

ÉVALUATION DE LA PERFORMANCE DE COMPTAGE DU SCANSTATION SUR MEMBRANE DE FILTRATION

Auteurs : Sylvie Viboud, PhD, INTERSCIENCE, sviboud@interlab15.com
Thomas ALEXANDRE, PhD, INTERSCIENCE, talexandre@interscience.com
Unité : ScanStation® - Logiciel version : 9

Introduction

Le contrôle de l'environnement, est une étape importante du contrôle de la qualité microbiologique dans divers domaines de la production industrielle (pharmaceutique, cosmétique ou alimentaire). Ce contrôle de la qualité comprend l'analyse des surfaces, de l'air et de l'eau. Alors que les tests de surface sont principalement réalisés à l'aide de géloses de contact, les tests de l'air et de l'eau nécessitent l'utilisation de membranes de filtration pour filtrer les microorganismes et révéler leur présence.

L'objectif de cette note applicative est d'évaluer les performances du comptage de colonies sur différents types de membranes de filtration à l'aide de l'incubateur et compteur de colonies en temps réel ScanStation.

Méthodes

Equipement et version du logiciel

Le ScanStation #439300S00156 équipé de la caméra télécentrique UI-337X a été utilisé pour cette étude. Les configurations détaillées pour l'acquisition des images des membranes blanches sont présentées dans le tableau suivant. Les colonies sur membranes blanches ont été dénombrées dans les conditions d'éclairage dites HFBR (pour "Haut Fond Blanc rasant").

	Membrane blanche
Client	8.23, 8.25, 8.26
Serveur	8.28.99, 8.31
Caméra	UI-3371 uEye
Driver	4.93.13.14
DLL de comptage	1.39.00

Souches

Escherichia coli ATCC 8739
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027
Ralstonia pickettii ATCC 27511
Stenotrophomonas maltophilia ATCC 13637
Sphingomonas paucimobilis ATCC 29837
Candida albicans ATCC 10231

Membranes de filtration

- Membrane PVDF (fluorure de polyvinylidène) 0,45 µm Merck Millipore #HVWP047S6,
- Membrane en cellulose MCE (ester mixte de cellulose) 0,45 µm Merck Millipore #HAW04700 (notée MCE_1 dans le rapport),
- Membrane en cellulose MCE 0,45 µm avec grille Merck Millipore #HAW047S6 (noté MCE_2 dans le rapport),
- Membrane en cellulose CA (acétate de cellulose) 0,45 µm Sartorius #11106--47-----N,
- Membrane PES (polyéthersulfone) 0,45 µm Sartorius 15406Z-47---SC.

Protocole

Après filtration, les membranes sont déposées sur boîtes TSA, et sont incubées à 32,5°C pendant 48 heures.

Résultats

Performance de comptage sur membranes blanches

Les tableaux 1 à 6 suivants montrent les résultats synthétiques du comptage ScanStation par rapport au comptage manuel de référence, exprimés en UFC et en pourcentage pour les six souches et les quatre membranes blanches énumérées dans le paragraphe Méthodes.

<i>Escherichia coli</i>				
Numéro de boîte	Membrane	UFC_HFBR	UFC_ref	%
2358	MCE_1	19	22	86
2359	MCE_1	36	37	97
867	MCE_1	20	20	100
868	MCE_1	36	36	100
869	MCE_1	31	29	107
2361	MCE_1	32	33	97
2362	MCE_1	44	51	86
2615	MCE_1	8	8	100
2617	CA	25	26	96
2619	CA	38	40	95
864	PES	29	29	100
865	PES	23	23	100
866	PES	22	22	100
2364	PES	18	22	82
2365	PES	31	47	66
2616	PES	19	17	112
861	PVDF	32	32	100
862	PVDF	24	24	100
863	PVDF	22	23	96
2619	PVDF	23	22	105
2620	PVDF	35	35	100

Tableau 1 : Comparaison et différence de pourcentage entre le comptage ScanStation (UFC_HFBR) et le comptage manuel (UFC_ref) d'*E. coli*. Les cellules vertes indiquent une performance de comptage égale à 100% ± 5.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
Numéro de boîte	Membrane	UFC_HFBR	UFC_ref	%
849	MCE_2	22	23	96
850	MCE_2	20	20	100
851	MCE_2	23	23	100
2597	MCE_2	28	23	122
2682	MCE_2	14	17	82
3336	MCE_2	16	16	100
3337	MCE_2	24	24	100
2600	CA	32	31	103
2601	CA	35	36	97
2684	CA	12	11	109
3340	CA	10	8	125
3341	CA	10	10	100
846	PES	20	20	100
847	PES	19	19	100
2488	PES	22	45	49
2598	PES	21	20	105
2599	PES	29	38	76
2683	PES	11	11	100
3338	PES	19	19	100
3339	PES	10	11	91
841	PVDF	27	27	100
842	PVDF	34	34	100
843	PVDF	28	29	97
2685	PVDF	17	17	100
2686	PVDF	21	22	95
3342	PVDF	20	20	100
3343	PVDF	28	28	100

Tableau 2 : Comparaison et différence de pourcentage entre le comptage de *P. aeruginosa* par ScanStation (UFC_HFBR) et le comptage manuel (UFC_ref). Les cellules vertes indiquent une performance de comptage égale à 100% ± 5.

<i>Ralstonia pickettii</i>				
Numéro de boîte	Membrane	UFC_HFBR	UFC_ref	%
2417	MCE_1	4	4	100
2418	MCE_1	3	3	100
2419	MCE_2	12	12	100
2420	MCE_2	5	5	100
2577	MCE_2	29	32	91
2578	MCE_2	54	56	96
3312	MCE_2	4	4	100
2581	CA	23	31	74
2582	CA	72	77	94
3314	CA	2	2	100
3315	CA	2	4	50
2421	PES	3	5	60
2422	PES	5	5	100
2579	PES	28	30	93
2580	PES	70	79	89
3313	PES	1	3	33
3316	PVDF	3	3	100
3317	PVDF	2	2	100

Tableau 3 : Comparaison et différence de pourcentage entre le comptage ScanStation (UFC_HFBR) et le comptage manuel (UFC_ref) de *R. pickettii*. Les cellules vertes indiquent une performance de comptage égale à 100% ± 5.

<i>Shingomonas paucimobilis</i>				
Numéro de boîte	Membrane	UFC_HFBR	UFC_ref	%
2501	MCE_1	4	4	100
2502	MCE_1	8	8	100
2503	MCE_2	8	8	100
2504	MCE_2	8	8	100
2641	MCE_2	6	6	100
2642	MCE_2	9	7	129
2643	MCE_2	18	18	100
3267	MCE_2	21	22	95
3268	MCE_2	23	24	96
2647	CA	6	6	100
2648	CA	11	11	100
2649	CA	22	22	100
3270	CA	15	15	100
3271	CA	19	19	100
2505	PES	10	10	100
2506	PES	7	7	100
2644	PES	7	7	100
2645	PES	10	10	100
2646	PES	14	15	93
3269	PES	10	10	100
2650	PVDF	11	12	92
2651	PVDF	7	7	100
3272	PVDF	11	11	100
3273	PVDF	22	22	100

Tableau 4 : Comparaison et différence de pourcentage entre le comptage ScanStation (UFC_HFBR) et le comptage manuel (UFC_ref) de *S. paucimobilis*. Les cellules vertes indiquent une performance de comptage égale à 100% ± 5.

Stenotrophomonas maltophilia				
Numéro de boîte	Membrane	UFC_HFBR	UFC_ref	%
2401	MCE_1	26	27	96
2402	MCE_1	20	20	100
858	MCE_2	4	4	100
859	MCE_2	6	6	100
860	MCE_2	5	5	100
2403	MCE_2	19	19	100
2404	MCE_2	21	22	95
3291	MCE_2	26	29	90
3293	CA	17	17	100
3294	CA	34	35	97
3295	CA	22	23	96
855	PES	8	8	100
856	PES	7	7	100
857	PES	8	8	100
2405	PES	27	28	96
2406	PES	23	25	92
3292	PES	22	25	88
852	PVDF	7	7	100
853	PVDF	10	10	100
854	PVDF	6	6	100
3296	PVDF	16	17	94
3297	PVDF	30	30	100

Tableau 5 : Comparaison et différence de pourcentage entre le comptage ScanStation (UFC_HFBR) et le comptage manuel (UFC_ref) de *S. maltophilia*. Les cellules vertes indiquent une performance de comptage égale à 100% ± 5.

Staphylococcus epidermidis				
Numéro de boîte	Membrane	UFC_HFBR	UFC_ref	%
2349	MCE_1	21	21	100
2380	MCE_1	12	12	100
2381	MCE_2	27	27	100
2382	MCE_2	16	18	89
2383	PES	25	27	93
2384	PES	20	25	80

Tableau 6 : Comparaison et différence de pourcentage entre le comptage ScanStation (UFC_HFBR) et le comptage manuel (UFC_ref) de *S. epidermidis*. Les cellules vertes indiquent une performance de comptage égale à 100% ± 5.

La comparaison du comptage ScanStation avec le comptage manuel de référence sur les quatre membranes de filtration blanches est correcte. En effet, dans environ 60% des cas, la performance de comptage du ScanStation est égale à 100% du comptage manuel de référence, incluant tous les types de membranes et toutes les souches testées. De plus, la performance de 100% ± 5 est atteinte dans 73% des cas.

Une analyse plus approfondie détaillée dans le tableau 7 montre que le comptage sur les membranes PES est moins performant que le comptage sur les trois membranes blanches testées.

Membrane	Nombre total de boîtes	Performance 100% ± 5	
		Nombre de cas	Pourcentage de cas
MCE_1	10	9	90
MCE_2	33	24	73
CA	19	14	74
PES	33	18	55
PVDF	23	21	91

Tableau 7 : Nombre de cas (nombre de boîtes) et pourcentage des analyses totales pour lesquels la performance de comptage du ScanStation est égale à 100% ± 5.

De plus, le graphique suivant (figure 1) montre la corrélation résumant tous les comptages manuels et ScanStation effectués sur les quatre types de membranes et les six souches. Le coefficient de corrélation R² est égal à 0,95, ce qui signifie qu'il n'y a pas de variation significative entre la référence manuelle et le comptage ScanStation.

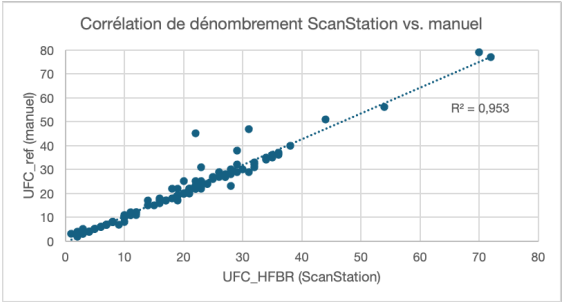


Figure 1 : Graphique de corrélation entre le dénombrement manuel de référence et celui du ScanStation des 113 membranes de filtration blanches analysées dans le cadre de cette étude.

Le tableau 8 montre des exemples de colonies manquantes ou de défauts dans l'analyse des boîtes par ScanStation. La plus faible performance observée (plus de 5% d'erreur par rapport au comptage de référence) est due à la présence de colonies trop proches les unes des autres dans la majorité des cas (ex : boîte numéro 2383). Dans des cas plus rares, les colonies sont comptées plusieurs fois. Un autre défaut dans l'analyse ayant moins d'impact sur le comptage montre un décalage sur le marquage des colonies ou sur l'alignement des membranes (ex : boîte numéro 2383 et 2384).

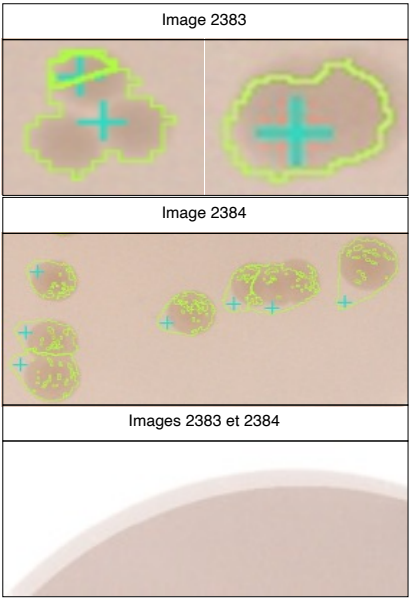


Tableau 8 : Illustrations de quelques cas de comptage avec des « erreurs » ou des « défauts ».

La figure 2 montre un exemple de suivi en temps réel de la croissance de *P. aeruginosa* sur une membrane de filtration.

Conclusion

Les résultats de l'évaluation du dénombrement de colonies par le ScanStation montrent que les colonies sont automatiquement détectées sur les membranes blanches avec une bonne précision.

Le ScanStation dénombre sur les membranes de filtration avec la précision suivante :

- PVDF = 99%.
- MCE = 97% ;
- CA = 91% ;
- PES = 90 %.

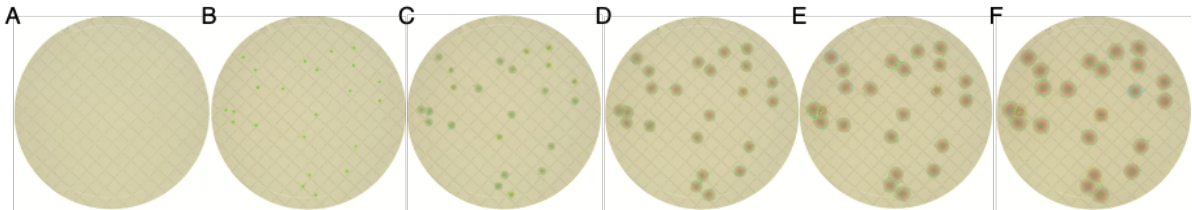


Figure 2 : Photos représentatives de la croissance de *P. aeruginosa* (#851) sur une membrane MCE_2 après (A) 0, (B) 9, (C) 18, (D) 27, (E) 36, et (F) 48 heures d'incubation.