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

Partie 2:

Technique utilisant le milieu gélosé au plasma
de lapin et au fibrinogène

[ISO 6888-2:1999](https://standards.iteh.ai/ISO/6888-2:1999)

<https://standards.iteh.ai/ISO/6888-2:1999> *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) —*

Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen 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.....	3
7	Échantillonnage	4
8	Préparation de l'échantillon pour essai.....	4
9	Mode opératoire.....	4
10	Expression des résultats	5
11	Fidélité	6
12	Rapport d'essai	6
	Bibliographie.....	7

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 688-2:1999
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e712868e-d0d7-4fc0-b83d-cae41b6e5146/iso-688-2-1999>

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 6888-2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

Cette première édition de l'ISO 6888-2, ensemble avec l'ISO 6888-1, 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 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 caractérisation des staphylocoques repose sur une réaction positive à la coagulase, mais il est reconnu que certaines souches des *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 [1]).

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

Partie 2:

Technique utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène

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 en milieu solide (milieu au plasma de lapin et au fibrinogène) après incubation en aérobiose à 35 °C ou 37 °C (voir la référence [2]).

iTeh STANDARD PREVIEW

2 Références normatives (standards.iteh.ai)

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 6888-1:1999, *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 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 en milieu sélectif gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène, 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 profondeur du milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène, coulé dans deux boîtes de Petri, avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou avec une quantité déterminée 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 37 °C ¹⁾ pendant 18 h à 24 h et, si nécessaire, 24 h supplémentaires.

4.3 À partir du nombre de colonies caractéristiques par boîte de Petri, calcul du nombre de staphylocoques à coagulase positive par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai.

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 traitant du produit à examiner.

5.3 Milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène (voir les références [3] et [4])

NOTE Des milieux commercialisés conformes aux spécifications de la présente partie de l'ISO 6888 peuvent être utilisés. Cependant, en raison de la variabilité constatée des lots de fabrication du supplément, il est recommandé de tester, avant utilisation, chaque lot de solution de fibrinogène bovin et de plasma de lapin en effectuant des contrôles positifs et négatifs.

5.3.1 Milieu de base

Préparer le milieu de base comme indiqué dans l'ISO 6888-1:1999, 5.3.1, à l'exception de la répartition du milieu de base, à raison de 90 ml par flacon.

5.3.2 Solutions

5.3.2.1 Solution de tellurite de potassium

Préparer la solution de tellurite de potassium comme indiqué dans l'ISO 6888-1:1999, 5.3.2.1.

5.3.2.2 Solution de fibrinogène bovin

5.3.2.2.1 Composition

Fibrinogène bovin	5 g à 7 g ^a
Eau stérile	100 ml
^a Selon la pureté du fibrinogène bovin.	

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

5.3.2.2.2 Préparation

En opérant aseptiquement, dissoudre le fibrinogène bovin dans l'eau, juste avant l'utilisation.

5.3.2.3 Solution de plasma de lapin et d'inhibiteur de trypsine

5.3.2.3.1 Composition

Plasma de lapin avec EDTA pour coagulase (plasma coagulase EDTA)	30 ml
Inhibiteur de trypsine	30 mg

5.3.2.3.2 Préparation

En opérant aseptiquement, dissoudre les composants dans l'eau, juste avant l'utilisation.

5.3.3 Milieu complet

5.3.3.1 Composition

Milieu de base (5.3.1)	90 ml
Solution de tellurite de potassium (5.3.2.1)	0,25 ml
Solution de fibrinogène bovin (5.3.2.2)	7,5 ml
Solution de plasma de lapin et d'inhibiteur de trypsine (5.3.2.3)	2,5 ml

5.3.3.2 Préparation

Faire fondre le milieu de base, puis le laisser refroidir à $48\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ dans un bain d'eau (6.3).

Ajouter de façon aseptique les trois solutions, préalablement réchauffées à $48\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ dans un bain d'eau et, après chaque addition, mélanger soigneusement par rotation, afin de minimiser la formation de mousse.

Utiliser le milieu complet **immédiatement après sa préparation**, afin d'éviter une précipitation du plasma.

AVERTISSEMENT En cas d'utilisation d'une solution commercialisée de fibrinogène bovin et de plasma de lapin, respecter scrupuleusement les instructions du fabricant pour la préparation de cette solution et du milieu complet (notamment la température du milieu de base). Sinon, le milieu peut perdre complètement son activité.

5.4 Préparation des boîtes de milieu gélosé

Voir l'ISO 6888-1:1999, paragraphe 5.3.4.

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 $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ou $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.3 Bain d'eau, ou dispositif similaire, réglable à $48\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.4 Boîtes de Petri, stériles, en verre ou en matière plastique.

6.5 Pipettes graduées à écoulement total, de 1 ml, 2 ml et 10 ml de capacité nominale, graduées respectivement en 0,1 ml, 0,1 ml et 0,5 ml.

7 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 6888. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique à l'échantillonnage du produit concerné, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la Norme internationale du produit concerné. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilution

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

9.2 Ensemencement et incubation

9.2.1 Prendre deux boîtes de Petri stériles (6.4). À l'aide d'une pipette stérile (6.5), transférer dans chacune des boîtes 1 ml de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits. Prendre deux autres boîtes de Petri stériles, transférer dans chacune des boîtes 1 ml de la première dilution décimale.

Répéter ces opérations avec des dilutions successives, à l'aide d'une nouvelle pipette stérile pour chaque dilution décimale.

9.2.2 Couler, dans chacune des deux boîtes de Petri (9.2.1), le milieu complet (5.3.3) utilisé extemporanément (ne pas le maintenir en surfusion), de façon à obtenir une épaisseur d'environ 3 mm.

Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu de culture et laisser solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface fraîche et horizontale.

9.2.3 Après solidification complète, retourner les boîtes ainsi préparées et les faire incuber à l'étuve (6.2) réglée à 35 °C ou 37 °C ²⁾ pendant 18 h à 24 h et, si nécessaire, réincuber pendant 18 h à 24 h supplémentaires.

9.3 Comptage des colonies

Après une période d'incubation suffisante (voir 9.2.3), les staphylocoques forment de petites colonies noires ou grises ou même blanches, entourées d'un halo de précipitation indiquant une activité de coagulase. Des colonies de *Proteus* peuvent présenter en début d'incubation un aspect similaire à celui des colonies de staphylocoques à coagulase positive. Cependant, après 24 h ou 48 h d'incubation, elles prennent un aspect de culture en nappe plus ou moins brunâtre et envahissante qui permet de ne pas les confondre avec les staphylocoques.

²⁾ La température fait l'objet d'un accord entre les parties intéressées et est indiquée dans le rapport d'essai.

Procéder au comptage des colonies caractéristiques pour chaque boîte.

NOTE Comme la gélose au plasma de lapin et au fibrinogène est fondée sur une réaction de coagulase, il n'est pas nécessaire de confirmer cette activité.

10 Expression des résultats

10.1 Cas général

Retenir celles des boîtes qui contiennent 300 colonies au maximum, dont 100 colonies caractéristiques au niveau de deux dilutions successives. Il faut qu'une boîte renferme au moins 15 colonies caractéristiques.

Calculer le nombre N de staphylocoques à coagulase positive présents par millilitre ou par gramme de produit en tant que moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives à l'aide de l'équation suivante:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

où

$\sum C$ est la somme des colonies de staphylocoques caractéristiques sur l'ensemble des boîtes retenues;

V est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres;

n_1 est le nombre de boîtes retenues à la première dilution;

n_2 est le nombre de boîtes retenues à la seconde dilution;

d est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue (la suspension mère est une dilution).

Arrondir à deux chiffres significatifs les résultats obtenus (voir l'ISO 7218).

Noter le résultat comme étant le nombre de staphylocoques à coagulase positive par millilitre (produit liquide) ou par gramme (autre produit), exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^x , où x est la puissance appropriée de 10.

EXEMPLE

Un dénombrement d'un produit après ensemencement avec 0,1 ml de produit a donné les résultats suivants:

- à la première dilution retenue (10^{-2}): 66 colonies caractéristiques et 54 colonies caractéristiques;
- à la deuxième dilution retenue (10^{-3}): 4 colonies caractéristiques et 7 colonies caractéristiques;

$$N = \frac{66 + 54 + 4 + 7}{2,2 \times 10^{-2}} = 5\,955$$

Le résultat, après arrondissement, est $6,0 \times 10^3$.

10.2 Estimation de petits nombres

10.2.1 Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits), contiennent chacune moins de 15 colonies, exprimer le résultat comme suit.

- a) Pour les produits liquides, nombre estimé de staphylocoques à coagulase positive par millilitre:

$$N_e = \frac{C}{2}$$