

ISO/TC 34/SC 9

Secrétariat: AFNOR

Début de vote:
2021-01-29

Vote clos le:
2021-03-26

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

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

**Partie 2:
Méthode utilisant le milieu gélosé au
plasma de lapin et au fibrinogène**

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/64355805-bc5b-425e-a242-ISO/FDIS/6888-2>

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

Part 2: Method using rabbit plasma fibrinogen agar medium

LES DESTINATAIRES DU PRÉSENT PROJET SONT INVITÉS À PRÉSENTER, AVEC LEURS OBSERVATIONS, NOTIFICATION DES DROITS DE PROPRIÉTÉ DONT ILS AURAIENT ÉVENTUELLEMENT CONNAISSANCE ET À FOURNIR UNE DOCUMENTATION EXPLICATIVE.

OUTRE LE FAIT D'ÊTRE EXAMINÉS POUR ÉTABLIR S'ILS SONT ACCEPTABLES À DES FINS INDUSTRIELLES, TECHNOLOGIQUES ET COMMERCIALES, AINSI QUE DU POINT DE VUE DES UTILISATEURS, LES PROJETS DE NORMES INTERNATIONALES DOIVENT PARFOIS ÊTRE CONSIDÉRÉS DU POINT DE VUE DE LEUR POSSIBILITÉ DE DEVENIR DES NORMES POUVANT SERVIR DE RÉFÉRENCE DANS LA RÉGLEMENTATION NATIONALE.

TRAITEMENT PARALLÈLE ISO/CEN



Numéro de référence
ISO/FDIS 6888-2:2021(F)

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/FDIS 6888-2
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/64355805-bc5b-425e-a242-102782f5445b/iso-fdis-6888-2>



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
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	2
3 Termes et définitions	2
4 Principe	2
4.1 Généralités.....	2
4.2 Incubation.....	3
4.3 Dénombrement.....	3
5 Milieux de culture et réactifs	3
6 Équipement et consommables	3
7 Échantillonnage	4
8 Préparation de l'échantillon pour essai	4
9 Mode opératoire (voir la Figure A.1)	4
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 en croissance sur un milieu RPFA.....	5
9.3.2 Mode opératoire de comptage des colonies.....	5
10 Expression des résultats	5
11 Caractéristiques de performance de la méthode	5
11.1 Étude interlaboratoires.....	5
11.2 Limite de répétabilité.....	6
11.3 Limite de reproductibilité.....	6
12 Rapport d'essai	7
13 Assurance qualité	7
Annexe A (normative) Logigramme du mode opératoire	8
Annexe B (normative) Milieux de culture et réactifs	9
Annexe C (informative) Résultats de l'étude interlaboratoires	12
Bibliographie	15

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 le lien suivant: 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 6888-2:1999), qui a fait l'objet d'une révision technique. Elle intègre également l'Amendement de l'ISO 6888-2:1999/Amd 1:2003. 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 de l'ISO 6888-1 et du présent document a été clarifié;
- le document a été aligné sur l'ISO 7218:2007, c'est-à-dire qu'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;
- le mode opératoire sous forme de logigramme à l'Annexe A a été mis à jour;

- les milieux de culture et les réactifs avec essais de performance ont été ajoutés et déplacés à l'[Annexe B](#);
- les essais de performance pour le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène (RPFA) ont été ajoutés;
- les résultats de l'étude interlaboratoires (selon les données de fidélité de l'ISO 6888-2:1999/Amendement 1:2003) 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.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO/FDIS 6888-2](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/64355805-bc5b-425e-a242-102782f5445b/iso-fdis-6888-2>

Introduction

L'ISO 6888-1, le présent document et l'ISO 6888-3 décrivent trois méthodes horizontales pour la détection et le dénombrement de staphylocoques à coagulase positive parmi lesquels se trouvent 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 caractérisation 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, mais elles peuvent être distinguées de ces autres bactéries en utilisant des essais complémentaires non inclus dans le présent document, tels que la sensibilité à la lysostaphine, la production d'hémolysine, de nucléase thermostable et d'acide à partir de mannitol (voir l'ISO 7218 et la Référence [13]).

Les principales modifications techniques listées 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). Ils ont un impact mineur sur les caractéristiques de performance de la méthode.

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

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO/FDIS 6888-2](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/64355805-bc5b-425e-a242-102782f5445b/iso-fdis-6888-2>

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

Partie 2:

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

AVERTISSEMENT — Afin de préserver la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel que les essais de dénombrement des 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.

iTeh STANDARD PREVIEW

1 Domaine d'application (standards.iteh.ai)

Le présent document spécifie une méthode horizontale de dénombrement des staphylocoques à coagulase positive par comptage des colonies obtenues en milieu solide (milieu au plasma de lapin et au fibrinogène) après incubation en aérobiose entre 34 °C et 38 °C (voir la Référence [10]).

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 entièrement appropriée 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 (complètement) 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, l'ISO 6888-1 et le présent document 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 <http://www.electropedia.org/>.

3.1 staphylocoques à coagulase positive
bactéries formant des colonies caractéristiques dans un milieu de culture sélectif (milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène)

Note 1 à l'article: Les colonies caractéristiques sont décrites en 9.3.

3.2 dénombrement des staphylocoques à coagulase positive
détermination du nombre de *staphylocoques à coagulase positive* (3.1) 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 profondeur du milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène, 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 en suivant le ou les modes opératoires conformément à l'ISO 7218.

NOTE Le volume de milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène à ajouter à l'inoculum joue un rôle essentiel dans la méthode et la réaction de coagulase.

4.2 Incubation

Incubation des boîtes entre 34 °C et 38 °C en aérobiose et examen après 24 h et, si nécessaire, après 48 h.

4.3 Dénombrement

Calcul du nombre de staphylocoques à coagulase positive par gramme, par millilitre, par centimètre carré ou par dispositif de prélèvement à partir du nombre de colonies caractéristiques, obtenues sur les boîtes retenues aux niveaux de dilution donnant un résultat significatif 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 milieuxensemencés 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 Boîtes de Petri, stériles, d'environ 90 mm de diamètre, en verre ou en matière plastique.

6.5 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 cônes des pipettes soient munis d'un bouchon en coton non absorbant pour empêcher la contamination lors de la manipulation de cultures microbiennes.

6.6 pH-mètre ayant une précision de lecture de ± 0,01 unité pH, permettant de réaliser des mesures précises à ± 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.

6.7 Réfrigérateur, pouvant fonctionner à 5 °C ± 3 °C.

6.8 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.

6.9 Membranes, d'une porosité de 0,2 µm.

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.

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 (voir la [Figure A.1](#))

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Voir la partie correspondante de la série de normes ISO 6887.

9.2 Ensemencement et incubation

Transférer, à l'aide d'une pipette stérile (6.5), 1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide ou 1 ml de la suspension mère (dilution 10⁻¹) pour les autres produits, dans une boîte de Petri (voir l'[Annexe B](#)). Pour les 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.

Dans chaque boîte de Petri (6.4), verser immédiatement 18 ml à 20 ml de milieu complet (B.2.3) préparé extemporanément de manière à obtenir une profondeur d'au moins 3 mm.

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

Après solidification complète, 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 ± 2 h.

Après 24 h ± 2 h d'incubation, marquer sur le fond des boîtes les emplacements des colonies caractéristiques éventuellement présentes. Si nécessaire, incuber à nouveau toutes les boîtes entre 34 °C et 38 °C pendant 24 h ± 2 h supplémentaires et marquer les nouvelles colonies caractéristiques.

NOTE Même si le milieu RPFA contient un inhibiteur de trypsine, les colonies d'apparence caractéristique après 24 h ± 2 h d'incubation peuvent perdre leur aspect caractéristique au bout de 48 h ± 4 h d'incubation, en raison de processus enzymatiques (trypsine) ou d'une croissance secondaire^[1]. Un seul comptage au bout de 24 h ± 2 h peut entraîner des dénombrements trop faibles ou l'absence totale de dénombrement.

9.3 Comptage des colonies

9.3.1 Description générale des colonies en croissance sur un milieu RPFA

Les colonies caractéristiques sont noires ou grises, petites et entourées d'un halo opaque de précipitation, indiquant une activité de coagulase. Les colonies de *Proteus* peuvent ressembler à celles des staphylocoques à coagulase positive au début de l'incubation. Cependant, elles peuvent être distinguées des staphylocoques après 24 h ± 2 h et 48 h ± 4 h d'incubation, car leurs colonies deviennent plus ou moins brunâtres et commencent à s'étendre.

9.3.2 Mode opératoire de comptage des colonies

À la fin de la période d'incubation (voir 9.2), compter les colonies caractéristiques dans chaque boîte.

Lors de la lecture des boîtes après 24 h, marquer sur le fond des boîtes les emplacements des colonies caractéristiques éventuellement présentes, avant de poursuivre l'incubation.

Si les boîtes sont à nouveau incubées entre 34 °C et 38 °C pendant 24 h ± 2 h, marquer les nouvelles colonies caractéristiques.

Pour le dénombrement, retenir uniquement les 2 boîtes contenant 300 colonies maximum, dont 100 colonies caractéristiques.

L'une des boîtes doit renfermer au moins 10 colonies.

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.

Lorsqu'il est attendu que le nombre d'ufc soit au niveau ou proche de la limite de détermination, il est préférable d'utiliser des boîtes en double. En cas d'utilisation de boîtes en double exemplaire, il convient que le minimum pour la somme de colonies soit 10. Dans ce cas, il est attendu que le niveau de contamination soit supérieur à 5 ufc/ml pour les échantillons liquides ou supérieur à 50 ufc/g pour les échantillons solides.

10 Expression des résultats

Pour le calcul des résultats, suivre le ou les modes opératoires de l'ISO 7218. Calculer et reporter les résultats comme le nombre de staphylocoques à coagulase positive, exprimé en ufc (unité formant colonie), par gramme, millilitre, centimètre carré ou dispositif de prélèvement.

Si aucune colonie du micro-organisme cible n'a été détectée, suivre l'ISO 7218 pour exprimer les résultats des cas particuliers.

11 Caractéristiques de performance de la méthode

11.1 Étude interlaboratoires

Les résultats de l'étude interlaboratoires visant à déterminer la fidélité de la méthode sont résumés à l'[Annexe C](#). Les limites de répétabilité et de reproductibilité ont été déterminées à l'aide de quatre