

---

---

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

Partie 1:

**Méthode utilisant le milieu gélosé de  
Baird-Parker**

*Microbiology of the food chain — Horizontal method for the  
enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus  
aureus and other species) —*

*Part 1: Method using Baird-Parker agar medium*



iTeh Standards  
(<https://standards.iteh.ai>)  
Document Preview

ISO 6888-1:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/c1650b43-ef90-4339-b426-381c893386b4/iso-6888-1-2021>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2021

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office

Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8

CH-1214 Vernier, Genève

Tél.: +41 22 749 01 11

E-mail: [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)

Web: [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

# Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b>	<b>iv</b>
<b>Introduction</b>	<b>vi</b>
<b>1 Domaine d'application</b>	<b>1</b>
<b>2 Références normatives</b>	<b>2</b>
<b>3 Termes et définitions</b>	<b>2</b>
<b>4 Principe</b>	<b>2</b>
4.1 Généralités	2
4.2 Incubation	2
4.3 Dénombrement et confirmation	3
<b>5 Milieux de culture et réactifs</b>	<b>3</b>
<b>6 Équipement et consommables</b>	<b>3</b>
<b>7 Échantillonnage</b>	<b>4</b>
<b>8 Préparation de l'échantillon pour essai</b>	<b>4</b>
<b>9 Mode opératoire</b>	<b>4</b>
9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions	4
9.2 Ensemencement et incubation	4
9.3 Comptage des colonies	5
9.3.1 Description générale des colonies cultivant sur un milieu BPA	5
9.3.2 Mode opératoire de comptage des colonies	5
9.4 Confirmation	6
9.4.1 Généralités	6
9.4.2 Essai en tube	6
9.4.3 Essai sur boîte de milieu RPFA	7
<b>10 Expression des résultats</b>	<b>8</b>
<b>11 Caractéristiques de performance de la méthode</b>	<b>8</b>
11.1 Étude interlaboratoires	8
11.2 Limite de répétabilité	8
11.3 Limite de reproductibilité	8
<b>12 Rapport d'essai</b>	<b>9</b>
<b>13 Assurance qualité</b>	<b>10</b>
<b>Annexe A (normative) Logigramme du mode opératoire</b>	<b>11</b>
<b>Annexe B (normative) Milieux de culture et réactifs</b>	<b>12</b>
<b>Annexe C (informative) Résultats de l'étude interlaboratoires</b>	<b>19</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>22</b>

## 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](http://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](http://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 le lien suivant: [www.iso.org/iso/fr/avant-propos](http://www.iso.org/iso/fr/avant-propos).

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 463, *Microbiologie de la chaîne alimentaire*, du Comité européen de normalisation (CEN), conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Cette seconde édition annule et remplace la première édition (ISO 6888-1:1999), qui a fait l'objet d'une révision technique. Elle intègre également les amendements ISO 6888-1:1999/Amd 1:2003 et ISO 6888-1:1999/Amd 2:2018. Les principales modifications par rapport à l'édition précédente sont les suivantes:

- le titre a été modifié pour faire référence à la «chaîne alimentaire»;
- le statut du présent document et de l'ISO 6888-2 a été clarifié;
- le document a été aligné sur l'ISO 7218:2007, par exemple il indique de verser le milieu gélosé fondu à une température comprise entre 44 °C et 47 °C;
- toutes les occurrences de «35 °C ou 37 °C», le cas échéant, ont été remplacées par «entre 34 °C et 38 °C»;
- toutes les occurrences des durées d'incubation «18 h à 24 h», le cas échéant, ont été remplacées par «24 h ± 2 h»;
- des exigences ont été ajoutées pour utiliser l'ISO 11133;
- toutes les normes disponibles concernant les techniques de prélèvement ont été mises à jour;
- la description des colonies caractéristiques et non caractéristiques sur un milieu gélosé de Baird-Parker (BPA) a été mise à jour;

- le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène (RPFA) a été ajouté afin d'offrir une alternative à l'essai de coagulase pour confirmation;
- le mode opératoire sous forme de logigramme à l'[Annexe A](#) a été mis à jour;
- les milieux de culture et réactifs avec essais de performance ont été ajoutés à l'[Annexe B](#);
- les résultats de l'étude interlaboratoires (provenant des données de fidélité de l'ISO 6888-1:1999/Amd1:2003) ont été mis à jour;
- la Bibliographie a été mise à jour.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 6888 se trouve sur le site web de l'ISO.

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).

iTeh Standards  
(<https://standards.iteh.ai>)  
Document Preview

ISO 6888-1:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/c1650b43-ef90-4339-b426-381c893386b4/iso-6888-1-2021>

## Introduction

Le présent document, l'ISO 6888-2 et l'ISO 6888-3 décrivent trois méthodes horizontales pour la détection et le dénombrement de 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*.

Pour les besoins du présent document, la confirmation des colonies caractéristiques et non caractéristiques 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, mais elles peuvent être distinguées en procédant à des essais complémentaires non inclus dans le présent document, tels que des essais pour la sensibilité à la lysostaphine, et la production d'hémolysine, de nucléase thermostable et d'acide à partir de mannitol (voir l'ISO 7218 et la Référence [15]).

Les principales modifications techniques énumérées dans l'avant-propos qui ont été apportées au présent document par rapport à la précédente édition sont considérées comme mineures (voir l'ISO 17468). Elles ont un impact mineur sur les caractéristiques de performance de cette méthode.

Les résultats de l'étude interlaboratoires et les échantillons soumis à essai sont décrits à l'[Annexe C](#).

iTeh Standards  
(<https://standards.iteh.ai>)  
Document Preview

ISO 6888-1:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/c1650b43-ef90-4339-b426-381c893386b4/iso-6888-1-2021>

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

## Partie 1: Méthode utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker

**AVERTISSEMENT** — Afin de préserver la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel que les essais de recherche de staphylocoques ne soient effectués que dans des laboratoires correctement équipés, sous la surveillance d'un microbiologiste expérimenté, et qu'un grand soin soit apporté à l'élimination de tous les matériaux incubés. Il convient que les utilisateurs du présent document maîtrisent les pratiques courantes de laboratoire. Le présent document ne prétend pas aborder la totalité des aspects liés à la sécurité qui pourraient découler de son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de ce document d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité.

### 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode horizontale de dénombrement des staphylocoques à coagulase positive par comptage des colonies obtenues en milieu solide (milieu de Baird-Parker)<sup>[10]</sup> après incubation en aérobiose entre 34 °C et 38 °C et confirmation par coagulase.

Le présent document s'applique aux:

- produits destinés à la consommation humaine;
- produits destinés à l'alimentation des animaux;
- échantillons environnementaux prélevés dans les secteurs de la production et de la distribution des aliments; et
- échantillons prélevés au stade de production primaire.

Cette méthode horizontale a été élaborée à l'origine pour l'examen de tous les échantillons appartenant à la chaîne alimentaire.

En raison de la grande diversité des produits de la chaîne alimentaire, il est possible que cette méthode horizontale ne soit pas appropriée dans ses moindres détails à tous les produits. Néanmoins, il est attendu que les modifications requises soient réduites le plus possible afin de ne pas s'écarter de manière significative de cette méthode horizontale.

D'après les informations disponibles au moment de la publication du présent document, cette méthode n'est pas considérée comme étant (parfaitement) adaptée à l'examen des produits fermentés ou d'autres produits contenant une flore technologique fondée sur *Staphylococcus* spp (par exemple, *S. xylosus*) (tels que les fromages à base de lait cru et certains produits à base de viande crue) susceptibles d'être contaminés par:

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

Néanmoins, le présent document et l'ISO 6888-2 bénéficient d'un statut équivalent.

## 2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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 de la chaîne alimentaire — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique*

ISO 7218, *Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations*

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

## 3 Termes et définitions

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

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>;
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <https://www.electropedia.org/>.

**3.1 staphylocoques à coagulase positive**  
bactéries formant des colonies soit caractéristiques soit non caractéristiques, ou les deux, à la surface d'un milieu de culture sélectif (milieu gélosé de Baird-Parker) et donnant une réaction positive à la coagulase lors d'un essai de coagulase en tube ou sur une gélose au plasma de lapin et au fibrinogène

Note 1 à l'article: Les colonies caractéristiques et non caractéristiques sont décrites en 9.3.1.

**3.2 dénombrement des staphylocoques à coagulase positive**  
détermination du nombre de *staphylocoques à coagulase positive* (3.1) trouvés par gramme, millilitre, centimètre carré ou dispositif de prélèvement/zone de prélèvement

Note 1 à l'article: Une zone de prélèvement est une zone qui n'est pas définie par une taille numérique, par exemple un robinet d'eau chaude ou une poignée de porte.

## 4 Principe

### 4.1 Généralités

Ensemencement en surface d'un milieu gélosé sélectif, 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.

### 4.2 Incubation

Incubation de ces boîtes entre 34 °C et 38 °C en aérobiose et examen après 24 h et 48 h.



### 4.3 Dénombrement et confirmation

Calcul du nombre de staphylocoques à coagulase positive trouvés par gramme, millilitre, centimètre carré ou dispositif de prélèvement à partir du nombre de colonies caractéristiques ou non caractéristiques, ou les deux, obtenues dans les boîtes retenues aux niveaux de dilution donnant un résultat significatif, et confirmées par un essai de coagulase positif, dans les limites de comptage de la méthode et conformément à l'ISO 7218.

NOTE Voir l'[Annexe A](#) relative au logigramme.

## 5 Milieux de culture et réactifs

Suivre les pratiques courantes de laboratoire conformément à l'ISO 7218.

La composition des milieux de culture et des réactifs et leur préparation sont décrites à l'[Annexe B](#).

Pour les essais de performance des milieux de culture et des réactifs, suivre les modes opératoires conformément à l'[Annexe B](#) ou à l'ISO 11133, ou aux deux.

Pour les diluants, voir la partie correspondante de la série de normes ISO 6887.

## 6 Équipement et consommables

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 ensemencés à l'intérieur d'une plage de température comprise entre 34 °C et 38 °C.

NOTE La plage de température comprise entre 34 °C et 38 °C pour l'incubation de milieux inclut l'utilisation d'étuves réglées à 35 °C ± 1 °C, à 36 °C ± 2 °C ou à 37 °C ± 1 °C.

### 6.3 Bain d'eau, ou dispositif similaire, pouvant être maintenu à une température entre 44 °C et 47 °C.

### 6.4 Tubes à essai, flacons ou fioles avec bouchons, de capacités appropriées. Des flacons ou fioles avec bouchons à vis métalliques ou plastiques non toxiques peuvent être utilisés.

### 6.5 Boîtes de Petri stériles, d'environ 90 mm de diamètre ou de plus grandes dimensions (facultatif; environ 140 mm de diamètre), en verre ou en matière plastique.

### 6.6 Fil droit (voir l'ISO 7218) ou pipette Pasteur.

Anses bouclées/cèse (d'un diamètre d'environ 3 mm) et fils droits, en platine/iridium ou nickel/chrome, ou tiges en verre, ou aiguilles d'ensemencement ou anses stériles jetables équivalentes.

### 6.7 Pipettes graduées ou pipettes automatiques stériles, d'une capacité nominale de 1 ml, 2 ml et 10 ml, graduées respectivement en 0,1 ml, 0,1 ml et 0,5 ml. Voir l'ISO 7218.

Il convient que les pipettes graduées et les embouts des pipettes soient munis d'un bouchon en coton non absorbant pour empêcher la contamination lors de la manipulation de cultures microbiennes.

**6.8 Étaleurs**, stériles, en verre ou en matière plastique.

**6.9 pH-mètre** ayant une précision de lecture de  $\pm 0,01$  unité pH, permettant de réaliser des mesures précises à  $\pm 0,1$  unité pH. Le pH-mètre doit être équipé d'un système de compensation de température soit manuel, soit automatique. Voir l'ISO 7218.

**6.10 Réfrigérateur**, pouvant fonctionner à  $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ .

**6.11 Membranes**, d'une porosité de  $0,2\text{ }\mu\text{m}$ .

## 7 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans le présent document. Suivre la Norme internationale spécifique du produit concerné. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique traitant de l'échantillonnage du produit concerné, il convient que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

Des techniques d'échantillonnage recommandées sont décrites dans les documents suivants:

- ISO/TS 17728 pour les aliments et les aliments pour animaux;
- ISO 707 pour le lait et les produits laitiers;
- ISO 6887-3 pour les produits de la pêche;
- ISO 13307 pour le stade de production primaire;
- ISO 17604 pour les carcasses;
- ISO 18593 pour les surfaces.

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif. Il convient que l'échantillon n'ait pas été endommagé ni modifié au cours du transport ou du stockage.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/c1650b43-ef90-4339-b426-381c893386b4/iso-6888-1-2021>

## 8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai à partir de l'échantillon de laboratoire, conformément à la Norme internationale spécifique du produit concerné: suivre les modes opératoires spécifiés dans la série de normes ISO 6887 et, si nécessaire, dans l'ISO 18593. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique, il convient que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

## 9 Mode opératoire

### 9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Se reporter à la partie correspondante de la série de normes ISO 6887.

### 9.2 Ensemencement et incubation

Transférer, à l'aide d'une pipette stérile (6.7),  $0,1\text{ ml}$  de l'échantillon pour essai s'il est liquide ou  $0,1\text{ ml}$  de la suspension mère (dilution  $10^{-1}$ ) pour les autres produits, dans une boîte de milieu gélosé de Baird-Parker (BPA) (voir B.2). Dans le cadre des techniques de dénombrement en microbiologie de la chaîne alimentaire, le nombre de boîtes de Petri à utiliser en fonction des dilutions soumises à essai est indiqué dans l'ISO 7218. Répéter le mode opératoire pour les dilutions décimales suivantes si nécessaire.

S'il est nécessaire, pour certains produits, de procéder au comptage de petits nombres de staphylocoques à coagulase positive, le niveau de détection peut être augmenté 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, soit à la surface d'une grande boîte ( $d = 140$  mm), soit à la surface de trois petites boîtes ( $d = 90$  mm) de milieu gélosé. Le nombre de boîtes de Petri à utiliser en fonction des dilutions soumises à essai est indiqué dans l'ISO 7218.

Étaler soigneusement l'inoculum le plus rapidement possible à la surface de la boîte de milieu gélosé, en évitant de toucher les bords de la boîte de Petri, à l'aide de l'étaleur (6.8). Laisser sécher les boîtes, avec leur couvercle en place, pendant environ 15 min à température ambiante.

NOTE 1 Pour l'ensemencement en mode Spiral, voir l'ISO 7218.

Retourner les boîtes préparées selon les instructions ci-dessus et les placer dans l'étuve (6.2) réglée à une température comprise entre 34 °C et 38 °C pendant 24 h  $\pm$  2 h. Puis incubé à nouveau pour atteindre une durée totale de 48 h  $\pm$  4 h.

NOTE 2 Les colonies d'apparence caractéristique après 24 h  $\pm$  2 h d'incubation peuvent perdre leur aspect caractéristique au bout de 48 h  $\pm$  4 h d'incubation, en raison d'une croissance secondaire avec élargissement du halo d'éclaircissement lors de la seconde phase d'incubation. Un seul comptage au bout de 48 h  $\pm$  4 h peut entraîner des dénombrements faibles ou l'absence totale de dénombrement.

## 9.3 Comptage des colonies

### 9.3.1 Description générale des colonies cultivant sur un milieu BPA

#### 9.3.1.1 Colonies présumées être des staphylocoques à coagulase positive

Les colonies caractéristiques sont noires ou grises, brillantes et convexes (de 1 mm à 1,5 mm de diamètre après 24 h  $\pm$  2 h d'incubation, et de 1,5 mm à 2,5 mm de diamètre après 48 h  $\pm$  4 h d'incubation) et sont entourées d'un halo d'éclaircissement qui peut être partiellement opaque. Après au moins 24 h d'incubation, peut apparaître dans ce halo d'éclaircissement un anneau opalescent immédiatement au contact des colonies.

Les colonies non caractéristiques ont la même taille que les colonies caractéristiques et peuvent présenter l'une des morphologies suivantes:

- colonies noires et brillantes avec ou sans bord blanc étroit; le halo d'éclaircissement est absent ou à peine visible et l'anneau opalescent est absent ou à peine visible;
- colonies grises dépourvues de halo d'éclaircissement.

Les colonies non caractéristiques sont surtout formées par des souches de staphylocoques à coagulase positive contaminant, par exemple, les produits laitiers, les crevettes et les abats. Elles sont moins souvent produites par les souches de staphylocoques à coagulase positive qui contaminent les autres produits.

#### 9.3.1.2 Colonies non présumées être des staphylocoques à coagulase positive

Les autres colonies sont celles éventuellement présentes sur les boîtes et qui n'ont pas l'apparence de colonies caractéristiques ou non caractéristiques décrite en 9.3.1.1 et sont considérées comme faisant partie de la flore annexe.

NOTE Des bactéries appartenant à d'autres genres que les staphylocoques peuvent former des colonies d'aspect similaire à celui des staphylocoques. L'examen microscopique d'une coloration de Gram, avant confirmation, permettra de faire la distinction entre ces autres genres et les staphylocoques.

### 9.3.2 Mode opératoire de comptage des colonies

Après 24 h  $\pm$  2 h d'incubation, marquer sur le fond des boîtes les emplacements des colonies caractéristiques éventuellement présentes.