il s'agit du dénombrement de l'un des quatre types par 2 mL (0,2 g d'aliment). Multiplier chaque dénombrement par cinq et les inscrire comme étant des dénombresments présumés respectifs par g d'aliment (C). Additionner les résultats et les inscrire comme étant le dénombrement présumé total par g d'aliment.

- 7.4.4.2 Si le nombre de toutes les colonies présumées de staphylocoques s'établit entre 20 et 200 par boîte, choisir deux boîtes au hasard, compter séparément le nombre de colonies de chaque boîte et calculer le dénombrement présumé moyen de chaque boîte (par 0,4 mL, ce qui équivaut à 0,04 g d'aliment) (A/2). Multiplier chaque dénombrement par 25 et inscrire les résultats comme étant les dénombrements présumés respectifs par gramme d'aliment (C). Additionner les résultats et les inscrire comme dénombrement présumé total par gramme d'aliment.
- 7.4.4.3 Si, parmi les cinq boîtes, certaines ont un nombre présumé de staphylocoques inférieur à 20 mais si d'autres en ont un qui est égal ou supérieur à 20, procéder comme dans 7.4.4.1. ci-dessus.
- 7.4.4.4 Si aucune boîte contenant de 20 à 200 colonies présumées de *S. aureus* n'est disponible, on peut établir un nombre estimatif en utilisant des boîtes dont le nombre présumé s'établit en dehors de cette plage.

#### 7.4.5 Dénombrement des boîtes préparées en double (toute dilution)

- 7.4.5.1 Choisir les boîtes qui contiennent de 20 à 200 colonies présumées de staphylocoques, total constitué des nombres combinés de tous les types par boîte.
- 7.4.5.2 Calculer le nombre présumé moyen par plaque pour chaque type (A/2), multiplier chaque nombre par cinq et par le facteur approprié de dilution et inscrire le total obtenu comme nombre présumé par g ou mL d'aliment pour chaque type (C). Additionner les résultats et les inscrire comme nombre présumé total par g ou mL d'aliment.
- 7.4.5.3 Si l'on utilise des boîtes de plus d'une dilution, il faut établir la moyenne des totaux de la façon indiquée en 7.4.6.
- 7.4.5.4 Si aucune boîte contenant de 20 à 200 colonies présumées de *S. aureus* n'est disponible, on peut établir un nombre estimatif en utilisant des boîtes dont le nombre présumé s'établit en dehors de cette plage. Lorsque les résultats sont en dehors de la plage de 20 à 200 colonies, il faut indiquer que les résultats représentent des estimations.
- 7.4.5.5 Lorsqu'un nombre estimatif contribue au nombre moyen, cette moyenne devient en soi une valeur estimative.

#### 7.4.6 Établissement de la moyenne de deux dilutions

Si les boîtes préparées à partir de deux dilutions décimales successives présentent des dénombrements de 20 à 200 colonies présumées de staphylocoques par boîte, il faut utiliser le total des quatre boîtes pour établir la moyenne. Comme il faut compter séparément les quatre types différents de colonies, comme il est fort probable que les totaux individuels seront inférieurs à 20, et comme les totaux combinés se trouvent à l'intérieur de la plage, il faut combiner les valeurs estimatives et les valeurs réelles pour calculer une moyenne. La formule suivante permet d'éviter cette difficulté :

$$\text{Dénombrement moyen par colonie/g ou mL} = \frac{\text{Nombre total de colonies comptées}}{\text{Volume utilisé par dilution} \left( \frac{1}{\text{Dilution}_1} + \frac{1}{\text{Dilution}_2} \right)}$$

Le tableau II contient un exemple de façon de compter les colonies.

- 7.4.6.1 Si l'on n'obtient aucune colonie présumée de staphylocoques, il faut inscrire les dénombrements présumés comme étant inférieurs à 5 par g ou mL pour

les cinq boîtes de la dilution 1:10 ou inférieurs à 2,5 x le facteur de dilution pour les boîtes préparées en double. Les résultats représentent alors des estimations.

## 7.5 Épreuves de confirmation

Pour confirmer la présence de *S. aureus*, il faut commencer par procéder à l'épreuve de la coagulase (suivre les instructions du fabricant). Il faut utiliser des solutions témoins (cultures positives et négatives et milieux témoins) en même temps que toutes les épreuves de confirmation.

### 7.5.1 Choix des colonies

7.5.1.1 Dans les boîtes préparées en double et qui ont été comptées, choisir comme il suit un certain nombre de colonies de chaque type pour vérifier la pureté de la culture :

Lorsque le dénombrement total par type de colonie sur toutes les boîtes d'une dilution est inférieur à cinq, prélever toutes les colonies de ce type.

Lorsque le dénombrement total par type de colonie sur toutes les boîtes d'une dilution est égal ou supérieur à cinq, prélever au hasard cinq colonies de ce type.

7.5.1.2 Si les colonies ont une morphologie typique et qu'elles sont bien isolées, procéder tel que décrit au point 7.5.1.5. Sinon, ensemencer en stries chaque colonie choisie sur un milieu non sélectif comme une gélose BA, NA ou TSA afin d'obtenir des colonies distinctes.

7.5.1.3 Incuber à 35 °C pendant 24 ± 2 h.

7.5.1.4 Si les colonies ont une morphologie typique et qu'elles sont bien isolées, procéder tel que décrit au point 7.5.1.5. Sinon, effectuer un frottis à partir de la croissance de chaque isolat sur le milieu non sélectif et colorer avec un colorant simple (violet de cristal, par exemple). Examiner au microscope pour déceler la présence de coques. Si un isolat n'est pas pur, choisir une autre colonie mentionnée à l'étape 7.5.1.2 et répéter les étapes d'isolation des colonies ci-dessus.

7.5.1.5 Transférer l'inoculum de chaque colonie dans une éprouvette distincte de bouillon de cerveau et de cœur (BHI).

7.5.1.6 Incuber les éprouvettes de bouillon de BHI ensemencées à 35 °C pendant 18-24 h et observer s'il y a croissance.

7.5.1.7 Garder les cultures de bouillon de BHI.

### 7.5.2 Épreuve de la production de coagulase

7.5.2.1 Transférer 0,2 mL de chaque culture de bouillon de BHI dans des éprouvettes stériles de 13 x 100 mm contenant 0,5 mL de plasma homologué pour l'épreuve de la production de coagulase. Mélanger soigneusement.

7.5.2.2 Incuber les éprouvettes à une température de 35 °C et examiner après 1 h et 4 h. Ne pas agiter les éprouvettes durant l'incubation. Incuber les éprouvettes négatives toute la nuit à la température de la pièce et vérifier de nouveau.



7.5.2.3 On considère que la présence d'un caillot ferme qui ne bouge pas lorsque l'on penche l'éprouvette (réaction coagulase 4+) constitue un résultat positif pour la présence de *S. aureus*. Aucune confirmation supplémentaire n'est nécessaire.

Si la réaction à la coagulase est de 3+ , 2+ ou 1+, il faut procéder à au moins deux des épreuves de confirmation indiquées au point 7.5.3. Si deux de ces épreuves donnent un résultat positif, on considère que l'isolat est constitué de *S. aureus*.

Si aucun caillot n'est observé, le résultat est considéré comme étant négatif pour *S.aureus*. Aucune confirmation n'est nécessaire.

Se référer à la Fig. 2 pour une visualisation des résultats de la coagulase.

### 7.5.3 Épreuves supplémentaires de confirmation

Au moins deux des épreuves suivantes doivent être effectuées, sans oublier que l'utilisation du glucose en anaérobiose et la sensibilité à la lysostaphine ne doivent pas être les deux seules épreuves effectuées.

#### 7.5.3.1 Méthode Accuprobe

Procéder à l'épreuve en suivant le protocole décrit dans la méthode MFLP-79

#### 7.5.3.2 Dosages des entérotoxines staphylococciques

Procéder à l'épreuve en suivant le protocole décrit dans la méthode MFLP-47, MFLP-67, MFLP- 68 ou MFLP- 69

#### 7.5.3.3 Trousses d'agglutination au latex

Procéder à l'épreuve en suivant le protocole décrit dans le manuel du fabricant.

#### 7.5.3.4 Trousses d'identification Rapid

Procéder à l'épreuve en suivant le protocole décrit dans le manuel du fabricant.

#### 7.5.3.5 Utilisation du glucose en anaérobiose

Ensemencer la culture à vérifier dans une éprouvette de milieu de fermentation des glucides contenant du glucose à 0,5 %. Recouvrir le tout d'huile de paraffine et incuber à 35 °C pendant 18-24 h. Un changement de couleur qui indique une réaction acide confirme une réaction positive pour *S. aureus*.

#### 7.5.3.6 Utilisation du mannitol en anaérobiose

Procéder comme dans le cas de l'utilisation du glucose, sauf que les glucides proviennent du mannitol. Le *S. aureus* donne habituellement une réaction positive, mais certaines souches ne fermentent pas le mannitol.

#### 7.5.3.7 Sensibilité à la lysostaphine

Ensemencer la culture à analyser dans 0,2 mL de solution tampon saline au phosphate et émulsionner. Transférer la moitié des cellules en suspension dans une autre éprouvette (13 x 100 mm) et mélanger avec 0,1 mL de solution tampon saline au phosphate pour produire un témoin négatif. Ajouter 0,1 mL de solution de

lysostaphine à l'éprouvette originale pour obtenir une concentration de 25 µg de lysostaphine par mL de suspension de cellules.

Incuber les deux éprouvettes à 35 °C pendant 2 heures au maximum.

Si le contenu de l'éprouvette qui contient des cellules et de la lysostaphine s'éclaircit, et si celui de l'éprouvette témoin ne s'éclaircit pas, l'épreuve est positive pour *S. aureus*. Si le mélange ne s'est pas éclairci en 2 heures, l'épreuve est négative.

#### 7.5.3.8 Épreuve de la production de thermonucléase

Procéder à l'épreuve de dépistage de la nucléase thermostable (TNase) en suivant le protocole décrit dans la méthode MFHPB-28.

#### 7.5.3.5 Si deux épreuves de confirmation donnent des résultats positifs, on considère que l'isolat est le *S. aureus*.

En se fondant sur les épreuves de confirmation de chacun des quatre types de culture, inscrire le nombre total de *S. aureus* par g ou mL d'aliment ( $N_T$ ). Le nombre total de *S. aureus* par g ou mL est égal à la somme du nombre de *S. aureus* des types 1, 2, 3 et 4 ( $N_T = N_1 + N_2 + N_3 + N_4$ )

$$\text{N}^{\text{bre}} \text{ de } S. \text{ aureus} \text{ du type 1} \\ \text{par g ou mL (N}_T\text{)} = \frac{\text{N}^{\text{bre}} \text{ de colonies confirmées} \\ \text{de } S. \text{ aureus (P)}}{\text{N}^{\text{bre}} \text{ de colonies testées (G)}} \times \text{dénombrement} \\ \text{présumé de type 1 (C)}$$

Procéder de la même façon pour les types 2, 3 et 4. Voir le tableau II.

## 8. RÉFÉRENCES

- 8.1 American Public Health Association (APHA). 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. APHA. Washington, DC. Chap. 33, p. 533-550.
- 8.2 Association of Official Analytical Chemists, (AOAC). 1999. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th. AOAC. Gaithersburg, Md. Vol. I. Chap. 17, p. 32-34.
- 8.3 Baird-Parker, A.C. 1962. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. J. Appl. Bacteriol. **25**:12-19.
- 8.4 Baird-Parker, A.C. et E. Davenport. 1965. The effect of recovery medium on the isolation of *Staphylococcus aureus* after heat treatment and after storage of frozen or dried cells. J. Appl. Bacteriol. **28**:390-402.
- 8.5 Collins-Thompson, D.L., A. Hurst et B. Aris. 1974. Comparison of selective media for the enumeration of sublethally heated food-poisoning strains of *Staphylococcus aureus*. J Can Microbiol **20**:1072-1075.
- 8.6 Crisley, F.D., J.T. Peeler et R. Angelotti. 1965. Comparative evaluation of five selective and differential media for the detection and enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. Appl. Microbiol. **13**:140-156.
- 8.7 Koskitalo, L.D. et M.E. Milling. 1969. Lack of correlation between egg yolk reaction in staphylococci medium 110 supplemented with egg yolk and coagulase activity of staphylococci isolated from cheddar cheese. J Can Microbiol **15**:132-133.
- 8.8 Rayman, M.K., C.E. Park, J. Philpott et E.C.D. Todd. 1975. Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease tests as means of identifying *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol. **29**:451-454

- 8.9 Selepak, S.T. et F.G. Witelsky. 1985. Inoculum size and lot-to-lot variation as significant variables in tube coagulase test for *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. **22**(5):835-837.
- 8.10 Sperber, W.H. et S.R. Tatini. 1975. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol. **29**:502-505.

**TABLEAU I**  
**Préparation de la dilution initiale**

Type d'aliment	Préparation
<b>Liquides :</b>	
lait, eau, etc.	transférer à la pipette directement sur une boîte de Pétri ou dans un diluant d'eau peptonée
liquides visqueux	peser dans un diluant d'eau peptonée
<b>Solides :</b>	
solides hydrosolubles	peser dans un diluant d'eau peptonée
poudres, viandes	peser dans un diluant d'eau peptonée
épices	peser dans un diluant d'eau peptonée
mollusques et crustacés	peser dans un diluant d'eau peptonée
fromages	peser dans un diluant de citrate de sodium 2% (chauffé à 45°C)

TABLEAU II

Exemple de dénombrement de *S. aureus* par g ou mL d'aliment

N <sup>bre</sup> total de colonies d'un des quatre types des boîtes préparées en double «A»	N <sup>bre</sup> d'isolats testés «G»	N <sup>bre</sup> d'isolats confirmés comme étant <i>S. aureus</i> «P»	N <sup>bre</sup> total de colonies de l'un des quatre types par g ou mL «C» C = 1/2Ax5 <sup>**</sup>	N <sup>bre</sup> de <i>S. aureus</i> de l'un des quatre types par g ou mL «N» N = (P/G)xC
Moins de 5 (p. ex., 4)	Tous (4)	2	1 000	500
Plus de 5 (p. ex., 18)	5(5)	4	4 500	3 600

Calculer N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub> et N<sub>4</sub> pour chaque type de colonie afin d'obtenir le nombre total de *S. aureus*. (N<sub>T</sub>) par g ou mL

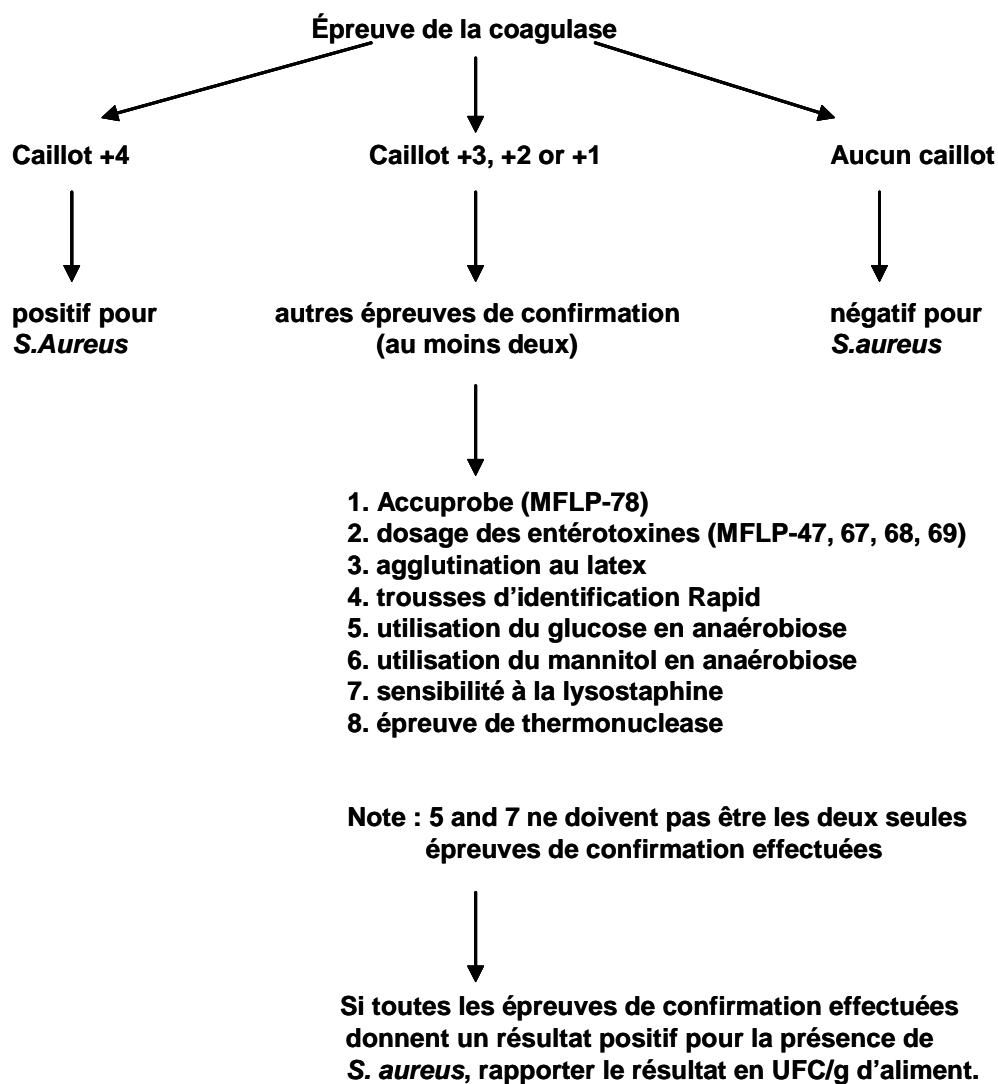
$$N_T = N_1 + N_2 + N_3 + N_4$$

p. ex., si N<sub>1</sub> = 1 000, N<sub>2</sub> = 100, N<sub>3</sub> = 0 et N<sub>4</sub> = 0  
N<sub>T</sub> = 1 000 + 100 = 1 100 par g

\* Facteur de dilution = 100

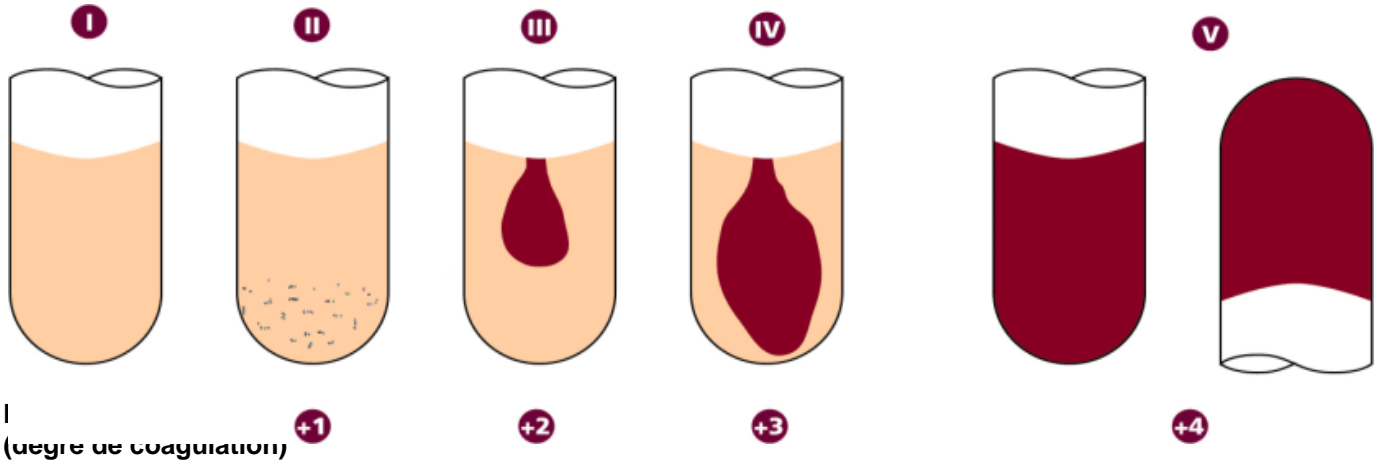
\*\* Pour des boîtes préparées en double, 0,2 mL par boîte. Diviser par 2 puisque «A» représente le nombre total de l'un des quatre types sur deux boîtes préparées en double. De même, lorsque l'on compte 5 boîtes de la dilution 1:10, il faut diviser par 5.  
Inscrire le nombre total de *Staphylococcus aureus* par g ou mL d'aliment en l'arrondissant à deux chiffres significatifs.

**FIGURE 1**  
**Ordinogramme du procédé de confirmation**



**FIGURE 2**  
**RÉACTION DE L'ÉPREUVE À LA COAGULASE**

Numéro d'éprouvette



**NÉGATIVE**

**À CONFIRMER**

**POSITIVE**