

Recherche de la Thermonucléase ou DNase Thermostable de *St. aureus*

Intérêt: Les souches de *Staphylococcus aureus* entérotoxiques produisent toutes une toxine : l'entérotoxine responsables des troubles; cette toxine, relativement résistante à la chaleur, n'est pas recherchée directement.

Par contre, on recherche une autre enzyme thermostable, la thermonucléase, relativement spécifique de ces *St. aureus* entérotoxiques

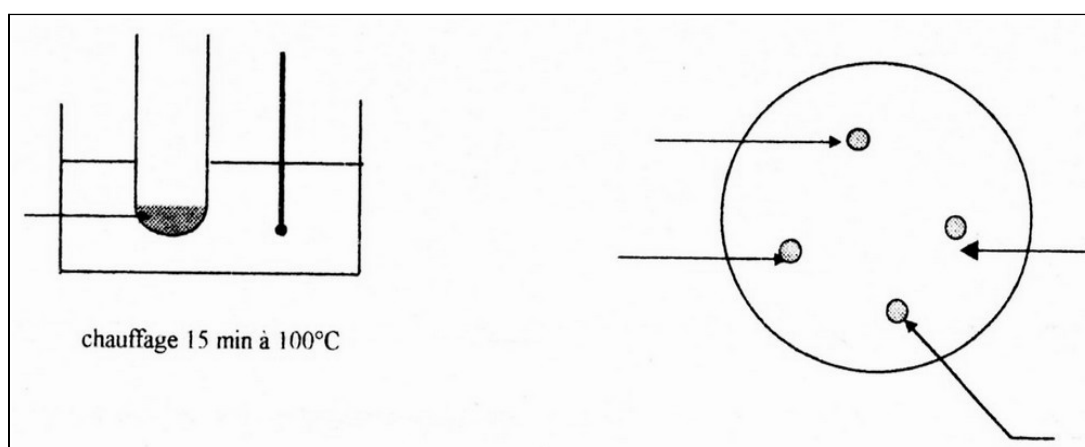
Cette thermonucléase est plus facile à mettre en évidence que l'entérotoxine.

Remarque: la plupart des *Staphylocoques aureus* possèdent une DNase qui n'est pas thermostable (= thermolabile) s'ils ne sont pas entérotoxiques.

Principe: La thermonucléase est une DNase (enzyme hydrolysant l'ADN) qui est thermorésistante, donc résiste à un chauffage à 100°C durant 15 minutes. L'hydrolyse de l'ADN par cette enzyme libère des nucléotides qui sont révélés en rosé par le bleu de toluidine.

Technique: la recherche peut se faire sur une culture en bouillon cœur-cervelle, ou sur l'aliment directement.

1. Destruction des DNases thermosensibles: chauffer une fraction du bouillon cœur-cervelle ensemencé avec la souche à tester au bain marie à 100°C pendant 15 minutes.
2. Préparer 4 cupules dans la gélose ADN-bleu de toluidine coulée en petite boîte.
 - déposer dans la première une goutte du bouillon chauffé
 - dans la deuxième une goutte du bouillon non chauffé
 - la troisième sert de témoin négatif (bouillon cœur-cervelle stérile)
 - la dernière sert de témoin positif (bouillon avec une souche possédant une DNase)
3. Incuber la boîte au moins 4h à 37°C (ou 24h)



Lecture: halo rosé → présence d'une DNase
Vérifier les témoins ; vérifier que la DNase est bien thermostable.

Interprétation: Si activité DNase thermostable, on peut conclure à *Staphylococcus aureus* entérotoxique.

MILIEU DE BAIRD PARKER

| | | | |
|--------------------|-----|---|-------------------|
| peptones | 10g | émulsion de jaune d'œuf | 50cm ³ |
| extrait de viande | 5g | tellurite de potassium | 0,1g |
| extrait de levure | 1g | | |
| pyruvate de sodium | 10g | ajoutés au moment de l'emploi à raison de 1cm ³ pour | |
| glycine | 12g | 20cm ³ de milieu | |
| LiCl | 5g | | |
| agar | 20g | | |

C'est le milieu de choix en microbiologie alimentaire. La base est très riche: jaune d'œuf, glycine, pyruvate.

Ensemencement: pour une recherche ou une numération de *St. aureus*, on étale en surface du milieu 0,1cm³ du produit (pipette râteau stérile).

Lecture: on dénombre les colonies de *St. aureus*, ne pas oublier de ramener ce nombre à 1cm³

Aspect des colonies de Staphylococcus aureus:

Colonies noires (réduction du tellurite et tellure noir)
brillantes, 0,5 à 2mm de diamètre entourées d'un halo clair (protéolyse des protéines de l'œuf)
éventuellement entourées d'une zone de précipitation opaque (précipitation des glycérides obtenus par action de la lécithinase de la bactérie qui hydrolyse la lécithine du jaune d'œuf).

Remarque: d'autres bactéries peuvent donner des aspects identiques: Micrococcus, Bacillus, levures