

ISO/TC 34/SC 9

Date: 2018-06

Deleted: 03-02

ISO 6888-1:1999/Amd 2:2018(F)

Deleted: FDAM

ISO/TC 34/SC 9/GT

Secrétariat: AFNOR

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

AMENDEMENT 2: Ajout d'un essai alternatif de confirmation utilisant la méthode de piqûre sur RPFA

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

AMENDMENT 2: Inclusion of an alternative confirmation test using RPFA stab method

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 6888-1:1999/Amd 2:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d4cf5ef2-7a26-48f3-92fa-b46a9f160aa9/iso-6888-1-1999-amd-2-2018>

Deleted: i . © ISO 2018 – Tous droits réservés

Deleted: ISO 6888-1:1999/Amd 2:2018(F)

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée 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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Deleted: le lien suivant:

Le présent document a été élaboré par le Comité technique CEN/TC 275, *Analyse des produits alimentaires — Méthodes horizontales*, du Comité européen de normalisation (CEN) en collaboration avec le Comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, Sous-comité SC 9, *Microbiologie*, conformément à l'accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

[Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.](http://www.iso.org/fr/members.html)

Une liste de toutes les parties de la série ISO 6888 peut être consultée sur le site de l'ISO.

Deleted: © ISO 2018 – Tous droits réservés iii

Deleted: ISO 6888-1:1999/Amd 2:2018(F)

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

AMENDEMENT 2: Ajout d'un essai alternatif de confirmation utilisant la méthode de piqûre sur RPFA

Article 2

Ajouter la référence normative suivante:

ISO 11133, *Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture*

Article 5

Ajouter le texte suivant

5.6 Milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène (RPFA)

5.6.1 Généralités

Des milieux de culture commercialisés et conformes aux spécifications du présent document, peuvent être utilisés. Cependant, en raison de la variabilité établie des lots de fabrication de supplément, il est recommandé de soumettre à essai, avant utilisation, chaque lot de solution de fibrinogène bovin et de plasma de lapin, en effectuant des contrôles positifs et des contrôles négatifs.

5.6.2 Milieu de base

Préparer le milieu de base comme indiqué en 5.3.1, à l'exception de la répartition du milieu de base, à raison de 90 ml par flacon ou fiole.

5.6.3 Solutions

5.6.3.1 Solution de tellurite de potassium

Préparer la solution de tellurite de potassium comme indiqué en 5.3.2.1.

5.6.3.2 Solution de fibrinogène bovin

5.6.3.2.1 Composition

| | |
|-------------------|------------------------|
| Fibrinogène bovin | 5 g à 7 g ^a |
| Eau stérile | 100 ml |

^a Selon la pureté du fibrinogène bovin.

Deleted: :

5.6.3.2.2 Préparation

Dans des conditions aseptiques, dissoudre le fibrinogène bovin dans l'eau juste avant utilisation.

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

5.6.3.3.1 Composition

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

5.6.3.3.2 Préparation

Dans des conditions aseptiques, dissoudre les composants dans l'eau juste avant utilisation.

5.6.4 Milieu complet

5.6.4.1 Composition

| | |
|---|---------|
| Milieu de base (5.6.2) | 90 ml |
| Solution de tellurite de potassium (5.6.3.1) | 0,25 ml |
| Solution de fibrinogène bovin (5.6.3.2) | 7,5 ml |
| Solution de plasma de lapin et d'inhibiteur de trypsine (5.6.3.3) | 2,5 ml |

5.6.4.2 Préparation

Faire fondre le milieu de base, puis le laisser refroidir à 47 °C à 50 °C dans un bain d'eau (6.4), car ce milieu se solidifie lorsque la température est inférieure à cette valeur.

Dans des conditions aseptiques, ajouter les trois solutions préalablement chauffées à 48 °C ± 1 °C dans un bain d'eau. Après chaque ajout, mélanger soigneusement par rotation, afin de réduire le plus possible la formation de mousse.

Utiliser le milieu complet **immédiatement après sa préparation**, afin d'éviter toute 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 concernant la préparation de cette solution et du milieu complet (en particulier pour ce qui concerne la température du milieu de base). Si ces instructions ne sont pas observées, le milieu peut perdre complètement son activité.

5.6.5 Préparation des boîtes contenant le RPFA

Couler la quantité nécessaire de milieu complet dans des boîtes de Petri stériles pour obtenir une épaisseur de gélose d'environ 4 mm, et laisser le milieu se solidifier.

Les boîtes de RPFA préparées peuvent être conservées, avant séchage, à 5 °C ± 3 °C pendant une période donnée avant utilisation, s'il a été démontré que le milieu reste stable pendant ladite période.

Pour les boîtes issues du commerce, il convient de suivre les instructions du fabricant.

Avant utilisation, sécher les boîtes suivant les spécifications de l'ISO 7218.

5.6.6 Essais de performance pour l'assurance qualité du milieu de culture

Le Tableau 1 indique les essais de performance pour l'assurance qualité du milieu RPFA utilisé comme milieu de confirmation.

Pour obtenir la définition de la productivité, de la sélectivité et de la spécificité, se référer à l'ISO 11133. En général, suivre les modes opératoires pour les essais de performance décrits dans l'ISO 11133.

Tableau 1 — Essais de performance pour l'assurance qualité du milieu RPFA

| Milieu | Type | Fonction | Incubation | Souche de contrôle | Numéro WDCM ^a | Méthode de contrôle | Critères ^c | Réaction caractéristique |
|--------|----------------|--------------|---------------------------------------|--|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|--|
| RPFA | S ^e | Productivité | (24 ± 2) h à (48 ± 2) h / (37 ± 1) °C | <i>Staphylococcus aureus</i> | 00034 ^b 00032 | Qualitative ^f | Bonne croissance (2) | Colonies noires ou grises avec halo opaque |
| | | Sélectivité | (48 ± 2) h / (37 ± 1) °C | <i>Escherichia coli</i> ^d | 00012 ou 00013 | Qualitative | Inhibition totale | — |
| | | Spécificité | (24 ± 2) h à (48 ± 2) h / (37 ± 1) °C | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 00159 ^b 00036 | Qualitative | — | Colonies noires ou grises sans halo opaque |

^a Consulter le catalogue des souches de référence disponible à l'adresse <http://www.wfcc.info> pour tout contact et toute information concernant les numéros d'identification des souches de collections de culture; WDCM: World Data Centre for Microorganisms.

^b Souche que le laboratoire doit utiliser (au minimum).

^c La croissance est classée en: 0: — croissance nulle; 1: — faible croissance; 2: — bonne croissance (voir l'ISO 11133).

^d Souche au choix; une des souches, au minimum, doit être utilisée.

^e S: milieu solide.

^f En cas d'utilisation à la fois quantitative et qualitative du milieu RPFA, seuls les résultats des essais quantitatifs sont nécessaires.

NOTE *Proteus* ou *Bacillus* peuvent également se développer mais ils se présentent sous forme de colonies brunes sur la gélose de Baird-Parker.

6.4

Remplacer le paragraphe 6.4 par le texte suivant:

6.4 Bains d'eau, ou dispositifs similaires, réglables entre 47 °C et 50 °C.

6.7

Remplacer le paragraphe 6.7 par le texte suivant:

6.7 Fil droit, (voir l'ISO 7218) ou pipette Pasteur.

9.5

Remplacer le texte du paragraphe 9.5 par le suivant:

NOTE Le texte de remplacement 9.5.2 est identique à l'ancien paragraphe 9.5 «Confirmation (recherche de la coagulase)».

9.5 Confirmation

9.5.1 Généralités

Deleted: ISO 6888-1:1999/Amd 2:2018(F)

La confirmation des staphylocoques à coagulase positive est effectuée par un essai de la coagulase en tube (9.5.2). Elle peut également être effectuée par un essai sur une boîte contenant un milieu RPFA (9.5.3) (voir les Références [9], [10] et [11]).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 6888-1:1999/Amd 2:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d4cf5ef2-7a26-48f3-92fa-b46a9f160aa9/iso-6888-1-1999-amd-2-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d4cf5ef2-7a26-48f3-92fa-b46a9f160aa9/iso-6888-1-1999-amd-2-2018>

9.5.2 Essai de la coagulase en tube

À l'aide d'un fil stérile (6.7), prélever un inoculum sur la surface de chaque colonie sélectionnée (9.4) et l'ensemencer dans un tube ou dans un flacon de bouillon cœur-cerveille (5.4).

Incuber à 35 °C ou 37 °C ^[5] pendant 24 h ± 2 h.

Ajouter aseptiquement 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 à hémolyse ou flacons (spécifiés en 6.5) et incuber à 35 °C ou à 37 °C ^[5].

En inclinant le tube, examiner la coagulation du plasma après 4 h à 6 h d'incubation et, si la réaction est négative, réexaminer après 24 h d'incubation, ou examiner après les temps d'incubation préconisés par le fabricant.

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

À titre de contrôle non ensemencé, ajouter, pour chaque lot de plasma, 0,1 ml de bouillon cœur-cerveille 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 doit pas présenter de signes de coagulation.

9.5.3 Essai sur une boîte contenant un milieu RPFA

À l'aide d'un fil stérile (6.7), prélever un inoculum sur la surface de chaque colonie sélectionnée (9.4), puis ensemencer par piqûre les boîtes de milieu RPFA (5.6.4).

Plusieurs colonies, en plus d'une souche de contrôle positive et d'une souche de contrôle négative, peuvent être ensemencées sur la même boîte de sorte que les colonies individuelles présentent des zones de précipitation bien distinctes.

NOTE À titre indicatif, jusqu'à dix colonies peuvent être ensemencées sur une même boîte.

Incuber les boîtes à 35 °C ou 37 °C pendant 24 h à 48 h.

Après incubation, les staphylocoques forment de petites colonies noires ou grises, voire blanches, entourées d'un halo de précipitation, indiquant une activité de coagulase.

Avant lecture, les boîtes peuvent être conservées au réfrigérateur à 5 °C ± 3 °C pendant 24 h à 48 h.

Bibliographie

Ajouter les références suivantes:

- [9] BAUDOIN N., Cauquil A., Soudrie N., Bouchez P., Deperrois V., Asséré A. and Lombard B. Report of EURL study of an alternative to the confirmation step of the Standard EN ISO 6888-1 for enumeration of coagulase-positive staphylococci (BP agar). Avril 2009. Disponible à l'adresse: <https://sites.anses.fr/en/minisite/staphylococci/study-alternative-confirmation-step-standard-en-iso-6888-1-enumeration-1>
- [10] Food and Consumer Product Safety Authority. Data of the study of the shelf-life of RPFA. Disponible à l'adresse suivante: <http://standards.iso.org/iso/6888/-1/ed-1/en/amd/2/>

Deleted: ISO 6888-1:1999/Amd 2:2018(F)

- [11] French study to compare confirmation of coagulase positive staphylococci by coagulase test tube and RPF agar plate. Disponible à l'adresse suivante: <http://standards.iso.org/iso/6888/-1/ed-1/en/amd/2/>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 6888-1:1999/Amd 2:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d4cf5ef2-7a26-48f3-92fa-b46a9f160aa9/iso-6888-1-1999-amd-2-2018>