
**Microbiologie des aliments — Méthode
horizontale pour le dénombrement des
staphylocoques à coagulase positive
(*Staphylococcus aureus* et autres
espèces) —**

Partie 1:
**Technique utilisant le milieu gélosé
de Baird-Parker**

[ISO 6888-1:1999](https://standards.iteh.ai/standards/ISO/6888-1:1999)

<https://standards.iteh.ai/standards/ISO/6888-1:1999> *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) —*

Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium



Sommaire

1	Domaine d'application	1
2	Références normatives	1
3	Termes et définitions.....	1
4	Principe.....	2
5	Diluant et milieux de culture.....	2
6	Appareillage et verrerie	5
7	Échantillonnage	6
8	Préparation de l'échantillon pour essai.....	6
9	Mode opératoire	6
10	Expression des résultats	8
11	Fidélité	10
12	Rapport d'essai	10
	Bibliographie.....	11

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 6888-1:1999](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/732508bb-15eb-42a8-b357-a49ac6fa0fba/iso-6888-1-1999)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/732508bb-15eb-42a8-b357-a49ac6fa0fba/iso-6888-1-1999>

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 en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 3.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 6888-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

Cette première édition de l'ISO 6888-1, ensemble avec l'ISO 6888-2, annule et remplace l'ISO 6888:1983 qui a fait l'objet d'une révision technique.

L'ISO 6888 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (Staphylococcus aureus et autres espèces)*:

- *Partie 1: Technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker*
- *Partie 2: Technique utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène*

0 Introduction

0.1 En raison de la grande diversité des produits alimentaires, il est possible que cette méthode horizontale ne soit pas applicable dans tous ses détails à certains d'entre eux. Dans ce cas, des méthodes différentes, spécifiques à ces produits, pourront être utilisées si cela s'avère absolument nécessaire pour des raisons techniques justifiées. Néanmoins, il convient que tous les efforts soient faits pour appliquer cette méthode horizontale chaque fois que possible.

Lors du prochain réexamen périodique de la présente partie de l'ISO 6888, il sera tenu compte de toutes les évolutions intervenues depuis sa publication et, notamment, dans quelle mesure cette méthode horizontale aura été suivie ainsi que les raisons des dérogations dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation de toutes les méthodes d'essai ne peut être réalisée de façon immédiate; de ce fait, il peut déjà exister des Normes internationales et/ou nationales pour certains groupes de produits, qui ne concordent pas avec la présente méthode horizontale. Lorsque de telles normes viendront en révision, il serait souhaitable de les aligner avec les prescriptions de la présente partie de l'ISO 6888 et de ne conserver que les seules divergences justifiées indispensables pour des raisons techniques.

0.2 L'ISO 6888 décrit deux méthodes horizontales (partie 1 et partie 2) pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive, parmi lesquels se rencontrent les souches entérotoxigènes. Il s'agit principalement de *Staphylococcus aureus*, mais également de *S. intermedius* et de certaines souches de *S. hyicus*.

Dans le cas général, utiliser la partie 1 de l'ISO 6888. Cependant, il est préférable d'utiliser le mode opératoire décrit dans la partie 2 (voir la référence [1]) uniquement pour les denrées alimentaires (telles que les fromages au lait cru et certains produits carnés crus) susceptibles d'être contaminées par

- des staphylocoques formant des colonies non caractéristiques sur milieu gélosé de Baird-Parker;
- une flore annexe pouvant masquer les colonies recherchées.

0.3 Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 6888, la confirmation des staphylocoques repose sur une réaction 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 être confondues avec d'autres bactéries; il est possible d'en faire la distinction par des essais complémentaires non inclus dans la présente partie de l'ISO 6888, telles la sensibilité à la lysostaphine, la production d'hémolysine, de nucléase thermostable et d'acide à partir de mannitol (voir la référence [2]).

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces) —

Partie 1:

Technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 6888 spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, par comptage des colonies obtenues sur milieu solide (milieu de Baird-Parker) après incubation en aérobiose à 35 °C ou 37 °C.

2 Références normatives

Les documents normatifs suivants contiennent des dispositions qui par suite de la référence qui y est faite, constituent des dispositions valables pour la présente partie de l'ISO 6888. Pour les références datées, les amendements ultérieurs ou les révisions de ces publications ne s'appliquent pas. Toutefois, les parties prenantes aux accords fondés sur la présente partie de l'ISO 6888 sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des documents normatifs indiqués ci-après. Pour les références non datées, la dernière édition du document normatif en référence s'applique. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 6887-1, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.*

ISO 7218, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques.*

3 Termes et définitions

Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 6888, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1

staphylocoques à coagulase positive

bactéries formant des colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques à la surface d'un milieu de culture sélectif et donnant une réaction positive à la coagulase, lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 6888

3.2

dénombrement des staphylocoques à coagulase positive

détermination du nombre de staphylocoques à coagulase positive trouvé par millilitre ou par gramme d'échantillon, lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 6888

4 Principe

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

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

4.2 Incubation de ces boîtes à 35 °C ou à 37 °C ¹⁾ en aérobiose et examen après 24 h et 48 h.

4.3 Calcul du nombre de staphylocoques à coagulase positive par millilitre ou par gramme d'échantillon, à partir du nombre de colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques obtenues dans les boîtes retenues aux niveaux de dilution donnant un résultat significatif, et confirmées par un résultat positif de l'essai de la coagulase.

5 Diluant et milieux de culture

5.1 Généralités

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir l'ISO 7218.

5.2 Diluant

Voir l'ISO 6887-1 et la norme spécifique du produit à examiner.

5.3 Milieu gélosé de Baird-Parker²⁾ (standards.iteh.ai)

NOTE Des milieux commercialisés peuvent être utilisés. Dans ce cas, il convient de se conformer strictement aux prescriptions du fabricant.

[ISO 6888-1:1999](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/732508bb-15eb-42a8-b357-a49ac6fa0fba/iso-6888-1-1999)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/732508bb-15eb-42a8-b357-a49ac6fa0fba/iso-6888-1-1999>

5.3.1 Milieu de base

5.3.1.1 Composition

Digestat pancréatique de caséine	10,0 g
Extrait de levure	1,0 g
Extrait de viande	5,0 g
Pyruvate de sodium	10,0 g
L-Glycine	12,0 g
Chlorure de lithium	5,0 g
Agar-agar	12 g à 22 g ^a
Eau, pour obtenir un volume final de	1 000 ml

^a Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

1) La température fait l'objet d'un accord entre les parties intéressées et est indiquée dans le rapport d'essai.

2) Le milieu gélosé est celui de Baird-Parker (voir la référence [3]) avec addition de sulfamézathine (voir la référence [4]) dans le cas où l'on suspecte la présence de *Proteus*.

5.3.1.2 Préparation

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

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,2 \pm 0,2$ à 25 °C .

Répartir le milieu, par quantités de 100 ml, dans des flacons ou fioles (6.5) de capacité appropriée.

Stériliser le milieu à 121 °C pendant 15 min.

5.3.2 Solutions

5.3.2.1 Solution de tellurite de potassium

5.3.2.1.1 Composition

Tellurite de potassium ^a (K_2TeO_3)	1,0 g
Eau	100 ml
^a Il est recommandé de s'assurer au préalable que le tellurite de potassium dont on dispose convient pour cet essai (voir 5.3.2.1.2).	

5.3.2.1.2 Préparation

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

Il convient que la poudre soit rapidement soluble. Si un composé blanc insoluble est présent dans l'eau, ne pas retenir la poudre.

Stériliser par filtration sur des membranes de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ de porosité.

La solution peut être conservée au maximum 1 mois à $+3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

Éliminer la solution si un précipité blanc se forme.

5.3.2.2 Émulsion de jaune d'œuf (à une concentration d'environ 20 % ou selon les instructions du fabricant)

NOTE Si une préparation commerciale est disponible, il convient de l'utiliser.

Utiliser des œufs frais de poule à coquille intacte. Nettoyer les œufs avec une brosse à l'aide d'un détergent liquide. Les rincer à l'eau courante puis désinfecter les coquilles, soit en les plongeant dans l'éthanol à 70 % (fraction volumique) pendant 30 s et les laissant sécher à l'air, soit en les pulvérisant d'alcool suivi de flambage.

En opérant de façon aseptique, casser chaque œuf et séparer le jaune du blanc par transferts répétés du jaune d'une demi-coquille dans l'autre. Placer les jaunes dans un flacon stérile (6.5) et ajouter quatre fois leur volume d'eau stérile. Mélanger vigoureusement. Chauffer le mélange dans le bain d'eau (6.4) réglé à 47 °C pendant 2 h et entreposer à $+3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ pendant 18 h à 24 h pour laisser se former un précipité. Recueillir aseptiquement le liquide surnageant dans un flacon récemment stérilisé pour l'utilisation.

L'émulsion peut être conservée 72 h au maximum à $+3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

5.3.2.3 Solution de sulfamézathine (sulfaméthazine, sulfadimidine)

NOTE À être utilisée seulement dans le cas où l'on suspecte la présence d'espèces de *Proteus* dans l'échantillon pour essai.

5.3.2.3.1 Composition

Sulfamézathine	0,2 g
Solution d'hydroxyde de sodium, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$	10 ml
Eau	90 ml

5.3.2.3.2 Préparation

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

Compléter à 100 ml avec de l'eau.

Stériliser par filtration sur des membranes de $0,22 \mu\text{m}$ de porosité.

La solution peut être conservée au maximum 1 mois à $+3 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$.

5.3.3 Milieu complet

5.3.3.1 Composition

Milieu de base (5.3.1)	100 ml
Solution de tellurite de potassium (5.3.2.1)	1,0 ml
Émulsion de jaune d'œuf (5.3.2.2)	5,0 ml
Solution de sulfamézathine (5.3.2.3) (si nécessaire)	2,5 ml

5.3.3.2 Préparation

Faire fondre le milieu de base, puis le refroidir à environ 47 °C au moyen du bain d'eau (6.4).

Ajouter, de façon aseptique, les deux autres solutions (5.3.2.1 et 5.3.2.2) et, si nécessaire (si l'on suspecte la présence d'espèces de *Proteus* dans l'échantillon pour essai), la solution de sulfamézathine (5.3.2.3), chaque solution étant préalablement réchauffée au bain d'eau à 47 °C , en mélangeant soigneusement après chaque addition.

5.3.4 Préparation des boîtes de milieu gélosé

Couler la quantité nécessaire du milieu complet (5.3.3), dans des boîtes de Petri stériles de façon à obtenir une épaisseur de gélose d'environ 4 mm, et laisser se solidifier.

Les boîtes peuvent être conservées, avant séchage, 24 h au maximum à $+3 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$.

NOTE Pour la durée de conservation de boîtes préparées industriellement, il convient de suivre les instructions du fabricant.

Avant utilisation, sécher les boîtes, de préférence avec le couvercle enlevé, et avec la surface de la gélose tournée vers le bas, dans une étuve réglée entre 25 °C et 50 °C , jusqu'à disparition des gouttelettes à la surface du milieu.

5.4 Bouillon cœur-cervelle

5.4.1 Composition

Digestat enzymatique de tissus animaux	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
Hydrogénorthophosphate disodique anhydre (Na ₂ HPO ₄)	2,5 g
Eau	1 000 ml

5.4.2 Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,4 \pm 0,2$ à 25 °C.

Répartir le milieu de culture, par quantités de 5 ml à 10 ml, dans des tubes ou fioles (6.5) de capacité appropriée.

Stériliser le milieu à 121 °C pendant 15 min.

5.5 Plasma de lapin

iTeh STANDARD PREVIEW

Utiliser un plasma déshydraté de lapin, (disponible dans le commerce, et le réhydrater en se conformant aux instructions du fabricant.

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

Si du citrate de potassium ou du citrate de sodium a été utilisé comme anticoagulant du plasma, ajouter une solution d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) de manière à avoir 0,1 % d'EDTA dans le plasma réhydraté ou dilué.³⁾

À défaut d'instructions du fabricant, le plasma réhydraté ou dilué doit être utilisé extemporanément.

Avant utilisation, contrôler chaque lot de plasma avec des souches de staphylocoques à coagulase positive ainsi qu'avec des souches de staphylocoques à coagulase négative.

6 Appareillage et verrerie

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

Matériel courant de laboratoire de microbiologie (voir l'ISO 7218) et, en particulier, ce qui suit.

6.1 Appareil pour la stérilisation en chaleur sèche (four) et en chaleur humide (autoclave)

Voir l'ISO 7218.

6.2 Étuve, permettant de maintenir les milieux inoculés, les boîtes et les flacons à l'intérieur d'une plage de températures de 35 °C ± 1 °C ou 37 °C ± 1 °C.

³⁾ Le plasma oxalaté ou hépariné ne demande pas d'EDTA (voir la référence [5]).