

Première édition  
2003-03-15

Version corrigée  
2004-01-15

---

---

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

**Partie 3:  
Recherche et méthode NPP pour les  
faibles nombres**

ISO 6888-3:2003

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

*Part 3: Detection and MPN technique for low numbers*



Numéro de référence  
ISO 6888-3:2003(F)

© ISO 2003

**PDF – Exonération de responsabilité**

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 6888-3:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fd1cb9c-d45c-442a-abc9-d36a7b3d36c2/iso-6888-3-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fd1cb9c-d45c-442a-abc9-d36a7b3d36c2/iso-6888-3-2003>

© ISO 2003

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax. + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

Avant-propos .....	iv
Introduction .....	v
1 <b>Domaine d'application</b> .....	1
2 <b>Références normatives</b> .....	1
3 <b>Termes et définitions</b> .....	2
4 <b>Principe</b> .....	2
4.1 <b>Méthode de recherche</b> .....	2
4.2 <b>Méthode de dénombrement</b> .....	3
5 <b>Diluants et milieux de culture</b> .....	3
6 <b>Appareillage</b> .....	6
7 <b>Échantillonnage</b> .....	7
8 <b>Préparation de l'échantillon pour essai</b> .....	7
9 <b>Mode opératoire</b> .....	7
9.1 <b>Méthode de recherche</b> .....	7
9.2 <b>Méthode de dénombrement</b> .....	8
9.3 <b>Sélection des boîtes et interprétation</b> .....	8
10 <b>Expression des résultats</b> .....	10
10.1 <b>Méthode de recherche</b> .....	10
10.2 <b>Méthode de dénombrement</b> .....	10
11 <b>Fidélité</b> .....	10
12 <b>Rapport d'essai</b> .....	11
Bibliographie .....	12

## 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 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 6888-3 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

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)*: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fd1cb9c-d45c-442a-abc9-d36a7b3d36c2/iso-6888-3-2003>

- *Partie 1: Technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker*
- *Partie 2: Technique utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène*
- *Partie 3: Recherche et méthode NPP pour les faibles nombres*

La présente version corrigée de l'ISO 6888-3:2003 a fait l'objet de la correction suivante:

### **Paragraphe 9.1.1**

Le deuxième alinéa a été modifié afin d'éliminer toute ambiguïté.

## Introduction

En raison de la grande diversité des produits alimentaires, il est possible que la présente 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 soit 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.

## iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 6888-3:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fd1cb9c-d45c-442a-abc9-d36a7b3d36c2/iso-6888-3-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fd1cb9c-d45c-442a-abc9-d36a7b3d36c2/iso-6888-3-2003>

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 6888-3:2003

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fd1cb9c-d45c-442a-abc9-d36a7b3d36c2/iso-6888-3-2003>

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

## Partie 3: Recherche et méthode NPP pour les faibles nombres

### 1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 6888 spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement et la recherche des staphylocoques à coagulase positive par la méthode NPP (nombre le plus probable). Elle est applicable aux

- produits destinés à l'alimentation humaine et animale;
- échantillons d'environnement dans le domaine de la production et de la distribution des aliments.

La présente méthode est recommandée pour les produits susceptibles de contenir des staphylocoques stressés et en faible nombre, comme c'est le cas, par exemple, des produits secs. Les staphylocoques à coagulase positive seront surtout des *Staphylococcus aureus*, mais les *Staphylococcus intermedius* et certaines souches de *Staphylococcus hyicus* peuvent également sécréter de la coagulase libre.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fd1cb9c-d45c-442a-abc9-d36a7b3d36c2/iso-6888-3-2003>

### 2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 6887 (toutes les parties), *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique*

ISO 8261, *Lait et produits laitiers — Lignes directrices générales pour la préparation des échantillons pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique*

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 6888-2:1999, *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 7218:1996, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques*

ISO/TS 11133-1, *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 1: Guide général pour l'assurance de la qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire*

ISO/TS 11133-2:—<sup>1)</sup>, *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 2: Guide général pour les essais de performance des milieux de culture*

### 3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

**3.1 staphylocoque à coagulase positive**  
bactérie 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 ou une réaction spécifique au plasma de lapin sur un milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène

NOTE Dans le cadre de la présente partie de l'ISO 6888, la confirmation des staphylocoques à coagulase positive repose sur une réaction fortement positive à la coagulase. Toutefois, il est reconnu que certaines souches de staphylocoques à coagulase positive présentent des réactions faiblement positives à la coagulase. Ces souches sont susceptibles d'être confondues avec d'autres bactéries, mais il est possible de les différencier à l'aide d'essais supplémentaires comme la recherche de la thermonucléase (pour plus de détails, voir la norme FIL 83).

**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

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

### 4 Principe

#### 4.1 Méthode de recherche

ISO 6888-3:2003

**4.1.1** Ensemencement dans le milieu de culture sélectif d'une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou d'une quantité déterminée de suspension mère dans le cas d'autres produits.

**4.1.2** Incubation des tubes à essais en conditions anaérobies à 37 °C pendant 24 h et 48 h. La présence éventuelle de staphylocoques à coagulase positive est indiquée par une réduction du tellurite de potassium.

NOTE Dans la présente partie de l'ISO 6888, l'anaérobiose est obtenue en disposant une couche de gélose ou de paraffine dans chaque tube pour former un bouchon. Une autre méthode consiste à faire incuber les tubes à essais dans une jarre ou dans une étuve en conditions anaérobies.

**4.1.3** Ensemencement de la surface du milieu sélectif solide de Baird-Parker à partir des tubes à essais présumés positifs (4.1.2) après 24 h d'incubation, et à l'aide des autres tubes après 48 h.

**4.1.4** Incubation des boîtes à 37 °C pendant 24 h et 48 h. La présence éventuelle de staphylocoques à coagulase positive est indiquée par une réduction du tellurite de potassium et par une réaction au jaune d'œuf.

**4.1.5** Confirmation, par une réaction de la coagulase, de colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques.

**4.1.6** Autre méthode possible: ensemencement de la surface du milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène. Après un temps d'incubation approprié, la présence de staphylocoques à coagulase positive est indiquée par des colonies présentant une réaction spécifique au plasma de lapin et au fibrinogène.

---

1) À publier.

**4.1.7** Présentation des résultats sous la forme «présence» ou «absence» de staphylocoques à coagulase positive dans  $x$  g ou  $x$  ml de produit.

## 4.2 Méthode de dénombrement

**4.2.1** Ensemencement de dilutions successives de produit dans le milieu de culture sélectif liquide.

**4.2.2** Incubation des tubes à essais en conditions anaérobies à 37 °C pendant 24 h et 48 h. La présence éventuelle de staphylocoques à coagulase positive est indiquée par une réduction du tellurite de potassium.

NOTE Dans la présente partie de l'ISO 6888, l'anaérobiose est obtenue en disposant une couche de gélose ou de paraffine dans chaque tube pour former un bouchon. Une autre méthode consiste à faire incuber les tubes à essais dans une jarre ou dans une étuve en conditions anaérobies.

**4.2.3** Ensemencement de la surface du milieu sélectif solide de Baird-Parker à partir des tubes à essais présumés positifs (4.2.2) après 24 h d'incubation, et à l'aide des autres tubes après 48 h.

**4.2.4** Incubation des boîtes à 37 °C pendant 24 h et 48 h. La présence éventuelle de staphylocoques à coagulase positive est indiquée par une réduction du tellurite de potassium et par une réaction au jaune d'œuf.

**4.2.5** Confirmation, par une réaction de la coagulase, de colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques.

**4.2.6** Autre méthode possible: ensemencement de la surface du milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène. Après un temps d'incubation approprié, la présence de staphylocoques à coagulase positive est indiquée par des colonies présentant une réaction spécifique au plasma de lapin et au fibrinogène.

**4.2.7** Calcul du nombre le plus probable (NPP) de staphylocoques à coagulase positive par gramme ou par millilitre d'échantillon en se référant aux tableaux des nombres les plus probables pour les dilutions confirmées (4.2.5 ou 4.2.6).

[ISO 6888-3:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fd1cb9c-d45c-442a-abc9-d36a7b3d36c2/iso-6888-3-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fd1cb9c-d45c-442a-abc9-d36a7b3d36c2/iso-6888-3-2003>

## 5 Diluants et milieux de culture

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

Les produits chimiques utilisés pour la préparation des milieux de culture et des réactifs doivent être de qualité analytique reconnue.

### 5.1 Diluants

Se référer aux parties pertinentes de l'ISO 6887, ou à l'ISO 8261, ou à la norme spécifique relative au produit à étudier.

**5.2 Bouillon de Giolitti et Cantoni modifié**

**5.2.1 Milieu de base**

**5.2.1.1 Composition**

	Milieu double concentration	Milieu simple concentration
Digestat enzymatique de caséine	20,0 g	10,0 g
Extrait de viande	10,0 g	5,0 g
Extrait de levure	10,0 g	5,0 g
Chlorure de lithium	10,0 g	5,0 g
Mannitol	40,0 g	20,0 g
Chlorure de sodium	10,0 g	5,0 g
Glycine	2,4 g	1,2 g
Pyruvate de sodium	6,0 g	3,0 g
Polyoxyéthylène mono-oléate de sorbitol (Tween 80)	2,0 g	1,0 g
Eau	1 000 ml	1 000 ml

**5.2.1.2 Préparation**

**iTeh STANDARD PREVIEW**

Dissoudre les ingrédients dans l'eau et, si nécessaire, chauffer et agiter pour arriver à complète dissolution. Laisser refroidir à la température ambiante et ajuster le pH de façon qu'après stérilisation il soit de  $6,9 \pm 0,2$ .

Répartir le milieu en portions appropriées dans des tubes à essais de dimensions adéquates (par exemple 16 mm x 160 mm pour le milieu simple concentration, et 20 mm x 200 mm pour les milieux double concentration).

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min.

**5.2.2 Solution de tellurite de potassium**

**5.2.2.1 Composition**

Tellurite de potassium <sup>2)</sup> (K <sub>2</sub> TeO <sub>3</sub> )	1,0 g
Eau	100 ml

**5.2.2.2 Préparation**

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

Il convient que la poudre soit facilement dissoute. Si un composé blanc insoluble se forme dans l'eau, éliminer le tellurite de potassium.

Stériliser par filtration à l'aide de membranes de 0,22 µm de porosité.

2) Il est recommandé de s'assurer au préalable que le tellurite de potassium dont on dispose est adapté à cet essai (5.2.2.2).

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

Si un précipité blanc s'est formé, ne pas utiliser la solution.

### 5.2.3 Milieu complet

Juste avant utilisation, chauffer le milieu de base (5.2.1) pendant 15 min à  $100\text{ °C}$  pour le désaérer.

Laisser refroidir jusqu'à une température comprise entre  $44\text{ °C}$  et  $47\text{ °C}$  et ajouter, en conditions aseptiques, 0,1 ml de solution de tellurite de potassium (5.2.2) par tube pour le milieu simple concentration et 0,2 ml de solution par tube pour le milieu double concentration.

### 5.2.4 Essai de performance pour l'assurance qualité du milieu de culture

Se reporter à l'ISO/TS 11133-1 pour les définitions des termes «sélectivité» et «productivité». Le Tableau 1 donne les critères pour les essais de performance du milieu de Giolitti et Cantoni modifié.

Tableau 1 — Critères pour les essais de performance du milieu de Giolitti et Cantoni modifié

Fonction	Incubation	Souches de contrôle	Milieu de référence	Méthode de contrôle	Critères
Productivité	37 °C pendant 48 h	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P ou <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 plus une souche compétitive ( <i>E. coli</i> ATCC 8732 ou 25922), ou la même souche enregistrée dans d'autres collections		semi-quantitative	> 10 colonies sur milieu sélectif
Sélectivité	37 °C pendant 48 h	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 ou 8739 ou la même souche enregistrée dans d'autres collections	TSA	semi-quantitative	pas de croissance sur milieu non sélectif

## 5.3 Solution gélosée (20 g/l)

### 5.3.1 Composition

Agar-agar	15 g à 20 g <sup>3)</sup>
Eau	1 000 ml

### 5.3.2 Préparation

Mettre la gélose en suspension dans l'eau en portant à ébullition et stériliser à l'autoclave à  $121\text{ °C}$  pendant 15 min.

Laisser refroidir jusqu'à une température comprise entre  $44\text{ °C}$  et  $47\text{ °C}$  avant utilisation. Verser dans des tubes à essais de dimensions adéquates. Conserver conformément à l'ISO 7218.

## 5.4 Milieu gélosé de Baird-Parker

### 5.4.1 Composition et préparation

Voir l'ISO 6888-1:1999, 5.3.

3) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.