
Norme internationale



6888

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION • МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ • ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement de *Staphylococcus aureus* — Méthode par comptage des colonies

Microbiology — General guidance for enumeration of Staphylococcus aureus — Colony count technique

Première édition — 1983-05-15

iteh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 6888:1983](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/792787b0-146f-4f5a-bb7f-59db6ce754cd/iso-6888-1983>

CDU 663.1

Réf. n° : ISO 6888-1983 (F)

Descripteurs : produit agricole, produit alimentaire, essai, analyse microbiologique, détermination, staphylocoque.

Prix basé sur 7 pages

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique correspondant. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO, participent également aux travaux.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO.

La Norme internationale ISO 6888 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, et a été soumise aux comités membres en novembre 1981.

Les comités membres des pays suivants l'ont approuvée: [ISO 6888:1983](#)

| | | |
|-------------------------|------------------|-----------------|
| Afrique du Sud, Rép. d' | Hongrie | Sri Lanka |
| Allemagne, R.F. | Inde | Tanzanie |
| Australie | Israël | Tchécoslovaquie |
| Brésil | Italie | Thaïlande |
| Canada | Mexique | Turquie |
| Chili | Nouvelle-Zélande | URSS |
| Égypte, Rép. arabe d' | Pays-Bas | USA |
| Espagne | Pologne | Vénézuéla |
| Éthiopie | Roumanie | Yougoslavie |
| France | Royaume-Uni | |

Le comité membre du pays suivant l'a désapprouvée pour des raisons techniques:

Portugal

Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement de *Staphylococcus aureus* — Méthode par comptage des colonies

0 Introduction

0.1 La présente Norme internationale se propose de fournir des directives générales pour l'examen microbiologique de produits non concernés par les Normes internationales existant actuellement et pour être étudiées par les organismes élaborant des méthodes d'essai microbiologiques de référence destinées à être appliquées à des produits alimentaires ou à des aliments pour animaux. En raison de la grande diversité des produits entrant dans ce domaine d'application, il est possible que ces directives, dans tous leurs détails, ne conviennent pas exactement à certains produits et que, pour certains autres produits, il puisse être nécessaire d'employer des méthodes différentes. Néanmoins, il est à espérer que, dans tous les cas, tous les efforts seront faits pour appliquer chaque fois qu'il sera possible les directives données et qu'on n'aura recours à des dérogations que si cela est absolument nécessaire pour des raisons techniques.

Lorsque la présente Norme internationale sera réexaminée, il sera tenu compte de tous les renseignements disponibles à ce moment-là, à savoir dans quelle mesure les directives auront été suivies et les raisons pour lesquelles il aura été nécessaire d'y déroger dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut pas être immédiate et, pour certains groupes de produits, des Normes internationales et/ou des normes nationales existent peut-être déjà, qui ne concordent pas avec ces directives. Dans le cas où des Normes internationales existent déjà pour le produit à contrôler, elles devront être appliquées, mais il serait souhaitable que, lorsqu'elles viendront en révision, elles soient modifiées de façon à se conformer à la présente Norme internationale si bien que, finalement, les seules divergences restantes seront celles qui auront été nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

0.2 Pour les besoins de la présente Norme internationale, la confirmation de *Staphylococcus aureus* repose sur une réaction fortement positive à la coagulase, mais il est reconnu que certaines souches de *Staphylococcus aureus* donnent une réaction faiblement positive à la coagulase. Ces dernières souches peuvent donc être confondues avec d'autres bactéries; il est possible d'en faire la distinction par des essais complémen-

taires non inclus dans la présente Norme internationale, tels la production de thermonucléase, d'acide à partir de mannitol, d'hémolysine et la sensibilité à la lysostaphine¹⁾.

0.3 Pour des raisons statistiques, il est admis que la limite du nombre de colonies le plus bas à compter par boîte est de 15, mais il est souvent demandé, pour des besoins pratiques, de procéder à un comptage sur des nombres encore inférieurs de *Staphylococcus aureus*. Les limites de confiance de telles déterminations (estimation des petits nombres) sont données en annexe.

1 Objet et domaine d'application

La présente Norme internationale donne des directives générales pour le dénombrement de *Staphylococcus aureus* dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale.

2 Référence

ISO 6887, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.*

3 Définition

Dans le cadre de la présente Norme internationale, la définition suivante est applicable.

Staphylococcus aureus: Micro-organismes formant des colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques à la surface d'un milieu de culture sélectif et donnant une réaction fortement positive à la coagulase.

4 Principe

4.1 Ensemencement en surface d'un milieu sélectif solide, coulé dans deux séries de boîtes, avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit concerné est liquide, ou de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

1) Voir Devriese et alii (1978) *Staphylococcus hyicus* (Sompolinsky 1953) comb. Nov. and *Staphylococcus hyicus* ssp. chromogènes ssp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **28**, pp. 482-490.

Bacteriological Analytical Manual 5th ed. 1978.
US Food and Drug Administration p. XI-4 + 5.

Dans les mêmes conditions, ensemencement des dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

4.2 Incubation de ces boîtes à 35 °C ou à 37 °C durant 24 à 48 h.

4.3 Calcul du nombre de *Staphylococcus aureus* par millilitre ou par gramme d'échantillon, à partir du nombre de colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques obtenues dans des boîtes choisies aux niveaux de dilution donnant un résultat significatif, et confirmées par l'essai de la coagulase.

5 Diluant et milieux de culture

5.1 Composants de base

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation du diluant et des milieux de culture, des composants de base déshydratés ou des milieux complets déshydratés et, pour l'émulsion du jaune d'œuf, une préparation commerciale. Les instructions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques utilisés doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déminéralisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus* dans les conditions de l'essai.

Si le diluant et les milieux de culture ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent être conservés à l'obscurité entre 0 et +5 °C, dans des conditions évitant toute modification de leur composition.

5.2 Diluant

Voir l'ISO 6887 et la norme spécifique du produit à examiner.

5.3 Milieu gélosé¹⁾

5.3.1 Milieu de base

Composition

| | |
|--------------------------------------|---------------------------|
| tryptone | 10,0 g |
| extrait de levure | 1,0 g |
| extrait de viande | 5,0 g |
| glycine | 12,0 g |
| chlorure de lithium | 5,0 g |
| agar-agar | 12 à 20,0 g ²⁾ |
| eau | 1 000 ml |
| et, si nécessaire : | |
| solution de sulfamézathine (5.3.2.2) | 27,5 ml |

1) Le milieu gélosé est celui de Baird-Parker, *J. Appl. Bacteriol.* **25** (1962) 12, avec addition de sulfamézathine [voir Smith et Baird-Parker, *ibid.* **27** (1964) 78] dans le cas où l'on suspecte la présence de *Proteus*.

2) Selon les instructions du fabricant.

3) Il est recommandé de s'assurer au préalable que le tellurite de potassium dont on dispose convient pour cet essai.

Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu gélosé complet dans l'eau, en portant à ébullition.

Si nécessaire, ajouter les 27,5 ml de la solution de sulfamézathine (sulfadimidine, INN) (5.3.2.2).

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,2 à 25 °C.

Répartir le milieu, par quantités de 90 ml, dans des flacons de 300 ml de capacité maximale.

Stériliser le milieu à 121 °C durant 15 min.

Le milieu peut être conservé 1 mois entre 0 et +5 °C.

5.3.2 Solutions

5.3.2.1 Solution de tellurite

Composition

| | |
|--|--------|
| tellurite de potassium ³⁾ (trioxotellurate dipotassique) | 1,0 g |
| eau | 100 ml |

Préparation

Dissoudre le tellurite de potassium dans l'eau, en chauffant le moins possible.

Stériliser par filtration.

La solution peut être conservée plusieurs mois entre 0 et +5 °C.

5.3.2.2 Solution de sulfamézathine (sulfadimidine, INN) (seulement dans le cas où l'on suspecte la présence de *Proteus*)

Composition

| | |
|--|--------|
| sulfamézathine | 0,2 g |
| solution d'hydroxyde de sodium, c(NaOH) = 0,1 mol/l | 10 ml |
| eau, quantité suffisante pour | 100 ml |

Préparation

Dissoudre la sulfamézathine dans la solution d'hydroxyde de sodium.

Compléter à 100 ml avec de l'eau.

5.3.2.3 Solution de pyruvate de sodium

Composition

| | |
|--------------------|--------|
| pyruvate de sodium | 20,0 g |
| eau | 100 ml |

Préparation

Dissoudre le pyruvate de sodium dans une partie de l'eau.

Compléter au volume final.

Stériliser par filtration.

La solution peut être conservée un mois au maximum entre 0 et +5 °C.

5.3.2.4 Émulsion de jaune d'œuf (à une concentration d'environ 20 %¹⁾)**Préparation** (à défaut de préparation commerciale)

Utiliser des œufs frais de poule et séparer les jaunes des blancs.

Bien mélanger les jaunes avec quatre fois leur volume d'eau.

Chauffer le mélange dans le bain d'eau (6.9) réglé à 45 ± 0,5 °C durant 2 h et entreposer entre 0 et +5 °C durant 18 à 24 h pour laisser se former un précipité.

Laisser décanter et stériliser le liquide surnageant par filtration, sauf si l'émulsion a été séparée aseptiquement.

L'émulsion peut être conservée 72 h au maximum entre 0 et +5 °C.

5.3.3 Milieu complet**Composition**

| | |
|--|--------|
| milieu de base (5.3.1) | 90 ml |
| solution de tellurite de potassium (5.3.2.1) | 1,0 ml |
| solution de pyruvate de sodium (5.3.2.3) | 5,0 ml |
| émulsion de jaune d'œuf (5.3.2.4) | 5,0 ml |

Préparation

Faire fondre le milieu de base, puis le refroidir à environ 50 °C au moyen du bain d'eau (6.10).

Ajouter les autres liquides, en mélangeant soigneusement après chaque addition.

5.3.4 Préparation des boîtes de milieu gélosé

Couler 15 à 20 ml du milieu complet (5.3.3), refroidi à environ 45 °C, dans des boîtes de Petri stériles et laisser se solidifier.

Les boîtes peuvent être conservées, avant séchage, 24 h au maximum entre 0 et +5 °C.

Sécher les boîtes, de préférence couvercle enlevé et surface de la gélose tournée vers le bas, dans une étuve ou un incubateur (6.3) réglé à 50 ± 1 °C, durant 30 min.

1) Selon les instructions du fabricant.

2) Le plasma oxalaté ou heparinisé ne demande pas d'EDTA (Voir Baird-Parker, A.C. *The Staphylococci*, 1972, p. 11, ed. Cohen, J.O. Wiley-Interscience and Sons. Inc. New York, London).

3) Acide éthylène-diamine tétraacétique.

5.4 Bouillon cœur-cervelle**Composition**

| | |
|---|----------|
| peptone | 10,0 g |
| extrait déshydraté de cervelle de veau | 12,5 g |
| extrait déshydraté de cœur de bœuf | 5,0 g |
| glucose | 2,0 g |
| chlorure de sodium | 5,0 g |
| hydrogène-orthophosphate disodique (Na ₂ HPO ₄) | 2,5 g |
| eau | 1 000 ml |

Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet dans l'eau, en portant à ébullition.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,4 à 25 °C.

Répartir le milieu de culture, par quantités de 10 ml, dans des tubes.

Stériliser le milieu à 121 °C durant 20 min.

Le milieu peut être conservé plusieurs mois entre 0 et +5 °C.

5.5 Plasma de lapin²⁾

Utiliser un plasma déshydraté de lapin, disponible dans le commerce, et le réhydrater en se conformant aux instructions du fabricant. Ajouter une solution d'EDTA³⁾ de manière à avoir 0,1 % d'EDTA dans le plasma réhydraté.

Si l'on ne peut se procurer du plasma de lapin déshydraté, diluer un plasma de lapin frais et stérile à 1 + 3 avec de l'eau stérile.

Avant utilisation, contrôler chaque lot de plasma avec des souches de *Staphylococcus aureus* faiblement et fortement positives ainsi qu'avec des souches de staphylocoques coagulase négative.

6 Appareillage et verrerie

NOTE — Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont convenables.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment:

6.1 Appareil pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave) (autoclave autonome ou faisant partie d'un appareillage, pour préparer et répartir les milieux).

Le matériel destiné à entrer en contact avec le diluant, les milieux de culture et l'échantillon, sauf s'il est livré stérile (particulièrement le matériel en plastique), doit être stérilisé par l'une des méthodes suivantes :

- a) au four, en le maintenant à une température de 170 à 175 °C durant au moins 1 h ;
- b) à l'autoclave, en le maintenant à une température de 121 ± 1 °C durant au moins 20 min.

6.2 Étuve, réglable à 35 ± 1 °C ou à 37 ± 1 °C.

6.3 Enceinte de séchage, étuve ou incubateur, ventilé(e) (permettant de sécher la surface du milieu gélosé coulé en boîte), réglable à 50 ± 1 °C.

6.4 Tubes, de ϕ 18 mm × 180 mm, et **flacons de culture**, de 125 à 300 ml de capacité, pour la stérilisation et la conservation des milieux de culture.

Des tubes de ϕ 10 mm × 75 mm sont également nécessaires pour la recherche de la coagulase.

6.5 Boîtes de Petri, en verre ou en plastique, d'un diamètre de 90 à 100 mm ou 140 mm si nécessaire.

6.6 Pipettes à écoulement total (pipettes à souffler), de 1 ml de capacité nominale.

6.7 Pipettes, étalonnées spécialement pour l'usage bactériologique, de 1 ml de capacité nominale, graduées en 0,1 ml et dont l'orifice d'écoulement a un diamètre de 2 à 3 mm.

6.8 Étalons en verre (type crosses de hockey), fabriqués avec des baguettes de verre, d'environ 3,5 mm de diamètre et 20 cm de longueur par exemple, coudées à angle droit à environ 3 cm de l'une de leurs extrémités ; les extrémités coupées doivent être polies par chauffage.

6.9 Bain d'eau, ou équipement similaire, réglable à 45 ± 0,5 °C.

6.10 Bain d'eau, ou équipement similaire, réglable à 50 ± 0,5 °C.

6.11 pH-mètre, précis à ± 0,1 unité de pH à 25 °C.

7 Échantillonnage

Effectuer l'échantillonnage conformément à la norme spécifique du produit concerné. S'il n'y a pas de norme spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Voir la norme spécifique du produit concerné. S'il n'y a pas de norme spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

9 Mode opératoire

NOTE — Dans le cas où les échantillons sont fortement contaminés, il est recommandé de pratiquer au préalable un examen microscopique direct.

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Voir ISO 6887 et la norme spécifique du produit concerné.

9.2 Ensemencement

9.2.1 Transférer, avec une pipette stérile, 2 fois 0,1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide ou 0,1 ml de la suspension mère (dilution 10⁻¹) pour les autres produits, à la surface de deux boîtes de milieu gélosé (5.3.4), respectivement. Répéter l'opération avec la dilution 10⁻² et les dilutions suivantes si nécessaire.

NOTE — S'il est souhaitable pour certains produits de procéder à des dénombrements de petits nombres de *Staphylococcus aureus*, les limites de la recherche peuvent être augmentées d'une puissance de 10, en ensemençant 1,0 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide, ou 1,0 ml de la suspension mère pour les autres produits. Répartir l'inoculum, soit à la surface d'une grande boîte (140 mm) de milieu gélosé, soit à la surface de trois petites boîtes (90 mm) de milieu gélosé. Dans les deux cas, effectuer ces opérations en double, de façon à avoir deux grandes boîtes ou six petites boîtes.

9.2.2 Étaler soigneusement l'inoculum le plus rapidement possible à la surface du milieu gélosé en essayant de ne pas toucher les bords de la boîte avec l'étaleur en verre (6.8). Utiliser un étaleur en verre stérile pour chaque boîte. Laisser sécher les boîtes avec leur couvercle durant environ 15 min à la température ambiante.

9.3 Incubation

Retourner les boîtes préparées selon 9.2.2 et les faire incuber durant 24 à 48 h dans l'étuve (6.2) réglée à 35 ± 1 °C ou à 37 ± 1 °C.

9.4 Sélection des boîtes et interprétation

Après 24 à 26 h d'incubation, marquer sur le fond des boîtes les colonies caractéristiques éventuellement présentes (voir note 1).

Incuber à nouveau toutes les boîtes à 35 ± 1 °C ou à 37 ± 1 °C durant 22 à 24 h supplémentaires, et marquer les nouvelles colonies caractéristiques ; marquer également les colonies non caractéristiques éventuellement présentes (voir note 1).

Ne retenir pour le dénombrement que les boîtes (9.2.1 et 9.4 ; voir note 2) renfermant entre 15 et 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques (voir note 3). Choisir, en vue de la confirmation (9.5), 5 colonies caractéristiques et/ou 5 colonies non caractéristiques selon le cas, à partir de chaque boîte.

S'il y a moins de 15 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques sur les boîtes ensemencées avec le produit liquide non dilué ou avec la dilution la plus faible pour les autres produits, il est possible de faire une estimation comme décrit dans la note 4 et en 10.6.

NOTES

1 Les colonies caractéristiques sont noires, brillantes et convexes (1 à 1,5 mm de diamètre après 24 h d'incubation et 1,5 à 2,5 mm de diamètre après 48 h d'incubation) et entourées d'une zone claire qui peut être partiellement opaque. Après 24 h d'incubation, peut apparaître dans cette zone claire un anneau opalescent immédiatement au contact des colonies.

Les colonies non caractéristiques sont semblables en apparence, mais sont dépourvues de zone claire. Les colonies non caractéristiques sont souvent constituées de souches de *Staphylococcus aureus* contaminant les produits laitiers. Elles ne sont pas produites, fréquemment, par les souches de *Staphylococcus aureus* qui contaminent les autres produits.

2 Si l'on étale 1,0 ml d'inoculum en le répartissant sur trois boîtes (voir la note de 9.2.1), effectuer les opérations de dénombrement et de confirmation sur l'ensemble de ces boîtes comme s'il s'agissait d'une seule boîte.

3 Si un type de colonie prédomine à une dilution et l'autre type prédomine à une dilution différente, retenir les boîtes des deux dilutions en vue de la sélection des colonies des deux types.

4 Pour faire une estimation des petits nombres de *Staphylococcus aureus* (voir 0.3), retenir toutes les boîtes qui contiennent des colonies caractéristiques et non caractéristiques. Retenir toutes ces colonies en vue de la confirmation sans sortir des limites fixées ci-dessus.

9.5 Confirmation (recherche de la coagulase)

À l'aide d'un fil stérile, prélever une partie de chaque colonie sélectionnée (9.4) et l'ensemencer dans un tube de bouillon cœur-cervelle (5.4). Faire incuber à 35 °C ou à 37 °C durant 20 à 24 h.

Ajouter stérilement 0,1 ml de chaque culture à 0,3 ml de plasma de lapin (5.5) (à moins que d'autres quantités soient spécifiées par le fabricant) dans des tubes stériles de ϕ 10 mm \times 75 mm et incuber à 35 °C ou à 37 °C.

Examiner la coagulation du plasma après 4 à 6 h.

Considérer que la réaction à la coagulase est positive quand le coagulum occupe plus des trois quarts du volume initialement occupé par le liquide.

À titre de contrôle, ajouter 0,1 ml de bouillon cœur-cervelle stérile (5.4) à la quantité recommandée de plasma de lapin (5.5) et faire incuber sans ensemencement. Pour que la réaction soit valable, le plasma du tube témoin ne devra pas montrer de signes de coagulation.

10 Expression des résultats

10.1 Mode de calcul

Voir les notes de 9.4.

10.1.1 Si au moins 80 % des colonies sélectionnées sont coagulase positive (9.5), prendre comme nombre de *Staphylococcus aureus* le nombre présumé donné par le comptage fait en 9.4.

10.1.2 Dans tous les autres cas, calculer le nombre à partir du pourcentage de *Staphylococcus aureus* présumés (9.4) qui sont coagulase positive (9.5).

10.1.3 Pour les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques pour deux dilutions consécutives, calculer le nombre de *Staphylococcus aureus* pour chaque dilution tel qu'il est indiqué en 10.1.1 et 10.1.2 et faire la moyenne arithmétique des deux valeurs obtenues, à moins que le rapport de la valeur la plus forte à la valeur la plus faible soit supérieur à 2; dans ce cas, retenir comme résultat la valeur la plus faible.

10.1.4 Calculer le nombre moyen de *Staphylococcus aureus* avec les résultats obtenus sur les deux séries de boîtes (10.1.1 et 10.1.2) ou avec deux dilutions consécutives dans le cas de 10.1.3.

Si, sur les boîtes obtenues pour le dénombrement, il y a présence de colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques, compter séparément ces colonies.

Additionner la moyenne de *Staphylococcus aureus* obtenue à partir des colonies caractéristiques et non caractéristiques, en prenant en considération pour chacune le facteur de dilution.

Ne retenir ensuite que deux chiffres significatifs, en opérant de la façon suivante:

— si le nombre est inférieur à 100, l'arrondir au plus proche multiple de 5;

— si le nombre est supérieur à 100 et se termine par un 5, l'arrondir au plus proche multiple de 20;

— si le nombre est supérieur à 100 et ne se termine pas par un 5, l'arrondir au plus proche multiple de 10.

Multiplier cette valeur par l'inverse du volume d'inoculum (voir note 2 de 9.4) et ensuite par l'inverse du taux de dilution de l'échantillon pour essai afin d'obtenir le nombre de *Staphylococcus aureus* par millilitre ou par gramme de produit selon le cas.

Exprimer le résultat par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^n , où n est la puissance appropriée. Un exemple de calcul est présenté en 10.2.

10.1.5 Pour une estimation des petits nombres, faire une moyenne à partir du nombre de colonies confirmées caractéristiques et non caractéristiques (9.4) et l'arrondir au nombre entier supérieur le plus proche.

10.1.6 Si le nombre moyen de colonies confirmées, tel qu'il est calculé en 10.1.4, est inférieur à 15 pour les boîtes ensemencées à partir de l'échantillon pour essai (produit liquide) ou de la suspension mère (autres produits), donner le résultat sous la forme:

a) pour les produits liquides:

— moins de $15 \times n_e$ *Staphylococcus aureus* par millilitre, où n_e est l'inverse de volume d'inoculum:

$$n_e = \frac{1}{\text{volume d'inoculum}}$$

b) pour les autres produits:

— moins de $15 \times N_e$ *Staphylococcus aureus* par gramme, où

$$N_e = \frac{1}{\text{volume d'inoculum}} \times \frac{1}{\text{dilution de l'échantillon pour essai}}$$

c) pour l'estimation des petits nombres dans les produits liquides:

$m \times n_e$ *Staphylococcus aureus* par millilitre

où m est le nombre moyen de colonies confirmées;

d) pour l'estimation des petits nombres dans les autres produits:

$m \times N_e$ *Staphylococcus aureus* par gramme

où m est le nombre moyen de colonies confirmées.

Les limites de confiance des estimations de petits nombres [c) et d)] sont données en annexe.

10.1.7 S'il n'y a aucune colonie confirmée au niveau de l'échantillon pour essai (produit liquide) ou de la suspension mère (autres produits), donner le résultat sous la forme:

a) pour les produits liquides:

— moins de $1 \times n_e$ *Staphylococcus aureus* par millilitre

b) pour les autres produits:

— moins de $1 \times N_e$ *Staphylococcus aureus* par gramme

10.2 Exemple de calcul pour le dénombrement par comptage de *Staphylococcus aureus*

Pour cet exemple, 0,1 ml d'inoculum de la dilution 10^{-2} de l'échantillon donne 65 et 85 colonies caractéristiques sur chaque boîte (9.4).

Aucune colonie non caractéristique n'a été identifiée sur ces boîtes.

Les 5 colonies choisies à partir de la boîte contenant 65 colonies sont coagulase positive (9.5) et, par conséquent, on considère que les 65 colonies sont des colonies de *Staphylococcus aureus*.

Trois colonies sur les 5 choisies à partir de la boîte contenant les 85 colonies sont coagulase positive et, par conséquent, on considère que 60 % des 85 colonies, soit 51 colonies, sont des colonies de *Staphylococcus aureus*.

Le nombre moyen (10.1.4) est

$$\frac{65 + 51}{2} = 58 \text{ *Staphylococcus aureus*}$$

Le nombre total (colonies caractéristiques + colonies non caractéristiques) est

$$58 + 0 = 58 \text{ (10.1.5)}$$

On arrondit le chiffre 58 au plus proche multiple de 5, soit: 60.

Le nombre de *Staphylococcus aureus* par gramme ou par millilitre est

$$\text{nombre} \times \frac{1}{\text{volume d'inoculum}} \times \frac{1}{\text{dilution de l'échantillon pour essai}}$$

iteh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai) ISO 6888:1983 https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sis/92787b01-146f-45a-bb7f-59db6ce754cd/iso-6888-1983

$$\begin{aligned} &= 60 \times \frac{1}{0,1} \times \frac{1}{10^{-2}} \\ &= 60 \times 10 \times 10^2 \\ &= 60 \times 10^3 \\ &= 6,0 \times 10^4 \text{ *Staphylococcus aureus* par gramme ou par millilitre} \end{aligned}$$

10.3 Précision du dénombrement (10.1.4)

Pour des raisons statistiques, dans 95 % des cas les limites de confiance de ces méthodes varient de $\pm 16\%$ à $\pm 52\%$.¹⁾ En pratique, des variations plus importantes encore peuvent être observées et, en particulier, entre les résultats obtenus par différents microbiologistes.

11 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée, la température d'incubation et les résultats obtenus. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le procès-verbal d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

1) Voir Cowell et Morisetti (1969), *J. Sci. Fd. Agric.* 20, p. 573.