

DENOMBREMENT DES AGENTS PATHOGENES D'ORIGINE HYDRIQUE AVEC SCANSTATION[®], STATION D'INCUBATION ET DE COMPTAGE EN TEMPS REEL. Utilisation de membranes de filtration

Auteurs : Sylvie VIBOUD, PhD, INTERSCIENCE

Appareil : ScanStation[®] - N/S : 439300S00045 - Version logiciel : v 1.19

Introduction

L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances de ScanStation[®] pour compter en temps réel les colonies sur membrane de filtration. Le dénombrement a été effectué avec des agents pathogènes d'origine hydrique connus pour être impliqués dans des infections associées aux soins de santé (IASS). Des suspensions bactériennes ont été filtrées à travers des membranes qui ont été ensuite déposées sur des boîtes de Petri. Les colonies ont été comptées manuellement et les résultats ont été comparés aux comptages automatiques effectués par ScanStation[®].

Matériaux

Souches de bactéries

Des pastilles de bactéries lyophilisées sont réhydratées et ensemencées sur des boîtes gélosées de TSA. Les boîtes de Petri (culture primaire) sont incubées à 30°C pendant 24-48h selon la souche. Les colonies sont transférées dans une solution saline stérile pour faire la suspension mère. Sept souches bactériennes ont été utilisées dans cette étude : *Pseudomonas mosselii* (ATCC 49838), *Burkholderia cepacian* (ATCC 25416), *Ralstonia pickettii* (ATCC 27511), *Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC 13637), *Sphingomonas paucimobilis* (ATCC 29837), *Bacillus licheniformis* (ATCC 12759), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933).

Membranes testées

Les suspensions bactériennes ont été filtrées avec des membranes en polycarbonate blanc de 0,4 µm de porosité (FMFNL1050, PALL[®]) et avec des membranes en polyéthersulfone noir quadrillées de 0,45 µm de porosité (PN4808, PALL[®]).

Protocole

Des dilutions en série des suspensions mères bactériennes ont été réalisées, afin d'obtenir une concentration située entre 50-300 UFC/mL. 1mL de chaque suspension de microorganismes cibles a été filtré sur les 2 types de membranes. La membrane a ensuite été placée sur une boîte gélosée R2A. D'autres boîtes de Petri sont directement inoculées avec 100µL de la précédente dilution (sans membrane). Toutes les boîtes sont chargées dans ScanStation[®] pour une incubation et une lecture automatique pendant 5 jours à 32,5°C. Les boîtes sont comptées manuellement et les résultats sont comparés à ceux de ScanStation[®] (logiciel v1.19).

Résultats

Des comptages automatiques ont été réalisés avec ScanStation[®] sur 2 types de membranes : membranes blanches non quadrillées, membranes noires quadrillées et directement sur des boîtes de gélose (les données brutes sont présentées dans le Tableau 1, annexe I). Les résultats montrent que dans le cas des membranes quadrillées (noires), les comptages automatiques sont la plupart du temps inférieurs à ceux observés avec la méthode manuelle (Figure 1A). Ces différences peuvent être visualisées sur la Figure 2A.

Pour les membranes blanches (sans grille) et quelles que soient les souches testées (n=7), les comptages automatiques réalisés par ScanStation[®] sont en concordance avec les comptages manuels (Figure 1B, 2B). Dans ce cas, deux configurations de lumière, fond blanc ou fond noir, peuvent être utilisées pour prendre des photos. Le fond blanc (lumière venant du bas) est celui qui est recommandé, en raison d'une meilleure illumination globale et d'un meilleur

contraste. Quelques photos peuvent être visualisées dans les Figure 3 à Figure 8, en annexe II. Sur les boîtes de gélose (sans membrane), les comptages automatiques et manuels sont assez comparables (Figure 1C). Les différences sont assez faibles entre les deux méthodes comme observé dans la Figure 2C.



Figure 1 Comptage des UFC de 7 souches bactériennes sur différents types de membranes (A : membrane noire quadrillée, B : membrane blanche non quadrillée) et sur une boîte de gélose sans membrane (C). Les lignes orange correspondent aux comptages manuels sur boîtes ("référence") et les lignes vertes aux comptages automatiques effectués par ScanStation®. Pour les comptages automatiques, deux configurations de lumière pour prendre des photos ont été testées : black bckgrd (fond noir) et white bckgrd (fond blanc). Liste des bactéries testées= *B.lich* : *Bacillus licheniformis*, *B.cep* : *Burkholderia cepacian*, *P.mirab* : *Proteus mirabilis*, *P.moss* : *Pseudomonas mosselii*, *R.pick* : *Ralstonia pickettii*, *S.malto* : *Stenotrophomonas maltophilia*, *S.pauci* : *Sphingomonas paucimobilis*.

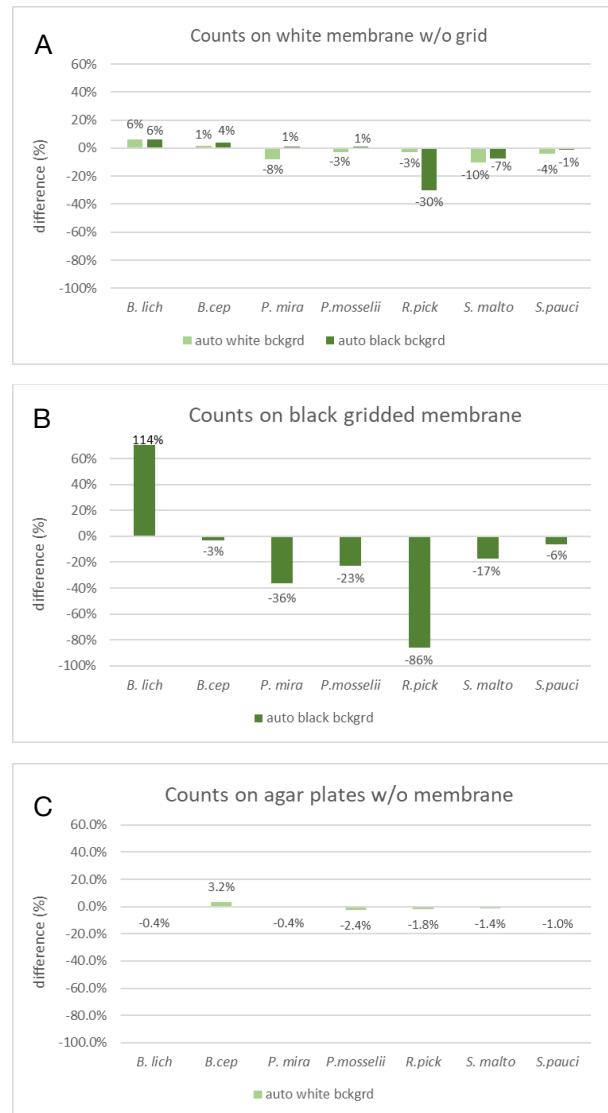


Figure 2. Différences entre les comptages manuels et automatiques de CFU par ScanStation sur différents types de membranes (A : membrane noire avec grille, B : membrane blanche sans grille) et sur une boîte de gélose sans membranes (C). $\text{Différence} = \frac{(\text{UFC}_{\text{comptages automatiques}} - \text{UFC}_{\text{comptages manuels}})}{\text{UFC}_{\text{comptages manuels}}} \times 100$. Pour les comptages automatiques, deux configurations de lumière pour prendre des photos ont été testées : black bckgrd (fond noir) et white bckgrd (fond blanc). Liste des bactéries testées = *B.lich* : *Bacillus licheniformis*, *B.cep* : *Burkholderia cepacian*, *P.mirab* : *Proteus mirabilis*, *P.moss* : *Pseudomonas mosselii*, *R.pick* : *Ralstonia pickettii*, *S.malto* : *Stenotrophomonas maltophilia*, *S.pauci* : *Sphingomonas paucimobilis*.

Conclusion

ScanStation® montre de bonnes performances pour compter en temps réel les colonies sur les membranes de filtration. Pour les sept souches testées, les comptages automatiques et manuels sont similaires, lorsque la filtration des suspensions bactériennes est effectuée sur des membranes en polycarbonate blanc (sans grille). Pour obtenir de meilleurs comptages automatiques dans ce cas, la configuration

lumineuse conseillée est le fond blanc (lumière venant du bas). Cette étude montre que les

colonies bactériennes peuvent être efficacement dénombrées avec ScanStation®.

Annexe I

Table 1. Tableau des données brutes, comptages automatiques et manuels des UFC et différences entre les deux méthodes calculées comme suit ((CFU_{comptages automatiques} - CFU_{comptages manuels})/ CFU_{comptages manuels} X 100).

Strains	CFU counts			Difference (%)	
	manual counts	automatic counts		automatic versus manual counts	
		Camera configuration		Camera configuration	
		white bckgrd	black bckgrd	white bckgrd	black bckgrd
white membrane w/o grid					
<i>Bacillus licheniformis</i>	16	17	17	6%	6%
<i>Burkholderia cepacia</i>	73	74	76	1%	4%
<i>Proteus mirabilis</i>	121	111	122	-8%	1%
<i>Pseudomonas mosselii</i>	196	190	198	-3%	1%
<i>Ralstonia pickettii</i>	33	32	23	-3%	-30%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	366	329	339	-10%	-7%
<i>Sphingomonas paucimoblis</i>	77	74	76	-4%	-1%
black gridded membrane					
<i>Bacillus licheniformis</i>	7	-	15	-	114%
<i>Burkholderia cepacia</i>	99	-	96	-	-3%
<i>Proteus mirabilis</i>	170	-	108	-	-36%
<i>Pseudomonas mosselii</i>	235	-	181	-	-23%
<i>Ralstonia pickettii</i>	206	-	29	-	-86%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	429	-	355	-	-17%
<i>Sphingomonas paucimoblis</i>	78	-	73	-	-6%
agar plate					
<i>Bacillus licheniformis</i>	223	222	-	-0.4%	-
<i>Burkholderia cepacia</i>	93	96	-	3.2%	-
<i>Proteus mirabilis</i>	252	251	-	-0.4%	-
<i>Pseudomonas mosselii</i>	296	289	-	-2.4%	-
<i>Ralstonia pickettii</i>	168	165	-	-1.8%	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	420	414	-	-1.4%	-
<i>Sphingomonas paucimoblis</i>	388	384	-	-1.0%	-

Annexe II.

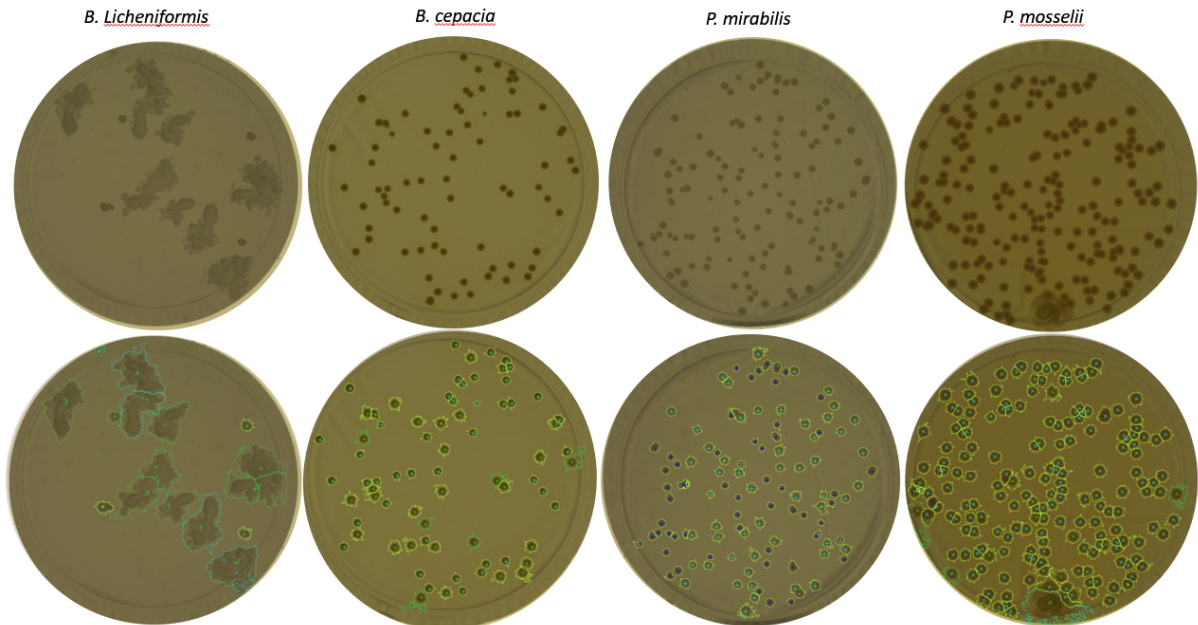


Figure 3. Les photos du haut montrent les images des membranes blanches (sans grille) prises par ScanStation®. Les photos du bas montrent les images après avoir été traitées par le logiciel pour le dénombrement des UFC (visualisation des croix et de la zone de détection autour des colonies). La configuration de la caméra est "fond blanc".

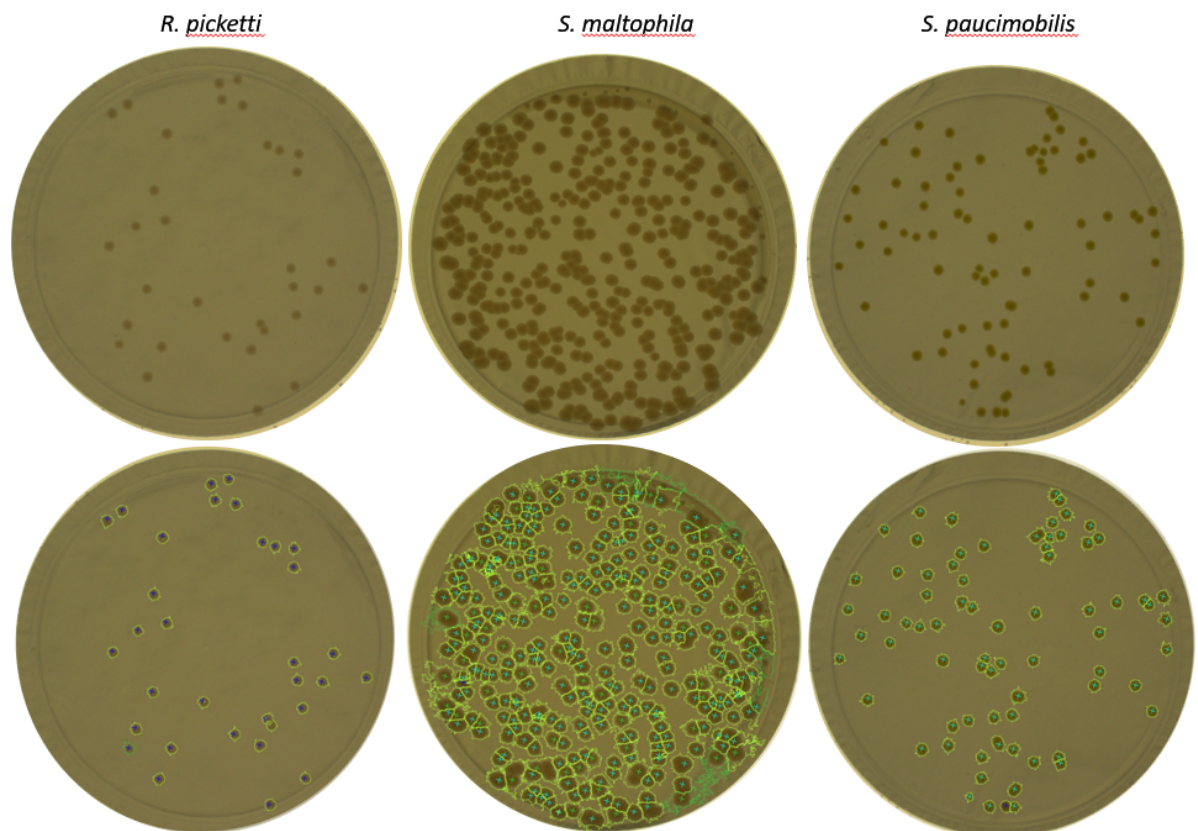


Figure 4. Les photos du bas montrent les images après avoir été traitées par le logiciel pour le dénombrement des UFC (visualisation des croix et de la zone de détection autour des colonies). La configuration de la caméra est "fond blanc".

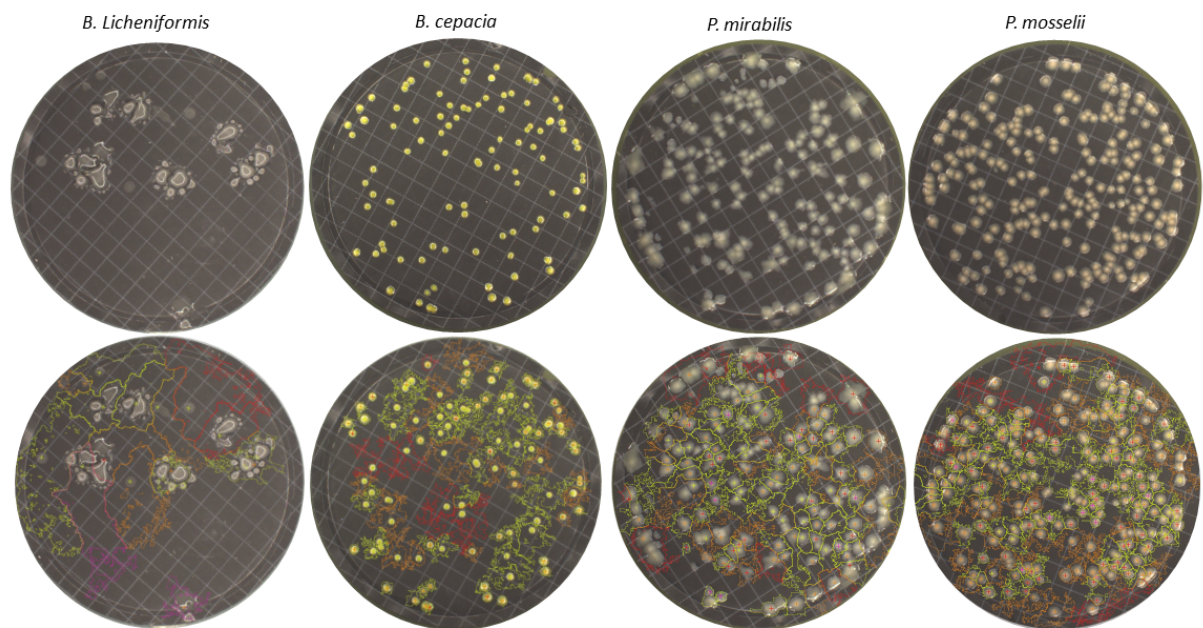


Figure 5. Les photos du haut montrent les images des membranes quadrillées noires prises par ScanStation®. Les photos du bas montrent les images après avoir été traitées par le logiciel pour le dénombrement des UFC (visualisation des croix et de la zone de détection autour des colonies). La configuration de la caméra est "fond noir".

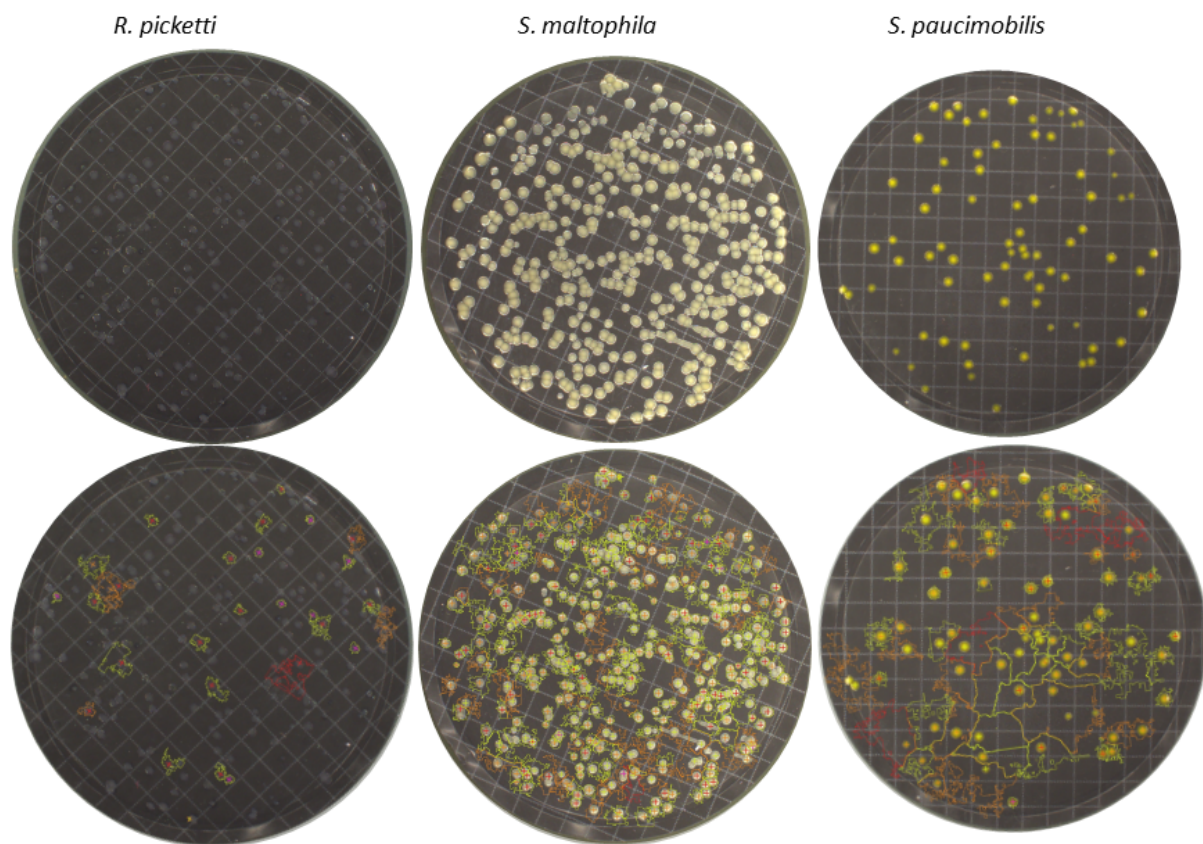


Figure 6. Les photos du haut montrent les images des membranes quadrillées noires prises par ScanStation®. Les photos du bas montrent les images après avoir été traitées par le logiciel pour le dénombrement des UFC (visualisation des croix et de la zone de détection autour des colonies). La configuration de la caméra est "fond noir".

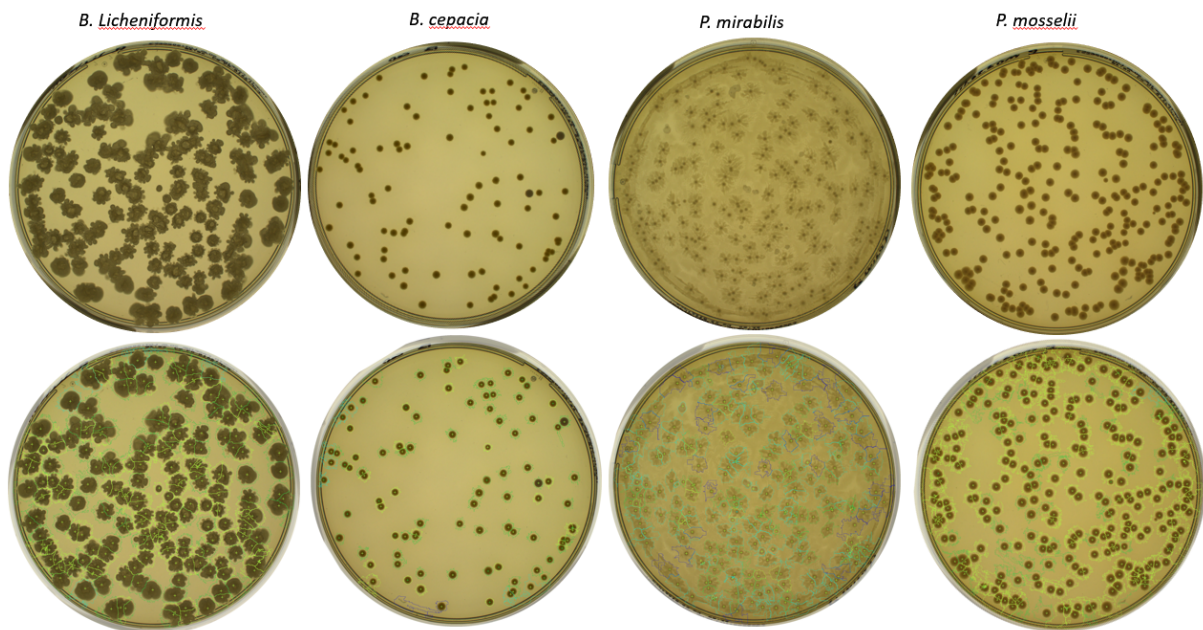


Figure 7. Les photos du haut montrent les images des boîtes de gélose prises par la ScanStation®. Les photos du bas montrent les images après avoir été traitées par le logiciel pour le dénombrement des UFC (visualisation des croix et de la zone de détection autour des colonies). La configuration de la caméra est "fond blanc".

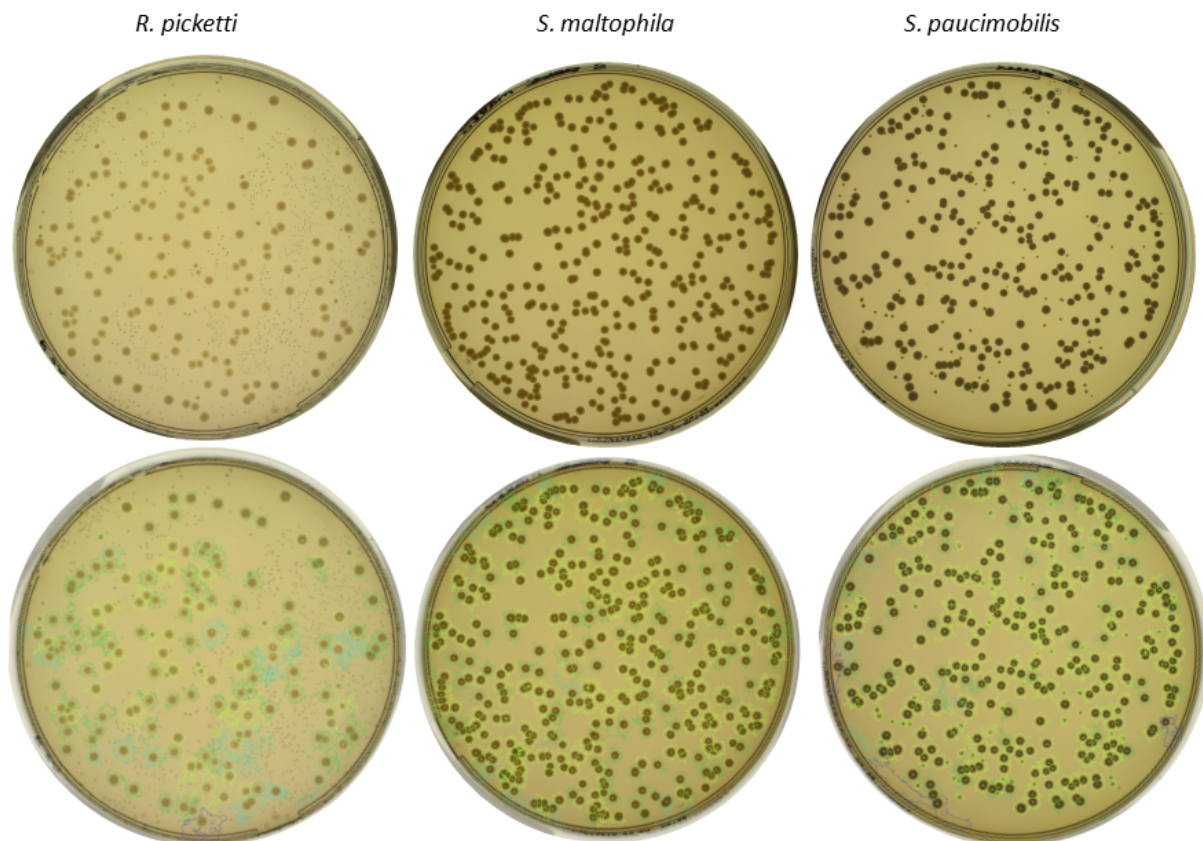


Figure 8. Les photos du haut montrent les images des boîtes de gélose prises par ScanStation®. Les photos du bas montrent les images après avoir été traitées par le logiciel pour le dénombrement des UFC (visualisation des croix et de la zone de détection autour des colonies). La configuration de la caméra est "fond blanc".