

GELOSE EASY STAPH

DENOMBREMENT DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE

1 DOMAINE D'UTILISATION

EASY STAPH est une méthode alternative de dénombrement des *Staphylococcus* à coagulase positive dans les produits alimentaires, les produits de l'alimentation animale et les produits de l'environnement. Ne nécessitant pas de confirmations, la méthode permet de dénombrer les *Staphylococcus* pathogènes en 22 heures au lieu de 48 heures par la méthode normalisée NF EN ISO 6888-2.

Le milieu permet l'ensemencement en surface, en profondeur ou par la méthode Spiral.

La méthode est certifiée NF VALIDATION selon le protocole de validation ISO 16140-2 :2016, pour tous produits d'alimentation humaine et pour les échantillons de l'environnement de production.



BKR 23/10 - 12/15
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE
POUR L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFNOR Certification <http://nf-validation.afnor.org>

Se référer au certificat disponible sur le site NF VALIDATION pour la date de fin de validité de la méthode.
La méthode de référence utilisée pour la validation est la norme NF EN ISO 6888-2 : 2021.

2 PRINCIPES

Le milieu de base a été spécialement formulé pour permettre le développement des *Staphylococcus* à coagulase positive en 22 heures.

L'optimisation du système sélectif a permis d'améliorer l'inhibition de la flore secondaire habituellement rencontrée sur les géloses Baird Parker.

Le supplément lyophilisé EASY STAPH correspond à un supplément Plasma de Lapin Fibrinogène optimisé. La composition a été ajustée de façon à favoriser le développement des halos de fibrine en 22 heures.

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. Il est renforcé en fibrinogène bovin. La staphylothrombine agit en coupant les fibrinopeptides A et B du fibrinogène, entraînant un processus de polymérisation qui se traduit par l'apparition de fibrine autour des colonies.
L'inhibiteur de trypsine extrait du soja évite la fibrinolyse.

3 FORMULE-TYPE

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Pour 1 L de milieu complet

- Peptones.....	19,4 g
- Activateurs	21,7 g
- Système tampon	1,4 g
- Système sélectif.....	4,5 g
- Agar agar bactériologique	14,4 g
- Fibrinogène bovin.....	5,3 g
- Plasma de lapin, EDTA	25 mL
- Inhibiteur de trypsine	25 mg
- Tellurite de potassium	25 mg

pH du milieu complet prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,3 ± 0,3.

Pour 68,2 g de base déshydratée (BK216)

- Peptones21,6 g
- Activateurs.....24,1 g
- Système tampon1,5 g
- Système sélectif.....5,0 g
- Agar agar bactériologique16,0 g

Pour 190 mL de base prêt-à-l'emploi (BM185) / kit BT012

- Peptones4,3 g
- Activateurs.....4,8 g
- Système tampon0,3 g
- Système sélectif1,0 g
- Agar agar bactériologique3,2 g

Pour un flacon de supplément BS090, BS091 / kit BT013 (Qs 100 mL),

- Fibrinogène bovin0,53 g
- Plasma de lapin, EDTA2,5 mL
- Inhibiteur de trypsine2,5 mg
- Tellurite de potassium2,5 mg

Pour un flacon de supplément BS086 / kit BT012

- Fibrinogène bovin1,06 g
- Plasma de lapin, EDTA5 mL
- Inhibiteur de trypsine5 mg
- Tellurite de potassium5 mg

Pour un flacon de supplément BS097 (Qs 500 mL)

- Fibrinogène bovin2,65 g
- Plasma de lapin, EDTA12,5 mL
- Inhibiteur de trypsine12,5 mg
- Tellurite de potassium12,5 mg

4 PREPARATION

Préparation du milieu déshydraté :

- Mettre en suspension 68,2 g de milieu déshydraté (BK216) dans 1 L d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution complète.
- Répartir en flacons, à raison de 90 mL ou de multiples de 90 mL.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.

✓ **Reconstitution :**
68,2 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

Réhydratation des suppléments lyophilisés

- Reprendre le lyophilisat en y ajoutant aseptiquement le volume d'eau distillée stérile précisé ci-dessous.
 - Qsp 100 mL de milieu complet (BS090, kit BT013 (BS091)) : 10 mL d'eau stérile
 - Qsp 200 mL de milieu complet, **spécifique au kit BT012 (BS086)** : 10 mL d'eau stérile
 - Qsp 500 mL de milieu complet (BS097) : 50 mL d'eau stérile
- La dissolution sera d'autant plus rapide que l'eau sera chaude (utiliser une eau dont la température sera ambiante ou préchauffée, sans dépasser 44 °C).
- Agiter le flacon plusieurs fois de façon à assurer une complète dissolution, tout en évitant la formation de mousse. La mise en solution n'est pas toujours immédiatement obtenue. Il est possible d'accélérer la dissolution en agitant le flacon au moyen d'un agitateur mécanique de type Vortex. Il est nécessaire que le produit soit totalement dissous avant d'être utilisé.

Préparation du milieu complet :

- Ajouter stérilement 10 mL de supplément spécifique *Easy Staph* (BS090, BS097) par fraction de 90 mL de milieu de base préparé à partir du milieu déshydraté.
- Utiliser aussitôt, pour l'ensemencement de boîtes en profondeur ou pour couler en boîtes de Petri.

Utilisation du kit BT01208 (Qsp 200 mL)

- Faire fondre le milieu de base compris dans le kit pendant le minimum de temps nécessaire à sa reliqufaction totale. Refroidir et maintenir à 44-47 °C.
- Reprendre le lyophilisat avec 10 mL d'eau stérile.
- Ajouter stérilement 10 mL de supplément spécifique *EASY STAPH* (BS086) à 190 mL de milieu de base (BM185).
- Utiliser aussitôt, pour l'ensemencement de boîtes en profondeur ou pour couler en boîtes de Petri.

Utilisation du kit BT01308 (Qsp 100 mL)

- Faire fondre le milieu de base compris dans le kit pendant le minimum de temps nécessaire à sa reliqufaction totale. Refroidir et maintenir à 44-47 °C.
- Reprendre le lyophilisat avec 10 mL d'eau stérile.
- Ajouter stérilement 10 mL de supplément spécifique *EASY STAPH* (BS091) à 90 mL de milieu de base (BM189).
- Utiliser aussitôt, pour l'ensemencement de boîtes en profondeur ou pour couler en boîtes de Petri.

NOTE :

Le milieu complet ne se conserve pas à 44-47 °C.

5 MODE D'EMPLOI

Respecter les bonnes pratiques de laboratoire.

Se reporter à la norme NF EN ISO 7218 pour l'ensemencement, le comptage des colonies et pour les calculs et expression des résultats.

Préparer la suspension mère de l'échantillon et les dilutions décimales selon les règles définies dans les normes ISO 6887 correspondantes et/ou ISO 18593.

Ensemencement en profondeur

- Transférer 1 mL de l'inoculum et de ses dilutions décimales dans des boîtes de Petri 90 mm stériles.
- Couler environ 15 mL de milieu complet préalablement reconstitué.
- Homogénéiser parfaitement.
- Laisser solidifier sur une surface froide.
- Incuber à 37 ± 1 °C pendant 24 ± 2 heures.

✓ **Ensemencement :**
1 mL En profondeur

✓ **Incubation :**
24 h à 37°C

Dans le cadre de la recherche de petits nombres, se référer à la norme ISO 7218.

Ensemencement en surface

- A la surface des boîtes préparées ou du milieu pré-coulé (BM187) ramené préalablement à température ambiante, transférer 0,1 mL de l'échantillon à analyser ou de ses dilutions décimales.
- Etaler l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur stérile.
- Incuber à 37 ± 1 °C pendant 24 ± 2 heures.

✓ **Ensemencement :**
0,1 mL en surface

✓ **Incubation :**
24 h à 37 ± 1 °C

NOTES :

- Le dénombrement utilisant une seule boîte et une seule dilution est une option certifiée NF Validation par AFNOR Certification. Dans ce contexte, les exigences de la norme ISO 7218 concernant l'utilisation de deux dilutions successives ou de deux boîtes d'une même dilution ne peuvent pas être appliquées (voir les paragraphes « Ensemencement » et « Calculs et expression des résultats »).

- La méthode est validée également avec la technologie d'ensemencement Spiral. L'ensemencement peut être en mode logarithmique de 50 ou 100 µL.

- La limite de dénombrement peut être diminuée d'un facteur de 10 en ensemencant 1,0 mL de l'échantillon ou de la suspension mère sur la surface de trois petites boîtes de gélose (90 mm).

- Dans le cadre de l'estimation de petits nombres, se référer à la norme ISO 7218.

- La durée d'incubation est de 24 ± 2 heures, toutefois, pour des raisons d'organisation des laboratoires, les boîtes peuvent être incubées :

jusqu'à 72 heures pour l'ensemencement en profondeur et la technologie Spiral,
jusqu'à 48 heures pour l'étalement en surface.

- Pour les prélèvements de surface après nettoyage, suspectés de présenter des résidus de désinfectants, il est recommandé d'utiliser des écouvillons, éponges, chiffonnettes déjà imbibés de solution neutralisante ou d'utiliser un diluant contenant 10% de neutralisants universels.

6 LECTURE

Les staphylocoques à coagulase positive sont caractérisés sur la gélose par la formation de colonies blanches, grises ou noires entourées d'un halo opaque de fibrine net, stable et bien visible.

Retenir et dénombrer les boîtes contenant moins de 100 colonies caractéristiques.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

7 CONTROLE QUALITE

Milieux de base déshydratés : poudre blanc crème, fluide et homogène.

Suppléments EASY STAPH : lyophilisat blanc à rosâtre, donnant après reconstitution une solution ambrée, limpide à très légèrement opalescente.

Milieu préparé complet : gélose ambrée.

Microorganismes	Croissance (Rapport de productivité : P_R)	Caractéristiques
<i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00034	$P_R \geq 50 \%$	Colonies avec halo opaque
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> WDCM 00159	Ralentie, score 0-1	Colonies sans halo opaque
<i>Escherichia coli</i> WDCM 00013	Inhibée, score 0	-

8 CONSERVATION

Milieux de base déshydratés : 2-30 °C.

Suppléments EASY STAPH : 2-8 °C.

Kits : 2-8 °C.

Milieux pré-coulés en boîtes : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Milieu de base préparé en flacons (*) : 6 mois à 2-8 °C.

Supplément lyophilisé réhydraté (*) : 8 jours à 2-8 °C. Réchauffer entre 25 et 37 °C avant utilisation. Le précipité blanc observé à 2-8 °C disparaît avec le réchauffement entre 25 et 37 °C.

Milieu complet préparé en boîtes (*) : 1 mois à 2-8 °C, à l'abri de la lumière.

Milieu complet préparé en flacons (*) : Utiliser aussitôt.

(*) Valeur indicative déterminée dans les conditions standards de préparation, suivant les instructions du fabricant.

9 PRESENTATION

Milieux de base déshydratés

Flacon de 500 g BK216HA

Seau de 5 kg BK216GC

Suppléments EASY STAPH

Coffret de 8 flacons qsp 100 mL BS09008

Flacon Qsp 500 mL BS09708

Kit (6 * 200 mL)

6 flacons de 190 mL de milieu de base et 6 suppléments lyophilisés BT01208

Kit (6 * 100 mL)

6 flacons de 90 mL de milieu de base et 6 suppléments lyophilisés BT01308

Milieux complets pré-coulés en boîtes de Petri (Ø 90 mm)

Coffret de 20 boîtes BM18708

Coffret de 120 boîtes BM19008

10 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Baird-Parker, A.C... 1962. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. *Journal of Applied Bacteriology*, **25** : 12-19.

Hauschild, A.H., Park, C.E. and Hilsheimer, R.. 1979. A modified pork plasma agar for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods. *Canadian Journal of Microbiology*, **25** : 1052-1057.

Beckers, H.J., van Leusden, F.M., Bindschedler, O. and Guerraz, D ... 1984. Evaluation of a pour-plate system with a rabbit plasma-bovine fibrinogen agar for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in food. *Canadian Journal of Microbiology*, **30** : 470-474.

NF EN ISO 6888-2. Septembre 2021. 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. Modifiée en septembre 2023 par l'amendement A1.

NF EN ISO 7218. Juillet 2024. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Exigences générales et recommandations pour les examens microbiologiques.

NF EN ISO 18593. Juillet 2018. Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, au moyen de boîtes de contact et d'écouvillons.

NF EN ISO 16140-2. Septembre 2016. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Validation des méthodes - Partie 2 : protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence - Microbiologie des aliments.

11 AUTRES INFORMATIONS

Code document : EASY STAPH_V08 (fr)
Date création : 12-2015
Date révision : 03-2026
Motif révision : Extension dénombrement optionnel sur une boîte, compléments divers

Gélose EASY STAPH

Dénombrement des *Staphylococcus* à coagulase positive.

Lecture :

Croissance obtenue après 24 heures d'incubation à 37 °C.



Staphylococcus aureus

Colonie caractéristique :
entourée d'un halo de fibrine