**Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive**

**(*Staphylococcus aureus* et autres espèces) « EN ISO 6888-1:1999 »**

(Autres espèces comme *S. intermedius, S. pseudintermedius et S. hyicus*)

**1. Domaine d'application**

La présente Norme internationale 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 sur milieu solide (milieu de Baird-Parker) après incubation en aérobiose à 35 °C ou à 37 °C.

**2. Termes et définitions**

* Staphylocoques à coagulase positive : bactéries qui forment des colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques à la surface d'un milieu de culture sélectif et qui donnent une réaction fortement positive à la coagulase, lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée dans la présente norme internationale.
* 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 norme internationale.
* La coagulase est une enzyme caractéristique des staphylocoques pathogènes

**3. Principe**

* Ensemencement en surface d'un milieu de culture gélosé sélectif, coulé dans deux boîtes de Pétri, avec une quantité déterminée de l’échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou de 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.
* Incubation des boîtes à 35 °C ou à 37 °C en aérobiose et une examination après 24 h et 48 h.
* Calcul du nombre de staphylocoques à coagulase positive  par millilitre ou par gramme d'échantillon, à partir du nombre de colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques obtenues dans les boîtes retenues aux niveaux de dilutions donnant un résultat significatif, et confirmées par l’essai de la coagulase.

**4. Diluants et milieux de culture**

**4.1. Diluants** **«**ISO 6887 » : Solution de peptone-sel **ou** eau peptonée tamponnée.

**4.2. Milieu complet :** Gélose de Baird-Parker ; sa composition :

* Milieu de base (100 ml): Digestat enzymatique de caséine (10.0 g), extrait de levure (1.0 g), extrait de viande (5.0 g), pyruvate de sodium (g 10.0 g/L), glycine (12.0 g), chlorure de lithium (5.0 g), agar (12 à 22 g), eau à un volume final de 1000 ml.
* Solution de tellurite de potassium (1,0 ml)
* Emulsion de jaune d’œuf (5,0 ml)
* Solution Sulfamezathine (2,5 ml)

**4.3. Préparation des boites de milieu gélosé**

Couler la quantité nécessaire du milieu complet dans les boîtes de Petri stériles et laisser solidifier, de façon à obtenir une épaisseur de gélose d´environ 4 mm. Les boites peuvent être conservées, avant séchage, 24 heures au maximum à +3 °C ± 2 °C. Avant l'emploi, sécher les plats de préférence en retournant les boîtes, dans une étuve réglée à une température entre 25 °C et 50 °C, jusqu'à ce que les gouttelettes aient disparu de la surface du milieu.

**4.4. Bouillon cœur-cervelle :** sa composition : Digestat enzymatique de caséine (10.0 g), extrait de cervelle (12,5 g), extrait de cœur (5,0 g), glucose (2,0 g), chlorure de sodium (5,0 g)

Hydrogénophosphate disodique anhydre (2,5 g), eau (1000 ml).

**4.5. Plasma du lapin :** sa composition : plasma déshydraté de lapin, EDTA (acide éthylène-diamine tétraacétique).

**5. Appareillage et verrerie**

Four, autoclave, étuve, boîtes de Pétri, pipettes, bain d’eau (47 ± 2 °C), appareil de comptage de colonies, tubes à essais ou fioles, pipettes pasteur, pipettes (1, 2, 10 ml), étaleurs, anse bouclée et fil droit, enceinte de séchage (étuve, hotte à flux laminaire).

**6. Échantillonnage**

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié pendant le transport ou le stockage.

**7. Mode opératoire**

**7.1. Prise d’essai, suspension mère et dilutions «**ISO 6887 » :

**7.2. Ensemencement et incubation**

* Transférer avec une pipette stérile, dans chacune des boîtescontenant le milieu de culture gélosé, 0.1 ml de l’échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 0.1 ml de la suspension mère dans le cas d’autres produits (dilution à 10−1). à l’aide d’une nouvelle pipette stérile, répéter, ces opérations avec la dilution 10-2, et pour d'autres dilutions décimales si nécessaire.
* Etaler soigneusement l’inoculum le plus rapidement possible à la surface du milieu gélosé en utilisant un étaleur stérile en verre ou en matière plastique pour chaque boite, et en essayant de ne pas toucher les bords de la boite avec l’étaleur. Laisser sécher les boites, couvercle fermé, pendant 15 minutes environ à la température ambiante de laboratoire.
* Retourner les boîtes préparées et les faire incuber à 35 °C ou 37 °C pendant 24 h ± 2 h et ré-incuber 24 h ± 2 h supplémentaires.

**7.3. Sélection des boites et interprétation**

* Après 24 h ± 2 h d’incubation, marquer sur le fond des boites les colonies caractéristiques éventuellement présentes. Incuber à nouveau toutes les boites à 35 °C ou à 37 °C) pendant 24 h ± 2 h supplémentaires, et marquer toutes les nouvelles colonies caractéristiques ; marquer également les colonies non caractéristiques éventuellement présentes.
* Il faut retenir pour le dénombrement que les boites renfermant au maximum 300 colonies avec 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques au niveau de deux dilutions successives. Il faut qu’une des boites renferme au moins 15 colonies. Choisir en vue de la confirmation, un nombre déterminé A (en général 5 colonies caractéristiques s'il y a seulement des colonies caractéristiques, ou 5 colonies non caractéristiques s'il y a seulement des colonies non caractéristiques, ou 5 colonies caractéristiques et 5 colonies caractéristiques si les deux types sont présents, à partir de chaque boite).
* Les colonies caractéristiques sont noires ou grises, brillantes et convexes (1 mm à 1.5 mm de diamètre après 24 h d’incubation, et 1.5 mm à 2.5 mm de diamètre après 48 h d’incubation) et entourées d’une auréole d’éclaircissement qui peut être partiellement opaque. Après 24 h d’incubation, dans cette zone claire peut apparaître 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, la zone claire est absente ou à peine visible et l'anneau opalescent est absent ou à peine visible ;
* colonies grises dépourvues de zone claire.

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

* Les autres colonies présentes dans les boites, ne montrant pas l'aspect caractéristique ou non caractéristique, sont considérées comme flore de base.

**7.4. Confirmation**

Prélever une partie de chaque colonie sélectionnée à l’aide d’un fil stérile, et l’ensemencer dans un tube de bouillon cœur-cervelle.

Faire incuber à 35 ou 37 °C pendant 20 +/- 2 h.

Ajouter stérilement 0.1 ml de chaque culture à 0.3 ml de plasma de lapin dans des tubes stériles à hémolyse, et incuber à 35 ou 37 °C.

Examiner la coagulation du plasma après 4 h à 6 h. Ré-incuber et examiner de nouveau à 24 h.

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

A titre de contrôle, ajouter 0.1 ml de bouillon cœur-cervelle stérile à la quantité recommandée de plasma de lapin et faire incuber sans ensemencement. Pour que la réaction soit valable, le plasma du tube témoin ne devra pas montrer de signes de coagulation.

**8. Expression des résultats**

**8.1. Calcul du nombre a de staphylocoques à coagulase positive identifiés pour chaque boite retenue :**

Calculer, pour chacune des boites, le nombre a de staphylocoques à coagulase positive identifiées, selon l’équation :

 bc bnc

a =--------- x Cc + ---------- x Cnc

 Ac Anc

Où :

Ac : est le nombre de colonies caractéristiques repiquées ;

Anc : est le nombre de colonies non caractéristiques repiquées ;

bc : est le nombre de colonies caractéristiques de staphylocoques présumés qui sont à coagulase positive ;

bnc : est le nombre de colonies non caractéristiques de staphylocoques présumés qui sont à coagulase positive ;

Cc : est le nombre total de colonies caractéristiques de staphylocoques à coagulase positive présumés pour la boite.

Cnc : est le nombre total de colonies non caractéristiques de staphylocoques à coagulase positive présumés pour la boite.

Arrondir à un nombre entier. Pour cela, si le dernier chiffre est inférieur à 5 , le chiffre précédent n’est pas modifié ; si le dernier chiffre est supérieur ou égal à 5, le chiffre précédent est augmenté d’une unité.

**8.2. Calcul du nombre N de staphylocoques à coagulase positive identifiés présents dans la prise d’essai**

Pour ces boites contenant au maximum 300 colonies avec 150 caractéristiques et/ou non caractéristiques pour deux dilutions consécutives, calculer le nombre de staphylocoques à coagulase positive pour chaque boite tel qu’il est indiqué et calculer le nombre N de staphylocoques à coagulase positive identifiés présents dans l’échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée à partir des deux dilutions successives à l’aide de l’équation :

 ∑ a

N = -------------------------

 V (n1 + 0.1 n2) d

Où :

- ∑ a : est la somme des colonies staphylocoques à coagulase-positive comptées sur toutes les boîtes retenues.

- V : est le volume de l´inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres;

- n1 : est le nombre des boîtes retenues à la première dilution;

- n2 : est le nombre des boîtes retenues à la seconde dilution;

- d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs. Pour cela, si le dernier chiffre est inférieur à 5, le chiffre précédent n’est pas modifié ; si le dernier chiffre est supérieur ou égal à 5, le chiffre précédent est augmenté d’une unité. Procéder de proche en proche jusqu’à ce que l’on ait deux chiffres significatifs.

Noter comme résultat le nombre de staphylocoque à coagulase positive par millimètre (produit liquide) ou par gramme (autre produit), exprimé par un nombre compris entre 1.0 et 9.9 multiplié par 10x où x est la puissance appropriée de 10.

**9. Interprétation des résultats**

Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires

**Remarques :**

* La présence de *Staphylococcus intermedius, Staphylococcus pseudintermedius et Staphylococcus hyicus* est rare dans les aliments contrairement à *Staphylococcus aureus*
* La gélose Baird-Parker contient les sources de carbone et d'azote nécessaires à la croissance
* Le chlorure de lithium inhibe les germes Gram –
* la présence de tellurite favorise l'inhibition de la microflore à Gram +
* La coloration noire des colonies de *Staphylococcus* est due à la réduction du tellurite de potassium en tellure métallique noir
* La sulfaméthazine inhibe la presque totalité des *Proteus* et en conséquence limite fortement l'envahissement du milieu par ces microorganismes
* Les staphylocoques qui produisent de la lécithinase dégradent le jaune d'œuf (lipolyse) qui contient des lipoprotéines, provoquant ainsi la formation de zones claires autour des colonies correspondantes
* L'activité de la lipase produite par les *staphylococcus* peut entraîner l'apparition d'une zone de précipitation opaque
* Le plasma de lapin a été choisi pour son excellente spécificité vis-à-vis de la coagulase staphylococcique et son aptitude à produire rapidement un coagulum en formant une staphylothrombine à partir de la prothrombine du plasma

